

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ  
НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ИНСТИТУТ  
ЦИТОЛОГИИ И ГЕНЕТИКИ СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

*На правах рукописи*

КОНОНОВ АЛЕКСАНДР ВЛАДИМИРОВИЧ

**ГЕНЕТИЧЕСКОЕ И ВИДОВОЕ РАЗНООБРАЗИЕ В  
ИСХОДНЫХ И ИНВАЗИВНЫХ ПОПУЛЯЦИЯХ  
КОМПЛЕКСА ВРЕДИТЕЛЕЙ ХВОЙНЫХ ДЕРЕВЬЕВ:  
ЖУК-КОРОЕД *P. PROXIMUS*  
(COLEOPTERA, SCOLYTIDAE) И ЕГО ГРИБЫ-  
СИМБИОНТЫ**

03.02.07 – генетика

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:

кандидат биологических наук,

в. н. с. Блинов Александр Геннадьевич

Новосибирск 2018

## СОДЕРЖАНИЕ

СОДЕРЖАНИЕ .....	2
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ .....	4
ВВЕДЕНИЕ .....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	12
1.1 Инвазия как биологическое загрязнение .....	12
1.2 Этапы инвазии .....	14
1.2.1 Интродукция .....	17
1.2.2 Закрепление .....	18
1.2.3 Распространение .....	20
1.3 Генетические процессы во время инвазии .....	21
1.4 Уссурийский короед .....	25
1.5 Инвазия <i>Polygraphus proximus</i> .....	29
1.6 Методы биологического контроля .....	33
1.7 Фитопатогенные грибы .....	34
1.8 Сумчатые грибы (Ascomycota) .....	36
1.9 Систематика фитопатогенов .....	39
1.10 Род <i>Ophiostoma</i> .....	41
1.11 Симбиотическое разнообразие .....	42
1.12 Симбиотические сообщества .....	46
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....	50
2.1 Сбор и морфологический анализ материала .....	50
2.2 Молекулярно-генетический анализ .....	55

2.3 Биоинформатический анализ.....	56
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	58
3.1 Изучение популяций <i>P. Proximus</i> .....	58
3.1.1 Анализ генетического разнообразия <i>P. proximus</i> .....	58
3.1.2 Генетическая структура популяций <i>P. proximus</i> .....	62
3.2 Анализ видового состава сообщества симбионтов <i>P. Proximus</i> .....	65
3.2.1 Генетический анализ грибковых культур.....	65
3.2.2 Анализ видового разнообразия симбиоты <i>P. proximus</i> .....	73
3.2.3 Постоянные и случайные симбионты.....	78
3.2.4 Инвазивное происхождение <i>G. aoshimae</i> .....	79
3.2.5 Изменение симбиоты в процессе инвазии.....	81
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	85
ВЫВОДЫ.....	87
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	88
ПРИЛОЖЕНИЕ.....	99

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

aLRT – approximate likelihood-ratio test – приближённое вычисления значений теста отношения правдоподобия;

COI – cytochrome c oxidase I – митохондриальный ген цитохром-оксидазы I;

COII – cytochrome c oxidase II – митохондриальный ген цитохром-оксидазы II;

DNA – deoxyribonucleic acid – ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;

dNTP – deoxyribose nucleoside triphosphate – дезоксирибонуклеиновый трифосфат;

ITS2 – internal transcribed spacer 2 – второй внутренний транскрибируемый участок, разделяющий гены двух рибосомных РНК;

LSU – large subunit ribosomal – рибосомная РНК большой субъединицы;

RNA — ribonucleic acid — РНК — рибонуклеиновая кислота;

ПЦР – полимеразная цепная реакция.

## ВВЕДЕНИЕ

### **Актуальность темы исследования**

Жуки-короеды являются важным элементом в лесных экосистемах. Они представляют особый экономический интерес для человека в области рационального лесопользования. Однако изучать короедов в отрыве от остальных элементов системы означает упускать часть важной информации. Такой подход порождает пробелы в понимании процессов, происходящих в экосистемах. Короед в лесном сообществе тесно связан как минимум с двумя другими членами этого сообщества: с деревом-хозяином, на котором он поселяется и кормится, а также со своими симбионтами. Последние представляют собой различные виды фитопатогенных грибов, участвующих в деструкции растительных тканей. Из вышесказанного следует, что для получения максимально полного представления о процессах, происходящих в лесных сообществах, следует рассматривать не отдельные популяции короеда, а биологические системы, состоящие из жука-короеда, дерева-хозяина и грибов симбионтов.

В настоящее время исследователи данной области рассматривают объекты своих исследований с генетической точки зрения. Использование молекулярно-генетических методов в исследованиях инвазий позволяет с большой точностью определять изменения, происходящие с популяциями вредителей, а также характеризовать сами популяции и связи между ними. Большую роль генетические методы играют в микологических исследованиях. Благодаря применению метода баркодирования была пересмотрена таксономическая структура многих групп фитопатогенных грибов, видовое определение исследуемых культур стало значительно точнее.

В этой работе на основе молекулярно-генетических методов исследованы популяции уссурийского короеда. Этот вредитель, обитающий на Дальнем Востоке, недавно распространился на сибирские и европейские

территории России. Внимание в настоящей работе направленно на изучение популяций жука и его симбиотического грибкового сообщества в исходном и инвазивном ареале.

В настоящий момент симбионты *P. proximus* мало изучены. Ниже представлен ряд работ, посвящённых изучению этого жука, однако информация о сообществе его симбионтов до сих пор крайне скудна. По данным 2011 г. на территории Томской области в 100% ходов уссурийского полиграфа встречаются офиостомовые грибы [Баранчиков, Кривец, 2010]. Наиболее часто встречаемым видом оказался гриб *Grosmannia aoshimae* (Ohtaka & Masuya), принадлежащий к семейству Ophiostomataceae. Этот вид является самым агрессивным фитопатогенным ассоциантом изучаемого короеда в Южно-Сибирских районах инвазии [Керчев, 2013]. Ещё одним ассоциантом исследуемого короеда на этой территории является гриб вида *Graphilbum rectangulasporium*. Определение видовой принадлежности гриба по морфологическим признакам представляет трудную задачу. Доступные генетические данные о симбионтах *P. proximus* отсутствуют. Однако нуклеотидные последовательности генетических маркёров для представителей различных родов семейства Ophiostomataceae можно найти в базах данных (род *Grosmannia* – 3585 последовательностей, род *Ophiostoma* – 2903 последовательности, род *Leptographium* – 1683 последовательности, род *Sporothrix* – 2360 последовательностей и др.), что позволяет определить виды исследуемых грибов с помощью молекулярно-генетических методов [Schoch и др., 2012].

Вышеуказанные факты приводят к мысли о необходимости дальнейшего исследования симбионтов *P. proximus*. Знания, полученные в работе, должны дать ясное представление о процессах, происходящих между элементами изучаемой биологической системы, а также о взаимодействии этой системы с другими членами лесных сообществ.

### **Цель и задачи исследования**

Целью данной работы является выявление генетического и видового разнообразия в исходных и инвазивных популяциях комплекса вредителей хвойных деревьев, состоящего из короеда *P. proximus* и его грибов-симбионтов, на территории России.

В рамках работы были сформулированы следующие задачи:

1. Установить нуклеотидные последовательности генетических маркёров у образцов *P. proximus* из популяций исходного и инвазивного ареалов.
2. Провести сравнительный анализ генетического разнообразия популяций изучаемого жука-вредителя, и установить межпопуляционные и внутривидовые различия.
3. Установить нуклеотидные последовательности генетических маркёров у образцов фитопатогенных грибов, ассоциированных с *P. proximus* в популяциях исходного и инвазивного ареалов.
4. Провести сравнительный и филогенетический анализ полученных ДНК-последовательностей грибов для установления их видовой принадлежности и дальнейшего анализа разнообразия симбиоты *P. proximus* с учётом генетического разнообразия данного вредителя в популяциях исходного и инвазивного ареала.

### **Научная новизна работы**

Относительно недавно внимание исследователей привлекла проблема инвазивного распространения *P. proximus*. В настоящей работе были получены данные о генетической структуре популяций *P. proximus* как из исходного ареала, так и из инвазивных территорий, о генетике которых ранее не было ничего известно. Международная база данных GenBank была дополнена 36-ю нуклеотидными последовательностями изучаемого вредителя. Это позволило изучить популяционные процессы, происходящие с вредителем в ходе распространения.

Существовали отрывочные биологические данные о фитопатогенах уссурийского полиграфа на территории исходного ареала [Баранчиков, Кривец, 2010]. В ходе исследования информация о симбиоте *P. proximus* была дополнена не только количественно, но и качественно. Данные о фитопатогенах, ассоциированных с вредителем в инвазивном ареале, представлены впервые. В базу данных GenBank была дополнена 41-на нуклеотидная последовательность фитопатогенных грибов.

Кроме того, в ходе исследования в ассоциации с *P. proximus* на территории Российской Федерации были обнаружены виды *O. nikkoense*, *O. microcarpum*, *L. taigense*, *L. sibirica* и представители рода *Geosmithia*, которые ранее не детектировались в ассоциации с этим жуком на данной территории.

### **Теоретическая и практическая значимость исследования**

В ходе исследования установлены основные популяционные события, произошедшие в ходе инвазии *P. proximus*. Эти результаты расширяют наши представления о процессах, происходящих в ходе инвазии вредителя. Отмеченные изменения в симбиотическом сообществе данного жука дают представление о характере связи между изучаемым вредителем и его симбиотой.

Данное исследование преследует не только упомянутые выше научные интересы, но также значимо с практической точки зрения. Так, источники и характер распространения вредителя, как и особенности его биологии, позволяющие закрепляться на новых освоенных территориях, могут использоваться в предотвращении такого распространения и для установления карантинных мер.

Экологическое и экономическое значение видов, инвазивность жука-переносчика и сложность его взаимоотношений с фитопатогенными ассоциантами делают изучение данного вопроса актуальным.



### **Положения, выносимые на защиту**

1. Инвазивные популяции жука-короеда *Polygraphus proximus* в Западной и Восточной Сибири генетически обособлены и сформированы в ходе двух независимых инвазий с территорий исходного ареала данного вредителя на Дальнем Востоке.
2. Высокий уровень генетического разнообразия инвазивных популяций *P. proximus* на европейских территориях сформирован в результате множественной инвазии из дальневосточного исходного и сибирского инвазивного ареалов.
3. Ядро симбиотического комплекса жука-короеда *P. proximus* в исследованных популяциях на территории Российской Федерации сформировано фитопатогенными офиостомовыми грибами видов *Grosmannia aoshimae*, *Graphilbum rectangulosporium*, *Ophiostoma subalpinum* и представителями рода *Geosmithia*.
4. Снижение видового разнообразия симбиотического сообщества фитопатогенных грибов ассоциированных с *P. proximus* происходит под действием конкурентного исключения в процессе инвазии данного вредителя на запад материка с территории Дальнего Востока.

### **Вклад автора**

Все основные научные результаты были получены автором самостоятельно. Биологический материал для генетического анализа был предоставлен нашими коллегами из лаборатории лесной зоологии Института леса им. В. Н. Сукачёва СО РАН (г. Красноярск) (заведующий лабораторией Ю. Н. Баранчиков). Информация, использованная для биоинформатического анализа, была взята из открытых бесплатных источников.

### Апробация работы

Основные результаты работы были представлены на следующих международных научных конференциях:

1. The 10th International Conference On Bioinformatics of Genome Regulation and Structure\Systems Biology. Новосибирск, 2016 г.
2. IXth International Conference in commemoration of 91th anniversary of Professor Nikolai Ilyish Fedorov: Problems of Forest Phytopathology and Mycology, Минск, 2015 г.
3. XXIth International Conference for Young Researches: Lomonosov-2014, Москва, 2014 г.

### Публикации

По материалам настоящей работы были опубликованы следующие статьи в рецензируемых журналах:

1. **Kononov A.**, Ustyantsev K., Blinov A., Fet V., Baranchikov Y. Genetic diversity of aboriginal and invasive populations of four eyed fir bark beetle *Polygraphus proximus* Blandford (Coleoptera, Curculionidae, Scolytinae). // Agricultural and Forest Entomology. – 2016. – V. 18 (3). – P. 294 – 301.
2. Pashenova N. V., **Kononov A. V.**, Ustyantsev K. V., Blinov A. G., Pertsovaya A. A., Baranchikov Yu. N. Ophiostomatoid Fungi Associated with the Four-Eyed Fir Bark Beetle on the Territory of Russia. // Russ J Biol Invasions. – 2018. – V. 9 (1). – P. 63 – 74.

Материалы работы были представлена на конференциях:

3. **Kononov A.**, Blinov A., Pashenova N., Percova N., Baranchikov Y. Invasive entomo-mycological association of *P. proximus* and its phytopatogenic symbiont in Siberia and European part of Russia. // The

10th International Conference On Bioinformatics of Genome Regulation and Structure\Systems Biology. – Новосибирск – 2016.

4. Baranchikov Y., Pashenova N., Seraya L., **Kononov A.**, Blinov A. Moving in pairs: invasive entomo-mycological association destroys fire in Siberia and European part of Russia. // IXth International Conference in commemoration of 91th anniversary of Professor Nikolai Ilyish Fedorov: Problems of Forest Phytopathology and Mycology. – Минск. – 2015.

# ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

## 1.1 Инвазия как биологическое загрязнение

Популяционная структура и границы ареала любого вида представляют собой динамические образования. Они могут изменяться под действием различных внешних сил. Наиболее глобальные изменения ареалов видов происходят под действием крупномасштабных трансформаций окружающей среды, например, континентальный дрейф или глобальные климатические изменения [Снакин, 2015]. Однако они происходят относительно медленно, по крайней мере, намного медленнее локальных пертурбаций видового разнообразия в отдельно взятом регионе. Большая часть таких изменений в настоящее время происходит под действием антропогенных факторов [Liebhold и др., 1995]. Выделяют две основные проблемы антропогенных нарушений окружающей среды. Первая, и наиболее серьёзная, – это разрушение мест обитания. Вторая – биологические загрязнения [Ижевский, 1995]. Под биологическим загрязнением понимается распространение видов за пределы исходных ареалов и дальнейшее их закрепление и распространение на новых территориях. Такой тип загрязнения, как правило, необратим. Поэтому борьба с биологическими загрязнениями носит превентивный характер.

Способы распространения видов принято называть векторами инвазии. Примерами антропогенных векторов являются системы транспортного сообщения человека. Так, транспортировка лесоматериалов с помощью железных дорог или наводного транспорта может привести к распространению лесных вредителей и инфекций деревьев.

Для мониторинга инвазивных видов и предотвращения биологических загрязнений в 1992 году была принята «Конвенция о биологическом разнообразии». Она была ратифицирована более чем 170 странами, в том

числе и Российской Федерацией. Данный документ предписывает странам-участникам исполнять меры по сохранению биоразнообразия экосистем, что подразумевает предотвращение интродукций, контролирование или уничтожение инвазивных видов, которые угрожают местным экосистемам, местам обитания или видам.

Предписания данной конвенции соответствуют нескольким руководящим принципам. Выделяют три ключевых момента для борьбы с биологическими загрязнениями. Одним из основных руководящих принципов является предотвращение интродукции видов. Данный принцип говорит о приоритете превентивных мер. Согласно ему правительствам и организациям следует препятствовать распространению видов и прилагать усилия по снижению риска расселения видов на новые территории. Еще одним важным принципом данной конвенции является поддержка научных исследований и мониторинга биоразнообразия. Он направлен на раннее выявление чужеродных видов. Также одним из основных принципов конвенции выделен пункт об обмене информацией по данной проблеме. Для этого стороны-участники должны поддерживать создание баз данных о видах, угрожающих биоразнообразию [Конвенция о биологическом разнообразии, 1992].

В 1997 году для реализации положений конвенции была создана «Глобальная программа по инвазивным видам» (ГПИВ). До настоящего времени это программа действует и реализует различные инициативы и проекты по поддержанию биологического разнообразия экосистем и предотвращению инвазий.

Также следует упомянуть организованную в 2001 году «Всемирным Союзом Охраны Природы» (IUCN) рабочую группа экспертов по инвазивным видам (ISSG, 2001). Данная группа участвует в разработке мер по предотвращению потерь биоразнообразия и созданию глобальной базы данных по инвазивным видам в рамках ГПИВ (ISSG, 2001).

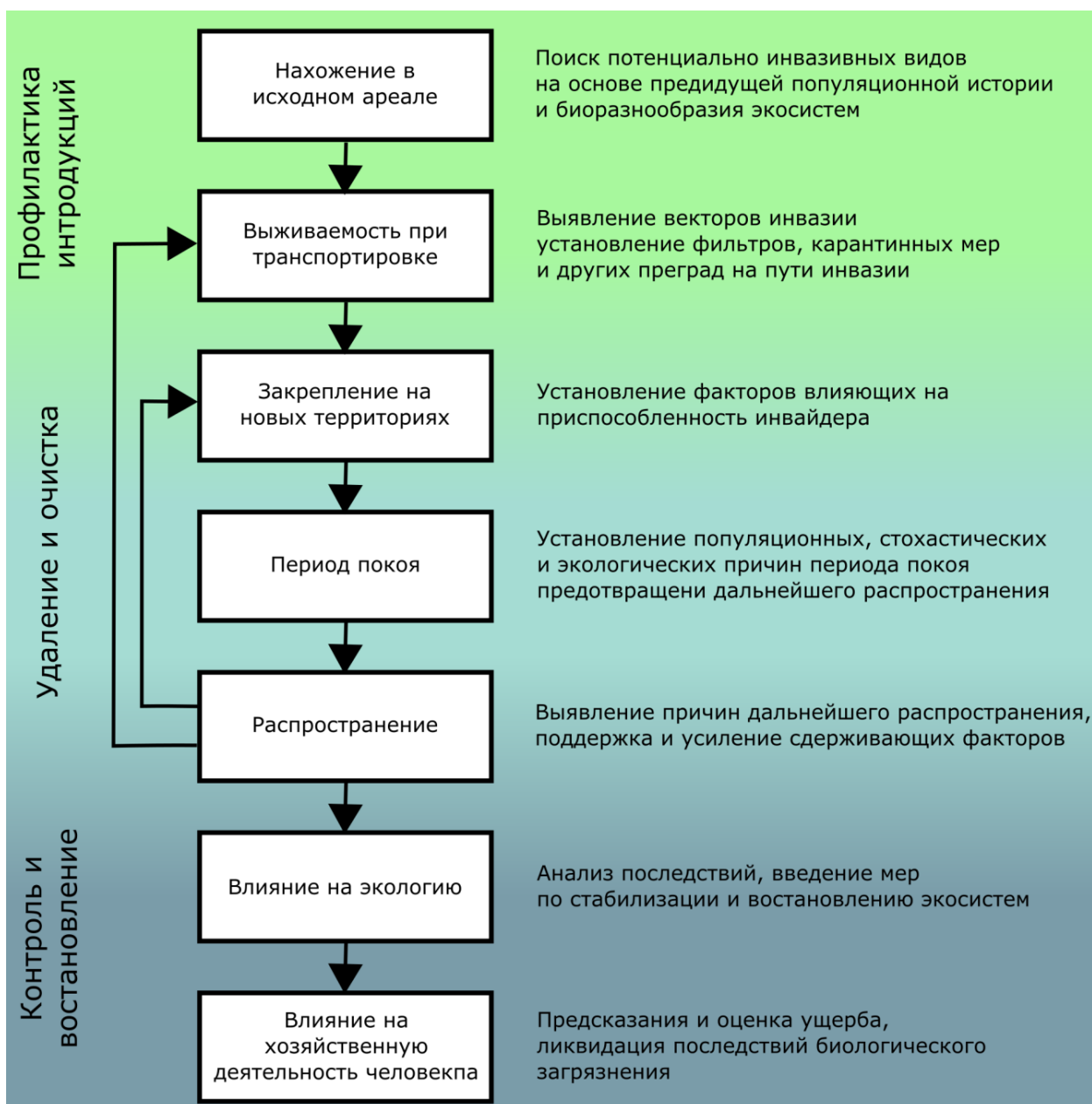
На территории России реализация предписаний «Конвенции о биологическом разнообразии» происходила постепенно. Были организованы различные проекты по изучению и защите биоразнообразия, например, проект «Глобального экологического фонда» «Сохранение биоразнообразия», проводимый с 1997 по 2003 годы [ГЭФ, 2003]. С 2001 года начинает разрабатываться правительственная программа по контролю и поддержанию биоразнообразия России [Нацстратегия сохранения биоразнообразия, 2002]. Количество и интенсивность работы в этом направлении усиливается [Сохранение биоразнообразия в РФ, 2015]. В 2018 году стартовал новый проект, направленный на изучение роли биоразнообразия и природных систем и на поддержание экосистем России: ТЕЕВ-Россия 2. Данный проект является продолжением предыдущего проекта, реализованного в 2013-2016 годах [Услуги наземных экосистем, 2016]. Проблема инвазий является трансграничной, поэтому реализация таких программ не только на национальном, но и на международном уровне является важным шагом в борьбе с биологическими загрязнениями и для контроля инвазивных видов.

## **1.2 Этапы инвазии**

Количество инвазивных процессов на нашей планете увеличивается с каждым годом [Кривец и др., 2015]. Распространение многих видов-вредителей леса влечёт за собой нежелательные экономические последствия. Большое количество биоматериала распространяется посредством различного рода транспорта напрямую или косвенно. Быстрое распространение видов на новой территории может происходить из-за отсутствия конкурентов, хищников, паразитов или заболеваний, которые участвуют в регуляции численности популяций в их исходном ареале [Есипенко, 2012]. Чтобы

отдельно взятый вид распространился на новой территории, ему необходимо преодолеть большое количество препятствий.

В процессе инвазии выделяют три основных этапа: интродукцию, закрепление и распространение [Crawley и др., 1986]. Три выделенных этапа значительно различаются друг от друга и предъявляют к виду-инвайдеру различные, а иногда и противоположные требования. При транспортировке зачастую организм сталкивается с дефицитом ресурсов и должен бережно расходовать их, в то время как при распространении вида на новой территории требуется способность активно использовать имеющиеся ресурсы новых захваченных территорий [Baker, 1974]. Поэтому для каждого этапа используются специфические подходы для изучения, а также различные методы по борьбе с инвазиями и их последствиями (Рисунок 1).



**Рисунок 1.** Обобщённая схема инвазивного процесса. Приведена с изменениями из работы Сакаи 2001 года [Sakai и др., 2001]. Цветом выделены три основных этапа инвазии, описанные далее в тексте. В белых блоках обозначены более детальные шаги, через которые проходит популяция в процессе переселения. Возможная последовательность смены этих шагов указана стрелочками. Остальные замечания, отмеченные на схеме, обозначают аспекты важные для изучения и предотвращения биологического загрязнения на каждом этапе изучаемого процесса.



