

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра морфологии и экологии животных

Мониторинг заселения каштана конского обыкновенного
(*Aesculus hippocastanum*) каштановой минирующей молью
(*Cameraria ohridella*) на территории Саратова и Хвалынска

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ
Студентки 2 курса 242 группы
Направление подготовки магистратуры 06.04.01 «Биология»
Биологического факультета
Еремакиной Анастасии Викторовны

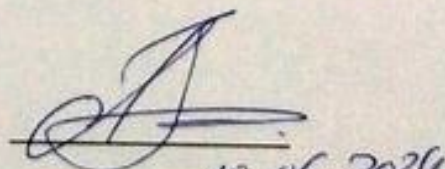
Научный руководитель
профессор, д. б. н.



10.06.2024

В. В. АНИКИН

Зав. кафедрой
профессор, д. б. н.



10.06.2024

В. В. АНИКИН

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность данной работы обусловлена тем, что охридский минер наносит существенный вред насаждениям конского каштана обыкновенного, являясь переносчиком фитопатогенных бактерий и грибов, в результате чего растение становится легкой мишенью для развития различных бактериальных и грибковых инфекций.

Объект исследования – растения конского каштана обыкновенного и гусеницы каштановой минирующей моли.

Новизна данного исследования заключается в том, что на момент начала исследований данных по грибковым заболеваниям и ассоциативным микроорганизмам, которые сопутствуют охридскому минеру, в Поволжском регионе не было.

Цель исследования – выявление закономерностей заселения насаждений каштана конского обыкновенного (*Aesculus hippocastanum*) и возможности переноса растительных фитопатогенов охридским минером (*Cameraria ohridella*) из отряда Lepidoptera на территории Саратова и Хвалынского.

Задачи исследования:

1. Собрать листья конского каштана в гг. Саратове и Хвалынске с выбранных точек наблюдения. Изучить заселенность деревьев конского каштана каштановой молью в гг. Саратове и Хвалынске разных поколений.

2. Посеять на чашки Петри пробы «чистых» листьев конского каштана (контроль), листьев с пустыми минами, куколок, гусениц и бабочек охридского минера из гг. Саратова и Хвалынского, а в качестве сравнения из гг. Пензы, Самары, Вольска, Нижнего Новгорода, Санкт-Петербурга (России) и Йенчепинга (Швеции).

3. Провести идентификацию грибов и бактерий, переносимых каштановой молью.

4. Провести статистический анализ полученных результатов.

Краткая характеристика материалов. Во введении сформулирована актуальность работы, поставлены цель и задачи исследований, определена научная новизна. Первая глава «Обзор литературы» посвящена наиболее актуальным и важным исследованиям по изучаемому виду насекомого. Вторая глава «Материалы и методы» посвящена описанию районов исследования; методам сбора растений; разбора собранного материала и отбора проб; сбора и последующего воспитания гусениц; культивирования микроорганизмов на различных питательных средах; количественного учёта бактерий и грибов; изучения биохимической активности и идентификации видов. В третьей главе «Результаты исследования» представлен анализ результатов собственных двухлетних исследований. На основании проделанной работы сделаны выводы.

Структура и объем работы. Работа изложена на 121 странице машинописного текста и включает в себя введение, 3 главы с 17 таблицами, 30 рисунками, выводы и 8 приложений. Список использованных источников содержит 80 наименований, из которых на русском языке 47, на иностранном - 33.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1 Обзор литературы

В данной главе рассматриваются литературные источники, посвященные изучаемому виду насекомого. Приводятся данные систематики, морфологии и развития *Cameraria ohridella* [1]. Приводится история появления и распространения *Cameraria ohridella* в странах Европы и России [2]. Был рассмотрен вопрос способов распространения *Cameraria ohridella* и ее вредоносности [3-4]. Были рассмотрены работы по изучению естественных врагов *Cameraria ohridella* [1]. Дано подробное описание ассоциативных микроорганизмов *Cameraria ohridella* [5-6]. Также приведены методы борьбы с данным инвазивным видом [7-8].

