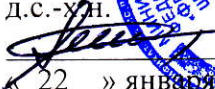


Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР «КРАСНОЯРСКИЙ НАУЧНЫЙ
ЦЕНТР СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»
ИНСТИТУТ ЛЕСА ИМ. В.Н. СУКАЧЕВА – ОБОСОБЛЕННОЕ ПОДРАЗДЕЛЕНИЕ
ФИЦ КНЦ СО РАН
(ИЛ СО РАН)

УДК 57.04

Рег. № НИОКТР АААА-А17-117101820002-3

УТВЕРЖДАЮ
Врио директора ФИЦ КНЦ СО РАН,
д.с.-х.н.

« 22 » января 2020 г.



ОТЧЕТ
О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

УСТОЙЧИВОЕ ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ ЛЕСНЫХ ЭКОСИСТЕМ В УСЛОВИЯХ
ИЗМЕНЕНИЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ И ИНТЕНСИВНОГО БИОТИЧЕСКОГО
ВОЗДЕЙСТВИЯ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ СЦЕНАРИЯХ ЛЕСОПОЛЬЗОВАНИЯ
(промежуточный за 2019 год)

Направление фундаментальных исследований
VI.52.2. «Лесные экосистемы Сибири: адаптивный потенциал биосферных и ресурсных
функций при различных сценариях климатических и антропогенных воздействий»

(Инв. № 0356-2019-0023)

Руководитель НИР
Заведующий лабораторией лесных культур
микологии и фитопатологии,
д-р. биол. наук, профессор


И.Н. Павлов

Красноярск 2020

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель НИР
заведующий лабораторией
ФГБНУ ИЛ СО РАН,
д-р. биол. наук, профессор



И.Н. Павлов
(введение, раздел 1,
заключение)

Ответственные исполнители:

Старший научный сотрудник
ФГБНУ ИЛ СО РАН,
д-р. биол. наук, доцент



Ю.А. Литовка (раздел 1)

Заведующий лабораторией
ФГБНУ ИЛ СО РАН,
канд. биол. наук



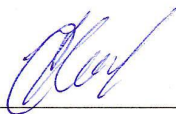
Ю.Н. Баранчиков (раздел 2)

Старший научный сотрудник
ФГБНУ ИЛ СО РАН,
канд. биол. наук



Н.В. Пашенова (раздел 2)

Нормоконтроль



Н. С. Кузьмик

РЕФЕРАТ

Отчет 39 с., 16 рис., 8 табл.

МАССОВОЕ УСЫХАНИЕ ЛЕСОВ, БИОТИЧЕСКИЕ СВЯЗИ, КОРНЕВЫЕ ПАТОГЕНЫ, МИТОГЕНОМ, НАСЕКОМЫЕ-ВРЕДИТЕЛИ, ВТОРИЧНЫЙ АРЕАЛ, ОРГАНИЗМЫ-ИНВАЙДЕРЫ

Объектом исследования являются компоненты лесных экосистем Сибири в условиях изменения окружающей среды и интенсивного биотического воздействия. В соответствии с задачами 2018 года: исследованы биотические связи (древесные растения, насекомые, грибы, бактерии) при патологическом усыхании хвойных лесов; разработаны методы оценки фитосанитарного риска расширения вторичных ареалов инвазийных вредителей / патогенов и интегративной видовой диагностики насекомых для оперативной идентификации аборигенных и чужеродных видов.

Проведена сборка и аннотирование круговых митохондриальных геномов четырех видов наиболее значимых в усыхании лесных древостоев корневых патогенов из комплекса *Armillaria mellea* s.l. Выявлены аналогичный порядок генов у видов *A. borealis* и *A. solidipes* и различия у *A. sinapina* и *A. gallica*, что согласуется с их современными филогенетическими отношениями. Установлена высокая вариабельность грибных митогеномов по размеру, содержанию генов и организации генома даже среди близкородственных видов *Armillaria*. Установлена определяющая роль корневых патогенов *A. mellea* s.l. и *Heterobasidion annosum* s.l. в формировании очагов массового усыхания пихтовых древостоев, от которых распространяется патологический отпад, в том числе за счет воздействия *Polygraphus proximus* и его фитопатогенных микоассоциантов. Выявлен сопутствующий возбудитель болезней *Abies sibirica* – гриб *Neonectria fuckeliana*, вызывающий усыхание ветвей, поражение ствола и обильное смолотечение, симптоматически похожее на последствия атаки *P. proximus*.

Предложен и апробирован способ раннего выявления дендрофильных видов насекомых и патогенов, которые могут оказаться потенциальными организмами-инвайдерами для других стран или континентов. Предложен подход к анализу данных дистанционного зондирования лесных территорий, позволяющий заблаговременно получить оценку состояния и устойчивости насаждений к нападению насекомых. Предложен метод реконструкции произошедших в прошлом массовых размножений филлофагов осенней группы на примере *Bupalus piniaria* без привлечения данных по приросту не повреждаемой породы. Проведена ревизия видового разнообразия грацилляриид (экономически важное семейство минирующих молей) – вредителей древесных растений в азиатской части России с применением интегративного подхода.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ.....	6
1 Исследование биотических связей (древесные растения, насекомые, грибы, бактерии) при патологическом усыхании хвойных лесов.....	6
- 1.1 Исследование митохондриальных геномов близкородственных видов <i>Armillaria</i> , наиболее значимых в усыхании лесных древостоев.....	6
- 1.2 Мониторинг, закономерности и перспективы биологического контроля <i>Polygraphus proximus</i> в пихтовых лесах Сибири, зараженных корневыми и стволовыми патогенами.....	8
- 1.3 Биосинтез вторичных метаболитов у сибирских штаммов грибов <i>Heterobasidion annosum sensu lato</i>	14
2 Разработка методов оценки фитосанитарного риска расширения вторичных ареалов инвазийных вредителей / патогенов и интегративной видовой диагностики насекомых...	17
- 2.1 Способ раннего выявления лесных организмов-инвайдеров.....	17
- 2.2 Исследование специфичных компонентов агрегационного феромона уссурийского полиграфа.....	21
- 2.3 Методика реконструкции истории массовых размножений филлофагов осенней фенологической группы.....	23
- 2.4 Разработка методов интегративной видовой диагностики насекомых - вредителей леса для оперативной идентификации аборигенных и чужеродных видов.....	25
- 2.5 Исследование экзоферментного спектра и фитотоксичности <i>Hymenoscyphus fraxineus</i>	28
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	34
Приложение.....	35

ВВЕДЕНИЕ

Настоящий отчет является промежуточным (за третий год выполнения) по теме: «Устойчивое функционирование лесных экосистем в условиях изменения окружающей среды и интенсивного биотического воздействия при различных сценариях лесопользования».

Причины начавшегося в конце 20 века и возрастающего усыхания хвойных лесов не установлены до настоящего времени. Затухая в одних местах, процесс дигрессии проявляется на других участках в более значимых масштабах. Отсутствие единой точки зрения на причины, определяющие интенсификацию усыхания древесных растений даже для одного района исследований, исключает разработку системы эффективного предотвращения их дальнейшего развития. Комплекс симптомов очагового усыхания древостоев в разных регионах характеризуется во многом общими чертами, что позволяет говорить об аналогичных закономерностях их образования и развития. Систематизация множества разрозненных фактов и установление общих закономерностей глобального усыхания бореальных лесов является важнейшей задачей на данном этапе.

Прогрессирующее усыхание хвойных насаждений – это системный процесс, обусловленный сопряженным влиянием на лесные биогеоценозы экзогенных и эндогенных экологических факторов, а рассматриваемая проблема является следствием нарушения устойчивости лесных экосистем на всех уровнях организации. Кедрово-пихтовые леса в условиях стремительно изменяющегося климата наиболее чувствительны к биотическому воздействию, включая аборигенных возбудителей корневых гнилей и насекомых-вредителей, а также агрессивных видов-инвайдеров. Перспективным методом сдерживания популяции патогенов в зоне депрессии численности может стать конкурирующий биологический контроль. Эффективность этого метода защиты леса во многом зависит от всестороннего исследования биотических связей в системе древесные растения – грибы – насекомые и систематического отбора высокоэффективных биоконтрольных микроорганизмов с инсектицидной и фунгицидной активностью.

Кадровый потенциал исполнителей проекта (всего 27 научных работников) включает: 3 доктора наук, 9 кандидатов наук, 4 аспиранта.

Возможные области применения результатов исследований: разработка методов биологического контроля наиболее значимых корневых патогенов и насекомых-вредителей и методов оценки фитосанитарного риска расширения ареалов организмов-

инвайдеров; прогнозирование рисков вспышек размножения лесных насекомых под воздействием природных и антропогенных модифицирующих факторов.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

1 Исследование биотических связей (древесные растения, насекомые, грибы, бактерии) при патологическом усыхании хвойных лесов

1.1 Исследование митохондриальных геномов близкородственных видов *Armillaria*, наиболее значимых в усыхании лесных древостоев

Проведена сборка и аннотирование круговых митохондриальных геномов четырех видов наиболее значимых в усыхании лесных древостоев корневых патогенов из комплекса *Armillaria mellea* s.l. Митогеномы *A.borealis*, *A.gallica*, *A.sinapina* и *A.solidipes* составляют 116,443; 98,896 103,563 и 122,167 п.н. соответственно (рис. 1).

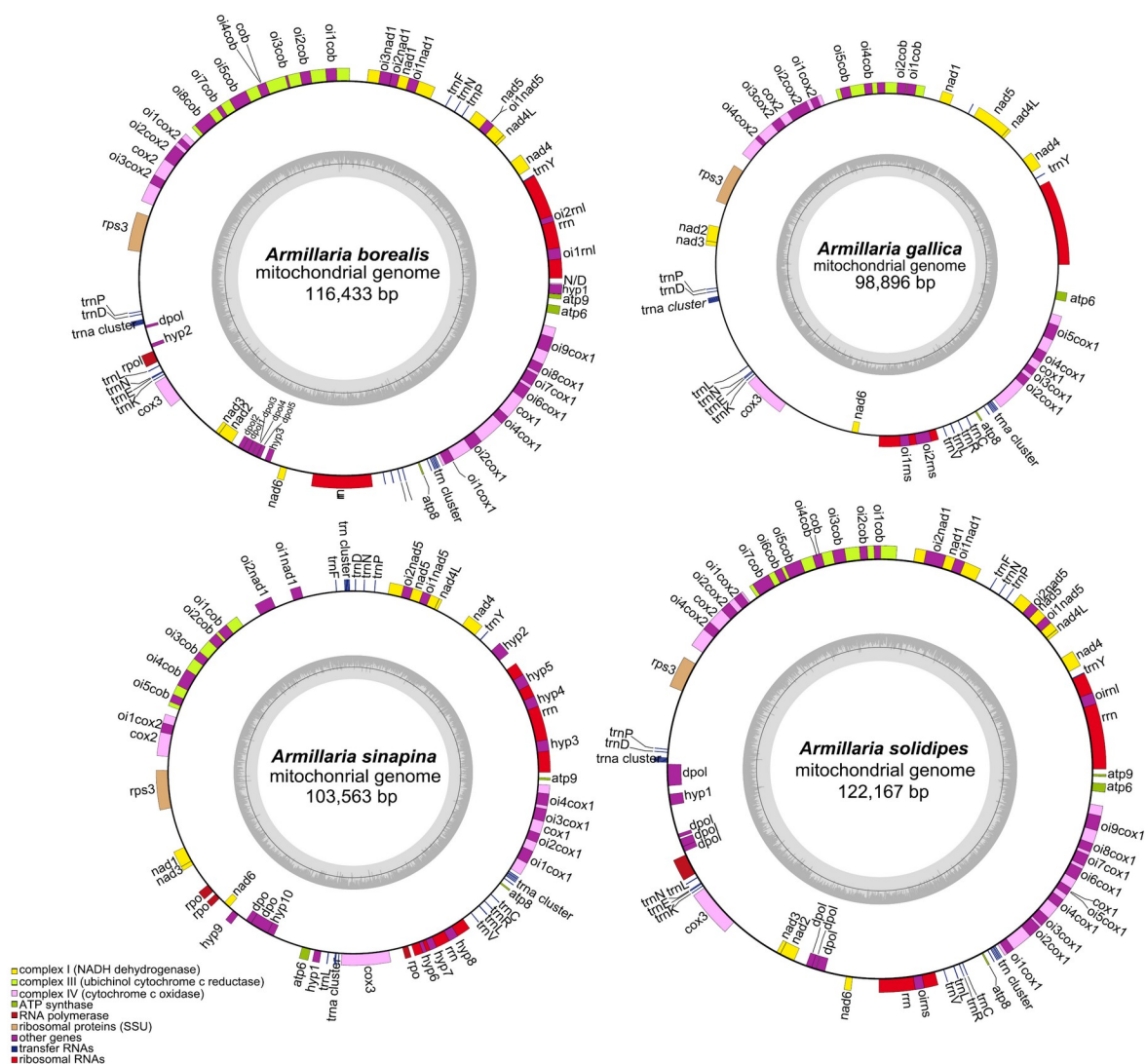


Рисунок 1 – Круговые полные графические карты митогенома видов *Armillaria borealis*, *A.solidipes*, *A. sinapina* и *A. gallica* (гены транскрибируется по часовой стрелке)

Каждый митогеном содержал 15 кодирующих белок генов: три гена субъединиц АТФ-синтазного комплекса (atp6, atp8 и atp9), три гена комплексных субъединиц IV (cox1, cox2 и cox3), один комплексный ген субъединицы III (cob), семь генов субъединиц комплекса транспорта электронов I (nad1, nad2, nad3, nad4, nad4L, nad5 и nad6), ген одного рибосомного белка (rps3), а также большие и малые рибосомные субъединицы генов РНК (rnl и rns). Во четырех исследуемых грибных митогеномах гены nad2 и nad3 и nad4L и nad5 были связаны с небольшим перекрытием: стоп-кодон nad2 перекрывал следующий стартовый кодон nad3 одним нуклеотидом, а стоп-кодон nad4L также перекрывал следующий стартовый кодон nad5 одним нуклеотидом. Все эти белковые кодирующие гены кодируются в одной и той же цепи ДНК, за исключением nad2 и nad3, которые начинаются с типичного кодона инициации трансляции ATG, но кодируются в противоположной цепи в *A. borealis* и *A. solidipes*.