### ***1.2.1 Интродукция***

Во время интродукции вид переносится из исходного ареала на новые территории посредством какого-либо вектора. В настоящее время подавляющее большинство случаев переноса особей инвазивных видов на большие расстояния являются прямым или косвенным следствием деятельности человека. Социальные и экономические факторы на этом этапе имеют такое же большое значение, как и биологические [Baker, 1986]. При этом вектора, используемые инвайдерами для распространения, могут быть различными. Так, с кораблями вода, используемая в качестве балластного груза, преодолевает огромные расстояния, и при сбросе балласта с корабля попадает в новые экосистемы на другой части планеты. Планктон, бактерии и другие организмы, попадающие в данный объём воды, интродуцируются на новую территорию и получают возможность на ней закрепиться [Ruiz и др., 2000].

Большое количество организмов переносится совместно с грузоперевозкой природных материалов. При перевозке древесины вместе с брёвнами переносятся и насекомые, а также бактерии и грибы, ассоциированные с данной породой. При транспортировке хозяйственных культур переносятся мутолистические организмы, связанные с ними [Baker, 1986].

Также следует отметить, что интродукция может происходить не только при переселении взрослых особей вида. Перенос семян растений, кусочков тканей вегетативно размножающихся организмов, спор, личинок и куколок насекомых и другого биологического материала может привести к интродукции вида [Sakai и др., 2001]. Чтобы выжить в ходе этого этапа, виду-инвайдеру следует обладать характеристиками, помогающими ему выжить в трудных условиях. Например, многие микроорганизмы замедляют свои внутренние метаболические процессы, перестают делиться, формируют

дополнительные защитные оболочки, или даже формируют экзоспору. Подобные стратегии позволяют пережить данным организмам первый этап инвазивного процесса.

### ***1.2.2 Закрепление***

После того как организмы чужеродного вида попали на новые территории, они стремятся закрепиться на них. Такая колонизация означает, что на новой территории организмы формируют новую популяцию. Исторически сложилось, что характеристики, которые обычно в литературе определяют инвазивный вид, необходимы организмам именно на этом этапе инвазии [Sakai и др., 2001]. В англоязычной литературе их определяют как «черты сорняка» [Baker, 1974]. К примеру, организмы, способные размножаться в изоляции друг от друга, имеют значительное преимущество на данном этапе инвазивного процесса. Растения, размножающиеся самоопылением, виды с возможностью партеногенетического размножения или виды, самки которых способны аккумулировать сперму, имеют большую вероятность успешно закрепиться на новой территории после интродукции [Matsuura, 2010; Savidge, Qualls, Rodda, 2007]. Виды, имеющие различные репродуктивные стратегии, также имеют это преимущество.

Ещё одной важной чертой, необходимой для успешного закрепления в новых условиях окружающей среды, является фенотипическая пластичность [Gray и др., 1986]. Она должна позволить организму выжить и произвести потомство в условиях отличных от условий исходного ареала. Под закреплением на новой территории понимается не только способность дать потомство одной выжившей особи, под закреплением понимается формирование новой стабильной самовоспроизводящейся популяции в инвазивном ареале. В действительности, свойства, требуемые для

первоначальной колонизации новой территории, и свойства, полезные для закрепления на них, мало перекрываются. Согласно исследованиям, проведённым на насекомых, к свойствам, способствующим формированию самоподдерживающейся популяции, относятся черты r-стратегов, такие как маленький размер тела, высокая скорость роста, быстрое достижение половой зрелости, появление нескольких поколений за сезон [Crawley и др., 1986]. Эти черты способны помочь быстро увеличить численность новой популяции, быстро освоить доступные ресурсы и конкурировать за них с аборигенными видами.

Аналогичная картина наблюдается и в случае инвазии растений. Показано, что малый размер семян коррелирует с большой производительностью организма. В свою очередь организм, производящий большое количество семян, имеет выше шанс закрепиться при инвазии [Rejmanek, Richardson, 1996]. Существуют исследования, показывающие альтернативные результаты, согласно которым семена большого размера прорастают быстрее, и вид с большей вероятностью закрепляется в инвазивном ареале [Forcella, 1985].

Как было упомянуто выше, в ходе размножения и формирования новой популяции вид сталкивается с конкуренцией за ресурсы с аборигенными видами. С этой точки зрения, преимущество в конкурентной борьбе может рассматриваться, как способность более активно потреблять ресурсы экосистемы. Успешно закрепившийся вид-инвайдер, как правило, потребляет ресурсы с большей скоростью и эффективнее трансформирует их в свою биомассу, чем автохтонные виды [Byers, 2000]. Особо красочно этот принцип был проиллюстрирован в исследованиях инвазии аргентинских муравьёв (*Linepithema humile*) на территорию Калифорнии (США). В данной работе показано, что занесённый вид успешнее, чем аборигенные виды муравьёв, захватывал и контролировал точки с ресурсами, предоставленные исследователями [Holway, 1999]. Примечательно, что аргентинские муравьи

использовали численное превосходство в конкуренции с другими видами. Это наблюдение согласуется с r-стратегией, свойственной для инвазивных видов.

Важными факторами, влияющими на закрепление вида на новой территории, являются наличие инфекций, паразитов и естественных врагов на этой территории. Влияние этих факторов достаточно специфично для каждого отдельного случая инвазии и требует отдельных исследований и экспериментов.

### ***1.2.3 Распространение***

После закрепления инвазивного вида на новой освоенной территории и формирования первой инвазивной популяции возможно дальнейшее расширение ареала этого вида. Такое распространение бывает двух типов. Первое называют *скачкообразным рассеиванием*, оно характеризуется переносом особей этого вида в другие удаленные регионы в процессе инвазии. Данный тип распространения является таким же инвазивным процессом, что и описываемый в этом разделе работы. Только источником инвазии на этот раз служит не исходная популяция, а инвазивная популяция, закрепившаяся в новом ареале. Второе называют *диффузионным распространением* [Smith и др., 1999]. В этом случае вид занимает новые территории, прилегающие к границам нового ареала.

На этом этапе важными становятся совокупные характеристики популяции: численность, смертность, рождаемость и т.д. Данный этап инвазивного процесса представляет основную опасность биологического загрязнения. При благоприятном для инвайдера стечении вышеперечисленных обстоятельств могут сформироваться условия, подходящие для лавинообразного распространения чужеродного вида на оккупированных территориях. Такие вспышки численности приводят к

нарушению связей внутри экосистемы, её истощению и потере биоразнообразия [Goodell, 2000].

Однако бурное распространение не всегда сразу следует после закрепления вида на новых территориях. Довольно часто после закрепления наступает период покоя, в котором популяция инвайдера поддерживает свою численность, но не растёт и не расширяет свой ареал [Kowarik, 1995]. С экологической точки зрения такая популяционная динамика может быть объяснена необходимостью адаптации к новым условиям среды, появления новых популяционных стратегий и новых межвидовых и внутривидовых взаимодействий.

С генетической точки зрения данный период стагнации может быть объяснен эффектом инбредной депрессии [Mask и др., 1999]. Этот эффект будет обсуждаться в последующем разделе настоящей работы. При отсутствии подобных сдерживающих факторов популяция инвайдера не попадает в период покоя и продолжает увеличиваться, расширяя свой ареал.

### **1.3 Генетические процессы во время инвазии**

Инвазивные процессы представляют собой особый интерес для изучения, поскольку могут пролить свет на механизмы распространения видов и основы формирования и изменения экосистем. В большинстве исследований данных процессов основное внимание уделяется экологическим аспектам инвазии. Исследования инвазивных видов предоставляет замечательную возможность и для изучения быстрых эволюционных процессов, которые проявляются в ходе переселения и закрепления вида на новых территориях [Quinn, Unwin, Kinnison, 2000]. Большое количество случаев быстрого эволюционного процесса было отмечено среди инвазивных видов или видов, взаимодействующих с инвазивными [Thompson, 1998]. Случаи межвидовой

или внутривидовой гибридизации между прежде изолированными популяциями также стимулируют быстрые эволюционные процессы во время инвазии [Ellstrand, Elam, 1993]. Тем не менее следует иметь в виду, что скорость и степень эволюционных ограничены набором генетических вариантов, имеющихся в популяции, а в случае инвазивных популяций их разнообразие крайне мало [Fisher, 1958].

Так как изначально на новую территорию попадает относительно небольшое число особей и, как следствие, ограниченное количество генетического материала, дальнейшие генерации должны иметь низкий уровень генетического разнообразия [Ellstrand, Elam, 1993]. Иными словами, инвазивные популяции подвергаются *эффекту основателя* и демонстрируют значительную генетическую однородность.

Выделяют два негативных следствия такой генетической гомогенности, которые сдерживают рост и развития новой популяции. Первым следствием является *инбредная депрессия* [Niemiinen и др., 2001]. Данный эффект проявляется из-за того, что в ходе нескольких первых поколений размножение проходит среди малого количества генетически схожих особей. По этой причине в потомстве увеличивается шанс проявления летальных аллелей и различных генетических заболеваний. Происходит снижение жизнеспособности особей в инвазивных популяциях по сравнению с исходными. Степень инбредной депрессии особенно высока при малом количестве потомства или медленной смене поколений. Таким образом, рост популяции инвазивного вида сдерживается за счёт внутренних генетических факторов.

Вторым следствием генетической гомогенности являются упомянутые выше ограничения на изменения вида и его дальнейшую эволюцию [Newman, Pilson, 1997]. Вид-инвайдер должен адаптироваться к новым условиям окружающей среды. Такая адаптация связана с изменениями в генетической структуре популяции, подавлением и элиминацией одних аллелей и

распространением других, подходящих к новым условиям среды. Но такие изменения ограничены спектром доступных генетических вариантов. Из-за того, что генетическое разнообразие ограничено, ограничены и возможности изменения вида. Вследствие этого популяция инвайдера не может адаптироваться к новым условиям, и её рост сдерживается множеством внешних факторов.

После первичной колонизации видом-инвайдером новой территории часто наступает *период покоя* (в англоязычной литературе этот этап называют *log-period*, «период регистрации») [Sakai и др., 2001]. Этот феномен обычно рассматривают как экологический, во время которого происходит адаптация к новым условиям. Но, как отмечалось выше, он может иметь и генетические причины, в частности инбредную депрессию [Ellstrand, Elam, 1993]. И в ряде случаев требуется продолжительное время, чтобы популяция преодолела эти преграды, а в некоторых случаях это не возможно без дополнительного стимула. Таким стимулом может служить вторичная интродукция этого вида из другого региона исходного или ивазивного ареала. В этом случае новая популяция получает дополнительное генетическое разнообразие, что позволяет преодолеть инбредную депрессию.

Интродуцированные популяции могут образоваться благодаря отдельным инвазиям из различных мест ареала, преобразуя межпопуляционное разнообразие среди природных популяций во внутривидовое разнообразие инвазивной популяции. Это было показано, например, для кубинской ящерицы *Anolis sagrei* при расселении её в Северную Америку [Kolbe и др., 2004]. Эти исследования являются наглядным примером того, как долго может длиться период покоя инвазивной популяции. В случае кубинской ящерицы первый случай инвазии на территорию Флориды (США) был зафиксирован около 200 лет назад (до 1800-го года). Однако заметное распространение этого вида на новых территориях началось только спустя 150 лет после первой детектированной интродукции (в

1940-х годах). Исследователями отмечается, что столь долгая стагнация обусловлена отсутствием притока дополнительного генетического разнообразия из исходного ареала на Кубе. Подобные случаи преодоления эффекта имбидной депрессии были изучены на примере различных организмов, например в менее известных работах о распространении сорняка *Mimosa pigra* L. на территорию Таиланда [Pramual, Khumkratok, Wongprakam, 2011] и инвазии травянистого злака *Bromus tectorum* (костёр) в Северную Америку [Novak, Mack, 1993]. При множественной инвазии из различных популяций исходного региона закрепление и распространение на новой территории происходит успешнее, если исходный ареал имел сложную генетическую структуру и популяции в нём имели значительные генетические различия [Kirkpatrick, Barton, 1997].

После того как закрепившаяся популяция преодолевает свою генетическую гомогенность и начинает расширять свой ареал, популяция сталкивается с новым режимом отбора, усиливается внутривидовая конкуренция. В условиях высокой гетерогенности и расширяющегося ареала формируются сильные *генетические потоки* внутри инвазивной популяции [Barrett, 1992; Hengeveld, 1992].

Эти генетические потоки являются фактором, ограничивающим расширение ареала. Генетические варианты, распространяющиеся из центра инвазивного ареала к его краям, влияют на адаптацию краевых популяций, замедляют её. Таким образом, генетические потоки из центра ареала к периферии размывают полезные аллели, поддерживаемые отбором на периферийных территориях инвазивного ареала [Kirkpatrick, Barton, 1997]. Структура и интенсивность этих потоков будут определять размер и генетическую структуру популяций на освоенных территориях.

Анализ и сравнение генетической структуры новых и исходных популяций дают возможность определить всю историю инвазии, показывают, имела ли место множественная интродукция, и позволяют установить



источники инвазии. Также подобная информация даёт нам возможность прогнозировать дальнейшую динамику популяций инвазивного вида на новой территории.

#### 1.4 Уссурийский короед

*Polygraphus proximus* (уссурийский короед, уссурийский полиграф) – жук-короед, широко распространённый в восточной части Азии. Его популяции обнаружены на территории Китая (северо-восток страны), Японии (Хокайдо, Хонсю, Кюсю, Сикоку), КНДР и Российской Федерации (Дальний восток). На территории России короед обитает в Хабаровском и Приморском краях, в том числе на островах Сахалин, Шикотан, Итуруп и Кунашир. Указанные регионы являются исходным природным ареалом для вида. Кроме того, было обнаружено присутствие *P. proximus* в Западной Сибири (Кемеровская и Томская области). В этом регионе популяции вредителя имеют инвазивное происхождение. В 1999 году представители данного вида были обнаружены в Ленинградской области, а в 2006 году – в Московской [Черпаков, 2014].

Данный вид короедов может заселять стволы различных видов пихты (род *Abies*). Основными кормовыми породами для *P. proximus* являются пихта белокорая (*Abies nephrolepis* (Trautv.) Maxim.), пихта цельнолистная (*A. holophylla* Maxim.), а также пихта сахалинская (*A. sachalinensis* Mast) [Старк, 1952]. В Приморье данный вид короеда встречается в елово-пихтовой тайге. Кроме того, он обитает и в смешенных лесах: елово-кедровых и кедрово-еловых с примесью пихты [Керчев, 2014].

В регионах инвазии, на территории Западно-Сибирской равнины (Томская область), черневой тайги Присалаиря (Новосибирская область, Красноярский край), южной тайги (Кемеровская область), а также в

европейской части материка, *P. proximus* поражает пихту сибирскую (*A. Sibirica Ledeb.*) и пихту бальзамическую (*A. Balsamea (L.) Mill.*). На вновь заселённых территориях вредители обнаруживаются в чистых пихтарниках или в лесах, где пихта является одним из доминантных видов деревьев.

В монопородных пихтовых древостоях популяции *P. proximus* достигают наибольшей численности [Керчев, 2014]. В Ленинградской области *P. proximus* был обнаружен на ели европейской (*Picea abies*) [Мандельштам, Поповичев, 2000], что объясняется отсутствием в данном регионе представителей рода *Abies*. Подобная переориентация на новую кормовую базу часто происходит при инвазивных процессах [Lee, 2002]. Так, например, инвазивный вид короедов *Dendroctonus valens* при интродукции в Китай из Северной Америки сменил свою кормовую породу: жёлтую сосну (*Pinus ponderosa*) на близкий вид – китайскую красную сосну (*P. tabuliformis*) [Таерум и др., 2013].

В ослабленном состоянии другие виды деревьев могут быть заселены вредителем как на территории исходного ареала, так и во вторичном ареале. К примеру, на Дальнем Востоке особи вида *P. proximus* были обнаружены на сосновых деревьях родов *Picea*, *Pinus*, *Larix* и *Tsuga*, а на территории Томской области на буреломных ветвях *Pinus sibirica* и *Pinus sylvestris* [Керчев, 2013].

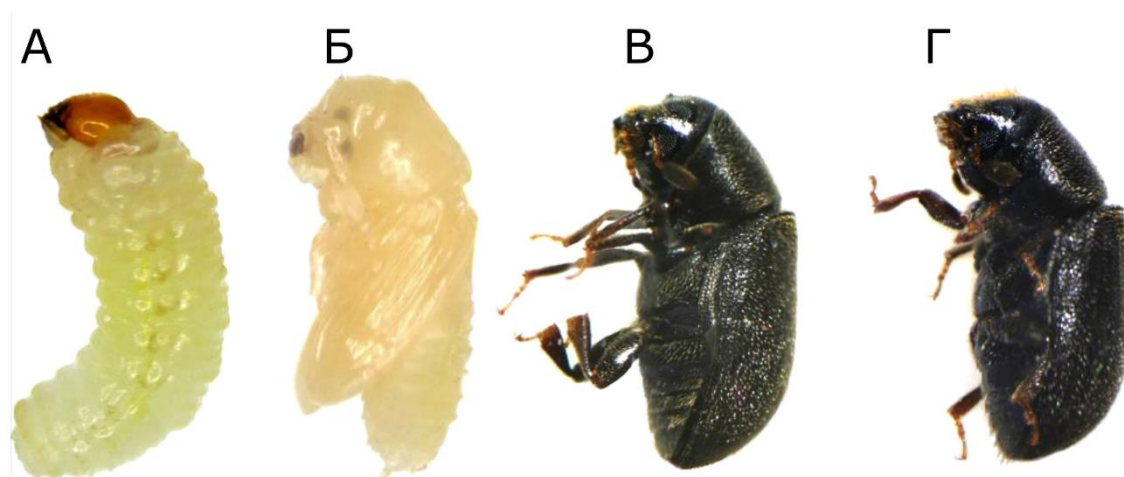
*P. proximus* представляет собой насекомое с полным превращением. Жук в своём развитии проходит через четыре фазы: яйцо, личинка, куколка, взрослая особь имаго (жук).

Яйца данного вредителя белого цвета и овальной формы, крупные, порядка 0,8 мм в длину. Личинки – белые, безногие. Голова личинки хорошо выражена, слегка согнута на брюшную сторону.

Выделяют личинок трёх возрастов, согласно ширине головной капсулы (I –  $0,38 \pm 0,07$  мм, II –  $0,53 \pm 0,07$  мм, III –  $0,68 \pm 0,08$  мм) (Рис 2). Куколка *P. proximus* – свободная, имеет веретеновидную форму. После образования из личинки мандибулы и глаза куколки постепенно темнеют, приобретая на

седьмой день темно-бурый цвет. Тело приобретает желтовато-белый цвет, появляются зачатки крыльев дымчато-серого цвета.

Взрослый жук имеет короткую овальную форму, тело темно-бурого цвета с более темной переднеспинкой короткой и широкой формы, черной широкой головой, и желтыми ногами, и усиками. Длина тела 2,5–3,3 мм. Лоб самца имеет два бугорка. У самки лоб покрыт густыми длинными волосками. Надкрылья имеют неглубокие точечные бороздки. Они густо покрыты слегка торчащими серовато-жёлтыми чешуйками. Грудь и брюшко покрыты прилегающими чешуйками и волосками.



**Рисунок 2.** Внешний вид *P. proximus* на разных фазах развития.

(А) Личиночная стадия, (Б) куколка, (В) самец имаго, (Г) самка имаго. Рисунок взят из методического пособия, посвящённого проблеме инвазии данного вредителя [Кривец и др., 2015].

Жуки формируют гнёзда под корой заселённых ими деревьев (Рисунок 3). Гнёзда представляют собой систему камер и ходов, которую короеды прогрызают в коре и *заболони* (древесной ткани, находящейся под корой). Сначала, как правило, самец вытачивает под корой небольшую брачную камеру. Затем в формируемое гнездо проникает самка. Она прогрызает от одного до четырёх маточных ходов. В стенках этих ходов самка прогрызает яйцевые камеры, куда откладывает яйца. Плодовитость самок *P. proximus* составляет в среднем около 50 яиц. После выхода из куколки

каждая личинка прогрызает свой ход, перпендикулярный маточному. После прохождения всех возрастов личинки выгрызают куколочные камеры и формируются куколки [Керчев, 2014].



**Рисунок 3.** Галереи *P. proximus* под корой дерева [Akulov, 2015]. На древесине наблюдаются глубокие бороздки, являющиеся маточными камерами. Менее глубокие бороздки представляют ходы прогрызенные личинками короеда. Личиночные ходы заканчиваются овальными углублениями, представляющие собой куколочные камеры.

Особи разных возрастов зимуют под корой. Данный вид короедов устойчив к низким температурам (до  $-50^{\circ}\text{C}$ ). Первые жуки выходят из под коры весной после схода снега. Сроки начала первого лёта особей *P. proximus* зависят от климатических условий, и могут сильно отличаться в различных регионах. Продолжительность и интенсивность лёта также зависит от микроклиматических условий [Кривец и др., 2015]. Большая часть популяции жука зимует в фазе личинки и куколки. В связи с этим период лёта этих организмов и заселение ими деревьев смещается. Поэтому чёткая картина сезонного развития данного вредителя отсутствует. Кроме того в течении одного сезона может произойти появление двух новых поколений и произойдет наложение популяционных генераций друг на друга.

Как правило, в исходном ареале повреждения, наносимые короедом, не приводят к гибели дерева, если оно не было ослаблено другими биотическими или абиотическими факторами. Инвазивные популяции *P. proximus* на новых

местах обитания являются причиной гибели изначально здоровых деревьев [Баранчиков, 2010]. Таким образом, для европейских лесов инвазия рассматриваемого вредителя является трагическим событием, которое может привести к нежелательным экологическим и экономическим последствиям.