2 Материалы и методы

Работа проводилась на базе кафедр морфологии и экологии животных, микробиологии и физиологии растений СГУ имени Н. Г. Чернышевского с использованием стандартных энтомологических и микробиологических методов. В ходе энтомологического исследования за 2022-2023 года был проведен сбор 162 листьев конского каштана обыкновенного в г. Саратове за три поколения (с июня по август), собранных с выбранных точек наблюдения (ул. Астраханской, Большой Садовой и Набережной Космонавтов) и 39 листьев в г. Хвалынске за первое поколение, собранных на ул. Советской, Луначарского и Ленина. Материал из гг. Пензы и Самары в 2022 году, а также из гг. Нижнего Новгорода, Санкт-Петербурга, Вольска и Йенчепинга в 2023 году был предоставлен доктором биологических наук, профессором В. В. Аникиным.

Разбор материала осуществлялся на кафедре морфологии и экологии животных под биноклем Carl Zeiss Primo Star с целью выявления количества мин и стадий развития каштановой моли в каждой из них при помощи пинцета. Со всех точек были отобраны пробы «чистых» листьев конского каштана обыкновенного, листьев с пустыми минами, гусениц каштановой минирующей моли и куколок (с 5 повторностями для всех типов проб) в отдельные

стерильные эппендорфы. Выведение бабочек осуществлялось при помощи методики сбора и последующего воспитания гусениц.

В ходе микробиологического исследования для изучения эндофитов каштана конского проводился посев листьев растения, стадий развития насекомого и пустых мин на среды ГРМ и PDA, изучение биологической активности и идентификация видов. Были определены видовой состав, индекс встречаемости (ИВ) и количественные показатели (КОЕ/г) микроорганизмов.

Количественный учет выделенных видов микроорганизмов проводился на первичных посевах сред ГРМ для бактерий и PDA для грибов, далее культуры отсевали на скошенную среду с целью дальнейшего изучения биохимических свойств, а также идентификации полученных видов. Идентификация культур осуществлялась на основании изучения фенотипических свойств изолированных видов с помощью определителя Берджи для бактерий и определителей Саттона и Благовещенской для грибов.

Обработка полученных данных и визуализация проводились с помощью программ Statistica (версия 6.0), Cluster Analysis, Past4.16c, ABYS online и Microsoft Office Excel. Различия считались статистически значимыми.

3 Результаты исследований

3.1 Заселенность каштанов и микробиота *Cameraria ohridella* в 2022 г.

По результатам энтомологического исследования, куда вошли данные минимума, максимума и медианы степени поражения листьев конского каштана охридским минером на деревьях выбранных точек наблюдения в гг. Саратове и Хвалынске, было установлено, что степень поражения охридским минером листьев каштана увеличилась к концу третьего поколения в 33.5 раз в г. Саратове за 2022 год. В течение первого поколения каштановой моли в г. Саратове степень заселения составляла 1.6 %. Ко второму поколению гусеницы способствовали поражению до 15.9 % листовой площади. Тогда как уже к третьему поколению произошло окончательное разрушение листьев, составляя 53.6 %. В течение первого поколения каштановой моли в

г. Хвалынске степень заселения составляла 1.03 %. Степень поражения каштановой молью в г. Саратове за первое поколение выше на 0.6 %, чем показатель в г. Хвалынске.

