

УДК 632.4: 630\*165.3

С. В. Пантелеев<sup>1</sup>, О. Ю. Баранов<sup>1</sup>, В. Б. Звягинцев<sup>2</sup>, А. В. Ярук<sup>2</sup><sup>1</sup>Институт леса Национальной академии наук Беларуси<sup>2</sup>Белорусский государственный технологический университет

**ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ИНВАЗИВНОГО АСКОМИЦЕТА  
HYMENOSCYPHUS FRAXINEUS BARAL ET AL.  
НА ТЕРРИТОРИИ БЕЛАРУСИ**

С использованием генетических методов исследования (полимеразная цепная реакция, секвенирование по Сэнгеру) проведена верификация чистых культур возбудителя халарового некроза ветвей – аскомицета *Hymenoscyphus fraxineus* (T. Kowalski) Baral et al., изолированных с усыхающих растений ясеня обыкновенного и ясеня пенсильванского в лесных насаждениях пяти областей республики (Минская, Могилевская, Брестская, Витебская, Гродненская). Видовая идентификация основывалась на секвенировании нуклеотидной структуры региона рибосомной ДНК – 18S рРНК-ВТС1-5,8S рРНК-ВТС2-28S рРНК и ее последующем сравнении с депонентами международного банка генов Национального центра биотехнологической информации (NCBI, США).

На основании применения молекулярно-генетического метода RAPD изучена внутривидовая изменчивость 24 штаммов *H. fraxineus*. В ходе исследования были протестированы 18 RAPD-праймеров. Анализ информативности полученных ДНК-профилей позволил отобрать для изучения внутривидовой изменчивости *H. fraxineus* 5 праймеров: UBC-268, primer6, UBC-536, Oligo 85 и OPA-09. По результатам RAPD-анализа для исследованных штаммов составлены генетические паспорта по 29 специфическим ДНК-локусам.

Установлено, что в исследованной белорусской популяции *H. fraxineus* отмечается высокий уровень внутривидового разнообразия. Согласно данным RAPD-анализа уровень различий между штаммами в большинстве случаев варьировал в диапазоне 7–47% локусов ( $D_N = 0,0715–0,4769$ ). Данное явление с учетом выявленного диффузного географического распределения генотипов можно объяснить гипотезой проникновения на территорию страны путем многократной инвазии спектра изолятов.

**Ключевые слова:** *Hymenoscyphus fraxineus*, штамм, ДНК, ДНК-локус, нуклеотидная структура, праймер, полимеразная цепная реакция, секвенирование, RAPD.

S. V. Panteleev<sup>1</sup>, O. Yu. Baranov<sup>1</sup>, V. B. Zviagintsev<sup>2</sup>, A. V. Yaruk<sup>2</sup><sup>1</sup>Forest Institute of the National Academy of Sciences of Belarus<sup>2</sup>Belarusian State Technological University

**GENETIC DIVERSITY OF INVASIVE ASCOMYCETE  
FUNGUS HYMENOSCYPHUS FRAXINEUS BARAL ET AL.  
IN THE TERRITORY OF BELARUS**

In the forest stands of five regions of the republic (Minsk, Mogilev, Brest, Vitebsk, Grodno) using genetic methods of analysis (polymerase chain reaction, Sanger sequencing) the causative agent of ash dieback disease *Hymenoscyphus fraxineus* (T. Kowalski) Baral et al. were verified. The pathogen was isolated *in vitro* from drying plants of common ash and green ash. Species identification was based on amplification and sequencing of the nucleotide structure of the rDNA region 18S rRNA-ITS1-5.8S rRNA-ITS2-28S rRNA and its subsequent comparison with the depositors of the GenBank database of the National Center for Biotechnological Information (NCBI, United States).

Using the molecular genetic method RAPD the intraspecific variability of 24 *H. fraxineus* strains was studied. During the study 18 RAPD primers were tested. An analysis of the information content of the obtained DNA profiles made it possible to select 5 primers for studying the intraspecific variability of *H. fraxineus*: UBC-268, Oligo 31, UBC-536, Oligo 85, and OPA-09. For the strains genetic passports for 29 specific DNA loci were compiled.

It was established that the Belarusian population of *H. fraxineus* is characterized by a high level of intraspecific genetic diversity. According to RAPD analysis the level of differences between strains in most cases varied in the range of 7–47% of loci ( $D_N = 0,0715–0,4769$ ). This phenomenon taking into account the geographical confinement of genotypes is explained by the hypothesis of the multiple invasion of the isolate spectrum into the country.

**Key words:** *Hymenoscyphus fraxineus*, strain, DNA, DNA locus, nucleotide structure, primer, polymerase chain reaction, sequencing, RAPD.

Введение. За последние два десятилетия в странах Европы стремительно распространилось инфекционное заболевание ясеня – халаровый некроз ветвей, или суховершинность (ash dieback disease, ADB) [1–6]. Это заболевание вызывается аскомицетным грибом *Hymenoscyphus fraxineus* (Т. Kowalski) Baral et al., известным также как *Chalara fraxinea* Kowalski et al. и *H. pseudoalbidus* Queloz et al. Патоген был впервые диагностирован в Польше в 2006 г. [7]. В Европе это инвазивный и агрессивный вид, в сильной степени повреждающий ясенники и в основном ясень обыкновенный [4–8]. Родиной гриба считается Восточная Азия [9, 10], а его распространение на запад связывают с интродукцией инфицированного посадочного материала ясеня маньчжурского (*Fraxinus mandshurica* Rupr.) с Дальнего Востока России в период 1960–1980 гг. [11].

