

УДК 630*443.3 (476)

В. Б. ЗВЯГИНЦЕВ¹, Д. Б. БЕЛОМЕСЯЦЕВА²,
А. Г. ПРОХОРОВА¹, Л. О. ИВАЩЕНКО^{1,3}, Т. Г. ШАБАШОВА²

ОЦЕНКА РИСКОВ БИОЛОГИЧЕСКИХ ИНВАЗИЙ ДЕНДРОПАТОГЕННЫХ ОРГАНИЗМОВ НА ТЕРРИТОРИИ БЕЛАРУСИ, ПУТИ ИХ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ И КОНТРОЛЯ

¹Белорусский государственный технологический университет, Минск, Беларусь, e-mail: zviagintsev@belstu.by

²Институт экспериментальной ботаники имени В.Ф. Купревича Национальной академии наук Беларуси,
Минск, Беларусь, e-mail: tiniti@inbox.ru

³Институт леса НАН Беларуси, Гомель, Беларусь

Аннотация. Описана история изучения биологических инвазий дендропатогенных организмов. Приведен обзор современных методов идентификации грибных инвайдеров, дана оценка перспективам их применения. Приведен список 53 инвазивных видов, выявленных авторами. Дана оценка новых очагов опасных карантинных объектов и инвазивных видов фитопатогенов в лесных насаждениях, проведено прогнозирование их дальнейшего распространения на территории страны с использованием методов компьютерного моделирования. На всех видах опасных карантинных видов отсутствующих на территории стран ЕАЭС (Единый перечень карантинных объектов Евразийского экономического союза), но уже выявленных в Европе (*Phytophthora ramorum* Weres et al., *Ph. kernoviae* Brasier, *Melampsora medusae* Thümen, *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner & Buhner) Nickle) показана высокая эффективность метода компьютерного моделирования в среде Махен распространения инвайдеров, позволяющего вести вариационную оценку пригодности среды обитания в конкретных эколого-климатических условиях для расширения неoareалов опасных организмов. Все вновь выявленные локалитеты располагались на прогнозной модели в диапазоне пригодности среды от 40 до 60%. Разработана бальная оценка пригодности местообитаний определенных территорий, которая по Беларуси составила для *Phytophthora ramorum* – 0,26, *Ph. kernoviae* – 0,12, *Melampsora medusae* – 0,45, *Bursaphelenchus xylophilus* – 0,14. Обоснована необходимость проведения оценки фитосанитарных рисков для картинных дендропатогенов и разработки мер локализации и ликвидации их очагов в лесном фонде и зеленых насаждениях.

Ключевые слова: инвазивные дендропатогены, микромицеты, таксономический анализ, молекулярно-генетические методы идентификации, оценка рисков инвазии, прогноз распространения, Махент.

V. B. ZVIAGINTSEV¹, D. B. BELOMESYATSEVA²,
A. G. PROKHOROVA¹, L. O. IVASHCHENKO^{1,3}, T. G. SHABASHOVA²

ASSESSMENT OF BIOLOGICAL INVASIONS RISKS OF THE DENDROPATHOGENIC ORGANISMS IN BELARUS TERRITORY, WAYS FOR THEIR PREDICTION AND CONTROL

¹Belarusian State Technological University, Minsk, Belarus, e-mail: zviagintsev@belstu.by

²V. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus,
e-mail: tiniti@inbox.ru

³Forestry Institute of the National Academy of Sciences of Belarus, Gomel, Belarus

Annotation. The history of the study of biological invasions of dendro-pathogenic organisms is described. An overview of modern methods for identifying fungal invaders is given, and the prospects for their use are assessed. A list of 53 invasive species identified by the authors is given. An assessment of new foci of dangerous quarantine objects and invasive species of phytopathogens in forest plantations is given, and their further spread across the country is predicted using computer modeling methods. For all types of dangerous quarantine species absent in the territory of the EAEU countries (Unified List of Quarantine Objects of the Eurasian Economic Union), but already identified in Europe (*Phytophthora ramorum* Weres et al., *Ph. kernoviae* Brasier, *Melampsora medusae* Thümen, *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner & Buhner) Nickle), high efficiency of the method of computer modeling in the Maxen environment of the spread of invaders was shown, which allows for a variational assessment of the suitability of the habitat in specific ecological and climatic conditions for the expansion of neo-ranges of dangerous organisms. All newly identified localities were located on the predictive model in the range of environmental suitability from 40 to 60%. A point assessment of the suitability of habitats of certain territories was developed, which for Belarus was 0.26 for *Phytophthora ramorum*, 0.36 for *Ph. kernoviae* – 0.12, *Melampsora medusae* – 0.45, *Bursaphelenchus xylophilus* – 0.14. The need

to assess the phytosanitary risks for pictorial dendropathogens and develop measures to localize and eliminate their foci in forests and green spaces is substantiated.

Key words: invasive dendropathogens, micromycetes, taxonomic analysis, molecular genetic identification methods, invasion risk assessment, spread forecast, Maxent.

ВВЕДЕНИЕ

По определению Продовольственной и сельскохозяйственной организации Объединённых Наций (ФАО) инвазивным признается вид живого организма, интродукция и/или распространение которого угрожает биологическому разнообразию [1]. Однако, точность этой формулировки часто оспаривается в научной литературе, т.к. она не учитывает важнейшие экономические последствия инвазий для сельскохозяйственных предприятий, лесного хозяйства, рекреации, туризма, традиционных видов занятий местного населения и т.д. Вместе с тем, известно, что биологические инвазии приносят экономический ущерб, сопоставимый или даже превышающий потери, приносимые стихийными бедствиями, такими как ураганы, землетрясения, наводнения, лесные пожары, и достигающий 1,2 трлн \$ США в год [2].

С 1960-х гг. только на территории стран ЕС экономические потери от внедрения чужеродных организмов оцениваются суммами от 116,61 до 138,6 млрд евро [3, 4] (рис. 1).

Инвазии патогенов и вредителей стали серьезным вызовом для биоразнообразия и функциональности лесов, а также для отраслей экономики, зависящих от лесных ресурсов [5].

Широкий спектр вредоносных организмов, включая грибы, бактерии, нематоды и насекомые, проникая в лесные экосистемы вносит необратимые изменения в их структуру и функции. Угроза инвазивных видов не ограничивается определенными регионами и странами; она имеет глобальный масштаб, влияя на леса различных климатических зон и экосистем [6–8].

Одной из наиболее серьезных проблем является интенсификация глобальной торговли и перемещения растений, что способствует быстрой дисперсии дендропатогенных организмов. Этот

процесс усугубляется климатическими изменениями, создавая условия, благоприятные для развития и распространения инвазивных видов [9–10].

Целью данного научного исследования является выявление чужеродных фитопатогенов древесных сосудистых растений, анализ отечественных и зарубежных данных, разработка подходов к усовершенствованию методологий прогноза, мониторинга и контроля инвайдеров.

