

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

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Новосибирск 2019

Работа выполнена в лаборатории молекулярно-генетических систем Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения российской академии наук», г. Новосибирск.

**Научный
руководитель:**

Блинов Александр Геннадьевич
к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярно-генетических систем ФГБНУ «ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН», г. Новосибирск

**Официальные
оппоненты:**

Агафонов Александр Викторович
д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории интродукции редких и исчезающих видов растений ФГБУН «Центральный сибирский ботанический сад СО РАН», г. Новосибирск

Легалов Андрей Александрович
д.б.н., заведующий лабораторией филогении и фауногенеза ФГБУН «Институт систематики и экологии животных СО РАН», г. Новосибирск

Ведущее учреждение: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук, г. Иркутск

Защита диссертации состоится «___» _____ 2019 г. на утреннем заседании диссертационного совета Д 003.011.01 на базе ФГБНУ «ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН» в конференц-зале Института по адресу:
пр. академика Лаврентьева 10, г. Новосибирск, 630090
тел: +7(383) 363-49-06 (1321); e-mail: dissov@bionet.nsc.ru.
факс: +7(383) 333-12-78

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИЦиГ СО РАН и на сайте Института: www.bionet.nsc.ru.

Автореферат разослан «___» _____ 2019 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

Т.М. Хлебодарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Жуки-короеды совместно с симбиотическими фитопатогенными грибами являются важным элементом лесных экосистем и представляют особый экономический интерес в области лесопользования.

Polygraphus proximus (уссурийский короед) – жук-короед, широко распространённый в восточной части Азии. Его популяции обнаружены на территории Китая, Японии, КНДР и восточной части России. Указанные регионы являются исходным ареалом для вида. В настоящее время посредством инвазии вредитель распространился на территории Европы, а также по Западной и Восточной Сибири [Черпаков, 2014].

Данный вид короедов может заселять стволы различных видов пихты (Род *Abies*) [Старк, 1952]. Жуки формируют гнёзда на заселённых ими деревьях, прогрызая систему камер и ходов в коре и заболони [Керчев, 2014].

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].

В случае инвазии жуков-короедов одним из важнейших биотических факторов, влияющих на успешность поселения и закрепление вредителя на дереве, являются фитопатогенные симбионты. [Vega, Dowd, 2005].

В пределах своего естественного ареала *P. proximus* являлся переносчиком 11-ти видов фитопатогенных грибов из рода *Ophiostoma* [Pashenova, Petko, Baranchikov, 2013]. Под совместным воздействием насекомых-вредителей и фитопатогенов ослабленное дерево быстро погибает [Guérard и др., 2000].

Фитопатогенные грибы рода *Ophiostoma* (Ascomycota) переносятся различными видами короедов и являются факультативными симбионтами [Vega, Dowd, 2005]. Благодаря 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 [Lu и др., 2010].

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 выполнены следующие задачи.

1. Установлены нуклеотидные последовательности генетических маркёров у образцов *P. proximus* из популяций исходного и инвазивного ареалов.

2. Проведён сравнительный анализ генетического разнообразия популяций изучаемого жука-вредителя, в ходе которого установлены межпопуляционные и внутрипопуляционные различия.

3. Установлены нуклеотидные последовательности генетических маркёров у образцов фитопатогенных грибов, ассоциированных с *P. proximus* в популяциях исходного и инвазивного ареалов.

4. Проведён 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*, а генетические исследования этого процесса прежде не проводились. 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. 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.

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 симбиотических сообществах 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 установлении 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. Популяции *P. proximus* в Западной и Восточной Сибири сформированы в ходе двух независимых инвазивных процессов с территориями исходного ареала на Дальнем Востоке, а популяция европейской части страны сформирована под действием множественной инвазии из дальневосточного исходного и западносибирского инвазивного ареала.

2. В ходе инвазии *P. proximus* исходное высокое видовое разнообразие симбиоты жука, включающее виды *O. nikkoense*, *O. microcarpum*, *L. taigense*, *L. sibirica* и представителей рода *Geosmithia*, ранее не отмеченных на исследуемых территориях, снижается до видов *G. aoshimae*, *Gr. rectangulosporium* и *O. subalpinum*, формирующих ядро симбиотического комплекса жука, распространяющихся совместно с короедом в процессе его инвазии.

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 лаборатории 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

2. IXth International Conference in commemoration of 91th anniversary of Professor Nikolai Ilyish Fedorov: Problems of Forest Phytopathology and Mycology, Минск, 2015

Публикации. По теме диссертации было опубликовано 4 научных работы, в том числе 2 статьи в рецензируемых зарубежных журналах входящих в перечень ВАК и международные базы цитирования (WoS, Scopus).