Ущерб, причиненный популяции ясеня в Европе халаровым некрозом ветвей, колоссален. Так, результаты лесопатологического мониторинга участков лесного фонда в Литве за 2008–2015 гг. показали гибель 61,1% ясеневых насаждений [12]. В Норвегии к 2016 г. доля усыхающих деревьев ясеня в лесных насаждениях с его преобладанием составила в среднем 57,2%, при этом в молодняках этот показатель достигал 80% [13]. В Латвии по данным официальной статистики на 2018 г. площадь ясенников сократилась по сравнению с 2005 г. на 40,6% [14]. В Великобритании в 2019 г. в насаждениях, созданных до наступления эпифитотии, максимально зарегистрированный показатель гибели деревьев составлял около 85%, в молодняках до 20 лет – 70% при естественном возобновлении – 82% [15]. Подобная ситуация наблюдается и в других европейских странах [16]. В Республике Беларусь на сегодняшний день площадь ясеневых насаждений также сократилась более чем на 40%. При этом к насаждениям с нарушенной биологической устойчивостью относят 98% ясенников [17]. Катастрофическая деградация ясеневых лесов требует разработки методов оперативного восстановления и сохранения природных популяций.

В настоящее время эффективных стратегий борьбы с данным заболеванием не разработано, и исследования в большинстве стран, которые пытались контролировать его распространение (проект FRAXBAC межправительственной программы COST), не увенчались успехом [18, 19].

Генетические исследования последних лет, основанные на методах секвенирования нового поколения, показывают, что европейская популяция *H. fraxineus* имеет происхождение лишь от нескольких изолятов из дальневосточной популяции России и возможно Японии [19].

Таким образом, полученные данные свидетельствуют об эффекте «бутылочного горлышка», в результате которого наблюдается меньшее генетического разнообразия в европейской популяции *H. fraxineus* по сравнению с дальневосточной. Однако данные по уровню генетического разнообразия популяций патогена приводятся в литературе в незначительных количествах [19]. Согласно литературным данным популяционно-генетические исследования *H. fraxineus* в странах Европы являются немногочисленными и выполнены с использованием различных типов ДНК-маркеров (SSR, ISSR). Вследствие этого сопоставление результатов представляется трудоемким, так как полученные данные являются разноплановыми, а выводы, сделанные авторами, частично противоречивы. Так, в литературных источниках указывается как незначительный, так и высокий уровень генетического разнообразия в европейских популяциях *H. fraxineus* при высоком уровне генотипического полиморфизма [20–23].

Целью данной работы являлось изучение генетического разнообразия белорусской популяции *H. fraxineus* с использованием RAPD-анализа.

RAPD (англ. *random amplified polymorphic DNA*) – произвольно амплифицируемая полиморфная ДНК. ПЦР продукт RAPD образуется в результате амплификации фрагмента геномной ДНК, фланкированной инвертированной последовательностью десятимерного праймера [24]. По результатам ПЦР и электрофореза ампликонов получают многофракционные видоспецифические спектры, напоминающие «штрихкод». Метод универсален для исследования разных видов организмов при использовании одних и тех же праймеров [25, 26]. Однако следует учесть, что разным видам может соответствовать свой оптимальный набор праймеров. Метод не позволяет делать выводы о филогении изучаемых индивидов, но является одним из наиболее доступных при изучении генетического полиморфизма в популяции.

**Основная часть.** Экспериментальный материал для получения культур *in vitro* аскомицета *H. fraxineus* (побеги с признаками некроза) был собран в лесных культурах ясеня, насаждениях с его преобладанием или примесью на территории пяти областей республики: Минская (ГЛХУ «Логойский лесхоз», ГОЛХУ «Борисовский опытный лесхоз», ГЛХУ «Минский лесхоз», ГОЛХУ «Стародорожский опытный лесхоз», ГЛХУ «Слуцкий лесхоз», Негорельский учебно-опытный лесхоз), Могилевская (ГОЛХУ «Осиповичский опытный лесхоз», ГЛХУ «Глуцкий лесхоз», ГЛХУ «Жорновская экспериментальная лесная база

Института леса НАН Беларуси», Брестская (Национальный парк «Беловежская пушча»), Витебская (ГЛХУ «Двинская экспериментальная лесная база Института леса НАН Беларуси»), Гродненская (ГЛХУ «Лидский лесхоз»). Растения с признаками некроза ветвей были представлены различными возрастными группами (2–70 лет).

Объектом исследования являлись 24 чистые культуры гриба, морфологически диагностированные как *H. fraxineus* и введенные в культуру *in vitro* с использованием сусло-агаровой питательной среды из древесины побегов ясеня обыкновенного и ясеня пенсильванского с признаками инфекционного некроза ветвей.

Генетическая верификация вида проводилась методами полимеразной цепной реакции (ПЦР) и секвенирования по Сэнгеру.

Видовая идентификация основывалась на анализе нуклеотидной структуры ампликонов 18S рРНК-ВТС1-5,8S рРНК-ВТС2-28S рРНК региона рибосомной ДНК. ВТС (внутренние транскрибируемые спейсеры, англ. ITS) представляют собой видоспецифичные некодирующие участки, разделяющие гены рРНК транскрипционной единицы рДНК. Использование данного региона в качестве ДНК-маркера является «золотым стандартом» при проведении видовой идентификации грибов [27, 28].

Экстракция тотальной ДНК проводилась из фрагментов мицелия с использованием модифицированного СТАВ-метода, описанного в литературных источниках [24]. Качество полученных препаратов суммарной ДНК оценивалось с использованием спектрофотометра NanoPhotometer P330 (Implen, Германия) согласно общепринятой методике [29].

