

ГРИБЫ – ВОЗБУДИТЕЛИ  
БОЛЕЗНЕЙ РАСТЕНИЙ

УДК 632.4.01/.08

ИДЕНТИФИКАЦИЯ *PESTALOTIOPSIS FUNEREA* НА ПОРАЖЕННЫХ  
ДЕРЕВЬЯХ ТУИ ЗАПАДНОЙ В ДЕКОРАТИВНЫХ НАСАЖДЕНИЯХ  
МОСКОВСКОЙ ОБЛАСТИ (РОССИЯ)

© 2022 г. С. Д. Каракотов<sup>1,\*</sup>, Н. В. Аршава<sup>1,\*\*</sup>, М. Б. Башкатова<sup>1,\*\*\*</sup>, Т. А. Андреева<sup>1,\*\*\*\*</sup>

<sup>1</sup>АО “Щелково Агротех”, 141108 Щелково, Россия

\*e-mail: ksd@betaren.ru

\*\*e-mail: arshava@betaren.ru

\*\*\*e-mail: bashkatova.m@betaren.ru

\*\*\*\*e-mail: dementyeva.t@betaren.ru

Поступила в редакцию 08.04.2022 г.

После доработки 05.06.2022 г.

Принята к публикации 07.06.2022 г.

В декоративных насаждениях в Московской обл. при исследовании филлотрофных грибов на деревьях туи западной с симптомами усыхания и отмирания трофических побегов выделен преобладающий в сообществе микромицет. На основании морфологических характеристик репродуктивных структур и сравнительного анализа последовательности ITS-региона рРНК была подтверждена его тождественность *Pestalotiopsis funerea* – возбудителю некроза туи (песталоциоз). Для экспресс диагностики песталоциозидных грибов в растительном материале были разработаны праймеры, которые позволили получить хорошо выявляемое количество целевого продукта ПЦР размером 443 п.н.

**Ключевые слова:** конидии, праймеры, ПЦР, сиквенс, филлотрофные микромицеты, ITS-регион рРНК

**DOI:** 10.31857/S0026364822050063

ВВЕДЕНИЕ

Туя – род голосеменных хвойных растений семейства кипарисовые (*Cupressaceae*). Виды этого рода, особенно туя западная (*Thuja occidentalis*), активно используются в садоводстве в качестве декоративно-лиственного растения. В древесине туи содержатся аромодендрин, токсифоллин, эфирные масла, обладающие противогрибковыми и антибактериальными свойствами. Листья используются в медицине из-за их антибактериального, жаропонижающего, противокашлевого, вяжущего, мочегонного, гемостатического и охлаждающего действия (Raghavendra et al., 2007). При надлежащем уходе и принятии профилактических мер деревья и кустарники туи обладают высокой устойчивостью к болезням. Все это делает ее чрезвычайно популярной и востребованной в городских насаждениях. Однако в связи с наблюдаемыми в последние десятилетия климатическими изменениями, увеличением объемов интродукции декоративных сортов, генетической пластичности патогенных микроорганизмов, усилением антропогенного воздействия на природу и пр., возросла степень ее поражения различными заболеваниями. Сведения о возбудителях этих заболеваний в отечественной литературе пока весьма скудны. Очевидно, интерес к изучению микробиоты ин-

тродуцируемых растений будет повышаться в связи с распространением болезней, снижающих их декоративность и долговечность. Тем не менее, фитопатологические исследования *Cupressaceae* в средней полосе России проводились и ранее.

Так, в 2009 г. в озеленительных посадках Москвы и Московской обл. на туе западной были описаны грибы *Hendersonia notha* Sacc., *Phoma thujana* Thm, *Phomopsis juniperovora* Hahn., *Kabatina thujae* Schneider ex von Arx. и *Pestalotiopsis funerea* (Desm.) Steyaert. Правда, в этих исследованиях последний вид особенно часто встречался на можжевельнике (Sokolova, Kolganikhina, 2009). В 2010 г. видовой состав патогенных грибов *Thuja occidentalis* дополнен *Coryneum thujinum* Dearn., *Steganosporium piri-forme* (Hoffm.) Corda, *Acanthostigma parasitica* (Hart.) Sacc. (Zhukov et al., 2010).