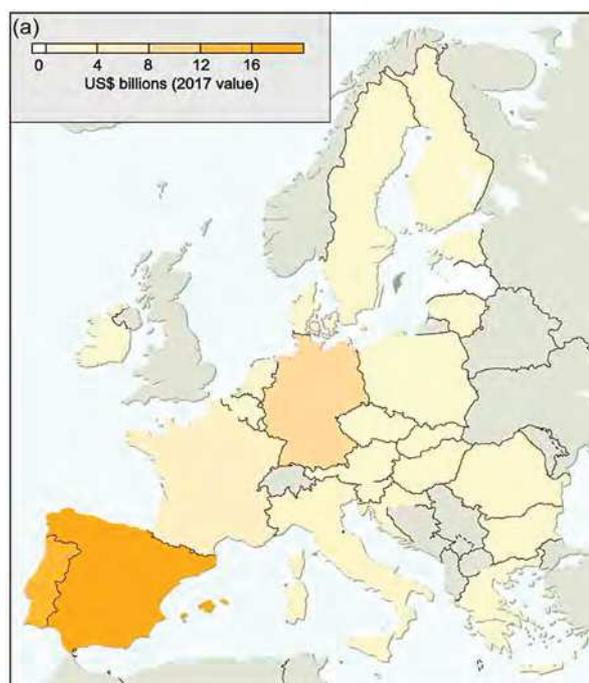


Рис. 1. Общие затраты, связанные с биологическими инвазиями в государствах-членах Европейского союза с 1960-х гг. [3, 4]

Fig. 1. Total costs associated with biological invasions in European Union member states since the 1960s [3, 4]

История изучения биологических инвазий дендропатогенных организмов

Развитие человеческого общества с древнейших времен способствовало интродукции биологических видов на новые обширные территории, причем не всегда этот перенос был преднамеренным и осмысленным. Резкий скачок в этом процессе связан с открытием Америки, морского пути в Индию и широкой колонизаторской деятельностью европейских народов в XVI–XVIII вв., сопровождавшейся массовыми перевозками сельскохозяйственной продукции, посадочного и семенного материала из Европы в колонии и из

колоний в Европу. Эти перевозки способствовали распространению многих вредоносных организмов [10]. С древнейших времен известны негативные последствия такой интродукции, связанные с исчезновением местных видов и целых экосистем, а также ощутимым ущербом для хозяйственной деятельности самого человека.

Первые наблюдения за инвазивными возбудителями заболеваний древесных пород, положившие основу для дальнейших исследований в области фитопатологии и дендрологии, начались

совсем недавно, что нельзя сказать про сельское хозяйство, где эта тема стала объектом внимания ещё в древности. Предпосылкой для идеи создания первых систем карантина растений, стала эпифитотия стеблевой ржавчины злаковых *Puccinia graminis* в 1660 г., однако исследования этого периода не давали конкретного объяснения причин возникновения болезней, а меры борьбы были лишены научного обоснования [11].

Осознание причин болезней и формирование первых их классификаций происходило в XVII–XVIII вв. В это время появились первые документированные случаи заболеваний деревьев. Важным исследователем в области корневой гнили и роли грибов в развитии болезней деревьев был шведский миколог Элиас Мерцелиус Фриэс (Elias Magnus Fries), который внес значительный вклад в классификацию, описание многих грибов, их влияния на лесные древесные породы. В частности, он проводил исследования корневой гнили, вызванной грибом *Armillaria mellea* [12]. Эти исследования позволили ему выявить, что не все болезни лесных древесных пород являются результатом естественных процессов, а могут быть вызваны микроорганизмами [13].

В своих работах Антон де Бари, впервые затрагивает тему симбиозов в природе, включая симбиотические отношения между растениями и грибами. Кроме того, де Бари впервые описал гриб *Phytophthora infestans*, вызывающий мучнистую росу картофеля [14].

После случайного завоза около 1865 г. в Европу североамериканской тли *Dactylosphaera vitifoliae*, которая впоследствии уничтожила большую часть виноградников региона интродукции, в 1881 г. зародилась Концепция международной защиты растений, когда пять стран подписали соглашение о контроле над распространением виноградной филлоксеры [15]. С этого момента в сельском и лесном хозяйстве стал применяться термин «карантин», были введены первые фитосанитарные меры [16].

В последующем большинство стран с развитой торговлей (Франция, Германия, Австрия, США, Мексика, Австралия, Россия начали вводить карантинные законы [11, 17]. В 1894 г. вышла на русском языке книга «Болезни деревьев» немецкого ученого Роберта Гартига. Этот труд стал первым в России учебником по лесной фитопатологии и вызвал значительный интерес лесоводов к этой науке [18]. Развитие микологии и фитопатологии создавало научную платформу для изучения проблемы биологических инвазий возбудителей болезней древесных растений.

Одной из первых, описанных в научной литературе инвазий древесного патогена стал класси-

ческий труд проф. А. А. Ячевского 1910 г., посвященный возбудителю мучнистой росы дуба, аскомицету *Microsphaera alphitoides* [19]. Выдвигалось несколько версий появления в Европе и быстрого распространения на континенте нового патогена, как считалось ранее узко специализированного на дубе черешчатом (*Quercus robur*). Одна из них объясняет это явление проникновением в Европу нового вида из неизвестного региона, другие говорят о возникновении нового вида паразита в процессе гибридизации, горизонтального переноса генов или ускоренной эволюции в изменившихся экологических условиях. Однако последние научные сведения, полученные на основе молекулярно-генетического анализа, показывают, что генетически близкие популяции *Erysiphe alphitoides* (= *Microsphaera alphitoides*) встречаются и на других видах дуба, и даже на растениях других родов и семейств на Американских континентах и в Восточной Азии [20–22]. Это является свидетельством инвазивной гипотезы появления нового вида фитопатогенов в Европе. Скорее всего в начале XX-го вв. *E. alphitoides* был интродуцирован из тропической зоны вместе с растениями манго и перешел к паразитированию на местных видах дуба [23, 24]. Причем доминирующий в Европе дуб черешчатый оказался наименее устойчивым к болезни, что позволило патогену быстро расширить свой вторичный ареал. Охватив всю площадь произрастания дубрав, болезнь стала одним из первичных факторов, вызывающих периодические депрессии дубовых насаждений [25, 26].

Выявлено, что обычно у новой популяции растения-хозяина наблюдается ограниченная резистентность к интродуцированному патогену, агрессивность которого, напротив, возрастает [27]. Это является следствием отсутствия предшествующей совместной эволюции видов [28]. Такие интродукционные события открывают огромные возможности для эволюции фитопатогенов. В своем первоначальном эндемичном ареале патоген, как правило, подвергается стабильным ограничениям естественного отбора, воздействующего через множество факторов, что со временем приводит к возникновению экологического баланса. Ни один из отдельных компонентов отбора не варьирует настолько сильно, чтобы нарушить равновесие между популяциями хозяина и фитопатогена. Таким образом, естественный отбор благоприятствует поддержанию относительно стабильной, хотя и со временем варьирующей структуры популяций [29]. Однако при попадании в новую среду патоген подвергается новым факторам отбора, воздействующим эпизодически. Относительно внезапно изменяются

количественные и качественные факторы интенсивности отбора, вызванные различными компонентами окружающей среды. Эволюционный скачек приводит к значительным изменениям в структуре популяции инвазивного фитопатогена и трансформации экологии вида [29, 30].

Яркой иллюстрацией такого развития инвазии стала одна из крупнейших экологических катастроф XX в. – панфитотия голландской болезни ильмовых. Эта массовая патология привела к гибели миллиарды деревьев рода *Ulmus* на двух континентах [31, 32]. Болезнь вызвана грибом *Ophiostoma ulmi*, который в начале XX в. был интродуцирован из Восточной Азии [33].

Первая волна пандемии голландской болезни, вызванная *Ophiostoma ulmi*, началась в Северо-Западной Европе примерно в 1910 г. Название новой патологии, имеющей симптоматику сосудистого микоза, дало место её подробного изучения – Голландия [34]. Заняв Центральную Европу, болезнь быстро распространилась на восток охватив обширные регионы вплоть до Юго-Западной Азии. В результате серии завозов зараженной древесины вяза возбудитель был интродуцирован в Великобританию и Северную Америку примерно в 1927 г. и в Среднюю Азию в конце 1930-х гг. [35]. Первоначально распространение *O. ulmi* привело к значительной смертности вязов в Европе. В 1940-х гг. эта волна усыхания неожиданно пошла на спад после гибели 10–40% вязов в большинстве европейских стран [35]. По одной из гипотез, это может быть связано с распространением патогенных микровирусов в популяции *O. ulmi* [36]. Однако в Северной Америке такого спада не наблюдалось и вредоносность голландской болезни оставалась высокой.

