

ЛЕСОЗАЩИТА И САДОВО-ПАРКОВОЕ СТРОИТЕЛЬСТВО

FOREST PROTECTION AND LANDSCAPING

УДК 577.212:632.4

О. Ю. Баранов^{1,2}, Л. О. Иващенко²

¹Национальная академия наук Республики Беларусь

²Белорусский государственный технологический университет

РАЗРАБОТКА НАБОРА ПРАЙМЕРОВ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ОФИОСТОМОВЫХ ГРИБОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ПРОЦЕССАМИ УСЫХАНИЯ ДУБА ЧЕРЕШЧАТОГО

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – технология, основанная на ферментативной амплификации матрицы ДНК в условиях *in vitro*, которая используется для быстрого обнаружения, характеристики и идентификации различных биологических организмов. Одним из наиболее важных этапов при проведении ПЦР-анализа является разработка праймеров, позволяющих наиболее точно диагностировать изучаемый объект. В данной статье описана технология разработки олигонуклеотидных праймеров, специфичных для фитопатогенных грибов семейства *Ophiostomataceae* Nannf., ассоциированных с поражением сосудистой системы дуба черешчатого *Quercus robur* L. В основу подхода положено использование родоспецифичных участков ДНК для создания последовательностей олигонуклеотидов.

Ключевые слова: офиостомовые грибы, *Q. robur*, праймер, усыхание, ПЦР.

Для цитирования: Баранов О. Ю., Иващенко Л. О. Разработка набора праймеров для диагностики офиостомовых грибов, ассоциированных с процессами усыхания дуба черешчатого // Труды БГТУ. Сер. 1, Лесное хоз-во, природопользование и перераб. возобновляемых ресурсов. 2023. № 1 (264). С. 41–48. DOI: 10.52065/2519-402X-2023-264-05.

О. Yu. Baranov^{1,2}, L. O. Ivashchenko²

¹National Academy of Sciences of the Republic of Belarus

²Belarussian State Technological University

DEVELOPMENT OF A SET OF PRIMERS FOR THE DIAGNOSIS OF OPHIOSTOMA FUNGI ASSOCIATED WITH DRYING PROCESSES OF ENGLISH OAK

Polymerase chain reaction (PCR) is a technology based on enzymatic amplification of DNA template *in vitro*, which is used for rapid detection, characterization and identification of various biological organisms. One of the most important stages in the PCR analysis is the development of primers that allow the most accurate diagnosis of the object under study. This article describes the technology for the development of oligonucleotide primers specific for phytopathogenic fungi of the family *Ophiostomataceae* Nannf., associated with the lesion of the vascular system of English oak *Quercus robur* L. The approach is based on the use of genus-specific DNA regions to create oligonucleotide sequences.

Keywords: Ophiostoma fungi, *Quercus robur*, primer, desiccation, PCR.

For citation: Baranov O. Yu., Ivashchenko L. O. Development of a set of primers for the diagnosis of ophiostoma fungi associated with drying processes of English oak. *Proceedings of BSTU, issue 1, Forestry. Nature Management. Processing of Renewable Resources*, 2023, no. 1 (264), pp. 41–48. DOI: 10.52065/2519-402X-2023-264-05 (In Russian).

Введение. Массовое усыхание дубовых насаждений в Европе наблюдается с начала XX в. [1]. С 1990-х гг. усыхание дуба считается

многофакторным процессом, в котором значительную роль играют абиотические факторы – уменьшение количества атмосферных осадков

в вегетационный период, снижение уровня грунтовых вод, повышенные температуры воздуха и т. д. Тем не менее, немаловажными выступают и биотические факторы, такие как распространение стволовых вредителей и фитопатогенных организмов, вызывающих повреждение сосудистой системы деревьев дуба. Кроме прямого воздействия на деревья, стволовые вредители способствуют более быстрому распространению инфекций, переноса возбудителей заболеваний на поверхности или внутри тела насекомого [2].

По данным лесопатологических обследований Учреждения «Беллесозащита» [3], на начало 2022 г. общая площадь очагов инфекционных болезней дуба составила порядка 3,4 тыс. га, или 1,4% от суммарной площади дубрав Беларуси. Одним из основных типов заболеваний является поражение сосудистой системы деревьев офиостомовыми грибами (семейство *Ophiostomataceae*) [4].