Объектом настоящего исследования стали 12-летние деревья туи западной сорта Колумна, высаженные на приусадебном участке в д. Таганьково Одинцовского р-на Московской обл. (55°68'44" с.ш., 37°06'66" в.д.). Во время обследования растений были отмечены верхушечные ожоги, повреждение и отмирание ветвей. Процесс начинался на кончиках молодых платикладиев, которые сначала желтели, затем становились коричневыми и в конечном итоге преждевременно опадали. На по-



Рис. 1. Симптомы песталоциозного увядания хвои туи западной.

верхности этих трофических побегов обнаруживались крошечные черные пятнышки, представляющие собой спороношения грибов. Описанная симптоматика свидетельствовала об инфекционном характере повреждений.

Целью данной работы стала идентификация патогена, несущего ответственность за перечисленные выше симптомы, на основе морфологических признаков его репродуктивных структур и путем генетической характеристики ITS-региона его ДНК.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Образцы веток туи с признаками хлороза, увядания и усыхания были отобраны с нескольких деревьев, предназначенных для озеленения приусадебного участка и прилегающих к нему улиц, в июле 2021 г. (рис. 1). При первичном визуальном осмотре на них были обнаружены следы жизнедеятельности минирующей туевой моли-пестрянки (*Argyresthia thuiella*), гусеницы которой прогрызают ходы в толще листовых пластинок и питаются их столбчатой паренхимой. Они перезимовывают внутри веток туи, весной там же окукливаются. Имаго вылупляются с середины мая до начала июля. Ежегодно развивают одно поколение *A. thuiella*. Встречается повсеместно (Копецн, efrov, 2014). На момент исследования бабочки уже покинули листья туи, практически не нанеся эстетического ущерба растениям.

На пораженных деревьях также были отмечены хлоротические и красновато-коричневые участки, распределенные случайным образом среди здоровой хвои. Концы пораженных побегов теряли зе-

леную окраску. На них наблюдалось пожелтение, верхушечный некроз и коричневые некротические пятна неправильной формы, которые со временем распространялись на весь платикладий, окрашивая его сначала в красновато-бурый, затем в бурый цвет. Со временем на поверхности трофических побегов образовывались единичные оливково-черные скопления в виде коростинок, представляющие собой спороношение гриба. Побуревшая хвоя преждевременно осыпалась.

С целью идентификации возбудителей болезни фрагмент платикладия осторожно промывали водой, поверхностно стерилизовали 96%-м этанолом и инкубировали на влажной фильтровальной бумаге в течение 8 сут. Колонии грибов пересеивали на картофельно-сахарозный агар (КСА), где через 7–10 сут развивался мицелий. Для получения моноспоровых изолятов инкубацию продолжали до появления спороношения. После чего стерильной иглой снимали одну или несколько конидий с конидиеносца и переносили на агаризованную среду для морфологической идентификации, которую проводили согласно методическим указаниям ВНИИЛМ (Zhukov et al., 2013). Все грибные структуры были исследованы под микроскопом стерео MC-5-ZOOM LED и сфотографированы с использованием цифрового видеоокуляра Toupcam UCMOS14000KPA.

Молекулярно-генетическая характеристика культуры получена путем секвенирования внутреннего транскрибируемого спейсерного региона рибосомальной РНК (ITS-региона). ITS-регионы, находясь между малой (18S рДНК) и большой (28S рДНК) субъединицами рибосомной РНК, традиционно являются основной мишенью при определении таксономического положения микроорганизма. Они присутствуют во всех известных организмах, более вариабельны среди близкородственных видов, чем регионы, кодирующие гены рРНК и, наконец, широко представлены в базах данных нуклеотидных последовательностей (в том числе GenBank NCBI). Для генетического анализа спородохии моноспорового изолята собирали стерильной иглой и переносили в картофельно-сахарозный бульон. Через 8 сут инкубации из выросшего мицелия экстрагировали ДНК по модифицированному протоколу СТАВ-PVPP (Neuhauser et al., 2009). ITS-регион был амплифицирован с использованием пары праймеров ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') и ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White et al., 1990). Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в общем объеме 25 мкл и она состояла из следующих стадий: 5-минутная денатурация при 94°C, за которой следовали 35 температурных циклов: 35 с при 95°C, 55 с при 56°C и 45 с при 72°C. Реакция завершалась этапом элонгации в течение 10 мин при 72°C. Продукты амплификации разделяли с помощью электрофореза в геле,

содержащем 1.0% агарозы. Фрагменты ДНК визуализировали с помощью окрашивания бромистым этидием в УФ-свете. Секвенирование ампликонов проводилось в ООО “Синтол”, г. Москва с использованием тех же праймеров, что и для реакции амплификации.

