

УДК 630\*443+582.47+595.768.24

## ОФИОСТОМОВЫЕ ГРИБЫ, АССОЦИИРОВАННЫЕ С УССУРИЙСКИМ ПОЛИГРАФОМ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИИ

© 2017 Пашенова Н.В.<sup>а,\*</sup>, Кононов А.В.<sup>б</sup>, Устьянцев К.В.<sup>б</sup>, Блинов А.Г.<sup>б</sup>,  
Перцовая А.А.<sup>а</sup>, Баранчиков Ю.Н.<sup>а,\*\*</sup>

<sup>а</sup> Институт леса им. В.Н. Сукачёва ФИЦ КНЦ СО РАН,  
Красноярск 660036, Академгородок, 50/28;

<sup>б</sup> ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН,  
Новосибирск 630090, пр. академика Лаврентьева, 10;  
e-mail: \*[pasnat@ksc.krasn.ru](mailto:pasnat@ksc.krasn.ru), \*\*[baranchikov-yuri@yandex.ru](mailto:baranchikov-yuri@yandex.ru)

Поступила в редакцию 31.05.2017

В статье представлены результаты исследований офиостомовых грибов, связанных с инвазийным вредителем пихты сибирской – уссурийским полиграфом (*Polygraphus proximus* Blandford, Coleoptera, Curculionidae). На российском Дальнем Востоке идентифицировано 8 видов грибных ассоциантов этого короеда. Все они (за исключением *Leptographium taigense* и *Grosmannia europhioides*) занесены короедом-пришельцем и в его вторичный ареал (Южная Сибирь и Московская область). Во вторичном ареале, связанный с *P. proximus* комплекс офиостомовых грибов состоит преимущественно из дальневосточных видов, адаптировавшихся к новым местообитаниям. *G. aoshimae* и *Ophiostoma nikkoense* продемонстрировали высокую фитопатогенную активность, будучи инокулированными во флоэму пихты сибирской. Культуры *G. aoshimae* и *O. subalpinum* вызывали образование больших некрозов в стволах лиственницы сибирской. В целом, по частоте встречаемости и по агрессивности по отношению к видам хвойных Южной Сибири, *G. aoshimae* служит основным микоассоциантом *P. proximus*. Он оказался высоко агрессивным по отношению к пихте сибирской и лиственнице сибирской; сосна обыкновенная оказалась также восприимчива к этому грибу. Устойчивыми оказались ель сибирская и кедр сибирский. Имеется высокая вероятность вхождения в микобиоту, связанную с уссурийским полиграфом, микоассоциантов чёрного пихтового усача *Monochamus urusovi* Fisch. – аборигенного вредителя пихты в Сибири.

**Ключевые слова:** офиостомовые грибы, инвазия, *Polygraphus proximus*, хвойные, Южная Сибирь.

### Введение

В последние десятилетия внимание учёных и практиков в области лесного хозяйства привлечено к дендрофильным насекомым-пришельцам, способным превратиться в масштабную угрозу для лесов на территории их вторичного ареала [Баранчиков, 2012]. Уссурийский полиграф – *Polygraphus proximus* Blandf. (Coleoptera, Curculionidae, Scolytinae) – пример экономически значимого вида-инвайдера [Кривец и др., 2015]. В пределах природного ареала (российский Дальний Восток, север Китая, Северной Кореи и Японии) этот короед, поселяющийся на различных видах пихт [Старк, 1952; Yamaoka et al., 2004b; Tokuda et

al., 2008], не рассматривается как экономически важный вид [Ohtaka et al., 2006; Кривец и др., 2015]. Но в инвазийном ареале – южная Сибирь (Алтайский и Красноярский края, Новосибирская, Томская, Кемеровская области, республики Алтай и Хакасия) – он формирует очаги массового размножения и поражает здоровые пихты с отпадом деревьев до 99.8% [Баранчиков и др., 2011; Керчев, 2014; Кривец и др., 2015]. Жуки уссурийского полиграфа были зарегистрированы возле Санкт-Петербурга [Мандельштам, Поповичев, 2000] и в Москве и окрестностях [Чилахсаева, 2008], где впоследствии локальный очаг инвайдера явился причиной серьёзных повреждений коллекци-

онных посадок разных видов пихт в Главном ботаническом саду РАН [Серая и др., 2014].

Насекомые-ксилофаги тесно связаны с большим количеством организмов (клещи, нематоды, грибы, бактерии, вирусы) [Whitney, 1982], большую часть которых они перемещают в пространстве, обеспечивая себе привычную биоту в новых гнёздах на заселяемых деревьях. Таким образом, насекомые-инвайдеры служат причиной вселения на новые территории целых сообществ чужеродных организмов [Desprez-Loustau et al., 2007]. В случае короедов исследовательский интерес обычно сосредоточен на связанных с ними офиостомовых грибах, которые вносят свой вклад в колонизацию вредителем живых деревьев [Six, Wingfield, 2010].

Офиостомовые грибы, связанные с уссурийским полиграфом в его первичном ареале, изучались только в Японии. В публикациях японских исследователей упоминаются виды: *G. aoshimae* (Ohtaka et Masuya) Mas. et Yamaoka, *G. abieticola* Yamaoka et Masuya, *G. davidsonii* (Olch. et Reid) H. Solheim, *G. europhioides* (Wright et Cain), *Graphilbum microcarpum* Yamaoka et Masuya, *Gra. rectangulosporium* Ohtaka, Masuya et Yamaoka, *O. albidum* Math.-Käärik., *O. nikkoense* Yamaoka et Masuya, *O. picea* (Munch) H. et P. Syd., *O. subalpinum* Ohtaka et Masuya и ещё несколько неидентифицированных представителей рода *Ophiostoma* [Ohtaka et al., 2002, Yamaoka et al., 2004 a, b; Ohtaka et al., 2006; Masuya et al., 2013]. Данные виды составляют комплекс офиостомовых грибов, общий для целой группы короедов (*P. proximus*, *Cryphalus montanus* Nobuchi, *C. piceae* Ratzeburg, *Dryocoetes hectographus* Reitter, *D. autographus* (Ratzeburg) и *D. striatus* Eggers), заселяющих пихты в Японии [Masuya et al., 2013]. Установлено, что жуки разных видов обитают совместно на одних и тех же деревьях, что допускает «обмен» грибами-ассоциантами между ними [Yamaoka et al., 2004 a, b; Masuya et al., 2013] и, вероятно, обуславливает отсутствие специфических связей между конкретными видами грибов и переносчиков. Однако для уссурийского полиграфа японские исследователи отмечали тесную связь с грибом *G. aoshimae*

[Yamaoka et al., 2004b; Ohtaka et al., 2006], предполагающую наличие специфических взаимоотношений.

Оценка фитопатогенной активности грибов, обнаруженных на японских видах пихт, показала, что при инокулировании здоровых деревьев пихты Вича (*Abies veitchii* Lindl.) самые большие зоны некротизированной флоэмы и усохшей заболони вызывали чистые культуры грибов *G. aoshimae*, *G. europhioides* и *O. subalpinum*. Эти виды были отнесены к потенциальным фитопатогенам на ослабленных деревьях [Yamaoka et al., 2004b], но в качестве основной причины усыхания пихтовых лесов в Японии ни они, ни их насекомые-переносчики не рассматривались [Ohtaka et al., 2006].

Целью настоящей работы было изучение видового состава и предварительная оценка фитопатогенной активности офиостомовых грибов, связанных с уссурийским полиграфом в его первичном и инвазийном ареалах на территории Российской Федерации.