В целом, все митогеномы имели сходное содержание генов: 14 белок-кодирующих консервативных генов, вовлеченных в окислительное фосфорилирование и сопряженный электронный транспорт; гены rnl, rns, rps3 и тРНК. Порядок генов аналогичен у *A. borealis* и *A. solidipes*, но различается у *A. sinapina* и *A. gallica*, что согласуется с их современными филогенетическими отношениями.

Всего в митогеномах *A. borealis*, *A. gallica*, *A. sinapina* и *A. solidipes* соответственно были аннотированы 26, 24, 25 и 26 генов тРНК. Подобно большинству изученных до сих пор грибных митогеномов, гены тРНК были в основном кластерными (рис. 2), за исключением гена тРНК-Тур (trnY), который был расположен между rnl и nad4 в четырех исследуемых митогеномах *Armillaria*, и ген тРНК-Phe (trnF), который был расположен снаружи кластеров во всех митогеномах, кроме *A. sinapina*.

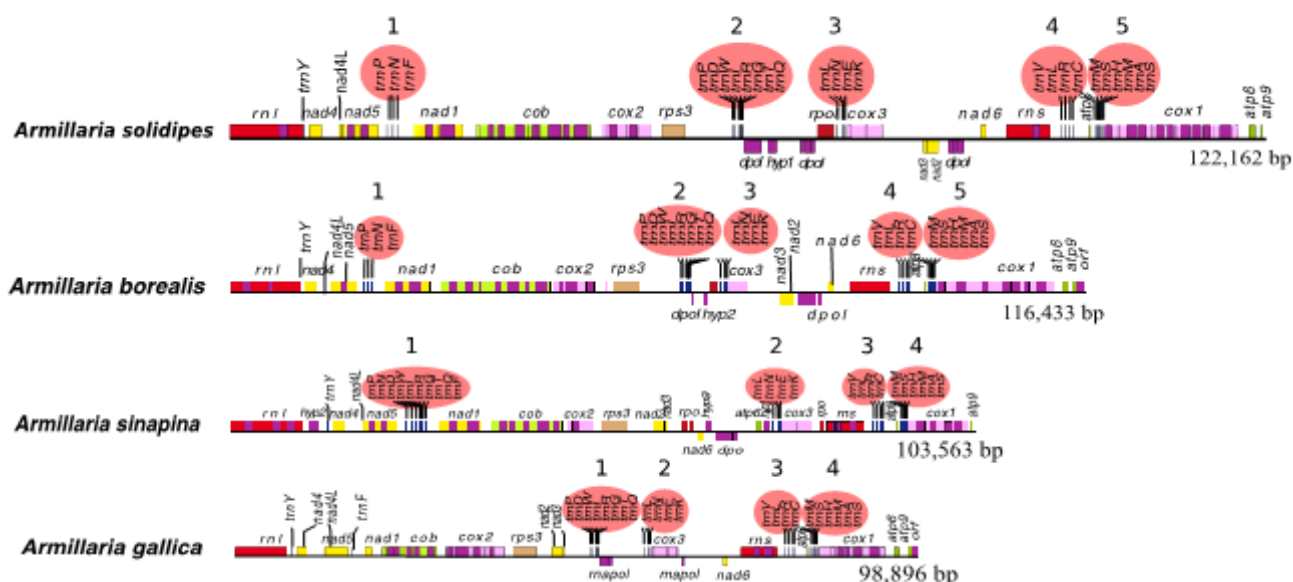


Рисунок 2 – Линейные полные графические карты генов митогенома четырех видов *Armillaria* с расположением генов тРНК (выделенх красными овалами)

Виды *A. borealis* и *A. solidipes* имели одинаковые пять кластеров; *A. gallica* и *A. sinapina* имели четыре одинаковых кластера, которые незначительно отличались от пяти кластеров в *A. borealis* и *A. solidipes* по составу и расположению. Все гены тРНК были представлены одной копией, кроме гена тРНК-Pro (trnP), который имел две копии в *A. borealis* и *A. solidipes*.

Установлена высокая вариабельность грибных митогеномов по размеру, содержанию генов и организации генома даже среди близкородственных видов *Armillaria*, что объясняется различным количеством мобильных генетических элементов, интронов и связанных с плазмидами последовательностей. Большинство интронов *Armillaria* содержат открытые рамки считывания (ORF), связанные с самонаводящимися эндонуклеазами семейств LAGLIDADG и GIY-YIG. Отдельные интроны были включены в митогеномы *Armillaria* как фрагменты плазмидных последовательностей благодаря подвижности ORF. Во всех исследуемых митогеномах обнаружены усеченные дубликации генов. В формирование структуры генома видов *Armillaria* значительную роль, по-видимому, сыграли мобильные генетические элементы, включенные в интроны и межгенные последовательности в митогеномах.

1.2 Мониторинг, закономерности и перспективы биологического контроля *Polygraphus proximus* в пихтовых лесах Сибири, зараженных корневыми и стволовыми патогенами

Представлены цифровые модели усыхания *Abies sibirica* по результатам визуального подеревного дешифрирования космических снимков с сервиса Google Earth (рис. 3). Нарастание процессов усыхания происходит равномерно на всей площади, что свидетельствует о ранней зараженности деревьев грибами *A. mellea* s. l. Активизация патологического отпада начинается только при достижении триггерной точки (комбинация погодных параметров, старение древостоя, сопутствующие болезни и вредители, антропогенные факторы).

Дальнейшему возрастанию агрессивности *A. mellea* s. l. и росту численности уссурийского полиграфа *Polygraphus proximus* Blandford способствует увеличение запаса сухостоя. Первые усыхающие деревья (2005-2010 гг.) приурочены к старым полуразложившимся пням *Betula pendula* Roth, *Pinus sibirica* Du Tour, *Abies sibirica*. В ряде случаев на них обнаружены плодовые тела *A. mellea* s.l. и *H. annosum* s.l., из которых, при наличии типичного разложения древесины, выделены чистые культуры грибов.

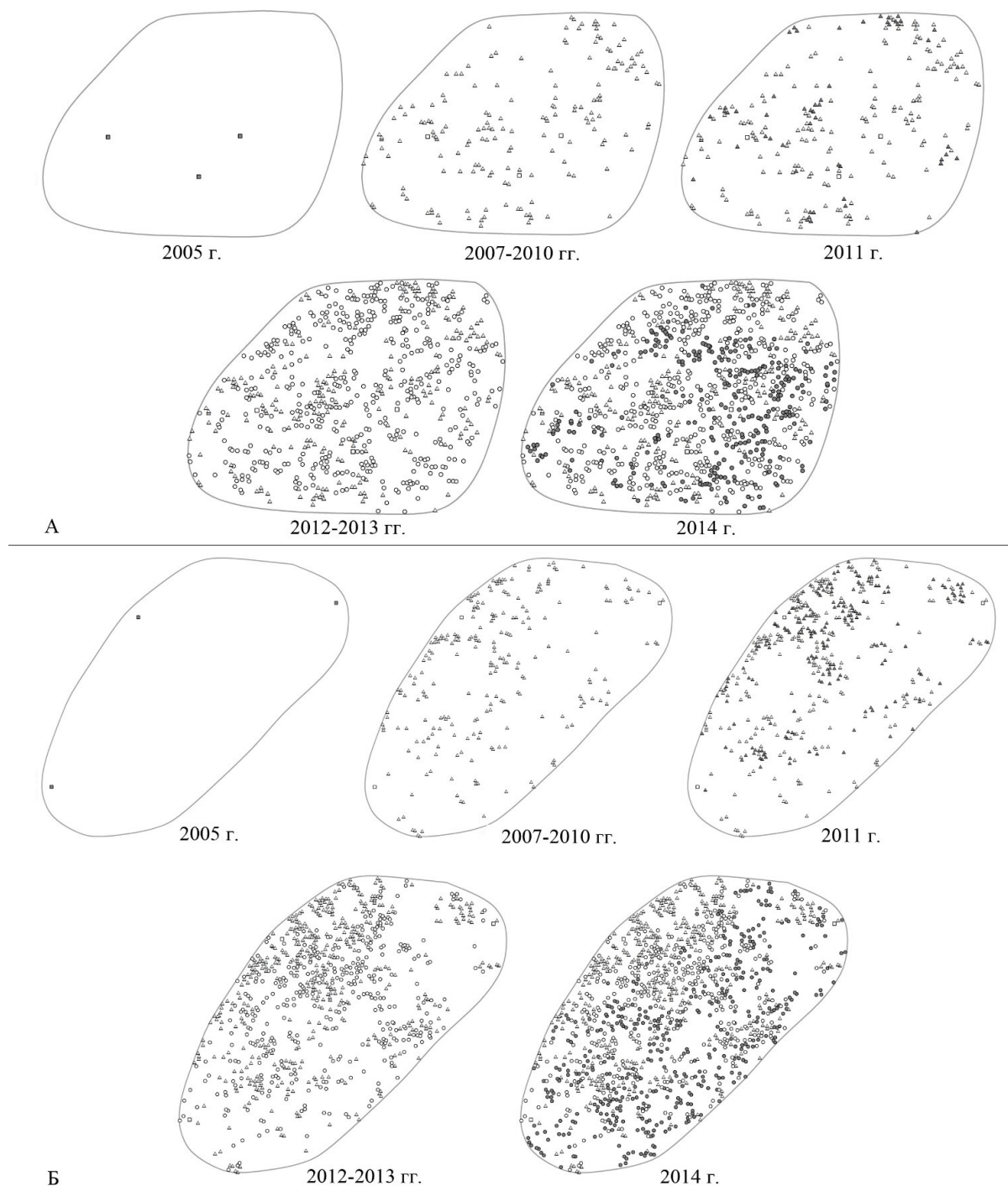


Рисунок 3 – Цифровая модель усыхания *Abies sibirica*: А – равномерное развитие усыхания; Б – развитие усыхания с выраженным вектором распространения (■ – деревья, погибшие в 2005 г., □ – деревья, погибшие в 2007-2011 гг.; ● – деревья, погибшие в 2012-2014 гг.; аналогичные обозначения без заливки – старый сухостой).

Установлена определяющая роль корневых патогенов *Armillaria mellea* s.l. и *Heterobasidion annosum* s.l. в усыхании пихтовых древостоев не только при их совместном воздействии с *Polygraphus proximus* Blandford, но и при его отсутствии (юго-западный склон Восточного Саяна, Кизирское лесничество).

Детальное обследование усыхающих древостоев *A. sibirica* с раскопкой корневых систем в конце вегетационного периода (время максимального развития веера мицелия *A. mellea* s.l.) позволило установить присутствие *P. proximus* на большинстве деревьях пихты, однако, в центре очагов усыхания на большей части деревьев отсутствовали смоляные потеки, что свидетельствует о гибели *A. sibirica* до момента заселения короедов. Интенсивное развитие веера мицелия *Armillaria* под корой свежего сухостоя пихты и на деревьях без признаков ослабления, подтверждает определяющую роль гриба в образовании очагов массового усыхания (табл. 1; рис. 4). Деревья, пораженные корневыми патогенами, являются центрами усыхания, от которых распространяется патологический отпад, в том числе за счет воздействия *P. proximus* и его фитопатогенных микоассоциантов. В дальнейшем, по мере возрастания численности *P. proximus*, возрастает его роль в увеличении патологического отпада *A. sibirica*.