Для определения сходства полученных последовательностей с депонированными в GenBank NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) использовалась поисковая компьютерная программа BLAST. Таксоны грибов были отнесены к виду и роду, демонстрирующим гомологию, равную или превышающую 99%.

Патогенность обнаруженных изолятов подтверждалась путем инокуляции здоровых трофических побегов туи суспензией описываемого гриба. Всего 15 платикладиев были осторожно повреждены легкими уколами игл для инсулиновых шприцев. Пять из них были оставлены в качестве контроля. Грибную культуру выращивали на КСА в пластиковых чашках Петри в темноте при 25°C. Интенсивное спороношение наблюдалось уже на 15-е сутки. Собранную споровую массу суспендировали в стерильной воде до концентрации 10<sup>7</sup> спор/мл и наносили на образцы мягкой кистью. Контрольные варианты обрабатывали стерильной водой.

После инокуляции образцы оставляли на влажной фильтровальной бумаге в чашке Петри в течение 14 сут при температуре 17–22°C. Поливали по мере необходимости. Опыт повторяли дважды.

Дизайн праймеров для экспресс-диагностики возбудителей заболеваний растений разрабатывали с помощью программного обеспечения PrimerQuest™ Tool. Вероятность формирования вторичных структур (димеры и шпильки) оценивали в той же программе. Проверку специфичности праймеров проводили с помощью алгоритма primer-BLAST (NCBI) *in silico* и конвенционной ПЦР на амплификаторе ДТ-96 (Москва, ООО “ДНК-Технология”) с использованием ДНК фитопатогенных микромикетов.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

В проведенных экспериментах 10-дневная инкубация пораженных фрагментов платикладиев во влажной камере спровоцировала развитие спороношения гриба, которое в природных условиях наблюдается осенью, с наступлением влажной и прохладной погоды. Визуально наблюдалось большое количество хаотично рассеянных черных округлых бугорков, выступающих из трещин покровных тканей и представляющих собой группировки конидиеносцев (ацервулы) с обильным конидиальным спороношением (рис. 2).

Колонии моноспоровых изолятов, предназначенные для морфологической идентификации, обладали выраженными индивидуальными особенностями. На КСА они сначала были белыми с

обильным воздушным мицелием, позднее темнели и становились серо-белыми, серыми или бледно-коричневыми. Росли быстро. Агар на чашке Петри диаметром 90 мм при температуре 25°C зарастал мицелием за 10 сут. Спустя еще 5–7 сут начиналось обильное конидиальное спороношение. Конидии образовывались в плоских черных или коричневых ацервулах, частично погруженных в мицелий и неравномерно в нем распределенных (рис. 2, а, б).

