

***Diplodia sapinea* (Fr.) P. Karst. – новый инвазионный вид фитопатогенных грибов на юге Восточной Сибири**

Ю. А. ЛИТОВКА^{1, 2, 3}, С. С. ПОЗНУХОВА¹, Н. В. ФОМИНА^{1, 2}, А. А. ТИМОФЕЕВ^{2, 3}, И. Н. ПАВЛОВ^{1, 2}

¹Сибирский государственный университет науки и технологий
им. академика М. Ф. Решетнева
660037, Красноярск, пр. им. газеты Красноярский рабочий, 31
E-mail: litovkajul@rambler.ru

²Институт леса им. В. Н. Сукачева СО РАН
660036, Красноярск, Академгородок, 50/28

³Федеральный исследовательский центр “Красноярский научный центр СО РАН”
660036, Красноярск, Академгородок, 50

Статья поступила 27.04.2024

После доработки 28.05.2024

Принята к печати 06.06.2024

АННОТАЦИЯ

Впервые в Средней Сибири в парковых насаждениях г. Красноярска на разновозрастных деревьях *Pinus sylvestris* L. с различным фитопатологическим состоянием нами выявлен инвазионный вид *Diplodia sapinea* (Fr.) P. Karst., который является опасным патогеном хвойных деревьев. Чистые культуры были изолированы из пикнид на шишках; их морфологические и молекулярно-генетические признаки соответствуют виду *D. sapinea*. Сибирские изоляты характеризуются высокой радиальной скоростью роста на питательных средах, оказывают фитопатогенное действие в отношении побегов *P. sylvestris* и плодов яблок сорта Granny Smith *in vitro*, вызывая стремительные и обширные некротические поражения коры, камбия побегов и мякоти плода, проявляют высокую пероксидазную и протеазную ферментативную активность. Сибирские изоляты *D. sapinea* по совокупности морфологических признаков, активности ферментов и фитопатогенности не выходят за пределы показателей южных изолятов. Значительные различия показаны со штаммом Dp1-23 *Diplodia seriata* De Not, выделенного из пикнид на шишках *Cupressus sempervirens* L. Для сибирских изолятов *D. sapinea* установлена высокая устойчивость к холодовому стрессу в диапазоне температур от –8 до –31 °C в серии экспериментов по замораживанию и оттаиванию мицелия. После активации радиальная скорость роста изолятов на картофельно-декстрозном агаре при 24 °C оказалась выше, чем у штаммов, не подвергавшихся замораживанию; относительно медленная активация отмечена при –16 °C по сравнению с другими температурами. Наличие длительной эндофитной фазы у впервые обнаруженного в Средней Сибири вида *D. sapinea*, высокие адаптивные возможности и фитопатогенность представляют особую опасность для его распространения на новой территории и растениях-хозяевах, что требует особого внимания и изучения.

Ключевые слова: фитопатоген, эндофит, *Diplodia sapinea*, первое обнаружение, инвазия, температурный стресс, ферментативная активность, скорость роста.

ВВЕДЕНИЕ

Экспансия инвазивных видов фитопатогенов вследствие изменения климата — не единственная угроза здоровью наших лесов. Эндифиты, которые обычно находятся в равновесии с растением, могут стать условно-патогенными, в том числе за счет ухудшения климатических условий для деревьев-хозяев. Ожидается, что глобальное изменение климата приведет к дальнейшему увеличению частоты и серьезности экстремальных явлений, таких как засухи [Chiang et al., 2021; Prospero et al., 2021]. Патогены кроны древесных растений предпочитают более влажные и теплые географические регионы, чем корневые патогены, доминирующие в холодных и засушливых районах [Redondo et al., 2018], что позволяет предположить большую восприимчивость возбудителей болезней филосферы к климатическим изменениям.

Гриб *Diplodia sapinea* (Fr.) P. Karst. впервые описан в XIX в. главным образом как сапротроф на отмершей хвое, шишках, коре, побегах, древесных остатках сосны и пихты. В настоящее время он известен как патоген многих видов хвойных деревьев, вызывающий побурение хвои, отмирание побегов, некроз коры ветвей с истечением смолы, корневую гниль семян, синеву заболонной древесины [Roy et al., 2022]. Особое внимание к *D. sapinea* было привлечено в последнее десятилетие, в частности, после массового усыхания 20-летних деревьев на плантации *Pinus sylvestris* L. (около 15 га) в августе 2016 г. к северу от Стокгольма [Brodde, 2019]. Хорошо развитые деревья потеряли все побеги текущего года, у большинства произошло усыхание вершины ствола, часть деревьев погибла. Вспышка в Швеции показала качественное изменение поведения *D. sapinea* не только в Северной Европе, но и в глобальном масштабе, а также изменило отношение к грибу со стороны исследователей и лесопромышленников.

Рост числа вспышек также наблюдается в Южной [Oliva et al., 2021] и Центральной [Adamson et al., 2021; Blumenstein et al., 2021a] Европе и постепенно увеличивается в Северной Европе [Terhonen et al., 2021]. В Германии вид *D. sapinea* широко распространен на здоровых и больных деревьях [Bußkamp et al., 2021]. Первоначально гриб действует как эндифит, и колонизиру-

ванные деревья зачастую остаются бессимптомными [Luchi et al., 2011; Blumenstein et al., 2021b]. В результате стрессовых факторов, таких как повреждение градом [Oliva et al., 2021] и засухи [Stanosz et al., 2001; Brodde et al., 2023], гриб способен переходить в паразитарную фазу. Заражение также может происходить в отсутствие физиологического стресса при повреждении насекомыми или в ассоциации с другими возбудителями болезней сосновых [Markovskaja et al., 2016; Drenkhan et al., 2017]. *D. sapinea* предпочитает хвойные породы и встречается на большинстве видов *Pinus*, однако недавно был обнаружен на *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. [Bußkamp et al., 2021] и *Fagus sylvatica* L. [Langer, Bußkamp, 2021]. Гриб способен колонизировать широкий спектр ростовых субстратов, но, являясь термофилом, значительно лимитирован низкой температурой. В соответствии с трендом глобального изменения климата тяжесть заболевания, вызываемого *D. sapinea*, уже возрастает в сосновых лесах Европы [Caballol et al., 2022], а дальнейшие климатические изменения могут привести к значительному расширению его ареала на территории, ранее неблагоприятные для инвазии.

Целью данной работы было обнаружение возбудителя болезни в насаждениях *P. sylvestris* в Сибирском регионе, вызывающего схожую симптоматику с грибом *D. sapinea*. В задачи входили изолирование чистых культур фитопатогенов, их молекулярно-генетическая идентификация, исследование морфолого-культуральных особенностей, ферментативной активности и фитопатогенности *in vitro*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили шишки разновозрастных деревьев *P. sylvestris* в лесопарковой зоне г. Красноярска (Средняя Сибирь) в различном фитопатологическом состоянии. Для выделения, идентификации и хранения чистых культур использовали агаризованные питательные среды: 2 % мальт-экстракт агар (МЭА) с 0,3 % танина (выделение из растительных тканей); МЭА и картофельно-декстрозный агар (КДА) (хранение культур); КДА со стерильной хвоей (формирование спороношения, пигментообразование) [Методы..., 1982; Alves et al., 2014].

Грибы выделяли из предварительно стерилизованных фрагментов шишек с пикнидами (рис. 1, а) методом их раскладки на питательную среду (стерилизующий агент 70 % этанол, время экспозиции 1,5–2 мин с последующей промывкой стерильной водой и подсушиванием). После инкубации при 24 °С в течение 5–7 суток быстрорастущие темные колонии субкультивировали на КДА в половинной концентрации с добавлением автоклавированной хвои *P. sylvestris* при рассеянном дневном свете. Моноконидиальные культуры получали из одиночных прорастающих спор и переносили их на свежие чашки с КДА ди-

аметром 90 мм для определения радиальной скорости роста (мм/сут). Для микроскопии содержимое конидиом, образовавшихся на хвое, иссекали и помещали в 100 % молочную кислоту (рис. 1, б) [Alves et al., 2014]. Использовали световой микроскоп (Nikon Eclipse Ni-U, Токио, Япония) и цифровую камеру Nikon D5100 (увеличение 1000–1500 раз).

