

## МЕТОДОЛОГИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ

УДК 632.4+58.08+674.031.931.2

### ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ВЫСЕЧЕК ИЗ ЛИСТЬЕВ ЯСЕНЯ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ФИТОПАТОГЕННЫХ СВОЙСТВ ГРИБА *Hymenoscyphus fraxineus*

Н. В. Пашенова<sup>1</sup>, Л. Г. Серая<sup>2</sup>, Ю. Н. Баранчиков<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт леса им. В. Н. Сукачева СО РАН – обособленное подразделение ФИЦ КНЦ СО РАН 660036, Красноярск, Академгородок, 50/28

<sup>2</sup> Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии 143050, Московская обл., Одинцовский р-н, п. п. Большие Вяземы, ул. Институт, владение 5

E-mail: pasnat@ksc.krasn.ru, lgseraya@gmail.com, baranchikov\_yuri@yahoo.com

Поступила в редакцию 24.06.2022 г.

Лабораторный метод изучения грибной фитотоксичности на высечках из листьев апробирован на грибе *Hymenoscyphus fraxineus* (Т. Kowalski) Baral, Queloz & Hosoya – возбудителе усыхания ясеня (*Fraxinus L.*). Использовали 12 культур гриба, происходящие из исходного и инвазийного ареалов возбудителя, и листья ясеней маньчжурского (*Fraxinus mandshurica* Rupr.) и пенсильванского (*F. pennsylvanica* Marsh.), различающихся по устойчивости к данному фитопатогену. После роста грибов на жидких питательных средах фильтраты культур наносили на высечки из листьев ясеней, помещенные во влажные камеры. Некротизация фотосинтезирующих тканей отмечена после действия экзометаболитов некоторых культур. Крупные некрозы развивались только на высечках из листьев ясеня пенсильванского. Это свидетельствует о том, что данный вид менее устойчив к *H. fraxineus* по сравнению с ясенем маньчжурским. Географическое происхождение и состав питательной среды не влияли на способность культур вызывать некроз. Анализ результатов указывал на вероятную положительную связь между некротизирующей активностью культуральной жидкости и уровнем урожайности биомассы. Можно предположить, что факторы, индуцирующие некроз, появились в культурах на стационарной стадии роста гриба. Не обнаружено совпадения результатов лабораторных опытов с листовыми высечками и полевых опытов по инокуляции мицелия *H. fraxineus* в стволы молодых ясеней. Обсуждается дефицит знаний о физиологии *H. fraxineus* и механизмах взаимодействия этого фитопатогена с хозяином. Сделан вывод о пригодности лабораторного метода с использованием высечек из листьев для изучения факторов фитопатогенности *H. fraxineus*, действующих при заселении фотосинтетической части кроны у чувствительных видов ясеня.

**Ключевые слова:** усыхание ясеней, гриб-возбудитель *Hymenoscyphus fraxineus*, лабораторный тест для выявления фитопатогенности.

DOI: 10.15372/SJFS20230106

#### ВВЕДЕНИЕ

Гриб *Hymenoscyphus fraxineus* (Т. Kowalski) Baral, Queloz & Hosoya является причиной массового усыхания ясеней (*Fraxinus L.*) в Европе, в том числе и в России. Жизненный цикл гриба начинается на восприимчивых видах ясеней с заражения аскоспорами листьев, что приводит к их усыханию и опадению. Гриб продолжает сапротроф-

ное развитие в опавших листьях (в подстилке), а после перезимовывания образует на черешках плодовые тела (апотеции), которые при созревании выбрасывают в воздух огромное количество аскоспор. Большинство зараженных листьев опадают без перехода гриба в одревесневшие органы хозяина (Schwanda, Kirisits, 2016), но в редких случаях гриб проникает через листовые черешки в ветви и стволы ясеня, продолжая раз-

витие во внутренней коре (флоэме) надземных частей растения. Кроме того, установлено, что *H. fraxineus* может вызывать некрозы внутренней коры в области корневой шейки (Landolt et al., 2016). Возможно, в этом принимают участие мелкие эндоконидии, продуцируемые конидиеносцами *Chalara*-типа, которые формируются при бесполой стадии развития *H. fraxineus*. Изначально конидиям приписывали роль сперматозоидов, вовлеченных в половой процесс гриба, но уже опубликованы свидетельства их участия в заражении листьев и корней сеянцев ясеня через почву (Fones et al., 2016).

Поскольку *H. fraxineus* относят к некротрофным фитопатогенам, продуцируемые им фитотоксины не остались без внимания при исследовании взаимоотношений гриба и хозяина. В культуральных экстрактах *H. fraxineus* обнаружено множество вторичных метаболитов, один из которых – токсин виридиол – вызывал некротизацию листьев восприимчивого вида ясеня обыкновенного (*Fraxinus excelsior* L.). Однако дальнейшие работы не подтвердили безусловной связи виридиола, продуцируемого культурами *H. fraxineus*, с фитопатогенной активностью последних, что предполагает наличие иных, пока еще не известных, факторов фитопатогенности (Juncker et al., 2014).

В основном негативное воздействие гриба на неустойчивые виды ясеня проявляется в двух взаимосвязанных аспектах: сначала споры гриба (аскоспоры) поражают листья, вызывая их некротизацию, усыхание и опад, впоследствии гриб может продвинуться в побеги и стволы деревьев, где вызывает некротизацию флоэмы. Высказано мнение, что решающее значение для функционирования гриба в природе и для эволюции механизмов его взаимодействия с растениями-хозяевами имеют инфицирование и колонизация листьев, а развитие гриба в одревесневших частях растения, скорее всего, носит тупиковый характер (Landolt et al., 2016).

Обращает на себя внимание большое разнообразие методик для оценки фитопатогенных свойств *H. fraxineus*. В работе с этим грибом применяли разные подходы. В качестве инокуляционного материала использовали мицелий, выращенный на древесине (щепки, опилки), суспензии аскоспор и конидий, собранных в природе или полученных в лабораторных условиях. Инокуляции делали на стволах саженцев в открытом грунте или теплицах, споры наносили на поверхность листьев, помещенных во влажные камеры, делали инъекции в листо-

вые черешки саженцев в горшках, обрабатывали суспензиями семена ясеня или проростки, выращенные в аксенической культуре. (Juncker et al., 2014, 2017; Kowalski et al., 2017; Orton et al., 2018). Однако эталонные методики оценки фитопатогенной активности для *H. fraxineus* пока не предложены.