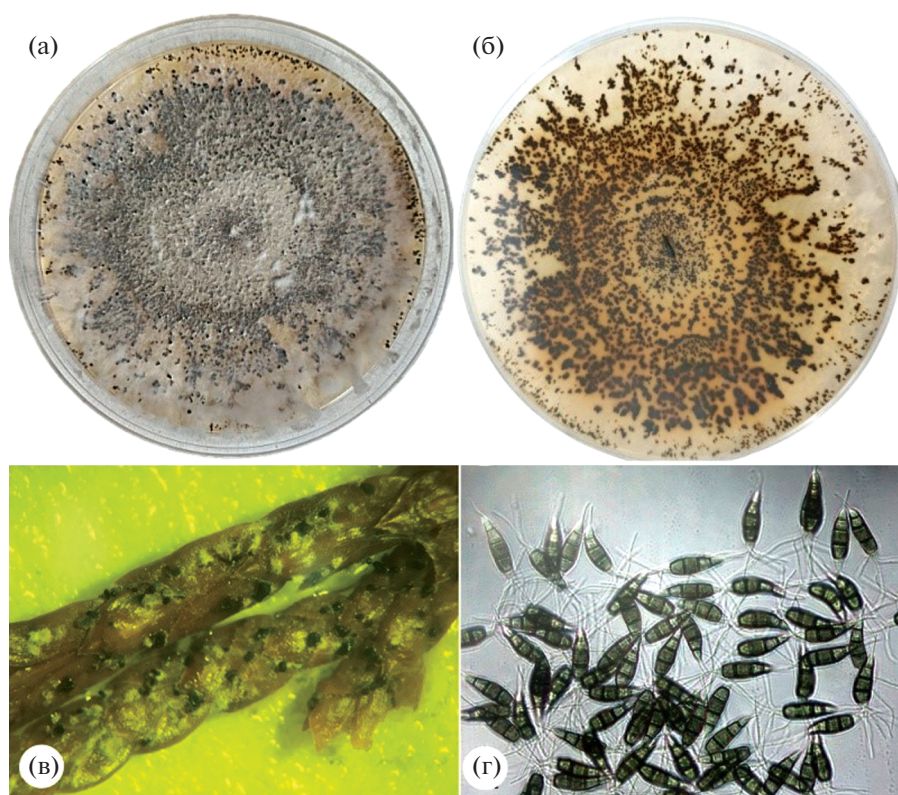
Первичная идентификация культур была выполнена на основе морфологических признаков репродуктивных структур. Конидии анализируемого микромикета представляли собой прямые или слегка изогнутые пятিকлеточные объекты веретеновидной и эллипсоидной формы с четырьмя поперечными перегородками. Три центральные клетки пигментированы, апикальные и базальные – прозрачные. Базальная клетка обычно заканчивалась шиповидным придатком. На апикальной насчитывалось от двух до шести нитевидных или ресничковидных придатков. Длина ресничек от 5 до 30 мкм, некоторые из них были разветвленные, большинство простые.

С этими данными хорошо согласуются описанные ранее морфологические характеристики *Pestalotiopsis funerea* (Ascomycota, Sordariomycetes), изолированного из сосны желтой, или оregonской (*Pinus ponderosa*), сосны Культера (*P. coulteri*) и сосны черной (*P. nigra*). Фитоэкспертизе подвергались деревья с симптомами болезни хвои, фитофтороза и серой гнили в Словакии (Ivanova, 2016).

Генетическая характеристика культуры, выделенной из подмосковной туи, была получена путем секвенирования внутреннего транскрибируемого спейсерного региона рибосомальной РНК (ITS-региона). Полученную в результате последовательность *Pestalotiopsis funerea* X-001 депонировали в GenBank NCBI под номером ON160928.1 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/ON160928>). По результатам BLAST при равном проценте идентичности с *Pestalotiopsis hollandica* (MH855436.1, NR\_147555.1, MH107906.1 и MT374678.1) и *Pestalotiopsis monochaeta* (KM199329.1, NR\_147554.1) наивысшая оценка выравнивания получена между последовательностью изучаемого микромикета и *Pestalotiopsis funerea* (EF055197.1). На лучшее соответствие между ними указывает и Query Coverage – 100% последовательности запроса покрывается эталонной последовательностью *P. funerea*.

В тестах на инокуляцию через 30 сут инкубации на всех побегах, обработанных суспензией конидий *P. funerea*, наблюдались некротические участки, выходящие за пределы точек инокуляции, частично выраженный хлороз или обесцвечивание. Контрольные образцы оставались либо бессимптомными, либо некроз наблюдался только в точке инокуляции, без дальнейшего распространения. Это говорит о том, что *P. funerea* способен колони-





**Рис. 2.** *Pestalotiopsis funerea*: а – через 10 сут инкубации на среде КСА; б – реверс; в – побег туи с множеством черных спорообразующих тел, ацервул гриба на увеличении 14×; г – септированные конидии гриба с апикальными и базальными придатками на увеличении 200×.

зировать платикладии туи, вызывая их патологические изменения.

## ОБСУЖДЕНИЕ

*P. funerea* вызывает некроз побегов хвойных пород, или песталоциоз. В странах Азии заболевание приобрело широкое распространение. Так, в Китае при исследовании эндофитов, ассоциированных с корой и хвоей *Pinus armandii*, 132 изолята были идентифицированы как виды *Pestalotiopsis*. Филогенетический анализ проводился на основании сходства ITS-регионов рибосомной ДНК и последовательностей гена β-тубулина (Hongli et al., 2006). В Алжире на 40-летних деревьях кипариса крупноплодного и можжевельника колючего наблюдались язвы на стволах и ветвях с обесцвечиванием коры, трещинами, выделением смолы, ведущими к отмиранию, увяданию кроны и гибели деревьев. При дальнейшем обследовании было выявлено, что данные симптомы вызывал гриб *Botryosphaeria iberica* совместно с *Pestalotiopsis funerea* (Azouaoui-Idjer et al., 2012).