Для молекулярно-генетических исследований выделяли ДНК из семисуточного мицелия; концентрацию ДНК в отдельных образцах определяли с помощью спектрофотометра Nanodrop (Thermo Fisher Scientific). Для ПЦР использовали праймеры ITS1F/ITS4; продукты

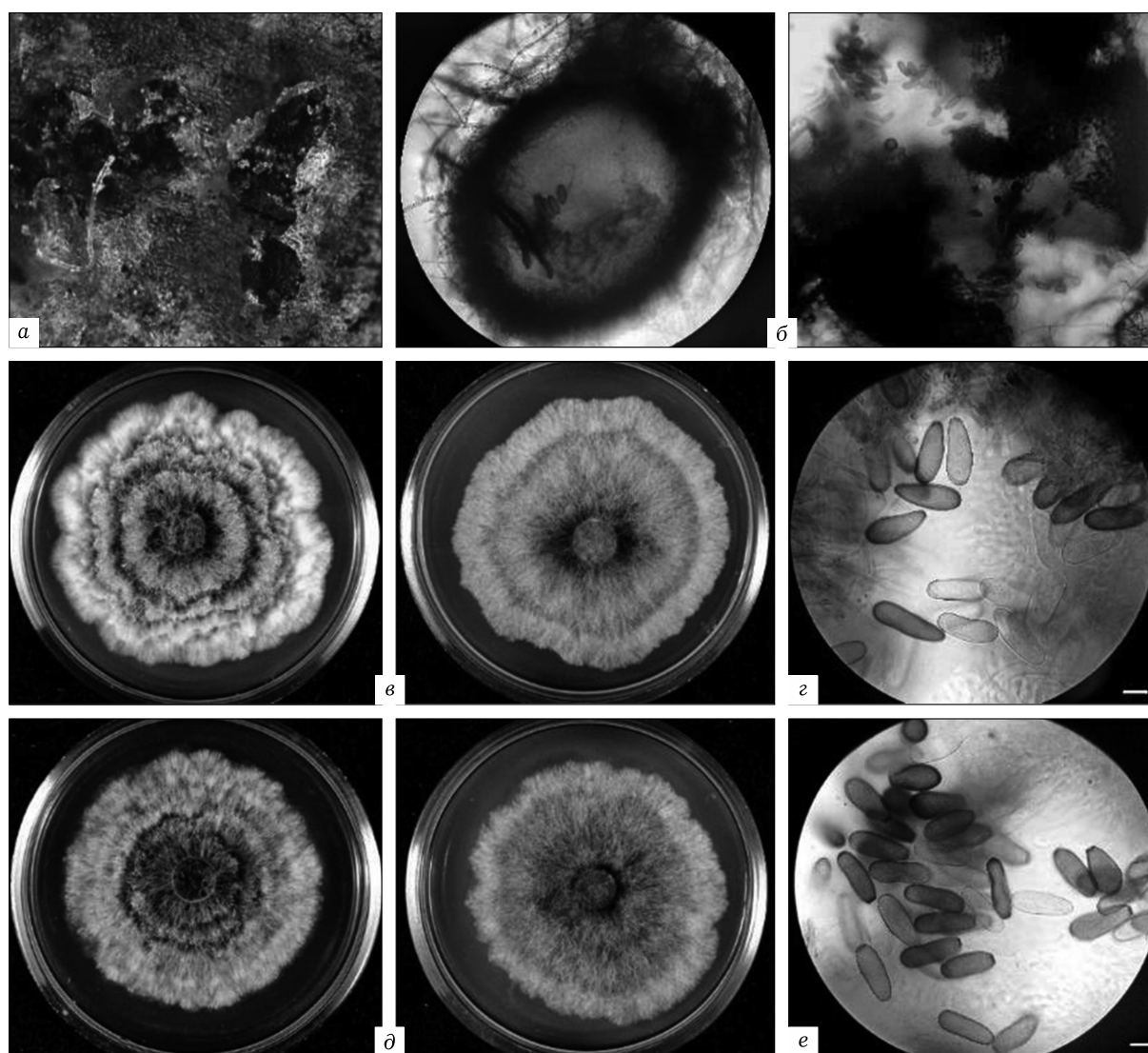


Рис. 1. Морфология колоний и микроструктуры *Diplodia sapinea*: а – пикниды на шишке; б – пикнида со спорами на хвое *Pinus sylvestris* в разрезе; в – колонии сибирского изолята на МЭА (5-е сутки) и КДА (3-и сутки); г – споры сибирского изолята *in vitro* на хвое; д – колонии южного изолята на МЭА (5-е сутки) и КДА (3-и сутки); е – споры; г, е – шкала 10 мкм

амплификации подвергали секвенированию в обоих направлениях. Реконструкцию филогенетического дерева выполняли на основе метода агломеративной иерархической кластеризации UPGMA. Последовательности отредактировали и собрали в MEGA X и далее сравнивали с последовательностями в Genbank.

Фитопатогенность *in vitro* оценивали на побегах *P. sylvestris* [Linaldeddu et al., 2016] и яблоках сорта Granny Smith [Diaz et al., 2022]. Штаммы для инокуляции предварительно высевали на КДА и культивировали в течение 5 суток при 24 °С в темноте. Для инокуляции побегов *P. sylvestris* использовали сегменты длиной 20 см; концы запечатывали парафином, чтобы избежать высыхания. В коре с помощью пробочного сверла проделывали отверстие диаметром 5 мм и вставляли агаровый блок с культурой гриба того же размера мицелием к раневой части; для каждого штамма проводили пять повторных инокуляций. Контролем служили побеги, инокулированные агаровыми блоками без культуры гриба. Точку инокуляции заклеивали лентой parafilm, побеги помещали во влажную камеру при 24 °С. Развивающееся поражение измеряли через 10 суток, удаляя скальпелем кору около места инокуляции. Регистрировали длину и ширину некроза (мм) в двух взаимно-перпендикулярных направлениях от точки инокуляции (всего четыре измерения), после чего рассчитывали сумму длин некрозов (мм). В конце эксперимента отбирали образцы из пораженных участков для реинокуляции штаммов *D. sapinea*. Внешнюю часть коры удаляли стерильным скальпелем и фрагменты некротической ткани (2–3 мм) помещали на 1,5%-й водный агар со стрептомицином (40 мг/л). Посевы инкубировали при 24 °С в темноте; через трое суток растущие колонии переносили на чашки с КДА. Их идентичность оценивали визуально по морфологии культуры в сравнении с исходным штаммом.

Для исследования патогенности на яблоках плоды приблизительно одного размера промывали проточной водой, поверхностно стерилизовали 70%-м этанолом в течение 2 мин, после чего двукратно промывали стерильной водой. Стерильным пробочным сверлом диаметром 5 мм вырезали отверстия глубиной 5 мм на разных сторонах каждого яблока, куда вносили агаровые блоки того же диаметра,

вырезанные из 5-суточных колоний грибов на КДА. Контролем служили агаровые блоки без культуры гриба. Каждое яблоко инокулировали тремя изолятами, четвертая лунка была контрольной. Отверстия закрывали пленкой, яблоки помещали во влажную камеру при 24 °С в течение 10 суток. По окончании эксперимента измеряли диаметр некроза (мм) в двух взаимно-перпендикулярных направлениях и глубину некроза (мм).