### 1.5 Инвазия *Polygraphus proximus*

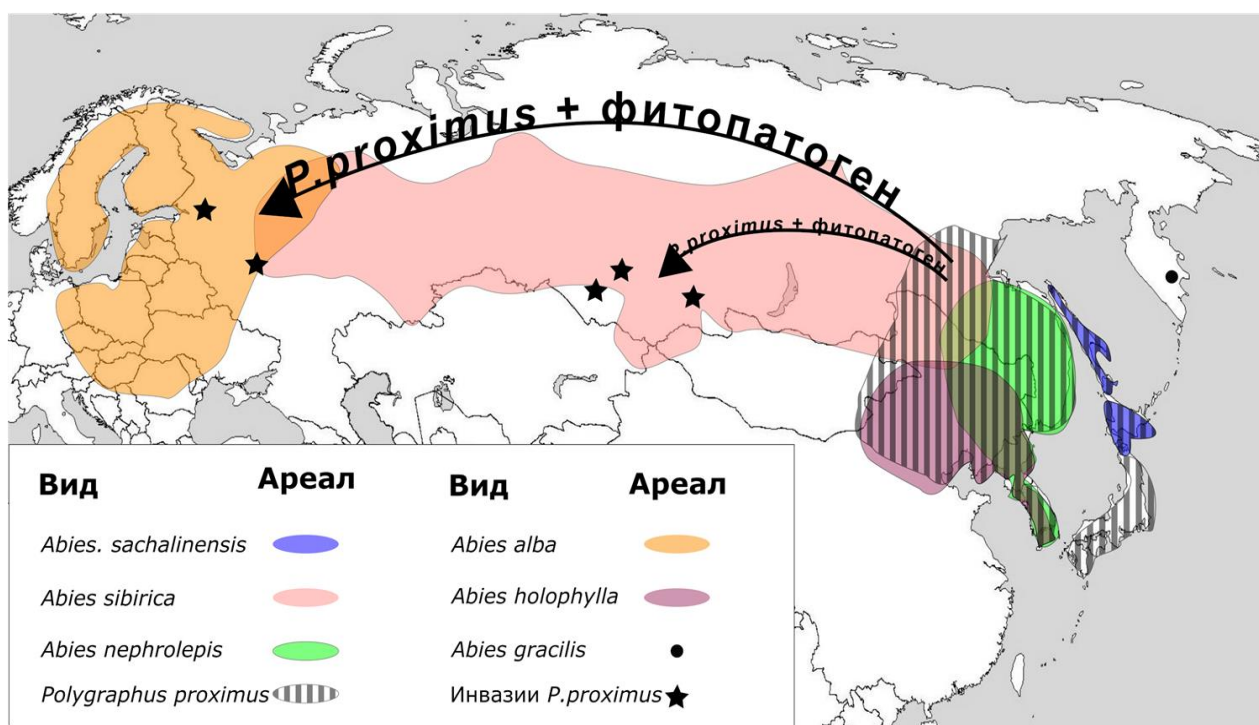
Распространение в последние десятилетия уссурийского короеда с Дальнего востока до европейской части Российской Федерации является наглядным примером крупномасштабной инвазии. Но первый случай инвазии данного жука был отмечен в европейской части России в окрестностях Санкт – Петербурга в 1999 году [Мандельштам, Поповичев, 2000]. Впоследствии данный вредитель был обнаружен на территории Московской области в 2006 году [Чилахсаева, 2008].

Предполагалось, что *P. proximus* покинул свои исходные места обитания в период 1899-1997 годах, что выразилось в гибели пихтовых лесов на площади 140 тыс. га в Красноярском крае. Согласно одному из последних исследований, проведённому с использованием дендрохронологического метода, первые случаи гибели деревьев пихты на территории Красноярского края датируются серединой 70-х годов прошлого века. Также предполагается, что интродукция данного вредителя на территорию Кемеровской области могла произойти раньше, в 60-х годах. Это предположение вероятно, поскольку известно, что в этом регионе в указанные годы для строительства Междуреченских шахт завозилась неокоренная древесина дальневосточной сосны [Кривец и др., 2015]. Данный материал мог послужить вектором для интродукции вредителя на территории Сибири.

Таким образом, в конце прошлого столетия *P. proximus* успешно обосновался на территории Южной Сибири и сформировал там

самостоятельные популяции. В начале текущего столетия этот вредитель стал увеличивать численность своих популяций. Происходили вспышки массового размножения жука, его широкое распространение и, как следствие, резкое увеличение площадей усыхания пихты в нескольких регионах Сибири.

Несмотря на такую распространённость, впервые этот короед был отмечен на территории Сибири только в 2008 году. Сначала упомянутые выше разрушения приписывали вторичному консументу пихты – пальцевому лубоеду (*Xylechinus pilosus*). Основываясь на материале тех годов и принимая в рассмотрение современное распространение и численность обоих видов, лесопатологи высказывают мнение о причастности *P. proximus* к гибели лесов в конце прошлого века. По данным 2010 года, этот жук является самым многочисленным вредителем пихты в Кемеровской и Томской областях [Баранчиков, Кривец, 2010]. Учитывая распространение *P. proximus* в Европе (Московская и Ленинградская области), можно говорить о его широкомасштабной инвазии на запад, через всю Сибирь и север европейской России [Баранчиков, Петько, 2013] (Рисунок 4).



**Рисунок 4.** Инвазия уссурийского короеда и его симбионтов на запад. На карте с помощью цвета обозначены ареалы видов пихты, являющиеся кормовыми для *P. proximus*, а также исходный ареал этого жука и места инвазии. Стрелочками указаны направления инвазии изучаемого жука-вредителя и ассоциированных с ним фитопатогенных грибов. Ареалы видов *Abies* отмечались на основе информации о распространении, полученной из баз данных [Invasive Species Compendium (CABI), 2017; The IUCN Red List of Threatened Species, 2017; Discover Life, 2017; The Gymnosperm Database, 2017; Плантариум определитель растений on-line, 2017]

Как упоминалось выше, в исходном ареале *P. proximus* не представляет большую угрозу для лесов Дальнего Востока. Данный вид в большом количестве поселяется на пихте белокорой, которая ранее была заселена другим вредителем деревьев: чёрным пихтовым усачём (*Monochamus urusovi*) [Куренцов, 1950].

На территории Сахалина была зафиксирована вспышка численности изучаемого короеда. Деревья пихты сахалинской в этом регионе были сильно поражены другими вредителями, в частности гусеницами сибирского коконопряда (*Dendrolimus sibiricus*) и монашенки (*Lymantria monacha*) [Гниненко, 2014].

В районах инвазии *P. proximus* широко распространился из-за слабой устойчивости пихты сибирской к данному вредителю и к симбиотическим грибам, облегчающим поселение жука на дереве. Первичный очаг размножения на территории инвазии, как правило, находится в ослабленном лесу: в свежих вырубках или недорубках, буреломах или лесопосадках, ослабленных какими-либо другими факторами. При дальнейшем росте численности инвазивной популяции вредитель способен расширять свой ареал, ослабляя и заселяя здоровые пихты.

Таким образом, формируется типичная *фиксированная вспышка массового размножения* короеда [Кривец и др., 2015]. Данный процесс протекает лавинообразно и останавливается после полного уничтожения кормового ресурса на территории локального пихтового насаждения. По прошествии 3-5 лет после достижения популяцией *P. proximus* максимальной численности происходит массовое усыхание и распад древостоя (Рисунок 5).





**Рисунок 5.** Усохший древостой после вспышки численности *P. proximus* на территории Томской области. Рисунок взят из методического пособия, посвящённого проблеме инвазии данного вредителя [Кривец и др., 2015].

## 1.6 Методы биологического контроля

Для сдерживания вредителя, помимо карантинных мер, могут применяться методы биологического контроля. Рассмотрим два основных подхода.

Первый заключается в интродукции новых видов естественных врагов на инвазивную территорию. Наглядным примером осуществления такого контроля может служить применение жуков рода *Rhizophagus* против большого елового лубоеда (*Dendroctonus micans*) на территории Грузии и Западной Европы [Grégoire и др., 1985].

Второй подход заключается в стимуляции развития и увеличения концентрации паразитов инвазивного вида. Так, в США для осуществления биологического контроля над короедом *Dendroctonus frontalis* была использована инкапсулированная подкормка, увеличивающая численность и продлевающая жизнь паразитам целевых жуков-вредителей [Баранчиков, Петько, 2013]. Однако реализация методов биологического контроля применительно к короедам затруднена, поскольку среди их паразитов и хищников крайне мало специализированных видов. Так, основными паразитами, участвующими в регуляции численности *P. proximus*, являются виды *Ecphyllus silesiacu*, *Meteorus ipidivorus*, *Eurytoma kangasi*, которые одновременно являются паразитами ряда других видов жуков [Баранчиков, Петько, 2013]. У исследуемого вида короедов известно 14 видов облигатных и факультативных хищников. В районах инвазии совокупного давления энтомофагов недостаточно для сдерживания численности *P. proximus*, хотя в этой совокупности организмов находятся энтомофаги, обитающие на Дальнем Востоке, в исходном ареале *P. proximus*, в том числе наиболее агрессивный в Сибири паразит короедов *Roptrocercus mirus* [Баранчиков, Петько, 2013].

## 1.7 Фитопатогенные грибы

Деревья имеют защиту от насекомых вредителей и инфекций. Такие физиологические процессы, как экссудация смолы и её кристаллизация, служат защитой от паразитического влияния [Vite, Wood, 1964]. Ещё одним механизмом защиты дерева от инфекций считается *вторичный* или *гиперчувствительный ответ* на заражение [Reid, Whitney, Watson, 1967]. В ходе этой реакции дерево увеличивает концентрацию монотерпенов и фенолов в экссудате в два раза, что влияет на рост ряда грибковых инфекций и развитие личинок короеда. В ходе вторичного ответа дерево также пытается

локализовать поражённые ткани с помощью лизиса паренхимальных клеток вокруг области инфекции [Raffa, Berryman, 1982].

Мутуалистические симбионты могут способствовать инвазии видов и их успешному закреплению на новой территории. Например, инвазия растений совместно с симбионтами микоризы более успешна, чем инвазия растений, потерявших своих муталистов [Nuñez, Horton, Simberloff, 2009]. В случае инвазии жуков-короедов одним из важнейших биотических факторов, влияющих на успешность поселения и закрепление вредителя на дереве, являются фитопатогенные симбионты.

Короеды в большой степени представляют собой векторы для грибных инфекций. Жуки переносят как конидии, так и аскоспоры фитопатогенов, которые заражают дерево, попадая на поверхность ходов [Vega, Dowd, 2005].

Основным преимуществом, которое дают грибы-симбионты короеду, является ослабление дерева-хозяина и более лёгкое закрепление на нём. Заражая дерево, патоген вызывает некротические процессы в тканях растения [Crous и др., 2004]. Так, грибы *Ceratocystis polonica*, переносимые короедами рода *Ips*, быстро распространяется по заболони и лубу, закупоривая проводящие ткани продуктами жизнедеятельности и вызывая истощение своего хозяина [Константинов, 2003]. В таких растениях ходы, прогрызенные короедом, не заливаются живицей, а смоляное давление снижено или вовсе отсутствует. Эти факты облегчают поселение ксилофагов. Под совместным воздействием насекомых-вредителей и фитопатогенов ослабленное дерево быстро погибает [Guérard и др., 2000].

В некоторых случаях грибы могут служить пищей для личинок жука, что является ещё одним преимуществом. Примером подобного симбиоза является ассоциация жука *Xyleborus dispa* и грибов рода *Candida* [Черпаков, 2014].

Различные фитопатогенные агенты переносятся насекомыми различными путями. Например, выше упомянутые грибы рода *Candida* являются частью кишечной микрофлоры жука *X. dispa*. Многие

фитопатогенные грибы также находятся на поверхности экзоскелета жука, например *Ophiostoma ainoe* и *O. bicolor* [Константинов, 2003]. У некоторых видов жуков-ксилофагов существуют специальные структуры, называемые микангии, которые образованы экзоскелетом насекомого. Они служат для переноса мицелия симбиотических грибов [Таегум и др., 2013]. Следует также упомянуть, что при заселении дерева короедом у растения помимо грибных инфекций часто наблюдаются и бактериальные. Одними из наиболее часто переносимых ксилофагами опосредованных фитопатогенами бактериальных инфекций являются бактериальная водянка (*Erwinia multivora*) и бактериальный ожог (*Erwinia amylovora*) [Черпаков, 2014].

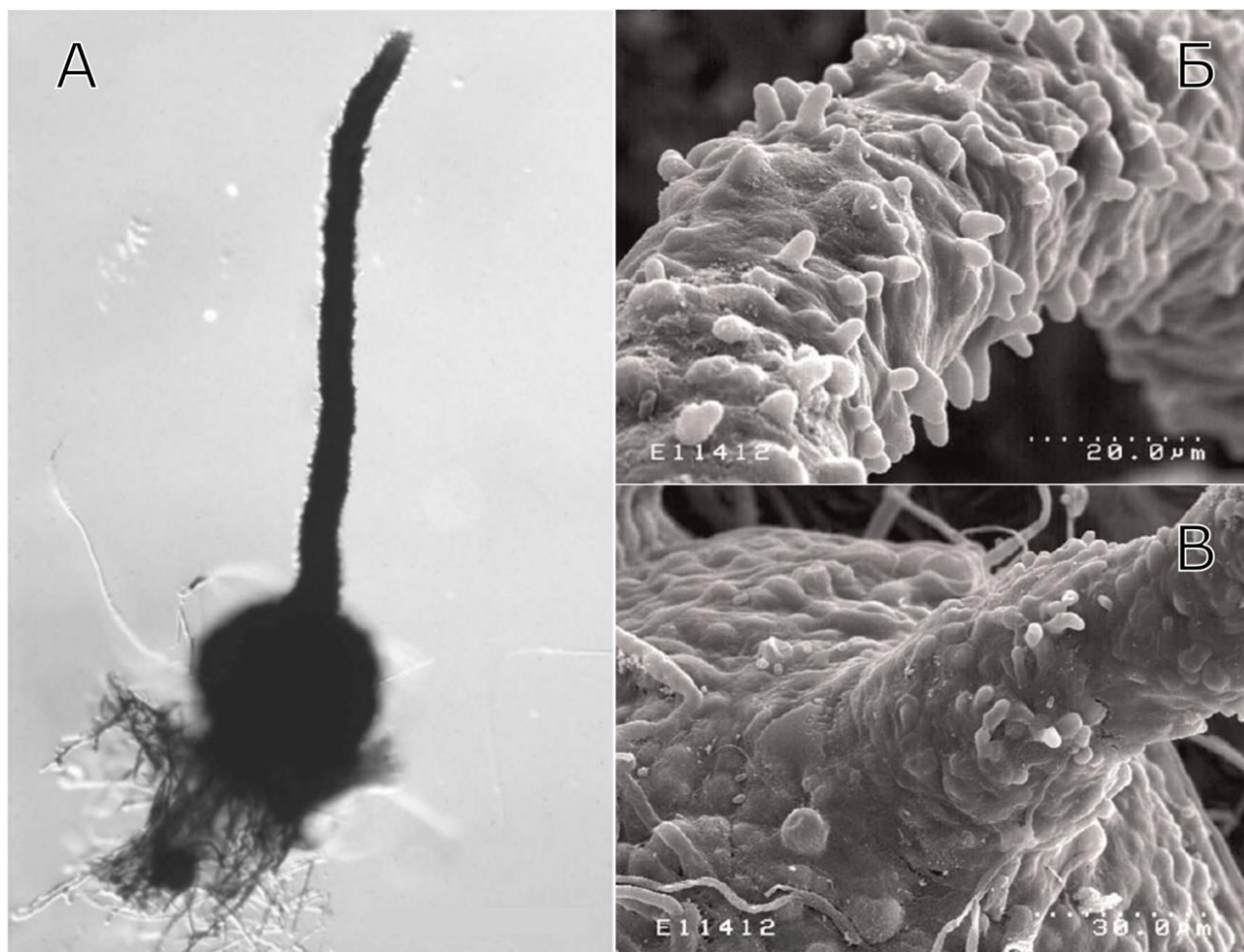
Наиболее часто встречаются в ассоциации с короедами представители семейства Ophiostomataceae (Ascomycota). На данный момент известно значительное разнообразие симбиотических грибов этого семейства. Однако информация об их разнообразии и распространении отрывочна, а данные о фитопатогенных грибах на территории Сибири и европейской части РФ практически отсутствуют. Ситуация осложняется проблемами, связанными с таксономией и номенклатурой данного семейства.

## 1.8 Сумчатые грибы (Ascomycota)

Отдел аскомицеты является самым разнообразным в царстве грибов. Он включает в себя представителей с различной экологией. Среди них встречаются сапротрофные грибы, участвующие в деструкции морт-массы растительной ткани в лесах, а также близкие им фитопатогенные грибы, инфицирующие здоровые деревья.

Важной чертой, характерной для грибов этого отдела, является формирование особого специализированного органа в процессе полового размножения – *аски*. Аской называется плодовое тело или сумка,

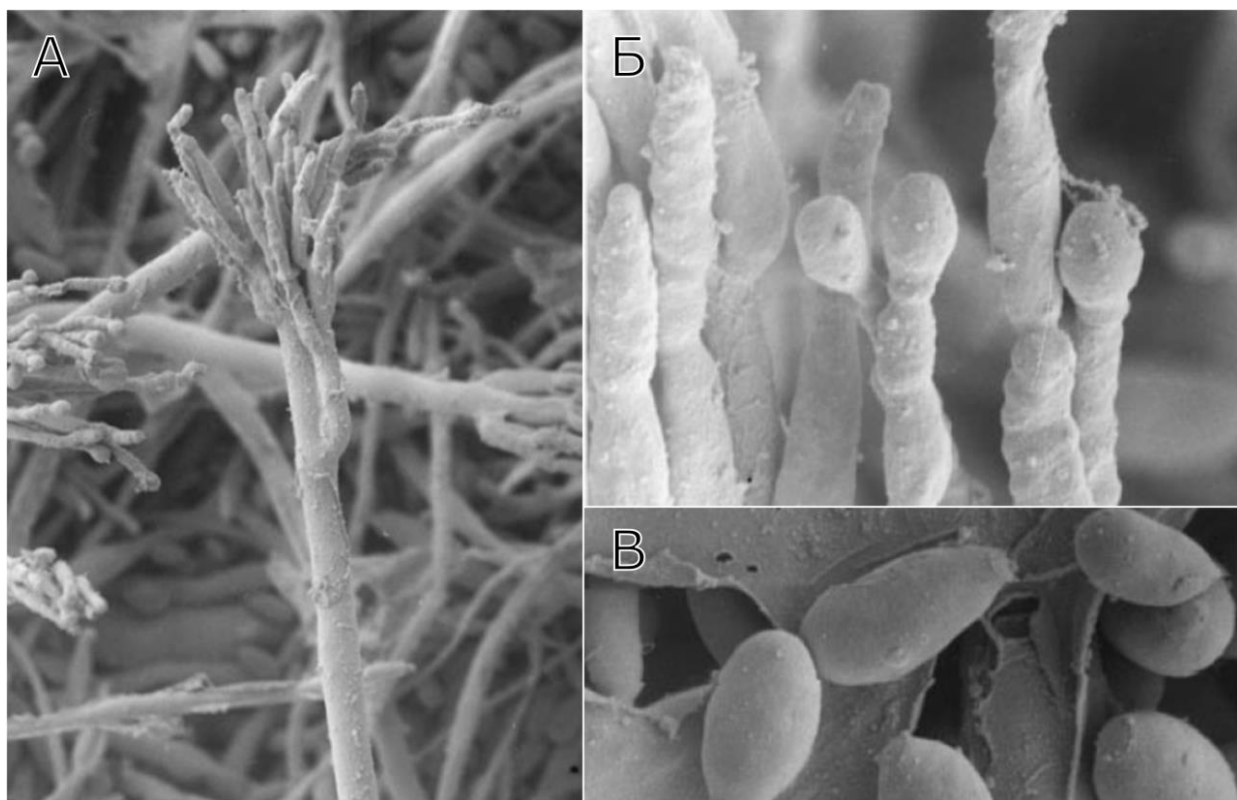
формирующаяся после копуляции гаметагиев грибов, вступивших в размножение. В этой сумке развиваются аскоспоры, из которых впоследствии формируются дочерние грибные мицелии (Рисунок 6) [Кутафьева, 2003].



**Рисунок 6.** Строение плодового тела сумчатого гриба на примере *Grosmannia aoshimae*. (А) Общий вид плодового тела гриба перетечиального типа. Фотография сделана при помощи оптического микроскопа. (Б и В) Шейка перитеция. Фотографии сделаны с использованием электронного микроскопа. Данный тип сумки является полузамкнутым и имеет отверстие на конце шейки, откуда выходят аскоспоры гриба. Микроскопические фотографии взяты из оригинальной работы, в которой данный вид был впервые описан [Ohtaka и др., 2006].

В жизненном цикле аскоспоровых грибов помимо стадии полового размножения, называемой теломорфной, существует стадия бесполого размножения, называемая анаморфной. Анаморфа гриба служит для быстрого увеличения численности и биомассы, а также для его быстрого

распространения. Анаморфная форма гриба производит споры в процессе бесполого размножения и, как следствие, обладает большей репродуктивной мощностью, чем теломорфная. Бесполое размножение осуществляется с помощью специализированных образований, называемых конидиомами. Конидиомы представляют собой образования различной формы из гиф гриба. Они расположены на поверхности мицелия и несут на себе большое количество спор, называемых конидиями (Рисунок 7) [Кутафьева, 2003].



**Рисунок 7.** Строение конидиома сумчатого гриба на примере *Leptographium sibirica*. Фотографии сделаны с помощью электронного микроскопа. (А) Общий вид конидиома. (Б) Формирующиеся конидии на конце конидиеносца. (В) Конидии – споры. Микроскопические фотографии взяты из оригинальной работы, в которой данный вид был впервые описан [Jacobs и др., 2000].

Как плодовые тела аскомицет, так и их конидиомы, очень разнообразны по размеру, форме и внутреннему строению. Эти различия использовались морфологами для систематизации разнообразия сумчатых грибов.

Чередование половой и бесполой формы организма зависит от условий, в которых произрастает гриб [Vega, Dowd, 2005] Так, в процессе

культивирования в лабораторных условиях многие виды размножаются исключительно бесполом путём. А при многократном пересеве культур в условиях лаборатории, колонии некоторых видов изменяют свой цвет [Linnakoski и др., 2016]

## 1.9 Систематика фитопатогенов

Сложность и нелинейность жизненных циклов грибов и разнообразие экологических ниш, в рамках которых они обитают, породили трудности в исследованиях данного семейства. Из-за больших морфологических различий половой и бесполой стадии, а также из-за их непостоянного чередования, теломорфную и анаморфную стадию одного и того же гриба часто относили к разным видам и родам. Это привело к путанице в номенклатуре семейства. На основании морфологических признаков теломорфных и анаморфных форм к этой группе применялись различные схемы классификаций [Perry, 1991]. С появлением методов молекулярной генетики и использованием молекулярных маркёров для систематизации биоразнообразия таксономия семейства *Ophiostomataceae* претерпела большие изменения. Большая часть родов оказалась полифелитичной [Hausner, Reid, Klassen, 1992].

В связи с изменением систематики и номенклатуры многие таксономические названия, ввиду их применения к разным формам одного организма, сведены до уровня синонимов. Ярким примером такого изменения можно считать вид *Ophiostoma piceaperdum* (Rumbold) [Rumbold, 1936]. Сначала данный вид был объединен с *O. europioides* (E. F. Wright & Cain) [Upadhyay, 1981; Wright, Cain, 1961], впоследствии и с *Ceratocystis pseudoeuropioides* [Jacobs, Wingfield, 2000]. Все вышеперечисленные названия стали рассматриваться как синонимы.