При сравнении всех точек за 2022 год объем выборки $n < 30$, проводить проверку на нормальность распределения значений не имеет смысла, поэтому в данном случае принялось решение о выборе коэффициента ранговой корреляции r -Спирмена. В первом поколении наиболее похожи оказались данные с ул. Большой Садовой и Набережной Космонавтов ($r_s = 0.96$). При сравнении гг. Саратова и Хвалынска было выявлено, что данные с улиц первого города практически одинаково коррелируют с данными улиц второго города. Данные из г. Хвалынска оказались наиболее похожи на данные, полученные с ул. Астраханской г. Саратова ($r_s = 0.66$). Во втором поколении наиболее похожи оказались данные с ул. Астраханской и Набережной Космонавтов ($r_s = 0.97$). В третьем поколении было выявлено, что данные улиц г. Саратова одинаково коррелируют между собой. Наибольшее сходство оказалось между данными с ул. Большой Садовой и Астраханской, а также ул. Большой Садовой и Набережной Космонавтов ($r_s = 0.99$).

По результатам микробиологического исследования в г. Саратове всего было выделено 66 видов бактерий и 42 вида грибов. За первое поколение было обнаружено 20 видов бактерий и 6 видов грибов, за второе поколение – 22 вида бактерий и 11 видов грибов, тогда как за третье поколение в материале было выделено 24 вида бактерий и 25 видов грибов. Наибольшее количество видов бактерий во всех поколениях относились к роду *Bacillus*. Сапрофитными бактериями оказались почти все бактерии кроме вида *Bacillus pumilus*. Были выделены и энтомопатогенные бактерии, среди которых виды *B. mycoides* и *B. thuringiensis*. По количеству выделенных из проб фитопатогенных видов грибов в 1 поколении доминировал род *Aspergillus*, во 2 поколении – рода *Aspergillus* и *Fusarium*, а в 3 поколении – род *Fusarium*.

В Хвалынске было выделено 17 видов бактерий и 8 видов грибов. К фитопатогенным микроорганизмам была отнесена бактерия вида *Bacillus*

pumilus и виды родов *Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria* и *Rhizopus*. Были выделены и энтомопатогенные бактерии, среди которых вид *B. mycooides*.

С целью выявления оригинальности аборигенных видов бактерий и грибов в гг. Саратове и Хвалынске было проведено сравнение с другими городами Поволжского региона. Из проб г. Самары изолировано 8 видов бактерий и 8 видов грибов, тогда как из проб г. Пензы – 5 видов бактерий и 6 видов грибов. Сапрофитными микроорганизмами оказались почти все выделенные бактерии кроме фитопатогенной бактерии вида *Bacillus pumilus*. Были выделены энтомопатогенные бактерии видов *B. mycooides* и *B. thuringiensis*. К фитопатогенным грибам были отнесены виды всех родов.

3.2 Заселенность каштанов и микробиота *Cameraria ohridella* в 2023 г.

По результатам энтомологического исследования степень поражения охридским минером листьев каштана увеличилась к концу третьего поколения в 5.6 раз в г. Саратове за 2023 год. В течение первого поколения каштановой моли в г. Саратове степень заселения составляла 9.7 %. Ко второму поколению гусеницы способствовали поражению до 22.8 % листовой площади. Тогда как уже к третьему поколению произошло окончательное разрушение листьев, составляя 54.1 %. В течение первого поколения каштановой моли в г. Хвалынске степень заселения составляла 3 %. Степень поражения каштановой молью в Саратове за первое поколение выше в 3.2 раза, чем показатель в Хвалынске. Оба показателя были выше в 2023 году, чем в 2022 году, для Саратова степень заселения была больше в 6 раз, а для Хвалынска – в 2.9 раз.

При сравнении всех точек за 2023 год в первом поколении было выявлено, что данные улиц г. Саратова практически одинаково коррелируют между собой. Наиболее похожи оказались данные с ул. Большой Садовой и Астраханской ($r_s = 0.99$). При сравнении гг. Саратова и Хвалынска было отмечено, что данные с улиц первого города практически одинаково коррелируют с данными улиц второго города. Данные из г. Хвалынска оказались наиболее похожи на данные, полученные с Набережной Космонавтов

г. Саратова ($r_s = 0.85$). Во втором поколении оказалось, что данные улиц г. Саратова практически одинаково коррелируют между собой. Наибольшее сходство оказалось между данными с ул. Астраханской и Набережной Космонавтов, а также ул. Большой Садовой и Набережной Космонавтов ($r_s = 0.96$). В третьем поколении было выявлено, что данные улиц г. Саратова одинаково коррелируют между собой. Наибольшее сходство оказалось между данными с ул. Большой Садовой и Астраханской ($r_s = 0.99$).