### Материал и методика

Сбор образцов и микологический анализ растительных тканей. Материал для изучения грибов был собран в период 2010–2016 гг. на российском Дальнем Востоке, в Южной Сибири и европейской части Российской Федерации (табл. 1). Материал был представлен высеками из стволов пихт (кора и подстилающая её древесина, 4–9 × 3–5 см), содержащими гнёзда или фрагменты гнёзд уссурийского полиграфа на всех стадиях развития. Всего микологическому анализу были подвергнуты 286 образцов растительных тканей, содержащих ходы уссурийского полиграфа. Образцы зачищали от тонкого слоя внешней мёртвой коры, разделяли на две половинки (коровая и древесная) и помещали в стерильные влажные камеры, приготовленные из чашек Петри и фильтровальной бумаги. Влажные камеры инкубировали в темноте при температуре 20–24 °С в течение 6 недель. Для учёта офиостомовых грибов в ходах полиграфа и примыкающих к гнезду короеда растительных тканях образцы просматривали с помощью бинокулярного микроскопа МБС–9 (РФ) не-

**Таблица 1.** Происхождение изученных в работе образцов растительных тканей, повреждённых уссурийским полиграфом

| Ареал      | Территориальная единица РФ и место отбора образцов   | Годы сбора образцов (количество исследованных популяций короеда) | Растение-хозяин короеда   |
|------------|--|--|---|
| Первичный  | о. Сахалин, Красногорский район (48°22' с. ш., 142°11' в. д.)  | 2014–2015 (1)  | Пихта сахалинская<br><i>Abies sachalinensis</i> (F. Schmidt) Mast |
|            | Приморский край, граница Лазовского и Партизанского районов (43°28' с. ш., 134°00' в. д.)  | 2014 (1)   | Пихта белокорая<br><i>A. nephrolepis</i> (Trautv. ex Maxim) Maxim |
|            | Хабаровский край, Большехехцирский заповедник (48°15' с. ш., 135°02' в. д.)  | 2011–2014 (2)  |   |
| Инвазийный | Красноярский край: Емельяновский (56°11' с. ш., 92°12' в. д.), Енисейский (58°42' с. ш., 92°57' в. д.), Ермаковский (53°08' с. ш., 92°52' в. д.), Козульский (56°12' с. ш., 91°12' в. д.) районы | 2010–2016 (4)  | Пихта сибирская<br><i>A. sibirica</i> Ledeb.                      |
|            | Томская область, Томский район, Заварзино (56°27' с. ш., 85°05' в. д.)   | 2011, 2014 (1)   |   |
|            | Новосибирская область, Маслянинский район (54°20' с. ш., 84°16' в. д.)   | 2012 (1)   |   |
|            | Республика Алтай, Турочакский район, пос. Турочак (52°15' с. ш., 87°05' в. д.)   | 2015 (1)   |   |
|            | г. Москва, Главный ботанический сад (55°50' с. ш., 37°37' в. д.)   | 2014–2015 (1)  |   |

посредственно при раскладке во влажные камеры и далее 1 раз в неделю. Обнаруженные в ходах полиграфа и примыкающих к гнезду короеда растительных тканях бесполое и половые спороношения офиостомовых грибов регистрировали, использовали для изолирования в чистую культуру и для изготовления микроскопических препаратов. Частоту встречаемости (%) каждого вида грибов рассчитывали как отношение числа образцов, содержащих структуры данного гриба, к общему количеству образцов в исследуемой партии.

Изолирование и морфологическая идентификация грибов. Для изолирования чистых культур слизистые капли аскоспор или конидий офиостомовых 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 агаризованное разбавленное неохмеленное пивное сусло (содержание сахаров 2–3° по Баллингу). Морфологическую идентификацию офиостомовых грибов выполняли по совокупности культуральных и микроморфологических признаков, описанных при росте грибов на естественном субстрате (флоэма, древесина) и агаровой среде. Микропрепараты («раздавленная капля»), изучали методом фазово-контрастной микроскопии, используя микроскоп Микмед-2 (ЛМО, РФ). При идентификации ориентировались на описания грибов, опубликованные японскими авторами [Ohtaka et al., 2002; Yamaoka et al., 2004 а, б; Ohtaka et al., 2006; Masuya et al., 2013]. Из образцов были изолированы 524 грибные культуры, относящиеся к 10 морфологическим группам (видам), среди которых 9 имели признаки офиостомовых грибов.

Выделение ДНК и ПЦР-амплификация. Для проверки правильности морфологической идентификации в каждой из 10 групп были отобраны культуры с выраженной для данного типа морфологией (общее число культур – 33) и подвергнуты молекулярно-генетическому анализу. Суммарная геномная ДНК была выделена из грибных культур с использованием набора для экстракции DNeasy® Blood & Tissue kit (Qiagen Inc., США) согласно инструкциям производителя. Для оценки генетической варибельности изучаемых грибных культур были амплифицированы последовательности ДНК-маркера ITS2 (второй межгенный спейсер кластера рибосомальных генов) длиной 311 п.н. Амплификация ITS2-последовательностей проводилась с использованием следующих праймеров: ITS5 (5'-TCCTCCGCTTATGATATGC-3') и ITS4 (5'-GAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') [Schoch et al., 2012]. Реакционная смесь ПЦР объёма 20 мкл содержала 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 Taq polymerase. ПЦР реакцию проводили в амплификаторе PC-Personal Cycler (Biometra, Германия) со следующим температурным профилем: начальная денатурация 10 мин при 95 °C, 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.

Очистка образцов и секвенирование, генетический и филогенетический анализы. Полученные ПЦР-продукты проявляли в 1.5%-м агарозном геле, выдержанном с бромистым этидием, и далее вырезали визуализированные ДНК-фрагменты из геля. Очистку вырезанного 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 [Центр..., 2017]. Для подтверждения

видовой принадлежности морфологических типов грибных культур производили поиск и сравнение установленных последовательностей ITS2 с известными последовательностями офиостомовых грибов в базе данных GenBank (NCBI) с помощью онлайн-интерфейса программы BLAST (NCBI). Отобранные таким путём гомологичные последовательности офиостомовых грибов выравнивали в программе MUSCLE [Edgar, 2004] и далее производили их филогенетический анализ методом максимального правдоподобия (программа PhyML) [Guindon et al., 2010] с целью визуализации и подтверждения их генетического родства.

Проверку фитопатогенной активности микоассоциантов уссурийского полиграфа в отношении видов хвойных пород южной Сибири выполняли в полевых экспериментах в весенне-летние сезоны 2011 и 2012 гг. Фитопатогенную активность грибов синевы древесины оценивали на основании длины вытянутых вдоль ствола овальных некрозов флэмы, которые образуются вокруг точки инокуляции стволов грибным мицелием [Solheim, 1988]. В инокуляционные эксперименты были отобраны культуры грибов, характеризующихся высокой частотой встречаемости и постоянным присутствием в популяциях *P. proximus*. Для тестов отбирали деревья основных лесобразующих пород без видимых признаков ослабления (табл. 2). Особое внимание при инокулировании было уделено древесным видам: пихта сибирская – основной хозяин вредителя-переносчика в инвазийном ареале, и лиственница сибирская – наиболее вероятный хозяин для полиграфа после пихты, согласно данным лабораторных экспериментов [Керчев, 2012]. Инокулирование деревьев выполняли в период массового лёта уссурийского полиграфа в Красноярском крае – с 20 мая по 10 июня. В качестве инокулюма для искусственного заражения деревьев использовали агаровые блоки (диаметр – 6 мм) с мицелием грибов, которые вырезали из края 7-суточной колонии соответствующей культуры, выращенной на агаризованном пивном сусле. Агаровый блок с мицелием помещали в отверстие того же диаметра, которое пробивали в стволах через кору

**Таблица 2.** Виды хвойных, использованные в экспериментах по тестированию фитопатогенной активности офиостомовых грибов в Красноярском крае

| Вид хвойных           | Количество деревьев | Диаметр стволов (см) на высоте 1.2 м | Год эксперимента | Тип леса  | Местоположение   |
|-----------------------|---------------------|--------------------------------------|------------------|---|--|
| Пихта сибирская       | 10                  | 19–25                                | 2011             | Пихтарник с примесью кедра разнотравный                                 | Козульский район, окрестности д. Шушково                       |
| Кедр сибирский        | 5                   | 25–27                                | 2011             | То же   | То же  |
| Сосна обыкновенная    | 5                   | 15–22                                | 2011             | Лесопосадки Емельяновского лесничества                                  | Емельяновский р-н, окрестности пос. Памяти 13 Борцов           |
| Ель сибирская         | 5                   | 15–19                                | 2011             | То же   | То же  |
| Пихта сибирская       | 10                  | 17–23                                | 2012             | Пихтарник с примесью кедра разнотравный                                 | То же  |
| Лиственница сибирская | 10                  | 10–14                                | 2012             | Культуры лиственницы в березняке осочково-разнотравном с примесью сосны | Емельяновский р-н, опытное лесное хозяйство «Погорельский бор» |

и луб до поверхности заболони, используя стерильное пробочное сверло (диаметр – 6 мм). Высечками коры, получившимися при пробивании лунок, закрывали инокулированные отверстия, и сверху обматывали ствол скотчем, чтобы избежать быстрого высыхания повреждённых тканей. Контролем служили лунки, оставленные без инокулюма. Через 5–7 недель тонкий слой наружной коры вокруг места инокуляции зачищали и измеряли длину некрозов, развившихся вокруг лунок с грибными культурами. Опыты выполнены в пяти- и десятикратной повторности. Длина некрозов флоэмы представлена через средние показатели и стандартное отклонение. Достоверность различий (при  $P \leq 0.05$ ) оценивали по непараметрическому критерию Манна – Уитни [Рунион, 1982].