Целью работы было проверить пригодность лабораторной методики изучения фитотоксических свойств грибов на листовых высеках для исследования факторов патогенности *H. fraxineus*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Для работы использовали 12 культур *H. fraxineus*, полученных при рассеивании аскоспор гриба на плотной среде (споровые изоляты) или изолированных из проводящих тканей побегов ясеня, поврежденных грибом (тканевые изоляты) (табл. 1). Образцы для изолирования культур собирали в 2017–2018 гг. на территории Российской Федерации, Республики Беларусь и Швеции. Культуры поддерживали в рабочей коллекции Института леса им. В.Н. Сукачева СО РАН на скошенном сушлом агаре при температуре 4 °С, пересев на свежую среду выполняли 1 раз в течение года.

### Получение культуральных фильтратов.

Культуры выращивали на трех жидких средах: 1) С – жидкое пивное сусло (содержание сахаров – 3–4 градуса Баллинга (3–4 °Б)); 2) МС – жидкое пивное сусло (1–2 °Б) с добавлением отвара листьев ясеня маньчжурского (*Fraxinus mandshurica* Rupr.); 3) ПС – жидкое пивное сусло (1–2 °Б) с добавлением отвара листьев ясеня пенсильванского (*F. pennsylvanica* Marsh.). Культивирование проводили в бактериологических пробирках в течение 3 мес, в стационарных условиях при 24 °С. Инокулом для засева жидких сред получали, выращивая грибы на агаризованных средах указанного выше состава в течение 1 мес при комнатной температуре. Для засева жидкой среды использовали мицелий, выращенный на соответствующей по составу агаризованной среде. В каждую пробирку, содержащую 10 мл среды, помещали 1 агаровый блок с мицелием (диаметр 6 мм), вырезанный из колонии соответствующей культуры. Контрольными вариантами служили стерильные среды, инокулируемые в тех же условиях, что и засеянные пробирки.

**Таблица 1.** Культуры гриба *Hymenoscyphus fraxineus*, использованные в работе

Шифр культур	Год изолирования	Происхождение	Характеристика культуры
Cf 1702	2017	РФ, Воронежская обл.	Тканевая
Cf 1704	2017	РФ, Ленинградская обл.	»
Cf 1806*	2018	Республика Беларусь	Споровая
Cf 1718	2017	Там же	Тканевая
Cf 1720	2017	»	»
Cf 1823	2018	РФ, г. Хабаровск	Споровая
Cf 1825	2018	» »	»
Cf 1830	2018	» »	»
Cf 1838	2018	» »	»
Cf 1852	2018	Швеция, о. Готланд	»
Cf 1853	2018	» »	»
Cf 1860	2018	» »	»

\* Культура *H. fraxineus* 1806 отсеяна из отдельно расположенной колонии, развившейся при попытке рассева конидий из культуры 1718.

Отбор проб проводили после 2 и 3 мес роста. Мицелиальную биомассу отфильтровывали в стерильных условиях через складчатые бумажные фильтры Macherey-Nagel MN 612 ¼ (Germany) и сушили для взвешивания. Из пробирок с фильтрами стерильно отбирали 1–1.5 мл для тестов на фитотоксичность, в фильтрах измеряли уровень рН. Стерильные среды без засева грибами (контроли) также подвергались фильтрации.

**Оценка фитотоксичности.** Проводилась согласно методике А. О. Берестецкого с соавт. (2010), предполагающей нанесение раствора метаболитов фитопатогена на высечки из листьев, помещенных во влажную камеру.

В работе использовали листья ясеней маньчжурского и пенсильванского из дендрария Института леса им. В. Н. Сукачева СО РАН. Опыты проводили в летний сезон 2020 г., 6 июля и 3 августа, соответственно для культуральных фильтратов после 2 и 3 мес роста грибов. Свежие листья собирали с деревьев соответствующего вида в день выполнения теста, промывали водопроводной водой, подсушивали в течение часа при комнатной температуре для удаления капельной влаги. Высечки делали пробочным сверлом (диаметр 10 мм), по обе стороны от центральной жилки листочков. Использовали только средние пары листочков, расположенные между непарным верхним и парными нижними листочками.

В центре каждой высечки иглой диаметром 0.4 мм делали перфорацию: разрез 1–1.5 мм (тест от 06.07.2020) или укол (тест от 03.08.2020). Вы-

сечки располагали рядами в стерильных влажных камерах, приготовленных из чашек Петри, нижней стороной листа к фильтровальной бумаге. На каждую высечку в месте укола наносили по 10 мкл определенного культурального фильтрата. В контрольных вариантах наносили по 10 мкл стерильной среды или стерильной воды. Влажные камеры располагали в один слой на лабораторном столе, в стороне от прямого солнечного света. Чашки оставляли при естественном чередовании дневного и ночного периодов в течение 2 сут. По истечении этого срока учитывали образование коричневых некротических пятен на поверхности высечек. В обоих тестах для каждого варианта повторность составляла 7 высечек.

**Инокулирование деревьев.** Эксперименты выполняли на территории питомника ООО «Мамина дача» (с. Богородское Владимирской обл.). Заражение молодых однолетних деревьев ясеней маньчжурского и пенсильванского (возраст 7–10 лет, диаметр стволиков от 14 до 38 мм) проводили в конце июня 2019 г. (рис. 1, а). Инокулюм в виде агаровых блоков, вырезанных из колоний грибов, которые выращивали в течение месяца на агаровой среде с сусликом и отваром листьев ясеня пенсильванского, помещали в лунки (6 мм), пробиваемые пробочным сверлом через слой внешней коры стволиков (рис. 1, б, в).

Металлический инструментарий (пробочное сверло, скальпель и проч.) стерилизовали этиловым спиртом и обжигали в пламени, для закладки блоков в лунки использовали одноразовые деревянные шпильки (зубочистки), стерилизованные





**Рис. 1.** Инокулирование деревьев ясеней маньчжурского и пенсильванского в питомнике ООО «Мамина дача». *а* – общий вид посадок ясеня пенсильванского; *б, в, г* – последовательные этапы инокуляции; *д, е, ж, з* – результаты инокуляции в течении 4 мес.



автоклавированием (рис. 1, в). Поверхность стволов не стерилизовали. Лунку с инокулюмом закрывали высеченной коровой пробкой и наносили сверху тонкий слой медицинского клея БФ-6, чтобы предотвратить высыхание растительных тканей (рис. 1, з). Полевые опыты по тестированию носили ограниченный характер, в них использованы только 4 культуры из исследуемых 12 культур гриба.