Ряд названий родов (*Leptographium*, *Pesotum*, *Hyalorhinocladiella* и др.) перестали обозначать таксономические категории, а остались как обозначения анаморфной формы гриба. Тем не менее, данные термины до сегодняшнего дня часто используются в качестве родового названия. Так, согласно современной номенклатуре все виды, объединенные в род *Grosmannia*, имеют *Leptographium*-подобную анаморфную форму, поэтому для обозначения этих видов часто используется изначальное родовое имя, например, *Leptographium procerum* и *L. taigense*.

В настоящей работе не стоит цели пересмотреть таксономию изучаемой группы организмов, в дальнейшем таксоны будут обозначаться согласно с последним номенклатурным справочником данного семейства [Beer, Seifert, Wingfield, 2013].

Фиопатогенные грибы рода *Ophiostoma sensu lato* (Ascomycota) являются наиболее часто встречаемыми представителями симбиоты короедов. Изначально, полифилитичный род был разделён на три монофилетичных рода согласно молекулярному анализу: *Grosmannia*, имеющие *Leptographium*-подобную анаморфную форму, *Ceratocystiopsis*, имеющие *Hyalorhinocladiella*-подобную анаморфную форму и чувствительность к циклогексимиду, а также экологически разнообразные виды *Ophiostoma sensu stricto*, имеющие *Sporothrix*- или *Pesotum*- подобную анаморфную форму [Zipfel и др., 2006]. В недавних исследованиях в группе *Ophiostoma s.l.* выделяют 6 родов и 18 видовых комплексов (*Ophiostoma s. str.*, *Raffaelea s. str.*, *Ceratocystiopsis*, *Fragosphaeria*, *Graphilbum*, и *Grosmannia* или *Leptographium s. l.*) [Beer, Seifert, Wingfield, 2013; Yamaoka, 2017]



### 1.10 Под *Ophiostoma*

Фитопатогенные грибы рода *Ophiostoma* переносятся различными видами короедов, но, несмотря на их ассоциацию с жуками, они имеют самостоятельное фитопатогенное значение [Vega, Dowd, 2005]. Так, при искусственном инфицировании растения без участия насекомого-вредителя гриб вызывает гибель растения. Представители данного рода являются факультативными паразитами. Однако специалисты отмечают направленность эволюции в сторону паразитизма ввиду наблюдаемой специализации к конкретным растениям у некоторых видов рода *Ophiostoma* [Константинов, 2003].

Не все представители данного рода являются агрессивными паразитами деревьев. Среди них встречаются и виды безвредные или частично патогенные для своих хозяев [Six, Wingfield, 2011].

Взаимоотношения грибов этого рода с насекомыми переносчиками тоже различно. Большинство видов *Ophiostoma* по отношению к короедам представляют собой симбионтов-комменсалов [Yamaoka, 2017]. Некоторые виды могут служить пищей для личинок жуков, а другие способны ингибировать развитие личинок. Таким образом, могут формироваться, соответственно, положительные или отрицательные обратные связи с популяцией переносчика [Hofstetter и др., 2006]. Благодаря такому взаимодействию фитопатогена и его переносчика, даже если гриб не агрессивен в своей естественной среде, на инвазивной территории он может вызвать вспышку численности ассоциированного с ним вредителя и причинить большой урон лесам данной местности.

Одним из примеров такого процесса можно считать распространение и рост численности короеда *Dendroctonus valens* на инвазированных территориях. Это произошло в результате взаимодействия

интродуцированного жука со своими офистомовыми грибами-симбионтами [Lu и др., 2010].

В пределах своего естественного ареала *P. proximus* являлся переносчиком 11-ти видов фитопатогенных грибов-ассоциантов из рода *Ophiostoma* [Pashenova, Petko, Baranchikov, 2013]. Пихты из исходного ареала в течение совместной эволюции выработали специфичные механизмы устойчивости к фитопатогенам, что позволило выжить даже заражённым деревьям. На инвазивных территориях скорость и интенсивность защитной реакции деревьев ниже, чем в исходном ареале из-за отсутствия резистентности к инфекции у пихт. Отсутствие у местных деревьев какой-либо устойчивости к этим фитопатогенным грибам является одной из причин быстрого распространения *P. proximus* на новых территориях [Баранчиков, 2010].

### **1.11 Симбиотическое разнообразие**

Изначально симбиоз представлялся биологами как особенная связь двух организмов, сформированная в определённых условиях окружающей среды и приносящая пользу участвующим в ней организмам. С увеличением наших знаний о межвидовых взаимодействиях представление о данном феномене не только усложнилось, но и, в некотором смысле, приобрело всеобъемлющий характер.

К примеру, каждый индивидуальный организм млекопитающего оплетен сетью симбиотических взаимоотношений с большим количеством микроорганизмов, обитающих на поверхности кожи, на слизистых, в органах пищеварения. Микроорганизмы участвуют в физиологических процессах и процессах развития, а также наследуются в ряду поколений [Gilbert, Sapp, Tauber, 2012]. Поэтому, при изучении симбиоза, эту систему межвидовых

взаимоотношений часто рассматривают как экосистему и используют соответствующие подходы для её изучения [Douglas, 2010].

Жуки-короеды имеют симбиотические отношения с широким спектром фитопатогенных грибов, образующих их симбиотическое сообщество или симбиоту. При изучении этих сообществ применяются подходы оценки видового разнообразия экосистем [Kostovcik и др., 2014].

Выделяют различные уровни видового разнообразия и подходы к их оценке и изучению [Бродский, 2002]. Для изучения симбиоты короедов применяют методы оценивания  $\alpha$ (альфа)-разнообразия [Kostovcik и др., 2014]. На этом уровне рассматривается разнообразие видов внутри сообщества или в пределах одного местообитания [Алексанов, 2017]. Так, изучение и оценка состава симбиоты *P. proximus* в настоящем исследовании проведена методами  $\alpha$ -разнообразия.

Разнообразие между сообществами, степень дифференцированности и распределения видов и степень изменения видового состава сообществ рассматривается как  $\beta$ (бета)-разнообразие. Использование методов  $\beta$  – разнообразия позволяет оценить разницу видового состава симбиотических сообществ жука между исходными и инвазивными популяциями.

При изучении  $\alpha$ -разнообразия сообщества используются индексы, оценивающие два аспекта видового разнообразия: видовое богатство и выравненность. Первый аспект отражает количество видов, присутствующих в сообществе. Данная оценка достаточно проста и может характеризовать разнообразие в первом приближении.

Наиболее часто используемыми индексами видового богатства являются индекс Маргалефа и индекс Менхиника (Таблица 1) [Бродский, 2002]. Разнообразие – это комплексное понятие, и его невозможно оценить, посчитав виды, входящие в биологическое сообщество. Так виды могут иметь разную представленность. Экосистемы, в которых один вид представляет подавляющее большинство, а все оставшиеся члены сообщества присутствуют

в незначительном количестве, должен характеризоваться меньшим разнообразием, чем экосистемы, виды в которых равнопредставлены.

Такая оценка сообществ возможна с использованием индексов, учитывающих относительное обилие видов внутри изучаемой системы [Kindt, Сое, 2010]. Наиболее часто используемыми индексами для оценки видового разнообразия с учётом обилия считаются индекс Бергера-Паркера, индекс Симпсона или величина обратная ему – индекс полидоминантности (Таблица 1). Данные индексы также используются для оценки выравненности сообщества.

Недостатками использования данных подходов считается их относительный характер оценивания. Сравнивая значения индексов, возможно получить количественные оценки исследуемых сообществ, и использовать эти оценки для их сравнения. Напрямую использовать статистические методы для оценки полученных результатов невозможно. В некоторых работах используются дополнительные методы «ресамплинга» (ресэмплинг – resampling) и рандомизации позволяющие проводить статистическую оценку значимости полученных результатов [Шитиков, Розенберг, 2013]. Данный подход имеет ряд ограничений, в частности необходимость значительного количества наблюдений в каждой анализируемой выборке.

В данном исследовании упомянутые индексы используются для изучения и сравнения видового разнообразия симбиотических сообществ жуков из популяций исходного и инвазивного ареалов.

Ещё одной группой индексов, учитывающих как видовое богатство, так и относительное обилие видов, являются информационно-статистические индексы. Среди них наиболее часто используемым является индекс Шеннона. Изначально этот индекс использовался для оценки энтропии в теории информации. Позже стал применяться в различных областях науки, в том

числе для оценки разнообразия экосистем в экологии [Шитиков, Розенберг, 2013].

Большим преимуществом индекса Шеннона является то, что это выборочный показатель, а, следовательно, он позволяет проводить статистическую оценку полученных значений. Для проверки значимости различий между двумя сообществами используется критерий Стьюдента. Благодаря возможности оценивать достоверность различий между симбиотическими сообществами из разных популяций *P. proximus*, этот подход представляет особый интерес.

Оценка  $\beta$ -разнообразия возможна с помощью расчёта индекса Уиттекера, который объединяет оценки разнообразия из нескольких сообществ или регионов. Однако в случае изучения симбиоты одного короеда *P. proximus* использование этой оценки не информативно.

При изучении  $\beta$ -разнообразия также оцениваются различия между сообществами. Для этого используются индексы общности или коэффициенты сходства. Одна из наиболее часто используемых оценок общности – индекс Жаккара [Алексанов, 2017]. Этот индекс, как и в случае индексов  $\alpha$ -разнообразия, носит относительный характер. Вычисление коэффициентов сходства имеет смысл, только если изучается более двух сообществ.

**Таблица 1.** Индексы оценки видового разнообразия.

Название Индекса	Формула	Описание
Индекс Маргалефа	$D_{mg} = \frac{S - 1}{\ln N}$	Оценка видового богатства
Индекс Менхиника	$D_{mn} = \frac{S}{\sqrt{N}}$	Оценка видового богатства
Индекс Бергера-Паркера	$d = \frac{N_{max}}{N}$	Относительная значимость наиболее обильного вида
Индекс Симпсона	$D = \frac{\sum n_i(n_i - 1)}{N(N - 1)}$	Вероятность принадлежности

		любых двух особей, случайно отобранных из неопределенно большого сообщества, к разным вида
Индекс полидоминантности	$S_\lambda = 1/D$	Величина, обратная индексу Симпсона
Выравненность	$E = S_\lambda/S$	«Равновозможность», с которой особи представлены по видам в сообществе.
Индекс Шеннона	$H = - \sum \left( \frac{n_i}{N} \ln \frac{n_i}{N} \right)$	Оценка энтропии дискретной системы
Индекс Уиттекера	$\beta_w = \frac{S}{\alpha} - 1$	Оценка уровня $\beta$ - разнообразия
Индекс Жаккара	$I_j = \frac{a}{a + b + c}$	отношение числа общих видов для двух списков к общему числу видов

Обозначения, используемые в формулах:  $S$  – число видов в сообществе,  $N$  – число особей в сообществе,  $n_j$  – число особей  $j$ -ого вида,  $N_{\max}$  – число особей наиболее представленного вида,  $\alpha$  (альфа) – среднее разнообразие изучаемых сообществ,  $a$  – число видов, общих для двух сообществ,  $b$  – число видов, присутствующих только в первом сообществе,  $c$  – число видов, присутствующих только во втором сообществе.

## 1.12 Симбиотические сообщества

Одним из классических генерализованных представлений о структуре сообществ, основанных на биологическом разнообразии, является теория конкурентно-равновесного сообщества [May, 1974]. Согласно этой теории виды, находящиеся внутри одного сообщества, разделены различными

экологическими нишами или микростациями. Эти виды подвержены принципу конкурентного исключения Ф. Г. Гаузе [Букварева, Алещенко, 2012]. Таким образом, при условии ограничения ресурсов число видов сообщества лимитировано числом экологических ниш.

В отношении сообщества фитопатогенных симбионтов короеда это значит, что грибы, обнаруживаемые в ассоциации с *P. proximus*, сегрегированны пространственно (развиваются в разных частях галерей, прогрызенных короедом), временно (на разных фазах жизненного цикла жука) или биологически (в разных тканях растения или на разных породах). В рамках этой парадигмы изменение разнообразия сообщества происходит из-за изменения диапазона доступных ресурсов и ширины ниш.

Следует упомянуть, что эта концепция была дополнена Ч. Элтоном. Он сделал вывод, что близкородственные виды должны чаще иметь разобщённые экологические ниши, поскольку ввиду их схожей экологии между ними возникает более сильная конкуренция [Elton, 2011]

Противоположной точкой зрения на данный вопрос считается концепция нейтральности или концепция С. Хаббела [Harpole, 2010]. Согласно этой концепции разнообразие локального сообщества определяется не конкурентными взаимоотношениями видов, а случайным заселением видами из мета-сообщества и процессом вымирания части из этих видов.

На первый взгляд, эта концепция больше подходит для описания симбиотических сообществ *P. proximus*. В основе её лежит не биологическая сегрегация видов по нишам, как в теории конкурентно-равновесных сообществ, а расселение видов, что соответствует изучаемому процессу инвазии [Matthews, Whittaker, 2014]. Также, альтернативным принципу конкурентного исключения является принцип сосуществования таксономически близких видов [Voerden, 1986]. Согласно этому принципу филогенетически близкие виды имеют схожие экологические характеристики и сосуществуют вместе более часто и более тесно, чем это может быть при

случайном распределении видов по различным местообитаниям [Шварц, 2004].

Поскольку в симбиотическом сообществе *P. proximus*, как правило, сосуществуют виды из одного или из близких родов, принцип сосуществования может быть применён к фитопатогенным симбиотическим сообществам короёда. Однако, как будет показано в результатах, этот принцип не выполняется в случае симбиоты изучаемого короёда. На межвидовом уровне в ходе инвазии происходят изменения видового разнообразия под влиянием конкурентного исключения, а принципы сосуществования и нейтральности можно применить только на уровне родов.

Распространения *P. proximus* по территории Российской Федерации по меркам популяционной биологии и эволюции произошло совсем недавно. Это событие даёт особую возможность для изучения процессов инвазии на каждом его этапе. Тесная связь данного короёда с фитопатогенными грибами, а также существенная изменчивость видового состава симбиоты жука может служить дополнительным источником информации об экологических особенностях инвазии. В свою очередь инвазия позволяет изучить особенности взаимоотношений между участниками симбиоза.

В разрезе озвученных выше научных интересов в данной работе исследуется генетическое и видовое разнообразие в исходных и инвазивных популяциях комплекса вредителей хвойных деревьев, состоящего из короёда *P. proximus* и его грибов-симбионтов, на территории России.

Изучение рассмотренной биологической системы проводилось в двух направлениях. Первым направлением является изучение генетической структуры популяций *P. proximus*. На сегодняшний день данных о генетике популяций этого вида немного, а информации о инвазивных популяциях нет. Поэтому первый шаг в этом направлении – устранение указанных пробелов и получение как можно более полных генетических данных о популяциях



вредителя. Дальнейшим шагом будет установление генетической структуры популяций вида *P. proximus*, установление межпопуляционных различий и внутривидового разнообразия. Вторым направлением данной работы является изучение симбионтов короеда. В этом направлении мы сталкиваемся с аналогичными трудностями и должны проделать аналогичные шаги для их преодоления. Установив видовой состав симбиотического сообщества *P. proximus*, необходимо соединить результаты популяционного анализа короеда и анализа симбиотических грибов, чтобы получить представление о генетической структуре изучаемой биологической системы «жук-симбионт».

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В настоящей главе будут рассмотрены образцы жуков *P. proximus*, собранные для изучения, а также образцы культур фитопатогенных грибов, выделенные из ходов, прогрызенных данным вредителем. Будут описаны методы, использованные для получения культур грибов, а также молекулярные и биоинформатические методы, использованные в данной работе для анализа популяций короеда и его симбионтов.

### 2.1 Сбор и морфологический анализ материала

Все работы по сбору культивированию грибов и морфологическому анализу образцов выполнялись на базе Института леса им. В. Н. Сукачёва СО РАН (г. Красноярск) нашими коллегами из лаборатории лесной зоологии (заведующий лаборатории Ю. Н. Баранчиков).

Для изучения генетической структуры популяций *P. proximus* использованы образцы (n=309), собранные в течение 2010-2014 гг. из популяций с территории Российской Федерации, включающих европейскую часть страны, Западную и Центральную Сибирь, Дальний Восток, а также из популяций с территории Японских островов (Таблица 2). Взрослые жуки собирались со стволов заражённых деревьев в естественных или искусственных насаждениях пихты. Все собранные образцы были помещены в 95% этанол и далее хранились при 6°C.

Таблица 2. Места сбора и количество образцов *P. proximus*

Регион	Административный субъект	Место сбора	Количество образцов
Европа	Московская область	Московский ботанический сад	9
		Российский Государственный Агрокультурный Университет, Москва	3
		Новогорск	2
		Михайловское	2
Западная Сибирь	Новосибирская область	Новосибирск	10
		Маслянинский район	49
	Томская область	Томск	9
		Река Басендайка	17
	Кемеровская область республика Алтай	Кемерово	11
		Артыбаш	8
Телецкое озеро	12		
Центральная Сибирь	Республика Хакасия	Кузнецк Алатау	15
		Балыкса	15
		Чебаки	28
	Красноярский край	Козулька	16
		Емельяновский район	10
		Заповедник «Столбы»	11
Дальний восток	Хабаровский край	Хабаровск	18
	Приморский край	Уссурийский природный заповедник	10
		Лазовский природный заповедник	21
	Сахалинская область	о. Сахалин	7
Япония	о. Хонсю	-	26

\*Все образцы *P. proximus* участвовали в генетическом анализе. Секвенированные последовательности из образцов добавлены в базу данных GenBank под номерами KR817585–KR817620.

Материал для изучения грибов-симбионтов собран в период 2010-2016 гг. на территории Дальнего Востока, в Южной Сибири и европейской части Российской Федерации (Таблица 3). Материал представлен высечками из стволов пихт (кора и подстилающая ее древесина, 4-9 x 3-5 см).

**Таблица 3.** Количество образцов собранных с исследуемых территорий и грибковые культуры, полученные из данных образцов.

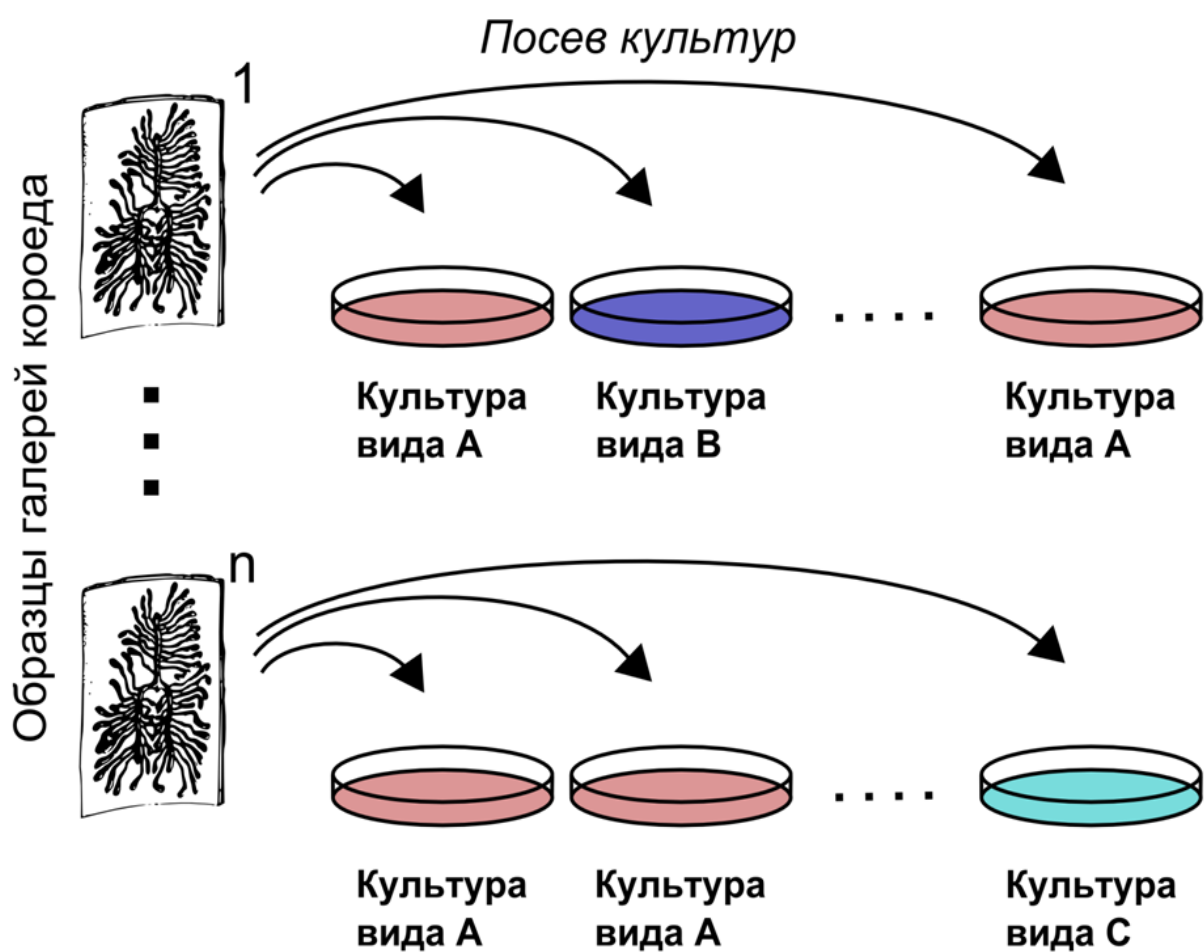
	<b>Европа,</b> 24 образца (%)	<b>Западная Сибирь,</b> 38 образцов (%)	<b>Центральна я Сибирь,</b> 160 образцов (%)	<b>Дальний Восток,</b> 81 образец (%)
<i>Geosmithia spp.</i>	4 (16.7)	13 (34.2)	92 (57.5)	11 (13.6)
<i>Graphilbum microsporum</i>	-	6 (15.8)	37 (23.1)	21 (25.9)
<i>Gra. rectangulospori um</i>	1 (4.2)	5 (13.2)	27 (16.9)	16 (19.8)
<i>Grosmannia aoshimae</i>	17 (70.8)	26 (6.8)	118 (73.8)	62 (76.5)
<i>Gro. europioides</i>	-	-	-	7 (8.6)
<i>Leptographium aenigmaticum</i>	-	-	-	1 (1.2)
<i>L. sibirica</i>	-	-	21 (13.1)	-
<i>L. taigense</i>	-	-	-	2 (2.5)
<i>Ophiostoma nikkoense</i>	-	1 (2.6)	11 (6.9)	11(13.6)
<i>O. piceae</i>	-	1 (2.6)	4 (2.5)	4 (4.9)
<i>O. subalpinum</i>	3 (12.5)	6 (15.8)	31 (19.4)	25 (30.9)

\*В названии колонки указано количество образцов коры с галереями вредителя, взятых на анализ из каждого региона. В клетках таблицы указано количество образцов галерей, из которых были получены грибковые культуры соответствующего вида. В скобочках указана частота встречаемости данного вида в образцах галерей на данной территории. Нужно отметить, что из одной галереи получают несколько культур,

относящихся к разным видам грибов, поэтому сумма чисел в столбике может превышать суммарное количество образцов, взятых из данного региона (Рисунок 3).