Чувствительность / резистентность сибирических штаммов *D. sapinea* к отрицательным температурам оценивали по их ростовым параметрам после серии экспериментов с чередованием температур в диапазоне от +24 до –31 °С. Контролем служили показатели радиальной скорости роста штаммов, не подвергшихся замораживанию. Культуры предварительно выращивали на стерильной хвое и побегах *P. sylvestris* во влажной камере в течение 14 сут при 24 °С. Далее чашки инкубировали 7 сут в холодильной камере при 6 °С, а затем в морозильной камере при –8, –16, –26, –31 °С. Спустя 7 суток промораживания чашки вновь выдерживали при 6 °С. На всех этапах осуществляли мониторинг изменения температуры с помощью температурных логгеров. Оценку жизнеспособности проводили на КДА при 24 °С, оценивая наличие роста колонии и, в случае активации роста, радиальную скорость роста (мм/сут). После однократного замораживания провели аналогичный эксперимент в режиме трехкратного замораживания-оттаивания с последующей активацией культуры в благоприятных условиях.

Для определения ферментативной активности штаммы *D. sapinea* культивировали на жидких питательных средах в стационарных условиях при 24 °С в течение 7 суток. Активность пероксидазы исследовали на среде Чапека – Докса, протеазы – на ферментационной глюкозно-глицериновой среде, целлюлазы – на среде Чапека – Докса с 1 % карбоксиметилцеллюлозой (КМЦ). Протеолитическую активность ($\text{мг} \cdot \text{ч}^{-1} \cdot \text{мл}^{-1}$) определяли методом титрования реакционной смеси культуральной жидкости и раствора желатина с учетом количества аминного азота, накопленного за время опыта в реакционной смеси [Martínez-Medina et al., 2024]. Пероксидазную активность ($\text{у.е.} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{мл}^{-1}$) оценивали методом спектрофотометрии (Thermo

Scientific Genesys 10SVIS, $\lambda = 420$ нм), основанном на измерении оптической плотности продуктов реакции при окислении пирогаллола за определенный промежуток времени [Savinova et al., 2023]. Целлюлазную активность (у. е. \cdot мин⁻¹ \cdot мл⁻¹) определяли методом колориметрирования ($\lambda = 540$ нм) окрашенного комплекса с динитросалициловой кислотой [Roy et al., 2024] после инкубирования культуральной жидкости и раствора КМЦ при 50 °С.

По всем исследуемым показателям сибирские штаммы сравнивали с имеющимися в нашей коллекции чистых культур южными штаммами *D. sapinea* – крымскими (Ялта, Алушка), абхазскими и кубанскими (Сочинский национальный парк) [Павлов и др., 2023], также штаммом *Diplodia seriata* De Not. (Сочинский дендрарий).

РЕЗУЛЬТАТЫ

На разновозрастных деревьях *P. sylvestris* в парковых насаждениях г. Красноярска впервые на территории Сибири нами выявлен вид *D. sapinea*, который является опасным патогеном хвойных деревьев с длительной эндофитной фазой в цикле развития. Всего из пикнид, обнаруженных на шишках *P. sylvestris*

(см. рис. 1, а), изолировано в чистую культуру три штамма, которые по морфологическим признакам оказались близки к представителям рода *Diplodia*.

Морфолого-культуральные особенности. На МЭА сибирские изоляты формируют колонии с выраженными концентрическими кругами и неровным краем (рис. 1, в, слева), бело-серые, при старении культуры черные. На КДА рост более быстрый с формированием пушистых ватообразных колоний (см. рис. 1, в, справа) серо-зеленоватого оттенка, со временем чернеющих. После инкубирования штаммов при рассеянном дневном свете в течение 12–14 сут на стерильных сосновых иглах получено характерное спороношение – эллиптической формы коричневые несептированные споры, редко с одной перегородкой, размером (27–43) \times (9–17) мкм (рис. 1, г). Все исследуемые штаммы *D. sapinea* быстро колонизируют питательные среды, но с различной скоростью: на третьи сутки при 24 °С на МЭА средняя радиальная скорость роста составила 4,3–4,9 мм/сут; на КДА скорость роста была существенно выше и находилась в пределах от 5,1 до 8,6 мм/сут. Скорость роста трех сибирских изолятов составила 4,4–4,9 и 5,5–7,1 мм/сут соответственно на МЭА и КДА (рис. 2).

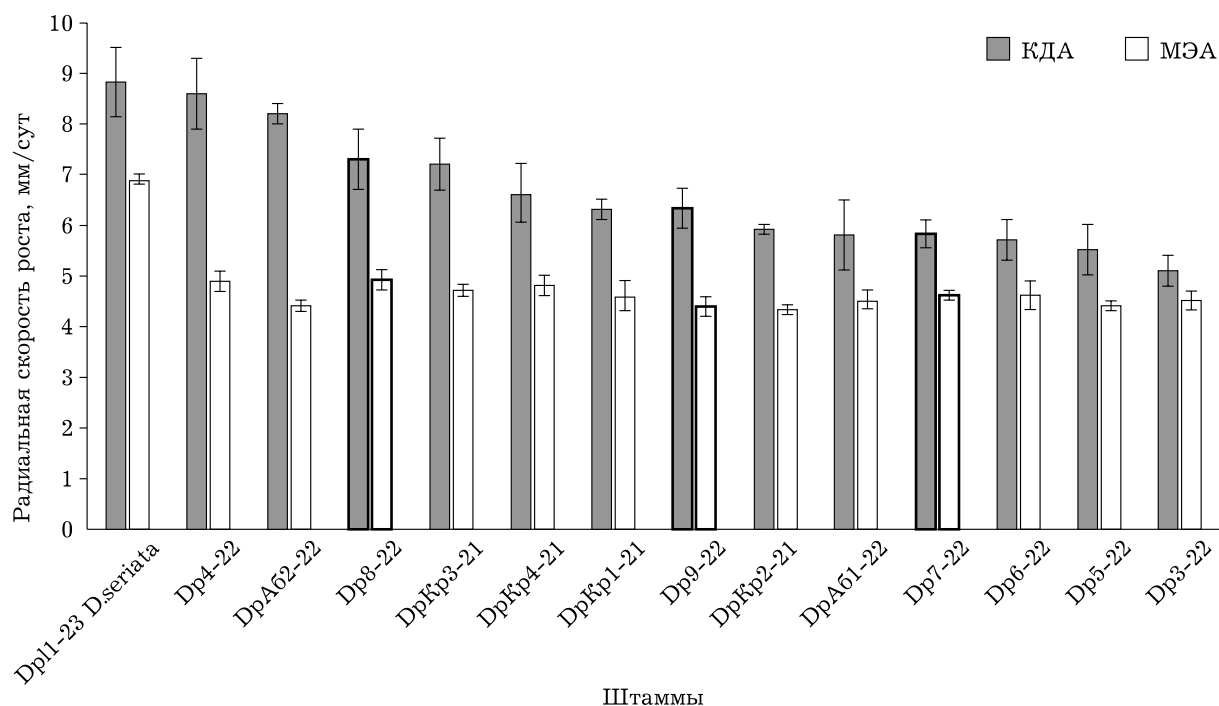


Рис. 2. Ростовые параметры грибов рода *Diplodia* на двух типах питательных сред при 24 °С *in vitro* (сибирские изоляты *D. sapinea* обведены жирной линией)

В целом, по показателям радиальной скорости роста, морфологии колоний и микроструктур не выявлено существенных различий между сибирскими и южными изолятами *D. sapinea* (рис. 1, д, е, см. рис. 2), в отличие от штамма Dp1-23 *D. seriata*, для которого характерны максимальные ростовые показатели на обеих питательных средах (8,8 и 6,9 мм/сут соответственно на КДА и МЭА) и морфологические отличия.

Молекулярно-генетические особенности.

Молекулярно-генетические исследования подтвердили принадлежность выделенных сибирских изолятов к виду *D. sapinea*. Видовая идентификация проведена на основе сравнения морфологических особенностей и нуклеотидных последовательностей участков ядерных рибосомных генов (ITS) в сочетании с филогенетическим анализом.