### Результаты

Микологический анализ образцов растительных тканей, содержащих фрагменты семейных гнёзд уссурийского полиграфа, позволил выявить 10 морфологических типов культур (табл. 3). Из них 9 морфотипов по данным

микроморфологии и генетического анализа были отождествлены с известными видами офиостомовых грибов.

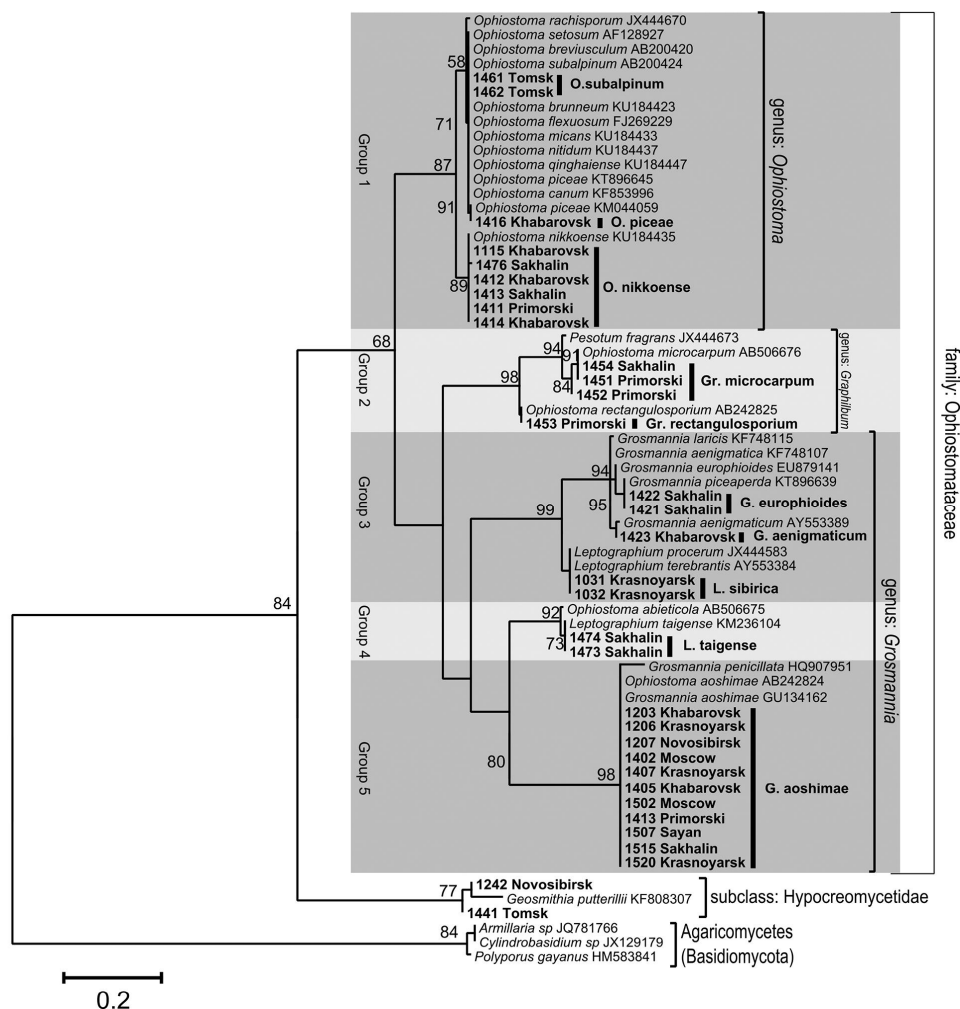
Культуры морфотипа I (табл. 3) на основании предварительной морфологической идентификации были ошибочно отнесены к виду *O. abieticola*, но генетические исследования однозначно указали на их принадлежность к виду *O. nikkoense* (рис. 1). Ошибка объясняется тем, что на используемой агаровой среде изучаемые культуры не формировали перитеции, и не было обнаружено удлинённых крупных септированных конидий, которые, по данным японских авторов, являются специфическим признаком *O. nikkoense* [Yamaoka et al., 2004a].

Морфотип II (табл. 3) по морфологическим признакам был идентифицирован как *G. europhioides*, но генетический анализ показал принадлежность исследованных культур к видам *G. piceiperda* (номера 1421, 1422, рис. 1) и *G. aenigmatica* (номер 1423, рис. 1). Все три упомянутых вида относятся к *G. piceiperda*-комплексу, и делинеация видов в пределах этого комплекса ещё не завершена [de Beer et al.,

**Таблица 3.** Культуры грибов, связанных с уссурийским полиграфом на территории РФ, для которых был проведён молекулярно-генетический анализ по ITS2-маркеру

| Морфологическая группа | Номер изолята         | 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>Grosmania piceaperda</i>    | MF067016                    |
|                        | 1422                  | о. Сахалин                     | <i>G. piceaperda</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>O. subalpinum</i>           | MF067023                    |
|                        | 1462                  | Томская область                | <i>O. subalpinum</i>           | MF067024                    |
| VI                     | 1203                  | Хабаровский край               | <i>G. 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>O. piceae</i>               | MF067036                    |
| VIII                   | 1031                  | Красноярский край (4)          | <i>Leptographium sibiricum</i> | MF067037                    |
|                        | 1032                  | Красноярский край (4)          | <i>L. sibiricum</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.



**Рис. 1.** Филогенетическое древо офиостомовых грибов, переносимых уссурийским полиграфом, построенное на основе последовательностей ITS2-маркера методом максимального правдоподобия. Значимость дивергенции каждой группы отражена коэффициентами aLRT поддержки, 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.

2013]. В дальнейшем для культур этого морфотипа приняты обозначения: *G. piceiperda* и *G. aenigmatica*.

Морфотипы III и IV были отождествлены с видами *Gra. microcarpum* и *Gra. rectangulosporium*, соответственно (рис. 1, табл. 3). Первоначально эти грибы были описаны как представители рода *Ophiostoma* [Yamaoka et al., 2004b; Ohtaka et al., 2006], позднее по данным генетического анализа отнесены к роду *Graphilbum* [de Beer et al., 2013; Masuya et al., 2013].

Культуры морфотипов V, VI и VII по совокупности исследованных признаков представляли виды *O. subalpinum*, *G. aoshimae* и *O. piceae* (рис. 1, табл. 3), соответственно. При

описании вида гриб *G. aoshimae* был помещён в род *Ophiostoma* [Ohtaka et al., 2006], но позднее, на основании генетического анализа, переведён в род *Leptographium* sensu lato (включающий род *Grosmannia*). Японские исследователи не обнаружили анаморфу *G. aoshimae* [Masuya et al., 2013], но у российских изолятов этого вида наблюдали *Leptographium*-подобные конидиеносцы [Пашенова, Баранчиков, 2013], что соответствует переносу указанного гриба в род *Grosmannia*.