В начале 1970-х гг. в Великобритании и соседних частях Европы произошла новая серьезная вспышка болезни голландских вязов, вызванная ранее неизвестным видом *Ophiostoma novo-ulmi* [37]. Позже выборочные исследования на большей части северного полушария показали, что вторая пандемия голландской болезни вяза, вызванная *O. novo-ulmi*, фактически началась в 1940-х гг. в двух совершенно разных местах: в регионе Молдовы и Украины в Восточной Европе (подвид *novo-ulmi*) и на юге Великих озер в Северной Америке (подвид *americana*) [38]. После этого подвид *novo-ulmi* мигрировал на запад через Европу, достигнув к середине 1970-х гг. Нидерландов и на восток в Юго-Западную Азию. В 1970-х гг. он попал Среднюю Азию, вероятно в результате антропогенного переноса. Аналогично, подвид *americana* постепенно распространился по всему североамериканскому континенту от восточного побережья до западного. В

этот период подвид *americana* был завезен из Канады в Великобританию на зараженных лесоматериалах вяза [39]. Проникнув с островов в континентальную Европу подвид *americana* быстро распространился в Нидерландах, Франции, Испании, а после и в других странах Западной Европы. Отмечено, что географические ареалы двух подвидов *O. novo-ulmi* перекрываются в нескольких частях Европы. Распространение *O. novo-ulmi* привело к катастрофической пандемии, в результате которой погибло большинство взрослых деревьев всех европейских видов вяза. Только в Великобритании отмечено усыхание около 28 миллионов деревьев. В Северной Америке, где разрушительное воздействие *O. novo-ulmi* еще сильнее, потери исчисляются сотнями миллионов вязов [26, 39].

На территории бывшего СССР также выделялись две волны усыхания вязов – в 1936–1943 гг. и 1955–1959 гг., причем вторая волна была гораздо более вредоносной [40]. Первое вторжение инвайдера затронуло в основном южные районы страны, но с середины XX в. болезнь начала распространяться на север, включая территорию Беларуси, что, вероятнее всего, говорит о появлении *Ophiostoma novo-ulmi*. В результате панфитотии массово усыхали вязовые древостои во всех южных и центральных регионах Советского Союза от Украины до Урала. Это огромное по своим масштабам бедствие, когда в течение короткого времени погибла ранее довольно распространенная лесная формация – вязовники [41]. В конце XX – начале XXI вв. процессы усыхания достигли северных границ ареала ясеня в Восточной Европе, где очаги болезни действуют и в настоящее время делая бесперспективным выращивание этой породы в лесных и зеленых насаждениях [42–44].

Еще одним хорошо изученным примером разрушительных инвазий дендропатогенов было появление крифонектриевого некроза каштанов. Впервые болезнь зафиксирована в 1904 г. на каштане американском (*Castanea dentata*) в США [45]. Возбудитель некроза аскомицет *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr. в 1930-х гг. интродуцирован Европу и теперь наносит огромный ущерб природным и культурным популяциям местного каштана посевного (*Castanea sativa*) [46]. Вектором инвазии стал ввоз саженцев японских каштанов, устойчивых к воздействию патогена [47].

При разработке мер борьбы с опасным инвайдером М. Гренте был открыт способ биоконтроля с помощью гиповирулентности (*Cryphonectria hypovirus* (CHV-1) и привел к многочисленным исследованиям в этом направлении [48].

Вследствие все чаще возникающих вспышек заболеваний, последствия которых стали иметь глобальный характер во второй половине XX в. началось стремительное развитие микробиологии и молекулярной биологии, стали появляться более точные методы идентификации и изучения векторов проникновения патогенов, о чем подробнее пойдет речь в следующих подразделах.

Значительное внимание уделяли изучению экологических аспектов чужеродных организмов. Элтон Метуэн в своей работе «Экология вторжений животных и растений» выявил крупномасштабные закономерности, такие как большее количество захватчиков в регионах с умеренным климатом по сравнению с тропическими регионами, а также на островах по сравнению с материковыми территориями одинакового размера [49, 50].

История создания селекции сортов лесных пород, устойчивых к патогенам, началась в середине 1970-х гг. и продолжается до сегодняшнего дня. На основе понимания организации наследственного аппарата различных модельных объектов разработаны технологии манипуляций с генами, получившие название генной инженерии [51].

Исследователи в области фитопатологии разрабатывали и внедряли методы создания сортов и пород деревьев, устойчивых к инвазиям. Это включало в себя селекцию деревьев с улучшенной иммунной системой или специфическими механизмами защиты от патогенов.

Проводили большое количество исследований по отбору устойчивых форм *Pinus silvestris* на основании индивидуальной устойчивости сосны к болезням. Исследователи отмечали различную степень устойчивости отдельных деревьев к ряду патогенов, таким как *Phacidium infestans* [52], а также *Heterobasidion annosum* [53].

Одним из заметных шагов в этом направлении был проект по селекции голландского вяза под руководством Ганса Хейбука, который сыграл решающую роль в разработке научных подходов к повышению устойчивости вяза путём селекции [54]. Выявлено, что гибриды вяза приземистого с вязом обыкновенным в первом и втором поколениях проявляют гетерозис к голландской болезни ильмовых [51, 54].

Контролируемые скрещивания между *Pinus montana* var. *rostrata* (комплекс *P. mugo*) и *P. sylvestris* проведены в 1970-х гг. в Институте лесной генетики и селекции лесных деревьев (Гроссхансдорф, Германия). Они проводились для получения гибридов с превосходными эксплуатационными характеристиками и устойчивостью к *Lophodermium seditiosum*. Предполагается, что *P. montana* более устойчива к этому возбудителю, чем *P. sylvestris* [55, 56].

Еще одна инвазия вредоносного фитопатогена аскомицета *Hymenoscyphus fraxineus* (= *Chalara fraxinea*, = *H. pseudoalbidus*) (Т.Ковальски) Baral, Queloz, Hosoya, впервые выявленного в Европе в конце XX в., считается основной причиной деградации ясеневых насаждений [57, 58]. За прошедшие десятилетия по всему ареалу ясеня обыкновенного (*Fraxinus excelsior* L.) наблюдается массовое усыхание древостоев и интенсивное выпадение этого вида из состава лесных насаждений [59, 60]. Это связывают с крайне низкой устойчивостью ясеня к новому заболеванию, что возможно является свидетельством отсутствия коэволюционных связей между хозяином и возбудителем [61]. В тоже время различные природные популяции *F. excelsior* проявляют неоднородность по устойчивости к халаровому некрозу [62]. Многие исследователи и лесоводы предполагают, что для сохранения генофонда экземпляров ясеня, потенциально толерантных к возбудителю инфекционного некроза, целесообразно отбирать растения без внешних признаков поражения для биотехнических и генетических методов сохранения популяции [63, 64].

Например, в Беларуси разработана Программа повышения устойчивости, защиты и восстановления ясеневых лесов, одним из направлений которой стала селекция ясеня на устойчивость к халаровому некрозу. В природных популяциях ясеня были отобраны устойчивые экземпляры и доказана передача иммунитета вегетативному потомству, полученному методами прививок и микроклонального размножения [64].

Открытие ПЦР (полимеразной цепной реакции) в 1985 г. произвело революцию в молекулярной диагностике, позволив точно идентифицировать виды и популяции грибных патогенов путем прямого секвенирования генов рибосомальной РНК [65, 66]. Это облегчило процесс отслеживания инвазий не только самых вредоносных и очевидных патогенов.

Таким образом, развитие методов диагностики возбудителей болезней, мер борьбы с ними и карантинного законодательства происходило параллельно с возникновением вспышек массовых заболеваний и подстегивались срочной необходимостью профилактики и ограничения вредоносности инвазий.

Важным шагом в области сохранения биоразнообразия и экосистем с целью координации мер по предотвращению распространения вредителей и болезней растений стало принятие в 1951 г. Международной конвенции по защите растений (International Plant Protection Convention, IPPC) [67], где Европейская и Средиземноморская организация по защите растений, ЕОКЗР (European

and Mediterranean Plant Protection Organization, EPPO) является региональной организацией по защите растений в Европе [68].

Позже, в 1976 г. для сотрудничества в области карантинных мер и обмена информацией о вредителях и болезнях растений была создана вторая региональная организация IPPC Североамериканская организация по защите растений (NAPPO) [69].

