

САПРОТРОФНАЯ МИКОБИОТА ЛИСТОВОГО ОПАДА ЯСЕНЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ ЕЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ДЛЯ РАЗВИТИЯ МЕТОДА БИОЛОГИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ ХАЛАРОВОГО НЕКРОЗА

Усыхание ясеня (суховершинность ясеня, халаровый некроз) – болезнь, поражающая в основном ясень обыкновенный и ясень узколистный. Является причиной массовой гибели ясеневых насаждений на территории Европы. Возбудитель – инвазивный аскомицет из восточной Азии *Hymenoscyphus fraxineus* (= *Chalara fraxinea*). Впервые был идентифицирован в Польше в 1992 году [1].

Из-за низкой устойчивости европейских ясеней вредоносность новой болезни оказалась чрезмерно высокой. Повсеместно отмечается деградация ясеневых насаждений и снижение их доли в лесном покрове. Например, в Беларуси менее чем за два десятилетия погибло более половины ясеневых лесов [2].

В настоящее время эффективных мер защиты ясеня не разработано, однако считается, что наиболее перспективны исследования в области селекции ясеня на устойчивость и поиск методов биологического контроля.

Биологический метод защиты растений – это система защитных и профилактических мероприятий с использованием полезных организмов (агентов биоконтроля) и веществ ими продуцируемых, решение о применении которых зависит от результатов фитопатологического мониторинга и прогнозов вредоносности болезней и вредителей [3].

Стадия полового размножения инвазивного гриба *H. fraxineus* проходит в лесной подстилке на остатках прошлогодних листьев ясеня. В западно-европейских странах изучались состав и сукцессии микобиоты на рахисах ясеня обыкновенного для поиска возможности биологического контроля усыхания ясеня с помощью сапротрофных грибов, заселяющих черешки [3,4].

Целью данной работы было изучение аборигенной сапротрофной микобиоты рахисов ясеня обыкновенного в Беларуси с целью поиска потенциального агента биологического контроля инвазивного патогена *H. fraxineus*.

Материалы для получения чистых культур грибов-сапротрофов отбирались в дендрарии Негорельского учебно-опытного лесхоза и в лесных насаждениях Минского лесхоза. Чистые культуры *H. fraxineus* были получены из пораженных побегов ясеня обыкновенного, отобранных в лесных насаждениях Негорельского учебно-опытного лесхоза.

Выделение чистых культур проводили общепринятыми методами на агар с солодовым экстрактом (malt agar).

Идентификация чистых культур производилась методом секвенирования по Сэнгеру на генетическом анализаторе НАНОФОР 05 (Синтол, РФ). Интерпретация получаемых данных выполнялась с использованием программного обеспечения Sequencing Analysis Software v.6.0 (Applied Biosystems, США). Структура секвенированных ампликонов была проанализирована с помощью программы BLAST в NCBI GenBank.

В результате работы из рахисов ясеня было выделено в чистые культуры 6 видов грибов. 5 из них удалось идентифицировать молекулярно-генетическими методами:

Xylaria sp. – род аскомицетных грибов, включающий более 500 видов заселяющих мертвый субстрат, обычно древесину. Характеризуются относительно крупными стромами, в которых содержатся плодовые тела [4].

Marasmius epiphyllus – базидиомицет, гриб с широким космополитичным ареалом. Встречается группами на опаде различных листовых деревьев, чаще на влажных участках, способен, как и большинство видов рода *Marasmius*, долго выдерживать засухи [5].

Trichoderma hamatum – аскомицет, широко распространённый гриб, встречающийся в почве и на различных растительных субстратах, иногда в качестве эндофита какао [6].

Fusarium graminearum – аскомицет, повсеместно распространённый вид, выделяемый из почвы и с различных частей злаков, реже с других растений. Вызывает гниль зерновок и гибель проростков [7].

Mycena olivaceimarginata – представители рода почти исключительно сапротрофные, произрастает осенью на открытых местах среди травы и мхов, группами. Сообщается, что они образуют микоризные ассоциации с отдельными видами *Orchidaceae* [8].

Из наркотизированных побегов ясеня обыкновенного было выделено 5 штаммов *H. fraxineus*.

Первичным этапом отбора перспективных антагонистов является определение их скорости линейного роста на твердых питательных средах [9]. Высокая скорость роста является важной характеристикой

эффективного агента биоконтроля, свидетельствующая о способности организма быстро заселять субстрат, конкурируя с целевыми патогенами. Скорости роста сапротрофов в сравнении с патогенным инвайдером *H. fraxineus* изучалась на двух средах: агар с солодовым экстрактом и та же среда с добавлением отвара из ветвей ясеня. Опыт проводился в трехкратной повторности с усреднением результатов измерения скорости радиального роста, измеренной в 4-х направлениях. На агаре с солодовым экстрактом наиболее быстрорастущими колониями характеризовались *F. graminearium*, *T. hamatum* и вид из рода *Xylaria* sp. – 7,00, 6,30 и 3,68 мм/сут. соответственно. Они достигли краев чашки за время проведения эксперимента (15 суток). *Xylaria* sp на 3 сутки после достижения краев чашки начал образовывать строны, в которых располагаются плодовые тела перитеции.