Учет некрозов флоэмы проводили через 4 мес, зачищая тонкий слой внешней коры и измеряя длину некрозов флоэмы (рис. 1, д, е, ж, з). Инокулирование выполняли в 10-кратной повторности.

Первичные данные обрабатывали статистически, используя возможности пакетов программ Microsoft Excell 2007 и Statistica 8.

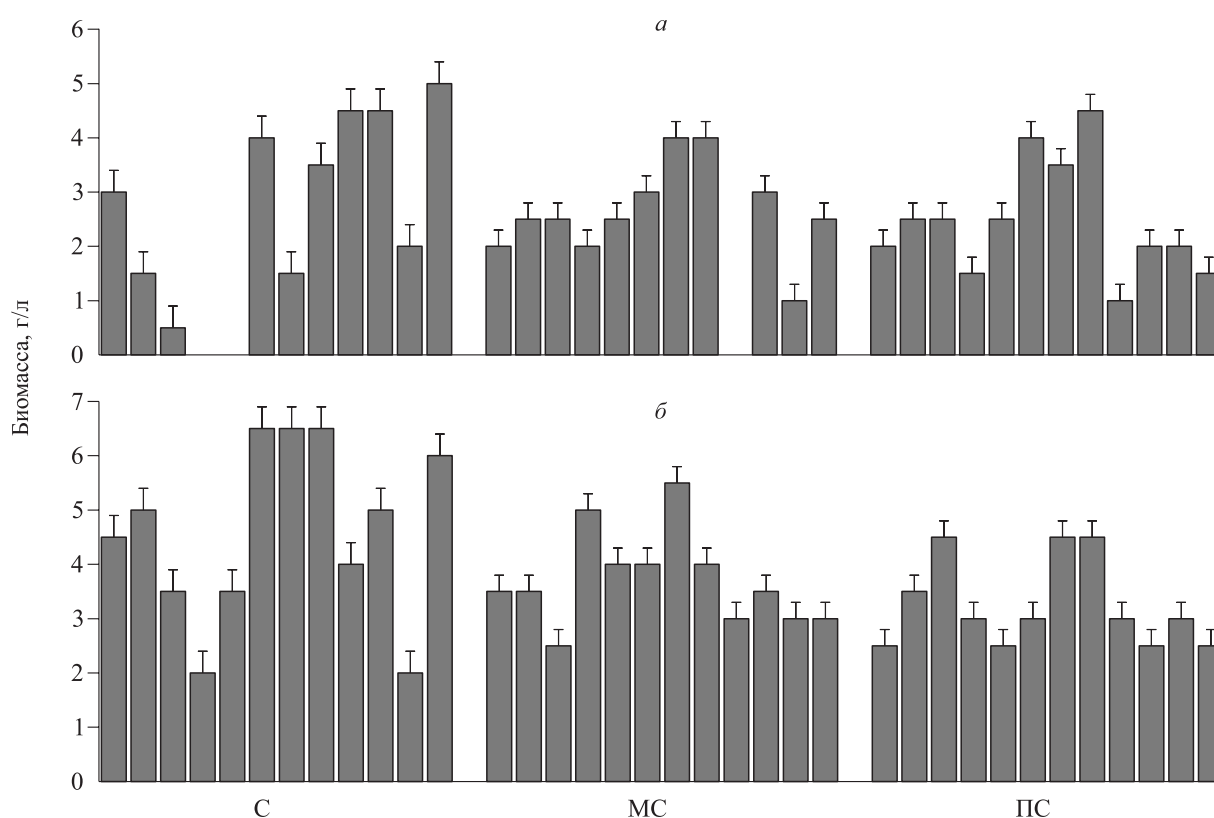
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Особенности физиологии культур *H. fraxineus* при росте на жидких средах.** Большое внутривидовое разнообразие культур *H. fraxineus* уже отмечалось в литературе (Juncker et al., 2017), и данные по накоплению

биомассы на жидких средах в нашем эксперименте также подтверждают это. Результаты (рис. 2) показали различное отношение исследуемых культур к составу сред, использованных для выращивания.

Некоторые культуры, например «белорусские» cf 1718, 1806 и 1720, демонстрировали долгий период адаптации и отсутствие роста на сусле и только после 3 мес культивирования показали умеренный рост (2–3 г/л по абсолютно сухой массе (а. с. м.)). Другие культуры, уже на 2-й месяц достигали уровня биомассы 4–5 г/л и либо прекращали активный рост (cf 1830 на ПС, cf 1853 на С) или продолжали накапливать биомассу на 3-й месяц (cf 1825 на МС). Полученные данные не показали связи между активностью роста на разных средах и географическим происхождением или способом изолирования (тканевые, споровые) культур *H. fraxineus*.

Несмотря на то что исследуемые культуры проявляли различия по скорости накопления биомассы на той или иной среде, средние показатели урожайности по всей выборке (12 культур) для разных сред различались мало. Данные, представленные в табл. 2, позволяют предполо-



**Рис. 2.** Индивидуальные показатели урожайности биомассы ( $x \pm m$ , г/л) исследуемых культур после роста на жидких средах в течение 2 (а) и 3 (б) мес.

Сусло: С – разбавленное, МС и ПС – с отваром листьев ясеней маньчжурского и пенсильванского. (Последовательность культур слева – направо отвечает порядку их перечисления в табл. 1).

**Таблица 2.** Накопление биомассы ( $x \pm \sigma$ , г а. с. м./л) при лабораторном стационарном культивировании гриба *H. fraxineus* на жидких средах ( $n = 12$ )

Среда	Время культивирования, мес		Доверительная вероятность по критерию Манна – Уитни, период, мес			
	2	3	2		3	
			МС	ПС	МС	ПС
С	$2.5 \pm 1.8$	$4.6 \pm 1.6$	0.86	0.98	0.12	0.03
МС	$2.4 \pm 1.1$	$3.7 \pm 0.9$	–	0.70	–	0.15
ПС	$2.5 \pm 1.1$	$3.3 \pm 0.8$	–	–	–	–

жить, что разбавленное сусло без добавок было более благоприятной средой для культивирования *H. fraxineus* и обеспечивало немногим большее накопление мицелиальной массы, чем среды с отварами листьев ясеней.

Но статистически достоверные различия проявились только между показателями урожая на С и ПС после 3 мес роста (табл. 2).