Таблица 1 – Сопряженность биотического воздействия *Armillaria mellea* s. l. и *Polygraphus proximus* на *Abies sibirica*

Расположение деревьев	Биотическое воздействие	Состояние <i>A. sibirica</i>							
		сухостой				живые деревья			
	Наличие веера мицелия <i>A. mellea</i> s.l.	+		–		+		–	
	Истечение смолы в результате воздействия <i>P. proximus</i>	+	–	+	–	+	–	+	–
Доля деревьев (%)									
Центр очагов усыхания / первый этап		4	82	3	11	0	0	0	0
Граница очагов усыхания / дальнейшее распространение усыхания		21	28	13	6	22	0	10	0

Фитопатогенность выделенных нами чистых культур корневых патогенов исследована и подтверждена в условиях *in vitro* на сеянцах *Abies sibirica* и семенах *Picea abies*. В качестве основных объектов использовали сибирские штаммы доминирующих в регионе видов фитопатогенных грибов – *Armillaria borealis* и *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref (табл. 2). Установлено пролонгированное ингибирующее действие большинства штаммов *A. borealis* на развитие сеянцев пихты. Достоверное снижение грунтовой всхожести семян (в 1,9-2,8 раза по сравнению с контролем) отмечено под действием 29 % культур. В ходе дальнейшей вегетации послеувсходовая гибель сеянцев приобрела массовый характер (до 90 %), при этом под действием 83 % исследуемых штаммов грибов гибель растений превысила 55 %. В зоне контакта *A. borealis* с корнями *A. sibirica*

сформировалась плотная мицелиальная пленка площадью от 35 до 55 % визуализируемой зоны наблюдения с высокой жизнеспособностью мицелия и различной степенью ризоморфообразования (от единичных до многочисленных разветвленных ризоморфов).



Рисунок 4 – Повреждения *Abies sibirica* в результате патогенного воздействия *Armillaria mellea* s.l. (А) и *Heterobasidion annosum* s. l. (Б)

Аналогичная тенденция отмечена при исследовании сибирских штаммов *H.annosum*: грунтовая всхожесть ниже контрольных показателей в 1,1-1,9 раза; послевсходовая гибель сеянцев находится в пределах 45-92 %. Доля штаммов, вызывающих гибель более 60 % сеянцев, составляет 86 %; жизнеспособность мицелия в корнеобитаемой зоне высокая (до 3-х баллов). Гибель сеянцев *A. sibirica* от исследуемых корневых патогенов подтверждена массовой ре-изоляция грибов из погибших растений: в 83-93 % случаев при исследовании *A. borealis* и в 85-95 % случаев при использовании *H.annosum*.

При биотестировании метаболитов корневых патогенов, полученных в глубинной культуре на среде Норкранс, на семенах не выявлено достоверного ингибирующего влияния на лабораторную всхожесть семян и развитие надземной части проростков. Показатели длины главного корня были ниже контрольных значений в 1,3-2,2 раза под действием метаболитов *A. borealis* и, более выражено, в 3,8-5,5 раз – под влиянием

H.annosum, при этом после 14-х суток вегетации на корнях большинства растений отмечено наличие некротических зон различной степени интенсивности. Массовое развитие некротического процесса (более чем у 35 и 47 % сеянцев соответственно для *A.borealis* и *H. annosum*), привело к достоверному снижению массы сухого проростка (максимально – в 1,9 и 3 раза).

Таблица 2 – Фитопатогенность грибов *in vitro* в отношении сеянцев и семян *Abies sibirica*

показатель	корневые патогены		контроль
	<i>Armillaria borealis</i>	<i>Heterobasidion annosum</i> s.s.	
сеянцы			
грунтовая всхожесть, %	9,0 – 23,0*	13,4 – 22,9	24,9
погибшие сеянцы, %	35,2 – 90,1	45,2 – 92,1	20,3
жизнеспособность мицелия (баллы)	2,6 – 3,0	2,5 – 3,0	–
реизоляция гриба из погибших растений, %	83,1 – 93,4	84,9 – 95,1	–
семена			
лабораторная всхожесть, %	33,8 – 56,1	30,9 – 46,3	51,3
длина главного корня, мм	10,3 – 18,4	4,2 – 6,1	23,1
масса проростка, мг	1,3 – 2,0	0,8 – 1,3	2,4

Установлен сопутствующий возбудитель болезней *Abies sibirica*, выделяющийся масштабами поражения пихтовых древостоев. Это аскомицетовый гриб *Neonectria fuckeliana* (C. Booth) Castl. & Rossman, который вызывает значительное ослабление деревьев за счет усыхания ветвей, поражения ствола и обильного смолотечения, симптоматически похожего на последствия атаки короеда *P. proximus* (рис. 5). Отмечены случаи гибели подроста (небольших экземпляров, до 3 м в высоту) в результате воздействия исключительно этого фитопатогена.



Рисунок 5 – Типичные повреждения *Abies sibirica* в результате воздействия стволового фитопатогенного гриба *Neonectria fuckeliana*

Фитопатогенность чистых культур *N. fuckeliana* подтверждена в условиях *in vitro*: послевсходовая гибель сеянцев *A. sibirica* составила 79-87 %; жизнеспособность мицелия фитопатогена в корнеобитаемой зоне достаточно высокая и варьировала в пределах от 2,2 до 2,9 баллов; ре-изоляция гриба из патологического материала – до 98 %. Метаболиты *N. fuckeliana* ингибируют ростовые процессы семян и проростков *A. sibirica*: лабораторная всхожесть семян ниже контрольного значения в 2,1-2,7 раза; длина главного корня – в 2,8-5,4 раза. На 10-12 сутки отмечен массовый некроз корневой системы (до 75 %) под влиянием большинства исследуемых штаммов.

Из имаго уссурийского полиграфа изолированы в чистую культуру энтомопатогенные грибы *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. и *Beauveria tenella* (Sacc.) Siemaszko для многоступенчатого скрининга продуцентов биопрепаратов. Исследованы их морфолого-культуральные особенности (рис. 6); проведена молекулярно-генетическая верификация культур; подобраны питательные среды для поддержания коллекции культур и получения активного инокулята.



мальт-экстракт агар

картофельно-глюкозный агар

Чапека-Докс агар

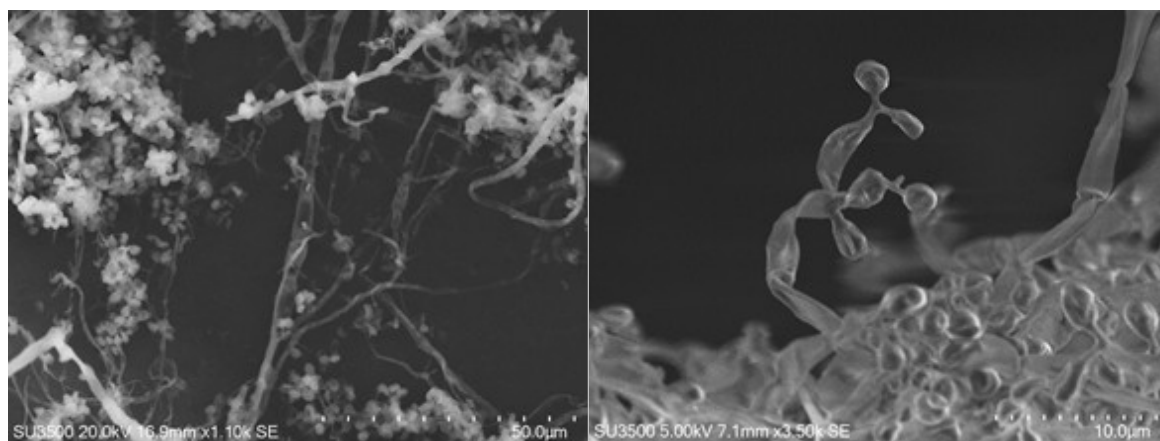


Рисунок 6 – Морфология колоний энтомопатогенных грибов *Beauveria bassiana* на агаризованных средах (вверху) и микроструктуры (сканирующая электронная микроскопия)

В лабораторных условиях при росте на агаризованных средах большинство штаммов характеризуются, как умеренно растущие; максимальная скорость роста отмечена на МЭА и составила 2,3-3,9 мм/сут; ростовой коэффициент – 37–75. На питательных средах Сабуро, Чапека-Докса и КГА все исследуемые штаммы энтомопатогенных грибов характеризуются как медленно растущие (табл. 3).

Таблица 3 – Радиальная скорость роста (мм / сут) энтомопатогенных грибов на примере штаммов *Beauveria tenella*

Штамм	Питательные среды			
	Сабуро	Чапека-Докс	Картофельно-глюкозный агар	Мальт-экстракт агар
P1	1,4±0,03	2,3±0,27	2,3±0,07	3,7±1,07
P2	1,4±0,08	2,1±0,15	1,4±0,00	3,7±1,07
P3	1,5±0,00	2,4±0,07	2,1±0,09	3,5±1,27
P4	1,6±0,28	2,0±0,10	2,3±0,01	2,4±0,00
P5	1,1±0,00	2,1±0,06	1,7±0,08	2,4±0,00
P6	1,2±0,19	2,5±0,03	2,5±0,00	3,8±0,03

Отобраны энтомопатогенные штаммы *B. bassiana* и *B. tenella*, приводящие к 100 % гибели имаго уссурийского полиграфа в течение 7–12 суток после инфицирования. Ре-изоляция штаммов из погибших насекомых составляет 89–95 %, что свидетельствует о высокой энтомопатогенности. Штаммы являются совместимыми при со-культивировании на лабораторных питательных средах и устойчивыми к воздействию большинства исследуемых фитонцидов хвойных пород деревьев.

1.3 Биосинтез вторичных метаболитов у сибирских штаммов грибов *Heterobasidion annosum sensu lato*

Исследован состав вторичных метаболитов у корневых патогенов у *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. и *Heterobasidion abietinum* Niemelä & Korhonen, выделенных на территории Средней (Красноярский край) и Западной Сибири (Алтайский край).

Вторичные метаболиты у *Heterobasidion* изучали при выращивании штаммов в среде Норкранс, которая обычно применяется при культивировании базидиомицетов. У

всех изученных штаммов видов *H. annosum* s.s. и *H. abietinum* был обнаружен метаболит **1** с $R_f=0.29$ (II). УФ-спектр метаболита **1** имел близкие фоманноксину значения полос поглощения ($\lambda_{\text{макс.}}$ 209, 232, 278, 294 нм) и положительный молекулярный ион $207(M+H)^+$. В МС/МС спектре также наблюдалось отщепление двух карбоксильных фрагментов и гидроксильной группы. На основании полученных данных метаболит был идентифицирован как 2-(2-гидроксипропан-2-ил)-2,3-дигидробензофуран-5-карбальдегид. У этих штаммов также был идентифицирован метаболит **2**, который имел молекулярный ион $205(M+H)^+$, характер расщепления которого был аналогичен предыдущему с разницей в две единицы, что может указывать на появление двойной связи в фурановом кольце и представлять собой 2-(2-гидроксипропан-2-ил)-2,3-гидробензофуран-5-карбальдегид. У штаммов *H. annosum* Т-На, 45-2, Н-2 и *H. abietinum* Нр-8, Н-1, Н-3, Н-4 основным метаболитом было соединение **3** с $R_f = 0.52$ (II). УФ-спектр выделенного метаболита имел максимальные значения полос поглощения при $\lambda_{\text{макс}}$ 209, 228, 280(пл.), 293 нм. Масс-спектр метаболита **3** показал положительный молекулярный ион $189 (M+H)^+$. В МС/МС спектре метаболита наблюдали последовательное отщепление двух карбоксильных и пропенильной групп. На основании литературных данных этот метаболит был идентифицирован как фоманноксин. У этих штаммов также был обнаружен метаболит **4** с $R_f = 0.18$ (II), который имел УФ-спектр: 209, 230, 290 нм и масс-спектр с положительным молекулярным ионом $217 (M+H)^+$. МС/МС спектр метаболита **4** указывал на наличие двух гидроксильных групп. Метаболит **4** был идентифицирован как 1-(2-(проп-1-ен-2-ил)-2,3-дигидробензофуран-5-ил)пропан-1,2-диол.