Структура и объём работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, двух глав, посвящённых результатам исследования и их обсуждению, заключения, выводов, списка литературы и приложения. Работа изложена на 102 страницах, содержит 14 рисунков, 8 таблиц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Обзор литературы

В обзоре литературы освещён широкий спектр тем связанных как с объектом исследования, так и с инвазивным процессом в целом. Инвазия рассмотрена с популяционной эволюционной, генетической и экологической точки зрения. Рассмотрены особенности распространения *P. proximus* вдоль территории России. Также описаны методы контроля инвазий. Приведены подробные сведения об экологических особенностях и морфологии *P. proximus* и фитопатогенных грибов ассоциированных с ним. Особое внимание уделено работам о связи короедов и их симбиотических грибов. Рассмотрены методы анализа симбиотических сообществ жука-вредителя с использованием подходов оценки видового разнообразия.

Глава 2. Материалы и методы

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.

Материал для изучения грибов-симбионтов собран в период 2010-2016 гг. на территории Дальнего Востока, в Южной Сибири и европейской части Российской Федерации. Всего микологическому анализу были подвергнуты 303 образца растительных тканей, содержащих ходы уссурийского полиграфа. Из этих образцов изолировали чистые грибковые культуры.

Морфологическую идентификацию грибов выполняли по совокупности культуральных и микроморфологических признаков. 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.

Для изучения генетической variability были секвенированы последовательности митохондриальных генов COI и COII *P. proximus* [Bugrov и др., 2009; Guryev и др., 2001]. Для оценки генетической variability грибковых культур были секвенированы последовательности ДНК-маркёров ITS2 и LSU [Schoch и др., 2012].

На основании идентичности полученных последовательностей с последовательностями из базы данных определялась видовая принадлежность образца. Последовательности анализировались алгоритмом MUSCLE в программе UGENE 1.16, далее производился их филогенетический анализ методом максимального правдоподобия в программе PhyML с использованием aLRT теста для оценки значимости и в программе MrBayes 3.2.5. Для популяционного анализа использовалась программа ARLEQUIN v. 3.11.

Глава 3. Изучение популяций *P. proximus*

Анализ генетического разнообразия *P. proximus*

В первой из каждого образца были конкатенированы и участвовали в сравнительном анализе. На основе данных последовательностей выделено 18 гаплотипов, объединённых в 5 групп. (Рисунок 1). Количество, распространённость и генетическая дисперсия гаплотипов для каждого географического региона отражена в таблице 1.

Группа I, состоящая из трёх гаплотипов, обнаружена в Московской области, Западной Сибири и на Дальнем Востоке (Рисунки 1-2). Группа II включила в себя пять гаплотипов с Дальнего Востока и только один из Московской области (IIЕ). Группа III содержит три гаплотипа с территории

Дальнего Востока. Группа IV, включающая два гаплотипа, обнаружена в Центральной Сибири, на Дальнем Востоке и в Московской области. Наиболее генетически удалённая группа V содержит два гаплотипа, уникальных для японских популяций. 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 2).