В 1994 г. была создана Группа специалистов по инвазивным видам (The Invasive Species Specialist Group, ISSG), в настоящее время насчитывающая 40 стран-участников, которые вносят свой вклад в уменьшение влияния инвазивных чужеродных видов на природные экосистемы и местные виды [70].

В конце XX – начале XXI вв. происходит расширение международного сотрудничества в области карантинных мер, создание онлайн-ресурсов и баз данных. В период с 1998 по 2000 гг. разработана Глобальная база данных инвазивных видов (The Global Invasive Species Database, GISD), которая предоставляет контрольные списки интродуцированных (натурализованных) и инвазивных видов по странам [71, 72].

Источником актуальной информации о конкретных видах, в том числе и карантинных, их распространении, а также точных научных названиях, является Глобальный информационный фонд по биоразнообразию (GBIF), образованный в 2001 г. [73].

При поддержке Секретариата Европейской и Средиземноморской организации по карантину и защите растений (ЕОКЗР) составлена Глобальная база данных ЕОКЗР, с целью предоставления

всей информации о вредных организмах, которая произведена или собрана ЕОКЗР. Для каждого вредителя даны: географическое распространение (с картой мира), растения-хозяева и классификация (карантинный статус) [74].

Многие страны укрепляют свою правовую базу в области карантинных мер, вступают в силу новые международные нормативные акты, например, Международные стандарты по фитосанитарным мерам (ISPM) в рамках IPPC, разработанные для регулирования международной торговли растениями и растительными продуктами с целью предотвращения распространения вредных организмов.

Одним из важных изменений в области фитосанитарии была последняя правка Конвенция МСФМ 1997 г., которая предоставила официальный статус и усилила правовые обязательства стандартов, а также установила Международный комитет по фитосанитарии (ICPM) в качестве высшего органа для принятия решений по вопросам стандартов и мер по фитосанитарии [75].

Таким образом с ростом глобализации и увеличением потоков товаров и людей стали разрабатываться и приниматься меры по управлению инвазивными видами на мировом уровне, наблюдаются тенденции к объединению научного и технического потенциала разных стран для решения этой глобальной проблемы [76]. Сегодня существует ряд международных, региональных и национальных организаций, а также списков и баз данных, направленных на предотвращение распространения и управление инвазивными организмами. Это является важной частью усилий по сохранению биоразнообразия и экосистем.

ОБЪЕКТЫ (МАТЕРИАЛЫ) И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследования являлись инвазивные микромицеты, развивающиеся на древесных породах. Сбор гербарных образцов проводили в 2021–2023 гг. сотрудниками Белорусского государственного технологического университета и Института экспериментальной ботаники НАН Беларуси. Диагностика выполнена по анатомо-морфологическим и культуральным признакам методом световой микроскопии.

Молекулярно-генетическую идентификацию патогенов проводили в Научной отраслевой лаборатории защиты леса (НОЛЗЛ) БГТУ, в случаях, когда симптоматическая картина и другие методы не позволяли однозначно определить вид патогена. Использовали следующую методологическую последовательность: выделение ДНК, классическая ПЦР, секвенирование по Сенгеру,

обработка нуклеотидных последовательностей в программе BioEdit и базе данных NCBI.

Для выделения ДНК из древесины использовали как готовые коммерческие наборы, так и модифицированный СТАВ-метод [99]. С полученными препаратами суммарной ДНК проводили классическую ПЦР. Для амплификации ДНК использовали специфические праймеры, работающие по определенному целевому объекту (виду). Для каждого исследуемого объекта были заданы свои определенные температурно-временные параметры амплификации. Результаты ПЦР регистрировали после проведения электрофореза в 1,6% агарозном геле, окрашенном бромистым этидием в гель-документирующей системе. ПЦР продукты, предназначенные для секвенирования, очищали с помощью коммерче-

ских наборов на основе магнитных частиц, а также по методу колонок. Реакцию секвенирования проводили с применением реагентов BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) и BrilliantDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Nimagen) согласно инструкции производителя, с последующим разделением фрагментов на генетических анализаторах 3500 Applied Biosystems и НАНОФОР 05 [99].

Латинские названия грибов даны в соответствии с Международной глобальной базой данных Index Fungorum.

Построение прогнозов появления новых для Беларуси дендропатогенных организмов проводили методом компьютерного моделирования в среде Maxent (рис. 2) с использованием точных координат мест их находок, а также климатических условий и данных о растительном покрове территории, взятых с авторитетных интернет ресурсов (рис. 3). Для оценки важности переменной, эти данные были предварительно откорректированы.

При проведении анализа в программе Maxent заданы следующие настройки: для статистического анализа точности полученные модели проверены случайной выборкой 25% местонахождений видов, для получения оптимальных моделей выходных данных выбраны параметр сложности (regularization multiplier) и максимальное количество фоновых точек (Max number of background points), случайные подвыборки выделены на основе кроссвалидации.

При условии «Random test percentage» заданном 25% программа случайным образом отбирает 25% находок для тестирования. Это позволяет произвести статистический анализ точности с использованием общепринятых методик.



Рис. 2. Общая характеристика программы Maxent

Fig. 2. General characteristics of the Maxent program

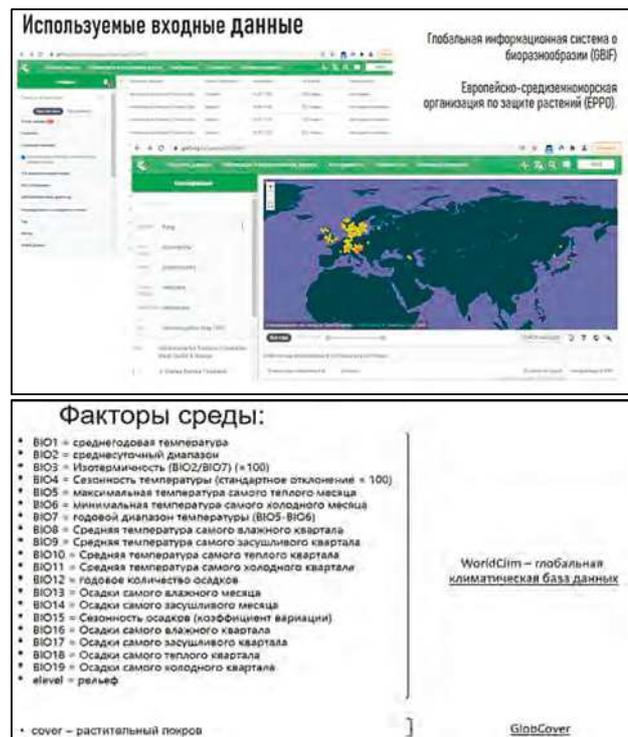


Рис. 3. Источники информации для построения модели в программе Maxent

Fig. 3. The sources of information for building a model in the Maxent program

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Аналитический обзор методов диагностики карантинных видов

Первоочередной задачей при работе с чужеродными микроорганизмами, которые являются малоизвестными на новых территориях, является их точная идентификация. Своевременная диагностика имеет первостепенное значение для последующего осуществления эффективной борьбы с болезнями и вредителями, поскольку она позволяет лучше понять потенциальное воздействие патогена на лесные экосистемы [77].

Количество биологических инвазий насекомых, растений, вирусов, грибов, бактерий, нематод и

других вредителей растет в геометрической прогрессии и их проникновение вызывает существенное нарушение лесных и агроэкосистем, а также влечет за собой серьезные социально-экономические последствия [78]. Фактически каждый год значительная часть мировых лесов уничтожается или серьезно повреждается инвазивными чужеродными патогенами и вредителями [79, 80].