Офиостомовые грибы представляют собой широко распространенную группу фитопатогенных грибов лесных древесных растений не только в Беларуси, но и в других странах. Внешний характер вызываемых повреждений связан с изменением окраски заболонной части древесины, что обуславливает ее низкую экономическую ценность. Массовое возникновение очагов и распространение некоторых видов офиостомовых грибов оказало значительное влияние на естественные леса и нанесло существенный ущерб мировому лесному хозяйству в течение прошлого века [5, 6].

Большинство представителей семейства *Ophiostomataceae* могут заражать деревья через раны и трещины, образующиеся в результате жизнедеятельности стволовых вредителей, а также механических повреждений, вызванных ветром, низкими отрицательными температурами и др. [7]. Наиболее благоприятными условиями для проникновения и развития инфекции в стволе дерева является глубокое нарушение покровных тканей и относительно недавний характер повреждения [8].

Следует отметить, что многие представители офиостомовых грибов часто ассоциированы с короедами подсемейства *Scolytinae* Latreille, которые колонизируют ослабленные или недавно погибшие деревья [9]. Примером такой взаимосвязи может служить голландская болезнь вязов, вызываемая грибом *Ophiostoma ulmi*, распространяемого ильмовыми заболонниками из рода *Scolytus* Geoffr. Распространение инфекции в прошлом веке привело к эпифитотиям и гибели значительного числа насаждений вяза в Европе и Северной Америке [10].

Диагностика поражения сосудистой системы дуба зачастую проводится по внешним

признакам поражения деревьев (морфологический метод), т. е. на поздних стадиях развития болезни. Кроме того, данный метод не позволяет точно определить возбудителя, поскольку сходные симптомы заболеваний могут быть вызваны как различными видами патогенных организмов, так и неблагоприятными внешними условиями.

Таким образом, разработка метода ранней диагностики офиостомовых грибов является одной из актуальных задач, связанных с совершенствованием системы лесопатологического мониторинга дубрав. В настоящее время наряду с используемыми классическими методами диагностики фитопатогенных грибов наибольшую значимость приобретают молекулярно-генетические подходы, основанные на выявлении ДНК возбудителя [11].

Основная часть. Диагностика возбудителей болезней лесных древесных растений имеет основополагающее значение практически для всех аспектов, связанных с патогенезом растений. Точная идентификация и раннее обнаружение фитопатогенных организмов является первоосновой для своевременной организации и проведения защитных мероприятий, направленных на элиминацию вредных организмов. Исходя из трудоемкости и высокой субъективности результатов идентификации патогенов, основанной только на анализе морфологических характеристик, использование методов ДНК-маркирования (и в частности, ПЦР-основанных подходов) является наиболее эффективным и информативным инструментом для быстрой и точной диагностики болезней растений [12].

Классический вариант ПЦР-амплификации включает в себя повторяющиеся циклы денатурации матрицы, отжига праймеров и удлинения маркерного региона клонируемой последовательности ДНК, фланкированного двумя олигонуклеотидными праймерами. При этом разработка олигонуклеотидов, специфичных для целевых организмов, является одним из наиболее важных элементов метода молекулярно-генетической диагностики. Праймеры, которые являются уникальными для амплифицируемой последовательности-мишени, должны удовлетворять определенным термодинамическим критериям, связанным с их размером, температурой отжига и плавления, способностью формировать вторичную структуру, специфичностью и др. [13].

Дизайн праймеров с использованием последовательностей внутренних транскрибируемых спейсеров ITS1 и ITS2 областей рДНК получил широкое распространение в молекулярно-генетической идентификации фитопатогенных грибов,

так как их изменчивость с диагностической точки зрения является информативной и достаточной для определения таксономической принадлежности патогенов [14]. На сегодняшний день олигонуклеотиды, разработанные на основе последовательностей внутренних транскрибируемых спейсеров, используются для обнаружения более 80 видов фитопатогенных грибов. Гены рРНК (18S, 5.8S и 28S) грибов характеризуются более низким (по сравнению с ITS1 и ITS2) уровнем филогенетических преобразований и поэтому в наибольшей степени пригодны для изучения таксономических групп на уровне родов или выше [12].