Полимеразная цепная реакция осуществлялась на базе термоциклеров Gene Max (Bioer, КНР) с использованием ПЦР-смеси следующего состава: Taq Buffer (10X) with KCl, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM NTP, Taq DNA Polymerase (5 U/μL) (Thermo Fisher Scientific, США). Компоненты реакции добавлялись в концентрациях, рекомендуемых фирмой-производителем с использованием праймеров ITS1F CTTG-GTCATTTAGAGGAAGTAA [28] и ITS4 TCC-TCCGCTTATTGATATGC [27] в перерасчете на 25 мкл общего объема ПЦР-смеси.

Электрофоретическое фракционирование продуктов ПЦР проходило в 1,5%-ном агарозном геле с использованием 1×TBE буфера при комнатной температуре в течение 45 мин и параметрах тока 6 Вт. Последующее окрашивание осуществлялось в растворе бромистого этидия (0,5 мкг/мл) в течение 5 мин.

Очистка ПЦР-продуктов (ампликонов) перед постановкой секвенирующей реакции про-

водилась с применением набора Agencourt AMPure XP согласно инструкции (Beckman Coulter, США).

Секвенирующая реакция ставилась с использованием набора BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific, США) и праймером ITS1F согласно протоколу производителя. Секвенирование ампликонов осуществлялось на базе генетического анализатора ABI Prism 3500 (Thermo Fisher Scientific). Анализ первичных данных проводился в программном обеспечении Sequencing Analysis 5.1.1 (Thermo Fisher Scientific, США). Видовая идентификация осуществлялась в международном геномном банке Национального центра биотехнологической информации (NCBI, США) с использованием онлайн-сервиса Nucleotide BLAST [30].

С целью изучения генетического разнообразия идентифицированных штаммов *H. fraxineus* в ходе исследования были протестированы 18 десятимерных RAPD-праймеров (табл. 1).

Таблица 1

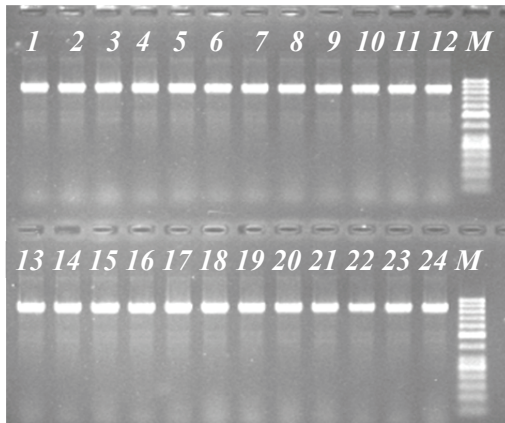
**Перечень и основные характеристики RAPD-праймеров, использованных в ходе исследования**

Нуклеотидная структура	Классификация	Температура отжига ( $T_a$ ), °C
CGTCTGCCCG	UBC-106	43,0
TCCATGCCGT	UBC-154	38,5
CAAACGGCAC	UBC-184	34,5
CACGGCAGT	UBC-203	38,7
CGCCCCATT	UBC-254	43,0
AGGCCGCTTA	UBC-268	38,7
TCCCGAACCG	UBC-337	43,0
GCCCCTCGTC	UBC-536	41,0
CAATCGCCGT	OPA-11	38,7
GGTGCGGGAA	ОPE-02	43,0
AAGAGCCCGT	primer 4	35,0
CCCGTCAGCA	primer 6	40,0
CCGCAGCAA	OPA-08	45,2
ATCGGTCCGTA	Oligo 85	38,7
TCACCGAACG	Oligo 92	34,5
GGGTAACGCC	OPA-09	38,7
AATCGGGCTG	OPA-04	38,7
CAAACGTCCG	OPA-19	35,0

Интерпретация результатов RAPD-анализа и построение дендрограмм осуществлялось в программном обеспечении POPGEN v1.32 (University of Alberta, Канада) и MEGA6 (Institute of Molecular Evolutionary Genetics, США).

В ходе ПЦР-анализа с праймерами ITS1F и ITS4 был получен однофракционный электрофоретический спектр, что свидетельствовало о содержании генетического материала одного вида микромицетов в каждом отдельном образце. Дли-

на ампликонов насчитывала  $\approx 900$  п. н., что свойственно грибам из рода *Hymenoscyphus* (рис. 1).



1–24 – номера чистых культур грибов  
M – маркер молекулярного веса (50–1000 п. н.)

Рис. 1. ПЦР-спектр исследуемых чистых культур грибов с использованием праймеров ITS1F/ITS4

Секвенирование продуктов ПЦР (ITS1F/ITS4) и сравнительный анализ полученных нуклеотидных последовательностей с депозитами базы данных Nucleotide NCBI [30] показали, что диагностируемые образцы принадлежат виду *Hymenoscyphus fraxineus* (T. Kowalski) Baral et al.

При этом генетическое сходство белорусских штаммов по маркерному региону рДНК со спектром депозитов NCBI отмечалось в диапазоне 99,08–100,00% с учетом показателя перекрытия нуклеотидных последовательностей (query coverage) 93–100% (табл. 2).