Для 2022 и 2023 годов за первое поколение каштановая минирующая моль заселяет только нижний ярус, за второе поколение она минирует нижний и средний ярусы, тогда как за третье поколение – все три яруса конского каштана обыкновенного. Таким образом, при смене поколений гусениц охридского минера в период с июня по август наблюдалось полное заселение охридским минером всех трех ярусов каштана конского обыкновенного, что визуализировано на рисунке 1.

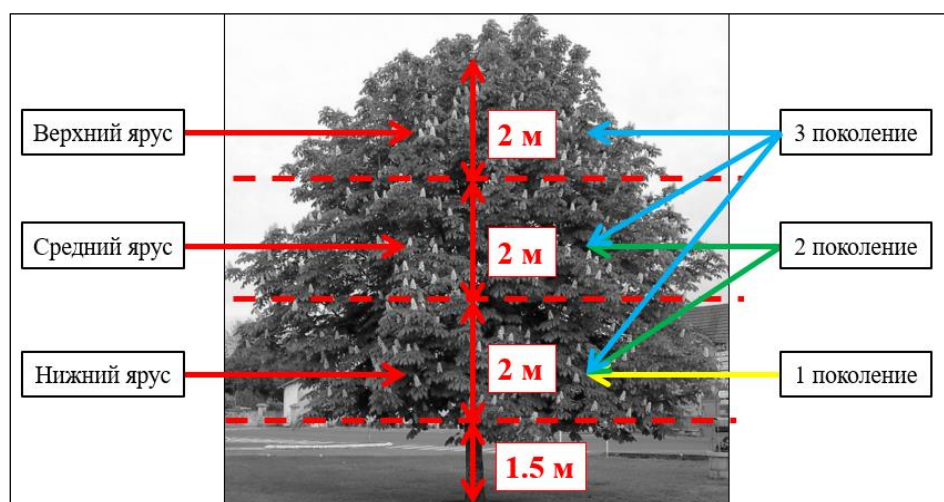


Рисунок 1 – Заселение охридским минером каштана конского по поколениям

По результатам микробиологического исследования в г. Саратове всего было выделено 49 видов бактерий и 39 видов грибов. За первое поколение было отмечено 13 видов бактерий и 11 видов грибов, за второе поколение – 15 видов бактерий и 13 видов грибов, тогда как за третье поколение в материале были найдены 21 вид бактерий и 15 видов грибов. Наибольшее количество видов

бактерий во всех поколениях относились к роду *Bacillus*. Сапрофитными оказались почти все бактерии кроме видов *Bacillus pumilus* и *Paenibacillus alvei*, которые проявляют фитопатогенную активность. Фитопатогенная активность присутствовала у всех грибов кроме вида *Rhizopus oligosporum*. По количеству выделенных из проб фитопатогенных видов грибов во всех поколениях доминировал род *Rhizopus*.

Из проб первого поколения каштановой моли г. Хвалынска было выделено 9 видов бактерий и 13 видов грибов. Большинство бактерий оказались сапрофитными, однако были выделены и энтомопатогенные виды, среди которых *Bacillus mycoides*, *B. thuringiensis* и *Lysinibacillus sphaericus*. Фитопатогенными оказались все виды грибов. Для сравнения были собраны пробы здоровых листьев каштана конского обыкновенного, не заселенного каштановой молью. Выделенная бактерия вида *B. mycoides* имеет энтомопатогенную активность, тогда как гриб вида *Cladosporium cladosporioides* является фитопатогенным. Количество и встречаемость данных видов были минимальны, число и разнообразие фитопатогенных микроорганизмов листьев, зараженных каштановой молью, по сравнению со здоровыми листьями, намного выше.