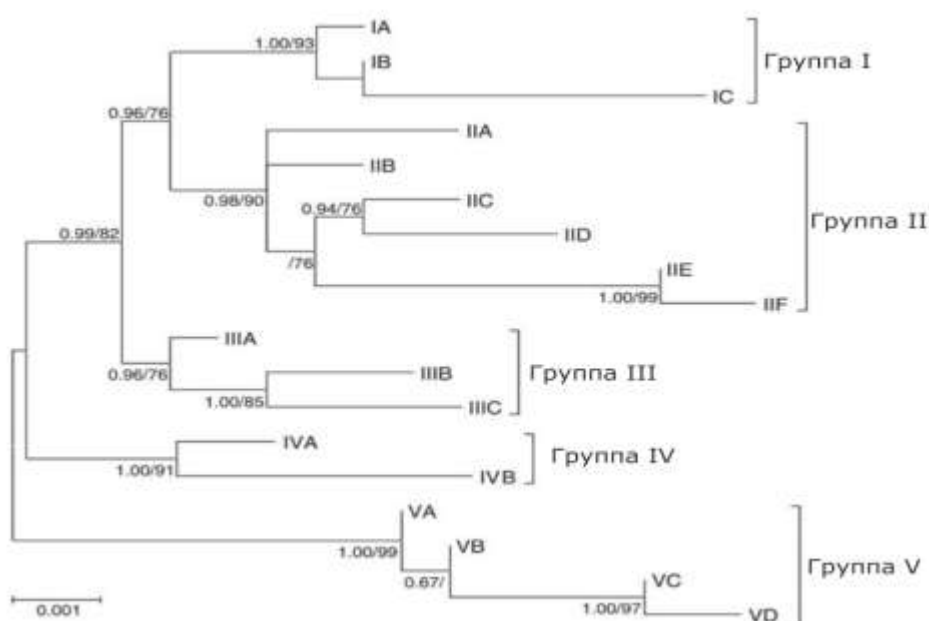


Рисунок 1. Филогенетические взаимоотношения гаплотипов *P. proximus*, реконструированные на основе конкатенированных последовательностей маркеров COI и COII с использованием метода максимального правдоподобия и Байесовского анализа. 5 групп выделены скобками справа. Каждая ветвь на филогенетическом дереве 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 1. Индексы генетического разнообразия популяций *P. proximus*.

Регион	N	K	k	h (\pm SE)	π (\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; π – среднее количество нуклеотидных замен на сайт; SE – стандартная ошибка.

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 (Таблица 1).



Рисунок 2. 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.

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 2). 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 деление гаплотипов на выбранные группы.

Таблица 2. Анализ молекулярной вариации на основе COI и COII маркёров для одной европейской, четырёх западносибирских, двух центральносибирских, четырёх дальневосточных и одной японской популяции.

Источник дисперсии	df	Сумма квадратов	Компоненты дисперсии	Процент дисперсии
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

Генетическая структура популяций *P. proximus*

С помощью молекулярного анализа ДНК-маркёров мы можем сравнить популяции исследуемого ксилофага из исходного и инвазивного ареалов. Природные популяции *P. proximus* на Дальнем Востоке имеют наибольший уровень генетического разнообразия, что подтверждает статус региона, как исходного для *P. proximus* (Рисунок 2).

Японские популяции жука также отличаются высоким уровнем генетической вариабельности. Это говорит о них как об популяциях, развивавшихся независимо от материковых. Популяции Западной и Центральной Сибири 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 IA, IC и IVB присутствуют в исходном ареале. Это говорит об инвазивном происхождении сибирских популяций. Отсутствие общих гаплотипов указывает на независимую интродукцию вредителей в Западную и Центральную Сибирь с территории Дальнего Востока.

Присутствие в европейских популяциях гаплотипов IC и IVA, уникальных для Западной и Центральной Сибири, и гаплотипа IIE из исходного ареала, говорит о факте независимых множественной инвазий из данных регионов. 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*.

Глава 4. Анализ видового состава сообщества симбионтов *P. proximus*

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. Из

образцов были выделены 584 грибковых культуры, относящиеся к 10 морфологическим группам. Ряд культур от каждой морфологической группы участвовал в дальнейшем молекулярно-генетическом анализе. 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 таксономического определения морфотипов. Конкатенированные ДНК-последовательности маркёров ITS2 и LSU для каждой культуры, исследуемой в молекулярном анализе, были использованы для построения филогенетического дерева (Рисунок 3).

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

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

Два образца вошли в базально расположенную ветвь, объединяющую в себе представителей подкласса Нуростеомycetidae. Обе последовательности очень близки, но не идентичны последовательностям вида *Geosmithia putterillii*.

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 3). 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, четвёртой и пятой групп к роду *Grosmannia*.

Группа 1 представлена образцами рода *Ophiostoma*, видами *O. nikkoense*, *O. piceae*, и *O. subalpinum*. Во второй группе располагаются виды *Gr. microcarpum* и *Gr. rectangulosporium*. Третья группа объединяет в своем составе разнообразные виды патогенов входящие в состав рода *Grosmannia*. К ней относятся образцы *G. piceaperda*, *G. aenigmaticum* и *L. sibirica*. Четвертая группа видов на филогенетических деревьях представлена видом *L. taigense*.

Пятая группа включает в свой состав вид *G. aoshimae*. В настоящей работе особое внимание уделено этому виду в связи с его высокой

агрессивностью и высокой частотой встречаемости по всему ареалу *P. proximus* [Pashenova, Petko, Baranchikov, 2013; Yamaoka и др., 2009]. На филогенетических деревьях представлено 26 образцов *G. aoshimae* (на Рисунке 3 показано 11 образцов) из различных регионов России. Все последовательности практически идентичны друг другу по обоим маркерам.