Морфотипы VIII и IX (табл. 3) представляли анаморфные грибы из рода *Leptographium*. Культуры, изолированные в Красноярском крае (номера 1031 и 1032), по морфологичес-

**Таблица 4.** Частота встречаемости (%) офиостомовых грибов и *Geosmithia* spp. в популяциях уссурийского полиграфа на территории Российской Федерации

| Вид гриба                     | Регионы Российской Федерации* |    |       |              |           |           |              |           |
|-------------------------------|-------------------------------|----|-------|--------------|-----------|-----------|--------------|-----------|
|                               | Сх                            | Пр | Хб    | Кр           | Ал        | Нв        | Тм           | Мс        |
| <i>Grosmannia aoshimae</i>    | 83                            | 88 | 73–89 | <b>46–88</b> | <b>73</b> | <b>73</b> | <b>17–90</b> | <b>67</b> |
| <i>G. europioides</i>         | 28                            | 0  | 0     | <b>0</b>     | <b>0</b>  | <b>0</b>  | <b>0</b>     | <b>0</b>  |
| <i>Graphilbum microcarpum</i> | 13                            | 44 | 27–29 | <b>0–54</b>  | <b>0</b>  | <b>27</b> | <b>0–30</b>  | <b>0</b>  |
| <i>Gra. rectangulosporium</i> | 25                            | 13 | 18–27 | <b>0–60</b>  | <b>9</b>  | <b>9</b>  | <b>0–30</b>  | <b>33</b> |
| <i>Ophiostoma nikkoense</i>   | 25                            | 13 | 9–14  | <b>0–16</b>  | <b>0</b>  | <b>9</b>  | <b>0</b>     | <b>0</b>  |
| <i>O. picea</i>               | 13                            | 0  | 4–18  | <b>0–8</b>   | <b>0</b>  | <b>0</b>  | <b>0–10</b>  | <b>0</b>  |
| <i>O. subalpinum</i>          | 33                            | 13 | 36–55 | <b>0–56</b>  | <b>0</b>  | <b>27</b> | <b>10–33</b> | <b>67</b> |
| <i>Leptographium</i> spp.**   | 25                            | 0  | 0     | <b>0–45</b>  | <b>0</b>  | <b>0</b>  | <b>0</b>     | <b>0</b>  |
| <i>Geosmithia</i> spp.        | 0                             | 0  | 0–39  | <b>15–82</b> | <b>55</b> | <b>18</b> | <b>10–67</b> | <b>5</b>  |

\* Сх – о. Сахалин, Пр – Приморский край, Хб – Хабаровский край, Кр – Красноярский край, Ал – Республика Алтай, Нв – Новосибирская область, Тм – Томская область, Мс – г. Москва. Жирный шрифт отражает регионы инвазийного ареала. В колонках пределы варьирования встречаемости указаны для регионов, в которых исследовали 2 и более популяций короёда.

\*\* Частота встречаемости грибов из рода *Leptographium* представлена в таблице без деления на виды, но в сахалинской популяции подразумевается *L. taigense*, а в красноярских популяциях – *L. sibiricum*.

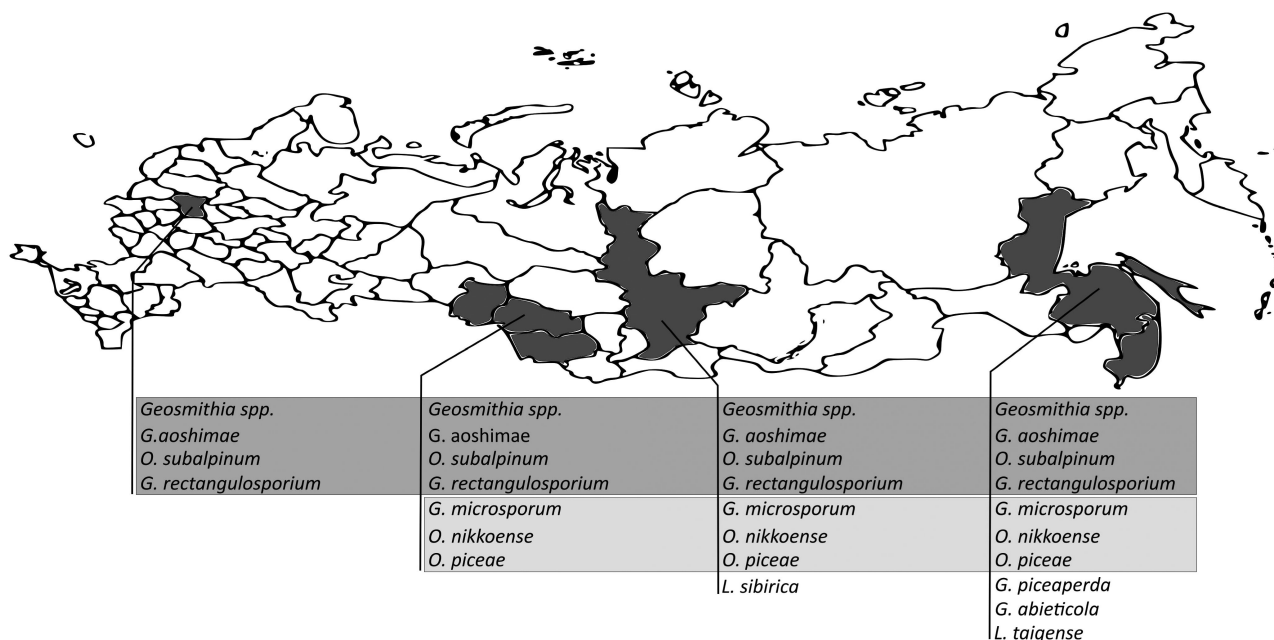
ким характеристикам соответствовали грибу *L. sibiricum* K. Jacobs & M.J. Wingfield, который входит в *L. procerum*-комплекс [de Beer et al., 2013]. Анализ генетических последовательностей ITS2 указал на соответствие изучаемых культур типовому виду упомянутого комплекса – *L. procerum* (W.B. Kendr.) M.J. Wingf. (рис. 1). Учитывая это, для морфотипа VIII в данной статье принято обозначение *L. sibiricum*. Культур, происходящие с о. Сахалин (номера 1473 и 1474), на основании генетического анализа были идентичны виду *L. taigense* (рис. 1).

Грибы, объединённые в морфотип X (табл. 3), не относятся к офиостомовым грибам. Они обратили на себя внимание частым и обильным присутствием в изучаемых образцах. Это поднимало их статус, подобно офиостомовым грибам, до уровня постоянного компонента микобиоты, связанной с уссурийским полиграфом. Генетические исследования указали на принадлежность этих грибов к роду *Geosmithia* Pitt. (*Insertae sedis*, *Hypocreales*, *Hypocreomycetidae*, *Sordariomycetes*, *Pezizomycotina*, *Ascomycota*). ДНК-последовательности двух изученных культур (номера 1242 и 1441) были

наиболее близки, но не идентичны, последовательностям ITS2 вида *G. putterillii* (95% и 93% сходства нуклеотидных последовательностей, соответственно) (рис. 1). Не исключено, что микоассоцианты уссурийского полиграфа из рода *Geosmithia* могут являться новыми видами.

Частота встречаемости грибов в исследуемых популяциях уссурийского полиграфа представлена в таблице 4. Гриб *G. aoshimae* характеризовался высокой частотой встречаемости (40% и более) и был отмечен во всех исследованных популяциях полиграфа. Грибы из рода *Graphilbum* и *O. subalpinum* были отмечены почти во всех партиях образцов, однако их встречаемость была ниже, чем у *G. aoshimae*. В отличие от упомянутых видов, *G. piceaperda*, *O. nikkoense* и *O. picea* характеризовались ещё более низким уровнем встречаемости и были зарегистрированы, главным образом, в образцах из естественного ареала *P. proximus* (рис. 2). Грибы из рода *Geosmithia* демонстрировали достаточно высокий уровень встречаемости в инвазийном ареале полиграфа, но в естественном ареале вредителя они были обнаружены





**Рис. 2.** Видовое разнообразие грибов, ассоциированных *P. proximus* в различных частях его современного ареала в России.

только в Хабаровском крае (табл. 4). Находки грибов из рода *Leptographium* были приурочены к конкретным регионам: *L. taigense* – о. Сахалин, *L. sibiricum* – некоторые популяции полиграфа в Красноярском крае.