Из проб третьего поколения каштановой моли г. Вольска было выделено 7 видов бактерий и 4 вида грибов. Все бактерии оказались сапрофитными, а все грибы – фитопатогенными.

Из проб первого поколения каштановой моли г. Нижнего Новгорода было выделено 3 вида бактерий и 4 вида грибов. Все бактерии оказались сапрофитными. Фитопатогенная активность присутствовала у всех грибов кроме вида *Rhizopus oligosporum*.

Из проб третьего поколения каштановой моли, собранных на территории Санкт-Петербурга, было выделено 16 видов бактерий и 14 видов грибов. Все бактерии оказались сапрофитными. Фитопатогенными оказались все грибы.

Из проб второго поколения каштановой моли, собранных на территории г. Йенчепинга, было выделено 12 видов бактерий и 11 видов грибов.

Фитопатогенными оказались все грибы кроме вида *Trichoderma viride*. Были выделены и 4 энтомопатогенные бактерии видов *Bacillus mycoides*, *B. pumilus*, *B. thuringiensis* и *Lysinibacillus sphaericus*.

После выявления видового состава было проведено сравнение микроорганизмов-ассоциантов конского каштана обыкновенного и каштановой минирующей моли из всех изученных городов за 2022-2023 года с использованием кластерного анализа. Результаты кластерного анализа по видам бактерий представлены на рисунке 2.

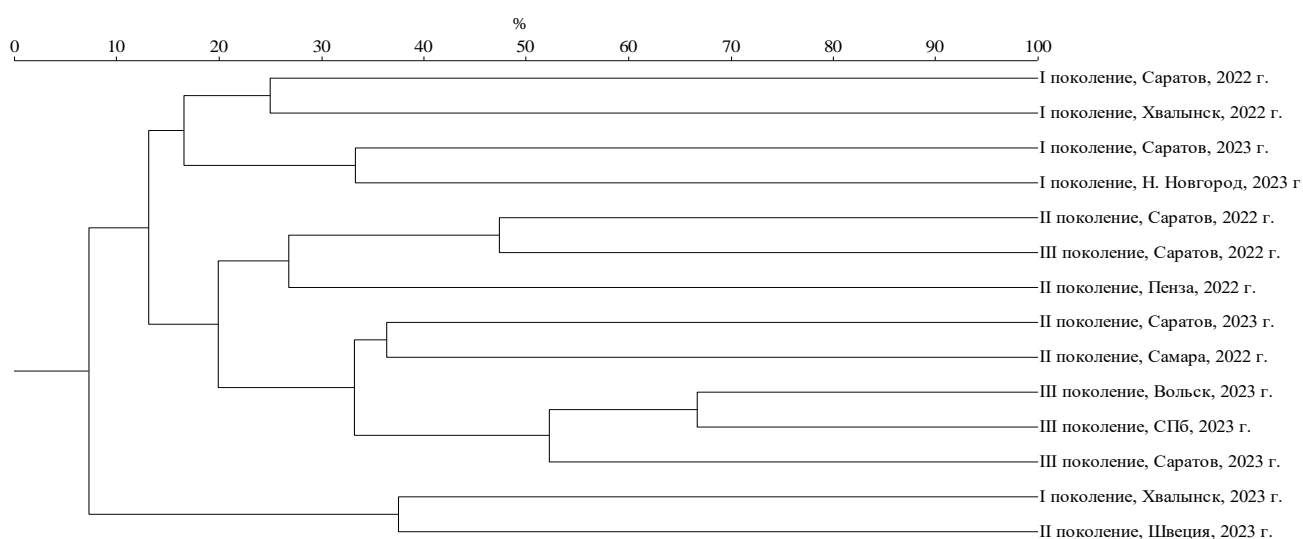


Рисунок 2 – Сходство видового состава бактерий из проб, собранных на территории всех изученных городов, за 2022-2023 гг. по коэффициенту Жаккара