Естественные леса Европы, Азии и Северной Америки особенно пострадали от инвазивных чужеродных патогенов, которые в XX в. привели

к исчезновению ключевых пород деревьев. Среди наиболее ярких исторических примеров – уничтожение каштанов чужеродным аскомицетом *Cryphonectria parasitica*, вызывающим фитофтороз каштанов; опустошительные эпидемии голландской болезни вяза, вызванные двумя чужеродными и агрессивными видами грибов *Ophiostoma ulmi* и *O. novo-ulmi*, ранее неизвестными науке; огромный ущерб, нанесенный белым соснам инвазивным возбудителем пузырчатой ржавчины сосны *Cronartium ribicola*; массовое отмирание платанов, особенно сильное в Южной Европе, вызванное заносом возбудителя язвенной болезни *Ceratocystis platani* [81].

Процесс вторжения чужеродного организма обычно состоит из четырех фаз: транспортировка, колонизация, акклиматизация и распространение [78]. Основным путем интродукции неместных патогенов растений является международная торговля растениями, в основном декоративными [82]. Одним из серьезных факторов увеличения распространения чужеродных патогенов является глобальное изменение климата. В последние годы последствия климатических изменений подвергают экосистемы стрессу, поскольку растения не успевают выработать механизмы адаптации, чтобы справиться с такими быстрыми изменениями. Благодаря взаимодействию повышения средних температур и изменения режима выпадения осадков с поведением патогенов (местных или чужеродных), у последних появляется возможность распространяться в районах, где факторы окружающей среды ранее препятствовали их интродукции. Все эти изменения серьезно влияют на взаимодействие хозяина и патогена на уровне вида древесного растения, лесной экосистемы и ландшафта [82].

Чтобы патоген стал инвазивным на новой территории, он должен преодолеть все перечисленные выше стадии (барьеры), которые сильно влияют на исход инвазии. Раннее выявление имеет решающее значение для успешного искоренения и сдерживания этих процессов. Хотя в настоящее время доступны сложные диагностические методы для наблюдения и мониторинга болезней и вредителей, в лесном хозяйстве можно использовать лишь несколько вариантов борьбы и смягчения последствий – из них биологический контроль является одним из наиболее часто применяемых [79].

Значение грибов как возбудителей болезней возрастает как у животных, так и у растений. Фишер и др. сообщили о 13-кратном увеличении числа заболеваний растений, вызываемых грибами за 15 лет во всем мире. Эту тенденцию подтверждает экспоненциальный рост количества

инвазивных грибных патогенов деревьев, который утвердился в Европе за последние 30 лет [81]. Ожидается, что эта тенденция сохранится и в будущем [83].

Для того, чтобы предотвратить и/или сократить проникновение и распространение ранее неизвестных болезней на новые территории, а также смягчить воздействие инвазивных и местных патогенных организмов в сельском и лесном хозяйстве с точки зрения воздействия, как на биоразнообразие экосистем, так и на их продуктивность необходим гармонизированный пул новых технических, методологических и концептуальных решений. Так как профилактика является одной из лучших стратегий защиты растений, необходим подбор надежных методов точной и быстрой идентификации патогенных организмов, способных перехватывать патогены древесных растений до того, как симптомы появятся у хозяина [79]. Вместе с тем при мониторинге инвазивных возбудителей болезней растений возникают дополнительные сложности:

- «непривычная» этиология и патогенез для специалистов лесного хозяйства и зеленого градостроительства;
- новые/другие симптомы и признаки болезни за пределами естественных ареалов и на новых хозяевах;
- морфологические изменения инвазивного вида в новых условиях;
- возникновение новых популяций, форм, гибридов фитопатогенов в неоареалах;
- отсутствие в регионе (стране) специалистов, имеющих опыт в диагностике определенного таксона живых организмов [80].

Далее приведен краткий обзор имеющихся на сегодняшний день методов идентификации фитопатогенных организмов, включающие как традиционные, так и современные молекулярно-генетические методы.

Классические методы диагностики возбудителей древесных растений

Некоторые возбудители болезней растений могут быть распознаны квалифицированным специалистом по симптомам или признакам, определяемым на инфицированных тканях. Однако существует множество заболеваний, симптомы которых невозможно отличить визуально друг от друга, что приводит к сложностям при проведении диагностики возбудителей. По этим причинам необходимо проведение дополнительных процедур по выявлению фитопатогенов. Во многих случаях, когда присутствие конкретного микроорганизма неизвестно, все же предпочтительным является выделение и морфологическая или молекулярная идентификация возбудителя [82].

Выделение грибных патогенов из растений обычно осуществляется путем помещения небольшой части инфицированной ткани на агаризованную питательную среду. В сложной природной среде, такой как растительные ткани, патогенные грибы представляют собой явное меньшинство среди множества разнообразных микроорганизмов, которые быстро колонизируют инфицированного хозяина. Несмотря на использование селективных сред, выделение патогенных грибов иногда затруднено из-за преобладания нежелательных и антагонистических грибов или бактерий, которые быстро размножаются по сравнению с патогенными грибами на питательной среде. Чистые (аксеничные) культуры можно идентифицировать по морфологическим признакам или молекулярно-генетическими методами. В первом случае характерные признаки гриба (например, конидиальное спороношение) анализируют с помощью микроскопа, что требует больших временных затрат и высокой квалификации специалиста. Поэтому с развитием молекулярно-генетических методов диагностики, им отдается все большее предпочтение за быстроту и точность идентификации исследуемых организмов [82].

Серологические методы

Для ускорения идентификации возбудителей растений и возможности их идентификации в полевых условиях разработан ряд серологических методов, основанных преимущественно на иммуноферментном анализе (ИФА, ELISA). Эти методы используются для обнаружения патогенов с использованием моноклональных антител, меченных флуоресцентными соединениями. Существуют различные методы иммуноанализа, основанные на визуализации связывания специфического антитела с родственным ему антигеном, позволяющие производить быструю диагностику патогенов растений за короткий промежуток времени. Основным недостатком иммунологических методов является подбор антитела, должным образом реагирующего на целевой патоген. Кроме того, высока вероятность неправильной диагностики из-за наличия ложноположительных результатов, возникающих в результате неспецифической реакции антитело-антиген. Серологические методы обнаружения фитопатогенных грибов не имеют такого успеха, как в бактериологии или вирусологии, во многом из-за высокой изменчивости и фенотипической серологической пластичности грибов. Несмотря на то, что в продаже имеется несколько портативных наборов для работы с различными патогенами, иммунологические методы, как правило,

менее чувствительны по сравнению с молекулярными методами [84].

Все разнообразие молекулярных методов можно разделить на следующие группы:

- методы на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР);
- методы изотермической амплификации;
- ДНК-фингерпринтирование;
- методы пост-амплификации;
- анализы на основе ДНК или РНК;
- классическое секвенирование;
- секвенирование нового поколения.

Методы на основе ПЦР

Классическая ПЦР. Этот метод позволяет синтезировать определенную часть ДНК в миллионах копий посредством чередующихся циклов денатурации, отжига и элонгации с использованием специфических праймеров. Данный метод широко используется для идентификации патогенов растений и зависит от эффективности экстракции ДНК и ее концентрации. Недостатком технологии ПЦР является то, что она требует разработки праймеров для инициации процесса репликации ДНК, что может ограничить практическое применение метода отбора проб болезней в полевых условиях. Однако на данный момент классическая ПЦР является самым доступным и простым способом идентификации патогенных организмов, в том числе инвазивных [85].

Иногда одна пара праймеров не дает конкретных и точных результатов. Чтобы преодолеть это ограничение, в настоящее время чаще всего используются ДНК-зонды и метод вложенной (гнездовой) ПЦР [82].

Гнездовая (вложенная) ПЦР используется для достижения высокой степени специфичности и чувствительности – вложенная ПЦР в 1000 раз чувствительнее классической ПЦР при идентификации грибов. Этот метод состоит из двух последовательных стадий, в котором на первой стадии одна пара праймеров используется для амплификации участка, содержащего целевой фрагмент ДНК, на второй стадии эта амплифицированная последовательность ДНК действует как мишень с использованием двух внутренних праймеров. В этом типе ПЦР отмечается значительный риск загрязнения, поскольку два цикла амплификации необходимо выполнять в отдельных пробирках. В связи с этим, вероятность получения ложноположительных результатов из-за загрязнения и интенсивной работы являются основными недостатками этого метода [85].