Филогении (рис. 3) построены с использованием последовательностей из 42 изолятов, включая 12 новых штаммов *Diplodia* spp., секвенированных по двум локусам. Последовательности для этих изолятов были выровнены и отсортированы по таксону *Pseudofusicoccum stromaticum* Mohali, Slippers & M. J. Wingf.; последовательности взяты из NCBI GenBank.

Фитопатогенность *in vitro*. Исследование фитопатогенности на побегах *P. sylvestris* показало, что под влиянием всех изолятов *D. sapinea* формируются обширные некротические поражения коры и камбия (рис. 4, табл. 1) в течение 10 сут при 24 °C. Сумма длин некрозов (четыре измерения от точки инокуляции) существенно варьировала в зависимости от штамма и находилась в пределах от 65,8 до 126,2 мм. Под действием сибирских изолятов *D. sapinea* суммарная длина некроза составила 82,7–97,8 мм, что свидетельствует о высоком уровне их фитопатогенности. Реинокуляция штаммов из зоны некроза была высокой и составила более 90 %. Минимальные показатели патогенности в отношении побегов *P. sylvestris* отмечены у штамма Dp1-23 *D. seriata* – суммарный некроз составил 15,5 мм.

При инокуляции яблок сорта Granny Smith на глубину 5 мм также отмечена стремительная некротизация в течение 10 сут: под действием штаммов *D. sapinea* глубина некроза варьировала от 14,0 до 25,3 мм, диаметр изменялся от 23,7 до 38,3 мм (см. рис. 4,

табл. 1). Показатели сибирских изолятов были достаточно высокими: глубина некроза находилась в пределах от 15,9 до 18,3 мм, диаметр некроза – от 26,5 до 36,5 мм. Максимальная фитопатогенность на яблоках выявлена у штамма Dp1-23 *D. seriata*: диаметр некроза 41,3 мм, глубина – 28,1 мм, при этом фитопатогенность на побегах *P. sylvestris* была минимальной и незначительной. Такое различие, вероятнее всего, связано со специализацией вида *D. seriata*, который практически не встречается на представителях рода *Pinus*, а нами был выделен из шишек *Cupressus sempervirens* L.

Исследование ферментативной активности показало, что сибирские изоляты *D. sapinea* характеризуются высокими показателями активности пероксидазы ($1,44\text{--}1,46\text{ у. е.}\cdot\text{мин}^{-1}\cdot\text{мл}^{-1}$), тогда как пределы варьирования у южных штаммов составили от $0,72$ до $1,41\text{ у. е.}\cdot\text{мин}^{-1}\cdot\text{мл}^{-1}$. Максимальная активность выявлена у штамма Dp1-23 *D. seriata* – $3,94\text{ у. е.}\cdot\text{мин}^{-1}\cdot\text{мл}^{-1}$ (табл. 2). Протеазная активность сибирских изолятов также достаточно высока ($2,26\text{--}2,37\text{ мг}\cdot\text{ч}^{-1}\cdot\text{мл}^{-1}$) на фоне значений южных штаммов – от $0,59$ до $3,56\text{ мг}\cdot\text{ч}^{-1}\cdot\text{мл}^{-1}$. Целлюлазная активность *D. sapinea* существенно варьировала – от $0,32$ до $3,68\text{ у. е.}\cdot\text{мин}^{-1}\cdot\text{мл}^{-1}$; активность сибирских изолятов составила $0,37\text{--}0,84\text{ у. е.}\cdot\text{мин}^{-1}\cdot\text{мл}^{-1}$. Минимальная активность фермента ($0,18\text{ у. е.}\cdot\text{мин}^{-1}\cdot\text{мл}^{-1}$) выявлена у штамма Dp1-23 *D. seriata*.

Таким образом, сибирские изоляты *D. sapinea* по совокупности всех изученных признаков не выходят за пределы показателей изолятов южной группы. Значительные различия показаны со штаммом Dp1-23 *D. seriata*, который характеризуется максимальными показателями радиальной скорости роста, фитопатогенности на плодах яблок и пероксидазной активности, а также минимальными показателями фитопатогенности на побегах *P. sylvestris* и активности целлюлазы.

ОБСУЖДЕНИЕ

Современный тренд глобальных климатических изменений способен существенно изменить направленность фитопатологического процесса и, при негативном сценарии, усугубить тяжесть заболевания растений. Особую

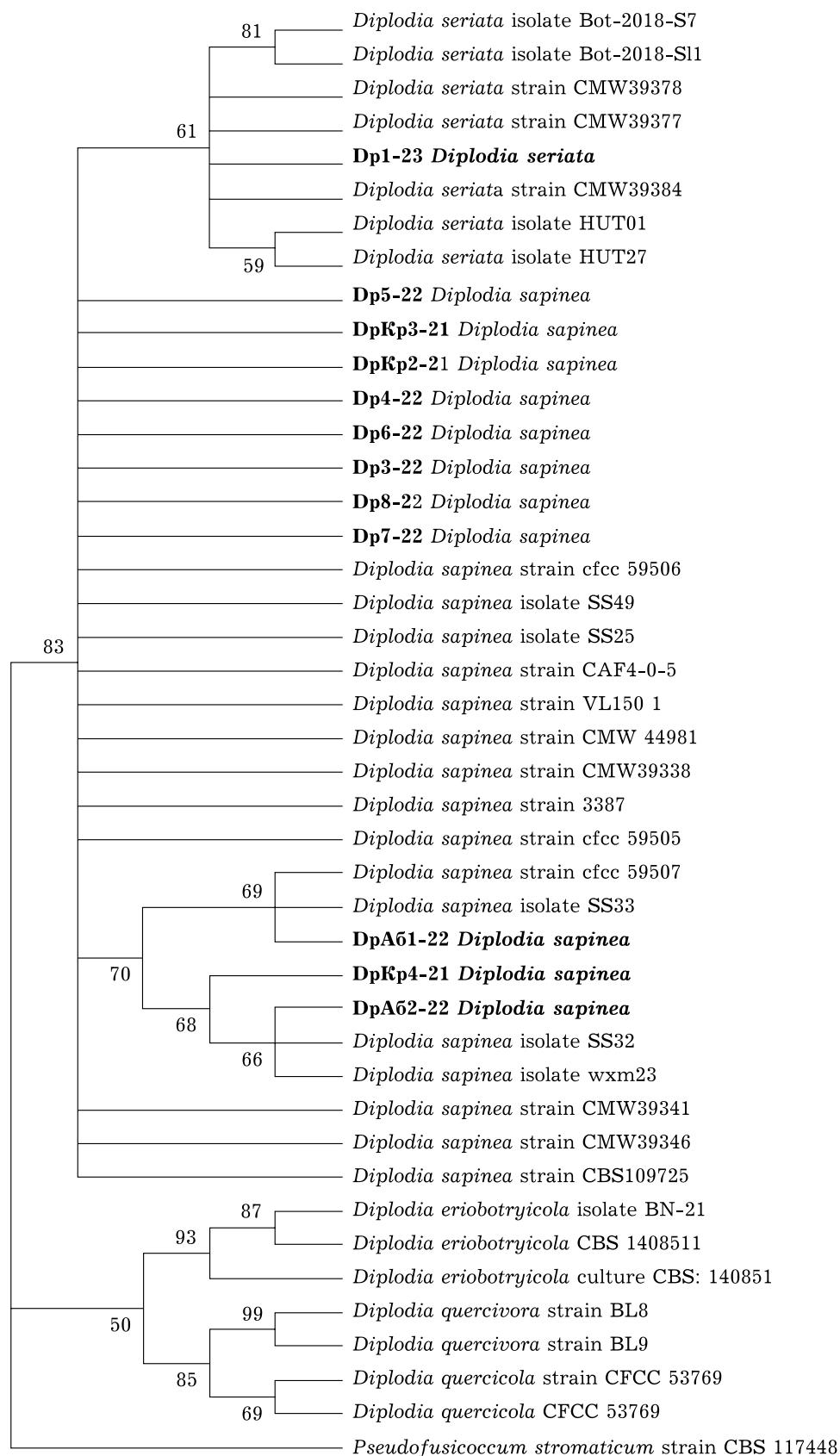


Рис. 3. Филогенетическое дерево на основе метода максимального правдоподобия (ML) 11 новых штаммов *Diplodia sapinea* (выделены жирным шрифтом), одного нового штамма *Diplodia seriata* и последовательностей *Diplodia* sp. из NCBI GenBank с использованием праймеров ITS. Бутстреп-значения более 50 % указаны рядом с кластерами. В качестве внешней группы использовали *Pseudofusicoccum stromaticum*