Исходя из полученных результатов кластерного анализа, наибольшее сходство видового состава бактерий по коэффициенту Жаккара приходилось на пробы из гг. Вольска и Санкт-Петербурга за третье поколение 2023 года ($K_f = 67\%$), тогда как пробы из г. Саратова за третье поколение 2023 года похожи на них несколько меньше ($K_f = 55\%$). Было отмечено несущественное сходство между пробами за второе и третье поколения из г. Саратова 2022 года ($K_f = 47\%$), первое поколение из г. Хвалынска и второе поколение из г. Йенчепинга 2023 года ($K_f = 38\%$), второе поколение из гг. Саратова 2023 года и Самары

2022 года ($K_f = 36\%$), первое поколение из гг. Нижнего Новгорода и Саратова 2023 года ($K_f = 33\%$) и первое поколение из гг. Саратова и Хвалынска 2022 года ($K_f = 25\%$). Схожесть проб из городов по годам не превышала $K_f = 40\%$. Результаты кластерного анализа по видам грибов представлены на рисунке 3.

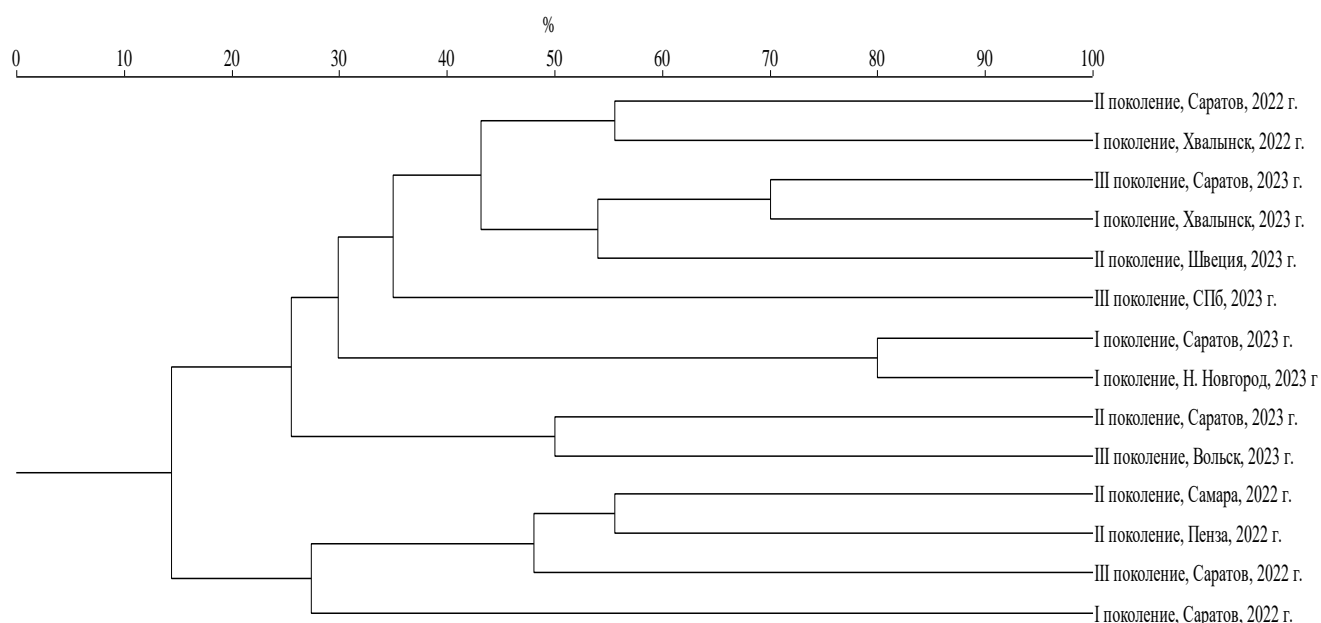


Рисунок 3 – Сходство видового состава грибов из проб, собранных на территории всех изученных городов, за 2022-2023 гг. по коэффициенту Жаккара

