

АНОТАЦІЯ

Клинова О. В. Поширення, екологія та вірулентність дерматоміцетів амфібій та рептилій. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 — «Біологія». Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, Харків, 2025.

Дисертаційна робота присвячена дослідженню розповсюдженості грибів-патогенів рептилій та амфібій *Ophidiomyces ophidiicola*, *Paranannizziopsis* spp. та *Batrachochytrium dendrobatidis* в Україні та Європі, їх поширеності серед різних видів, а також вивченню патоген-специфічних факторів, що впливають на інфікування змій грибом *O. ophidiicola*. Зокрема, четвертий розділ роботи присвячений вивченню швидкості росту, порівняльній характеристиці проростання спор та вірулентності штамів *O. ophidiicola* різних генотипів, виділених зі змій природніх популяцій у Європі та США. Крім того, у роботі узагальнені рекомендації щодо протидії поширенню патогену *O. ophidiicola* серед змій в природі, а також щодо утримання змій в неволі з метою подальшої реінтродукції в природні популяції.

Дослідження поширеності грибів-патогенів рептилій проводилося на матеріалі, зібраному в рамках дослідження розповсюдження *O. ophidiicola* у Європі колективом з 17 дослідників (Blavillain et al., 2024). Зібрані зразки були надані Джозефом Хойтом, головою Лабораторії екології хвороб та збереження біорізноманіття Політехнічного інституту штату Вірджинія (США), в якій дисертантка проводила основну частину дисертаційного дослідження. Чисті культури вісімнадцяти штамів *O. ophidiicola*, що використовувалися у дослідженні проростання, росту та вірулентності цього патогену, зберігалися у загальнодоступній колекції культур Національного центру здоров'я дикої природи Геологічної служби США і

були надані для дослідження співробітником центру Джеффом Лорчем. Дослідження поширеності збудника хітридіомікозу *B. dendrobatidis* проводилося на матеріалі, зібраному в рамках дослідження розповсюдження цього патогену в Україні, виконаного колективом з 16 авторів (Jakóbk et al., 2024).

Для дослідження розповсюдження *O. ophidiicola* в Україні був проведений аналіз 156 зразків з 82 змій природніх популяцій, що відносилися до восьми видів, а також восьми зразків з колекції Музею природи ХНУ імені В. Н. Каразіна. Оцінку наявності ДНК патогену у зразках проводили методом кПЛР з використанням специфічних праймерів до ділянки ITS геному цього гриба. Визначення генотипів *O. ophidiicola* було проведено Джеффом Лорчем за допомогою секвенування послідовностей ділянок ITS, ITS2 та *tef* геному патогену.

Аналіз швидкості росту *O. ophidiicola* проводили на восьми штаммах гриба, що відносилися до клональних ліній та рекомбінантних генотипів у межах двох основних філогенетичних клад. Для цього спорову суспензію *O. ophidiicola* сіяли на поживне середовище, після чого вимірювали діаметр колоній, що з'явилися, кожні 24 години протягом 16 діб. Оцінку проростання спор *O. ophidiicola* здійснювали шляхом інкубації спорової суспензії п'ятнадцяти ізолятів гриба у рідкому поживному середовищі при різних температурах протягом 3 годин з подальшим пророщуванням за оптимальної для росту цього гриба температури. Частку пророслих спор оцінювали за допомогою світлової мікроскопії. Вірулентність *O. ophidiicola* оцінювали шляхом інокуляції 105 маїсових полозів сімома штамми патогену. Тварин утримували у лабораторних умовах протягом семи тижнів, щотижнево брали стандартні мазки шкіри, оцінювали тяжкість уражень та фіксували частоту линяння особин в кожній групі.

Для дослідження розповсюдження патогенних грибів роду *Paranannizziopsis* в Європі був проведений аналіз 516 зразків з 405 змій

природніх популяцій, що відносилися до 19 видів з 11 країн. Оцінку наявності ДНК патогену у зразках проводили методом кПЛР з використанням специфічних праймерів до ділянки ITS геному цього гриба.

В рамках дослідження поширеності *B. dendrobatidis* на території України було зібрано 446 зразків 11 видів земноводних із 36 локацій по всій території України. Визначення видової приналежності представників роду *Pelophylax* здійснювали шляхом ампліфікації інтрона 1 ядерного сироваткового альбуміну (SAI-1), описаної Hauswaldt et al. (2012). Визначення наявності ДНК *B. dendrobatidis* у зразках проводили методом кПЛР із застосуванням специфічних праймерів. Статистичний аналіз проводили у програмному середовищі R версії 4.4.2, в тому числі за допомогою пакетів glmmTMB, brms, ineq.

Аналіз розповсюдження *O. ophidiicola* в Україні показав присутність патогену двох генотипів в околицях м. Харків, а також у Львівській області. Загальна поширеність уражень шкіри серед всіх обстежених особин складала 30,5%, але лише 40% особин з ураженнями були носіями офідіомікозу. Загалом, носіями *O. ophidiicola* виявилися 13,4% досліджених особин. Патоген було виявлено серед трьох видів змій: *Natrix natrix*, *Vipera berus nikolskii* та *Zamenis longissimus*, але лише *N. natrix* та *Z. longissimus* демонстрували симптоми офідіомікозу. Крім того, було підтверджено присутність *O. ophidiicola* та його здатність викликати явний дерматомікоз вужів звичайних на території Харківської області щонайменше з 2003 року.

В ході аналізу музейних зразків було вперше встановлено присутність *O. ophidiicola* на території Грузії, що також є першою знахідкою цього патогену у Кавказькому регіоні.