С целью создания видоспецифичных праймеров последовательности целевой рДНК грибов могут быть получены из специализированных баз данных (например, NCBI GenBank [https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi]) или путем секвенирования целевого фрагмента рДНК изучаемых образцов генетического материала грибов с помощью универсальных праймеров [15]. Последующее сравнение последовательностей рДНК-мишени среди родственных видов грибов

позволяет идентифицировать консервативные таксоноспецифические регионы и разработать структуру диагностических праймеров [12].

Целью данной работы является разработка родоспецифичных олигонуклеотидных последовательностей для идентификации фитопатогенных грибов семейства *Ophiostomataceae*, ассоциированных с процессами усыхания дубовых насаждений Беларуси.

На первом этапе исследований с использованием литературных данных был актуализирован видовой состав микромицетов, вызывающих поражение проводящих тканей растений *Q. robur*. Полученные данные относительно патогенных грибов семейства *Ophiostomataceae* представлены в табл. 1.

Большинство из этих видов на территории Беларуси не зафиксированы (по данным из Глобальной информационной системы о биоразнообразии GBIF [https://www.gbif.org/]), что может быть связано с их отсутствием в настоящее время или невозможностью проведения достоверной лабораторной идентификации.

Таблица 1

Перечень представителей семейства *Ophiostomataceae*, ассоциированных с дубом черешчатым

№ п/п	Род	Вид	Литературный источник
1	<i>Sporothrix</i> Hektoen & C.F.Perkins	<i>S. abietina</i>	Selochnik N. N. et al. [16]
2		<i>S. dentifunda</i>	Aghayeva D. N. et al. [17]
3		<i>S. eucastaneae</i>	Jankowiak R. et al. [9]
4		<i>S. fusiformis</i>	Selochnik N. N. et al. [16]
5		<i>S. inflata</i>	Halmschlager E. [18]
6		<i>S. lunata</i>	Selochnik N. N. et al. [16]
7		<i>S. prolifera</i>	Jankowiak R. et al. [9]
8		<i>S. stenoceras</i>	
9		<i>S. schenckii</i>	Selochnik N. N. et al. [16]
10	<i>Ophiostoma</i> Syd. & P.Syd.	<i>O. australiae</i>	Taerum S. J. et al. [19]
11		<i>O. boreale</i>	
12		<i>O. denticiliatum</i>	
13		<i>O. himal-ulmi</i>	
14		<i>O. karelicum</i>	
15		<i>O. novo-ulmi</i>	
16		<i>O. solheimii</i>	Jankowiak R. et al. [9]
17		<i>O. sparsiannulatum</i>	Jankowiak R. et al. [9]
18		<i>O. tasmaniense</i>	Taerum S. J. et al. [19]
19		<i>O. tsotsi</i>	
20		<i>O. ulmi</i>	
21		<i>O. undulatum</i>	
22		<i>O. villosum</i>	Aas T. et al. [20]
23	<i>Leptographium</i> Lagerb. & Melin	<i>L. flavum</i>	Jankowiak R. et al. [9]
24		<i>L. procerum</i>	Aas T. et al. [20]
25		<i>L. tardum</i>	Jankowiak R. et al. [9]
26		<i>L. verrucosum</i>	Gebhardt H. et al. [21]
27		<i>L. vulnerum</i>	Jankowiak R. et al. [9]