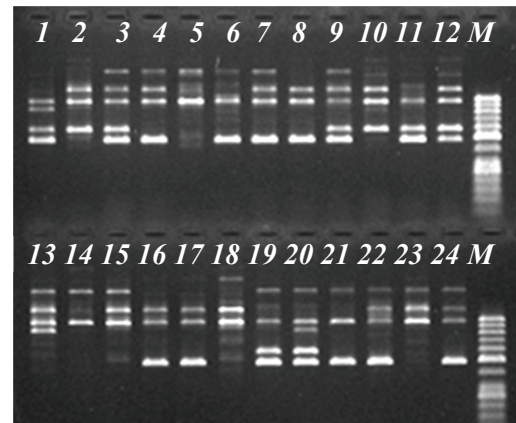
Таблица 2

**Депозиты NCBI, используемые в исследовании**

Штамм / Страна	Номер NCBI / % идент.
<i>H. fraxineus</i> ZT3404_1 / Австрия	MN931276.1 / 99,89–100
<i>C. fraxinea</i> AIN-M-8 / Франция	HM193468.1 / 99,89
<i>H. fraxineus</i> NK2 / Сербия	KX255648.1 / 99,89–100
<i>C. fraxinea</i> / Финляндия Kast1b, Knp4, Fag1	GU797161.1 / 99,88–100 GU797148.1 / 99,88–100 GU797152.1 / 99,88–100
<i>H. fraxineus</i> 23.1_DS / Хорватия	KY977559.1 / 99,54–99,66
<i>H. fraxineus</i> / Словакия H42, H146, CH_30	MF564277.1 / 99,54–99,65 MF175245.1 / 99,42–99,54 KU736880.1 / 99,08–99,20
<i>H. pseudoalbidus</i> 8097 / Китай	KF188725.1 / 99,65–99,77
<i>H. fraxineus</i> AIG17P / Швейцария	KJ820414.1 / 99,77–99,88

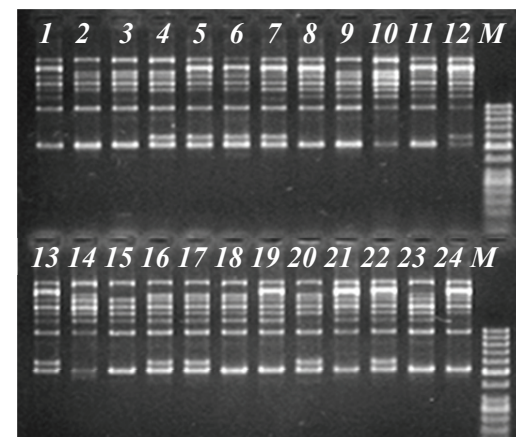
На основании полученных данных проведено депонирование белорусских генотипов *H. fraxineus* в базу международного генного банка NCBI с присвоением идентификационных номеров MK621286 и MT155386.

В ходе анализа информативности полученных RAPD-профилей для дальнейшего анализа генетического разнообразия штаммов *H. fraxineus* были отобраны 5 праймеров: UBC-268, primer 6, UBC-536, Oligo 85 и OPA-09 (рис. 2 и 3).



1–24 – номера штаммов *H. fraxineus*  
M – маркер молекулярного веса

Рис. 2. RAPD-профиль штаммов *H. fraxineus* с праймером primer 6



1–24 – номера штаммов *H. fraxineus*  
M – маркер молекулярного веса

Рис. 3. RAPD-профиль штаммов *H. fraxineus* с праймером UBC-536

Полиморфизм RAPD-маркеров представлен двумя группами аллелей. Первая группа характеризуется полной комплементарностью нуклеотидной структуры праймеров к местам их отжига в обоих фланкирующих регионах. На RAPD-профилях данная группа аллелей представлена четкой зоной амплификации и

обозначена как «1». Вторая группа характеризуется отсутствием комплементарности нуклеотидной структуры в местах отжига одного или обоих фланкирующих регионов, а также делецией амплифицируемого региона. На электрофореграммах данная группа аллелей представлена в виде отсутствия ПЦР-фрагмента в зоне амплификации и обозначена как «0» [25, 26].

Таким образом, в ходе анализа RAPD-профилей были составлены генетические паспорта исследуемых штаммов *H. fraxineus* по 29 локусам, которые были проанализированы в специальном программном обеспечении для популяционно-генетического анализа POPGEN v 1.32 и MEGA6. На основании расчета показателя генетической дистанции Неи ( $D_N$ ) был установлен уровень генетической разнородности среди штаммов *H. fraxineus* в белорусской популяции.

Значения генетической дистанции Неи ( $D_N$ ) среди изученных штаммов *H. fraxineus*, варьировали в значительной степени ( $D_N = 0,00-0,4769$ ), что свидетельствовало о высоком показателе внутривидового генетического разнообразия. Так, в исследованной выборке, представленной 24 штаммами, генетическая идентичность по

всем 29 локусам отмечалась только в случае двух штаммов из Лидского лесхоза (№ 16 и 17 на рис. 2 и 3). Остальные образцы характеризовались альтернативными вариантами генотипов в 7,1–47,7% локусов. Среднее значение показателя общего генетического разнообразия  $H_T = 0,2046$  при стандартном отклонении = 0,0440. На основании полученных значений генетической дистанции Неи с использованием невзвешенного парно-группового метода кластерного анализа (UPGMA) и метода максимального правдоподобия были построены дендрограммы, иллюстрирующие уровень генетической дифференциации исследованных штаммов *H. fraxineus* (рис. 4, 5).

Как видно из рис. 5, на полученной дендрограмме наблюдается запараллеливание более длинных ветвей. Данное явление получило название «гомоплазия», что свидетельствует о возникновении у выявленных штаммов вторичных гомологий, не унаследованных от общего предка и сближающих дивергировавшие организмы в ходе филогенеза (параллельная эволюция). В случае RAPD-локусов гомоплазии представлены сходными комбинациями аллелей.