Еще одной разновидностью ПЦР является мультиплексная ПЦР, которая предусматривает использование нескольких пар праймеров в од-

ной реакции, что позволяет одновременно обнаруживать различные целевые последовательности ДНК, тем самым экономя временные и денежные затраты. Этот метод имеет большое значение при патологии растений, когда возбудителем инфекционной болезни растения является комплекс патогенов. При мультиплексной ПЦР на точность синтеза ДНК сильно влияет размер ампликона, поэтому праймеры должны быть разработаны с учетом их относительной концентрации и температуры отжига. В настоящее время в комплексной методике идентификации патогенных грибов используются специальные ПЦР-зонды [85].

ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). Важным ограничением всех молекулярных методов является неспособность различать живые и мертвые грибы или грибные структуры в препаратах суммарной ДНК. Поэтому результаты обнаружения и идентификации грибных возбудителей растений должны быть подтверждены тестами на патогенность. Поскольку мРНК (матричная РНК) быстро разлагается в мертвых клетках, ее обнаружение с помощью ОТ-ПЦР считается точным индикатором жизнеспособности клеток. При ОТ-ПЦР РНК подвергается обратной транскрипции с использованием фермента обратной транскриптазы. Затем полученную комплементарную ДНК амплифицируют с использованием обычного или любого другого метода, основанного на ПЦР. Наиболее частым применением этого метода в фитопатологии является анализ экспрессии генов растений и грибов во время развития заболевания [84].

ПЦР в реальном времени. В настоящее время данный метод считается золотым стандартом обнаружения патогенов растений. Этот метод позволяет контролировать реакцию во время процесса амплификации с помощью флуоресцентного сигнала, который увеличивается пропорционально количеству генерируемых ампликонов и количеству мишеней, присутствующих в образце. ПЦР в реальном времени имеет множество преимуществ по сравнению с обычной ПЦР, т.к. эта система не требует использования пост-ПЦР-обработки (например, электрофореза), что позволяет избежать риск загрязнения, а также снизить трудовые и материальные затраты на анализ. Помимо повышенной чувствительности и специфичности, этот метод позволяет точно определить количество целевого патогена путем интерполяции измеренного количества на стандартную кривую с известным количеством целевых копий. Эта количественная характеристика очень полезна в фитопатологии, т.к. позволяет сопоставить количество грибов в биологическом

образце с состоянием болезни или отслеживать развитие болезни у зараженного растения. Еще одним преимуществом ПЦР в реальном времени является возможность мультиплексного обнаружения двух или более патогенов в пределах одной реакции [84–87].

Методы изотермической амплификации

Петлевая изотермическая амплификация (LAMP)-метод, при котором используется набор из шести олигонуклеотидных праймеров с восемью сайтами связывания, специфически гибридуемых с различными областями целевого гена, и термофильную ДНК-полимеразу, выделенную из бактерии *Geobacillus stearothermophilus* для амплификации ДНК. Этот метод позволяет специфически амплифицировать целевую ДНК, используя только нагретый блок, менее чем за 1 ч. Продукты амплификации можно обнаружить непосредственно путем визуального осмотра во флаконах с использованием асимметричного цианинового красителя или путем измерения повышенной мутности (из-за выделения большого количества пирофосфата магния), а также с помощью электрофореза на агарозном геле. Метод LAMP подходит для полевых испытаний и потенциально полезен для лабораторий, не имеющих оборудования для ПЦР [85]. Этот изотермический метод применялся для детекции *Fusarium graminearum* в зараженных семенах пшеницы (Abd-Elsalam et al., 2011), а также для выявления таких инвазивных видов как *Phytophthora ramorum* и *P. kernoviae* в экспериментальных образцах (Tomlinson et al., 2007, 2010) [88–93].

ДНК-фингерпринтирование

Позволяет проводить скрининг случайных участков грибного генома для выявления видоспецифичных последовательностей, когда консервативные гены не имеют достаточной изменчивости для успешной идентификации вида. Данный метод обычно используется для изучения филогенетической структуры популяций грибов. Однако он также оказался полезным для идентификации специфических последовательностей, используемых для обнаружения грибов на очень низком таксономическом уровне и может быть использован для дифференциации штаммов одного и того же вида с разным диапазоном хозяев, вирулентностью, группой совместимости или типом спаривания [84].

Полиморфизм длин рестриционных фрагментов (ПДРФ, RFLP). ПДРФ включает расщепление ДНК патогена рестриционными ферментами с последующим разделением фрагментов электрофорезом в агарозном или полиакриламидном геле для выявления различий в размерах фрагментов

ДНК. Полиморфизмы сайтов расщепления рестриктазами используются для различения видов грибов и сочетает в себе амплификацию целевой области с дальнейшим расщеплением полученных ПЦР-продуктов. Примером использования ПДРФ-метода при изучении фитопатогенных грибов может служить использование специфичных для рода *Phytophthora* праймеров в ходе амплификации и при дальнейшем расщеплении полученных ампликонов, позволивший получить специфический паттерн рестрикции для 27 различных видов *Phytophthora* [84, 90–91].

Случайно амплифицированная полиморфная ДНК (RAPD)-метод, основанный на ПЦР-амплификации генома патогена с использованием коротких произвольных последовательностей (обычно декамеров), которые используются в качестве праймеров. Полученные ПЦР-фрагменты разделяют на электрофореze для получения светящихся фракций, по которым можно отличить виды или даже штаммы грибов. Некоторые из конкретных фрагментов ДНК, обнаруженных в профиле, можно вырезать из геля и секвенировать для получения последовательности амплифицированной области, на основании которой можно сконструировать специфические праймеры для более точного обнаружения при помощи обычной ПЦР. Например, такие специфические праймеры использовались для идентификации таких видов фитопатогенных грибов как *Phytophthora cactorum*, *Fusarium subglutinans* и *Guignardia citricarpa* [84]. Данный метод является простым, недорогим и не требует каких-либо предварительных знаний о последовательности ДНК целевого организма. К недостаткам RAPD-анализа можно отнести следующие: используемые маркеры являются доминантными, поэтому они не могут измерить генетическое разнообразие, на которое влияет количество аллелей в локусе, а также невозможно дифференцировать гомозиготных и гетерозиготных особей [84, 86].

Амплифицированный полиморфизм длины фрагментов (AFLP) заключается в использовании ферментов рестрикции для расщепления всей геномной ДНК с последующим лигированием специфичных для половины сайтов рестрикции адаптеров ко всем фрагментам рестрикции. После расщепления проводят селективную амплификацию этих рестрикционных фрагментов с помощью ПЦР-праймеров, имеющих на 3'-конце соответствующую адаптерную последовательность и селективные основания. Технология AFLP позволяет одновременно амплифицировать от 50 до 100 фрагментов и обнаруживать различные полиморфизмы в разных областях генома. Как и в случае с другими мето-

дами, для амплификации не требуется никакой предварительной информации о последовательности. Недостатками AFLP являются то, что для его постановки требуется ДНК с высокой молекулярной массой, а также больше технических знаний, чем при RAPD-методе [84, 94].

Микросателлиты, также известные как повторы простых последовательностей (SSR) или короткие tandemные повторы (STR), представляют собой участки из одного-шести нуклеотидов, повторяющиеся несколько раз во всех геномах эукариот (обычно в некодирующих областях). Эти нуклеотидные единицы могут различаться по количеству повторов у разных индивидов, и их распределение в геноме практически случайно. Используя праймеры, фланкирующие такие вариабельные области, можно получить ПЦР-продукты различной длины. Таким образом, микросателлиты представляют собой универсальные генетические маркеры, которые широко используются для фингерпринтинга ДНК. Преимущества SSR заключаются в том, что они мультиаллельны, кодоминантны, высоко полиморфны и доступны несколько тысяч потенциально полиморфных маркеров. Более того, возможен анализ образцов с ограниченным количеством ДНК или деградированной ДНК с высокой воспроизводимостью. Микросателлиты имеют высокую скорость мутаций и способны приобретать и терять повторяющиеся единицы за счет проскальзывания репликации ДНК – механизма мутации, специфичного для tandemно повторяющихся последовательностей. Однако при использовании микросателлитов для популяционно-генетического анализа могут возникнуть некоторые трудности. К другим недостаткам SSR можно отнести необходимость наличия предварительной информации о последовательности ДНК фланкирующих областей, высокую стоимость такого анализа и низкую производительность из-за трудностей автоматизации и управления данными [84].