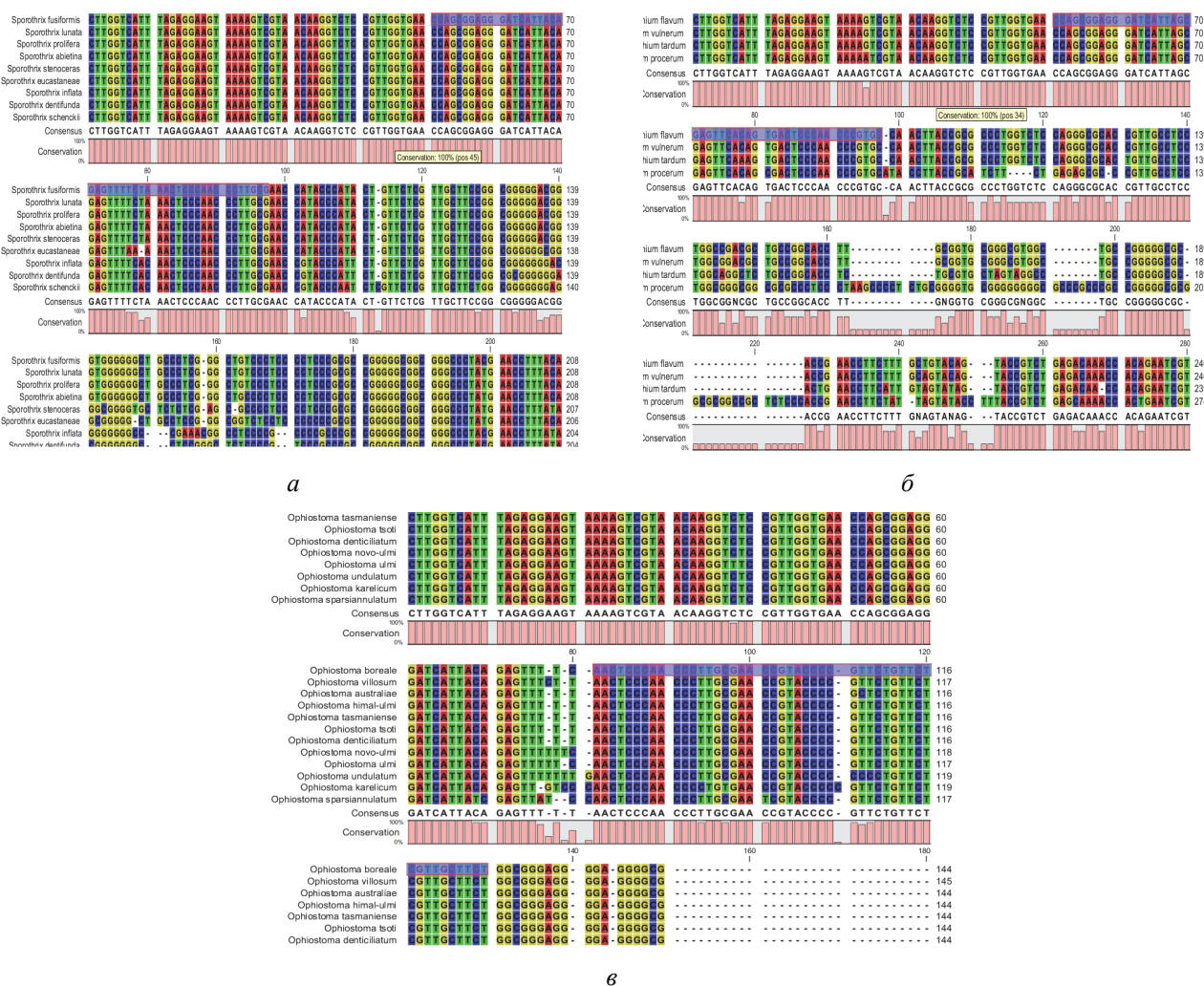


Рис. 1. Фрагменты выравнивания видов семейства *Ophiostomataceae* с выделенными консервативными участками:
а – род *Sporothrix*; б – род *Leptographium*; в – род *Ophiostoma*

На следующем этапе работы была сформирована база данных нуклеотидных последовательностей, состоящая из 27 видов офистомовых грибов.

Формирование нуклеотидных последовательностей производилось на основе имеющихся в международном геном банке NCBI GenBank данных. При помощи программного обеспечения CLC Sequence Viewer 6.6.2 было проведено выравнивание последовательностей для определения консервативных участков с целью последующего подбора регионов для разработки структуры праймеров. Фрагменты выравнивания видов представлены на рис. 1.

На основе анализа консервативных участков ДНК с использованием специального программного обеспечения Primer Blast для каждого из изучаемых родов были разработаны 30 вариантов пар праймеров согласно следующим критериям: размер праймера – в диапазоне от 18 до 30 оснований; GC-состав – не менее 50%; различия в температурах плавления

(T_m) между прямым и обратным праймером не более чем 2–3 °С, отсутствие вторичной структуры (шпильки или димеры) [21–23], температура плавления (T_m) – 55–63 °С; длина ампликона – от 390 до 515 п. н. Все остальные параметры принимались «по умолчанию».