Среда с отваром из ветвей ясеня в используемой концентрации (50 г. сухих ветвей на 0,5 л воды) оказала ощутимый ингибирующий эффект на развитие всех изучаемых видов грибов. Самые быстрорастущие виды *T. hamatum*, *M. epiphyllus*, *M. olivaceomarginata* показали тут скорость роста 3,03, 1,84, 1,69 мм/сут. соответственно, что более чем в 2 раза ниже, чем на чистом агаре с солодовым экстрактом. Кроме этого, на данной среде существенно изменилась морфология колоний большинства изучаемых видов и в особенности *F. graminearum*. Мы связываем это с высокой концентрацией дубильных веществ в ветвях и коре ясеня. Экстракт этих танинов проявил существенное фунгистатическое действие.

Скорость роста штаммов *H. fraxineus* существенно ниже по сравнению с сапротрофными видами и составляет в среднем 0,91 мм/сут. на агар с солодовым экстрактом и 0,11 мм/сут. на среде с добавлением отвара из ветвей ясеня. Причем наблюдается быстрая деградация культур патогена. Через 3-4 пассажа, грибок с трудом переходит на агаризованную питательную среду, что создает дополнительные затруднения в постановке опыта на антагонистическую активность.

Для культивации грибов-сапротрофов использовались различные методы. Относительно эффективнее был метод помещения рахисов во влажную камеру (выделено больше видов). Меньшая эффективность метода помещения рахисов на питательную среду обусловлена массовым ростом бактерий. Возможно, этот метод применим только для выделения только быстрорастущих организмов.

Питательная среда с высокой концентрацией отвара из ветвей ясеня не может рекомендоваться для выращивания изучаемых видов грибов из-за явного фунгистатического действия.

Таким образом, предварительно, основываясь на результатах определения радиальной скорости чистых культур как одном из критерии отбора агентов биологического контроля, для этой цели рекомендуются *Xylaria sp.* и *T. hamatum*. *F. graminearum* не рекомендуется как агент биологического контроля из-за фитопатогенных свойств в отношении проростков и молодых растений.

ЛИТЕРАТУРА

1 Kowalski T. *Chalara fraxinea* sp. nov. associated with dieback of ash (*Fraxinus excelsior*) in Poland // Forest Pathology. 2006. № 36. p. 264–270.

2 Звягинцев В.Б., Ярук А.В., Кривицкая З.И., Пантелеев С.В., Потапова А.В. О разработке программы защиты и восстановления ясеневых лесов Беларуси // Дендробионтные беспозвоночные животные и грибы и их роль в лесных экосистемах (XI Чтения памяти О.А. Катаева) 2020. С. 164–165.

3 Kowalski T, Bilański P. Fungi Detected in the Previous Year's Leaf Petioles of *Fraxinus excelsior*...// Forests 2021, 12(10).

4 Bilański P., Kowalski T. Fungal endophytes in *Fraxinus excelsior* petioles ... // Microbiological Research V. 257, 2022

5 O'Brien, P.A. Biological control of plant diseases. Australasian Plant Pathol. 46, 293–304 (2017).

6 *Xylaria* sp. The Candle Snuff Fungus from West Java Rudy Hermawan, Yuyu Nisaul Khairillah Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, IPB University, Darmaga Campus, Bogor 16680, Indonesia.

7 Noordeloos M. E. Flora agaricina Neerlandica – 1995. – Vol. 3. – P. 141–142.

8 Gams W., Bissett J. Morphology and identification of *Trichoderma* // *Trichoderma & Gliocladium* / C. P. Kubicek, G. E. Harman (eds.). – Taylor & Francis, 1998. – Vol. 1. Basic biology, taxonomy and genetics. – P. 18.

9 Пидопличко Н. М. Грибы-паразиты культурных растений: Определитель. – Киев: «Наукова думка», 1977. – Т. 2. – С. 257.

10 Emmett, E.E., Aronsen, A., Læssøe, T. & Elborne, S.A. 2008. *Mycena*. – In: Knudsen, H. & Vesterholt, J. (eds.): *Funga Nordica*, p. 360.

11 Романовская Т.В., Арашкова А.А., Тригубович А.М., Коломиец Э.И., Звягинцев В.Б., Волченкова Г.А., Савицкий А.В. Скрининг изолятов *Phlebiopsis gigantea*, перспективных для создания биопрепарата против корневой гнили / Микробные биотехнологии: Фундаментальные и прикладные аспекты: сб. науч. тр. Института микробиологии НАН Беларуси – Минск: «Беларуская навука», 2017. – Т. 9. С. 92–103.