Штамм *H. annosum* 45-2 синтезировал метаболит **5** с $R_f=0.47$ (II), который имел УФ-спектр с $\lambda_{\text{макс.}} = 256$ нм, характерный для сесквитерпена фоманносина. Масс-спектр метаболита **5** характеризовался положительным молекулярным ионом $247(M+H)^+$ и наличием гидроксильной и карбонильной группы. На основании полученных данных этот метаболит был идентифицирован как иллудолактон А. У этого штамма также был обнаружен метаболит **6** с $R_f = 0.25$ (II), который имел УФ-спектр с $\lambda_{\text{макс.}}=259$ нм и молекулярный ион $261 (M+H)^+$, отличающейся от предыдущего метаболита на метильную группу. Этот метаболит не был идентифицирован, но УФ-спектр и схожая фрагментация молекулярного иона с иллудолактоном А, позволяет предположить, что этот метаболит является метильным производным иллудолактона А. В органо-минеральной среде 3 штамм *H. annosum* 45-2 помимо указанных выше метаболитов синтезировал метаболит **7**, который имел УФ-спектр с $\lambda_{\text{макс.}} = 256$ нм и масс-спектр с положительным молекулярным

ионом 263 (M+H)⁺. Этот метаболит был идентифицирован как фоманносин. У штамма *H. ecrustosum* He-16K вышеуказанные вторичные метаболиты не были идентифицированы.

Таким образом, сибирские штаммы грибов видов *H. annosum* s.s. и *H. abietinum* синтезировали бензогидрофураны фоманноксинового ряда. Фоманноксин был основным метаболитом у трех штаммов *H. annosum*, а у двух других обнаружены метаболиты, близкие по ему по структуре. Эти результаты соответствует хемотаксономическим критериям, предложенным для вида *H. annosum*. У фоманноксин-синтезирующего штамма *H. annosum* 45-2 был идентифицирован фоманносин и его биосинтетические предшественники. У всех исследованных штаммов вида *H. abietinum* обнаружены фоманноксин и близкие ему соединения.

Биосинтез фоманноксина определяется физиолого-биохимическими особенностями штаммов *H. annosum* s.l., при этом состав среды культивирования оказывает регулярное влияние на биосинтез вторичных метаболитов фоманноксинового ряда. На среде Норкранс максимум накопления составил 55 мг/л; на органоминеральной среде № 2 – 34 мг/л (табл. 4).

Таблица 4 – Показатели роста и биосинтеза фоманноксина фитопатогенными штаммами *H.annosum* и *H. abietinum* при жидкофазном культивировании

Вид, штамм	Показатели	Питательные среды		
		Норкранс	Органоминеральная среда №1	Органоминеральная среда №2
<i>H. annosum</i> 45-2	pH	5.8	2.5	5.8
	Биомасса, г/л	1.9	1.0	1.8
	Фоманноксин, мг/л	16	1.9	34
	У р/х, мг/г	8.4	2.3	18.9
<i>H. abietinum</i> Н-1	pH	3.7	3.9	4.4
	Биомасса, г/л	2.2	1.5	2.5
	Фоманноксин, мг/л	55	25	13
	У р/х, мг/г	25.0	16.6	5.2

Установлена связь между фитопатогенностью *H. annosum* s.l. и спектром синтезируемых метаболитов фоманноксинового ряда. Максимальную вирулентность в отношении растительных тест-объектов (сеянцы *Pinus sylvestris* L.) проявляет штамм *H.annosum*, синтезирующий максимальное количество фоманноксина (от 16 до 32 мкг/мл) и более широкий спектр метаболитов (фоманноксин, фоманносин, иллулолактон А, метилиллулолактон А, 2-(2-гидроксипропан-2-ил)-2,3-дигидробензофуран-5-

карбальдегид, 2-(2-гидроксипропан-2-ил)-2,3-гидробензофуран-5-карбальдегид, 1-(2-(проп-1-ен-2-ил)-2,3-дигидробензофуран-5-ил) пропан-1,2-диол). Жизнеспособность сеянцев сосны обыкновенной на 6 сутки составила 37 % на фоне замедления развития стебля по сравнению с контролем в 3.5 раза и массовых некротических поражений (до 70 % от общего количества растений); на 12 сут отмечена 100 % гибель сеянцев *P. sylvestris*.

В целом, у всех штаммов, проявляющих фитопатогенные свойства, были обнаружены вторичные метаболиты фоманоксинового ряда. Различия в степени патогенности и содержанием фоманноксина связаны с совокупностью различных факторов, влияющих на эти процессы, например, с отличиями в условиях роста грибов *in vivo* и *in vitro*. Отсутствие биосинтеза фоманноксина и других соединений этой группы у корейского штамма *H. ecrustosum* He-16K согласуется с данными других исследователей, что этот вид не проявляет патогенные свойства и является сапрофитом.

2. Разработка методов оценки фитосанитарного риска расширения вторичных ареалов инвазийных вредителей / патогенов и интегративной видовой диагностики насекомых

2.1 Способ раннего выявления лесных организмов-инвайдеров

Предложен и апробирован способ раннего выявления дендрофильных видов насекомых и патогенов, которые могут оказаться потенциальными организмами-инвайдерами для других стран или континентов. Для этого предложено в регионе-потенциальном доноре (экспортере) закладывать так называемые дозорные плантации древесных растений двух типов: из местных видов («свои») и зарубежных видов растений («чужие»). В обоих случаях в набор видов включаются в основном наиболее важные виды древесных растений как для целей экспорта («свои»), так и импорта («чужие»). Высадка подобных растений в репрезентативных повторностях, способствует эффективному выявлению вредоносных агентов и определению степени их возможного воздействия на экономически и экологически важные виды растений при их интродукции.

Ботанические сады и дендрарии, в которых собран широкий спектр «чужих» видов древесных растений, являются частным примером дозорных плантаций второго типа (рис. 7). Дозорные плантации «свои» состоят из саженцев местных видов древесных растений в стране-доноре, служащих мишенями для местных насекомых-вредителей, которые могут быть занесены при интродукции растений в страну-реципиент. Дозорные посадки «чужие» представлены древесными видами из страны-реципиента, которые могут служить экологическими ловушками для организмов - потенциальных инвайдеров. На базе ботанических садов и дендрариев в азиатской части России (дендрарий ИЛ СО РАН,

Центральный сибирский ботанический сад СО РАН, Сибирский ботанический сад, Горно-таежная станция им В.Л. Комарова ДВО РАН) выполнены исследования, подтверждающие ценность использования коллекций древесных растений для раннего выявления потенциально вредоносных организмов и изучения процессов становления их трофических связей с новыми кормовыми объектами.



Рисунок 7 – Схема дозорных плантаций двух типов в стране-экспортере

Предложен подход к анализу данных дистанционного зондирования лесных территорий, позволяющий заблаговременно получить оценки состояния и устойчивости насаждений к нападению насекомых. В качестве показателя, характеризующего состояние насаждений, предложено использовать данные о восприимчивости величин NDVI (Normalized Difference Vegetation Index) в течение сезона к изменению температуры подстилающей поверхности, также получаемой по данным дистанционного зондирования (MODIS/AQUA). В качестве объектов исследований выступали лесные насаждения на территории Енисейского района Красноярского края, Россия.

Для оценки состояния древесных растений предложено использовать величину восприимчивости изменений NDVI к изменению температуры подстилающей поверхности. Для расчета восприимчивости можно записать интегральное уравнение, связывающее изменения $\Delta NDVI$ и температуры ΔT :

$$\Delta NDVI(t) = \int_0^t h(\tau) \cdot \Delta T(t - \tau) d\tau \quad (1)$$

где $\Delta NDVI(t)$ – первая разность изменения значения NDVI в течение сезона, $\Delta T(t)$ – первая разность изменения температуры подстилающей поверхности в течение сезона, $h(\tau)$ – функция отклика (импульсная переходная функция системы, характеризующая восприимчивость величины NDVI к воздействию температуры).

Значение $h(\tau)$ характеризует динамическую связь, существующую между входом $\Delta T(t)$ и выходом $\Delta NDVI(t)$, и эту характеристику можно использовать в качестве показателя состояния насаждения. Если значение $h(\tau) \rightarrow 0$, изменение температуры среды не влияет на изменение NDVI. При малых значениях $h(\tau)$ величина NDVI устойчива к воздействию температуры.

Предложенный подход был апробирован для оценки устойчивости пихтовых насаждений в зоне очага вспышки сибирского шелкопряда (рис. 8). Вспышка массового размножения на правом берегу Енисея была зарегистрирована в 2015 г., однако состояние насаждений в зоне будущего очага уже в 2013 г. отличалось от состояния лесов в неповрежденных насаждениях (рис. 9) и, зная это, можно было принимать меры по предотвращению вспышки.

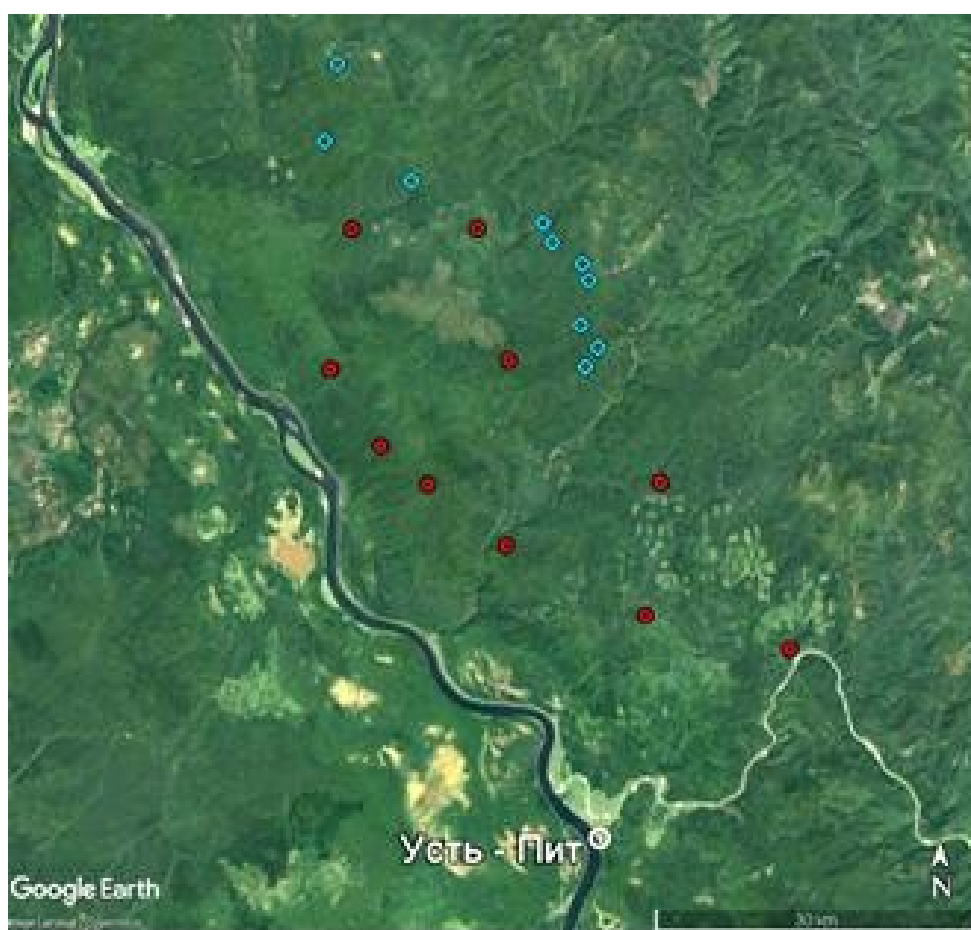


Рисунок 8 – Пробные площади вблизи очага массового размножения сибирского шелкопряда (бассейн Енисея вблизи п.Усть-Пит) (красные точки – насаждения, поврежденные вредителем, синие точки – неповрежденные насаждения (по данным Красноярского Центра защиты леса))

Рассмотренный подход может оказаться перспективным и в лесной экологии, поскольку с его помощью можно оценить реакцию деревьев в насаждении на локальные изменения погоды без использования данных с метеостанций, подчас расположенных далеко от изучаемых лесных территорий. Возможность заблаговременно определить снижение и потерю устойчивости насаждений к возможным атакам насекомых может оказаться крайне важным при решении задач лесозащитного мониторинга и оценок риска возникновения очагов массового размножения лесных насекомых.

Для моделирования динамики численности насекомых в условиях, когда известны лишь данные по динамике численности моделируемого вида и погодные условия на территории, использована так называемая ADL (autoregressive distributed lag)-модель. Авто регрессионная часть уравнения представляет собой процесс Юла, то есть текущее значение переменной зависит от регулирующих факторов (двух предыдущих значений) плюс модифицирующий фактор (погода).