Последующий детальный анализ термодинамических характеристик разработанных структур олигонуклеотидных последовательностей позволил идентифицировать варианты праймеров, характеризующиеся наиболее оптимальными значениями указанных ранее характеристик (табл. 2).

Функциональность разработанных праймеров была протестирована модулем Primer Blast в базе данных нуклеотидных последовательностей NCBI GenBank. Полученные результаты показали, что пары праймеров являются специфичными по отношению к гену 18S рДНК представителей родов *Ophiostoma*, *Leptographium*, *Sporothrix*. На рис. 2 представлены результаты для пары олигонуклеотидов GLep (F) и GLep (R).

Таблица 2

Нуклеотидные последовательности разработанных праймеров

Род	Праймер	Последовательность праймера (5'–3')
<i>Leptographium</i>	GLep (F)	CCCAACCCGTGCCAACTTA
	GLep (R)	AGATGCTTACTGCGCTCGG
<i>Sporothrix</i>	GSp (F)	CCCTTGCGAACCATACCCAT
	GSp (R)	GGAGAACTTGCGTTCGGTACT
<i>Ophiostoma</i>	GOph (F)	CTGTTCTCGTTGCTTCTGGC
	GOph (R)	GCGAGAGAGAGAACTTGCCT

— Detailed primer reports

Primer pair 1						
	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CCCAACCCGTGCCAACTTA	19	60.23	57.89	3.00	2.00
Reverse primer	AGATGCTTACTGCGCTCGG	19	60.23	57.89	4.00	2.00
Products on target templates						
>MH055537.1 <i>Leptographium flavum</i> strain CBS 144106 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial						
product length = 445						
Forward primer	1 CCCAACCCGTGCCAACTTA 19					
Template	86 104					
Reverse primer	1 AGATGCTTACTGCGCTCGG 19					
Template	530 512					
>MH055533.1 <i>Leptographium vulnorum</i> strain CBS 144038 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial						
product length = 445						
Forward primer	1 CCCAACCCGTGCCAACTTA 19					
Template	86 104					
Reverse primer	1 AGATGCTTACTGCGCTCGG 19					
Template	530 512					
>MH055525.1 <i>Leptographium tardum</i> strain CBS 144087 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial						
product length = 444						
Forward primer	1 CCCAACCCGTGCCAACTTA 19					
Template	37 55					
Reverse primer	1 AGATGCTTACTGCGCTCGG 19					
Template	480 462					
>MH055524.1 <i>Leptographium tardum</i> strain N2016-0676/2/2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial						
product length = 444						
Forward primer	1 CCCAACCCGTGCCAACTTA 19					
Template	37 55					

Рис. 2. Результаты тестирования в NCBI Primer Blast

Как видно из рис. 2, праймеры являются специфичными для представителей рода *Leptographium* и могут быть использованы для их идентификации в образцах пораженных тканей древесных растений. Аналогичные результаты были получены при тестировании праймеров для родов *Sporothrix* и *Ophiostoma*.

Заключение. Таким образом, в результате проведенных исследований сконструированы три пары специфичных праймеров, позволяющих идентифицировать и дифференцировать фитопатогенные грибы родов *Ophiostoma*,

Leptographium, *Sporothrix*. Специфичность разработанных праймеров подтверждена *in silico* с использованием доступных нуклеотидных последовательностей представителей данных родов в базе данных NCBI GenBank.

На следующем этапе исследований будут проведены тесты *in vitro* по изучению эффективности диагностики маркерных локусов офиостомовых грибов, как с использованием чистых культур изолятов патогенов, так и образцов дуба черешчатого, характеризующихся симптомами инфекционного поражения сосудистой системы.