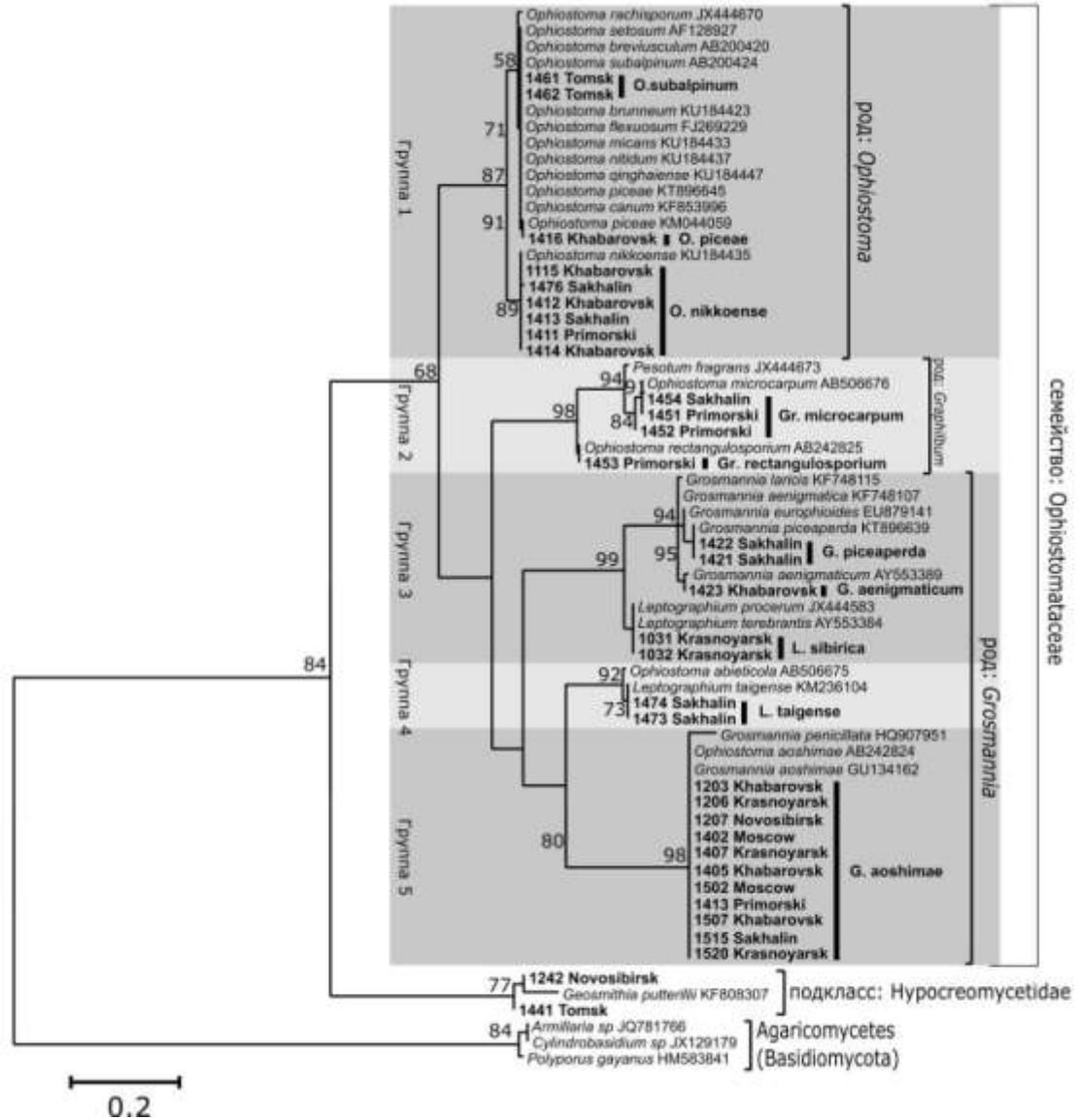


Рисунок 3. Филогенетическое дерево фитопатогенных грибов, построенное на основе конкатенированных последовательностей маркеров ITS2 и LSU методом максимального правдоподобия. Значимость дивергенции каждой отдельной группы отражена коэффициентами aLRT-поддержки [Anisimova, Gascuel, 2006], расположенными 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.

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 4). Данный вид жуков на территории исходного ареала (район Дальнего Востока) обнаруживает симбиотические отношения как минимум с 10 видами грибов.



Рисунок 4. 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 серых блоках. Для каждого региона указано количество образцов растительной ткани, участвовавших в исследовании. Справа от культур указан процент образцов, из которых была выделена данная культура в указанном регионе. В схеме индекс видового разнообразия (индекс Шеннона) для каждого региона указан в голубых овалах. 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.