Исходя из полученных результатов кластерного анализа, наибольшее сходство видового состава грибов по коэффициенту Жаккара приходилось на пробы из гг. Саратова и Нижнего Новгорода за первое поколение 2023 года ($K_f = 80\%$). Было отмечено меньшее сходство между пробами за первое поколение из г. Хвалынска и третье поколение из г. Саратова 2023 года ($K_f = 70\%$), второе поколение из гг. Пензы и Самары 2022 года ($K_f = 56\%$), первое поколение из г. Хвалынска и второе поколение из г. Саратова 2022 года ($K_f = 56\%$) и второе поколение из г. Саратова и третье поколение из г. Вольска 2023 года ($K_f = 50\%$). Схожесть проб из городов по годам не превышала $K_f = 50\%$.

Дендрограммы кластерного анализа 2022 и 2023 годов показали высокую степень оригинальности аборигенного состава грибов и бактерий для всех проб с модельных площадок исследованных городов.

При смене поколений гусениц каштановой минирующей моли в период с июня по август в г. Саратове наблюдались рост общей микробной обсемененности объектов, увеличение видового разнообразия микроорганизмов и/или замещение видов. Многочисленная эндофитная микрофлора в гусеницах, бабочках и минах без гусениц свидетельствует о том, что охридский минер может быть источником различных бактерий и грибов. Кроме того, большое число микроорганизмов было найдено и в чистых листьях, это означает, что каштановая моль распространяет ассоциативные виды, дополнительно заражая здоровые листья конского каштана и приводя к появлению множества бактериальных и грибковых инфекций.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С каждым годом количество городов с наличием зараженных каштанов все растет, моль распространяется дальше, но, тем не менее, методы борьбы с ней и защиты от нее пока что только ищутся и исследуются. Необходим мониторинг со стороны надзорных и карантинных органов городов, которые могли бы отслеживать изменение численности популяции каштановой минирующей моли и производить определенные меры для борьбы с этим инвазивным видом, не допуская массового распространения паразита и еще больших эстетических потерь городских насаждений.

Нельзя недооценивать вредоносность и скорость распространения охридского минера. Именно этот вид вызвал сильные повреждения каштанов в Западной Европе, потерю их декоративности и засыхание, что властям ничего не оставалось кроме как полной замены конского обыкновенного каштана на другие виды деревьев. Эти меры привели к большим потерям в финансах многих государств и могут сильно ударить в будущем и по экономике Российской Федерации. Будущее конского обыкновенного каштана в Саратове и области находится под серьезной угрозой.

Выводы:

1. Степень поражения охридским минером листьев каштана конского обыкновенного в г. Саратове за 2022 год возросла от первого поколения к третьему в 33.5 раза, а за 2023 – в 5.6 раз. В 2023 году степень поражения в среднем за первое поколение была уже 9.7 %, тогда как в 2022 году – 1.6 %. За 2022-2023 гг. при смене поколений гусениц каштановой моли в период с июня по август в г. Саратове происходило полное заселение охридским минером всех трех ярусов конского каштана.

2. В 2022 году наиболее схожи между собой оказались ул. Большая Садовая и Набережная Космонавтов ($r_s = 0.96$), тогда как в 2023 году больше похожи были ул. Большая Садовая и Астраханская ($r_s = 0.99$). Заметная сила связи была установлена в 2022 году для улиц г. Хвалынска и ул. Астраханской

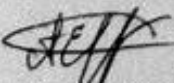
г. Саратова ($r_s = 0.66$), тогда как в 2023 году улицы г. Хвалынска были наиболее схожи с ул. Набережной Космонавтов г. Саратова ($r_s = 0.85$).