В Европе и некоторых штатах США заболевание систематически обнаруживается местными исследователями. Первое сообщение о *P. funerea* на кипарисе Лейланда в Италии опубликовано в 2001 г. Гриб был выделен из некротизированных веточек и язв с ацервулиями на деревьях с симпто-

мами пожелтения листьев и отмирания ветвей (Gonthier, Nicolotti, 2002). На севере Португалии в 2004 г. было впервые зафиксировано заражение *P. funerea* хакеи игловидной (*Hakea sericea*). Поскольку инвазия этого растения становится проблемой для сохранения местного биоразнообразия, *Pestalotiopsis* в перспективе планируется использовать для биологической борьбы с захватчиком (Sousa et al., 2004). В Словакии гриб поражал сосны *Pinus ponderosa* и *P. nigra* (Ivanová, 2016), во Франции – шишечки кипариса (Bouaziz, 2003). При описании тиса ягодного (*Taxus baccata*), распространенного на меловых склонах Саут-Даунс в Великобритании авторы включили *Pestalotiopsis funerea* в список сордариомицетов, паразитирующих на его листьях и побегах (Thomas, Polwart, 2003). В США с 2019 по 2022 г. гриб был зафиксирован в штатах Нью-Йорк, Массачусетс, Нью-Джерси и др. (GBIF, 2022).

В Республике Беларусь с *P. funerea* впервые столкнулись в 2008 г. (Belomesyatseva et al., 2018). Постепенно осваивая территории и новые виды растений, в 2013 г. *P. funerea* появился в виде единичных очагов на растениях тиса и туи (Belomesyatseva et al., 2013), в 2016 г. на растениях туи западной и можжевельника чешуйчатого (*Juniperus squamata*) (Golovchenko et al., 2017), и в 2017 г. – на побегах лиственницы европейской (*Larix decidua* Mill) (Belomesyatseva, Shabashova, 2017). Но



**Таблица 1.** Праймеры для специфической амплификации ДНК *Pestalotiopsis funerea*

Праймер	Сиквенс (5'–3')	Размер продукта, п.н.	Температура отжига, °С	Участок генома
PestF1	GCGGAGGGATCATATAGAGTTT	443	56	ITS область рРНК
PestR1	CAGATCCGCCGTTGTATTCA			

лена электрофореграмма продуктов ПЦР с праймерами PestR1 и PestF1. Размер полученных ампликонов соответствовал расчетному, неспецифические продукты отсутствовали. Метод чувствителен к присутствию гриба в ткани растения даже без видимых симптомов поражения (см. рис. 3, дорожка 5). Контаминация препаратов растительной ДНК не ухудшает специфичность и чувствительность реакции. В ходе дальнейшего исследования было показано, что на остальных образцах к инфекционному усыханию листового аппарата привела инвазия других фитопатогенов. Изоляты этих грибов были выделены в чистую культуру и охарактеризованы морфологическими и генетическими методами (табл. 1).

В результате коллекция грибов биологической лаборатории АО «Шелково Агрохим» пополнилась следующими патогенами хвойных: *Microsphaeropsis olivacea* (можжевельник, Самарканд), *Neosetophoma iranianum* (ель, г. Самарканд), *Sydowia polyspora* (сосна черная, Волгоград), *Lophodermium* sp. (сосна обыкновенная, г. Москва), *Fusarium acuminatum* (сосна обыкновенная, г. Шелково) и *Dothistroma septosporum* (кедр, Республика Алтай). Таким образом, отсутствие репрезентативной выборки изолятов *Neopestalotiopsis* sp., *Pestalotiopsis* sp. и *Pseudopestalotiopsis* sp. пока не позволяет предлагать метод для объемного скрининга соответствующих микромицетов. Поэтому формирование коллекции чистых культур песталоциидных видов грибов, патогенных для растений, остается нашей приоритетной задачей.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Естественные леса и искусственные древесные насаждения в силу своих средообразующей и средозащитной функций имеют огромное значение для жизни человека. Эффективность лесозащитных и лесовосстановительных мероприятий, рентабельность лесозаготовок и состоятельность программ по озеленению населенных пунктов невозможны без знаний о грибном сообществе древесных растений. В том числе без идентификации потенциально вредных патогенов для предотвращения их интродукции в новые зоны обитания. Но пока соответствующие исследования значительно отстают от исследований сельскохозяйственных культур. Представленная работа посвящена идентификации одного из потенциальных патогенов хвойных деревьев – *Pestalotiopsis funerea*. Возмож-

но, это первое обнаружение гриба на туе, растущей в Подмосковье.