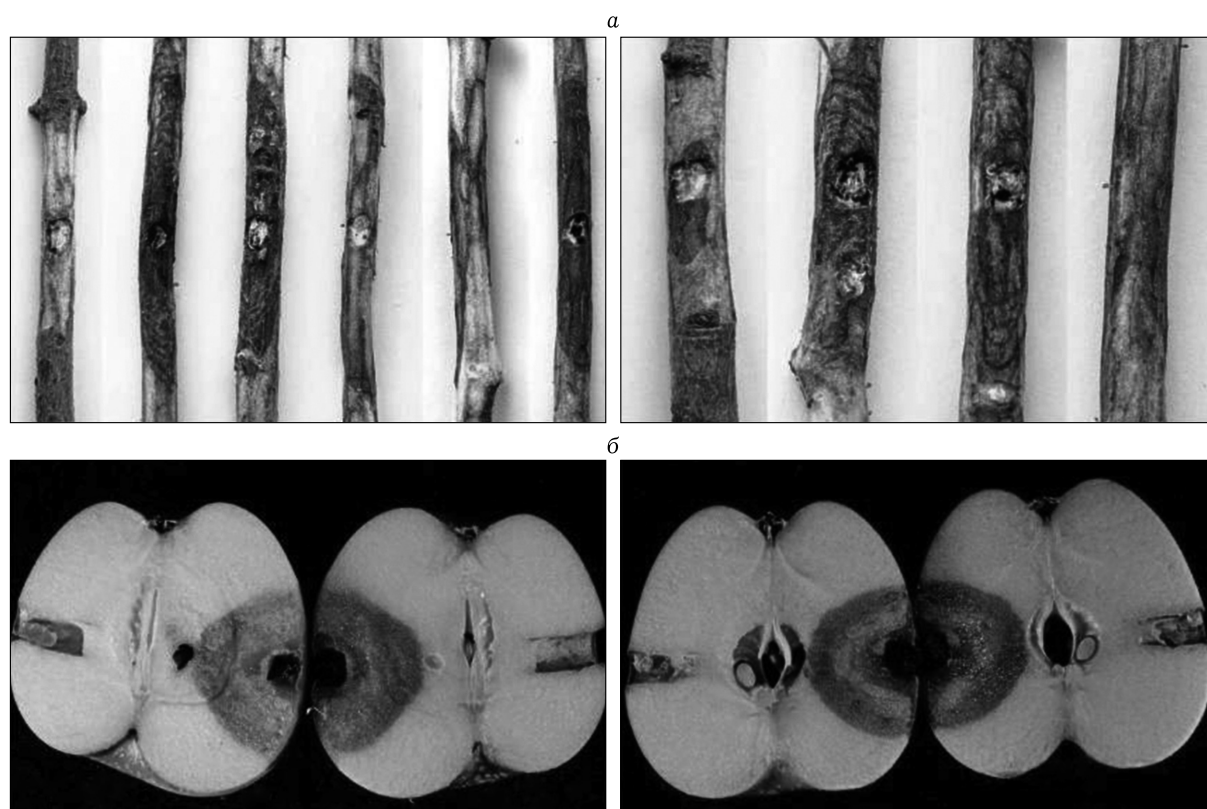


Рис. 4. Фитопатогенность сибирских и южных штаммов *Diplodia sapinea* на двух тест-объектах в течение 10 суток (а – некроз побегов *Pinus sylvestris*; б – некроз яблок сорта Granny Smith)

Т а б л и ц а 1

Фитопатогенность грибов рода *Diplodia* в условиях *in vitro* на двух тест-объектах в течение 10 суток

Штамм	Вид	Побеги <i>Pinus sylvestris</i>	Яблоки сорта Granny Smith	
		Сумма длин некрозов от точки инокуляции, мм	Диаметр некроза, мм	Глубина некроза, мм
Сибирские штаммы				
Др8-22	<i>D. sapinea</i>	97,8 ± 5,31	36,5 ± 4,51	18,3 ± 1,71
Др7-22		83,3 ± 4,61	26,5 ± 3,53	16,2 ± 1,52
Др9-22		82,7 ± 3,24	27,7 ± 3,22	15,9 ± 2,53
Южные штаммы				
ДрА61-22	<i>D. sapinea</i>	126,2 ± 14,1	26,3 ± 2,78	18,0 ± 2,51
Др5-22		110,5 ± 6,36	37,7 ± 4,16	21,7 ± 3,32
ДрКр3-21		100,5 ± 3,44	38,3 ± 1,72	25,3 ± 1,52
Др3-22		85,5 ± 4,31	32,0 ± 2,69	24,7 ± 2,32
ДрА62-22		83,0 ± 2,83	27,0 ± 4,62	14,0 ± 2,14
Др6-22		82,7 ± 3,82	29,2 ± 3,91	19,0 ± 2,61
ДрКр2-21		82,0 ± 5,66	35,7 ± 2,63	23,0 ± 0,64
Др4-22		79,5 ± 4,24	25,0 ± 3,12	17,0 ± 1,19
ДрКр1-21		78,8 ± 5,30	23,5 ± 3,09	20,7 ± 2,32
ДрКр4-21	65,8 ± 5,03	23,7 ± 3,21	16,7 ± 1,89	
Др1-23	<i>D. seriata</i>	15,5 ± 1,13	41,3 ± 3,02	28,1 ± 2,12
Контроль		1,5 ± 0,21	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00

Ферментативная активность грибов рода *Diplodia* на жидкой среде в течение 7 суток

Штамм	Вид	Пероксидаза, у. е. · мин ⁻¹ · мл ⁻¹	Протеаза, мг · ч ⁻¹ · мл ⁻¹	Целлюлаза, у. е. · мин ⁻¹ · мл ⁻¹
Сибирские штаммы				
Dp7-22	<i>D. sapinea</i>	1,46 ± 0,05	2,26 ± 0,09	0,37 ± 0,05
Dp8-22		1,44 ± 0,11	2,26 ± 0,09	0,84 ± 0,03
Dp9-22		1,41 ± 0,11	2,37 ± 0,05	0,42 ± 0,02
Южные штаммы				
Dp1-23	<i>D. seriata</i>	3,94 ± 0,20	2,07 ± 0,04	0,18 ± 0,02
Dp3-22	<i>D. sapinea</i>	1,65 ± 0,12	0,59 ± 0,02	0,42 ± 0,01
DpKp4-21		1,41 ± 0,10	3,56 ± 0,09	0,39 ± 0,04
DpKp1-21		1,17 ± 0,06	2,67 ± 0,04	0,32 ± 0,02
DpKp3-21		1,14 ± 0,10	2,81 ± 0,07	3,68 ± 0,02
Dp4-22		1,04 ± 0,08	0,89 ± 0,03	0,86 ± 0,04
Dp6-22		1,04 ± 0,04	0,59 ± 0,02	2,66 ± 0,03
DpKp2-21		1,01 ± 0,08	2,86 ± 0,08	0,56 ± 0,04
Dp5-22		1,01 ± 0,05	0,59 ± 0,02	0,79 ± 0,05
DpA61-22		0,72 ± 0,02	2,07 ± 0,05	0,78 ± 0,03
DpA62-22		0,93 ± 0,02	2,37 ± 0,03	0,86 ± 0,04

опасность представляют инвазивные патогены, которые долгое время могут оставаться невидимыми и распространяться без видимого ущерба растению-хозяину, но при благоприятных условиях стать причиной развития массовых эпифитотий. Задержка между появлением нового патогена и его обнаружением вследствие отсутствия визуализируемых симптомов существенно усложняет его идентификацию и организацию своевременных эффективных мероприятий по ограничению развития и дальнейшего распространения фитопатогена.