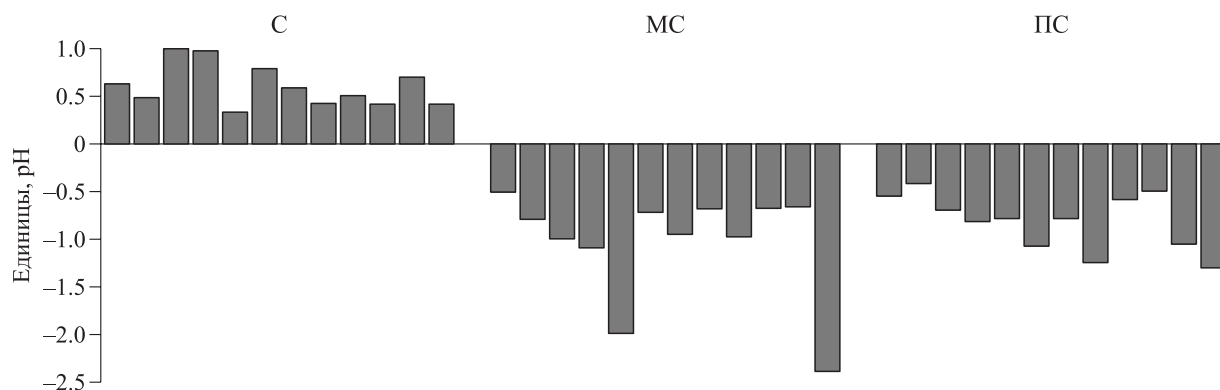
Перед культивированием исходные значения активной кислотности сред, за которые приняты показания рН стерильных сред (контроли), были близки и составляли 5.6, 5.4 и 5.6, соответственно для сред С, МС и ПС. Максимальные изменения показателей активной кислотности среды в процессе роста составили до 4.66 (cf 1806 – среда С), до 7.75 (cf 1860 – среда МС) и до 6.86 (cf 1860 – среда ПС). Рассчитанная для каждой культуры разница между показателями рН в начале и конце культивирования представлена на рис. 3.

Можно видеть, что внутривидовое варьирование также проявилось при регуляции активной кислотности среды в процессе роста. Общим для всех культур было то, что рост на сусле сопровождался снижением активной кислотности среды (показатели разницы положительны), а на средах с отварами листьев ясеней уровень

рН, наоборот, увеличивался, сдвигаясь к нейтральным и даже слабощелочным значениям (показатели разницы отрицательны).

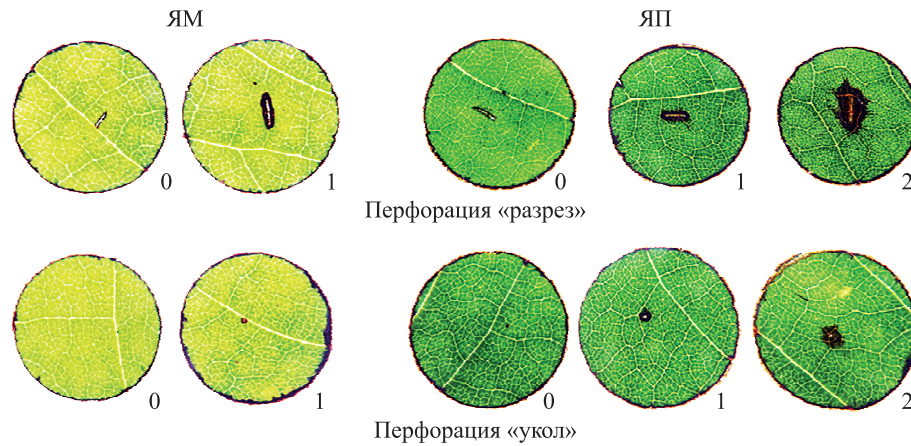
**Некротизация листовых высечек под действием культуральных фильтратов *H. fraxineus*.** Проверка некротизирующей способности стерильных сред и культуральных жидкостей показала, что уже на 2-е сутки от начала теста можно было выделить три типа реакции фотосинтезирующей ткани: 0 – отсутствие визуально заметной некротизации ткани вокруг центральной перфорации; 1 – отчетливая рыжевато-коричневая полоса вокруг центральной перфорации; 2 – коричневое пятно с нечеткими краями вокруг центральной перфорации (рис. 4).

Хотя фильтрация через бумажный фильтр не могла гарантировать полное отсутствие грибных пропагул в фильтраатах, но быстрое, через 2-е суток, проявление некротизации, исключало вероятность того, что эта реакция была вызвана живым грибом. В работе J. W. Mansfield и соавт. (2018) сообщается, что при нанесении аскоспор *H. fraxineus* на неповрежденную поверхность листовой пластинки или листовых черешков ясеня обыкновенного признаки некрозов в лабораторных условиях появлялись только на 7–9-е сутки. Основываясь на своих наблю-

**Рис. 3.** Максимальная разница значений рН в начале (контроли – стерильные среды) и в конце роста культур *H. fraxineus*.

С – чистое сусло, МС и ПС – сусло с добавлением отвара листьев ясеня маньчжурского и пенсильванского соответственно. (Последовательность культур слева – направо отвечает порядку их перечисления в табл. 1).





**Рис. 4.** Примеры реакции ткани листьев ясеня маньчжурского (ЯМ) и ясеня пенсильванского (ЯП) после нанесения опытных и контрольных жидкостей на высечки.

Реакция: 0 – отсутствие; 1 – слабая; 2 – активная.

дениях, авторы относят *H. fraxineus* к фитопатогенам с временным биотрофным способом паразитирования (pathogens with a temporarily biotrophic mode of infection): аскоспоры на поверхности листьев прорастают гаусториями, которые проникают в растительные клетки уже на 2-е–3-и сутки после инокуляции, но в начальный период колонизации (3-и–5-е сутки) гриб не вызывает гибель клеток хозяина и появления признаков некротизации. Отсутствие некротической реакции на высечках (0 баллов) ожидаемо наблюдали после нанесения стерильной воды и стерильных сред. Но такой же эффект наблюда-

ли после воздействия культуральной жидкости некоторых изолятов. Например, реакция на листьях обоих видов ясеней отсутствовала после действия фильтратов культур cf 1720, 1825 и 1860 (рост на средах МС и ПС), культуральный фильтрат cf 1853 (после роста на средах С и МС) вызвал слабую некротизацию только на листьях ясеня пенсильванского. Культуры cf 1702 и 1838 не вызывали некротизацию листьев обоих видов ясеня, если росли на средах ПС и МС, соответственно (табл. 3).