В полевых тестах только два вида – *G. aoshimae* и *L. sibiricum* – продемонстрировали фитопатогенную активность как на пихте, так и на лиственнице: некрозы, сформировавшиеся после инокуляции стволов мицелием этих грибов, достоверно превышали контроль (рис. 3). Способность распространяться во флоэме живых деревьев показали также культуры *O. nikkoense* (пихта) и *O. subalpinum* (лиственни-

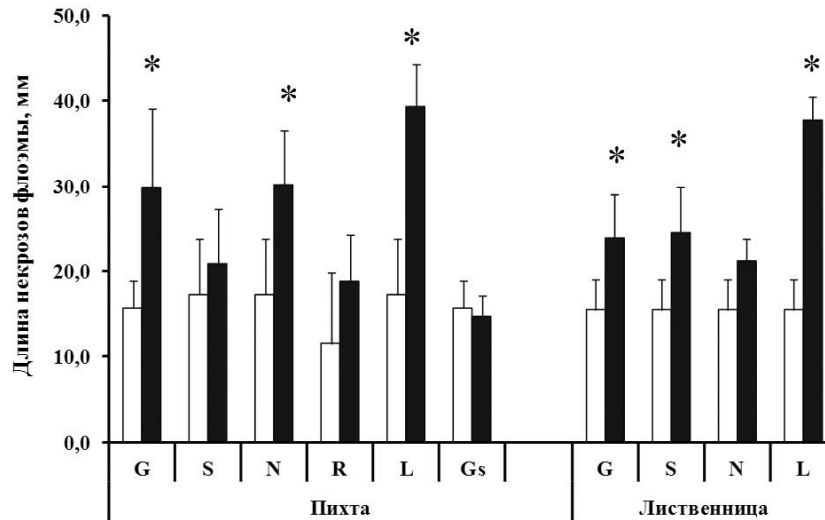
ца). Остальные исследуемые культуры грибов вызывали небольшие некрозы (около 20 мм в длину), чье достоверное отличие от контрольных некрозов не подтвердилось (рис. 3).

Фитопатогенные свойства *G. aoshimae* и *L. sibiricum*, как наиболее агрессивных грибов среди ассоциантов уссурийского полиграфа, были проверены на представителях всех видов хвойных в южносибирских лесах. Самые большие некрозы (длина от 30 до 50 мм) были отмечены на деревьях пихты и лиственницы сибирской (табл. 5). Меньшие некрозы (средняя длина – не более 20 мм), но достоверно превышающие контроль, исследуемые культу-

**Таблица 5.** Длина некрозов флоэмы ( $\bar{x} \pm \sigma$ , мм), после инокуляции стволов хвойных культурами наиболее агрессивных грибов-ассоциантов уссурийского полиграфа в его инвазийном ареале (Контроль – средняя длина некрозов после механического поранения без инокуляции, опыт – средняя длина некрозов после инокуляции мицелием грибов)

| Виды хвойных          | Виды грибов (обозначение культуры)       |            |  |           |
|-----------------------|--|------------|--|-----------|
|                       | <i>Grosmannia aoshimae</i><br>(ash 1007) |            | <i>Leptographium sibiricum</i><br>(deg 1113) |           |
|                       | контроль                                 | опыт       | контроль                                     | опыт      |
| Пихта сибирская       | 17.3±6.5                                 | 42.8±14.9* | 17.3±6.5                                     | 39.4±4.9* |
| Лиственница сибирская | 15.5±3.6                                 | 23.8±5.2*  | 15.5±3.6                                     | 37.7±2.8* |
| Сосна обыкновенная    | 10.0±1.0                                 | 20.0±5.5*  | 10.0±1.0                                     | 19.4±5.7* |
| Ель сибирская         | 11.0±1.9                                 | 13.8±2.3   | 11.0±1.9                                     | 15.2±2.3  |
| Кедр сибирский        | 18.3±2.4                                 | 19.8±1.5   | 18.3±2.4                                     | 25.0±9.9  |

\* Достоверное отличие от контроля по критерию Манна – Уитни при  $P \leq 0.05$ .



**Рис. 3.** Средние размеры длины некрозов флоэмы после инокулирования стволов пихты сибирской и лиственницы сибирской мицелием грибов-ассоциантов *P. proximus* в его инвазийном ареале: G – *Grosmannia aoshimae*, S – *Ophiostoma subalpinum*, N – *O. nikkoense*, R – *Graphilbum rectangulosporium*, L – *Leptographium sibiricum*, Gs – *Geosmithia* sp. (Контроль – светлые, опыт – темные столбики. \* – достоверное отличие контроля и опыта по критерию Манна – Уитни при  $P \leq 0.05$ ).

ры вызывали во флоэме сосны обыкновенной. На ели и кедре сибирском некрозы после инокулирования были малы и не отличались от последствий механического поранения (контроля) (табл. 5).

### Обсуждение результатов

При анализе полученных данных следует учитывать, что не все регионы были представлены в работе равными выборками, включающими одинаковое количество исследованных популяций уссурийского полиграфа. Кроме того, на полноту выявления видового состава грибов могло оказывать влияние и время отбора образцов (стадия развития потомства короеда). Поэтому полученные нами результаты имеют скорее предварительный характер и предполагают необходимость более глубоких исследований для уточнения видового состава.

Большинство обнаруженных нами видов входит в список офиостомовых грибов, связываемых с уссурийским полиграфом в Японии [Masuya et al., 2013]. Судя по уровню встречаемости и обязательному присутствию во всех исследуемых популяциях уссурийского полиграфа, *G. aoshimae* действительно является главным и специфическим ассоциантом этого короеда (табл. 4). Виды *Gra. microcar-*

*prum*, *Gra. rectangulosporium* и *O. subalpinum* также представляются постоянными компонентами комплекса офиостомовых грибов, распространяемых полиграфом в инвазийном ареале (табл. 4). *G. europheoides*, *O. nikkoense* и *O. picea*, похоже, относятся к так называемым случайным видам, которые присутствуют в ходах ксилофагов нерегулярно и с низкой частотой встречаемости [Gibbs, 1999].

Согласно данным таблицы 4, наибольшее разнообразие видов офиостомовых грибов в популяциях полиграфа было отмечено в дальневосточных регионах (первичный ареал короеда) и Красноярском крае (инвазийный ареал). Более «бедный» видовой состав грибов в остальных (сибирских и московской) популяциях может объясняться недостаточным количеством исследованного материала, но нельзя исключать, что он отражает также и недавнюю по времени инвазию уссурийского полиграфа в соответствующие регионы РФ.

По мнению японских исследователей, *O. nikkoense* и *Gra. microcarpum*, вместе с *G. abieticola*, являются эндемичными видами на пихтах в Японии [Masuya et al., 2013]. Наши результаты показали, что, по крайней мере, первые два из перечисленных грибов обитают также и на российском Дальнем Востоке в повреж-

дённых *P. proximus* тканях пихт белокорой и сахалинской (табл. 4). Инвазия уссурийского полиграфа дала возможность его грибным ассоциантам продвинуться в западном направлении и освоить ещё один вид растения-хозяина – пихту сибирскую. На общем фоне скудной информации по офиостомовым грибам, связанным с вредителями хвойных в России, юг Красноярского края представляет исключение. На этой территории уже более 20 лет проводятся исследования офиостомовых грибов. В частности, в 1990-е гг. активно изучались грибы, заносимые в стволы пихты сибирской аборигенным вредителем – чёрным пихтовым усачом [Пашенова и др., 1994, 1998]. И хотя идентификацию микоассоциантов усача выполняли по морфологическим характеристикам, нет никаких оснований полагать, что грибы, рассматриваемые в настоящей работе как ассоцианты *P. proximus*, присутствовали в заметном количестве на территории Сибири до регистрации широкомасштабных вспышек этого короеда.

Следует особо остановиться на находках грибов, неизвестных ранее в микокомплексе уссурийского полиграфа: представителей родов *Leptographium* и *Geosmithia*. В Японии грибы из рода *Leptographium* (исключая несовершенные стадии развития грибов рода *Grossmannia*) не упоминались в связи с *P. proximus* [Masuya et al., 2013]. Поэтому довольно неожиданным выглядело обнаружение *L. taigense* в образцах с о. Сахалин. *L. taigense* – малоизученный вид, который был обнаружен не так давно в Фенноскандии, в гнёздах короеда-типографа и вредителей сосны, на *Picea abies* и *Pinus sylvestris*, соответственно [Linnakoski et al., 2012]. Связи вида *L. taigense* с представителями рода *Abies* и их вредителями в литературе не отмечены. Учитывая, что изучаемые нами культуры по данным генетического анализа показали идентичность с видом *L. taigense* (рис. 1), очевидно, что связи этого вида с переносчиками и хозяевами нуждаются в дальнейшем исследовании.