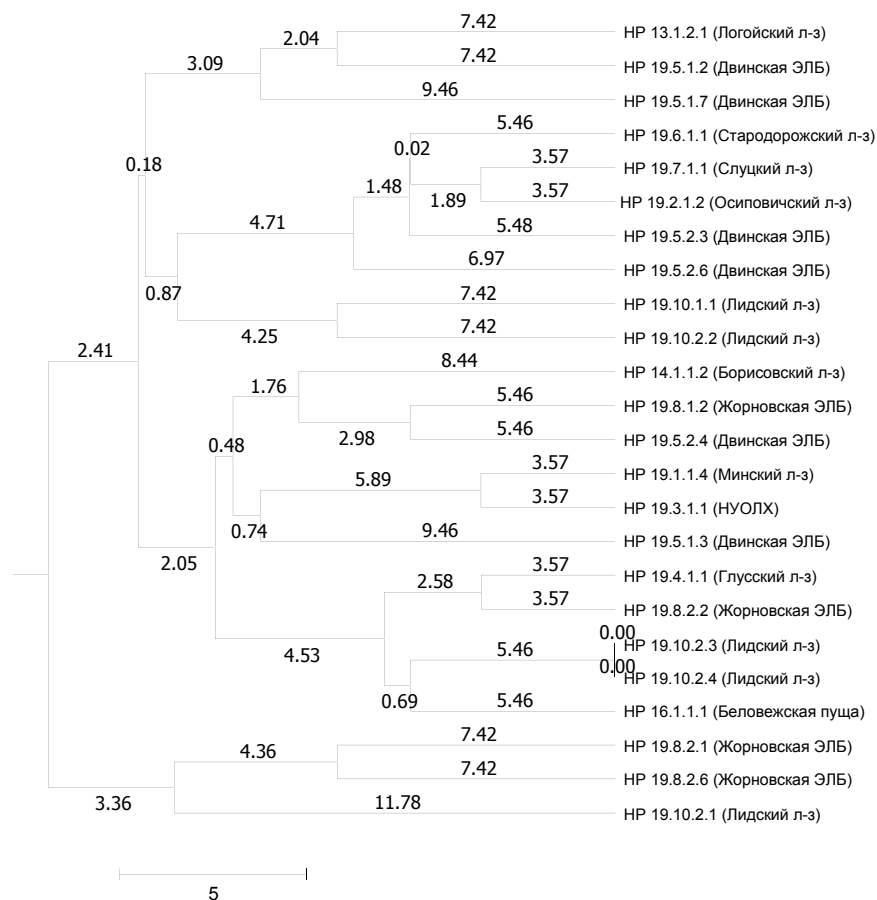


Рис. 4. Дендрограмма, иллюстрирующая уровень генетической дифференциации белорусских штаммов *H. fraxineus* (UPGMA, %)



Рис. 5. Дендрограмма, иллюстрирующая уровень генетической дифференциации белорусских штаммов *H. fraxineus* (метод максимального правдоподобия)

Явление гомоплазии указывает на общую направленность развития популяции на определенной территории и может являться следствием адаптации к сходным условиям обитания под действием естественного отбора.

**Заключение.** Полученные данные указывают на то, что популяция *H. fraxineus* на территории Беларуси состоит из множества микропопуляций, генетическая структура которых не имеет строгой географической приуроченности.

Установленный высокий уровень генетического разнообразия у белорусских штаммов

*H. fraxineus* и их диффузное географическое распространение по областям республики указывает на проникновение на территорию страны, по всей вероятности, путем многократной инвазии спектра изолятов. Многообразие генотипов возбудителя в популяции может способствовать также низкой конкуренции в силу сходной вирулентности штаммов и доступности кормовой базы. Полученные данные RAPD-анализа являются дополнением и вносят определенный вклад в популяционно-генетические исследования патогенного микробиота *H. fraxineus* на территории Европы.

#### Список литературы

1. Timmermann V., Borja I., Hietala A. M., Kirisits T., Solheim H. Ash dieback: pathogen spread and diurnal patterns of ascospore dispersal, with special emphasis on Norway // EPPO bull. 2011. Vol. 41. P. 14–20. DOI: 10.1111/j.1365-2338.2010.02429.x.
2. Bakys R., Vasaitis R., Barklund P., Thomsen I. M. Occurrence and pathogenicity of fungi in necrotic and non-symptomatic shoots of declining common ash (*Fraxinus excelsior*) in Sweden // European Journal of Forest Research. 2009. Vol. 128. P. 51–60. DOI: 10.1007/s10342-008-0238-2.