Всего микологическому анализу были подвергнуты 303 образца растительных тканей, содержащих ходы уссурийского полиграфа (Рисунок 8). Образцы зачищали от тонкого слоя внешней мертвой коры, разделяли на две части (коровая и древесинная) и помещали в стерильные влажные камеры, приготовленные из чашек Петри и фильтровальной бумаги. Влажные камеры инкубировали в темноте при температуре 20-24С<sup>0</sup> в течение 6 недель.

Для изолирования чистых культур аскоспоры или конидии грибов переносили стерильной иглой с образца на агаровую среду, к которой была добавлена молочная кислота (4 мл/л среды), чтобы ингибировать рост бактерий. Для изолирования, культивирования и поддержания чистых культур в лабораторной коллекции использовали агаризованную среду на основе разбавленного неохмеленного пивного сусла (2-3<sup>0</sup> по Баллингу).



**Рисунок 8.** Схема выделения грибковых культур из образцов растительной ткани. Растительные ткани представляют собой вырубку галерей, прогрызенных короедом, в которых развиваются фитопатогенные грибы. Из каждого образца галереи высевались ряд культур (на рисунке отмечено стрелочками). В ходе получения чистых культур фитопатогенов из одного образца галереи *P. proximus* могло быть изолировано несколько разных видов грибов (на рисунке отмечено цветом).

Морфологическую идентификацию грибов выполняли по совокупности культуральных и микроморфологических признаков, описанных при росте грибов на естественном субстрате (флоэма, древесина) и агаровой среде.

На основе морфологического анализа среди грибковых культур выделялись морфологические группы. В каждой из групп были отобраны культуры с выраженной для данного типа морфологией. Они участвовали в дальнейшем молекулярно-генетическом анализе.

## 2.2 Молекулярно-генетический анализ

Суммарная геномная ДНК была выделена из насекомых и грибковых культур с использованием набора для экстракции DNeasy® Blood & Tissue kit (Qiagen Inc., США) согласно инструкциям производителя. Для изучения генетической вариабельности были амплифицированы последовательности митохондриальных генов COI и COII (участки генов цитохромоксидазы, субъединицы 1 и 2) *P. proximus* длиной 1338 п.н. и 560 п.н. соответственно. Последовательности COI были получены ПЦР амплификацией двух перекрывающихся участков ДНК с использованием трёх пар праймеров: 911 (5'-ТТТСТАСАААТСАТАААГАТАТТGG-3') и 912 (5'-ТАААСТТCAGGGTGACCAAAAАТСА-3') [Guryev и др., 2001], M5 (5'-СААСАТТТАТТТТGАТТТТТТGG-3') и M3 (5'-ССААТGCACTAАТCTGCCАТАТТА-3') [Mikkola, Ståhls, 2008] и AP-L-2176 (5'-GGTACAGGTTGAАСТGTTTACCC-3') и AP-H-2650 (5'-TCCGACTGTAAАТАТGTGATGTGCTC-3') [Pedersen, 1996].

Праймеры C2J (5'-AGAGCTTCTCCTTTAАТАGААСА-3') и C2N (5'-ССАСАААТТТCTGAАСАТТGACCA-3') были использованы для получения последовательностей COII маркёра [Bugrov и др., 2009]. Для оценки генетической вариабельности изучаемых грибных культур были амплифицированы последовательности ДНК-маркёров ITS2 (второй межгенный спейсер кластера рибосомальных генов) длиной 311 п.н. и LSU (ген 28S рибосомальной РНК) длиной 928 п.н. Амплификация ITS2 последовательностей проводилась с использованием праймеров: ITS5 (5'-TCCTCCGCTTАТТGАТАТGC-3') и ITS4 (5'-GAAGTAAAAGTCGTAАСАAGG-3'), а LSU при помощи праймеров LR0R (5'-ACCCGCTGAАСТТАAGC-3') и LR5 (5'-TCCTGAGGGAAАСТTTCG-3') [Schoch и др., 2012]. ПЦР реакция проводилась в объёме 20 мкл, содержащих 2 мкл раствора с образцом ДНК, 200 мкМ каждого dNTP, 0,2 мкМ каждого

праймера, 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 50 мМ KCl, 10 мМ Tris-HCl (pH 9.0 при 25°C), 1% Triton X-100 и 2.5 единиц of Taq polymerase. ПЦР реакцию проводилась в амплификаторе PC-Personal Cyler (Biometra, Германия) со следующим температурным профилем: начальная денатурация 10 мин при 95°C, далее следовало 35 циклов 15 с при 95°C, 30 с при 52°C, 1,5 мин при 72°C, и последний шаг, элонгация при 72°C в течение 9 мин.

Полученные ПЦР-продукты тестировали в 1,5% агарозном геле и далее вырезали визуализированные ДНК-фрагменты из геля. Выделение и очистку полученного ПЦР-продукта проводили с использованием набора реактивов Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, США). Очищенный продукт секвенировали в обоих направлениях с помощью секвенатора ABI PrISM 3100 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США) с использованием набора реактивов Big Dye terminator sequencing kit (Applied Biosystems) на базе ЦКП «Геномика» СО РАН (г. Новосибирск, <http://sequest.niboch.nsc.ru>).

### 2.3 Биоинформатический анализ

Полученные нуклеотидные последовательности сравнивались с последовательностями маркёров из базы данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) при помощи программы BLAST(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). На основании идентичности с последовательностями из базы данных определялась видовая принадлежность образца. Случаи отсутствия однозначного соответствия полученных последовательностей и генетической информации из базы данных обсуждаются в разделе о генетическом анализе. Отобранные таким путем гомологичные последовательности выравнивали алгоритмом MUSCLE [Edgar, 2004] в программе UGENE 1.16 [Okonechnikov, Golosova, Fursov, 2012],



далее производили их филогенетический анализ с целью визуализации и подтверждения их генетического родства. Использовался метод максимального правдоподобия реализованный в программе PhyML с использованием aLRT теста для оценки значимости кластеризации [Anisimova, Gascuel, 2006; Guindon и др., 2010]. Также филогенетический анализ проводился на основе байесовского подхода в программе MrBayes версии 3.2.5 (<http://mrbayessourceforge.net>). При запуске производилось вычисление четырёх последовательностей Марковских цепей Монте-Карло (MCMC) по 100 000 генераций. Для оценки генетического и гаплотипического разнообразия, расчёта  $\Phi_{ST}$  и анализа молекулярной вариации (AMOVA) использовалась программа ARLEQUIN v. 3.11 [Excoffier, Laval, Schneider, 2007].

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

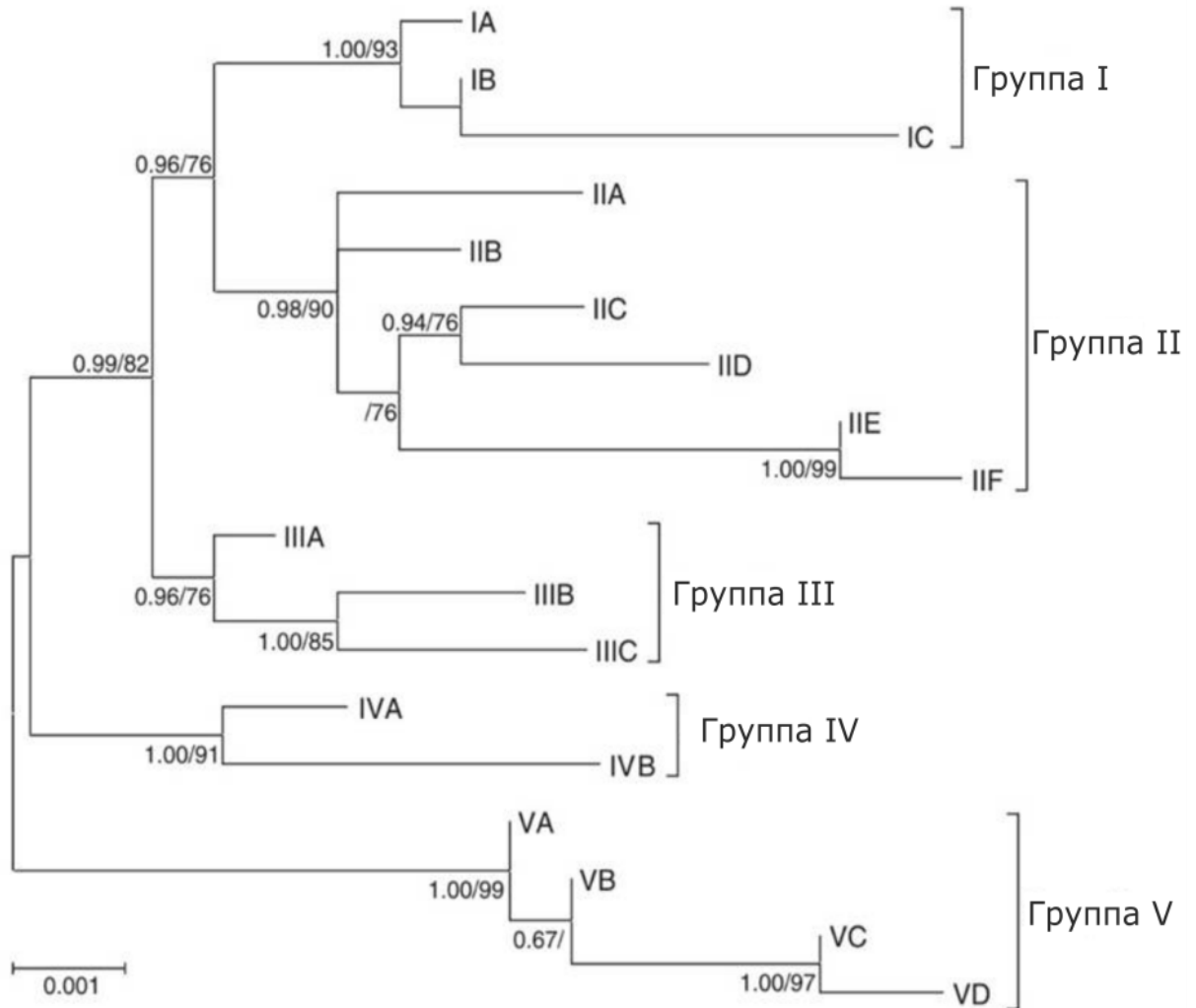
### 3.1 Изучение популяций *P. proximus*

В настоящей главе будут представлены результаты, полученные в ходе исследования исходных и инвазивных популяций *P. proximus*. Будут рассматриваться результаты анализа генетического разнообразия популяций короеда, полученные на основе молекулярного анализа митохондриальных ДНК-маркёров. Будет рассмотрены результаты филогенетического анализа полученных молекулярных данных. В данной главе будут обсуждаться генетическая структура популяций в исходном и инвазивном ареале жука и популяционные события, происходившие с вредителем в ходе его инвазии.

#### 3.1.1 Анализ генетического разнообразия *P. proximus*

В первой части работы была изучена генетическая структура популяций *P. proximus* на исследуемых территориях. Для этого были секвенированы 16 образцов *P. proximus* из европейской части страны (Московская область), 116 образцов из популяций Западной Сибири, 95 из Центральной Сибири, 56 из Дальнего Востока и 26 с территории Японии (Таблица 2). Последовательности COI и COII для каждого образца были конкатенированы и далее участвовали в сравнительном анализе. На основе данных последовательностей выделено 18 гаплотипов, объединённых в 5 групп. Кластеризация осуществлялась методом максимального правдоподобия и байесовской реконструкции (Рисунок 9). ДНК-последовательности исследуемых маркёров для каждого гаплотипа опубликованы в международной базе данных GenBank. Нуклеотидные последовательности, аминокислотные последовательности, кодируемые генами COI и COII, а также другую подробную информацию об секвенированных последовательностях можно найти в указанной базе данных

под номерами: KR817585 – KR817620 (Приложение 1). Количество, распространённость и генетическая дисперсия гаплотипов для каждого географического региона отражена в таблице 4.



**Рисунок 9.** Филогенетические взаимоотношения гаплотипов *P. proximus*, реконструированные на основе конкатенированных последовательностей маркёров COI и COII с использованием метода максимального правдоподобия и Байесовского анализа. 5 групп выделены скобками справа. Каждая ветвь на филогенетическом дереве соответствует гаплотипу. Коэффициенты поддержки выше 60%, соответствующие Байесовской достоверности (левое число) и коэффициенту поддержки aLRT для максимального правдоподобия (правое число), указаны слева от соответствующих узлов на дендрограмме.

**Таблица 4.** Индексы генетического разнообразия популяций *P. proximus* для каждого исследуемого региона.

Регион	N	K	k	h ( $\pm$ SE)	$\pi$ ( $\pm$ SE)
Европа	16	4	25	0.742 $\pm$ 0.057	0.00504 $\pm$ 0.00068
Западная Сибирь	116	2	7	0.214 $\pm$ 0.035	0.00079 $\pm$ 0.00004
Центральная Сибирь	95	2	8	0.456 $\pm$ 0.031	0.00194 $\pm$ 0.00011
Дальний Восток	56	11	45	0.859 $\pm$ 0.021	0.00440 $\pm$ 0.00031
Япония	26	4	7	0.754 $\pm$ 0.038	0.00171 $\pm$ 0.00020

\*N – количество анализируемых индивидуумов; K – количество гаплотипов; k – количество обнаруженных ДНК полиморфизмов; h – разнообразие гаплотипов;  $\pi$  – среднее количество нуклеотидных замен на сайт; SE – стандартная ошибка.

Группа I, состоящая из трёх гаплотипов, была обнаружена в Московской области, Западной Сибири и на Дальнем Востоке (Рисунок 9-10). Группа II оказалась более разнообразной и включила в себя пять гаплотипов с Дальнего Востока и только один из Московской области (ШЕ). Группа III содержит три гаплотипа с территории Дальнего Востока. Группа IV, включающая два гаплотипа, была обнаружена в Центральной Сибири, на Дальнем Востоке и в Московской области. Наиболее генетически удалённая группа V содержит два гаплотипа, уникальных для японских популяций жука. Таким образом, четыре из пяти выделенных групп представлены в исходных популяциях *P. proximus* на Дальнем Востоке; три из пяти обнаружены в молодых инвазивных европейских популяциях; одна группа, генетически отдалённая от материковых, отмечена среди аборигенных популяций жука в Японии (Рисунок 9-10).



**Рисунок 10.** Распространение и популяционное разнообразие изучаемых гаплотипов *P. proximus* на территории России и Японии. Границы России показаны толстыми серыми линиями. Пунктирными линиями условно обозначены границы регионов, выделяемые в данном исследовании. Чёрными линиями обозначены основные участки российской железной дороги. Серыми кругами с чёрными пунктирными границами обозначены примерные места сбора образцов для каждого выделяемого региона. На гистограммах внизу отражена относительная доля гаплотипов в каждом из регионов.

Наибольшее разнообразие гаплотипов наблюдается на территории Дальнего Востока (0,859), а наименьшее в Центральной Сибири (0,214). Разнообразие гаплотипов в Западной Сибири (0,456), Московской области (0,742) и Японии (0,754) имеет промежуточные значения (Табл. 3).

Для того чтобы установить, подтверждается ли на генетическом уровне деление всех популяций жука на вышеуказанные пять групп, среди изученных гаплотипов, был проведён анализ молекулярной вариации (AMOVA) (Таблица 5). В данном анализе показано, что 65,6% всей генетической дисперсии объясняется различием между группами ( $\Phi_{ST} = 0.73$ ,  $p\text{-value} < 10^{-7}$ ), и 26,8% дисперсии объясняется различиями внутри популяций ( $\Phi_{ST} = 0.66$ ,  $p\text{-value} < 10^{-7}$ ), что подтверждает разделение гаплотипов на выбранные группы.

**Таблица 5.** Анализ молекулярной вариации на основе COI и COII маркёров для одной европейской, четырёх западносибирских, двух центральносибирских, четырёх дальневосточных и одной японской популяции.

<b>Источник дисперсии</b>	<b>df</b>	<b>Сумма квадратов</b>	<b>Компоненты дисперсии</b>	<b>Процент дисперсии</b>
Между групп	4	998.663	4.18953 Va	65.59
Между популяциями внутри группы	7	89.830	0.48394 Vb	7.58
Внутри популяций	298	510.781	1.71403 Vc	26.83

### ***3.1.2 Генетическая структура популяций *P. proximus****

С помощью молекулярного анализ ДНК-маркёров мы можем сравнить популяции исследуемого ксилофага из исходного и инвазивного ареалов. Это делает возможным установление источника инвазии для каждой конкретной инвазивной популяции вредителя. Природные популяции *P. proximus* на Дальнем Востоке имеют наибольший уровень генетического разнообразия, что подтверждает статус региона, как исходного для *P. proximus* (Рисунок 10).

Хотя японские популяции жука имеют значительные генетические отличия от материковых, они также отличаются высоким уровнем генетической вариабельности. Это говорит о них как об аутентичных природных популяциях, развивавшихся независимо от материковых. Противоположную картину можно наблюдать в популяциях Западной и Центральной Сибири. Они имеют низкий уровень генетического разнообразия и включают в себя только по два гаплотипа: IA и IC в Западной и IVA и IVB в Центральной Сибири. При этом гаплотипы IA, IC и IVB также присутствуют

в исходном ареале на Дальнем Востоке. Это говорит об инвазивном происхождении сибирских популяций. Отсутствие общих гаплотипов указывает на независимую интродукцию вредителей в Западную и Центральную Сибирь с территории Дальнего Востока. Примечательно, что, несмотря на инвазивное происхождение и сравнительно маленькую выборку (16 образцов), популяции из европейской части России (Московская область) имеют генетическую вариабельность на уровне популяций из Японии (Табл. 3). Присутствие в европейских популяциях гаплотипов IC и IVA, уникальных для Западной и Центральной Сибири, соответственно, может говорить о факте независимых вторичных инвазий из данных регионов. Присутствие в европейских популяциях гаплотипа IIЕ и отсутствие гаплотипов второй группы в популяциях Сибири говорит об инвазии с территории исходного ареала. Таким образом, множественная инвазия из разных источников, в данном случае с Дальнего Востока и из Сибири, сформировала необычно высокий для инвазивной популяции уровень генетического разнообразия в европейских популяциях *P. proximus*.

В ходе исследования насекомого-вредителя *P. proximus* на основе митохондриальных ДНК-маркёров проведён молекулярный анализ генетического разнообразия популяций данного короеда. Также был проведён филогенетический анализ полученных последовательностей. Была изучена генетическая структура популяций данного вредителя, и реконструированы основные популяционные события, происходившие с ним в ходе его инвазии на исследуемых территориях.

Согласно результатам, полученным в настоящей главе, в популяциях жука идентифицировано 18 гаплотипов, объединенных в 5 групп. Было отмечено независимое развитие островных японских популяций *P. proximus* от материковых.

Также, в качестве выводов из представленных результатов можно указать следующие положения.

Установлено, что популяции *P. proximus* на территории Западной и Восточной Сибири сформировались независимо в результате двух инвазивных процессов, источник которых находился в исходном ареале на Дальнем Востоке.

Установлено, что генетическое разнообразие популяций короеда на территории европейской части страны (Московская область) сформировано под действием множественной инвазии из исходных популяций Дальнего Востока и из инвазивных популяций Сибири.



## **3.2 Анализ видового состава сообщества симбионтов *P. Proximus***

В настоящей главе будут представлены результаты морфологического и молекулярно-генетического анализа грибковых культур, выделенных из ходов уссурийского полиграфа на территориях исходной и инвазивной части ареала. Будут рассмотрены результаты филогенетического анализа последовательностей изучаемых грибковых культур для их таксономического определения. Будет рассмотрены результаты анализа видового разнообразия симбиоты жука в разных регионах инвазии и исходных популяциях. Результаты, полученные в данной главе, будут сопоставлены с генетическим разнообразием популяций вредителя, рассмотренным в предыдущей главе. Каждый детектируемый вид фитопатогенных грибов будет обсуждаться как отдельно, так и в контексте всего симбиотического сообщества короеда.

### **3.2.1 Генетический анализ грибковых культур**

Вторая часть настоящего исследования посвящена изучению сообществ симбионтов жука. В ходе микологического анализа было изучено 303 образца растительных тканей, содержащих ходы уссурийского полиграфа (Таблица 3). Из образцов были выделены 584 грибковых культуры, относящиеся к 10 морфологическим группам, среди которых 9 имели признаки грибов *Ophiostoma*. Ряд культур от каждой морфологической группы участвовал в дальнейшем молекулярно-генетическом анализе для подтверждения видовой принадлежности культуры и для прояснения таксономического положения грибов, ранее генетически не исследованных (Таблица 6). Следует особо отметить, что филогенетический анализ последовательностей в применении к полифелитичной группе фитопатогенов не служит цели отразить эволюционные связи между анализируемыми культурами, а используется для

характеризации каждого морфотипа и его таксономического определения. Конкатенированные ДНК-последовательности маркёров ITS2 и LSU для каждой культуры, исследуемой в молекулярном анализе, были использованы для построения филогенетического дерева. Секвенированные нуклеотидные последовательности из выделенных культур фитопатогенных грибов опубликованы в международной базе данных GenBank. Нуклеотидные последовательности и их подробную аннотацию можно найти в указанной базе данных под номерами: MF067010– MF067042 (Приложение 1)

**Таблица 6.** Культуры грибов, связанных с уссурийским полиграфом на территории России, использованные в молекулярно-генетическом анализе.