Изучение структуры биоценозов древесных пород в целом можно облегчить внедрением ПЦР-тестов, рассчитанных на идентификацию той или иной таксономической группы в рамках соответствующего биоценоза. В настоящем исследовании были разработаны праймеры для первичного скрининга песталоциидных видов грибов в растительной ткани. Но для реализации замысла по их мониторингу необходимо формирование коллекции песталоциидных грибов для тестирования праймеров и отработки методики ПЦР-идентификации их изолятов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Aguilar-Pérez M.M., Torres-Mendoza D., Vásquez R. et al. Exploring the antibacterial activity of *Pestalotiopsis* spp. under different culture conditions and their chemical diversity using LC–ESI–Q–TOF–MS. *Journal of Fungi*. 2020. V. 6 (3). P. 140. <https://doi.org/10.3390/jof6030140>
- Azouaoui-Idjer G., Gianni D.R., Pecchioli A. et al. First report of *Botryosphaeria iberica* associated with dieback and tree mortality of Monterey Cypress (*Cupressus macrocarpa*) in Algeria. *Plant Dis*. 2012. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-11-0901-PDN>
- Belomesyatseva D.B., Gapienko O.S., Zvyagintsev V.B. et al. Invasive species of phytopathogenic organisms in Belarus and neighboring countries. *Mikologiya i fitopatologiya*. 2013. V. 47. P. 87–98 (in Russ.).
- Belomesyatseva D.B., Shabashova T.G. Findings of adventitious species of micromycetes on conifers of the southwest of Belarus. In: *Botany (research): Collection of scientific papers*. Issue 46. Minsk, 2017, pp. 304–307 (in Russ.).
- Belomesyatseva D.B., Zvyagintsev V.B., Shabashova T.G. et al. Invasive component in the composition of the mycobiota of conifers. In: *Proceedings of the Belarusian State Technology University*. Minsk, 2018, pp. 37–44 (in Russ.).
- Bouaziz K. Etude d'un modèle de relation tripartites cône-insecte-champignon: rôle de la punaise *Orsillus depressus* Dallas (*Heteroptera, Lygaeidae*) dans la vécution du champignon pathogène d'origine exotique, *Seiridium cardinale* (Wag.) Sutton et Gibson, responsable de la maladie du chancre du cyprès en Algérie. *Doct. Thesis*. Orlean, 2003.
- Dishuk N.G., Golovchenko L.A. Infectious diseases of juniper and arborvitae in plantations of the Republic of Belarus. State and prospects for the development of green building in the Republic of Belarus: Abstracts of the Republi-