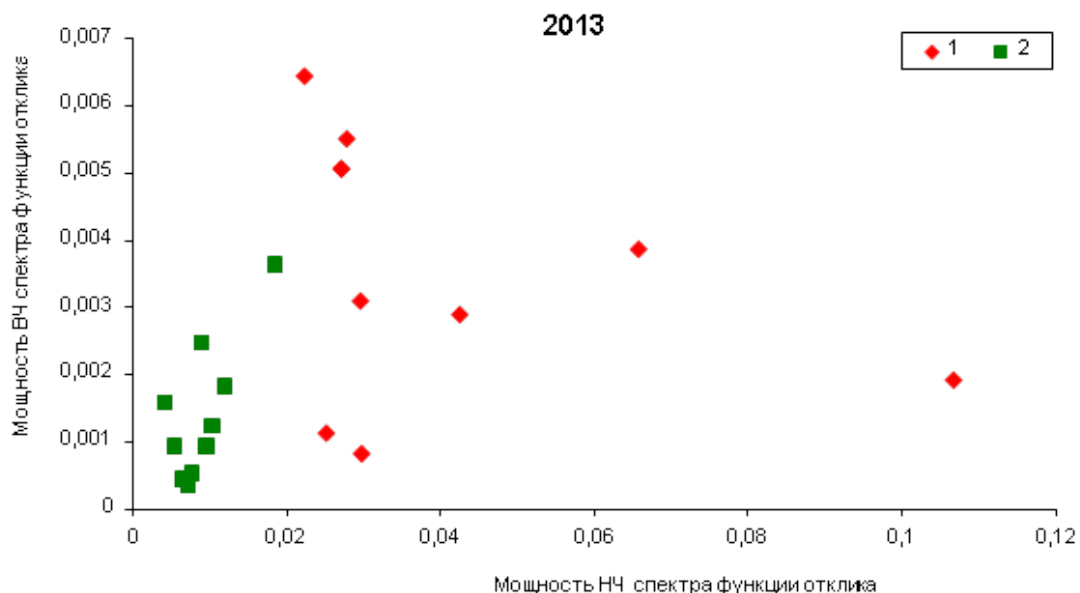


Рисунок 9 – Характеристики состояния лесных насаждений на Правобережье Енисея в 2013 г.; (1) – зоны будущих (через два года, в 2015 г.) очагов вспышек массового размножения сибирского шелкопряда; (2) – контрольные неповрежденные насаждения (каждая точка – отдельная пробная площадь).

В таблице 5 приведены статистические характеристики модельного ADL-уравнения динамики численности сибирского шелкопряда на Ангаре. На рисунке 10 приведены трансформированный ряд учетов численности сибирского шелкопряда и модельный ряд.

Таблица 5 – Статистические характеристики модельного ADL-уравнения динамики численности сибирского шелкопряда на Ангаре

переменные	статистические параметры			
	B	Std.Err.	t(10)	p-level
a0	-133.432	65.606	-2.034	0.069
T (6, i)	0.474	0.234	2.025	0.070
ГТК (5, i-1)	-1.028	0.575	1.788	0.104
LTI (i-2)	-0.796	0.175	-4.538	0.001
LTI (i-1)	1.441	0.153	9.392	0.000
R ²	0.92			
F(4, 10)	29.54			

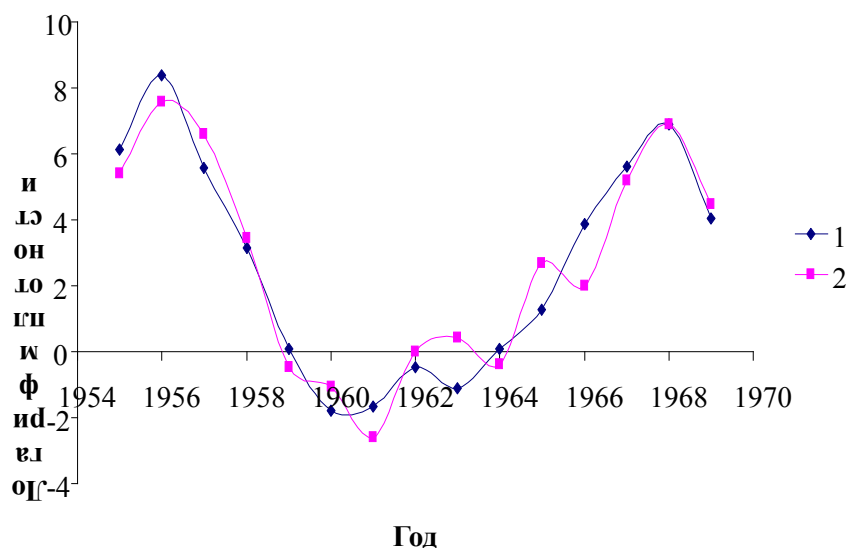


Рисунок 10 – Трансформированный ряд учетов численности (1) и модельный ряд (2)

2.2 Исследование специфичных компонентов агрегационного феромона уссурийского полиграфа

Определены специфичные компоненты агрегационного феромона уссурийского полиграфа, выделяемого, как было показано нами ранее, самцами уссурийского полиграфа. Компоненты были экстрагированы из летучих выделений жуков-самцов полиграфа методом твердофазной микроэкстракции [Rahmani et al., 2015]. Входящие в «букет» летучей фракции выделений самцов компоненты были определены в Department of Chemical Engineering, MidSweden University, Sundswaal, Швеция (Dr. E. Hedenstrom). Расшифровка компонентов будет дана в подготовленной для печати статье.

Проведено тестирование привлекательности отдельных 6-и компонентов феромона (+ растворитель – нонан) в полевом эксперименте. Растворенные в нонане чистые компоненты А, В, С, D, Е и Z, а также их смеси – AZ, DZ, CZ, DZ, EZ помещали в 10 мл пластиковые пузырьки, через отверстие в пробки которых пропускали тонкую трубку-испаритель. Пузырьки подвешивали в пластиковые барьерные ловушки. Ловушки с тестируемыми веществами, с чистым растворителем и пустые ловушки (контроль) экспонировали в 10-кратной повторности в очаге полиграфа в пихтарнике разнотравном (близ пос. Памяти 16 Борцов Емельяновского района Красноярского края) в течение 2х месяцев в последовательности АБСАБС и т.д. с расстоянием между ловушками в 30 м. Ловушки проверяли в среднем еженедельно, при этом, для уменьшения влияния на уловы особенностей местообитания, при каждой проверке вся линия ловушек сдвигалась на одну позицию вперед.

Результаты (рис. 11) позволили впервые (а) выделить компоненты смеси, специфические для каждого из двух обитающих в темнохвойных ассоциациях видов полиграфов – *Polygraphus proximus* и *P.subopacus* и (б) из специфических для уссурийского полиграфа веществ, выделить наиболее для его жуков привлекательное – вещество В. Таким образом, основная цель поиска феромона полиграфа достигнута. Оставшаяся задача – разработка технологии феромонного мониторинга: подбор оптимальной конструкции диспенсера и скорости испарения компонента, а также схемы размещения ловушек на местности и выявления соотношения уловов и плотности популяции вредителя.

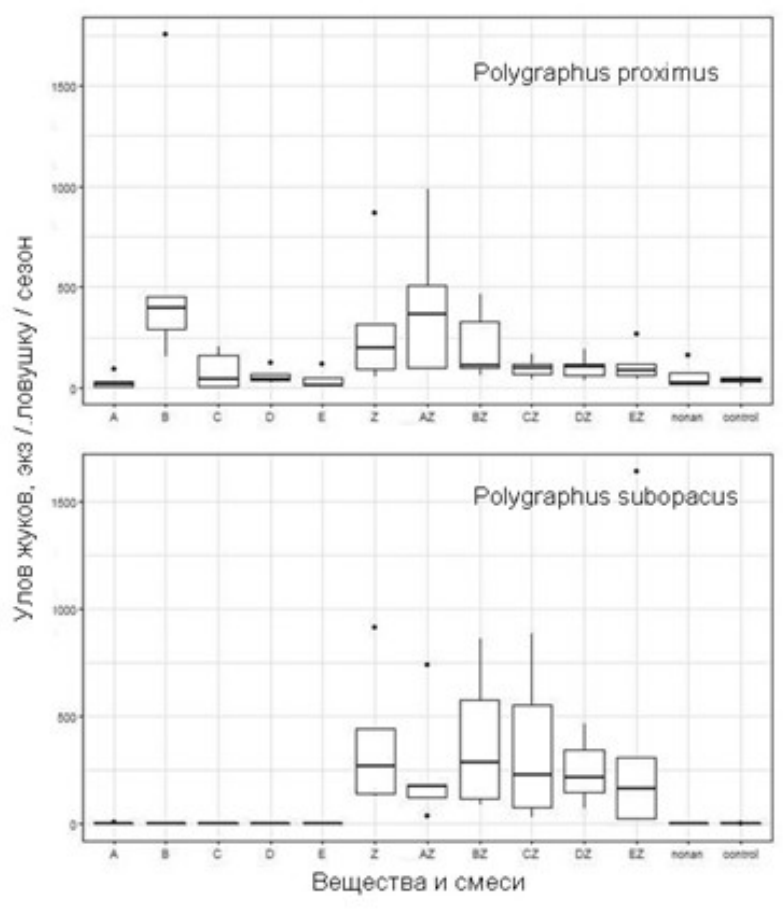


Рисунок 11 – Лет жуков двух видов полиграфов на феромонные ловушки с различными компонентами феромонных смесей. Горизонтальные линии – медианы, четырехугольники – квартили между .25 и .75, вертикальные линии – разброс данных (крайние выбросы исключены), точки – выбросы.

На рисунке 11 четко видно, что отсутствие компонента Z отрезает прилет «нецелевого» вида – *P. subopacus* в ловушки. Максимальной привлекательностью для уссурийского полиграфа *P. proximus* обладает компонент B.

2.3 Методика реконструкции истории массовых размножений филлофагов осенней фенологической группы

Предложен метод реконструкции произошедших в прошлом массовых размножений филлофагов осенней группы на примере *Bupalus piniaria* без привлечения данных по приросту не повреждаемой породы. Продемонстрировано его преимущество над предложенными ранее алгоритмами, указаны ограничения в применении. Существующие методы дендрохронологической реконструкции периодов дефолиации древесных пород имеют некоторые трудно устранимые недостатки. Первый из них связан с необходимостью сопоставления рядов радиального прироста, повреждаемого и не

повреждаемого видов деревьев. Такой подход надёжен и хорошо обоснован, но неприменим в случае отсутствия в регионе исследования подходящей неповреждаемой породы. Именно такая ситуация сложилась в лесостепных и степных борах Сибири, атакованных сосновой пяденицей *Bupalus piniaria* (L.) (Lepidoptera, Geometridae). Но даже при использовании набора признаков, позволяющих не опираться при реконструировании на данные о радиальном приросте не повреждаемого вида, остаются трудности с отделением спадов, вызванных дефолиацией, от таковых, связанных с другими неблагоприятными воздействиями, главным образом, пожарами и засухами [Speer et al., 2001].

Мы попытались создать свободную от этих недостатков методику реконструкции массовых размножений *B. piniaria* на основе особенностей реакции на дефолиацию прироста ранней (РД) и поздней (ПД) древесины. Согласно сделанному допущению, в год дефолиации n потеря ассимиляционного аппарата не повлияет на ксилогенез, так как основной ущерб сосновая пяденица наносит после его завершения. На следующий год $n+1$ влияние дефолиации на прирост РД будет невелико, так как древесина в начале вегетации формируется за счёт накопленных в прошлом году запасных углеводов. Рост же ПД будет ограничен, так как восстанавливающаяся хвоя не сможет синтезировать достаточно питательных веществ для его обеспечения. Сформированный в этом году пул запасных углеводов также будет невелик, что приведёт к уменьшению в год $n+2$ уже прироста РД. Прирост же ПД в этом году начнёт восстановление. Таким образом, на дефолиацию должен указывать резкий и синхронный спад прироста ПД, на следующий год за которым наблюдается такой же спад прироста РД.

Проведена апробация метода при анализе материала, собранного в трёх древостоях из окрестностей г. Бийск (Алтайский край). Из каждого дерева приростным буравом брали один или два керны, после высушивания наклеивали их на деревянные рейки, шлифовали и сканировали с разрешением не ниже 1200 dpi. Ширина годичных колец (ШГК), РП и ДП измерялась в программе CooRecorder (Cybis, Швеция), перекрёстное датирование по ШГК проводили в программе CDendro (Cybis). Если для одного дерева для дальнейшей работы отбирали более одного древесно-кольцевого ряда, то их усредняли. После этого для каждого древостоя в пакете dplR [Bunn, 2008] определяли временные промежутки, на которых величина EPS для ШГК была не ниже 0,85, и далее работали только с ними. Выделение реперных (с резким и синхронным спадом прироста) лет для РД и ПД проводили с помощью dplR по критерию, предложенному в [Becker et al., 1994]. После

этого мы, согласно описанным выше допущениям, выбирали реперные годы для ПД, непосредственно за которыми следовали таковые для РД (рис. 12).