3. Pautasso M., Aas G., Queloz V., Holdenrieder O. European ash (*Fraxinus excelsior*) dieback – a conservation biology challenge // *Biol. Conserv.* 2013. Vol. 158. P. 37–49. DOI: 10.1016/j.biocon.2012.08.026
4. Gross A., Holdenrieder O., Pautasso M., Queloz V., Sieber T. N. *Hymenoscyphus pseudoalbidus*, the causal agent of European ash dieback // *Mol. Plant Pathol.* 2014. Vol. 15. P. 5–21. DOI: 10.1111/mpp.12073.
5. Zhao Y., Hosoya T., Baral H. O., Hosaka K., Kakishima M. *Hymenoscyphus pseudoalbidus*, the correct name for *Lambertella albida* reported from Japan // *Mycotaxon.* 2012. Vol. 122. P. 25–41. DOI: 10.5248/122.25.
6. McKinney L. V., Nielsen L. R., Collinge D. B., Thomsen I. M., Hansen J. K., Kjær E. D. The ash dieback crisis: genetic variation in resistance can prove a long-term solution // *Plant Pathol.* 2014. Vol. 63. P. 485–499. DOI: 10.1111/ppa.12196.
7. Kowalski T. *Chalara fraxinea* sp. nov. associated with dieback of ash (*Fraxinus excelsior*) in Poland // *For. Pathol.* 2006. Vol. 36. P. 264–270.
8. Fones H. N., Mardon C., Gurr S. J. A role for the asexual spores in infection of *Fraxinus excelsior* by the ash-dieback fungus *Hymenoscyphus fraxineus* // *Sci. Rep.* 2016. Vol. 6. P. 1–10. DOI: 10.1038/srep34638.
9. Krautler K., Treitler R., Kirisits T. *Hymenoscyphus fraxineus* can directly infect intact current-year shoots of *Fraxinus excelsior* and artificially exposed leaf scars // *For. Pathol.* 2015. Vol. 45. P. 274–280. DOI: 10.1111/efp.12168.
10. Baral H. O., Queloz V., Hosoya T. *Hymenoscyphus fraxineus*, the correct scientific name for the fungus causing ash dieback in Europe // *IMA Fungus.* 2014. Vol. 5. P. 79–80. DOI: 10.5598/imafungus.2014.05.01.09.
11. Drenkhan R., Sander H., Hanso M. Introduction of Mandshurian ash (*Fraxinus mandshurica* Rupr.) to Estonia: Is it related to the current epidemic on European ash (*F. excelsior* L.) // *European Journal of Forest Research.* 2014. Vol. 133, no. 5. P. 769–781. DOI: 10.1007/s10342-014-0811-9.
12. Pliura A., Bakys R., Suchockas V., Marciulyniene D., Gustiene A., Verbyla V., Lygis V. Ash dieback in Lithuania: disease history, research on impact and genetic variation in disease resistance, tree breeding and options for forest management // *Dieback of European ash (Fraxinus spp.) – Consequences and Guidelines for Sustainable Management.* Uppsala: Swedish University of Agricultural Sciences, 2017. P. 150–166.
13. Timmermann V., Nagy N. E., Hietala A., Borja I., Solheim H. Progression of ash dieback in Norway related to tree age, disease history and regional aspects // *Balt. For.* 2017. Vol. 23, no. 1. P. 150–158.
14. Matisone I., Matisons R., Laiviņš M., Gaitnieks T. Statistics of ash dieback in Latvia // *Silva Fennica.* 2018. Vol. 52, no. 1, P.1–6. DOI: 10.14214/sf.9901.
15. Coker T. L. R., Rozsypalek J., Edwards A., Harwood T. P., Butfoy L., Buggs R. J. A. Estimating mortality rates of European ash (*Fraxinus excelsior*) under the ash dieback (*Hymenoscyphus fraxineus*) epidemic // *Plants People Planet.* 2019. Vol. 1. P. 48–58.
16. Vasaitis R. Dieback of European Ash (*Fraxinus* spp.). Consequences and Guidelines for Sustainable Management // *The Report on European Cooperation in Science & Technology (COST).* Uppsala: SLU, 2017. 288 p.
17. Общая характеристика лесопатологической ситуации в лесном фонде Республики Беларусь. Ясеневые насаждения [Электронный ресурс] // Официальный сайт Учреждения «Беллесозащита». URL: <http://www.bellesozaschita.by/front/ru/index?id=153>. (дата обращения 05.01.2020).
18. Are Europe’s ash trees finished? [Электронный ресурс] // *NewScientist.* URL: <https://www.newscientist.com/article/dn22449-are-europes-ash-trees-finished>. (дата обращения: 05.11.2019).
19. Sonstebo J. H., Vivian-Smith A., Adamson K., Drenkhan R., Solheim H., Hietala A. Genome-wide population diversity in *Hymenoscyphus fraxineus* points to an eastern Russian origin of European Ash dieback [Электронный ресурс] // *The preprint server for biology.* URL: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/154492v1> (дата обращения: 01.02.2020).
20. Rytkonen A., Lilja A., Drenkhan R., Gaitnieks T., Hantula J. First record of *Chalara fraxinea* in Finland and genetic variation among isolates sampled from Åland, mainland Finland, Estonia and Latvia // *For. Pathol.* 2011. Vol. 41. P. 169–174. DOI: 10.1111/j.1439-0329.2010.00647.x.
21. Kraj W., Zarek M., Kowalski T. Genetic variability of *Chalara fraxinea*, dieback cause of European ash (*Fraxinus excelsior* L.) // *Mycol. Progress.* 2012. Vol. 11. P. 37–45. DOI: 10.1007/s11557-010-0724-z.
22. Gross A., Grunig C. R., Queloz V., Holdenrieder O. A molecular toolkit for population genetic investigations of the ash dieback pathogen *Hymenoscyphus pseudoalbidus* // *Forest Pathology.* 2012. Vol. 42. P. 252–264. DOI: 10.1111/j.1439-0329.2011.00751.x.

23. Nguyen D. T., Cleary M. R., Enderle R., Berlin A., Stenlid J. Analyses of the ash dieback pathogen, *Hymenoscyphus fraxineus*, suggest role of tree species diversity on colonization and population structure differentiation // *Forest Pathology*. 2016. Vol. 48. P. 82–84. DOI: 10.1111/efp.12236.

24. Падутов В. Е., Баранов О. Ю., Воропаев Е. В. Методы молекулярно-генеического анализа // Минск: Юнипол, 2007. С. 51.

25. Which DNA marker for which purpose: final compendium of the research project // DGXII Biotechnology FW IV Research Programme; ed. E. M. Gillet / Institut für Forstgenetik und Forstpflanzenzüchtung, Universität Göttingen. Göttingen, 1999. 253 p.

26. Ford-Lloyd B. Measuring genetic variation using molecular markers. Rome: IPGRI, 1996. 72 p.

27. White T. J., Bruns T. D., Lee S. B., Taylor J. W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics // *PCR protocols: a guide to methods and applications*. 1990. P. 315–322. DOI: 10.1016/0168-9525(90)90186-A.