Морфологическая группа	Номер культуры	Регионы происхождения культур*	Вид	Номер в базе данных GenBank
I	1411	Приморский край	<i>Ophiostoma nikkoense</i>	MF067010
	1412	Хабаровский край	<i>O. nikkoense</i>	MF067011
	1413-1	о. Сахалин	<i>O. nikkoense</i>	MF067012
	1414	Хабаровский край	<i>O. nikkoense</i>	MF067013
	1115	Хабаровский край	<i>O. nikkoense</i>	MF067014
	1476	о. Сахалин	<i>O. nikkoense</i>	MF067015
II	1421	о. Сахалин	<i>Grosmannia europioides</i>	MF067016
	1422	о. Сахалин	<i>G. europioides</i>	MF067017
	1423	Хабаровский край	<i>G. aenigmatica</i>	MF067018
III	1451	Приморский край	<i>Graphilbum microcarpum</i>	MF067019
	1452	Приморский край	<i>Gra. microcarpum</i>	MF067020
	1454	о. Сахалин	<i>Gra. microcarpum</i>	MF067021
IV	1453	Приморский край	<i>Gra. rectangulosporium</i>	MF067022
V	1461	Томская область	<i>Ophiostoma subalpinum</i>	MF067023
	1462	Томская область	<i>O. subalpinum</i>	MF067024

**Таблица 6 - продолжение.** Культуры грибов, связанных с уссурийским полиграфом на территории России, использованные в молекулярно-генетическом анализе.

Морфологическая группа	Номер культуры	Регионы происхождения культур*	Вид	Номер в базе данных GenBank
VI	1203	Хабаровский край	<i>Grosmannia aoshimae</i>	MF067025
	1206	Красноярский край (1)	<i>G. aoshimae</i>	MF067026
	1207	Новосибирская обл.	<i>G. aoshimae</i>	MF067027
	1402	г. Москва	<i>G. aoshimae</i>	MF067028
	1405	Хабаровский край	<i>G. aoshimae</i>	MF067029
	1407	Красноярский край (1)	<i>G. aoshimae</i>	MF067030
	1413-2	Приморский край	<i>G. aoshimae</i>	MF067031
	1502	г. Москва	<i>G. aoshimae</i>	MF067032
	1507	Красноярский край (3)	<i>G. aoshimae</i>	MF067033
	1515	о. Сахалин,	<i>G. aoshimae</i>	MF067034
	1520	Красноярский край (2)	<i>G. aoshimae</i>	MF067035
VII	1416	Хабаровский край	<i>Ophiostoma piceae</i>	MF067036
VIII	1031	Красноярский край (4)	<i>Leptographium sibiricum</i>	MF067037
	1032	Красноярский край (4)	<i>L. sibirica</i>	MF067038
IX	1473	о. Сахалин	<i>L. taigense</i>	MF067039
	1474	о. Сахалин	<i>L. taigense</i>	MF067040
X	1242	Новосибирская обл.	<i>Geosmithia</i> sp.	MF067041
	1441	Томская область	<i>Geosmithia</i> sp.	MF067042

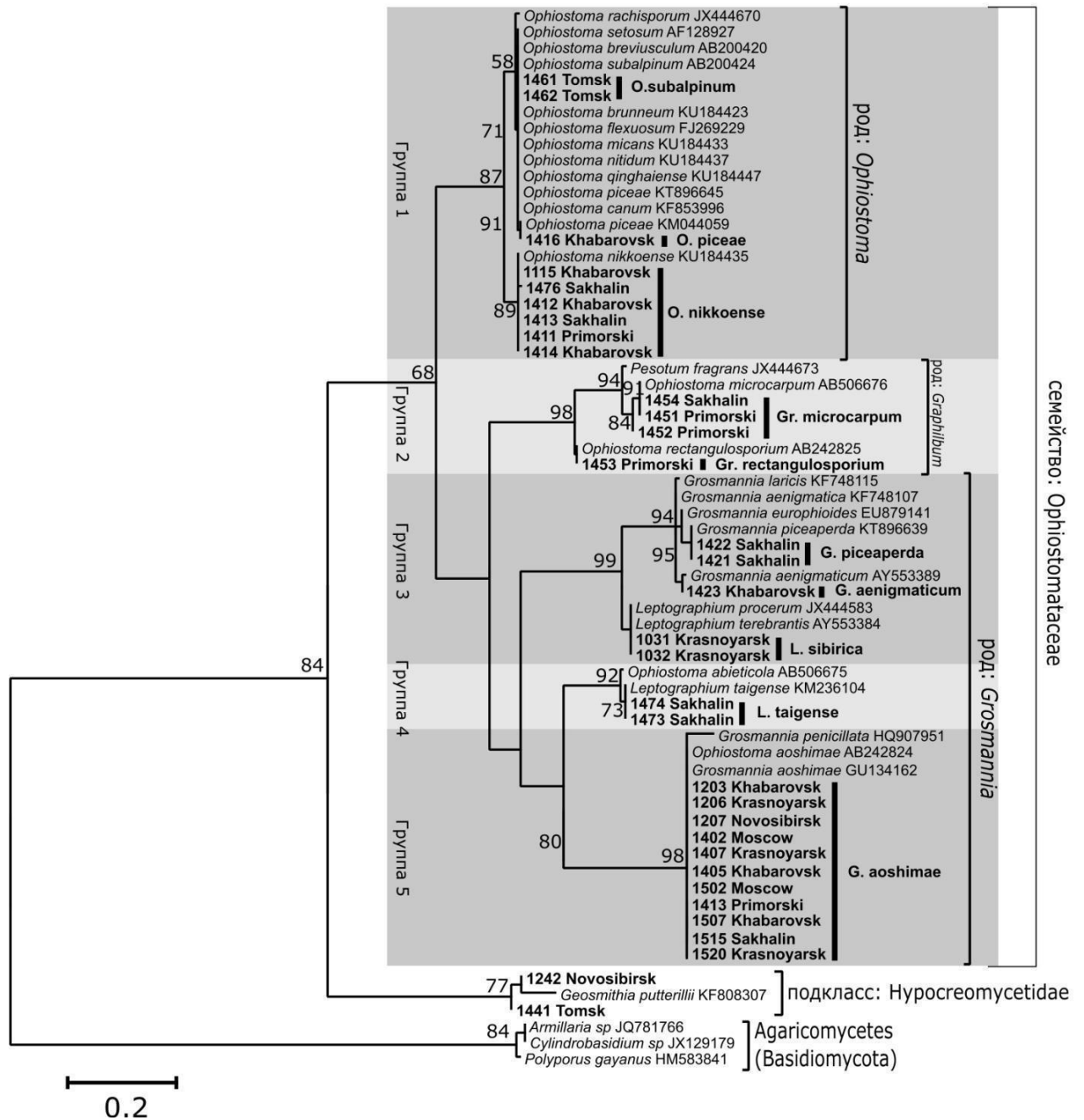
\*Для культур из Красноярского края в скобках приведены районы сбора образцов: 1 – Емельяновский, 2 – Енисейский, 3 – Ермаковский, 4 – Козульский.

В качестве внешней группы для укоренения дендрограммы взяты последовательности из базы данных GenBank, родов *Cylindrobasidium*, *Polyporus* и *Armillaria* (Agaricomycetes: Basidiomycota).

Все остальные представители, отраженные на филогенетических деревьях, относятся к отделу сумчатых грибов Ascomycota.

Два образца, 1441 и 1242, из г. Томска и г. Новосибирска вошли в базально расположенную ветвь, объединяющую в себе представителей подкласса Нуроскреомycetidae. Обе последовательности очень близки, но не идентичны последовательностям вида *Geosmithia putterillii*. Необходимо особо отметить, что эти грибы, объединенные в морфотип X (Таблица 6), не относятся к грибам *Ophiostoma*. Они обратили на себя внимание частым и, как правило, обильным присутствием в изучаемых образцах. Это поднимало их статус до уровня постоянного компонента микобиоты уссурийского полиграфа подобного грибам *Ophiostoma*.

Остальные ветви на филогенетических деревьях относятся к семейству Ophiostomataceae (подкласс Sordariomycetidae, класс Sordariomycetes). Внутри этого семейства все исследованные виды можно разделить на пять групп согласно филогенетической близости (Рисунок 11). Эти группы не имеют прямых соответствий с какими-либо таксономическими категориями, однако хорошо отражают особенности филогенетической структуры данного семейства. Представителей первой групп относят к роду *Ophiostoma*, второй к роду *Graphilbum*, а представителей третьей, четвертой и пятой групп к роду *Grosmannia*.



**Рисунок 11.** Филогенетическое древо фитопатогенных грибов, построенное на основе конкатенированных последовательностей маркеров ITS2 и LSU методом максимального правдоподобия. Значимость дивергенции каждой отдельной группы отражена коэффициентами aLRT-поддержки [Anisimova, Gascuel, 2006], расположенными рядом с соответствующими узлами древа. Отображены коэффициенты статистической поддержки со значением выше 70%. Справа от древа обозначена таксономическая принадлежность соответствующих кластеров. Последовательности, полученные в данной работе, обозначены жирным шрифтом с указанием места сбора. Для упрощения рисунка на филогенетическом древе указана только часть культур *G. aoshimae*, поскольку они все генетически идентичны и располагаются на одной ветке.

Группа 1 представлена двумя ветвями. В 1 ветви присутствуют 6 образцов (1115, 1411-1414, 1476) из Приморского, Хабаровского края и о. Сахалина, последовательности которых полностью идентичны виду *O. nikkoense*. Все они отнесены к мофотипу I. 2 ветвь представлена несколькими видами рода *Ophiostoma*, относящимся к видам *riceae*-комплекса. В данной ветви расположены три образца: один из Хабаровска (1416), представляющий морфотип VII, и два из г. Томска (1461, 1462), представляющие морфотип V. Образец из Хабаровска полностью идентичен *O. riceae*, а образцы из г. Томска отличаются между собой и от других видов *riceae*-комплекса единичными заменами в обеих последовательностях. Однако ближе всего они к виду *O. subalpinum*. Более того, морфологически они были определены как *O. subalpinum*.

Во второй группе располагаются виды *Gr. microcarpum* и *Gr. rectangulosporium*. Эта группа представляет собой отдельную хорошо дифференцирующуюся ветвь на обоих филогенетических деревьях. Два образца из Приморского края (1451 и 1452) и один с о. Сахалина (1454) по обеим последовательностям идентичны *Gr. microcarpum* и представляют морфотип III. Образец из Приморского края (1453) идентичен *Gr. rectangulosporium* и представляют морфотип IV. Первоначально эти два вида грибов были описаны как представители рода *Ophiostoma* [Ohtaka и др., 2006; Yamaoka и др., 2004], позднее по данным генетического анализа отнесены к роду *Graphilbum* [Beer, Seifert, Wingfield, 2013].

Третья группа объединяет в своем составе разнообразные виды патогенов, такие как *Grosmannia piceaperda*, *G. europioides* и *L. procerum*. Все они входят в состав рода *Grosmannia*. На ITS2 и LSU деревьях эта группа представлена двумя ветвями.

1 ветвь третьей группы содержит два образца с о. Сахалина (1421, 1422), полностью идентичные *G. piceaperda* по последовательностям, и один образец (1423) из г. Хабаровска, который отличается несколькими нуклеотидными

заменами и близок к виду *G. aenigmaticum*. Данные культуры представлены морфотипом II. Эти виды относятся к *G. piceiperda* – комплексу, и делинеация видов в пределах этого комплекса еще не завершена [Beer, Seifert, Wingfield, 2013].

2 ветвь третьей группы представлена видами *L. procerum*-комплекса. Два образца из Красноярского края (1031, 1032) имеют ДНК-последовательности идентичные *L. procerum* и представляют морфотип VIII. Данные образцы по морфологическим характеристикам соответствовали грибу *L. sibirica* K.Jacobs & M.J. Wingfield, который входит в *L. procerum* – комплекс [Beer, Seifert, Wingfield, 2013]. Поскольку внутри комплекса сложно разделить близкие виды на основании ДНК-маркёров, для морфотипа VIII в статье принято обозначение *L. sibirica*.

Четвертая группа видов на филогенетических деревьях представлена видом *L. taigense*. В эту группу вошли образцы 1473 и 1474 с о. Сахалина. Эти образцы идентичны друг другу и последовательностям *L. taigense*. В литературе вид *L. taigense* не включают ни в какой комплекс. На дендрограмме он совместно с видом *O. abieticola* формирует обособленную ветку в роду *Grosmania*. Представляет собой морфотип IX.

Пятая группа включает в свой состав виды *G. penicillata* и *G. aoshimae*. В настоящей работе особое внимание уделено виду *G. aoshimae* в связи с его высокой агрессивностью и высокой частотой встречаемости по всему ареалу *P. proximus* [Pashenova, Petko, Varanchikov, 2013; Yamaoka и др., 2009]. На филогенетических деревьях представлено 26 образцов *G. aoshimae* (на Рисунок 6 показано 11 из них) из различных регионов России, включая о. Сахалин, Приморье, Западную и Центральную Сибирь, а также Московскую область. Все последовательности идентичны друг другу по обоим маркерам, за исключением нескольких образцов (1503, 1505, 1506, 1507, 1515, 1517, 1519, 1520), которые отличались единичными нуклеотидными заменами. Данный вид представляет морфотип VI. Изначально при описании вида гриб

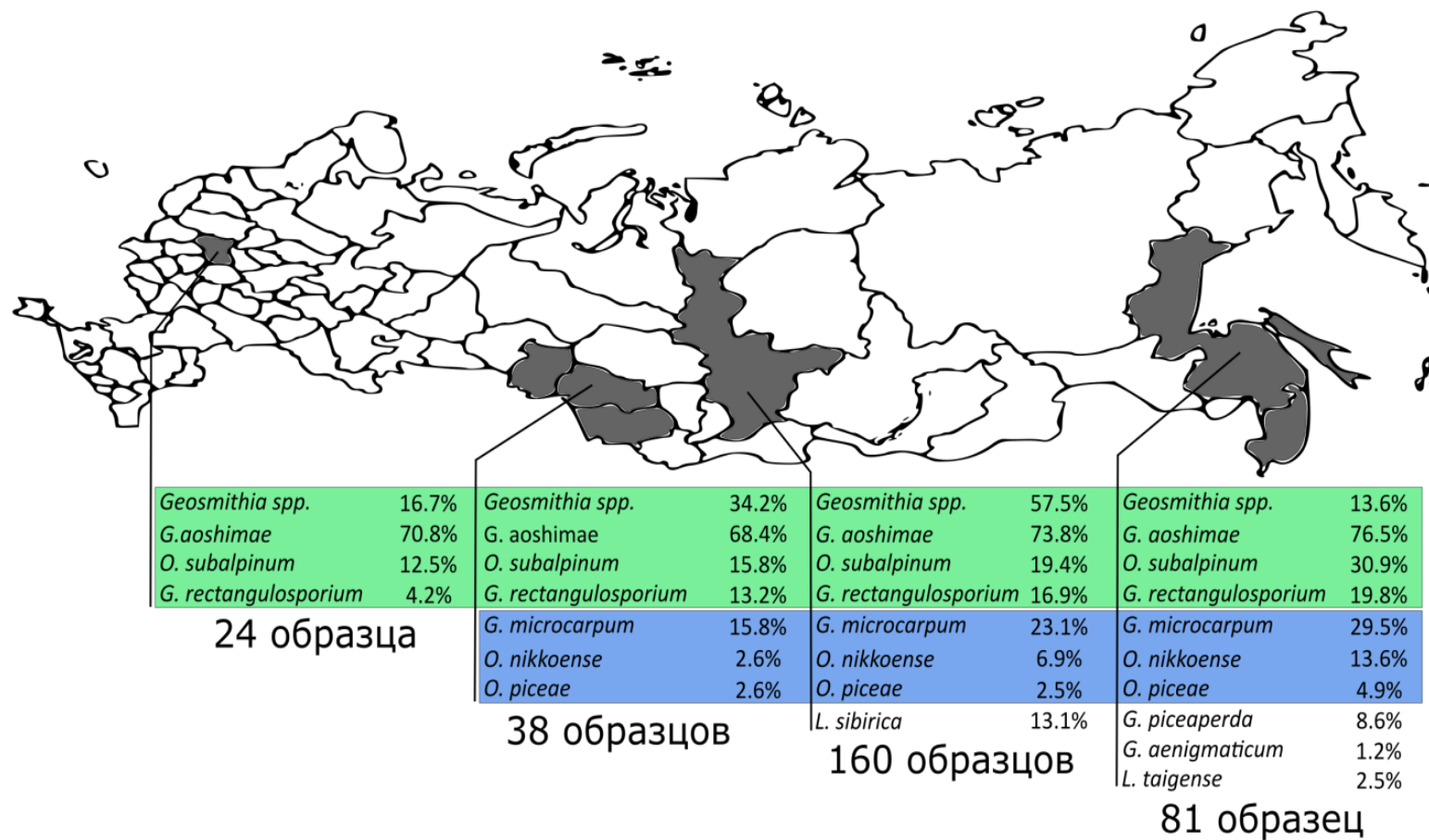


*G. aoshimae* был помещен в род *Ophiostoma* [Ohtaka и др., 2006], но позднее на основании генетического анализа переведен в группу родов *Ophiostoma sensu lato* (включающий род *Grosmannia*).

### 3.2.2 Анализ видового разнообразия симбиоты *P. proximus*

В проведенном исследовании отмечена симбиотическая связь с *P. proximus* с 9 видами грибов семейства Ophiostomataceae и с грибами рода *Geosmithia* (Рисунок 12). Данный вид жуков на территории исходного ареала (район Дальнего Востока) обнаруживает симбиотические отношения как минимум с 10 видами грибов. На территории Центральной Сибири зафиксирована ассоциация *P. proximus* с 8 видами фитопатогенов. На территории Западной Сибири детектирована ассоциация с 7 видами грибов, а в европейских популяциях только с 4 видами.

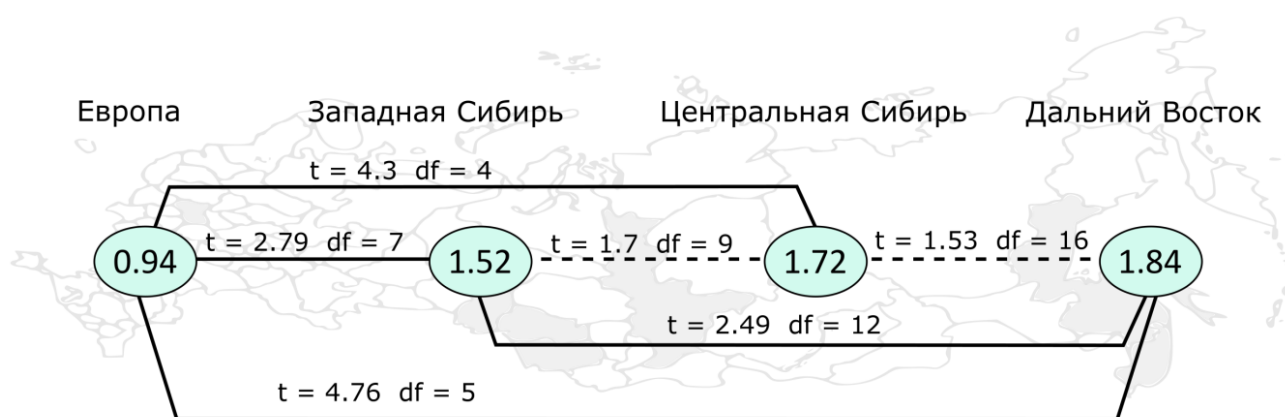
Основываясь на географическом распространении, можно выделить группы видов, которые входят в симбиоту жука. Первая группа включает *G. aoshima*, *O. subalpinum*, *Gr. rectangulosporium* и *Geosmithia spp.* Они входят в состав симбиоты во всех исследованных регионах. Вторая группа включает *G. microsporum*, *O. nikkoense* и *O. picea*. Они обнаружены в симбиотическом ансамбле жуков в регионах Сибири и Дальнего Востока. Третья группа видов включает *G. piceaperda*, *L. taigense* и *L. aenigmaticum*. Эти виды обнаружены только на территории Дальнего Востока. Также можно отметить вид *L. sibirica*, представители которого детектированы в популяциях Центральной Сибири.



**Рисунок 12.** Видовое разнообразие офистомовых грибов ассоциированных с *P. proximus* в различных частях его ареала на территории РФ. Виды, обнаруженные более чем в одном регионе, обозначены в цветных блоках. Для каждого региона указано количество образцов растительной ткани. Справа от культур указан процент образцов, из которых была выделена данная культура в указанном регионе.

Согласно проведённому мониторингу симбиотического сообщества видовое разнообразие симбиоты *P. proximus* в инвазивных популяциях при движении с востока на запад снижается (Рисунок 13). Это направление совпадает с направлением расселения данного вредителя.

Для оценки видового разнообразия использовался индекс Шеннона. Данный индекс позволяет произвести статистическую оценку изучаемых выборок и оценить значимость различий между уровнями видового разнообразия разных регионов. Для подтверждения значимости различий в значениях индекса Шеннона использовался параметрический критерий Стьюдента.



**Рисунок 13.** Оценка видового разнообразия с использованием индекса Шеннона. В схеме индекс видового разнообразия для каждого региона указан в овалах. Достоверность различий между значениями индекса оценивалась согласно критерию Стьюдента. Регионы, различие в уровне разнообразия которых статистически подтверждено, соединены сплошными линиями ( $p=0.05$ ). Регионы, различие в уровне разнообразия которых отмечено на уровне тенденции, соединены пунктирными линиями.

Симбиотическое сообщество *P. proximus* может быть описана в терминах  $\alpha$ -разнообразия. Видовое богатство симбиоты было отражено с помощью индекса Маргелефа (Таблица 7). Он демонстрирует снижение видового богатства при движении в сторону инвазии. Аналогичную тенденцию показывает индекс полидоминантности, отражающий доминирование отдельных видов в симбиотическом сообществе. Снижение

полидоминантности в инвазивных популяциях свидетельствует об уменьшении равнопредставленности видов в симбиотическом сообществе *P. proximus*. Однако выравненность разнообразия, рассчитанная на основе индекса Симпсона, не показывает заметных изменений значений среди исследуемых регионов по сравнению с предыдущими индексами.

Сохранение уровня выравненности симбиоты в инвазивных популяциях говорит о том, что изменения в симбиоте жука в процессе инвазии связаны в большей степени с видовым богатством симбиотического сообщества. При этом относительная представленность видов, входящих в ядро симбиотического сообщества, сохраняется в процессе инвазии. Полученные результаты соответствуют принципу сосуществования П. Де Бура и концепции нейтральности сообществ С. Хаббела, который предполагает уменьшение видового разнообразия не под действием конкурентного исключения, а за счёт стохастических изменений в процессе развития сообществ [Шварц, 2004]. В данном случае таким стохастическим изменением является проявление эффекта основателя в инвазивных популяциях.

Эти данные показывают симбиоту жука не как конкурентно-равновесное сообщество, а как сообщество, соответствующее принципу нейтральности. В разрезе настоящего исследования это означает, что изменения в симбиоте *P. proximus* в инвазивных популяциях обусловлены эффектом основателя, а не конкуренцией.