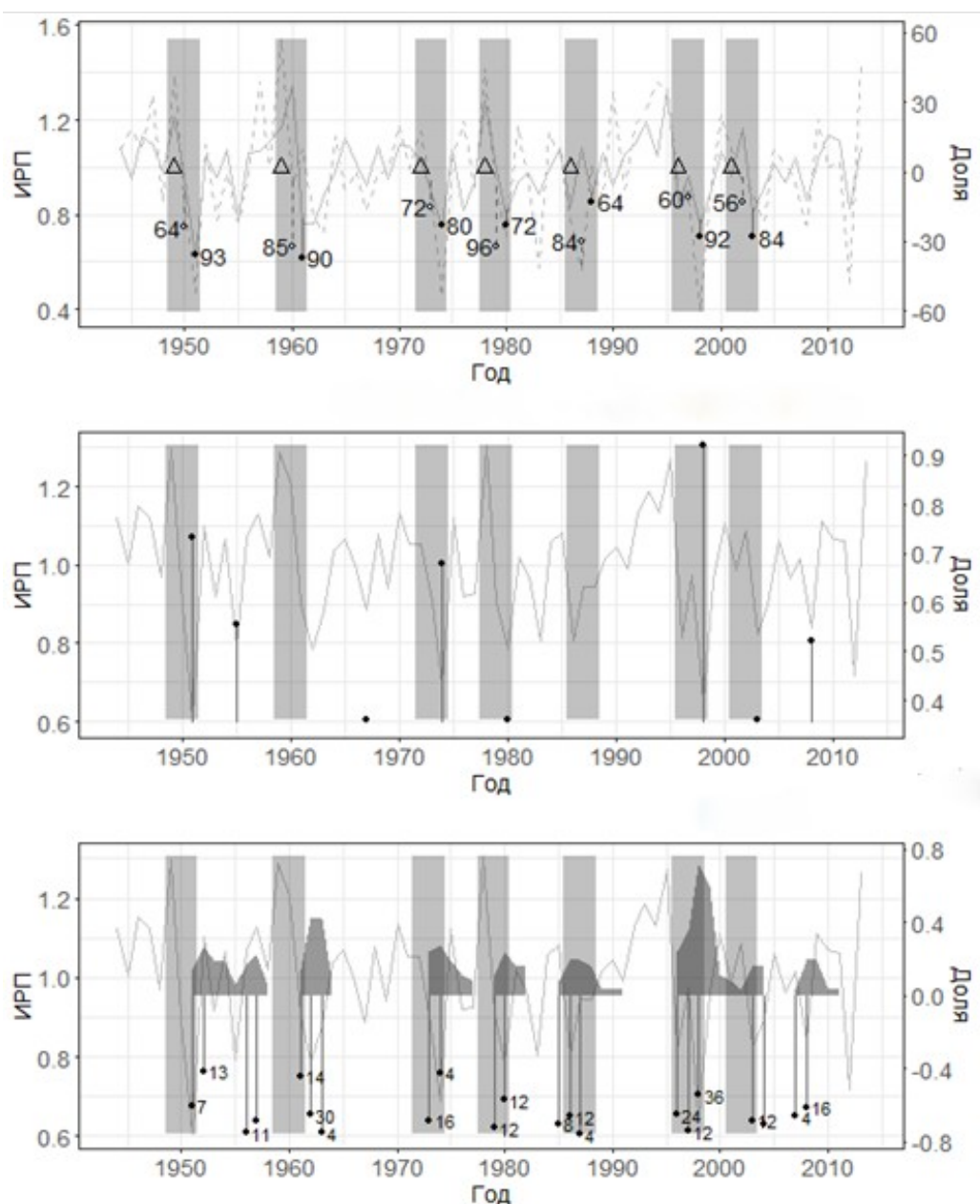


Рисунок 12 – Реконструкция для древостоя Заречье согласно оригинальному методу (вверху), локальным минимумам (в центре), методу OUTBREAK (внизу)

ИРП на всех графиках – индекс радиального прироста. Треугольниками обозначены годы предполагаемой дефолиации, серыми полосами – период её наибольшего влияния на прирост. Пунктир – индексированный прирост поздней древесины, сплошная линия – то же, ранней древесины (вверху) и ширина годичного кольца (в центре, внизу). Вверху: точки без заливки – доля деревьев со спадом прироста поздней древесины, с заливкой – то же, ранней древесины. В центре: точка показывает долю деревьев с локальным минимумом прироста. Внизу: число показывает долю

деревьев с резким спадом ширины годичного кольца, точка – величину спада, тёмно-серая заливка – долю деревьев, для которых в данном году прирост отклонился от среднего на величину ниже пороговой.

Год, предшествующий реперному для ПД, принимали как год дефолиации. Глубину и синхронность спада подбирали так, чтобы они на периоде мониторинга популяции *B. piniaria* (с 1996 года) позволяли обнаружить известные дефолиации, не давая ложноположительных результатов. Кроме того, мы проверили согласованность работы нашего критерия с алгоритмами OUTBREAK [в модификации Speer et al., 2001] и локальных минимумов прироста [Büntgen et al., 2009], параметры которых оптимизировались с той же целью. Преимущество разработанного подхода заключается в меньшем количестве ложноположительных результатов, которые другие алгоритмы на тестовом временном отрезке дали для двух древостоев из трёх. Однако, разработанный метод имеет два ограничения. Первое из них связано с фенологией исследуемого филлофага: он пригоден только если дефолиация будет приходиться на ту часть вегетационного периода, в которой ксилогенез почти полностью или совершенно прекращён. Второе ограничение связано с особенностями анатомии древесины исследуемого вида деревьев: метод неприменим для рассеяно сосудистых видов, у которых ранняя и поздняя древесина не выделяются.

2.4. Разработка методов интегративной видовой диагностики насекомых - вредителей леса для оперативной идентификации аборигенных и чужеродных видов

Проведена ревизия видового разнообразия грацилляриид – представителей экономически важного семейства минирующих молей – вредителей древесных растений в азиатской части России (в Сибири и на Дальнем Востоке), с применением интегративного подхода. ДНК-баркодингу (секвенированию фрагмента гена COI мтДНК) было подвергнуто около 800 особей молей, отнесенных к 70 видам грацилляриид, развивающихся на листьях древесных растений в Сибири и на Дальнем Востоке России. ДНК-баркоды сибирских грацилляриид показали наибольшее генетическое сходство с референсными образцами из стран Северной Европы (Финляндии, Норвегии) и Канады (55% видов), из стран Западной Европы (Австрия, Бельгия, Германия, Франция, Португалия) и Балтии (Литва) (в совокупности 31% видов). ДНК-баркоды дальневосточных грацилляриид надежно кластеризовались в генбанке преимущественно с образцами, имеющими происхождение из Японии и Южной Кореи (67% видов), в меньшей степени с образцами из Европы (Германия, Литва, Финляндия) и Канады (в

совокупности 23% видов). Полученные результаты свидетельствует о близости сибирской фауны грацилляриид к таковой европейской, тогда как для дальневосточная фауна в значительной мере роднится с восточноазиатской, что объясняется природой происхождения видов исследованных макрорегионов.

На филогенетическом дереве (рис. 13), построенном для 70 видов грацилляриид (представленных 170 ДНК баркодами) из Сибири и РДВ, образцы безошибочно группируются в шесть подсемейств: Lithocolletinae (*Phyllonorycter*, *Cameraria*), Parornichinae (*Callisto*, *Parornix*), Gracillariinae (*Caloptilia*, *Gracillaria*), Acrocercopinae (*Sauterina*), Ornixolinae (*Micrurapteryx*, *Parectopa*), Phyllocnistinae (*Phyllocnistis*), что подтверждает недавно предложенную систему таксономии семейства [Kawahara et al., 2017] и свидетельствует о надежной детерминации видов грацилляриид, собранных в азиатской части России, по молекулярно-генетическим характеристикам.

Определены параметры, позволяющие надежно разграничивать близкородственные виды грацилляриид, и проводить их диагностику исключительно по молекулярно-генетическим характеристикам. Среднее значение внутривидовой генетической изменчивости по изученному фрагменту гена у грацилляриид варьирует от $0,25 \pm 0,09\%$ (у представителей рода *Callisto*) до $1,3 \pm 0,1\%$ (*Phyllonorycter*), с максимальным абсолютным значением $2,0\%$ (*Phyllonorycter*) (табл. 6). Средний показатель межвидовой изменчивости принимает значение от $8,06\%$ (у представителей *Gracillaria*) до $13,12\%$ (*Phyllonorycter*), с наиболее высокими абсолютными минимальными и максимальными величинами от $2,8$ до $17,17\%$ у *Phyllonorycter*. Таким образом, для отнесения образцов грацилляриид по их ДНК-баркодам к искомому виду целесообразно придерживаться $2,0\%$ порога. Значения выше этого порога в большинстве случаев будут являться основанием отнесения образца к другому виду. Исключением являются представители *Phyllocnistis*, демонстрирующие максимальный порог внутривидовой изменчивости $3,62\%$, что с одной стороны отражает сложность детерминации видов этого рода, с другой стороны говорит о недостаточно проработанной таксономии группы.

Благодаря ДНК-баркодинку в окрестностях Красноярска был выявлен и описан новый для науки вид моли-пестрянки с караганы – *Phyllonorycter ivani* Kirichenko, Triberti, Lopez-Vaamonde, 2019 (подсем. Lithocolletinae).

№	Род	Число видов	Число повторностей ¹	Генетическая <i>p</i> -дистанция, (%) ²			
				Внутривидовая		Межвидовая	
				M±SE	min–max	M±SE	min–max
1	<i>Callisto</i>	2	3	0,25±0,09a	0,02–0,03	9,13±0,19a	8,90–9,30
2	<i>Caloptilia</i>	10	22	0,36±0,12a	0–1,73	10,66±0,36ab	4,83–15,87
3	<i>Cameraria</i>	1	3	0,94±0,48b	0,16–1,14	–	–
4	<i>Gracillaria</i>	2	4	0	0	8,06±0,21a	8,10–8,30
5	<i>Micrurapteryx</i>	2	4	0,10±0,05a	0–0,16	9,41±0,19a	9,30–9,55
6	<i>Parectopa</i>	1	5	0,38±0,10a	0–0,79	–	–
7	<i>Phyllonorycter</i>	29	332	1,3±0,11b	0–2,0	12,10±2,8b	2,5–17,17
8	<i>Phyllocnistis</i>	5	12	0,44±0,28a	0–3,62	13,12±0,32b	5,6–16,13
ВСЕГО		52	385				

*Расчеты проводились для видов, представленных минимум тремя особями в анализе, с применением метода ближайших соседей и K2P (Двухпараметрического метода Кимуры). M±SE – среднее и стандартная ошибка, min–max – диапазон абсолютным минимальных и максимальных величин. ¹Число секвенированных особей для каждого рода. Серым цветом закрашены ячейки с максимальными значениями. ²*p*-дистанция рассчитана на основе сравнения ДНК-баркодингового фрагмента гена COI мтДНК между особями одного вида или особями разных видов одного рода и выражена процентом несовпадения нуклеотидов в соответствующих позициях гена. В столбцах значения, выделенные разными буквами, достоверно различаются, $p > 0,05$ (U-критерий Манна-Уитни).

2.5 Исследование экзоферментного спектра и фитотоксичности *Hymenoscyphus fraxineus*

Выявлено внутривидовое варьирование спектра и активности экзоферментов возбудителя халарового некроза ясеня *Hymenoscyphus fraxineus* под влиянием внешних условий и в ходе онтогенеза, что снижает вероятность использования показателей экзоферментативной активности в качестве маркеров фитопатогенности *H. fraxineus*. Установлено, что оксидазная, липазная и целлюлазная активности представлены у всех исследованных культур *H. fraxineus*; амилазную и пектолитическую активности проявили, соответственно 64 и 43 % исследованных культур. Отмечено внутривидовое варьирование по наличию ферментативных реакций и степени их интенсивности. Даже в колонии одной и той же культуры ферментативная активность могла изменяться локально, при трансформации вегетативного мицелия в специализированные структуры: у культур 1838, 1841, 1852 и 1860 на участках формирования темного плотного мицелия (предположительно, зачатков стром) усиливались окислительная, липолитическая и целлюлолитическая активности (табл. 7).