Список литературы

1. Ragazzi A., Vagniluca S., Moricca S. European expansion of oak decline, involved microorganisms and methodological approaches // *Phytopathol. Mediterr.* 1995. Vol. 34. P. 207–226.
2. Oak Decline Caused by Biotic and Abiotic Factors in Central Europe: A Case Study from the Czech Republic / M. Machacova [et al.] // *Forests.* 2022. Vol. 13 (8). P. 1223.
3. Обзор лесопатологического и санитарного состояния лесного фонда Республики Беларусь за 2021 год и прогноз развития патологических процессов в 2022 году / М-во лесного хоз. Респ. Беларусь, Беллесозащита. Ждановичи, 2022. 84 с.

4. Федоров Н. И. Лесная фитопатология. Минск: БГТУ, 2004. 462 с.
5. Harrington T. C. Biology and taxonomy of fungi associated with bark beetles // Beetle-pathogen interactions in conifer forests. 1993. Vol. 25. P. 37–58.
6. The unified framework for biological invasions: a forest fungal pathogen perspective / M. J. Wingfield [et al.] // Biological Invasions. 2017. Vol. 19 (11). P. 3201–3214.
7. Gibbs J. N. The biology of ophiostomatoid fungi causing sapstain in trees and freshly cut logs // Ceratocystis and Ophiostoma. Taxonomy, ecology, and pathogenicity. 1993. Vol. 474. P. 153–160.
8. A diverse assemblage of Ophiostoma species, including two new taxa on eucalypt trees in South Africa / G. Kamgan Nkuekam [et al.] // Mycological progress. 2012. Vol. 11 (2). P. 515–533.
9. Four new Ophiostoma species associated with conifer-and hardwood-infesting bark and ambrosia beetles from the Czech Republic and Poland / R. Jankowiak [et al.] // Antonie van Leeuwenhoek. 2019. Vol. 112 (10). P. 1501–1521.
10. Three new species of Ophiostomatales from Nothofagus in Patagonia / A. de Errasti [et al.] // Mycological Progress. 2016. Vol. 15 (2). P. 1–15.
11. Early detection and identification of the main fungal pathogens for resistance evaluation of new genotypes of forest trees / K. A. Shestibratov [et al.] // Forests. 2018. Vol. 9 (12). P. 732–740.
12. Ma Z., Michailides T. J. Approaches for eliminating PCR inhibitors and designing PCR primers for the detection of phytopathogenic fungi // Crop Protection. 2007. Vol. 26 (2). P. 145–161.
13. Dieffenbach C. W., Lowe T. M., Dveksler G. S. General concepts for PCR primer design // PCR methods appl. 1993. Vol. 3 (3). P. 30–37.
14. Использование ПДАФ-маркеров для метагеномного анализа микробиомов насекомых-вредителей лиственных пород Беларуси / А. В. Падутов [и др.] // Современные проблемы лесозащиты и пути их решения: материалы II Междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 95-летию со дня рождения проф. Николая Ильича Федорова и 90-летию каф. лесозащиты и древесиноведения, Минск, 30 нояб. – 4 дек. 2020 г.; под ред. В. Б. Звягинцева, М. О. Середич. Минск, 2020. С. 198–201.
15. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics / T. J. White [et al.] // PCR protocols: a guide to methods and applications. 1990. Vol. 18 (1). P. 315–322.
16. Ophiostomatoid fungi and their roles in *Quercus robur* dieback in Tellermann forest, Russia / N. N. Selochnik [et al.] // Silva Fenn. 2015. Vol. 49 (5). P. 16.
17. *Ophiostoma dentifundum* sp. nov. from oak in Europe, characterized using molecular phylogenetic data and morphology / D. N. Aghayeva [et al.] // Mycological Research. 2005. Vol. 109 (10). P. 1127–1136.
18. Halmschlager E., Kowalski T. *Sporothrix inflata*, a root-inhabiting fungus of *Quercus robur* and *Q. petraea* // Mycological Progress. 2003. Vol. 2 (4). P. 259–266.
19. *Ophiostoma quercus*: An unusually diverse and globally widespread tree-infecting fungus / S. J. Taerum [et al.] // Fungal biology. 2018. Vol. 122 (9). P. 900–910.
20. Four new *Ophiostoma* species associated with hardwood-infesting bark beetles in Norway and Poland / T. Aas [et al.] // Fungal biology. 2018. Vol. 122 (12). P. 1142–1158.
21. Gebhardt H., Kirschner R., Oberwinkler F. A new *Ophiostoma* species isolated from the ambrosia beetle *Xyleborus dryographus* (Coleoptera: Scolytidae) // Mycological Progress. 2002. Vol. 1 (4). P. 377–382.
22. Abd-Elsalam K. A. Bioinformatic tools and guideline for PCR primer design // African Journal of biotechnology. 2003. Vol. 2. (5). P. 91–95.
23. Achyar A., Atifah Y., Putri D. H. In silico study of developing a method for detecting pathogenic bacteria in refillable drinking water samples // Journal of Physics: Conference Series. 2021. Vol. 1940 (1). P. 012061.