Однако если мы примем во внимание популяционную историю инвазии *P. proximus*, то вынуждены будем изменить такую интерпретацию видового разнообразия симбиоты. Европейские популяции *P. proximus*, сформированные множественной инвазией из разных регионов, имеют высокий уровень генетического разнообразия по сравнению с инвазивными популяциями Сибири. Учитывая это, случайные стохастические изменения видового состава симбиоты должны были также сформировать высокий

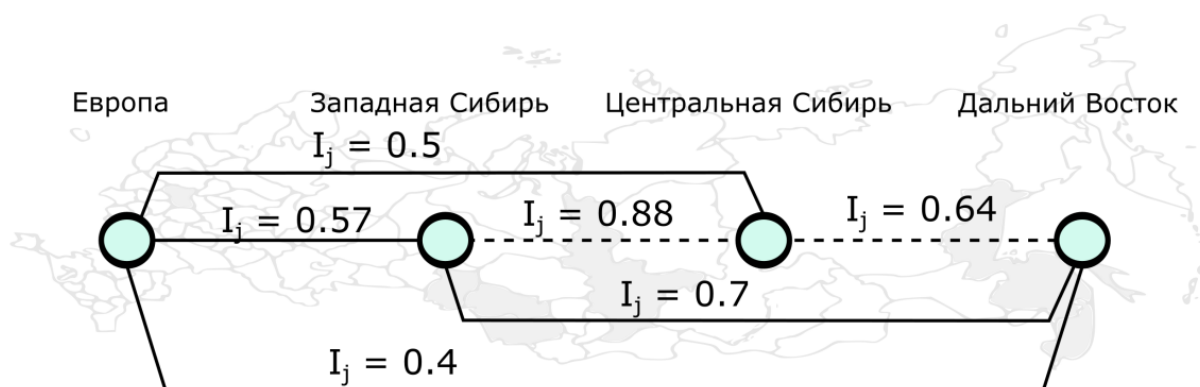
уровень разнообразия в этом регионе согласно концепции нейтральности сообществ. Результаты демонстрируют противоположное.

При сопоставлении результатов филогенетического анализа и анализа видового разнообразия примечательным является то, что в ядро симбиотического сообщества вошли по одному виду из каждого анализируемого рода: *G. aoshima*, из рода *Grosmannia*, *O. subalpinum* из рода *Ophiostoma*, *Gr. rectangulosporium* из рода *Graphilbum* и фитопатогены рода *Geosmithia spp.* Такая выборочная элиминация близких видов полностью соответствует концепции конкурентного исключения Г. Ф. Гаузе.

**Таблица 7.** Индексы видового разнообразия симбиоты *P. proximus*.

<b>Регионы</b>	<b>Индекс Маргелефа</b>	<b>Индекс полидоминантности</b>	<b>Выровненность (по индексу Симпсона)</b>
Европа	2.69	2.07	0.52
Западная Сибирь	6.73	3.73	0.53
Восточная Сибирь	7.80	4.51	0.56
Дальний Восток	9.77	4.78	0.48

Индексы общности, используемые в оценке  $\beta$ -разнообразия, являются малоинформативными для анализа четырёх регионов, обозначенных в настоящей работе. Тем не менее они подтверждают предыдущие утверждения об изменении симбиоты жука в ходе инвазивного процесса и выражают в числовой форме закономерности, наблюдаемые на рисунке 12 (Рисунок 14).



**Рисунок 14.** Индексы общности Жаккара, рассчитанные между каждой парой регионов исследованных в работе. Регионы обозначены голубыми кругами. Индексы написаны над линиями, соединяющими два региона, между которыми данный индекс был рассчитан. Пунктирной линией соединены регионы, различие в индексе  $\alpha$ -разнообразия между которыми не было статистически подтверждено в предыдущем анализе на рисунке 13.

Симбиотическое сообщество *P. proximus* из Центральной Сибири имеют меньшую общность с симбиотой исходного ареала ( $I_j = 0.64$ ), чем более удалённые популяции Западной Сибири ( $I_j = 0.7$ ) из-за появления в них аборигенного вида *L. sibirica*. Несмотря на независимый процесс инвазии на территорию Западной и Центральной Сибири фитопатогенные ассоциации короедов с этих двух территорий имеют значительную общность ( $I_j = 0.88$ ), о чём говорит почти одинаковый ряд детектируемых грибов из этих регионов. Симбиота *P. proximus* из европейского региона имеет низкую общность с симбиотой остальных регионов ( $I_j = 0.4; 0.5; 0.57$ ) из-за малого видового состава симбиотического сообщества данного региона.

### 3.2.3 Постоянные и случайные симбионты

Как мы обнаружили ранее, история вида *P. proximus* на исследованных территориях насыщена популяционными событиями. Когда мы обращаемся к

грибным симбионтам данного вредителя, в фокус попадают популяции не одного, а целого набора видов, напрямую генетически не связанные, но объединенные общей экологией. В данном случае невозможно напрямую использовать филогенетический анализ для реконструкции популяционных изменений, случившихся в истории симбиоты. Однако, при рассмотрении результатов молекулярного анализа совместно с информацией о видовом разнообразии симбиотического ансамбля и распространённости каждого вида грибов можно установить основные эволюционные события и обозначить закономерности, согласно которым они происходят.

Фитопатогены, исследуемые в работе, являются факультативными симбионтами *P. proximus*, и могут существовать как сапротрофные грибы, исполняя роль редуцентов в лесных экосистемах. Поэтому разные виды грибов могут иметь разную степень ассоциации с ксилофагом. Судя по уровню встречаемости и обязательному присутствию во всех исследуемых популяциях уссурийского полиграфа *G. aoshimae*, он действительно является главным и специфическим ассоциантом этого короеда. Вид *G. aoshimae* совместно с *Gr. rectangulosporium* были выделены и описаны на территории Японии в 2006 на основе молекулярных данных [Ohtaka и др., 2006]. Этот вид малоизучен, в предыдущих исследованиях так же отмечалась его сильная ассоциация с *P. proximus*. Виды *Graphilbum rectangulosporium* и *O. subalpinum* также представляются постоянными компонентами комплекса грибов *Ophiostoma*, распространяемых совместно с *P. proximus* (Рисунок 12).

### **3.2.4 Инвазивное происхождение *G. aoshimae***

Грибы вида *G. aoshimae* были обнаружены по всей территории обитания *P. proximus* как в исходных, так и в инвазивных популяциях. На этих территориях изучен ряд ксилофагов, а также некоторые из их грибных

симбионтов, однако рассматриваемый вид ранее не детектировался на территории Сибири и Московской области [Linnakoski и др., 2010]. Согласно молекулярно-генетическому анализу все популяции *G. aoshimae* однородны во всем ареале, как в исходных, так и на новоосвоенных территориях. Поскольку представители вида с Дальнего Востока и Европы безусловно изолированы друг от друга, генетические потоки между ними должны отсутствовать или быть незначительными. Учитывая отсутствие ранних сведений о существовании *G. aoshimae* в Сибири, генетическую однородность популяций из разных мест обитания и географическую изоляцию популяций этого гриба, можно сделать вывод о распространении *G. aoshimae* по Евразийскому материку совместно с *P. proximus* в процессе недавней инвазии.

В исходном ареале *P. proximus* обладает значительным генетическим разнообразием и содержит целый ряд гаплотипов, в инвазивных популяциях наблюдается малое генетическое разнообразие и был отмечен эффект основателя. Популяции *G. aoshimae*, распространяющиеся совместно с *P. proximus*, демонстрирует генетическую однородность как исходных, так и инвазивных популяций. Отсутствие генетической структуры внутри вида характерно для большинства грибов изучаемого семейства, а в тех видах, где существует внутривидовое генетическое разнообразие, оно, как правило, вызвано различиями между американскими и евро-азиатскими популяциями [Linnakoski и др., 2010; Webber, Breuil, 2004]. Также следует заметить, что используемые в данной работе маркёры (ITS2 и LSU) хоть и являются наиболее универсальными последовательностями для баркодирования и генетического анализа грибов, в ряде случаев их разрешение может быть недостаточным для установления внутривидового разнообразия [Harrington и др., 2001; Schoch и др., 2012].



### 3.2.5 Изменение симбиоты в процессе инвазии

Анализ литературы и полученные результаты показывают, что комплекс грибов, связанный с уссурийским полиграфом на Дальнем Востоке, претерпевает изменения видового состава. Успешная адаптация насекомого-переносчика к новым условиям не означает, что все привнесенные им организмы также закрепятся на новых территориях. Можно предположить, что вероятность этого существует, учитывая эволюционно закрепленную экологическую общность насекомого-хозяина и его симбионтов.

Как следует из результатов, связь «*P. proximus* – *G. aoshimae*» является сильной, и этот микоассоциант продолжает занимать доминирующее положение в грибном сообществе гнезд полиграфа на пихте сибирской (Таблица 3). Успешно адаптировались к новым условиям виды *Graphilbum rectangulosporium* и *O. subalpinum*. В Японии данные виды являются общими для нескольких видов короедов, селящихся на деревьях рода *Abies* [Beer, Seifert, Wingfield, 2013]. Кроме того, в работах по искусственному инфицированию деревьев грибковыми культурами отмечено, что виды *G. aoshimae* и *O. subalpinum*, а также вид *G. piceaperda (europioides)* являются наиболее вирулентными фитопатогенами среди анализируемых [Yamaoka и др., 2004]. В ходе совместной колонизации происходит постоянный обмен видами грибов между вредителями. В новом ареале микобиота, связанная с *P. proximus*, лишилась такой подпитки со стороны сопутствующих короедов. Этим можно объяснить снижение видового разнообразия симбиоты на новых территориях. Что касается встречаемости упомянутых видов в инвазийных популяциях *P. proximus*, она продолжает оставаться на высоком уровне. Это предполагает, что *Gr. rectangulosporium*, *O. subalpinum*, а также грибы из рода *Geosmithia* не только хорошо адаптировались в новых условиях, но и перешли в категорию постоянных компонентов микобиоты *P. proximus*, к которой относится *G. aoshimae*.

Изначально считалось, что *O. nikkoense* и *O. (Graphilbum) microcarpum* являются эндемическими видами пихт в Японии [Yamaoka и др., 2004]. Представленные результаты свидетельствуют, что эти грибы обитают также и на Дальнем Востоке России в поврежденных жуком тканях белокорой и сахалинской пихт. Инвазия уссурийского полиграфа дала возможность его грибным ассоциантам продвинуться в западном направлении и освоить еще один вид растения-хозяина – пихту сибирскую (*A. sibirica*).

Остановимся на грибах, неизвестных ранее в микокомплексе уссурийского полиграфа: представителей рода *Geosmithia* и вида *Leptographium taigense*.

*L. taigense* относится к роду *Grosmannia*. Поскольку представители данного вида еще не упоминались в связи с *P. proximus*, довольно неожиданно обнаружение их в образцах с о. Сахалин. Этот малоизученный вид обнаружен в Фенноскандии, в гнездах короеда-типографа (*Ips typographus*) и вредителей сосны на *Picea abies* и *Pi. sylvestris* [Linnakoski, Beer, Wingfield, 2012]. Находка этого вида в тканях пихты сахалинской, поврежденной *P. proximus*, свидетельствует о необходимости более глубокого изучения связей этого вида с короедами на хвойных.

Нахождение грибов *L. procerum*-комплекса в некоторых популяциях *P. proximus* в Красноярском крае объясняется тем, что автохтонным вредителем пихты сибирской на этой территории является черный пихтовый усач (*Monochamus urusovi*), в состав микобиоты которого входит специфические фитопатогенные ассоцианты вида *L. sibirica* [Jacobs и др., 2000] и неидентифицированный гриб, по данным генетических исследований близкий к комплексу *Ophiostoma minus*. Перекрывание ареалов этих видов позволяет предположить, что автохтонный и инвазийный вредители пихты обмениваются своими микоассоциантами.

Грибы рода *Geosmithia* не так давно привлекли к себе внимание исследователей. Представители этого рода грибов хорошо изучены на

территории Северной Америки [Kolařík, Kostovčík, Pažoutová, 2007]. Исследования грибов этого рода, связанных с короедами, повреждающими лиственные породы, были недавно предприняты в Европе [Peroni и др., 2015]. Известно, что эти грибы могут быть обнаружены в почве, древесине и пищевых продуктах, однако многие из данных видов преимущественно встречаются в ходах короедов. В роде *Geosmithia* на сегодняшний день выделяют 46 видов. Около половины из них детектированы на основе молекулярно-генетического анализа и не описаны [Kolařík и др., 2017]. Среди представителей данного рода мало видов, ассоциированных с насекомыми-вредителями хвойных деревьев. Данные фитопатогены отмечены в ассоциации с вредителями хвойных родов *Pinus* и *Picea*. Предыдущие случаи обнаружения особей рода *Geosmithia* на пихте были единичными и отмечались как случайные [Wbight, 1938]. До настоящего момента вопрос о подверженности пихты грибковым инфекциям *Geosmithia* оставался открытым. Присутствие представителей рассматриваемого рода среди основных видов симбиоты *P. proximus* показывает подверженность пихты данным инфекционным агентам.

Имеется мало сведений о представителях рода *Geosmithia* на хвойных породах, но имеющиеся данные подтверждают, что комплексы *Geosmithia spp.*, связанные с короедами на хвойных и лиственных видах, различаются [Kolařík и др., 2017].

Можно предположить, что эти грибы, если и присутствовали на данных территориях до инвазии *P. proximus*, то, в отличие от микобиоты уссурийского полиграфа, были представлены скудно и нерегулярно, и ускользнули от внимания исследователей. Так или иначе, полученные нами результаты – это первое свидетельство обнаружения *Geosmithia spp.* в составе микобиоты короедов на хвойных деревьях в России.

В ходе исследования был проведён морфологический и молекулярно-генетический анализы грибковых культур, выделенных из ходов *P. proximus* на территориях исходной и инвазивной части ареала. Филогенетический анализ последовательностей изучаемых культур использовался для их характеристики и таксономического определения. Симбиотическое сообщество фитопатогенов, ассоциированных с *P. proximus*, было изучено с использованием методов оценки видового разнообразия. Данные полученные о видовом разнообразии симбиоты жука были сопоставлены с генетическим разнообразием популяции данного вредителя.

Результаты, рассмотренные в настоящей главе, позволяют сформулировать следующие выводы.

Виды *G. aoshimae*, *Gr. rectangulosporium* и *O. subalpinum* формируют ядро симбиотического комплекса *P. proximus* на изучаемой территории, и распространяются совместно с этим короедом в процессе его инвазии на новые территории.

В процессе инвазии *P. proximus* видовое разнообразие его симбиоты снижается. При этом наблюдается элиминация близкородственных видов, принадлежащих одному роду, которая согласуется с концепцией конкурентного исключения.

Впервые на территории Российской Федерации в ассоциации с *P. proximus* были обнаружены виды *O. nikkoense*, *O. microcarpum*, *L. taigense*, *L. sibirica* и представители рода *Geosmithia*.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Поставленные в данном исследовании задачи и цель выделили две логические части настоящей работы. В первой части были исследованы исходные и инвазивные популяции *P. proximus* на генетическом уровне.

Согласно генетическим данным, в популяциях жука идентифицировано 18 гаплотипов, объединенных в 5 групп.

Далее была проанализирована генетическая структура популяций *P. proximus*. Было отмечено независимое развитие островных японских популяций *P. proximus* от материковых.

Установлена независимая инвазия данного вредителя на территорию Западной и Центральной Сибири из исходного ареала на Дальнем Востоке.

Установлен факт множественной инвазии на территорию европейской части страны из исходных и из инвазивных популяций.

Вторым направлением данной работы являлось изучение симбионтов короеда. Изучен видовой состав симбиотического сообщества *P. proximus*.

Было установлено ядро симбиотического комплекса жука на изучаемой территории, включившее в себя виды *G. aoshimae*, *Gr. rectangulosporium* и *O. subalpinum*.

На основании генетической однородности инвазивных и исходных популяций подтверждено распространение *G. aoshimae* совместно с *P. proximus* в процессе инвазии данного жука на новые территории.

Отмечено снижение видового разнообразия симбиотического ансамбля ксилофага в инвазивных популяциях по сравнению с исходными.

Было показано, что представители видов *O. nikkoense*, *O. microcarpum*, *L. taigense*, *L. sibirica* и ранее не исследованные представители рода *Geosmithia* находятся в ассоциации с короедом *P. proximus* на исследуемой территории.

Обобщив эти тезисы, мы получаем картину сложных взаимодействий внутри целой биологической системы ксилофаг-симбионт-дерево. Видовое

сообщество грибов-симбионтов *P.proximus* в исследованном ареале представлено 11 видами четырёх родов класса сордариомицетов: *Ophiostoma*, *Graphilbum*, *Grosmannia* (семейство Ophiostomataceae) и рода *Geosmithia* (семейства Bionectriaceae). При движении от исходного ареала *P.proximus* к западным границам его инвазивного ареала происходит снижение видового разнообразия сообщества грибов-симбионтов. Уменьшение видового состава данного сообщества и генетического разнообразия в популяциях *P.proximus* говорит о совместном развитии всего исследуемого видового комплекса в процессе инвазии

## ВЫВОДЫ

1. Анализ нуклеотидных последовательностей митохондриальных гаплотипов позволил впервые установить генетическую структуру популяций жука-короеда *P. proximus* на исследованных территориях исходного и инвазивного ареалов.
2. Исследованные популяции *P. proximus* на территории Западной Сибири и популяции Восточной Сибири генетически изолированы друг от друга и сформировались в результате двух независимых инвазий из исходного ареала жука-короеда на Дальнем Востоке.
3. Генетическое разнообразие популяций жука-короеда на территории Московской области сформировано в результате множественной инвазии из исходных популяций *P. proximus* Дальнего Востока и из инвазивных популяций Сибири.
4. На основании анализа нуклеотидных последовательностей ядерных ДНК-маркеров на исследованной территории Российской Федерации впервые в ассоциации с *P. proximus* обнаружены виды офиостомовых фитопатогенных грибов *O. nikkoense*, *O. microcarpum*, *L. taigense*, *L. sibirica* и представители рода *Geosmithia*.
5. Виды офиостомовых грибов *G. aoshimae*, *Gr. rectangulosporium* и *O. subalpinum* формируют ядро симбиотического комплекса *P. proximus* на Дальнем Востоке и распространяются совместно с жуком-короедом в процессе его инвазии на запад материка.
6. При инвазии *P. proximus* видовое разнообразие его симбиоты снижается, сопровождаясь элиминацией видов из одного рода, что согласуется с концепцией конкурентного исключения.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алексанов В.В. Методы изучения биологического разнообразия. : Калуга, 2017.
2. Баранчиков Ю. Козволюционные аспекты инвазийности лесных дендрофильных насекомых // Известия Санкт-Петербургской государственной лесотехнической академии. 2010. № 192. С. 30–39.
3. Баранчиков Ю., Кривец С. О профессионализме при определении насекомых: как просмотрели появление новогоагрессивного вредителя пихты а Сибири // Экология Южной Сибири и сопредельных территорий. 2010. Т. 14. С. 1999–2001.
4. Баранчиков Ю., Петько В. О перспективах биологического контроля популяций инвазийного вредителя пихты сибирской - уссурийского полиграфа *Polygraphus proximus bland* // Интнрэкспо гео-Сибирь. 2013. Т. 4. № 3.
5. Бродский А.К. Введение в проблемы биоразнообразия. : СПб, 2002. 1-144 с.
6. Букварева Е.Н., Алещенко Г.М. Разделение ниш – условие или следствие наблюдаемого видового разнообразия? Оптимизация разнообразия как дополнительный механизм формирования структуры экологических сообществ // Успехи современной биологии. 2012. Т. 132. № 4. С. 337–353.
7. Гниненко Ю.И. Вспышка массового размножения шелкопряда-монашенки *Lymantria monacha* (Lepidoptera, Erebidae) на Сахалине // Чтения памяти О.А. Катаева “Вредители и болезни древесных растений России” материалы междунар. конф. (Санкт-Петербург, 18–20 ноября 2014 г. ). 2014. С. 21.
8. Есипенко Л. Биологические инвазии как глобальная экологическая проблема юга России // Юг России экология, развитие. 2012. Т. 4. С. 21–25.



9. Ижевский С.С. Чужеземные насекомые как биоагрессоры // Экология. 1995. Т. 2. С. 119–122.
10. Керчев И. Экология уссурийского полиграфа *Polygraphus proximus blandeford* (Coleoptera; curculionidae, scolytinae) в западно-сибирском регионе инвазии. Томск: , 2013.
11. Керчев И. Экология полиграфа уссурийского *Polygraphus proximus blandeford* (Coleoptera; curculionidae, scolytinae) в западно-сибирском регионе инвазии // Российский Журнал Биологических Инвазий. 2014. Т. 24. С. 80–95.
12. Константинов М.Ю. Ассоциация насекомых-ксилофагов с офиостомовыми грибами и реакция растения-хозяина при стрессовых воздействиях // 2003.
13. Кривец С.А. и др. Усурийский полиграф в лесах Сибири. Томск - Красноярск: Умиум, 2015.
14. Куренцов А.И. Вредные насекомые хвойных пород Приморского края. Владивосток: Дальневосточный филиал АН СССР, 1950. 256 с.
15. Кутафьева Н.П. Морфология Грибов. Новосибирск: Сибирское университетское издательство, 2003.
16. Мандельштам М.Ю., Поповичев Б.Г. Аннотированный список видов короедов (Coleoptera, Scolytidae) Ленинградской области // Энтомологическое обозрение. 2000. Т. 79. № 3. С. 599–618.
17. Снакин В.В. Динамика биоразнообразия, дрейф материков и глобализация // Век глобализации. 2015. Т. 1. С. 66–74.
18. Старк В. Короеды // Фауна СССР, Жесткокрылые. : Издательство Академии наук СССР, 1952. С. 462.
19. Черпаков В. Насекомые-ксилофаги - переносчики и симбионты патогенной микрофлоры древесных пород // Известия Санкт-Петербургской лесотехнической академии. 2014. Т. 207. С. 71–83.