28. Gardes M., Bruns T. D. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes application of the identification of mycorrhizae and rusts // *Mol. Ecol.* 1993. Vol. 2. P. 113–118. DOI: 10.1111/j.1365-294x.1993.tb00005.x.

29. Tataurov A. V., You Y., Owczarzy R. Predicting ultraviolet spectrum of single stranded and double stranded deoxyribonucleic acids // *Biophys. Chem.* 2008. Vol. 133. P. 66–70. DOI:10.1016/j.bpc.2007.12.004.

30. National Center for Biotechnological Information, NCBI [Электронный ресурс] // National Centre Biotechnology Information. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (дата обращения: 10.09.2019).

### References

1. Timmermann V., Borja I., Hietala A. M., Kirisits T., Solheim H. Ash dieback: pathogen spread and diurnal patterns of ascospore dispersal, with special emphasis on Norway. *EPPO bull.*, 2011, vol. 41, pp. 14–20. DOI: 10.1111/j.1365-2338.2010.02429.x.

2. Bakys R., Vasaitis R., Barklund P., Thomsen I. M. Occurrence and pathogenicity of fungi in necrotic and non-symptomatic shoots of declining common ash (*Fraxinus excelsior*) in Sweden. *European Journal of Forest Research*, 2009, vol. 128, pp. 51–60. DOI: 10.1007/s10342-008-0238-2.

3. Pautasso M., Aas G., Queloz V., Holdenrieder O. European ash (*Fraxinus excelsior*) dieback – a conservation biology challenge. *Biol. Conserv.*, 2013, vol. 158, pp. 37–49. DOI: 10.1016/j.biocon.2012.08.026

4. Gross A., Holdenrieder O., Pautasso M., Queloz V., Sieber T. N. *Hymenoscyphus pseudoalbidus*, the causal agent of European ash dieback. *Mol. Plant Pathol.*, 2014, vol. 15, pp. 5–21. DOI: 10.1111/mpp.12073.

5. Zhao Y., Hosoya T., Baral H. O., Hosaka K., Kakishima M. *Hymenoscyphus pseudoalbidus*, the correct name for *Lambertella albida* reported from Japan. *Mycotaxon*, 2012, vol. 122, pp. 25–41. DOI: 10.5248/122.25.

6. McKinney L. V., Nielsen L. R., Collinge D. B., Thomsen I. M., Hansen J. K., Kjør E. D. The ash dieback crisis: genetic variation in resistance can prove a long-term solution. *Plant Pathol.*, 2014, vol. 63, pp. 485–499. DOI: 10.1111/ppa.12196.

7. Kowalski T. *Chalara fraxinea* sp. nov. associated with dieback of ash (*Fraxinus excelsior*) in Poland. *For. Pathol.*, 2006, vol. 36, pp. 264–270.

8. Fones H. N., Mardon C., Gurr S. J. A role for the asexual spores in infection of *Fraxinus excelsior* by the ash-dieback fungus *Hymenoscyphus fraxineus*. *Sci. Rep.*, 2016, vol. 6, pp. 1–10. DOI: 10.1038/srep34638.

9. Krautler K., Treitler R., Kirisits T. *Hymenoscyphus fraxineus* can directly infect intact current-year shoots of *Fraxinus excelsior* and artificially exposed leaf scars. *For. Pathol.*, 2015, vol. 45, pp. 274–280. DOI: 10.1111/efp.12168.

10. Baral H.O., Queloz V., Hosoya T. *Hymenoscyphus fraxineus*, the correct scientific name for the fungus causing ash dieback in Europe. *IMA Fungus*, 2014, vol. 5, pp. 79–80. DOI: 10.5598/ima fungus.2014.05.01.09.

11. Drenkhan R., Sander H., Hanso M. Introduction of Mandshurian ash (*Fraxinus mandshurica* Rupr.) to Estonia: Is it related to the current epidemic on European ash (*F. excelsior* L.). *European Journal of Forest Research*, 2014. vol. 133, no. 5, pp. 769–781. DOI: 10.1007/s10342-014-0811-9.

12. Pliura A., Bakys R., Suchockas V., Marciulyniene D., Gustiene A., Verbyla V., Lygis V. Ash dieback in Lithuania: disease history, research on impact and genetic variation in disease resistance, tree breeding and options for forest management. In: Vasaitis R., Enderle R., editors. *Dieback of European ash (Fraxinus spp.) – Consequences and Guidelines for Sustainable Management*. Uppsala, Sweden, Swedish University of Agricultural Sciences Publ., 2017, pp. 150–166.