Известно, что гриб *D. sapinea* ранее вызывал вспышки только в районах с мягким климатом, таких как Южная Африка и Новая Зеландия, в основном на плантациях интродуцированных сосен [Burgess et al., 2004]. Первоначально гриб действует как эндофит, который активизируется при физиологическом стрессе растения под влиянием погодных условий и / или вследствие повреждения насекомыми-вредителями и сопутствующими болезнями. Так, после града в южной Капской провинции Южной Африки около 2000 га плантаций *Pinus radiata* D. Don пострадали от вымирания, связанного с *Sphaeropsis sapinea* и двумя видами насекомых-ксилофагов – *Pissodes nemorensis* и *Orthotomicus erosus* [Zwolinski et al., 1995].

Основной преградой для массового распространения вида *D. sapinea* ранее считалась его термофильность. Низкие температуры влияют на жизнеспособность спор и, как следствие, распространение гриба. В исследованиях [Keen, Smits, 1989; Milijašević, 2006] показано, что максимальная, оптимальная и минимальная пороговые температуры роста *in vitro* для *D. sapinea* составили 40, 28 и 4 °C соответственно независимо от происхождения штаммов. Экспериментально установлено, что предварительное воздействие температуры 35 °C на молодой мицелий увеличивает скорость роста гриба при оптимальной температуре [Roy et al., 2022], однако предшествующий температурный стресс в 4 °C снижает его способность расти при оптимальной температуре. Несмотря на установленную термофильность, сделано предположение, что слабое воздействие *D. sapinea* в альпийских регионах Европы (более 800 м) может быть обусловлено в большей степени низким присутствием инокулята в насаждениях, чем условиями, не способствующими развитию болезни [Fabre et al., 2011].

Проведенные нами исследования по чувствительности к отрицательным температурам сибирских изолятов *D. sapinea* выявили их высокую устойчивость к холодovому стрессу. Так, при однократном воздействии

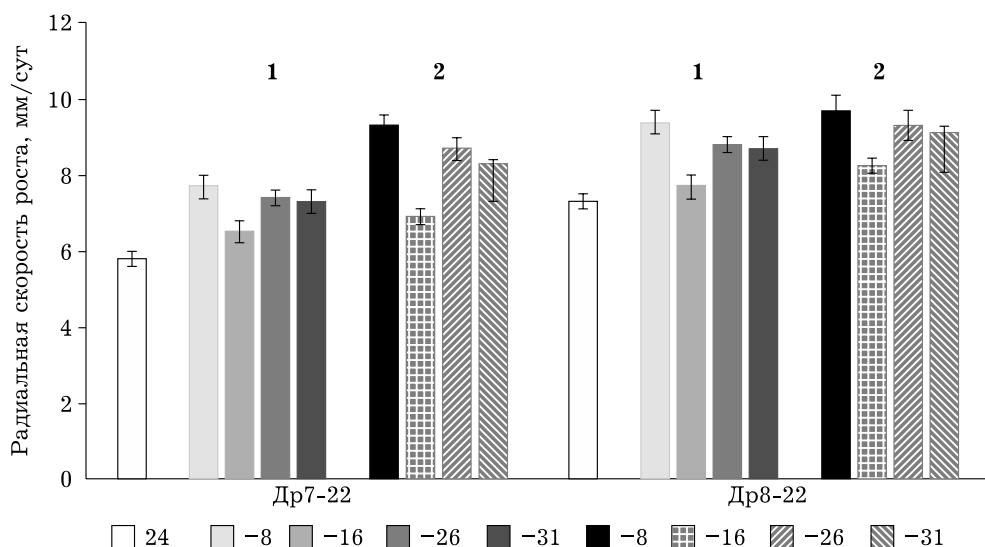


Рис. 5. Ростовые параметры сибирских изолятов *Diplodia sapinea* при 24 °С (контроль) и отрицательных температурах (1 – однократное температурное воздействие; 2 – трехкратный цикл замораживания-оттаивания)

отрицательных температур в пределах от –8 до –31 °С в течение 7 суток штаммы после размораживания быстро активизировались (рис. 5, 6).

На КДА при 24 °С их радиальная скорость роста была выше, чем в контроле (штаммы, не подвергавшиеся замораживанию), и составила от 6,5 до 9,4 мм/сут в зависимости от изолята и температуры воздействия. Относи-

тельно низкие ростовые показатели выявлены после экспозиции мицелия при температуре –16 °С, однако скорость роста была выше уровня контрольных значений.

Активированные культуры были подвергнуты более длительному периоду воздействия отрицательных температур с трехкратным замораживанием и оттаиванием при 6 °С. По завершении эксперимента штаммы по-преж-

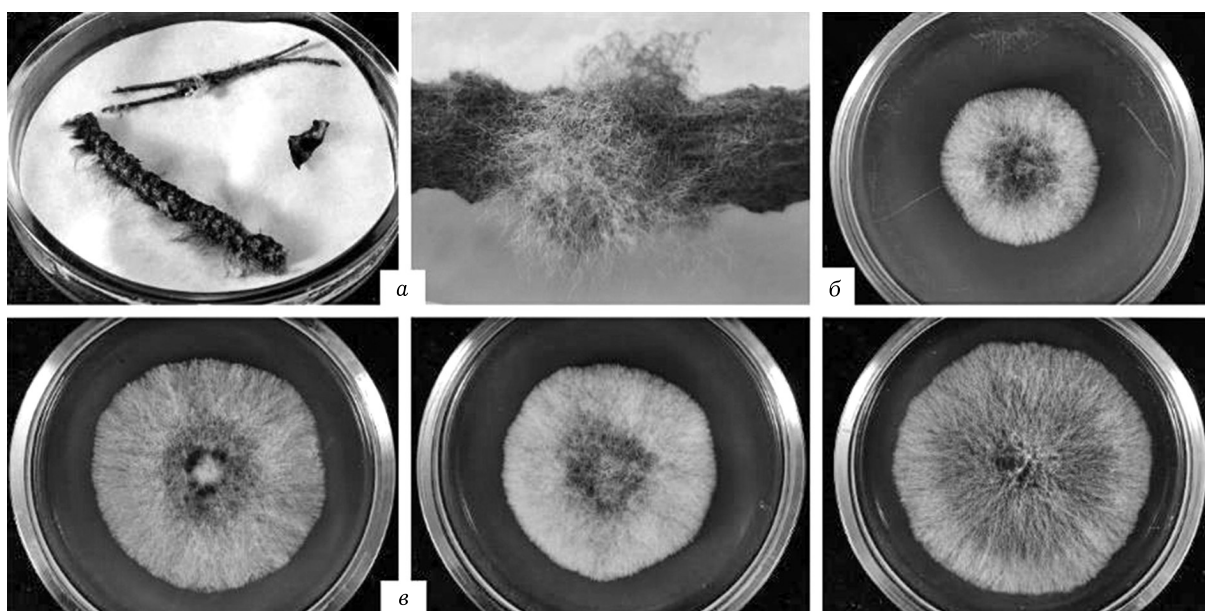


Рис. 6. Морфология сибирских изолятов *Diplodia sapinea* после трехкратного воздействия отрицательных температур (а – мицелий на стерильных побегах и хвое *Pinus sylvestris* при 6 °С после холодового стресса; б – контроль (без воздействия отрицательных температур); в – штаммы после активации)

нему быстро активизировались на питательной среде, а их радиальная скорость роста на КДА при 24 °С была существенно выше относительно контроля (6,9–9,7 мм/сут). При температуре –16 °С также зафиксированы меньшие ростовые показатели на момент активации по сравнению с другими температурами, но при этом значения были выше контрольных.