Методы пост-амплификации

ДНК-микрочип-технология, позволяющая анализировать тысячи мРНК одновременно и использовать их для наблюдения за изменениями в экспрессии генов. Этот метод отличается от описанных выше тем, что он обеспечивает измерение экспрессии определенных наборов генов. Используя этот метод, можно достичь полного понимания клетки гриба на одном массиве данных. Метод микрочипов очень прост в использовании, поскольку не требует крупномасштабного секвенирования ДНК. Несмотря на то, что этот метод позволяет отслеживать глобальные изменения в экспрессии генов, есть определенные не-

достатки в его применении. Во-первых, для этого метода требуется большое количество мРНК. Во-вторых, такие исследования отличаются высокой стоимостью и труднодоступностью. Эта технология называется деструктивным тестированием, поскольку для получения доступа к моделям экспрессии генов необходимо физическое разрушение клеток, поэтому в результате деградации мРНК могут быть получены ложные данные. В молекулярной фитопатологии технология микрочипов была применена для идентификации вида *Aspergillus candida* [85].

Макрочипы ДНК. Создаются путем разработки видоспецифичных олигонуклеотидов, которые размещаются в луночных планшетах и фиксируются на нейлоновой или нитроцеллюлозной мембране. Благодаря данному методу можно обнаружить гибридизацию олигонуклеотида при амплификации и меченную целевую ДНК-последовательность. Макрочип является надежным и эффективным методом при диагностике комплексов патогенов. Существенными недостатками данного метода являются невозможность количественной оценки патогенов и определение принадлежности обнаруженной ДНК к живому организму [95, 96].

Анализ на основе ДНК или РНК

Гибридизация *in situ*. Метод гибридизации *in situ* (ISH) предназначен для обнаружения генетического материала (РНК или ДНК), присутствующего в фиксированном образце. Разработка зонда нуклеиновой кислоты, направленного на связывание с целевой последовательностью РНК или ДНК, является основным этапом этого анализа. Однако также можно использовать синтетические олигонуклеотидные зонды и зонды кДНК. При данном методе зонды метят радиоактивными изотопами ³⁵S, ¹²⁵I и ³²P для маркировки, поскольку они очень чувствительны и их легко определить количественно. ISH позволяет максимально использовать ткани, которые являются трудноисследуемыми, но основными ограничениями ISH являются высокая стоимость и опасность использования радиоактивных зондов, а также сложность идентификации при низких концентрациях ДНК и РНК [96].

Флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH). Сравнительно недавняя и инновационная технология диагностики болезней растений. Гибридизация фиксированных грибов с флуоресцентно мечеными олигонуклеотидными зондами, которые комплементарны уникальным целевым участкам на рибосомальной РНК, позволяет проводить прямую микроскопическую визуализацию без предварительных этапов амплификации. Основными преимуществами данного метода яв-

ляются воспроизводимость, чувствительность, специфичность, точность и скорость обнаружения. Также при данном методе возможна идентификация основных патогенов в образцах смешанных видов. Однако ложноположительные результаты при использовании автофлуоресцентных материалов являются распространенной ошибкой, снижающей специфичность анализа [96].

Классическое секвенирование заключается в ПЦР-амплификации целевого гена с помощью универсальных праймеров с последующим секвенированием и сравнением с общедоступными базами данных. Следует отметить, что при помощи методов секвенирования было описано большое количество новых видов грибов. Однако использование баз данных последовательностей для идентификации организмов на основе сходства ДНК может иметь некоторые ограничения, такие как ошибочные и неполные последовательности, принадлежности другим видам организмов, невозможность легкого изменения или обновления данных, а также проблемы, связанные с определением границ видов, приводящие к ошибочной интерпретации результатов поиска. Другим ограничением секвенирования как диагностического инструмента является необходимость секвенировать более одного локуса для обеспечения надежности результата, а также непрактичность этого метода в случаях, когда необходимы быстрые результаты, например, для контроля и/или борьбы с серьезными вспышками болезней растений. Тем не менее, увеличение возможностей секвенирования и снижение затрат позволили накопить большое количество последовательностей грибов в общедоступных базах данных, а последовательности выбранных генов широко используются для идентификации специфических патогенов и разработки диагностических методов на основе секвенирования [84].

Секвенирование нового поколения

Развитие технологий секвенирования нового поколения (NGS) или высокопроизводительного секвенирования (HTS) способствовало развитию инновационных способов обнаружения и идентификации фитопатогенов. Выделение и фрагментация ДНК, подготовка библиотеки, массовое параллельное секвенирование, биоинформатический анализ, а также аннотация и интерпретация вариантов/мутаций являются основными этапами NGS на основе ДНК. Массивно-параллельное сигнатурное секвенирование, пиросеквенирование, полноэкзомное секвенирование и секвенирование с помощью обнаружения лигирования олигонуклеотидов (SOLID) – это некоторые широкодоступные передовые методы секвениро-

вания в HTS. Секвенирование РНК (RNA-Seq) обеспечивает расширенный охват и лучшее разрешение динамической природы транскриптома. Платформа Illumina HiSeq является наиболее универсальной платформой NGS для секвенирования РНК и установила стандарт для NGS.

NGS на основе RNA-Seq можно использовать для быстрой идентификации грибных патогенов растений, вызывающих новые заболевания. Наборы данных популяционной геномики, построенные на основе NGS, можно использовать для восстановления вариаций, включая однонуклеотидные полиморфизмы (SNP), инсерции и делеции, и другие структурные вариации [96].

Таким образом, последние достижения в области молекулярно-биологических методов позволили улучшить обнаружение и диагностику

новых, ранее зарегистрированных и вновь появляющихся фитопатогенов. Традиционные и варианты анализы на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР), изотермические инструменты и инструменты постаmplификации, методы гибридизации и подходы секвенирования нового поколения (NGS) широко используются при диагностике фитозаболеваний. Однако, несмотря на высокую достоверность и точность при идентификации фитопатогенных организмов, инструменты молекулярной диагностики должны быть дополнены другими методами, в т.ч. традиционными культуральными, что позволит комплексно подойти к диагностике и защите лесных древесных растений как от имеющихся вредителей и болезней, так и от чужеродных патогенных организмов.

Результаты рекогносцировочных работ и диагностики чужеродных видов

Рекогносцировочные работы в Белорусском Полесье проведены на территории Гомельского, Столинского, Мозырского, Лунинецкого, Пинского, Ивацевичского лесхозов, НП «Припятский», а также в исторических дендропарках XVIII–XIX вв. Для сравнительного анализа обследованиями охвачены растительные объекты центральной лесорастительной подзоны (Осиповичский опытный и Негорельский учебно-опытный лесхозы) и северной лесорастительной подзоны (Лепельский лесхоз и НП «Браславские озера»).

Обследовали насаждения лиственных пород и отдельные древесные растения с симптомами и признаками болезни в соответствии с методиками, принятыми в защите леса [97]. Описывали патологическую картину, категорию состояния растений по «Санитарным правилам в лесах Республики Беларусь», отбирали образцы инфицированных органов и тканей для составления гербария и диагностики патологии.

Проведенная ревизия видового состава микобиоты растений в лесных питомниках, культурах и насаждениях показала наибольшую частоту встречаемости следующих видов фитопатогенных организмов с подтвержденным или обсуждаемым инвазивным статусом.