Несмотря на большое варьирование данных (табл. 3), очевидно, что наиболее активная реак-

**Таблица 3.** Некротизирующая активность\* культуральной жидкости *H. fraxineus* после роста на средах: разбавленное сусло (С), разбавленное сусло + отвары листьев ясеней маньчжурского (МС) и пенсильванского (ПС), балл

Шифр культуры	Высечки из листьев					
	я. маньчжурский			я. пенсильванский		
	С	МС	ПС	С	МС	ПС
Cf 1702	1	1	0	2	2	2
Cf 1704	1	1	1	1	1	1
Cf 1806	1	1	1	1	1	2
Cf 1718	0	1	0	0	2	1
Cf 1720	1	0	0	1	0	0
Cf 1823	1	1	1	2	1	1
Cf 1825	0	0	1	0	0	0
Cf 1830	1	1	1	2	2	2
Cf 1838	1	0	1	2	0	1
Cf 1852	1	1	1	2	2	2
Cf 1853	0	0	0	1	1	0
Cf 1860	0	0	0	1	0	0

\* Оценка дана в баллах. Приведена максимальная проявившаяся реакция по совокупности двух экспериментов.

**Таблица 4.** Средняя урожайность биомассы культур\* *H. fraxineus* ( $x \pm \sigma$ , г а. с. м./л), культуральные фильтраты которых вызвали разную активность некротизации листьев ясеней и число культур, у которых проявилась соответствующая реакция (в скобках)

Среда для роста грибов	Я. маньчжурский		Я. пенсильванский		
	Активность реакции некротизации на листьях, балл				
	0	1	0	1	2
С	2.0 ± 0.0 (2)	5.1 ± 1.2 (7)	2.0 ± 0.0 (1)	3.5 ± 1.5 (3)	5.4 ± 1.0 (5)
МС	3.0 ± 0.0 (2)	3.7 ± 0.8 (7)	3.0 ± 0.0 (1)	3.3 ± 0.7 (4)	4.0 ± 0.7 (4)
ПС	2.8 ± 0.3 (3)	3.7 ± 0.8 (6)	2.8 ± 0.3 (3)	3.3 ± 0.5 (3)	3.8 ± 1.2 (3)

\* Без учета данных по культурам cf 1720, 1825 и 1860.

ция некротизации (2 балла) проявлялась только на листьях ясеня пенсильванского, но не маньчжурского. Полученные данные не показали возможного влияния на некротизирующую активность в экспериментах таких факторов, как географическое происхождение культур, состав среды культивирования, тип и интенсивность регуляции активной кислотности среды в процессе роста.

Анализ и обработка результатов позволили предположить некоторую зависимость между активностью некротической реакции на высечках и урожайностью биомассы. У трех культур из рабочей выборки – cf 1720, 1825 и 1860 (происхождение: Белоруссия, Хабаровск и Швеция соответственно) – способность вызывать некротизацию на высечках проявилась наиболее слабо. Удаление из общей выборки данных по этим культурам (как нетипичным) привело к тому, что коэффициенты корреляции между показателями активности некротической реакции и урожайности биомассы составили 0.58 и 0.62 для листьев ясеней маньчжурского и пенсильванского соответственно. Сопоставление средних показателей урожайности биомассы для групп из нескольких культур, проявивших одинаковую активность некротизации на высечках, также подтверждает эту тенденцию. Способность культуральных фильтратов вызывать некротизацию листьев ясеня начинает проявляться при накоплении биомассы 3.0–3.5 г а. с. м./л и более. Самая активная реакция на листьях ясеня пенсильванского отмечена при урожайности биомассы 4.0–5.0 г а. с. м./л (табл. 4).

Разнородность полученных показателей невозможно объяснить, исходя из предположения, что в тестах проявилось действие только одного некротизирующего фактора – токсина/токсинов. Поскольку использованная методика предполагала, что в тестах действовали только метаболи-

ты *H. fraxineus*, эффект некротизации, предположительно, мог быть также вызван ферментами гриба и/или низкомолекулярными веществами – элиситорами.

Предположение о присутствии в культуральных фильтратах как токсина/токсинов, так и элиситоров позволяет в определенной степени обобщить зарегистрированные данные. На уровне тенденции отмечено, что активность некротизации была выше в тех вариантах культивирования, где урожайность биомассы больше (табл. 4). Лабораторное культивирование в ограниченном объеме среды со временем приводит к достижению грибной культурой стационарной фазы роста, связанной с неблагоприятными условиями. Этот период связан с продуцированием наибольшего количества вторичных метаболитов и частичным отмиранием и лизисом мицелия. Большинство токсинов являются вторичными метаболитами, а элиситоры могут быть представлены низкомолекулярными продуктами распада мицелия. Логично предположить, что наибольший выход токсинов и элиситоров в наших экспериментах приходился на стационарную фазу роста, когда культура приближается к максимально возможному в данных условиях накоплению биомассы.

Из данных табл. 3 можно видеть, что на высечках из листьев ясеня маньчжурского активность реакции некротизации на превышала 1 балла. Известно, что в его ареале на Дальнем Востоке гриб *H. fraxineus* хотя и присутствует, но не расценивается как заметный фитопатоген (Drenkhan et al., 2017). Возможно, ясень маньчжурский не восприимчив или мало восприимчив к действию токсинов *H. fraxineus*. Реакция некротизации, которую наблюдали на высечках из листьев ясеня маньчжурского (1 балл), может быть расценена как быстро реализованный защитный ответ в тканях устойчивого хозяина,



вызванный элиситорами гриба, которые содержались в культуральных фильтратах. Именно элиситоры *H. fraxineus* и их концентрация могли послужить причиной более сильной и отчетливой реакции некротизации в сравнении с вариантами, классифицированными «0 баллов», где элиситоры гриба отсутствовали или их было мало. В этих случаях имела место обычная сверхчувствительная реакция на механическое поранение, слабо заметная без увеличения (рис. 4). Более обширные некротические пятна (2 балла) на высечках ясеня пенсильванского могут быть связаны с распространением как элиситоров грибных культур, так и их токсинов (рис. 4). Показано, что ясень пенсильванский частично восприимчив к грибу *H. fraxineus*, хотя уровень его вирулентности можно назвать низким в сравнении с ясенем обыкновенным – наиболее чувствительным хозяином *H. fraxineus* (Kowalski et al., 2015). Чувствительность предполагает ослабление или замедление защитного ответа на сигналы о вторжении фитопатогена, что позволяет элиситорам и/или токсинам распространиться от места перфорации на большее расстояние, увеличивая размеры некротизированного участка тканей.