Таблица 7 – Изменение ферментативной активности (доли (в %) от общего количества изучаемых культур) при старении *H. fraxineus* и смене среды культивирования

Характер изменения ферментативной активности	Ферментативная активность: О – оксидазная, Л – липазная, Ц – целлюлазная, А – амилазная, П – пектиназная				
	О	Л	Ц	А	П
при старении культур					
Появление или увеличение интенсивности	0	40	40	70	30
Отсутствие изменений	30	50	60	30	40
Уменьшение интенсивности	70	10	0	0	30
на среде ЛЯСА по сравнению со средой СА					
Появление или увеличение интенсивности	77	15	8	0	31
Отсутствие изменений	15	62	69	62	69
Уменьшение интенсивности	8	23	0	38	0

Сравнение ферментативной активности в культурах *H. fraxineus*, растущих на среде ЛЯСА (разбавленное пивное сусло (1°Б) с добавлением отвара листьев ясеня пенсильванского) в течение 1-го и 2-х месяцев, показало, что старение приводило к снижению оксидазной и увеличению амилазной активностей у большинства штаммов. Сравнение ферментативной активности молодых культур *H. fraxineus*, выращенных на средах СА (разбавленное пивное сусло) и ЛЯСА, показали, что у большинства штаммов уровень активности липаз, целлюлаз, амилаз и пектиназ оставался одинаковым на обеих средах, но оксидазная активность у 80% культур увеличивалась на среде ЛЯСА в сравнении со средой СА.

Показана возможность использования тестов на высечках из листьев ясеня для скрининга культур *H. fraxineus* по фитотоксическим свойствам. Выявлена большая устойчивость к грибным метаболитам *H. fraxineus* у ясеня маньчжурского в сравнении с ясенем пенсильванским. Признаки некротизации листовых высечек были отмечены в вариантах с культурами 1701, 1718, 1823, 1838. На высечках наиболее активно действовали тканевые культуры 1701 и 1718 (соответственно, из Теллермановского леса и из Белоруссии) (табл. 8). Следует отметить, что культура 1718, кроме некрозов на листьях *Fraxinus pennsylvanica* Marsh., была способна вызывать крошечные коричневые некротические пятна на целых высечках из листьев *Fraxinus mandshurica* Rupr. (рис. 14), который является аборигеном первичного ареала *H. fraxineus* и достаточно устойчив к этому патогену.

Таблица 8 – Проявление некротизации на высечках из листьев ясеней манчжурского и пенсильванского, после инкубирования с фильтратами культуральных жидкостей: указана доля высечек (%) с некротическими пятнами

Вид ясеня	Прокол в центре высечки	Объем фильтрата, мкл/высечка (повторность)	Культура <i>H. fraxineus</i>			
			1701	1718	1823	1838
<i>Fraxinus pennsylvanica</i>	+	10 (4)	75	50	н.о.	50
	-	10 (4)	0	100	н.о.	25
	+	20 (7)	н.о.	100	0	н.о.
	-	20 (7)	н.о.	14	43	н.о.
<i>Fraxinus mandshurica</i>	+	10 (4)	0	0	н.о.	0
	-	10 (4)	0	100	н.о.	25
	+	20 (7)	н.о.	0	0	н.о.
	-	20 (7)	н.о.	71	14	н.о.

Примечание: «н.о.» означает, что данного варианта тест не проводили

Две споровые культуры из Хабаровска (1823, 1838) демонстрировали более слабую токсическую активность: если не принимать во внимание некротизацию менее 25%, эти культуры вызвали некрозы только на 43 и 50% высечек ясеня пенсильванского. В то же время, следует отметить, что некротизация на высечках не показала четкой зависимости ни от наличия или отсутствия центрального прокола, ни от количества нанесенного фильтрата. Например, в варианте «Ясень пенсильванский – культура 1718, 10 мкл/высечка» 100%-ная некротизация была отмечена на неповрежденных высечках, а на проколотых снижалась до 50%. Подобные варьирования степени некротизации можно было наблюдать и у других культур. Возможное объяснение нестабильности некротизации может быть связано с тем фактом, что, хотя проколы (так же, как и любые микроповреждения поверхности листа) способствуют прямому контакту и воздействию токсических метаболитов гриба на живую фотосинтезирующую ткань ясеня, но при нанесении небольшого количества фильтрата на проколотой диск, жидкость протекала через центральное отверстие под высечку и диффундировала по влажной фильтровальной бумаге. Быстрота протекания (а значит, и время воздействия токсина на растительную ткань) могла, в свою очередь, варьировать в зависимости от диаметра отверстия и вязкости фильтрата использованной культуры.

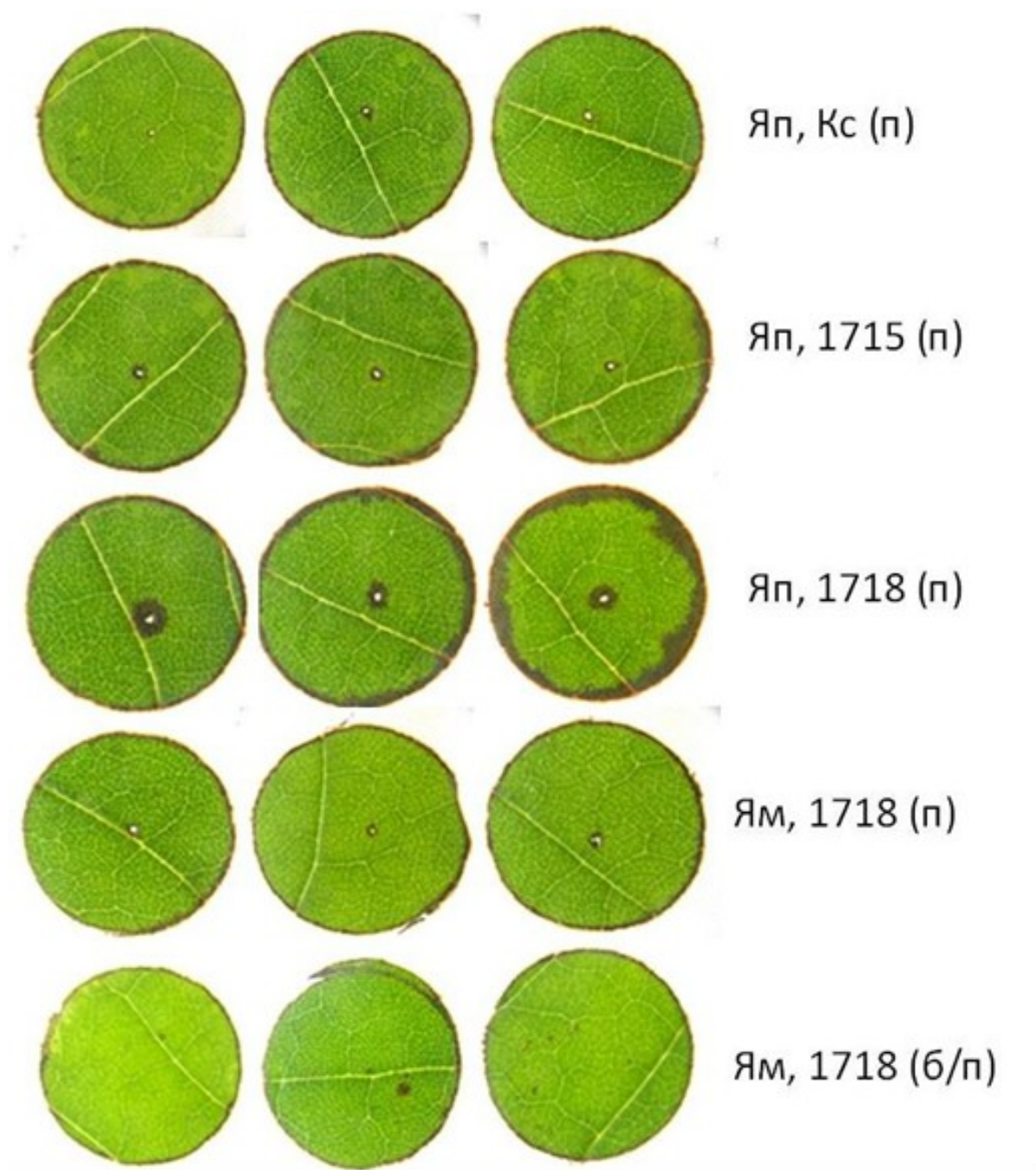


Рисунок 14 – Высечки из листьев ясеней манчжурского (Ям) и пенсильванского (Яп) после нанесения по 20 мкл стерильной среды (Кс), фильтрата жидких культур 1715 (неактивная по токсинообразованию) и 1718 (активная по токсинообразованию) на каждую высечку и выдерживания в течение 7 дней при комнатной температуре. (п) – высечки, проколотые в центре, (б/п) – высечки без прокола

В дополнительных тестах, при нанесении 5-7 мкл фильтрата на проколы листьев ясеней, помещенных в воду, признаки некротизации на листовых пластинках ясеня пенсильванского вызывали культуры 1701, 1718, и 1838 (рис. 15-16). На листьях ясеня

манчжурского маленькие некрозы в местах нанесения фильтратов не отличались от реакции на механическое поранение и контроли с нанесением стерильной воды и среды.

В тестах на листьях, помещенных во влажные камеры, когда 100 мкл фильтрата наносили на подрезанную центральную жилку, у ясеня пенсильванского некрозы вызывали культуры 1718 и 1823 (культура 1838 в этом опыте не использовалась). У ясеня манчжурского отчетливые некрозы образовывались под действием культуры 1718, хотя признаки слабой некротизации (мелкие коричневые пятна вблизи нанесения фильтрата) были отмечены и в варианте с культурой 1823.

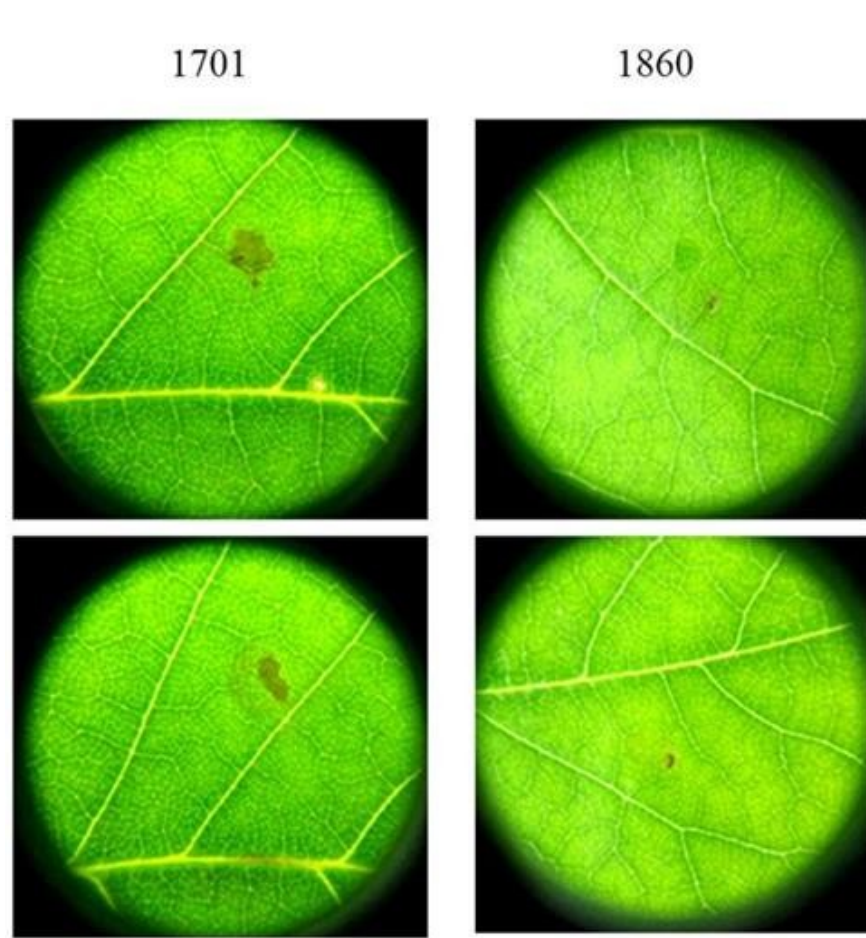


Рисунок 15 – Некротизация листовых пластинок ясеня пенсильванского после укола и нанесения 5-7 мкл фильтратов активной (1701) и неактивной (1860) по токсинообразованию культур (увеличено в 2 раза)