20. Чилахсаева Е.А. Первая находка *Polygraphus proximus* (Coleoptera, Scolytidae) в Московской области // Бюлл. Моск. об-ва испытателей природы. Отдел биол. 2008. Т. 113. № 6. С. 39–42.
21. Шварц Е. Сохранение биоразнообразия: сообщества и экосистемы. Москва: Т-во научн. изд. КМК, 2004. 1-112 с.
22. Шитиков В., Розенберг Г. Рандомизация И Бутстреп: Статистический Анализ В Биологии И Экологии С Использованием R. , 2013. 314 с.
23. Конвенция о биологическом разнообразии. Гаага: , 1992.
24. Национальная стратегия сохранения биоразнообразия России. Москва: Министерство природных ресурсов Российской Федерации, 2002.
25. Проект ГЭФ « Сохранение биоразнообразия » в России : результаты и перспективы. Москва: Министерство природных ресурсов Российской Федерации, 2003.
26. Пятый национальный доклад: Сохранение биоразнообразия в Российской Федерации. Москва: Министерство природных ресурсов Российской Федерации, 2015.
27. Услуги наземных экосистем // Экосистемные услуги России: Прототип национального доклада / под ред. Е.Н. Букварёва, Д.Г. Замолотчиков. Москва: Центра охраны дикой природы, 2016. С. 148.
28. Invasive Species Compendium (CABI) [Электронный ресурс]. URL: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/1930> (дата обращения: 17.04.2018).
29. The IUCN Red List of Threatened Species [Электронный ресурс]. URL: <http://www.iucnredlist.org>.
30. Discover Life [Электронный ресурс]. URL: <http://www.discoverlife.org/mp/20q?search=Abies+alba> (дата обращения: 17.04.2018).
31. The Gymnosperm Database [Электронный ресурс]. URL: [http://www.conifers.org/pi/Abies\\_nephrolepis.php](http://www.conifers.org/pi/Abies_nephrolepis.php) (дата обращения: 17.04.2018).

32. Плантиум определитель растений on-line [Электронный ресурс]. URL: <http://www.plantarium.ru/page/view/item/15.html> (дата обращения: 17.04.2018).
33. Akulov E. *Polygraphus proximus* (POLGPR) [Электронный ресурс]. URL: <https://gd.eppo.int/taxon/POLGPR/photos> (дата обращения: 17.04.2018).
34. Anisimova M., Gascuel O. Approximate likelihood-ratio test for branches: A fast, accurate, and powerful alternative. // Syst. Biol. 2006. Т. 55. № 4. С. 539–52.
35. Baker H.G. The Evolution of Weeds // Annu. Rev. Ecol. Syst. 1974. Т. 5. № 1. С. 1–24.
36. Baker H.G. Patterns of Plant Invasion in North America. : Springer, New York, NY, 1986. С. 44–57.
37. Barrett S.C.H. Genetics of weed invasions // Applied Population Biology. Dordrecht: Springer Netherlands, 1992. С. 91–119.
38. Beer Z.W. De, Seifert K.A., Wingfield M.J. A nomenclator for ophiostomatoid genera and species in the Ophiostomatales and Microascales // Biodivers. Ser. 2013. Т. 12. С. 245–322.
39. Boer P.J. den. The present status of the competitive exclusion principle // Trends Ecol. Evol. 1986. Т. 1. № 1. С. 25–28.
40. Bugrov A.G. и др. Using DNA sequences of two mitochondrial genes (COI and COII) for taxonomy and phylogeny of *Bradyporinae katydids* (Orthoptera, Ensifera, Tettigoniidae) // Euroasian Entomol. J. 2009. Т. 8. С. 1–8.
41. Byers J.E. Competition between two estuarine snails: implications for invasions of exotic species // Ecology. 2000. Т. 81. № 5. С. 1225–1239.
42. Crawley M.J. и др. The Population Biology of Invaders // Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci. 1986. Т. 314. № 1167. С. 711–731.
43. Crous P.W. и др. Phylogenetic reassessment of *Mycosphaerella* spp. and their anamorphs occurring on Eucalyptus // Stud. Mycol. 2004. Т. 50. С. 195–214.

44. Douglas A.E. *The Symbiotic Habit*. Princeton: Princeton University Press, 2010.
45. Edgar R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. // *Nucleic Acids Res.* 2004. T. 32. № 5. C. 1792–7.
46. Ellstrand N.C., Elam D.R. Population genetic consequences of small population size: Implications for plant conservation // *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 1993. T. 24. C. 217–242.
47. Elton C. *Competition and the Structure of Ecological Communities* // *Society*. 2011. T. 15. № 1. C. 54–68.
48. Excoffier L., Laval G., Schneider S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. // *Evol. Bioinform. Online*. 2007. T. 1. C. 47–50.
49. Fisher R. *The genetical theory of natural selection* // Dover Publ. 1958. T. 22. C. 127–130.
50. Forcella F. Final distribution is related to rate of spread in alien weeds // *Weed Res.* 1985. T. 25. № 3. C. 181–191.
51. Gilbert S.F., Sapp J., Tauber A.I. A Symbiotic View of Life: We Have Never Been Individuals // *Q. Rev. Biol.* 2012. T. 87. № 4. C. 325–341.
52. Goodell K. *Biological impacts of species invasions: Implications for policy makers* // *Incorporating Science, Economics, and Sociology in Developing Sanitary and Phytosanitary Standards in International Trade*. Washington, D.C.: National Academies Press, 2000.
53. Gray A.J. и др. Do Invading Species have Definable Genetic Characteristics? // *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 1986. T. 314. № 1167. C. 655–674.
54. Grégoire J. и др. Biocontrol of *Dendroctonus micans* by *Rhizophagus grandis* Gyll. (Col., Rhizophagidae) in the Massif Central (France) // *J. Appl. Entomol.* 1985. T. 99. № 1–5. C. 182–190.

55. Guérard N. и др. Interactions between Scots pine, *Ips acuminatus* (Gyll.) and *Ophiostoma brunneo-ciliatum* (Math.): estimation of the critical thresholds of attack and inoculation densities and effects on hydraulic properties in the stem // Ann. For. Sci. 2000. Т. 57. С. 681–690.

56. Guindon S. и др. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. // Syst. Biol. 2010. Т. 59. № 3. С. 307–21.

57. Guryev V. и др. Phylogeny of the genus *Chironomus* (Diptera) inferred from DNA sequences of mitochondrial cytochrome b and cytochrome oxidase I. // Mol. Phylogenet. Evol. 2001. Т. 19. № 1. С. 9–21.

58. Harpole W. Neutral Theory of Species Diversity // Nat. Educ. Knowl. 2010. Т. 3. № 10. С. 60.

59. Harrington T. и др. Phylogeny and Taxonomy of the *Ophiostoma piceae* Complex and the Dutch Elm Disease Fungi Dutch elm disease fungi // Mycologia. 2001. Т. 91. № 1. С. 111–136.

60. Hausner G., Reid J., Klassen G.R. Do galeate-ascospore members of the Cephaloascaceae, Endomycetaceae and Ophiostomataceae share a common phylogeny? // Mycologia. 1992. Т. 84. С. 870–881.

61. Hengeveld R. Dynamic biogeography. : Cambridge University Press, 1992. 249 с.

62. Hofstetter R.W. и др. Antagonisms, mutualisms and commensalisms affect outbreak dynamics of the southern pine beetle. // Oecologia. 2006. Т. 147. № 4. С. 679–91.

63. Holway D.A. Competitive mechanisms underlying the displacement of native ants by the invasive argentine ant // Ecology. 1999. Т. 80. № 1. С. 238–251.

64. Jacobs K. и др. A new *Leptographium* species from Russia // Mycol. Res. 2000. Т. 104. № 12. С. 1524–1529.

65. Jacobs K., Wingfield M.J. *Ophiostoma europhioides* and *Ceratocystis pseudoeurophioides*, synonyms of *O. piceaperdum* // 2000. № February.

66. Kindt R., Coe R. Tree diversity analysis // *Training*. 2010. Т. 18. № 18. С. 18598–614.
67. Kirkpatrick M., Barton N.H. Evolution of a Species' Range // *Am. Nat.* 1997. Т. 150. № 1. С. 1–23.
68. Kolařík M. и др. *Geosmithia* associated with bark beetles and woodborers in the western USA: taxonomic diversity and vector specificity // *Mycologia*. 2017. Т. 109. № 2. С. 185–199.
69. Kolařík M., Kostovčík M., Pažoutová S. Host range and diversity of the genus *Geosmithia* (Ascomycota: Hypocreales) living in association with bark beetles in the Mediterranean area // *Mycol. Res.* 2007. Т. 111. № 11. С. 1298–1310.
70. Kolbe J.J. и др. Genetic variation increases during biological invasion by a Cuban lizard // *Nature*. 2004. Т. 431. № 7005. С. 177–181.
71. Kostovcik M. и др. The ambrosia symbiosis is specific in some species and promiscuous in others : evidence from community pyrosequencing // *ISME J. Multidiscip. J. Microb. Ecol.* 2014. Т. 9. № 1. С. 126–138.
72. Kowarik I. Time lags in biological invasions with regard to the success and failure of alien species in plant invasions // *Plant Invasions Gen. Asp. Spec. Probl.* 1995. № JANUARY 1995. С. 15–38.
73. Lee C.E. Evolutionary genetics of invasive species // *Trends Ecol. Evol.* 2002. Т. 17. № 8. С. 386–391.
74. Liebhold A.M. и др. Invasion by Exotic Forest Pests : A Threat to Forest Ecosystems // *For. Sci. Monogr.* 30. 1995. Т. 30. С. 49.
75. Linnakoski R. и др. *Ophiostoma spp.* associated with pine- and spruce-infesting bark beetles in Finland and Russia // *Persoonia*. 2010. Т. 25. С. 72–93.
76. Linnakoski R. и др. The *Ophiostoma clavatum* species complex : a newly defined group in the Ophiostomatales including three novel taxa // *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2016.

77. Linnakoski R., Beer Z.W. De, Wingfield M.J. *Grosmannia* and *Leptographium spp.* associated with conifer-infesting bark beetles in Finland and Russia, including *Leptographium taigense sp. nov.* // *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2012. T. 102. C. 375–399.

78. Lu M. и др. Complex interactions among host pines and fungi vectored by an invasive bark beetle. // *New Phytol.* 2010. T. 187. № 3. C. 859–66.

79. Mack R.N. и др. Biotic Invasions: Causes, Epidemiology, Global Consequences and Control // *Issues Ecol.* 1999. T. 4. № 4. C. 1–12.

80. Matsuura K. Sexual and Asexual Reproduction in Termites // *Biology of Termites: a Modern Synthesis*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2010. C. 255–277.

81. Matthews T.J., Whittaker R.J. Neutral theory and the species abundance distribution: recent developments and prospects for unifying niche and neutral perspectives // *Ecol. Evol.* 2014. T. 4. № 11. C. n/a-n/a.

82. May R.M. On the theory of nich overlap // *Theor. Pop. Biol.* 1974. T. 5. C. 297–332.

83. Mikkola K., Ståhls G. Morphological and molecular taxonomy of *Dendrolimus sibiricus Chetverikov* stat. rev. and allied lappet moths (Lepidoptera: Lasiocampidae), with description of a new species // *Entomol. Fenn.* 2008. T. 19. № June. C. 65–85.

84. Newman D., Pilson D. Increased probability of extinction due to decreased genetic effective population size: experimental populations of *Clarkia pulchella* // *Evolution* (N. Y). 1997. T. 51. № 2. C. 354–362.

85. Nieminen M. и др. Experimental confirmation that inbreeding depression increases extinction risk in butterfly populations. // *Am. Nat.* 2001. T. 157. № 2. C. 237–44.

86. Novak S.J., Mack R.N. Genetic variation in *Bromus tectorum* (Poaceae): comparison between native and introduced populations // *Heredity* (Edinb). 1993. T. 71. № 2. C. 167–176.

87. Nuñez M.A., Horton T.R., Simberloff D. Lack of belowground mutualisms hinders *Pinaceae* invasions. // *Ecology*. 2009. T. 90. № 9. С. 2352–9.
88. Ohtaka N. и др. Two new *Ophiostoma* species lacking conidial states isolated from bark beetles and bark beetle- infested *Abies* species in Japan // *Can. J. Bot.* 2006. T. 84. С. 282–293.
89. Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M. Unipro UGENE : a unified bioinformatics toolkit // *Bioinformatics*. 2012. T. 28. № 8. С. 1166–1167.
90. Pashenova N. V., Petko V.M., Baranchikov Y.N. Attractivity of phitopathogenic fungus *Grosmannia Aoshimae* for adults of its invasive vector - four-eyed fir bark beetle // *Interexpo Geo Sib*. 2013. T. 4. № 3.
91. Pedersen B.V. A Phylogenetic Analysis of *Cuckoo Bumblebees* (Psithyrus, Lepeletier) and *Bumblebees* (Bombus, Latreille) Inferred from Sequences of the Mitochondrial Gene Cytochrome Oxidase I // *Mol. Phylogenet. Evol.* 1996. T. 5. № 2. С. 289–297.
92. Pepori A.L. и др. Morphological and molecular characterisation of *Geosmithia* species on European elms // *Fungal Biol.* 2015. T. 119. № 11. С. 1063–1074.
93. Perry T.J. A synopsis of the taxonomic revisions in the genus *Ceratocystis* including a review of blue-staining species associated with *Dendroctonus* beetles // *USDA For. Serv.* 1991. № SO-86.
94. Pramual P., Khumkratok S., Wongpakam K. Population genetics of invasive weed *Mimosa Pigra* L. (Mimosoideae) in Thailand // *Pakistan J. Bot.* 2011. T. 43. № 6. С. 2721–2716.
95. Quinn T.P., Unwin M.J., Kinnison M.T. Evolution of temporal isolation in the wild: genetic divergence in timing of migration and breeding by introduced *chinook salmon* populations. // *Evolution*. 2000. T. 54. № 4. С. 1372–85.
96. Raffa K.F., Berryman A.A. Physiological differences between *Lodgepole Pines* resistant and susceptible to the *Mountain Pine Beetle* and associated microorganisms // *Environ. Entomol.* 1982. T. 11. № 2. С. 486–492.



97. Reid R.W., Whitney H.S., Watson J.A. Reactions of lodgepole pine to attack by *Dendroctonus ponderosae* Hopkins and blue stain fungi // Can. J. Bot. 1967. T. 45. C. 10–14.
98. Rejmanek M., Richardson D.M. What Attributes Make Some Plant Species More Invasive? // Ecology. 1996. T. 77. № 6. C. 1655–1661.
99. Ruiz G.M. и др. Global spread of microorganisms by ships // Nature. 2000. T. 408. № 6808. C. 49–50.
100. Rumbold C.T. Three blue-staining fungi including two new species associated with bark beetles // J. Agric. Res. 1936. T. 52. C. 419–436.
101. Sakai A.K. и др. The Population Biology of Invasive Species // Annu. Rev. Ecol. Syst. 2001. T. 32. № 1. C. 305–332.
102. Savidge J.A., Qualls F.J., Rodda G.H. Reproductive Biology of the Brown Tree Snake, *Boiga irregularis* (Reptilia: Colubridae), during Colonization of Guam and Comparison with That in Their Native Range1 // [http://dx.doi.org/10.2984/1534-6188\(2007\)61\[191:RBOTBT\]2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.2984/1534-6188(2007)61[191:RBOTBT]2.0.CO;2). 2007.
103. Schoch C.L. и др. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi // Proc. Natl. Acad. Sci. 2012. T. 109. № 16. C. 6241–6246.
104. Six D.L., Wingfield M.J. The role of phytopathogenicity in bark beetle-fungus symbioses: a challenge to the classic paradigm. // Annu. Rev. Entomol. 2011. T. 56. C. 255–72.
105. Smith H.A. и др. The Implications of Variable or Constant Expansion Rates in Invasive Weed Infestations // Weed Sci. 1999. T. 47. C. 62–66.
106. Taerum S.J. и др. Large Shift in Symbiont Assemblage in the Invasive Red Turpentine Beetle // PLoS One. 2013. T. 8. № 10. C. 1–12.
107. Thompson J.N. Rapid evolution as an ecological process. // Trends Ecol. Evol. 1998. T. 13. № 8. C. 329–32.
108. Upadhyay H.P. A Monograph of *Ceratocystis* and *Ceratocystiopsis*. , 1981. 1-176 с.

109. Vega F.E., Dowd P.F. Insect–Fungal Associations Ecology and Evolution. Oxford New York: Oxford University Press, 2005.
110. Vite J.P., Wood D.L. Rapid Measurement of Oleoresin Exudation Pressure in *Pinus ponderosa* Laws // Canad. Ent. 1964. № March. C. 510–513.
111. Wbight E. Further investigations of brown-staining fungi associated with engraver beetles (*Scolytus*) in white fir // J. Agric. Res. 1938. T. 57. C. 759–773.
112. Webber J., Breuil C. Phylogenetic analysis of the bluestain fungus *Ophiostoma minus* based on partial ITS rDNA and  $\beta$ -tubulin gene sequences // 2004. T. 108. № July. C. 759–765.
113. Wright E.F., Cain R.F. New species of the genus *Ceratocystis*. // Can. J. Bot. 1961. T. 39. C. 1215–1230.
114. Yamaoka Y. и др. Three new *Ophiostoma* species with *Pesotum* anamorphs associated with bark beetles infesting *Abies* species in Nikko , Japan // 2004. № 187. C. 277–286.
115. Yamaoka Y. и др. Constant association of ophiostomatoid fungi with the bark beetle *Ips subelongatus* invading Japanese larch logs // Mycoscience. 2009. T. 50. C. 165–172.
116. Yamaoka Y. Taxonomy and pathogenicity of ophiostomatoid fungi associated with bark beetles infesting conifers in Japan, with special reference to those related to subalpine conifers // Mycoscience. 2017. T. 58. № 4. C. 221–235.
117. Zipfel R.D. и др. Multi-gene phylogenies define *Ceratocystiopsis* and *Grosmannia* distinct from *Ophiostoma* // Stud. Mycol. 2006. T. 55. C. 75–97.

## ПРИЛОЖЕНИЕ

Приложение 1. Информация о нуклеотидных последовательностях,  
депонированных в базу данных GenBank.

№	Вид	Гаплотип или номер культуры	Секвенированный ДНК локус	Номер в базе данных
1	<i>Polygraphus proximus</i>	IA	COI	KR817585
2	<i>Polygraphus proximus</i>	IB	COI	KR817586
3	<i>Polygraphus proximus</i>	IC	COI	KR817587
4	<i>Polygraphus proximus</i>	IIA	COI	KR817588
5	<i>Polygraphus proximus</i>	IIB	COI	KR817589
6	<i>Polygraphus proximus</i>	IIC	COI	KR817590
7	<i>Polygraphus proximus</i>	IID	COI	KR817591
8	<i>Polygraphus proximus</i>	IIE	COI	KR817592
9	<i>Polygraphus proximus</i>	IIF	COI	KR817593
10	<i>Polygraphus proximus</i>	IIIA	COI	KR817594
11	<i>Polygraphus proximus</i>	IIIB	COI	KR817595
12	<i>Polygraphus proximus</i>	IIIC	COI	KR817596
13	<i>Polygraphus proximus</i>	IVA	COI	KR817597
14	<i>Polygraphus proximus</i>	IVB	COI	KR817598
15	<i>Polygraphus proximus</i>	VA	COI	KR817599
16	<i>Polygraphus proximus</i>	VB	COI	KR817600
17	<i>Polygraphus proximus</i>	VC	COI	KR817601

18	<i>Polygraphus proximus</i>	VD	COI	KR817602
19	<i>Polygraphus proximus</i>	IA	COII	KR817603
20	<i>Polygraphus proximus</i>	IB	COII	KR817604
21	<i>Polygraphus proximus</i>	IC	COII	KR817605
22	<i>Polygraphus proximus</i>	IIA	COII	KR817606
23	<i>Polygraphus proximus</i>	IIB	COII	KR817607
24	<i>Polygraphus proximus</i>	IIC	COII	KR817608
25	<i>Polygraphus proximus</i>	IID	COII	KR817609
26	<i>Polygraphus proximus</i>	IIE	COII	KR817610
27	<i>Polygraphus proximus</i>	IIF	COII	KR817611
28	<i>Polygraphus proximus</i>	IIIA	COII	KR817612
29	<i>Polygraphus proximus</i>	IIIB	COII	KR817613
30	<i>Polygraphus proximus</i>	IIIC	COII	KR817614
31	<i>Polygraphus proximus</i>	IVA	COII	KR817615
32	<i>Polygraphus proximus</i>	IVB	COII	KR817616
33	<i>Polygraphus proximus</i>	VA	COII	KR817617
34	<i>Polygraphus proximus</i>	VB	COII	KR817618
35	<i>Polygraphus proximus</i>	VC	COII	KR817619
36	<i>Polygraphus proximus</i>	VD	COII	KR817620
37	<i>Ophiostoma nikkoense</i>	1411	ITS2	MF067010
38	<i>Ophiostoma nikkoense</i>	1412	ITS2	MF067011

39	<i>Ophiostoma nikkoense</i>	1413-1	ITS2	MF067012
40	<i>Ophiostoma nikkoense</i>	1414	ITS2	MF067013
41	<i>Ophiostoma nikkoense</i>	1115	ITS2	MF067014
42	<i>Ophiostoma nikkoense</i>	1476	ITS2	MF067015
43	<i>Grosmannia europioides</i>	1421	ITS2	MF067016
44	<i>Grosmannia europioides</i>	1422	ITS2	MF067017
45	<i>Grosmannia aenigmatica</i>	1423	ITS2	MF067018
46	<i>Graphilbum microcarpum</i>	1451	ITS2	MF067019
47	<i>Graphilbum microcarpum</i>	1452	ITS2	MF067020
48	<i>Graphilbum microcarpum</i>	1454	ITS2	MF067021
49	<i>Graphilbum rectangulosporium</i>	1453	ITS2	MF067022
50	<i>Ophiostoma subalpinum</i>	1461	ITS2	MF067023
51	<i>Ophiostoma subalpinum</i>	1462	ITS2	MF067024
52	<i>Grosmannia aoshimae</i>	1203	ITS2	MF067025
53	<i>Grosmannia aoshimae</i>	1206	ITS2	MF067026
54	<i>Grosmannia aoshimae</i>	1207	ITS2	MF067027
55	<i>Grosmannia aoshimae</i>	1402	ITS2	MF067028
56	<i>Grosmannia aoshimae</i>	1405	ITS2	MF067029
57	<i>Grosmannia aoshimae</i>	1407	ITS2	MF067030
58	<i>Grosmannia aoshimae</i>	1412	ITS2	MF067031
59	<i>Grosmannia aoshimae</i>	1502	ITS2	MF067032

60	<i>Grosmannia aoshimae</i>	1507	ITS2	MF067033
61	<i>Grosmannia aoshimae</i>	1515	ITS2	MF067034
62	<i>Grosmannia aoshimae</i>	1520	ITS2	MF067035
63	<i>Ophiostoma piceae</i>	1416	ITS2	MF067036
64	<i>Leptographium sibiricum</i>	1031	ITS2	MF067037
65	<i>Leptographium sibirica</i>	1032	ITS2	MF067038
66	<i>Leptographium taigense</i>	1473	ITS2	MF067039
67	<i>Leptographium taigense</i>	1474	ITS2	MF067040
68	<i>Geosmithia</i> sp.	1242	ITS2	MF067041
69	<i>Geosmithia</i> sp.	1441	ITS2	MF067042