Но следует отметить, что высказанные предположения не соответствуют выявленным эффектам у наиболее «слабых» по активности некротизации культур cf 1720, 1825 и 1860. Возможно, эти культуры не были способны продуцировать токсин (-ы), но в некоторых вариантах культивирования – cf 1720 (МС), 1825 (С и МС) – максимальная урожайность достигала значений 4 – 6,5 г а. с. м./л, что предполагает процессы отмирания мицелия, наличие элиситоров в культуральных фильтратах и как следствие – прояв-

ление реакции на высечках вокруг перфораций, хотя бы на уровне 1 балл. Однако в этих случаях реакция некротизации отсутствовала (0 баллов, табл. 3), что пока не представляется возможным объяснить.

**Реакция флоэмы ствола двух видов ясеней на искусственное заражение культурами *H. fraxineus*.** Способность вызывать некрозы внутренней коры ясеней маньчжурского и пенсильванского проверена для четырех культур *H. fraxineus* (cf 1702, 1718, 1838 и 1860) в эксперименте с искусственной инокуляцией стволов молодых деревьев. Из полученных данных (табл. 5) можно видеть, что на ясенях маньчжурском только культуры 1702 и 1838 вызывали небольшие, но достоверно отличающиеся от контроля некрозы флоэмы; на ясенях пенсильванском некротизирующую активность проявили культуры 1702, 1838 и 1860. Культура cf 1718 не вызывала некротизацию ствольной флоэмы ясеней маньчжурского и пенсильванского.

Для сравнения приведены оценки активности некротизации высечек из листьев под действием фильтратов тех же культур (в обоих случаях использовали среду, содержащую сусло и отвар листьев ясеня пенсильванского) (табл. 5).

Можно видеть, что для всех культур активность некротизации фотосинтезирующей ткани под действием метаболитов грибов не соответствует скорости распространения мицелия в проводящих тканях коры, т. е. фитопатогенные эффекты, полученные в наших экспериментах на высечках из листьев ясеней, не соответствовали результатам искусственного инокулирования стволов ясеня.

Следует упомянуть уже выдвинутое предположение о вероятных различиях защитных

**Таблица 5.** Сравнение активности некротизации фотосинтезирующих тканей листьев и флоэмы стволов ясеня соответственно культуральной жидкостью ( $n = 7$ ) и живыми культурами ( $n = 10$ ) *H. fraxineus* (Пашенова и др., 2020)

Культуры гриба	Среда культивирования*	Я. маньчжурский		Я. пенсильванский	
		Листья, балл	Длина некрозов флоэмы, $x \pm \sigma$ , мм	Листья, балл	Длина некрозов флоэмы, $x \pm \sigma$ , мм
Cf 1702	ПС/ПСА	0	10.6 ± 3.9**	0	15.8 ± 7.0**
Cf 1718	ПС/ПСА	0	9.4 ± 1.2	1	12.7 ± 2.9
Cf 1838	ПС/ПСА	1	10.2 ± 2.9	1	44.4 ± 34.9**
Cf 1860	ПС/ПСА	0	10.2 ± 3.3**	0	21.8 ± 14.6**

\* ПС – жидкая среда с добавлением отваров листьев ясеня пенсильванского, ПСА – агаризованная среда с отваром листьев ясеня пенсильванского, использованная для выращивания инокулюма в полевые эксперименты 2019 г.

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

реакций хозяина при поражении грибом листьев кроны и одревесневших частей растений (Landolt et al., 2016), а это допускает различные физиологические механизмы колонизации грибом фотосинтезирующих тканей и флоэмы ствола. Возможно, токсины не играют важной роли при колонизации грибом тканей ствола.

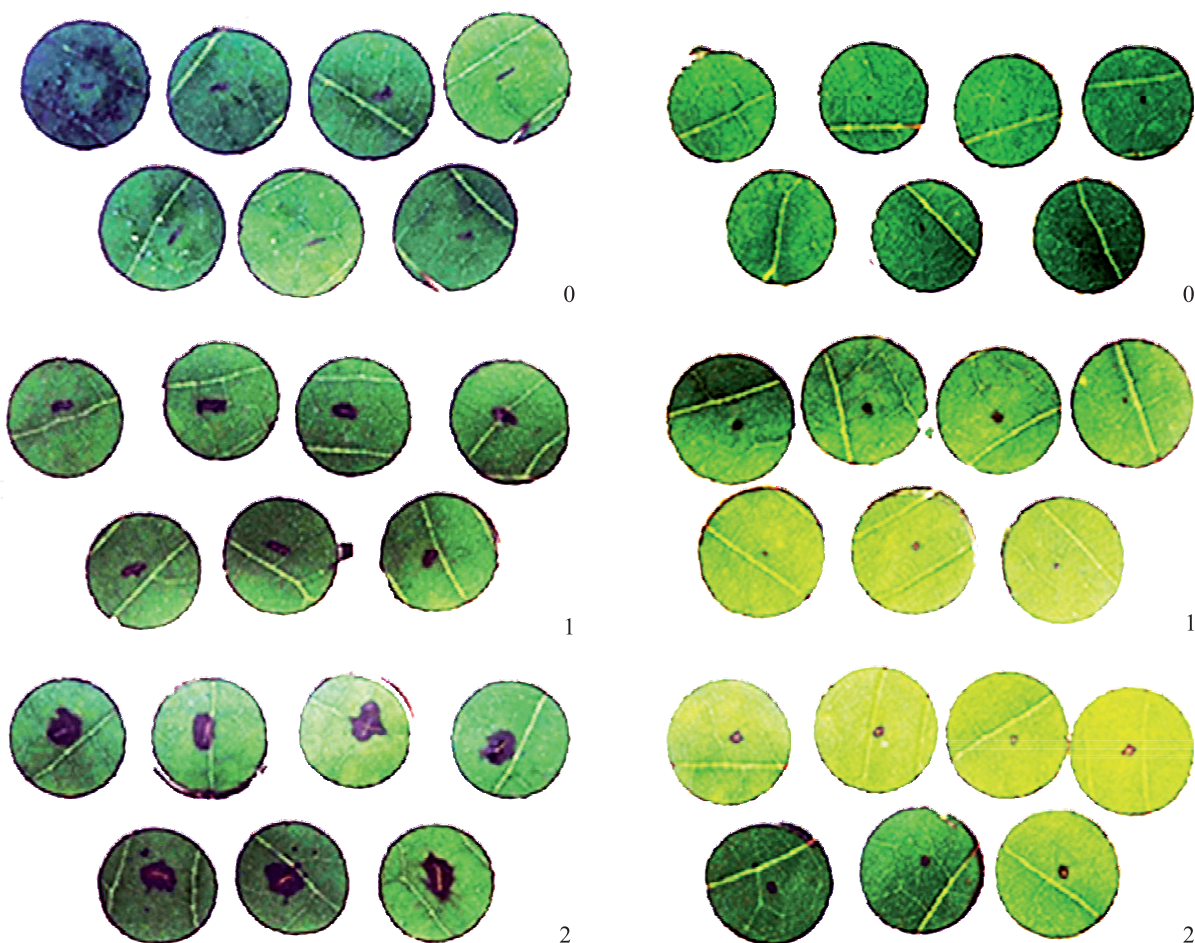
**Сравнение двух типов перфорации высечек из листьев ясеня при лабораторном тесте с метаболитами *H. fraxineus*.** Сравнение разных способов перфорирования листовых высечек для проверки некротизирующей способности культуральных фильтратов показало, что использование перфорации в виде разреза позволяет быстро выявить реакцию некротизации и подходит для первичного скрининга большого количества культур. При перфорации листьев уколом, некротическая реакция была не столь очевидна для невооруженного глаза (рис. 5).