- can scientific and practical seminar, Minsk, Belarus, April 26–27, 2018. Minsk, 2018, pp. 58–61 (in Russ.).
- Gilvana F.G., Aricleia De M.C., Thiago F.S. et al. *Pseudopezalotiopsis gilvanii* sp. nov. and *Neopezalotiopsis formicarum* eaves spot pathogens from guarana plant: a new threat to global tropical hosts. *Phytotaxa*. 2021. V. 489 (2) P. 121–139.  
<https://doi.org/10.11646/phytotaxa.489.2.2>
- Global Biodiversity Information Facility: Free and open access to biodiversity data. Copenhagen: 2001. <https://www.gbif.org>. Accessed 20.04.22.
- Golovchenko L.A., Dishuk N.G., Timofeeva V.A. et al. Invasions of alien species of pathogenic fungi in plantations of Belarus. In: Problems of plant protection in botanical gardens. Minsk, 2017, p. 528 (in Russ.).
- Gonthier P., Nicolotti G. First report of *Pestalotiopsis funerea* on *Cupressocyparis leylandii* in Italy. *Plant Dis.* 2002. V. 86 (12). P. 1402–1402.  
<https://doi.org/10.1094/PDIS.2002.86.12.1402B>
- Hongli H., Rajesh J., Dequn Z. et al. Phylogenetic diversity of endophytic *Pestalotiopsis* species in *Pinus armandii* and *Ribes* spp.: evidence from rDNA and  $\beta$ -tubulin gene phylogenies. *Fungal Diversity*. 2006. P. 1–22.  
<https://doi.org/10.1.1.473.7105&rep=rep1&type=pdf>
- Ivanová H. Comparison of the fungi *Pestalotiopsis funerea* (Desm.) Steyaert and *Truncatella hartigii* (Tubefuf) Steyaert isolated from some species of the genus *Pinus* L. in morphological characteristics of conidia and appendages. *J. Forest Sci.* 2016. V. 62. P. 279–284.  
<https://doi.org/10.17221/2/2016-JFS>
- Judith-Hertz C. Systematics and species delimitation in *Pestalotia* and *Pestalotiopsis* s.l. (*Amphisphaeriales*, *Ascomycota*). Doct. Thesis. Frankfurt am Main, 2016. Kolganikhina G.B., Shishkina A.A. Phytopathogenic fungi on coniferous trees and shrubs in the expositions of the Pereyaslavl dendrarium. In: Diseases and pests in the forests of Russia: XXI century. Krasnoyarsk, 2011, pp. 85–87 (in Russ.).
- Konečná H., Šefrová H. Morphology, biology and control possibilities of two *Argyresthia* species – *A. thuiella* and *A. trifasciata* (*Lepidoptera: Argyresthiidae*). *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*. 2014. V. 62 (3). P. 529–538.  
<https://doi.org/10.11118/actaun201462030529>
- Neuhauser S., Huber L., Kirchmair M. A DNA based method to detect the grapevine root-rotting fungus *Roesleria subterranea* in soil and root samples. *Phytopathol. Mediterr.* 2009. 48 (1). P. 59–72.
- Raghavendra V.B., Sunayana N., Govindappa M. et al. First report of *Fusarium oxysporum* causing Fusarium wilt on *Thuja orientalis* in India. *Australasian Plant Disease Notes*. 2007. V. 2. P. 87–88.  
<https://doi.org/10.1071/DN07035>
- Sokolova E.S., Kolganikhina G.B. Fungal diseases of woody introduced species in plantations in Moscow and the Moscow region. *Vestnik MGUL*. 2009. № 5 (68). P. 145–153 (in Russ.).
- Sousa M.F., Tavares R.M., Gerós H. et al. First report of *Hakea sericea* leaf infection caused by *Pestalotiopsis funerea* in Portugal. *Plant Pathol.* 2004. V. 53. P. 535.
- Surina T.A., Kopina M.B. Mycoflora of forest plantations of coniferous species in the territory of Primorsky Krai. *Karantin rasteniy*. 2019. V. 1. P. 37–43 (in Russ.).
- Thomas P.A., Polwart A. *Taxus baccata* L. *J. Ecology*. 2003. V. 91. P. 489–524.  
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2745.2003.00783.x>
- Vlasov D.Yu., Sidelnikova M.V. Micromycetes on trees and shrubs in the suburban parks of St. Petersburg // *Izvestiya Sankt-Peterburgskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta*. 2014. V. 37 (in Russ.).
- White T.J., Bruns T., Lee S. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR protocols, a guide to methods and applications. Academic Press, San Diego, 1990, pp. 315–322.
- Zhukov A.M. Problems of the use of exotic plants in forest plantations and landscaping. *Vestnik MGUL*. 2010. № 3. P. 222–228 (in Russ.).
- Zhukov A.M., Gninenko Yu.I., Zhukov P.D. Dangerous little-studied diseases of conifers in the forests of Russia. *Pushkino*, 2013 (in Russ.).
- Беломесяцева Д.Б., Гапиенко О.С., Звягинцев В.Б. и др. (Belomesyatseva et al.) Инвазивные виды фитопатогенных организмов Беларуси и сопредельных стран // *Микология и фитопатология*. 2013. Т. 47. С. 87–98.
- Беломесяцева Д.Б., Шабашова Т.Г. (Belomesyatseva, Shabashova) Находки адвентивных видов микромицетов на хвойных породах юго-запада Беларуси // *Ботаника (исследования): Сборник научных трудов*. Вып. 46. Минск, 2017. С. 304–307.
- Беломесяцева Д.Б., Звягинцев В.Б., Шабашова Т.Г. и др. (Belomesyatseva et al.) Инвазионный компонент в составе микобиоты хвойных // *Известия Белорусского государственного технологического университета*. Минск, 2018. С. 37–44.
- Головченко Л.А., Дишук Н.Г., Тимофеева В.А. и др. (Golovchenko et al.) Инвазии чужеродных видов патогенных грибов в насаждения Беларуси // *Проблемы защиты растений в ботанических садах*. Минск, 2017. С. 528.
- Дишук Н.Г., Головченко Л.А. (Dishuk, Golovchenko) Инфекционные болезни можжевельника и туи в насаждениях Республики Беларусь. Состояние и перспективы развития зеленого строительства в Республике Беларусь: Тезисы докладов Республиканского научно-практического семинара. Минск, Беларусь, 26–27 апреля 2018 г. Минск, 2018. С. 58–61.
- Жуков А.М. (Zhukov) Проблемы использования экзотических растений в лесопосадках и озеленении // *Вестник МГЮЛ*. 2010. № 3. С. 222–228.
- Жуков А.М., Гниненко Ю.И., Жуков П.Д. (Zhukov et al.) Опасные малоизученные болезни хвойных лесов России. *Пушкино*, 2013. 218 с.
- Колганихина Г.Б., Шишкина А.А. (Kolganikhina, Shishkina) Фитопатогенные грибы на хвойных деревьях и кустарниках в экспозициях Переяславского дендропарка // *Болезни и вредители лесов России: XXI век*. Красноярск, 2011. С. 85–87.
- Соколова Е.С., Колганихина Г.Б. (Sokolova, Kolganikhina) Грибные болезни древесных интродуцентов в насаждениях Москвы и Московской области // *Вестник МГЮЛ*. 2009. № 5 (68). С. 145–153.
- Сурина Т.А., Копина М.Б. (Surina, Kopina) Микофлора лесных насаждений хвойных пород на территории Приморского края // *Карантин растений*. 2019. Т. 1. С. 37–43.