3. В 2022 году из проб, собранных на территории г. Саратова, за первое поколение было выделено 20 видов бактерий и 6 видов грибов, за второе поколение – 22 вида бактерий и 11 видов грибов, тогда как за третье поколение в материале было обнаружено 24 вида бактерий и 25 видов грибов. В 2023 году из проб, собранных на территории г. Саратова, за первое поколение было отмечено 13 видов бактерий и 11 видов грибов, за второе поколение – 15 видов бактерий и 13 видов грибов, тогда как за третье поколение в материале были найдены 21 вид бактерий и 15 видов грибов. За двухлетний период с первого по третье поколения охридского минера в пробах из г. Саратова происходили рост общей микробной обсемененности объектов, увеличение видового разнообразия бактерий и грибов и/или замещение видов.

4. Дендрограммы кластерного анализа 2022 и 2023 годов показали высокую степень оригинальности аборигенного состава грибов и бактерий для всех проб с модельных площадок исследованных городов. Схожесть в пробах по годам не превышала $K_f = 40\%$ для бактерий и $K_f = 50\%$ для грибов. Сходство видового состава микроорганизмов между образцами из гг. Саратова и Хвалынска было отмечено для грибов как в 2022 году ($K_f = 67\%$), так и в 2023 году ($K_f = 70\%$). По видовому составу бактерий между пробами из двух городов сходства выявлено не было. При сравнении образцов из всех изученных городов наибольшее сходство по видовому составу бактерий было выявлено для проб из гг. Вольска и Санкт-Петербурга в 2023 году ($K_f = 67\%$), тогда как по видовому составу грибов были схожи пробы из гг. Саратова и Нижнего Новгорода в 2023 году ($K_f = 80\%$).

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Голосова, М. А. Каштановый минер *Cameraria ohridella* – опасный карантинный вредитель на объектах городского озеленения / М. А. Голосова, Ю. И. Гниненко, Е. И. Голосова. – Москва : ВПРС МОББ, МГУЛ, ВНИИЛМ, 2008. – 26 с.
- 2 Kirichenko, N. I. Tracing the invasion of a leaf-mining moth in the Palearctic through DNA barcoding of historical herbaria / N. I. Kirichenko, E. V. Zakharov, C. Lopez-Vaamonde // Scientific Reports. – 2022. – Vol. 12, № 1. – P. 50-65.
- 3 Anikin, V. V. Present day bio-invasions in the Volga-Ural Region : from the South to the North or from the East to the West? *Cameraria ohridella* (Lepidoptera : Gracillariidae) in the Lower and Middle Volga / V. V. Anikin // Zootaxa. – 2019. – Vol. 4624, № 4. – P. 583-588.
- 4 Economic costs of biological invasions in terrestrial ecosystems in Russia / N. I. Kirichenko [et al.] // NeoBiota. – 2021. – Vol. 67. – P. 103-130.
- 5 Skuhavy, V. Zusammenfassende Betrachtung der Kenntnisse uber die Rosskastanienminiermotte, *Cameraria ohridella* Desch. & Dem. (Lep., Gracellaridae) / V. Skuhavy // Anzeiger fur Schadlingskunde. – 1999. – Vol. 72, № 4 – P. 95-99.
- 6 Presence of entomopathogenic fungi and bacteria in Latvian population of horse-chestnut leaf miner *Cameraria ohridella* / Z. Metla [et al.] // Acta Biologica Universitatis Daugavpiliensis. – 2013. – Vol. 13, № 1. – P. 69-76.
- 7 The effectiveness of the neem product TreeAzin(R) in controlling *Cameraria ohridella* (Lepidoptera : Gracillariidae : Lithocolletinae) / A. Gubka [et al.] // European Journal of Endocrinology. – 2020. – Vol. 117. – P. 463-473.
- 8 Identification of a new lepidopteren sex pheromone in picogram quantities using an antennal biodetector : (8E,10Z)-Tetradeca-8,10-dienal from *Cameraria ohridella* / A. Svatos [et al.] // Tetrahedron Letters. – 1999. – Vol. 40, № 38. – P. 7011-7014.


10.06.24