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. Согласно проведённому мониторингу симбиотических сообществ, можно отметить, что видовое разнообразие симбиоты *P. proximus* в инвазивных популяциях при движении с востока на запад снижается

(Рисунок 4). Это направление совпадает с направлением расселения данного вредителя. Для оценки видового разнообразия использовался индекс Шеннона (Рисунок 4).

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.

Симбиотическое сообщество *P. proximus* может быть описана в терминах α -разнообразия. Видовое богатство симбиоты снижается при движении в сторону инвазии, согласно индексу Маргелефа (Таблица 3). Аналогичную тенденцию показывает индекс полидоминантности, отражающий доминирование отдельных видов в симбиотическом сообществе. Это говорит о смещении разнообразия симбиоты *P. proximus*.

Сохранение уровня выравненности симбиоты в инвазивных популяциях, говорит о том, что уменьшение разнообразия обусловлено снижением только видового богатства, а не изменением частоты встречаемости видов, входящих в симбиоту (Таблица 3).

Таблица 3. Индексы видового разнообразия симбиоты *P. proximus*.

Регионы	Индекс Маргелефа	Индекс полидоминантности	Выровненность (по индексу Симпсона)
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

Согласно данным приведённым на рисунке 5 в ходе инвазии иллюминируются близкородственные виды грибов. В европейских популяциях в симбиоте детектируются только по одному виду из каждого рода изучаемых грибов.

Приведённые выше факты показывают симбиоту жука как конкурентно-равновесное сообщество [May, 1974]. В разрезе настоящего исследования это означает, что изменения в симбиоте *P. proximus* могут быть обусловлены конкурентным исключением видов в ходе изменений условий среды в процессе инвазии.

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. 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 материка совместно с *P. proximus* в процессе недавней инвазии.

Изменение симбиоты в процессе инвазии

Анализ литературы и полученные результаты позволяют предположить, что комплекс грибов, связанный с уссурийским полиграфом на Дальнем Востоке, попавший в новые регионы в результате инвазии переносчика, претерпевает изменения видового состава в ходе адаптации к новым условиям.

Как следует из результатов, связь «*P. proximus* – *G. aoshimae*» является сильной, и этот микоассоциант продолжает занимать доминирующее положение в симбиотическом сообществе (Рисунок 4). Успешно адаптировались к новым условиям виды *Gr. rectangulosporium* и *O. subalpinum*. Их встречаемость в инвазийных популяциях жука остаётся на высоком уровне. Это предполагает, что данные виды, а также грибы из рода *Geosmithia* 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 на белокорой и сахалинской пихт. Инвазия *P. proximus* дала возможность его ассоциантам продвинуться в западном направлении и освоить еще один вид растения-хозяина – пихту сибирскую (*A. sibirica*).

Неожиданным было обнаружение *L. taigense* в образцах с о. Сахалин. Этот вид детектирован в Фенноскандии, в гнездах короеда *Ips typographus* [Linnakoski, Beer, Wingfield, 2012]. Его обнаружение в тканях пихты сахалинской, поврежденной *P. proximus*, свидетельствует о более широком распространении данного фитопатогена, чем считалось ранее.

Нахождение грибов *L. sibirica* в 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 патогены этого вида [Jacobs и др., 2000]. Перекрывание ареалов этих насекомых позволяет предположить, что автохтонный и инвазийный вредители пихты обмениваются своими микоассоциантами.

Грибы рода *Geosmithia* изучены в Северной Америки [Kolařík и др., 2017]. Эти грибы если и присутствовали на данных территориях до инвазии *P. proximus*, то были представлены скудно и нерегулярно, и ускользнули от внимания исследователей. Полученные нами результаты – это первое свидетельство обнаружения *Geosmithia spp.* в составе микобиоты короедов на хвойных деревьях в России.

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. В этом анализе жука идентифицировано 18 гаплотипов, объединенных в 5 групп. 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, а также факт множественной инвазии на территорию европейской части страны из исходных и из инвазивных популяций.

Во второй части работы были исследованы грибные симбионты жука.

Было установлено ядро симбиотического комплекса жука, 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.

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 *P. proximus* на исследуемой территории.

ВЫВОДЫ

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

2. На основании молекулярного анализа ДНК-маркёров 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. Показано, что виды *G. aoshimae*, *Gr. rectangulosporium* и *O. subalpinum* формируют ядро симбиотического комплекса *P. proximus* на исходной территории, и распространяются совместно с этим короедом в процессе его инвазии на новые территории.

4. Показано, что 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.

5. 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*.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

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.
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.