## Identification of *Pestalotiopsis funerea* on Affected Trees of *Thuja occidentalis* in Ornamental Plantations of the Moscow Region (Russia)

S. D. Karakotov<sup>a,#</sup>, N. V. Arshava<sup>a,##</sup>, M. B. Bashkatova<sup>a,###</sup>, and T. A. Andreeva<sup>a,####</sup>

<sup>a</sup>“Schelkovo Agrokhim” Concern, Schelkovo, Russia

<sup>#</sup>e-mail: ksd@betaren.ru

<sup>##</sup>e-mail: arshava@betaren.ru

<sup>###</sup>e-mail: bashkatova.m@betaren.ru

<sup>####</sup>e-mail: dementyeva.t@betaren.ru

When examining ornamental plantations of *Thuja occidentalis* in the Moscow region, several trees showed signs of drying and dying off of trophic shoots. They were randomly distributed among healthy branches. Over time, olive-black acervuli were formed on the surface of the affected platycladia, representing the sporulation of the fungus. The brown needles were shed prematurely. In the course of a laboratory study of the complex of phyllostrophic fungi, a micromycete prevailing in the community was isolated. A characteristic feature of its growth on PSA was the presence of unevenly distributed and partially immersed in the mycelium acervuli filled with conidia. Conidia were straight or slightly curved five-cell structures of fusiform and ellipsoid shape, with four transverse septa. The basal cell was usually terminated by a spiny appendage. On the apical cell, there were from two to six filiform appendages. The genetic characterization of the culture was obtained by DNA sequencing the internal transcribed spacer region of its ribosomal RNA (ITS). The ITS region was amplified using the primer pair ITS1 and ITS4. The resulting sequence was deposited with GenBank NCBI as ON160928.1. Based on the morphological characteristics of the reproductive structures and a comparative analysis of the sequence of the rRNA ITS region, the identity of the analyzed isolate and *Pestalotiopsis funerea* was confirmed. In a laboratory experiment, *P. funerea* has been shown to cause needle necrosis, i.e. is an opportunistic pathogen. For express diagnostics of pestalothoid fungi in plant material, primers PestF1 and PestR1 were developed that are specific to the ITS regions of these fungi. The primers made it possible to obtain a well detectable amount of the target PCR product with a size of 443 bp.

**Keywords:** conidia, PCR, phyllostrophic micromycetes, primers, rRNA ITS region, sequencing