Но в этом случае возможна стандартизация размера наносимого отверстия (если проколы делать иглой одного и того же диаметра), что

позволяет в дальнейшем измерить площади некрозов и использовать для сравнительной оценки реакции количественные данные. На рис. 6 приведены примеры соответствия площади некроза глазомерной оценке (в баллах), использованной в выполненных тестах.

Однако с нанесением отверстий в центр высечек связано техническое затруднение, способное ухудшить результаты теста. Как правило, тип реакции на высечках был один и тот же для всех 7 повторностей каждого варианта (см. рис. 4).

Но в ряде случаев капля фильтрата, помещенная на высечку, исчезала с ее поверхности уже после первого часа экспонирования. Наиболее вероятным объяснением представляется, что капля просачивалась через перфорационное отверстие и впитывалась в подстилающий слой влажной фильтровальной бумаги. Причиной могли быть слишком большое отверстие при перфорации, недостаточно увлажненная фильтровальная бумага во влажной камере и проч. В результате на высечках с впитавшимися



**Рис. 5.** Примеры некротизации листовых высечек, перфорированных «разрезом» (слева) и «уколом» (справа), активность некротизации усиливается от значения 0 до 2 баллов сверху вниз.



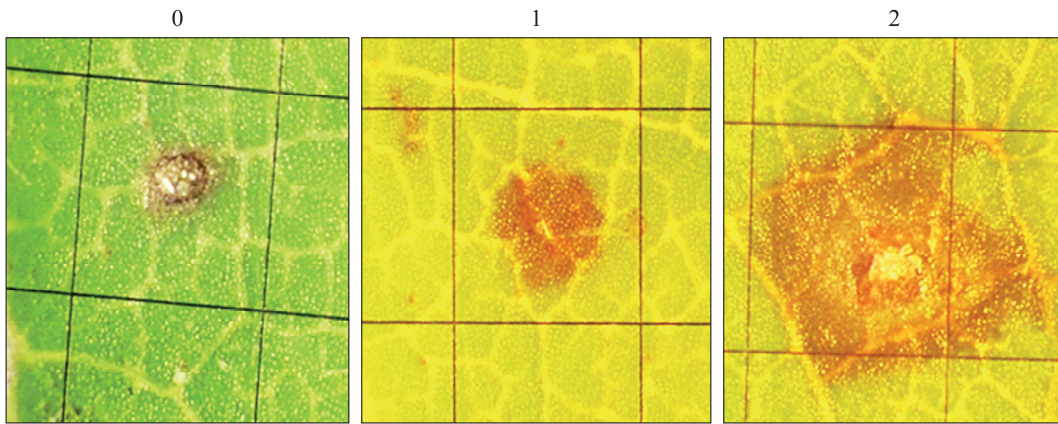


Рис 6. Некрозы с наложенной сеткой (сторона квадрата 1 мм).

0 баллов – отсутствие некроза; площадь развившегося некроза, мм<sup>2</sup>: 1 балл –  $\leq 0.5$ ; 2 балла –  $\geq 1$ .

каплями реакция отсутствовала или имела нечеткий характер. Устранение этой технической особенности необходимо для повышения воспроизводимости результатов. Но это потребует дополнительных усилий.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты исследований и сделанные на их основе предположения указывают на необходимость более глубокого понимания физиологических механизмов взаимодействия *H. fraxineus* с устойчивыми и восприимчивыми видами ясеней. Серьезный интерес представляет изучение внутривидовой изменчивости фитопатогенных факторов этого гриба. Очевидно, что использованный в нашей работе тест на высечках из листьев добавляет удобный инструмент к ряду других методик для исследования *H. fraxineus*: простота и непродолжительность теста, малая затратность, возможность количественной оценки результатов, анализ в одних и тех же условиях сравнительно большого числа индивидуумов фитопатогена и растения-хозяина. Однако эта методика предназначена только для изучения роли гриба *H. fraxineus* и его метаболитов при колонизации листы. Результаты, полученные для культуры в лабораторном тесте на высечках из листьев ясеней, вряд ли могут быть использованы для прогноза фитопатогенной активности этой культуры в побегах и стволах.

Авторы признательны Д. С. Полякову за любезное разрешение работать в его питомнике, В. Б. Звягинцеву и Р. Васайтису – за содействие в сборах фитопатогена в Беларуси и Швеции соответственно.