Обнаружение грибов *L. procerum*-комплекса в некоторых популяциях *P. proximus* в Красноярском крае выглядит более ожидаемо. Как упоминалось выше, аборигенным вредителем пих-

ты сибирской на этой территории является чёрный пихтовый усач, в состав микобиоты которого входит специфические фитопатогенные ассоцианты: *L. sibiricum* [Jacobs et al., 2000] и неидентифицированный гриб, близкий к комплексу *O. minus* [Пашенова и др., 1994]. Морфология «красноярских» *Leptographium*-изолятов, полученных из гнёзд уссурийского полиграфа, показала их сходство с грибом *L. sibiricum*, входящим в *L. procerum*-комплекс [de Beer et al., 2013]. Установленная идентичность ITS2-последовательностей гриба *L. procerum* и сибирских *Leptographium*-изолятов (рис. 1) не опровергает принадлежности последних к виду *L. sibiricum*, так как показана невозможность разграничения видов внутри *L. procerum*-комплекса на основании анализа ITS2-LSU области [Yin et al., 2015]. Это даёт основания для предположений о том, что в гнёздах полиграфа обнаружен именно *L. sibiricum*. Кроме того, в Красноярском крае мы отмечаем единичные случаи заселения одного и того же дерева жуками усача и полиграфа и «перекрытие» зон распространения мицелия их грибов-ассоциантов в коре хозяина: перитеции *G. aoshimae* обнаруживали на кормовых площадках личинок усача, а в гнёздах полиграфа наблюдали конидиеносцы *Leptographium*- и *O. minus*-типа. Такая «пространственная близость» позволяет предположить, что автохтонный и инвазийный вредители пихты могут обмениваться своими микоассоциантами. Следует добавить, что присутствующий, как случайный вид, в красноярских и томских популяциях уссурийского полиграфа гриб *O. piceae* (табл. 4) также может иметь «сибирское» происхождение, поскольку показана его связь с чёрным пихтовым усачом на пихте сибирской [Пашенова и др., 2009].

Грибы рода *Geosmithia* не так давно привлекли к себе внимание исследователей и продолжают оставаться малоизученными объектами. Хотя некоторые виды обнаружены в почве, древесине, пищевых продуктах, могут присутствовать в качестве эндофитов на здоровых растениях, большинство грибов этого рода облигатно или факультативно связано с короедами [Kolarik et al., 2008]. Непонятны механизмы энтомохории этих грибов, формирующих

обильные массы сухих гидрофобных конидий, их значение для насекомых, их роль в составе микобиоты, связанной с переносчиком. Пока имеется мало сведений о принадлежности единичных видов рода *Geosmithia* к амброзиевым грибам – облигатным симбионтам жуков-ксилофагов, которые обеспечивают полноценное питание потомству переносчика [Kolarik, Kirkendall, 2010]. Масштабные исследования грибов этого рода, связанных с короедами на листовенных породах, были предприняты в Европе [Kolarik et al., 2008]. Сведения о представителях рода *Geosmithia* на хвойных породах малочисленны, но имеющиеся данные подтверждают различия комплексов *Geosmithia* spp., связанных с короедами на хвойных и листовенных видах [Kolarik et al., 2008].

Несмотря на упомянутый выше, более чем 20-летний период изучения грибов, связанных с вредителями основных хвойных пород в Центральной Сибири, грибы рода *Geosmithia* не привлекали до сих пор внимания в этом регионе. Можно утверждать, что эти грибы, если и присутствовали ранее в изучаемом нами материале, то были представлены скудно и нерегулярно (в отличие от гнёзд уссурийского полиграфа), не производя впечатления значимого компонента. Так или иначе, полученные нами результаты – это первое свидетельство обнаружения *Geosmithia* spp. в составе микобиоты короедов на хвойных в России.

Анализ литературы и полученные нами результаты позволяют предположить, что комплекс грибов, связанный с уссурийским полиграфом на Дальнем Востоке, после попадания в новые регионы в результате инвазии переносчика претерпевает, по крайней мере, качественные изменения в ходе адаптации к новым условиям. Успешная адаптация насекомого-переносчика в инвазийном ареале не означает, что все привнесённые им организмы также достигнут статуса успешного инвайдера, хотя вероятность этого достаточно высока, учитывая эволюционно закреплённую общность экологической ниши насекомого-хозяина и его ассоциантов.

Как следует из наших данных, связь «*P. proximus* – *G. aoshimae*» (прямая или опосре-

дованная, например, через форезирующих клещей или нематод) является сильной, и данный микоассоциант продолжает в инвазийном ареале занимать доминирующее положение в грибном сообществе гнёзд полиграфа. Вероятно, успешно адаптировались к новым условиям виды *Gra. microcarpum*, *Gra. rectangulosporium* и *O. subalpinum*. Как уже упоминалось, в Японии эти грибы, предположительно, являются общими для нескольких видов короедов, поселяющихся на деревьях рода *Abies*. В ходе совместной колонизации деревьев происходит постоянный «обмен» видами грибов между вредителями. В новом ареале микобиота, связанная с уссурийским полиграфом, лишилась такой «подпитки» со стороны сопутствующих короедов, но встречаемость упомянутых грибов в инвазийных популяциях *P. proximus* продолжает оставаться на достаточно высоком уровне. По-видимому, *Gra. microcarpum*, *Gra. rectangulosporium*, *O. subalpinum*, а также грибы из рода *Geosmithia*, не только хорошо адаптировались в новых условиях, но, возможно, перешли в категорию постоянных компонентов микобиоты, связанной с *P. proximus*.

Ещё одно изменение видового состава микоассоциантов полиграфа – появление в его «красноярских» популяциях грибов, очень похожих на вид *L. sibiricum* – вероятно, обусловлено его прямым контактом с аборигенным вредителем пихты сибирской – чёрным пихтовым усачом *M. urussovi* Fisch. При совместном поселении на одном и том же дереве возможно проникновение мицелия грибов, переносимых аборигенным вредителем, в зоны питания потомства уссурийского полиграфа. В результате, отродившиеся молодые жуки будут нести на экзоскелете конидии и аскоспоры микоассоциантов усача.

Интересно, что, согласно проведённому мониторингу микобиотических ассоциантов *P. proximus*, наблюдается тенденция к снижению их видового разнообразия по направлению от исходного ареала жука на запад его инвазийного ареала (рис. 2). Эта тенденция совпадает с направлением расселения данного вредителя и коррелирует с показанным ранее умень-

шением генетического разнообразия самого короеда-переносчика *P. proximus* в популяциях инвазийного ареала по сравнению с генетическим разнообразием популяций исходного дальневосточного ареала жука [Konofov et al., 2016].

Предварительная оценка фитопатогенных свойств грибов-ассоциантов уссурийского полиграфа в его инвазийном ареале показала, что наибольший интерес в этом отношении представляют грибы *G. aoshimae* и *L. sibiricum*. Культуры этих видов вызвали большие некрозы, достоверно отличающиеся от контроля, в стволах пихты, лиственницы и сосны (рис. 3, табл. 5). Обращает на себя внимание, что средние значения длины некрозов, вызванных *L. sibiricum*, были близки на пихте и лиственнице и в обоих случаях даже несколько превосходили соответствующие показатели культур *G. aoshimae* (рис. 3). Это соответствует предположению о возможной принадлежности *L. sibiricum* к автохтонной (сибирской) микобиоте. Учитывая повсеместное распространение и высокую частоту встречаемости в инвазийных популяциях полиграфа, именно *G. aoshimae* претендует на роль самого опасного фитопатогена в новом ареале короеда.

В дополнительной проверке нуждаются виды *O. nikkoense* и *O. subalpinum*, мицелий которых при искусственном заражении послужил причиной достаточно больших некрозов флоэмы пихты и лиственницы, соответственно (рис. 3). Для грибов *G. aoshimae* и *O. subalpinum* подтверждены фитопатогенные свойства в отношении некоторых видов пихт в Японии [Yamaoka et al., 2004b], но о проявлении агрессивности гриба *O. nikkoense* данные отсутствуют, и его фитопатогенные свойства требуют дополнительных исследований.