References

1. Ragazzi A., Vagniluca S., Moricca S. European expansion of oak decline, involved microorganisms and methodological approaches. *Phytopathol. Mediterr*, 1995, vol. 34, pp. 207–226.
2. Machacova M., Nakladal O., Samek M., Bat'a D., Zumr V., Peskova V. Oak Decline Caused by Biotic and Abiotic Factors in Central Europe: A Case Study from the Czech Republic. *Forests*, 2022, vol. 13 (8), p. 1223.
3. *Obzor lesopatologicheskogo i sanitarnogo sostoyaniya lesnogo fonda Respubliki Belarus' za 2021 god i prognoz razvitiya patologicheskikh processov v 2022 godu* [Review of the forest pathological and

sanitary state of the forest fund of the Republic of Belarus for 2021 and the forecast for the development of pathological processes in 2022]. Zhdanovich, 2022. 84 p. (In Russian).

4. Fedorov N. I. *Lesnaya fitopatologiya* [Forest phytopathology]. Minsk, BSTU Publ., 2004. 462 p. (In Russian).

5. Harrington T. C. Biology and taxonomy of fungi associated with bark beetles. *Beetle-pathogen interactions in conifer forests*, 1993, vol. 25, pp. 37–58.

6. Wingfield M. J., Slippers B., Wingfield B. D., Barnes I. The unified framework for biological invasions: a forest fungal pathogen perspective. *Biological Invasions*, 2017, vol. 19 (11), pp. 3201–3214.

7. Gibbs J. N. The biology of ophiostomatoid fungi causing sapstain in trees and freshly cut logs. *Ceratocystis and Ophiostoma. Taxonomy, ecology, and pathogenicity*, 1993, vol. 474, pp. 153–160.

8. Kamgan Nkuekam G., Wilhelm de Beer Z., Wingfield M. J., Roux J. A diverse assemblage of *Ophiostoma* species, including two new taxa on eucalypt trees in South Africa. *Mycological progress*, 2012, vol. 11 (2), pp. 515–533.

9. Jankowiak R., Bilanski P., Strzalka B., Linnakoski R., Bosak A., Hausner G. Four new *Ophiostoma* species associated with conifer- and hardwood-infesting bark and ambrosia beetles from the Czech Republic and Poland. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2019, vol. 112 (10), pp. 1501–1521.

10. de Errasti A., de Beer Z. W., Coetzee M. P. A., Roux J., Rajchenberg M., Wingfield M. J. Three new species of *Ophiostomatales* from *Nothofagus* in Patagonia. *Mycological Progress*, 2016, vol. 15 (2), pp. 1–15.

11. Shestibratov K. A., Baranov O. Yu., Subbotina N. M., Lebedev V. G., Panteleev S. V., Krutovsky K. V., Padutov V. E. Early detection and identification of the main fungal pathogens for resistance evaluation of new genotypes of forest trees. *Forests*, 2018, vol. 9 (12), pp. 732–740.

12. Ma Z., Michailides T. J. Approaches for eliminating PCR inhibitors and designing PCR primers for the detection of phytopathogenic fungi. *Crop Protection*, 2007, vol. 26 (2), pp. 145–161.

13. Dieffenbach C. W., Lowe T. M., Dveksler G. S. General concepts for PCR primer design. *PCR methods appl.*, 1993, vol. 3 (3), pp. 30–37.