Работа выполнена в рамках государственного задания (№ АААА-А17-117101820002-3), Полевые работы частично поддержаны грантом РФФИ № 14-04-01235А.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Берестецкий А. О., Юзихин О. С., Каткова А. С., Добродумов А. В., Сивогризов Д. Е., Коломбет Л. В. Выделение, идентификация и характеристика фитотоксина, образуемого грибом *Alternaria cirsinioxia* // Прикл. биохим. и микробиол. 2010. Т. 46. № 1. С. 84–88.
- Пашенова Н. В., Серая Л. Г., Демидко Д. А., Перцовая А. А., Баранчиков Ю. Н. Экспериментальная оценка фитопатогенной активности *Hymenoscyphus fraxineus* (Т. Kowalski) Baral, Queloz & Hosoya // Дендробионтные беспозвоночные животные и грибы и их роль в лесных экосистемах (XI чтения памяти О. А. Катаева): Материалы Всерос. конф. с междунар. участ. Санкт-Петербург, 24–27 ноября 2020 г. СПб.: СПбГЛТУ, 2020. С. 251–252.
- Drenkhan R., Solheim H., Bogacheva A., Riit T., Adamson K., Drenkhan T., Maaten T., Hietala A. M. *Hymenoscyphus fraxineus* is a leaf pathogen of local *Fraxinus* species in the Russian Far East // Plant Pathol. 2017. N. 66. P. 490–500.
- Fones H. N., Mardon Ch., Gurr S. J. A role for the asexual spores in infection of *Fraxinus excelsior* by the ash-dieback fungus *Hymenoscyphus fraxineus* // Sci. Rep. 2016. N. 6. Article number: 34638. P. 1–10.
- Junker C., Mandey F., Pais A., Ebel R., Schulz B. *Hymenoscyphus pseudoalbidus* and *Hymenoscyphus albidus*: viridiol concentration and virulence do not correlate // For. Path. 2014. N. 44. P. 39–44.
- Junker C., Vries J. de, Eickhorst C., Schulz B. Each isolate of *Hymenoscyphus fraxineus* is unique as shown by exoenzyme and growth rate profiles // Balt. For. 2017. V. 23. N. 1. P. 25–40.
- Kowalski T., Bilański P., Holdenrieder O. Virulence of *Hymenoscyphus albidus* and *H. fraxineus* on *Fraxinus excelsior* and *F. pennsylvanica* // PLoS ONE. 2015. V. 10. N. 10. Article number: e0141592. P. 1–15.

- Kowalski T., Bilanski P., Kraja W. Pathogenicity of fungi associated with ash dieback towards *Fraxinus excelsior* // Plant Pathol. 2017. V. 66. Iss. 8. P. 1228–1238
- Landolt J., Gross A., Holdenrieder O., Pautasso M. Ash dieback due to *Hymenoscyphus fraxineus*: what can we learn from evolutionary ecology? // Plant Pathol. 2016. V. 65. Iss. 7. P. 1056–1070.
- Mansfield J. W., Galambos N., Saville R. The use of ascospores of the dieback fungus *Hymenoscyphus fraxineus* for infection assays reveals a significant period of biotrophic interaction in penetrated ash cells // Plant Pathol. 2018. V. 67. Iss. 6. P. 1354–1361.
- Orton E. S., Clarke M., Brasier C. M., Webber J. F., Brown J. K. A versatile method for assessing pathogenicity of *Hymenoscyphus fraxineus* to ash foliage // For. Path. 2018. V. 49. N. 2; e12484. P. 1–5.
- Schwanda K., Kirisits T. Pathogenicity of *Hymenoscyphus fraxineus* towards leaves of three European ash species: *Fraxinus excelsior*, *F. angustifolia* and *F. ornus* // Plant Pathol. 2016. V. 65. Iss. 7. P. 1071–1083.

## USING ASH LEAF CUT-OFFS IN STUDYING THE FUNGUS *Hymenoscyphus fraxineus* PHYTOPATHOGENIC PROPERTIES

N. V. Pashenova<sup>1</sup>, L. G. Seraya<sup>2</sup>, Yu. N. Baranchikov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> V. N. Sukachev Institute of Forest, Russian Academy of Sciences, Siberian Branch, Federal Research Center Krasnoyarsk Scientific Center, Russian Academy of Sciences, Siberian Branch Akademgorodok, 50/28, Krasnoyarsk, 660036 Russian Federation

<sup>2</sup> All-Russian Research Institute of Phytopatology Institute str., 5, settlement Bolshie Vyazemy, Odintsovsky District, Moscow Oblast, 143050 Russian Federation

E-mail: pasnat@ksc.krasn.ru, lgseraya@gmail.com, baranchikov\_yuri@yahoo.com

A laboratory method for studying the fungal phytotoxicity with cut-offs from leaves was tested for the fungus *Hymenoscyphus fraxineus* the causative agent of ash dieback (*Fraxinus* L.) disease. We used 12 cultures of the fungus originating from the native and invasive ranges of the pathogen, and leaves of two species of ash Manchurian (*Fraxinus mandshurica* Rupr.) and ash green (*F. pennsylvanica* Marsh.) that differed in resistance to this phytopathogen. After cultivation of fungi on liquid nutrient media, the cultural filtrates were applied to cut-offs from ash leaves placed in moist chambers. Necrotization of photosynthetic tissues was noted after the action of exometabolites of some cultures. At the same time, large necrosis have developed only on the cut-offs from the leaves of ash green, which corresponds to the known fact that this species is less resistant to *H. fraxineus* in comparison with of ash Manchurian. The geographical origin and composition of the culture medium did not affect the ability of cultures to induce necrosis. The analysis of the results indicated a probable positive relationship between the necrotizing activity of the culture liquid and the indicators of the crop biomass yield. It can be assumed that the necrosis inducing factors appeared in cultures at the stationary stage of the fungus growth. No concurrence was found between the results of laboratory tests with leaf cut-offs and field experiments on the inoculation of *H. fraxineus* mycelium into the trunks of young ash trees. The deficiency of knowledge about the *H. fraxineus* physiology and the mechanisms of interaction of this phytopathogen with the host are discussed. A conclusion was made about the suitability of the laboratory technique with leaf cut-offs for factors of *H. fraxineus* phytopathogenicity investigation, which act during the colonization of the photosynthetic part of the crown in sensitive ash species.

**Keywords:** ash dieback, *Hymenoscyphus fraxineus*, laboratory test to detect phytopathogenicity.

**How to cite:** Pashenova N. V., Seraya L. G., Baranchikov Yu. N. Using ash leaf cut-offs in studying the fungus *Hymenoscyphus fraxineus* phytopathogenic properties // *Sibirskij Lesnoj Zurnal* (Sib. J. For. Sci.). 2023. N. 1. P. 58–69 (in Russian with English abstract and references).