Выполненные тесты показали, что пихта сибирская являлась самой чувствительной к фитопатогенным офиостомовым грибам, обнаруженным в инвазийных популяциях уссурийского полиграфа. Кроме того, при искусственном заражении эти грибы были способны распространяться во флоэме лиственницы сибирской и, в меньшей степени, сосны обыкновенной (табл. 5). В этой связи необходимо

отметить, что возможность развития уссурийского полиграфа на отрубках лиственницы, кедра и ели сибирских была подтверждена лабораторными экспериментами [Керчев, 2012], а в естественных условиях отмечали единичные поселения этого вредителя на умирающих и буреломных стволах и ветвях ели и кедра сибирских, сосны обыкновенной [Керчев, 2014]. По мнению И.А. Керчева [2014], пихта сибирская, скорее всего, и впредь останется основной кормовой породой уссурийского полиграфа в инвазийном ареале, но приводимые им факты указывают на возможный путь попадания грибов, связанных с полиграфом (*G. aoshimae*, в том числе), в состав аборигенных микоассоциаций и их распространение на другие виды хвойных уже за счёт аборигенных стволовых вредителей. Все это свидетельствует о необходимости включения офиостомовых грибов, занесённых уссурийским полиграфом с Дальнего Востока, в список объектов фитопатологического мониторинга в хвойных лесах РФ, и более тщательной проверки их агрессивности в отношении основных лесообразующих пород Сибири и европейской части России.

### Выводы

Полученные данные позволяют сделать следующие выводы:

1). В ходе инвазии с Дальнего Востока уссурийский полиграф занес на территорию Сибири новые виды офиостомовых грибов, часть которых адаптировалась к условиям инвазийного ареала и образовала ядро микобиоты, связанной с вредителем.

2). Появление в сибирских популяциях уссурийского полиграфа грибов, связываемых ранее с чёрным пихтовым усачом, указывает на идущую трансформацию комплекса микоассоциантов этого короеда-инвайдера во вторичном ареале.

3). Среди лесообразующих хвойных видов Южной Сибири устойчивость к фитопатогенным ассоциантам уссурийского полиграфа проявили ель сибирская и кедр сибирский. Восприимчивыми видами являлись сосна обыкновенная и лиственница сибирская, са-

мый неустойчивый вид – пихта сибирская.

4). Наиболее важным фитопатогенным ассоциантом уссурийского полиграфа в инвазийном ареале является гриб *G. aoshimae*, присутствующий с высокой частотой встречаемости во всех инвазийных популяциях переносчика и проявляющий фитопатогенные свойства не только в отношении здоровых деревьев основной кормовой породы – пихты сибирской, но и в отношении лиственницы сибирской и сосны обыкновенной.

5). Дополнительной проверки требует фитопатогенная активность грибов *O. subalpinum*, чьи фитопатогенные свойства уже отмечены в дальневосточном регионе, и *O. nikkoense*.

### Благодарности

Авторы выражают благодарность за помощь в сборе образцов для микологического анализа Ю.И. Гниненко, М.С. Ключину и Е.А. Чилахсаевой (ВНИИЛМ, г. Пушкино), С.А. Кривец и И.А. Керчеву (ИМКЭС СО РАН, г. Томск), Д.А. Демидко (Институт леса ФИЦ КНЦ СО РАН, г. Красноярск), Г.И. Юрченко (ДальНИИЛХ, г. Хабаровск), Л.Г. Серой (ФГБУ ВНИИФ, Большие Вязёмы). За помощь в проведении полевой оценки фитопатогенной активности грибных культур авторы благодарят Д.А. Демидко и В.М. Петько (Институт леса ФИЦ КНЦ СО РАН, г. Красноярск). Работа частично поддержана грантами РФФИ № 14-04-01235 и 17-04-01765, а также бюджетным проектом “Генетические основы биотехнологий и биоинформатика” № 0324-2026-0008.

### Литература

- Баранчиков Ю.Н. Инвазии дендрофильных насекомых – источник хозяйственных проблем и полигон для эколого-эволюционных исследований // В сб.: Экологические и экономические последствия инвазий дендрофильных насекомых. Мат. Всерос. конференции / Под ред. Ю.Н. Баранчикова. Красноярск: ИЛ СО РАН, 2012. С. 6–11.
- Баранчиков Ю.Н., Петько В.М., Астапенко С.А., Акулов Е.Н., Кривец С.А. Уссурийский полиграф – новый агрессивный вредитель пихты в Сибири // Лесной вестник. 2011. Т. 80. № 4. С. 78–81.
- Керчев И.А. Экспериментальное исследование возможности возникновения новых трофических связей полиграфа уссурийского *Polygraphus proximus* Blandf. (Coleoptera: Curculionidae, Scolytinae) в Западной Сибири // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2012. № 3 (19). С. 169–177.
- Керчев И.А. Экология полиграфа уссурийского *Polygraphus proximus* Blandford (Coleoptera; Curculionidae, Scolytinae) в Западно-Сибирском регионе инвазии // Российский журнал биологических инвазий. 2014. № 2. С. 80–95.
- Кривец С.А., Керчев И.А., Бисирова Э.М. и др. Уссурийский полиграф в лесах Сибири. Томск; Красноярск: Изд-во «УМИУМ», 2015. 48 с.
- Мандельштам М.Ю., Поповичев Б.Г. Аннотированный список видов короедов (Coleoptera, Scolytidae) Ленинградской области // Энтомологическое обозрение. 2000. Т. 79. № 3. С. 599–618.
- Пашенова Н.В., Баранчиков Ю.Н. К идентификации *Grosmannia aoshimae* – специфичного грибного ассоцианта уссурийского полиграфа // Лесной Вестник. 2013. Т. 98. № 6. С. 106–111.
- Пашенова Н.В., Вишнякова З.В., Ветрова В.П. Структурные изменения микобиоты коры и древесины хвойных в связи с их дефолиацией сибирским шелкопрядом и заселением стволовыми вредителями // Лесоведение. 1998. № 4. С. 11–19.
- Пашенова Н.В., Выдрякова Г.А., Ветрова В.П. Фитопатогенные микромицеты, ассоциированные с чёрным пихтовым усачом // Лесоведение. 1994. № 3. С. 39–47.
- Пашенова Н.В., Полякова Г.Г., Афанасова Е.Н. Изучение грибов синевы древесины в хвойных лесах Центральной Сибири // Хвойные бореальной зоны. 2009. Т. 26. № 1. С. 22–28.
- Рунион Р.П. Справочник по непараметрической статистике: современный подход. М.: Финансы и статистика, 1982. 198 с.
- Серая Л.Г., Пашенова Н.В., Мухина Л.Н., Дымович А.В., Александрова М.С., Баранчиков Ю.Н. Повреждаемость видов рода *Abies* Mill. в коллекции Главного ботанического сада РАН уссурийским полиграфом *Polygraphus proximus* Bland. и его грибными ассоциантами // В сб.: Лесные биогеоценозы бореальной зоны: география, структура, функции, динамика: Мат. Всерос. конференции / Ред. Ю.Н. Баранчиков и др. Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2014. С. 652–655.
- Старк В.Н. Фауна СССР: Жесткокрылые. Т. 31. Короеды. М.; Л.: Изд. АН СССР, 1952. 462 с.
- Центр коллективного пользования «Геномика» СО РАН, Новосибирск (Электронный ресурс) // (<http://sequest.niboch.nsc.ru>). Проверено 20.01.2017 г.
- Чилахсаева Е.А. Первая находка *Polygraphus proximus* Blandford, 1894 (Coleoptera, Scolytidae) в Московской области // Бюлл. Моск. общ. испыт. природы. Отд. биол. 2008. Т. 113. № 6. С. 39–42.
- De Beer Z.W., Seifert K.A., Wingfield M.J. A nomenclator for ophiostomatoid genera and species in the Ophiostomatales and Microascales // The Ophiostomatoid Fungi: Expanding Frontiers. CBS Biodiversity Series 12 / Eds. K.A. Seifert, Z.W. de Beer, M.J. Wingfield. Utrecht:

- CBS–KNAW Fungal Biodiversity Centre, 2013. P. 245–322.
- Desprez-Loustau M-L., Robin C., Buee M., Courtecuisse R., Garbaye J., Suffert F., Sacle I., Rizzo D.M. The fungal dimension of biological invasions // *TRENDS in Ecology and Evolution*. 2007. Vol. 22. No. 9. P. 472–480.
- Edgar R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput // *Nucleic acids research*. 2004. Vol. 32. No. 5. P. 1792–1797.
- Gibbs J.N. The biology of Ophiostomatoid fungi causing sapstain in trees and freshly cut logs // *Ceratocystis and Ophiostoma*. Taxonomy, Ecology and Pathogenicity / Eds. M.J. Wingfield, K.A. Seifert, J.F. Webber. St. Paul: APS PRESS, 1999. P. 153–160.
- Guindon S., Dufayard J.F., Lefort V., Anisimova M., Hordijk W., Gascuel O. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0 // *Systematic biology*. 2010. Vol. 59. No. 3. P. 307–321.
- Jacobs K.M., Wingfield M.J., Pashenova N.V., Vetrova V.P. A new *Leptographium* species from Russia // *Mycological Research*. 2000. No. 104. P. 1524–1529.
- Kolarik M., Kirkendall L.R. Evidence for a new lineage of primary ambrosia fungi in *Geosmithia* Pitt (Ascomycota: Hypocreales) // *Fungal Biology*. 2010. Vol. 114. No. 8. P. 676–689.
- Kolarik M., Kubatova A., Hulcr J., Pazoutova S. *Geosmithia* fungi are highly diverse and consistent bark beetle associates: evidence from their community structure in temperate Europe // *Microbial Ecology*. 2008. Vol. 55. No. 1. P. 65–80.
- Kononov A., Ustyantsev K., Blinov A., Fet V., Baranchikov Y.N. Genetic diversity of aboriginal and invasive populations of four-eyed fir bark beetle *Polygraphus proximus* Blandford (Coleoptera, Curculionidae, Scolytinae) // *Agricultural and Forest Entomology*. 2016. Vol. 18. No. 3. P. 294–301.
- Linnakoski R., Z. Wilhelm de Beer, Pekka Niemelä, Wingfield M.J. Associations of Conifer-Infesting Bark Beetles and Fungi in Fennoscandia // *Insects*. 2012. No. 3. P. 200–227.
- Masuya H., Yamaoka Y., Wingfield M.J. Ophiostomatoid fungi and their associations with bark beetles in Japan // *The Ophiostomatoid Fungi: Expanding Frontiers*. CBS Biodiversity Series 12 / Eds. K.A. Seifert, Z.W. de Beer, M.J. Wingfield. Utrecht: CBS–KNAW Fungal Biodiversity Centre, 2013. P. 77–89.
- Ohtaka N., Masuya H., Kaneko S., Yamaoka Y. Two *Ophiostoma* species associated with bark beetles in wave-regenerated *Abies veitchii* forests in Japan // *Mycosciense*. 2002. No. 43. P. 151–157.
- Ohtaka N., Masuya H., Yamaoka Y., Kaneko S. Two new *Ophiostoma* species lacking conidial states isolated from bark beetles and bark beetle-infested *Abies* species in Japan // *Canadian Journal of Botany*. 2006. No. 84. P. 282–293.
- Schoch C.L., Seifert K.A., Huhndorf S., Robert V., Spouge J.L., Levesque C.A. et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2012. No. 109. P. 6241–6246.
- Six D.L., Wingfield M.J. The role of phytopathogenicity in bark beetle – fungus symbiosis: a challenge to the classic paradigm // *Annual Review of Entomology*. 2010. No. 56. P. 255–272.
- Solhiem H. Pathogenicity of some *Ips typographus*-associated blue-stain fungi to Norway spruce // *Meddelelser fra Norsk Institutt for skogforskning*. 1988. No. 14. P. 1–11.
- Tokuda M., Shoubu M., Yamaguchi D., Yukawa J. Defoliation and dieback of *Abies firma* (Pinaceae) trees caused by *Parendaeus abietinus* (Coleoptera: Curculionidae) and *Polygraphus proximus* (Coleoptera: Scolytidae) on Mount Unzen // *Applied Entomology and Zoology*. 2008. Vol. 43. No. 1. P. 1–10.
- Whitney H.S. Relationships between bark beetles and symbiotic organisms // *Bark Beetles in North American Conifers* / Eds. J.B. Mitton, K.B. Sturgeon. Austin: Texas, USA: University of Texas Press, 1982, P. 183–211.
- Yamaoka Y., Masuya H., Ohtaka N., Goto H., Kaneko S., Abe J.P. Three new *Ophiostoma* species with *Pesotum* anamorphs associated with bark beetles infesting *Abies* species in Nikko, Japan // *Mycoscience*. 2004a. No. 45. P. 277–286.
- Yamaoka Y., Masuya H., Ohtaka N., Goto H., Kaneko S., Kuroda Y. *Ophiostoma* species associated with bark beetles infesting three *Abies* species in Nikko, Japan // *Journal of Forestry Research*. 2004b. No. 9. P. 67–74.
- Yin M., Duong T.A., Wingfield M.J., Zhou X.D., de Beer Z.W. Taxonomy and phylogeny of the *Leptographium* procerum complex, including *Leptographium sinense* sp. nov. and *Leptographium longiconidiophorum* sp. nov // *Antonie van Leeuwenhoek*. 2015. Vol. 107. No. 2. P. 547–563.

# OPHIOSTOMATOID FUNGI ASSOCIATED WITH THE FOUR EYED FIR BARK BEETLE ON THE TERRITORY OF RUSSIA

© 2017 Pashenova N.V.<sup>a,\*</sup>, Kononov A.V.<sup>b</sup>, Ustyantsev K.V.<sup>b</sup>, Blinov A.G.<sup>b</sup>,  
Pertsovaya A.A.<sup>a</sup>, Baranchikov Yu.N.<sup>a,\*\*</sup>

<sup>a</sup> Sukachev Institute of Forest SB RAS, FRC KSC SB RAS,  
Krasnoyarsk, 660036, Akademgorodk, 50/28

<sup>b</sup> FRC Institute of Cytology and Genetics SB RAS,  
Novosibirsk 630090, prospect Lavrentyeva, 10;  
e-mail: \*[pasnat@ksc.krasn.ru](mailto:pasnat@ksc.krasn.ru), \*\*[baranchikov-yuri@yandex.ru](mailto:baranchikov-yuri@yandex.ru)

The study is connected with ophiostomal fungi, associated with the four eyed fir bark beetle (*Polygraphus proximus* Blandford, Coleoptera, Curculionidae) – an invasive pest of Siberian fir *Abies sibirica*. At the Russian Far East 8 fungal species are associated with this bark beetle. We found that all those fungi (but *Leptographium taigense* and *Grosmannia europhioides*) were brought by *P. proximus* to its secondary range (Southern Siberia and Moscow oblast). At the secondary range a complex of ophiostomal fungi, connected with *P. proximus* consists mainly of the Far Eastern species, adapted to new habitats. Phytopathogenic activity of bark beetle associated fungi was studied. *G. aoshimae* and *Ophiostoma nikkoense* demonstrated high phytopathogenic activity after inoculation into phloem of Siberian fir. Culture of *G. aoshimae* and *O. subalpinum* produced large necroses in stems of Siberian larch *Larix sibirica*. In general *G. aoshimae* is the main mycoassociate of *P. proximus* based on frequency and stability of its occurrence in samples and on its aggressiveness towards coniferous species of Southern Siberia. It demonstrated high aggressiveness towards Siberian fir and Siberian larch; Scots pine *Pinus sylvestris* is also susceptible to this fungus. Siberian spruce *Picea obovata* and Siberian pine *Pinus sibirica* are resistant. There is a high possibility of *P. proximus* mycobiota enrichment with a complex of fungi, connected with fir sawyer beetle *Monochamus urussovi* Fisch., an aboriginal pest of fir in Siberia.

**Key words:** ophiostomatoid fungi, invasion, *Polygraphus proximus*, conifers, Southern Siberia.