Таким образом, сибирские штаммы *D. sapinea* в условиях *in vitro* проявляют не только выраженную фитопатогенность в отношении побегов *P. sylvestris*, но и высокую стрессоустойчивость при воздействии отрицательных температур. Проведенный эксперимент в определенной степени снимает вопрос о трудностях преодоления грибами *D. sapinea* температурного барьера в связи с их термофильностью и свидетельствует о возможности их дальнейшего активного распространения в новом ареале с более холодным климатом.

Современный тренд глобального потепления, несомненно, будет только способствовать усугублению фитопатологической ситуации для насаждений *P. sylvestris*, которые являются наиболее подверженными фитопатогенному воздействию *D. sapinea*. Несмотря на то что *P. sylvestris* относительно засухоустойчивый вид, установлено замедление восстановления роста и устойчивости к сильной засухе на участках средней высоты и на участках с более низкой продуктивностью [Bose et al., 2020]. Короткий вегетационный период может сделать деревья, растущие в северных регионах, более чувствительными к потере хвои, чем в южных условиях [Oliva et al., 2016]. Кроме того, наряду с климатическими аномалиями происходит увеличение возраста сосновых лесов. Следует учитывать, что более крупное дерево содержит больше не фотосинтетической биомассы, что требует существенных затрат на поддержание жизнеспособности [Scholz et al., 2011], а возрастание высоты дерева может увеличить гидравлические ограничения и риски кавитации ксилемы в условиях засухи [Olson et al., 2018]. Такое снижение устойчивости деревьев со временем может поставить под угрозу физиологический потенциал адаптации к прогнозируемым более интенсивным и частым засухам и, как следствие, стремительному ухудшению фитопатологической ситуации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые на территории Сибири на разновозрастных деревьях *P. sylvestris* с различным фитопатологическим состоянием нами выявлен инвазионный вид *D. sapinea*, который является опасным патогеном хвойных деревьев. Сибирские изоляты проявляют фитопатогенность *in vitro* в отношении побегов *P. sylvestris* и плодов яблок сорта Granny Smith, вызывая стремительные и обширные некротические поражения коры, камбия и мякоти плода, а также характеризуются высокой активностью пероксидазы и протеазы.

Сибирские изоляты *D. sapinea* по совокупности морфологических признаков, ферментативной активности и фитопатогенности *in vitro* не выходят за пределы показателей южных изолятов. Значительные различия показаны только со штаммом Dp1-23 вида *D. seriata*, который характеризуется максимальными показателями радиальной скорости роста, фитопатогенности на плодах яблок и пероксидазной активности, а также минимальными показателями фитопатогенности на побегах *P. sylvestris* и активности целлюлазы.

Сибирские изоляты *D. sapinea* оказались высокоустойчивыми к холодовому стрессу в серии экспериментов по замораживанию и оттаиванию мицелия в диапазоне температур от –8 до –31 °С. Радиальная скорость роста при 24 °С после активации оказалась существенно выше, чем у штаммов, не подвергавшихся замораживанию. Относительно медленная активация отмечена при –16 °С по сравнению с другими температурами.

Наличие длительной эндофитной фазы *D. sapinea*, высокие адаптивные возможности и фитопатогенность в отношении *P. sylvestris* позволяют патогену оставаться незамеченным карантинными службами при транспортировке живых растений / их фрагментов и представляют особую опасность для распространения инвазивных высокоагрессивных штаммов на новых территориях и растениях-хозяевах.

Вклад авторов

Идея работы и планирование эксперимента (Литовка Ю. А. и Павлов И. Н.), сбор данных (Фомина Н. В., Познухова С. С., Тимофеев А. А.), обработка данных (Литовка Ю. А., Фомина Н. В., Познухова С. С., Тимофеев А. А.), написание и редактирование манускрипта (Литовка Ю. А. и Павлов И. Н.).

Финансирование

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда, № 23-26-00052, <https://rscf.ru/project/23-26-00052>

Соблюдение этических стандартов

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

Конфликт интересов

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

- Методы экспериментальной микологии / под ред. В. И. Билай. Киев: Наукова думка, 1982. 550 с.
- Павлов И. Н., Литовка Ю. А., Бебия С. М., Губаз Э. Ш., Лейба В. Д., Шинкуба М. III, Шармагий А. К., Герасимчук В. Н., Фомина Н. В. К вопросу исследования наиболее вредоносных возбудителей болезней древесных растений в лесных и парковых ландшафтах черноморского побережья России и Абхазии // Бюл. ГНБС. 2023. № 149. С. 72–80.
- Adamson K., Laas M., Blumenstein K., Busskamp J., Langer G. J., Klavina D., Drenkhan R. Highly clonal structure and abundance of one haplotype characterize the *Diplodia sapinea* populations in Europe and Western Asia // J. Fungi. 2021. Vol. 7. P. 634.
- Alves A., Linaldeddu B. T., Deidda A., Scanu B., Phillips J. L. The complex of *Diplodia* species associated with *Fraxinus* and some other woody hosts in Italy and Portugal // Fungal Diversity. 2014. Vol. 67. P. 143–156.
- Blumenstein K., Bußkamp J., Langer G. J., Langer E. J., Terhonen E. The *Diplodia* tip blight pathogen *Sphaeropsis sapinea* is the most common fungus in Scots pines' mycobiome, irrespective of health status – a case study from Germany // J. Fungi. 2021a. Vol. 7, N 8. P. 607.
- Blumenstein K., Bußkamp J., Langer G. J., Schlößer R., Parra Rojas N. M., Terhonen E. *Sphaeropsis sapinea* and associated endophytes in scots pine: interactions and effect on the host under variable water content // Front. For. Glob. Change. 2021b. Vol. 4.
- Bose A. K., Gessler A., Bolte A., Bottero A., Buras A., Caillet M., Rigling A. Growth and resilience responses of Scots pine to extreme droughts across Europe depend on predrought growth conditions // Global Change Biol. 2020. Vol. 26, N 8. P. 4521–4537.
- Brodde L., Adamson K., Julio Camarero J., Castaño C., Drenkhan R., ... Oliva J. *Diplodia* tip blight on its way to the north: Drivers of disease emergence in Northern Europe // Front. Plant Sci. 2019. Vol. 9. P. 1818–1829.
- Brodde L., Aslund M. S., Elfstrand M., Oliva J., Wagström K., Stenlid J. *Diplodia sapinea* as a contributing factor in the crown dieback of Scots pine (*Pinus sylvestris*) after a severe drought // Forest Ecol. Management. 2023. Vol. 549. 121436.
- Burgess T. I., Wingfield M. J., Wingfield B. D. Global distribution of *Diplodia pinea* genotypes revealed using simple sequence repeat (SSR) markers // Australas. Plant Pathol. 2004. Vol. 33. P. 513–519.
- Bußkamp J., Blumenstein K., Terhonen E., Langer G. J. Differences in the virulence of *Sphaeropsis sapinea* strains originating from scots pine and non-pine hosts // For. Pathol. 2021. Vol. 51.
- Caballol M., Méndez-Carín A. L., Serradó F., de Cáceres M., Coll L., Oliva J. Disease in regenerating pine forests linked to temperature and pathogen spillover from the canopy // J. Ecol. 2022. Vol. 110, N 11. P. 2661–2672.
- Chiang F., Mazdiyasni O., AghaKouchak A. Evidence of anthropogenic impacts on global drought frequency, duration, and intensity // Nat. Commun. 2021. Vol. 12, N 1. P. 2754.
- Díaz G. A., Valdez A., Halleen F., Ferrada E., Lolas M., Latorre B. A. Characterization and Pathogenicity of *Diplodia*, *Lasioidiplodia* and *Neofusicoccum* Species Causing *Botryosphaeria* Canker and Dieback of Apple Trees in Central Chile // Plant Disease. 2022. Vol. 106. P. 925–937.
- Drenkhan T., Voolma K., Adamson K., Sibul I., Drenkhan R. The large pine weevil *Hylobius abietis* (L.) as a potential vector of the pathogenic fungus *Diplodia sapinea* (Fr.) Fuckel. // Agricult. and Forest Entomol. 2017. Vol. 19, N 1. P. 4–9.
- Fabre B., Piou D., Desprez-Loustau M.-L., Marçais B. Can the emergence of pine *Diplodia* shoot blight in France be explained by changes in pathogen pressure linked to climate change? // Glob. Change Biol. 2011. Vol. 17. P. 3218–3227.
- Keen A., Smits T. F. C. Application of a mathematical function for a temperature optimum curve to establish differences in growth between isolates of a fungus // Netherlands J. Plant Pathol. 1989. Vol. 95. P. 37–49.
- Langer G. J., Bußkamp J. Fungi associated with woody tissues of European beech and their impact on tree health // Front. Microbiol. 2021. Vol. 12. 702467.
- Linaldeddu B. T., Deidda A., Scanu B., Franceschini A., Alves A., Abdollahzadeh J., Phillips A. J. L. Phylogeny, morphology and pathogenicity of *Botryosphaeriaceae*, *Diatrypaceae* and *Gnomoniaceae* associated with branch diseases of hazelnut in Sardinia (Italy) // Eur. J. Plant Pathol. 2016. Vol. 146. P. 259–279.
- Luchi N., Pratesi N., Simi L., Pazzagli M., Capretti P., Scala A., ... Pinzani P. High-Resolution Melting Analysis: a new molecular approach for the early detection of *Diplodia pinea* in Austrian pine // Fungal Biol. 2011. Vol. 115, N 8. P. 715–723.
- Markovskaja S., Kačergius A., Davydenko K., Fraser S. First record of *Neocatenulostroma germanicum* on pines in Lithuania and Ukraine and its co-occurrence with *Dothistroma* spp. and other pathogens // Forest Pathol. 2016. Vol. 46, N 5. P. 522–533.
- Martínez-Medina G. A., Prado-Barragán A., Torres-León C. Exploration of potential of different fungi in protease production and analysis of capacity to produce active peptides // Systems Microbiol. and Biomanufacturing. 2024. Vol. 4, N 1. P. 274–281.
- Milijašević T. Effect of temperature on the mycelial growth of the fungus *Sphaeropsis sapinea* // Glasnik Šumarskog Fakulteta. 2006. Vol. 94. P. 211–222.
- Oliva J., Ridley M., Redondo M. A., Caballol M. Competitive exclusion amongst endophytes determines shoot blight severity on pine // Funct. Ecol. 2021. Vol. 35. P. 239–254.
- Oliva J., Stenlid J., Grönkvist-Wichmann L., Wahlström K., Jonsson M., Drobyshev I. Pathogen-induced defoliation of *Pinus sylvestris* leads to tree decline and death from secondary biotic factors // For. Ecol. Manag. 2016. Vol. 379. P. 273–280.