Патогенні гриби *Paranannizziopsis* spp. не були зареєстровані на території України. Натомість, було виявлено два нові види-хазяїни для цього патогену у Європі: *Vipera latastei* та *Coronella austriaca*. Крім того, нами були зареєстровані перші знахідки цього патогену в Португалії.

Було узагальнено рекомендації щодо протидії поширенню *O. ophidiicola* у природних популяціях змій. Встановлено, що при утриманні змій в неволі з метою подальшого випуску ключовими факторами контролю захворювання на офідіомікоз є регулярний моніторинг стану здоров'я рептилій, ізоляція симптоматичних особин, розміщення теплових ламп у тераріумах для збільшення швидкості линяння, регулярне очищення тераріумів. Утримання *Natrix tessellata* в неволі рекомендується уникати.

В ході аналізу швидкості росту *O. ophidiicola* встановлено, що ізоляти з Європи мають значно менші темпи росту, ніж ізоляти із США. Крім того, ізоляти, що відносяться до філогенетичної клади I («Європейської») мають значно меншу швидкість росту, ніж ізоляти клади II. Загалом всі досліджені ізоляти були розділені на три групи: повільнозростаючі (I-W та II-D), швидкозростаючі (II-A та II-F) та ізоляти із середньою швидкістю росту (II-E, II-D/E, II-VA).

Встановлено, що проростання спор різних ізолятів *O. ophidiicola* в оптимальних умовах варіює в діапазоні від 4,6% до 93,4%, при цьому швидкозростаючі ізоляти (II-A та II-F) характеризуються найменшим відсотком пророслих спор. Виявлено позитивний вплив теплового шоку на проростання спор 11 з 15 ізолятів. Закономірностей залежності рясності проростання від генотипу чи географічного розподілу нами виявлено не було. Кореляції між швидкістю проростання та температурою по градієнту широти також не спостерігалось.

За результатами експериментального інфікування маїсових полозів конідіями *O. ophidiicola*, були виявлені значні відмінності у тяжкості уражень, викликаних різними штамами патогену, при чому штам рекомбінантного генотипу II-VA характеризувався найбільшою вірулентністю. Встановлено, що штами філогенетичної клади II викликали значно тяжчі симптоми офідіомікозу та частіші линяння, ніж штам клади I. Частота появи уражень та їх тяжкість були значно вищими за попередньої

скарифікації шкіри. Всі заражені змії линяли значно частіше, ніж змії у контрольній групі. Загалом, важчі ураження провокують більш часті линьки у хворих змій.

Аналіз поширеності *B. dendrobatidis* показав присутність патогену на півночі та заході України. Поширеність гриба серед видів амфібій обмежувалася видами *Bombina orientalis*, *B. variegata* та *Pelophylax* sp. Був виявлений статистично значущий зв'язок між придатністю середовища існування, передбаченою моделлю для *B. dendrobatidis* (Tytar et al. 2023) та наявністю патогену, оціненою за допомогою польових зразків.

Був задокументований випадок ураження шкіри гадюки Нікольського (*Vipera berus nikolskii*) з природи ентомопатогенним грибом *Beauveria bassiana* sensu lato.

Наукова новизна роботи полягає в доповненні наявних знань щодо поширення патогенних грибів амфібій та рептилій в Україні та Європі, а також з'ясуванні ролі патоген-специфічних факторів у динаміці захворювання на офідіомікоз. Зокрема, у роботі доповнено вкрай обмежені знання щодо поширення патогенних грибів *Paranannizziopsis* spp. територією континентальної Європи, виявлено перші знахідки цього патогену у Португалії та для двох нових видів змій. Вперше виявлено наявність патогенного гриба *O. ophidiicola* на території Грузії. Узагальнено рекомендації щодо протидії поширенню грибів-патогенів рептилій у природніх популяціях та зменшення негативного впливу захворювання при утримуванні змій в неволі. Виявлено різницю у інтенсивності проростання, швидкості росту та ступені тяжкості інфекції серед ізолятів, генотипів, філогенетичних клад та місць походження *O. ophidiicola*. Вперше для території України досліджено наявність, географічну розповсюдженість та поширеність серед різних видів амфібій патогенного гриба *Batrachochytrium dendrobatidis*.

Практичне значення роботи полягає в тому, що вона доповнює знання про фактори ризику, яким піддаються такі вразливі і в той самий час важливі для підтримання стабільності екосистем групи тварин, як рептилії та амфібії. Близько 19% видів рептилій перебувають під загрозою зникнення, а для оцінки статусу ще 21% недостатньо даних, тому розуміння факторів зменшення чисельності популяцій рептилій є напрочуд актуальним для розробки оптимальних стратегій збереження. Вивчення генотип-специфічних особливостей, що можуть впливати на вірулентність патогену, важливе для прогнозування швидкості розповсюдження та динаміки захворювання у наївних популяціях, в які потрапляє відповідний штам. Узагальнені на основі проведених досліджень рекомендації щодо протидії поширенню грибів-патогенів рептилій та проведення транслокацій тварин можуть використовуватися для коригування природоохоронних стратегій окремими дослідниками, громадськими організаціями, державними та приватними природоохоронними установами. Результати дослідження можуть бути включені до освітніх програм підготовки спеціалістів з біології, мікології, герпетології, екології, ветеринарії.

Ключові слова: паразитичні гриби, *Ascomycota*, амфібії, *Anura*, рептилії, змії, поширення, Україна, ДНК баркодинг, генетичний аналіз, збереження популяцій, вірулентність, *Ophidiomyces ophidiicola*, *Paranannizziopsis*, *Batrachochytrium dendrobatidis*.