13. Timmermann V., Nagy N. E., Hietala A., Borja I., Solheim H. Progression of ash dieback in Norway related to tree age, disease history and regional aspects. *Balt. For.*, 2017, vol. 23, no. 1. pp. 150–158.
14. Matisone I., Matisons R., Laiviņš M., Gaitnieks T. Statistics of ash dieback in Latvia. *Silva Fennica*, 2018, vol. 52, no. 1, pp. 1–6. DOI: 10.14214/sf.9901.
15. Coker T. L. R., Rozsypalek J., Edwards A., Harwood T. P., Butfoy L., Buggs R. J. A. Estimating mortality rates of European ash (*Fraxinus excelsior*) under the ash dieback (*Hymenoscyphus fraxineus*) epidemic. *Plants People Planet*. 2019, vol. 1, pp. 48–58.
16. Vasaitis R. Dieback of European Ash (*Fraxinus* spp.). Consequences and Guidelines for Sustainable Management. *The Report on European Cooperation in Science & Technology (COST)*. Uppsala, SLU, 2017. 288 p.
17. *Obshchaya kharakteristika lesopatologicheskoy situatsii v lesnom fonde Respubliki Belarus'. Yasenevyye nasazhdeniya* [General characteristics of the forest pathological situation in the forest fund of the Republic of Belarus. Ash forests]. Available at: <http://www.bellesozaschita.by/front/ru/index?id=153> (accessed 05.01.2020).
18. Are Europe's ash trees finished? Available at: <https://www.newscientist.com/article/dn22449-are-europes-ash-trees-finished> (accessed 05.11.2019).
19. Sonstebo J. H., Vivian-Smith A., Adamson K., Drenkhan R., Solheim H., Hietala A. Genome-wide population diversity in *Hymenoscyphus fraxineus* points to an eastern Russian origin of European Ash dieback. *BioRxiv*, 2017, pp. 1–25. DOI: 10.1101/154492. Available at: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/154492v1/> (accessed 01.02. 2020).
20. Rytkonen A., Lilja A., Drenkhan R., Gaitnieks T., Hantula J. First record of *Chalara fraxinea* in Finland and genetic variation among isolates sampled from Åland, mainland Finland, Estonia and Latvia. *For. Path.*, 2011, vol. 41, pp. 169–174. DOI: 10.1111/j.1439-0329.2010.00647.x.
21. Kraj W., Zarek M., Kowalski T. Genetic variability of *Chalara fraxinea*, dieback cause of European ash (*Fraxinus excelsior* L.). *Mycol. Progress*, 2012, vol. 11, pp. 37–45. DOI: 10.1007/s11557-010-0724-z.
22. Gross A., Grunig C. R., Queloz V., Holdenrieder O. A molecular toolkit for population genetic investigations of the ash dieback pathogen *Hymenoscyphus pseudoalbidus*. *Forest Pathology*, 2012, vol. 42, pp. 252–264. DOI: 10.1111/j.1439-0329.2011.00751.x.
23. Nguyen D. T., Cleary M. R., Enderle R., Berlin A., Stenlid J. Analyses of the ash dieback pathogen, *Hymenoscyphus fraxineus*, suggest role of tree species diversity on colonization and population structure differentiation. *Forest Pathology*, 2016, vol. 48, pp. 82–84. DOI: 10.1111/efp.12236.
24. Padutov V. Ye., Baranov O. Yu., Voropayev Ye. V. *Metody molekulyarno-geneticheskogo analiza* [Molecular genetic analysis methods]. Minsk, Yunipol Publ., 2007. 176 p.
25. Which DNA marker for which purpose: final compendium of the research project. *DGXII Biotechnology FW IV Research Programme; ed. E. M. Gillet*. Institut für Forstgenetik und Forstpflanzenzüchtung, Universität Göttingen, 1999, 253 p.
26. Ford-Lloyd B. *Measuring genetic variation using molecular markers*. Rome, IPGRI Publ., 1996, 72 p.
27. White T. J., Bruns T. D., Lee S. B., Taylor J. W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 1990, pp. 315–322. DOI: 10.1016/0168-9525(90)90186-A.
28. Gardes M., Bruns T. D. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes application of the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol. Ecol.*, 1993, vol. 2, pp. 113–118. DOI: 10.1111/j.1365-294x.1993.tb00005.x.
29. Tataurov A.V., You Y., Owczarzy R. Predicting ultraviolet spectrum of single stranded and double stranded deoxyribonucleic acids. *Biophys. Chem.*, 2008, vol. 133, pp. 66–70. DOI: 10.1016/j.bpc.2007.12.004.
30. National Center for Biotechnological Information, NCBI. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (accessed 10.09.2019).

### Информация об авторах

**Пантелеев Станислав Викторович** – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник. Институт леса Национальной академии наук Беларуси (246050, г. Гомель, ул. Пролетарская, 71, Республика Беларусь). E-mail: stasikdesu@mail.ru

**Баранов Олег Юрьевич** – доктор биологических наук, доцент, заведующий лабораторией. Институт леса Национальной академии наук Беларуси (246050, г. Гомель, ул. Пролетарская, 71, Республика Беларусь). E-mail: betula-belarus@mail.ru

**Звягинцев Вячеслав Борисович** – кандидат биологических наук, доцент, заведующий кафедрой лесозащиты и древесиноведения. Белорусский государственный технологический университет (220006, г. Минск, ул. Свердлова, 13а, Республика Беларусь). E-mail: mycolog@tut.by

**Ярук Анна Владимировна** – ассистент кафедры лесозащиты и древесиноведения. Белорусский государственный технологический университет (220006, г. Минск, ул. Свердлова, 13а, Республика Беларусь). E-mail: smile\_04@mail.ru

#### **Information about the authors**

**Panteleev Stanislav Victorovich** – PhD (Biology), Senior Researcher. Institute of Forest of the National Academy of Sciences of Belarus (71, Proletarskaya str., 246050, Gomel, Republic of Belarus). E-mail: stasikdesu@mail.ru

**Baranov Oleg Yur'evich** – DSc (Biology), Associate Professor, Head of the Laboratory. Institute of Forest of the National Academy of Sciences of Belarus (71, Proletarskaya str., 246050, Gomel, Republic of Belarus). E-mail: betula-belarus@mail.ru

**Zviagintsev Viacheslav Borisovich** – PhD (Biology), Associate Professor, Head of Department of Forest Protection and Wood Science. Belarusian State Technological University (13a, Sverdlova str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: mycolog@tut.by

**Yaruk Anna Vladimirovna** – Assistant Lecturer, Department of Forest Protection and Wood Science. Belarusian State Technological University (13a, Sverdlova str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: smile\_04@mail.ru

*Поступила 20.03.2020*