14. Padutov A. V., Seredich M. O., Yarmolovich V. A., Pashkevich I. A., Baranov O. Yu. The use of PDAF markers for metagenomic analysis of microbiomes of insect pests of hardwoods in Belarus. *Sovremennyye problemy lesozashchity i puti ikh resheniya: materialy II Mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii, posvyashchyonnoy 95-letiyu so dnya rozhdeniya professora Nikolaya Il'icha Fedorova i 90-letiyu kafedry lesozashchity i drevesinovedeniya* [Modern problems of forest protection and ways to solve them: materials of the II International Scientific and practical Conference, dedicated 95th birthday of professor Nikolai Ilyich Fedorov and the 90th anniversary of the Department of Forest Protection and Wood Science]. Minsk, 2020, pp. 198–201 (In Russian).

15. White T. J., Bruns T., Lee S., Taylor J. W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 1990, vol. 18 (1), pp. 315–322.

16. Selochnik N. N., Pashenova N. V., Sidorov E., Wingfield M. J., Linnakoski R. Ophiostomatoid fungi and their roles in *Quercus robur* dieback in Tellermann forest, Russia. *Silva Fenn.*, 2015, vol. 49 (5), p. 16.

17. Aghayeva D. N., Wingfield M. J., Kirisits T., Wingfield B. D. *Ophiostoma dentifundum* sp. nov. from oak in Europe, characterized using molecular phylogenetic data and morphology. *Mycological Research*, 2005, vol. 109 (10), pp. 1127–1136.

18. Halmschlager E., Kowalski T. *Sporothrix inflata*, a root-inhabiting fungus of *Quercus robur* and *Q. petraea*. *Mycological Progress*, 2003, vol. 2 (4), pp. 259–266.

19. Taerum S. J., de Beer Z. W., Marincowitz S., Jankowiak R., Wingfield M. J. *Ophiostoma quercus*: An unusually diverse and globally widespread tree-infecting fungus. *Fungal biology*, 2018, vol. 122 (9), pp. 900–910.

20. Aas T., Solheim H., Jankowiak R., Bilanski P., Hausner G. Four new *Ophiostoma* species associated with hardwood-infesting bark beetles in Norway and Poland. *Fungal biology*, 2018, vol. 122 (12), pp. 1142–1158.

21. Gebhardt H., Kirschner R., Oberwinkler F. A new *Ophiostoma* species isolated from the ambrosia beetle *Xyleborus dryographus* (Coleoptera: Scolytidae). *Mycological Progress*, 2002, vol. 1 (4), pp. 377–382.

22. Abd-Elsalam K. A. Bioinformatic tools and guideline for PCR primer design. *African Journal of biotechnology*, 2003, vol. 2 (5), pp. 91–95.

23. Achyar A., Atifah Y., Putri D. H. *In silico* study of developing a method for detecting pathogenic bacteria in refillable drinking water samples. *Journal of Physics: Conference Series*, 2021, vol. 1940 (1), p. 012061.

Информация об авторах

Баранов Олег Юрьевич – доктор биологических наук, доцент, академик-секретарь Отделения биологических наук. Национальная академия наук Беларуси (220072, г. Минск, пр-т Независимости, 66, Республика Беларусь); профессор кафедры лесозащиты и древесиноведения. Белорусский государственный технологический университет (220006, г. Минск, ул. Свердлова, 13а, Республика Беларусь). E-mail: betula-belarus@mail.ru

Ивашченко Любовь Олеговна – младший научный сотрудник кафедры лесозащиты и древесиноведения. Белорусский государственный технологический университет (220006, г. Минск, ул. Свердлова, 13а, Республика Беларусь). E-mail: lyba281997@mail.ru

Information about the authors

Baranov Oleg Yurievich – DSc (Biological), Associate Professor, Academician-Secretary of the Department of Biological Sciences. National Academy of Sciences of Belarus (66, Nezavisimosti Ave., 220072, Minsk, Republic of Belarus); Professor, Department of Forest Protection and Wood Science. Belarusian State Technological University (13a, Sverdlova str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: betula-belarus@mail.ru

Ivashchenko Lyubov Olegovna – Junior Researcher, Department of Forest Protection and Wood Science. Belarusian State Technological University (13a, Sverdlova str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: lyba281997@mail.ru

Поступила 22.10.2022