- Olson M. E., Soriano D., Rosell J. A., Anfodillo T., Donoghue M. J., Edwards E. J., Méndez-Alonzo R. Plant height and hydraulic vulnerability to drought and cold // Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 2018. Vol. 115, N 29. P. 7551.
- Prospero S., Botella L., Santini A., Robin C. Biological control of emerging forest diseases: How can we move from dreams to reality? // For. Ecol. Manage. 2021. 119377.
- Redondo M. A., Boberg J., Stenlid J., Oliva J. Contrasting distribution patterns between aquatic and terrestrial *Phytophthora* species along a climatic gradient are linked to functional traits // The ISME J. 2018. Vol. 12, N 12. P. 2967–2980.
- Roy D., Gunri S. K., Pal K. K. Isolation, screening and characterization of efficient cellulose-degrading fungal and bacterial strains and preparation of their consortium under in vitro studies // Biotech. 2024. Vol. 14, N 5. P. 1–15.
- Roy J., Kyritsi I., Reinwarth N., Bachelier J. B., Rillig M. C., Lücking R. Host and abiotic constraints on the distribution of the pine fungal pathogen *Sphaeropsis sapinea* (= *Diplodia sapinea*) // Front. Forests and Global Change. 2022. Vol. 5. 971916.
- Savinova O. S., Chulkin A. M., Moiseenko K. V., Fedorova T. V. Obtaining a Recombinant Producer of *Trametes hirsuta* Versatile Peroxidase VP2 in *Penicillium canescens* // Appl. Biochem. and Microbiol. 2023. Vol. 59, N 6. C. 891–899.
- Scholz F., Phillips N., Bucci S., Goldstein G. Hydraulic capacitance: Biophysics and functional significance of internal water sources in relation to tree size // Size- and age-related changes in tree structure and function / Eds.: F. C. Meinzer, B. Lachenbruch, T. E. Dawson. Dordrecht, The Netherlands: Springer, 2011. Vol. 4. P. 341–361.
- Stanosz G. R., Blodgett J. T., Smith D. R., Kruger E. L. Water stress and *Sphaeropsis sapinea* as a latent pathogen of red pine seedlings // New Phytologist. 2001. Vol. 149, N 3. P. 531–538.
- Terhonen E., Babalola J., Kasanen R., Jalkanen R., Blumenstein K. *Sphaeropsis sapinea* found as symptomless endophyte in Finland // Silva Fennica. 2021. Vol. 55, N 1. P. 10420.
- Zwolinski J. B., Swart W. J., Wingfield M. J. Association of *Sphaeropsis sapinea* with insect infestation following hail damage of *Pinus radiata* // Forest Ecol. and Management. 1995. Vol. 72. P. 293–298.

First report of *Diplodia sapinea* P. Karst. on *Pinus sylvestris* L. in Central Siberia

YU. A. LITOVKA^{1, 2, 3}, S. S. POZNUKHOVA¹, N. V. FOMINA^{1, 2}, A. A. TIMOFEEV^{2, 3}, I. N. PAVLOV^{1, 2}

¹Reshetnev Siberian State University of Science and Technology
31, Krasnoyarskiy rabochiy ave., Krasnoyarsk, 660037, Russia
E-mail: litovkajul@rambler.ru

²V. N. Sukachev Institute of Forest of SB RAS
50/28, Akademgorodok, Krasnoyarsk, 660036, Russia

³Federal Research Center “Krasnoyarsk Science Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences”
50, Akademgorodok, Krasnoyarsk, 660036, Russia

For the first time in Central Siberia, in the parks of Krasnoyarsk, on *Pinus sylvestris* L. trees of different ages with different phytopathological conditions, we identified the invasive species *Diplodia sapinea* (Fr.) P. Karst., which is a dangerous pathogen of coniferous trees. Pure cultures were isolated from pycnidia on cones; their morphological and molecular genetic characteristics correspond to the species *D. sapinea*. Siberian isolates are characterized by a high radial growth rate on nutrient media; are phytopathogenic against shoots of *P. sylvestris* and fruits of Granny Smith apples in vitro. They cause rapid and extensive necrotic lesions of the bark, shoot cambium and fruit pulp; exhibit high peroxidase and protease enzymatic activity. Siberian isolates of *D. sapinea* do not exceed the parameters of southern isolates in terms of morphological characteristics, enzyme activity and phytopathogenicity. Significant differences are shown with the Dp1-23 strain of *Diplodia seriata* De Not, isolated from pycnidia on the cones of *Cupressus sempervirens* L. For Siberian isolates of *D. sapinea*, high resistance to cold stress was established in the temperature range from –8 to –31 °C in a series of experiments on freezing and thawing of the mycelium. After activation, the radial growth rate of isolates on PDA at 24 °C turned out to be higher than that of strains that were not subjected to freezing; relatively slow activation was noted at –16 °C compared to other temperatures. The presence of a long endophytic phase in a species first discovered in Central Siberia, high adaptive capabilities and phytopathogenicity pose a particular danger to its spread to a new territory and host plants, which requires special attention and study.

Key words: phytopathogen, endophyte, *Diplodia sapinea*, first detection, invasion, temperature stress, enzymatic activity, growth rate.