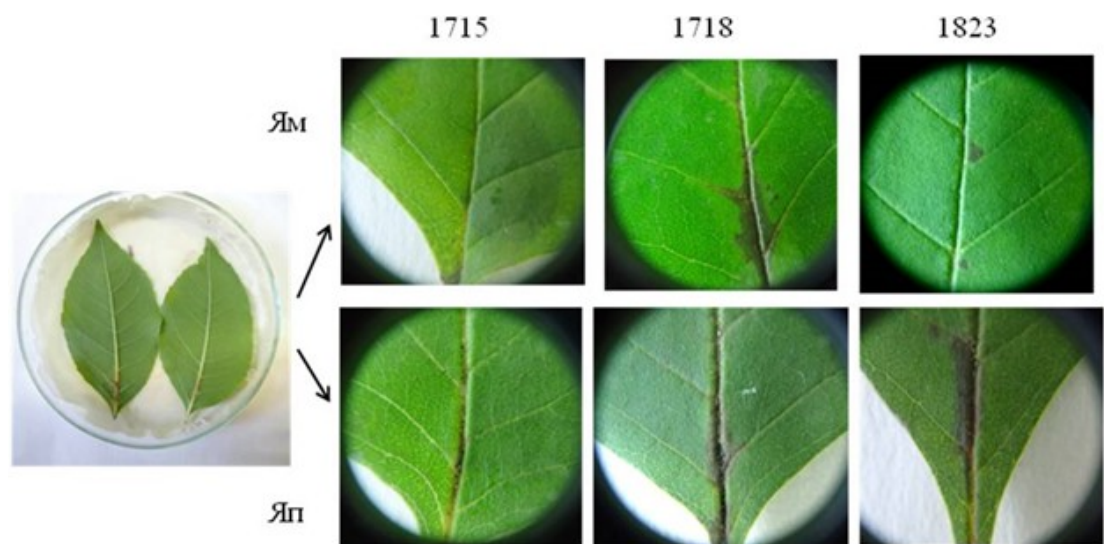


Рисунок 16 – Некротизация тканей (культуры 1718, 1823) и отсутствие реакции (культура 1715) после нанесения 100 мкл фильтратов жидких культур на подрезанную центральную жилку листьев ясеня маньчжурского (Ям) и ясеня пенсильванского (Яп)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В отчете представлены результаты работ по проекту «Устойчивое функционирование лесных экосистем в условиях изменения окружающей среды и интенсивного биотического воздействия при различных сценариях лесопользования». В качестве важнейшего достижения по проекту в целом за 2019 г. позиционированы результаты исследования, в ходе которого впервые проведена сборка и аннотирование круговых митохондриальных геномов четырех видов наиболее значимых в усыхании лесных древостоев корневых патогенов из комплекса *Armillaria mellea* s.l. Выявлены аналогичный порядок генов у видов *A. borealis* и *A. solidipes* и различия у *A. sinapina* и *A. gallica*, что согласуется с их современными филогенетическими отношениями. Установлена высокая вариабельность грибных митогеномов по размеру, содержанию генов и организации генома даже среди близкородственных видов *Armillaria*.

Установлена определяющая роль корневых патогенов *A. mellea* s.l. и *Heterobasidion annosum* s.l. в формировании очагов массового усыхания пихтовых древостоев; выявлен новый сопутствующий возбудитель болезней *Abies sibirica* – гриб *Neonectria fuckeliana*.

Предложен и апробирован способ раннего выявления дендрофильных видов насекомых, которые могут оказаться потенциальными организмами-инвайдерами для других стран или континентов. Предложено в регионе - потенциальном доноре (экспортере) закладывать дозорные плантации наиболее важных древесных растений двух типов: из местных видов («свои») и зарубежных видов растений («чужие»).

Суммируя результаты проделанной работы, следует сделать вывод, что программа запланированных на 2019 год работ выполнена; получены новые научные знания. Возможные области применения результатов целевых исследований: разработка методов биологического контроля наиболее значимых корневых патогенов и насекомых-вредителей и методов оценки фитосанитарного риска расширения ареалов организмов-инвайдеров; прогнозирование рисков вспышек размножения лесных насекомых под воздействием природных и антропогенных модифицирующих факторов.

Кадровый потенциал исполнителей проекта: 3 доктора наук, 9 кандидатов наук, 4 аспиранта; всего 27 научных работников.

В соответствии с государственным заданием в Отчет за 2019 год вошли 9 публикаций, индексируемых Web of Science и / или Scopus.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

ПЕРЕЧЕНЬ СТАТЕЙ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМАТИКЕ ПРОЕКТА В 2019 Г. WEB OF SCIENCE, SCOPUS (9):

1. Kolesnikova A.I., Putintseva Y.A., Simonov E.P., Biriukov V., Oreshkova N.V., **Pavlov I.N.**, Sharov V., Kuzmin D, Anderson J.B., Krutovsky K.V. Mobile genetic elements explain size variation in the mitochondrial genomes of four closely-related *Armillaria* species // BMC Genomics. 2019. Vol. 20, Is. 1. DOI:10.1186/s12864-019-5732-z
2. Moodley O., Sun Y., Sossah F.L., Kakishima M., **Pavlov I.N.**, Li Y., Wang Q. Application of Toxigenic *Alternaria oxytropis* to Soybeans and its Effect on Swainsonine Detection in Different Environments // Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. 2019 Feb;102(2):268-274 DOI: 10.1007/s00128-018-2496-07
3. Желифонова В. П., Антипова Т. В., **Литвинова Е.А.**, Баскунов Б.П., **Литовка Ю.А.**, **Павлов И.Н.**, Козловский А. Г. Биосинтез протоиллуденовых сесквитерпеновых арильных эфиров сибирскими штаммами грибов рода *Armillaria* // Прикладная биохимия и микробиология. 2019. Т55, №3, С. 1–7. DOI: 10.1134/S0555109919030152 [Версия на английском языке: Zhelifonova V.P., Antipova T.V., **Litvinova E.A.**, Bascunov B.P., **Litovka Yu.A.**, **Pavlov I. N.**, Kozlovsky A. G. Biosynthesis of Protoilludene Sesquiterpene Aryl Esters by Siberian Strains of the Genus *Armillaria* Fungi // Applied Biochemistry and Microbiology, 2019, Vol. 55, No. 3, pp. 277–283. DOI: 10.1134/S0003683819030153].
4. Kuz'min V. I. Magnetism in spin crossover systems: Short-range order and effects beyond the Heisenberg model / V. I. Kuz'min, Yu. S. Orlov, A. E. Zarubin, **T. M. Ovchinnikova**, S. G. Ovchinnikov // PHYSICAL REVIEW B, 2019. V. 100 (14). P. 144429 DOI: 10.1103/PhysRevB.100.144429 ISSN 24699950
5. Semizer-Cuming D. Saving the world's ash forests calls for international cooperation now / D. Semizer-Cuming, K.V. Krutovsky, Y.N. Baranchikov, E.D. Kjær, C.G.Williams// Nature Ecology & Evolution, 2019. V.3. P. 141–144. <https://doi.org/10.1038/s41559-018-0761-6>
6. Morales-Rodríguez C. Forewarned is forearmed: harmonized approaches for early detection of potentially invasive pests and pathogens in sentinel plantings / C. Morales-Rodríguez, S. Anslan, M.-A. Auger-Rozenberg, S. Augustin, **Yu. Baranchikov**, A. Bellahirech, D. Burokienė, D. Čepukoit, E. Çota, K. Davydenko, T. Doğmuş Lehtijärvi, R. Drenkhan, T. Drenkhan, R. Eschen, I. Franić, M. Glavendekić, M. de Groot, M. Kacprzyk, M. Kenis, **N. Kirichenko**, I. Matsiakh, D. Musolin, J. Nowakowska, R. O'Hanlon, S. Prospero, A. Roques, A.

Santini, V. Talgø, L. Tedersoo, A. Uimari, A. Vannini, J. Witzell, S. Woodward, S. Zambounis, M. Cleary // *Neobiota*, 2019. Vol. 47. P. 95-123. doi: 10.3897/Neobiota.47.34276

7. **Kirichenko N.** Exploring species diversity and host plant associations of leaf-mining micromoths (Lepidoptera: Gracillariidae) in the Russian Far East using DNA barcoding / **N. Kirichenko**, P. Triberti, E. Akulov, M. Ponomarenko, S. Gorokhova, V. Sheiko, C. Lopez-Vaamonde // *Zootaxa*, 2019. Vol. 4652, № 1. P. 1–55. DOI: 10.11646/zootaxa.4652.1.1

8. Kirichenko N. New species of leaf-mining Phyllonorycter (Lepidoptera Gracillariidae) from Siberia feeding on Caragana (Fabaceae) / N. Kirichenko, P. Triberti, C. Lopez Vaamonde // *ZooKeys*, 2019. Vol. 835. P. 17–41. doi: 10.3897/zookeys.835.33166

9. Kirichenko N.I. Past distribution of Tilia-feeding Phyllonorycter micromoth (Lepidoptera: Gracillariidae) in the Russian Far East based on survey of historical herbarium / N.I. Kirichenko, E.N. Akulov, N.S. Babichev, I.A. Mikhailova, M.G. Ponomarenko, C. Lopez-Vaamonde // *Far Eastern Entomologist*, 2019. № 390. P. 19-32. <https://doi.org/10.25221/fee.390.3>

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

ПЕРЕЧЕНЬ КОНФЕРЕНЦИЙ В КОТОРЫХ УЧАСТВОВАЛИ С УСТНЫМИ ДОКЛАДАМИ ИСПОЛНИТЕЛИ ПРОЕКТА (15):

1. XI European Congress of Lepidopterology, 3-7 июня 2019, Кампобассо, Италия.
2. 8th International Barcode of Life Conference, 17-20 июня 2019, Тронхейм, Норвегия.
3. IUFRO WP 7.03.10 Methodology of forest insect and disease survey in Central Europe conference: "Recent Changes in Forest Insects and Pathogens Significance", Working Party Meeting, 16-20 сентября 2019, Сучава, Румыния.
4. International conference LIFE ARTEMIS "Detection and control of forest invasive alien species in a dynamic world", 25–28 сентября 2019, Любляна, Словения.
5. 2-ая Всероссийская конференция с международным участием «Мониторинг и биологические методы контроля вредителей и патогенов древесных растений: от теории к практике», 22-26 апреля 2019 г., ГБС РАН, Москва.
6. VII Всероссийская конференция «Аэрокосмические методы и геоинформационные технологии в лесоведении, лесном хозяйстве и экологии». 22-24 апреля 2019 г. Москва
7. Чтения памяти А.И. Куренцова, 5-6 марта 2019, ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН, Владивосток.
8. Шестая Национальная научная конференция с международным участием ЭкоМатМод-2019. Математическое моделирование в экологии. 26–29 сентября 2019 г. Пущино.
9. Научно - практический семинар «История, достижения и взгляд в будущее: 50 - летний опыт защиты леса в Красноярском крае и Республике Хакасия». ЦЗЛ Красноярского края, филиал ФБУ "Российский центр защиты леса". МВДЦ Сибирь, 4 сентября 2019 г. Красноярск.
10. Всероссийская конференция с международным участием, посвященная 75-летию Института леса им. В. Н. Сукачева СО РАН «Лесные экосистемы бореальной зоны: биоразнообразие, биоэкономика, экологические риски», 26–31 августа 2019 г., Красноярск.
11. Международная конференция молодых ученых Экология Южной Сибири и сопредельных территорий. 20-22 ноября 2019 г. Абакан.

12. Актуальные проблемы аграрного права. Всероссийская конференция с международным участием. 15-19 октября 2019 г. Тамбов.

13. Экология и эволюция: новые горизонты: Международный симпозиум, посвященный 100-летию академика С. С. Шварца (1–5 апреля, 2019, г. Екатеринбург).

14. XXII конференция молодых ученых ФИЦ КНЦ СО РАН. Красноярск: ФИЦ КНЦ СО РАН, 2019.

15. Всероссийская научно-практическая конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Молодые ученые в решении актуальных проблем науки». 25–26 апреля 2019 г. Красноярск.

ПРИЛОЖЕНИЕ В

ПЕРЕЧЕНЬ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИХ ПРОГРАММ И ПРОЕКТОВ,
РУКОВОДИТЕЛЯМИ (ОТВЕТСТВЕННЫМИ ИСПОЛНИТЕЛЯМИ) КОТОРЫХ
ЯВЛЯЮТСЯ ИСПОЛНИТЕЛИ ПРОЕКТА (5):

1. Грант РФФИ [19-04-00197](#) «Молекулярные основы действия бакуловирусов на популяционную динамику лесных насекомых-филлофагов» (отв. исполнитель В.Г. Суховольский).

2. Грант РФФИ 17-04-01765а «Механизмы внутри- и межвидовой коммуникации инвазийного энтомо-микологического тандема с пихтой сибирской» (отв. исполнитель Т. М. Овчинникова).

3. Грант РФФИ 19-04-01029 «Тайны вековых гербарных коллекций: ретроспективный молекулярно-генетический анализ истории инвазии и поиск агентов биоконтроля вредоносной липовой моли-пестрянки в Палеарктике» (отв. исполнитель Н.И. Кириченко).

4. Хоздоговор № 739/19 «Оказание услуг по выполнению мониторинга состояния и загрязнения окружающей среды на территории объектов размещения отходов ООО «Медвежий ручей» в пределах их воздействия на окружающую среду в 2019 году» (отв. исполнитель И.Н. Павлов).

5. Хоздоговор КНЦ-2019 «Комплексная оценка состояния компонентов окружающей среды на территориях объектов размещения отходов ЗФ ПАО «ГМК «Норильский никель» и в пределах их воздействия на окружающую среду» (отв. исполнитель И.Н. Павлов).