На хвойных породах:

1. *Cyclaneusma minus* (Butin) DiCosmo, Peredo & Minter, Eur. J. For. Path. 13(4): 208 (1983);
2. *Dothistroma septosporum* (Dorog.) M. Morelet, Bull. Soc. Sci. nat. Arch. Toulon et du Var 177: 9 (1968);
3. *Gymnosporangium tremelloides* R. Hartig, Lehrb. Baumkrankh.: 55 (1882);
4. *Lophodermium conigenum* (Brunaud) Hiltzer, Věd. Spisy čsl. Akad. zeměd. 3: 76 (1929) (инвазивный статус уточняется);
5. *Ophiostoma polonicum* Siemaszko, Planta Pol. 7(3): 33 (1939);

6. *Passalora juniperina* (Georgescu & Badea) H. Solheim, Agarica 33: 78 (2013);
7. *Pestalotiopsis funerea* (Desm.) Steyaert, Bull. Jard. bot. État Brux. 19(3): 340 (1949);
8. *Rhizosphaera kalkhoffii* Bubák, Ber. dt. bot. Ges. 32: 190 (1914);
9. *Sphaeropsis sapinea* (Fr. ex. Fr.) Dyko et Sutton in Sutton, The Coelomycetes (Kew): 120 (1980) (инвазивный статус уточняется [98]);
10. *Stigmina deflectens* (P. Karst.) M.B. Ellis, Mycol. Pap. 72: 63 (1959);
11. *Coleosporium complex* (видовой и инвазивный статус уточняется);
12. *Phoma complex* (видовой и инвазивный статус уточняется).

На лиственных породах встречаются следующие виды инвазивных дендропатогенных организмов:

1. *Hymenoscyphus fraxineus* (T. Kowalski) Baral, Queloz & Hosoya, IMA Fungus 5(1): 79 (2014) (анаморфная стадия *Chalara fraxinea* T. Kowalski, For. Path. 36(4): 264 (2006);
2. *Erysiphe alphitoides* (Griffon & Maubl.) U. Braun & S. Takam., Schlechtendalia 4: 5 (2000);
3. *Erysiphe flexuosa* (Peck) U. Braun & S. Takam., Schlechtendalia 4: 19 (2000);
4. *Cytospora chrysosperma* (Pers.) Fr., Sylv. mycol. berol. (Berlin): 28 (1818);
5. *Gymnosporangium sabiniae* (Dicks.) G. Winter, Pilze Deutschl. 1: 232 (1884);
6. *Melampsorium betulinum* (Pers.) Kleb., Z. PflKrankh. PflPath. PflSchutz 9: 21 (1899);
7. *Melampsorium hiratsukanum* S. Ito ex Hirats. f., J. Fac. agric., Hokkaido Imp. Univ., Sapporo 21: 10 (1927);
8. *Neofabraea alba* (E.J. Guthrie) Verkley, Stud. Mycol. 44: 125 (1999);
9. *Ophiostoma ulmi* (Buisman) Nannf., in Melin & Nannfeldt, Svensk Skogsvårdsförening Tidskr. 3-4: 408 (1934);

10. *Pestalotiopsis funerea* (Desm.) Steyaert, Bull. Jard. bot. État Brux. 19(3): 340 (1949);

11. *Phyllosticta paviae* Desm., Annls Sci. Nat., Bot., sér. 3 8: 32 (1847);

12. *Phytophthora alni* Brasier & S.A. Kirk, in Brasier, Kirk, Delcan, Cooke, Jung & Man in't Veld, Mycol. Res. 108(10): 1174 (2004).

Также зафиксировано развитие бактерии *Erwinia amylovora* (Burrill 1882) Winslow et al.

Недавно появившийся в стране вид *Melampsorium hiratsukanum* S. Ito ex Hirats. f., J. Fac. agric., Hokkaido Imp. Univ., Sapporo 21: 10 (1927) выявлен на двух видах ольхи *Alnus glutinosa* и *A. incana*. Патоген обнаружен в северной и южной геоботанических подзонах страны на территории Витебской, Минской и Брестской областей, что подтверждается методом молекулярного анализа.

Ревизия видового состава микобиоты в дендропарках и дендрариях Министерства лесного хозяйства Беларуси, показала, что имеются очаги развития инвазивных фитопатогенных организмов. Далее приведен перечень выявленных видов:

Ascochyta syringae Bres.;

Ascochyta tenerrima Sacc. & Roum.;

Capnophialophora pinophila (Nees) Borowska;

Ceratocystis ulmi (Buism.) Moreau (*Ophiostoma ulmi*);

Cercospora ligustrina Boerema;

Coleosporium complex;

Colletotrichum exiguum Penz. et Sacc.;

Coniothyrium australe Sacc.;

Diaporthe oncostoma (Duby);

Diplodia taxi (Sowerby) De Not.;

Dothidella juniperi (Desm.) Höhn. (*Phoma juniperi*);

Dothistroma septosporum (Dorog.) M. Morelet;

Erysiphe alphitoides (Griffon & Maubl.) U. Braun & S. Takam.;

Erysiphe flexuosa (Peck) U. Braun & S. Takam.;

Erysiphe palczewskii (Jacz.) U. Braun & S. Takam.;

Erysiphe syringae Schwein.;

Guignardia aesculi (Peck) V. B. Stewart (*Phyllosticta paviae*);

Gymnosporangium sabinae (Dicks.) G. Winter;

Gymnosporangium tremelloides R. Hartig;

Hymenoscyphus fraxineus (T. Kowalski) Baral, Queloz & Hosoya;

Lachnellula willkommii (R. Hartig) Dennis;

Lirula nervisequa (DC.) Darker;

Melampsorium hiratsukanum S. Ito ex Hirats.;

Metadiplodia thujae (Westend.) Zambett.;

Microsphaera jaczewskii U. Braun;

Mycosphaerella patouillardii (Sacc.) Maire & Werner;

Neofusicoccum ribis (Slippers, Crous & M.J. Wingf.) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips (*Septomyxa aesculi*);

Ophiognomonia leptostyla (Fr.) Sogonov (*Marssonina juglandis*);

Ophiostoma complex;

Passalora juniperina (Georgescu & Badea) H. Solheim (*Asperisporium juniperinum*);

Pestalotiopsis funerea (Desm.) Steyaert;

Phomopsis velata (Sacc.) Traverso;

Phyllosticta spiraeina Brun.;

Plagiostoma aesculi (Fuckel) Sogonov (*Cryptodiaporthe aesculi*);

Podosphaera minor Home.;

Pratylenchus penetrans (Cobb) Filip. Et Sch. Stekh.;

Pseudoidium hortensiae (Jørst.) U. Braun & R.T.A. Cook;

Pseudomonas sp.;

Pseudonectria buxi (DC.) Seifert, Gräfenhan & Schroers (*Volutella buxi*);

Ramularia spiraeae Peck;

Rhabdocline laricis (Vuill.) J.K. Stone (*Meria laricis*);

Septoria aesculina Thüm.;

Septoria astragali f. *robiniae* Nagorny;

Septoria cydoniae Fuckel;

Septoria guevillensis Sacc.;

Septoria hippocastani Berk. et Broome;

Septoria ligustri (Roberge ex Desm.) J. Kickx f.;

Sphaeloma symphoricarpi Barrus & Horsfall;

Sphaeropsis sapinea (Fr.) Dyko & B. Sutton.;

Sydowia polyspora (Bref. & Tavel) E. Müll.

(*Sclerophoma pityophila*);

Trichocladia coluteae f. *caraganae* Jacz.;

Uromyces caraganae (Thüm.) Magnus;

Valsa cypri (Tul.) Tul. & C. Tul.

В табл. 1 приведен перечень наиболее распространенных в лесном хозяйстве и озеленении заболеваний, вызываемых инвазивными микромицетами.

Проводились также исследования по выделению в культуру штаммов патогенов, с наибольшей скоростью распространения и натурализации, как представляющих наибольшую опасность для древесных пород в Беларуси – *Phytophthora alni*, *Hymenoscyphus fraxineus* и *Melampsorium hiratsukanum*.

Молекулярно-генетическую идентификацию патогена проводили в случаях, когда симптоматическая картина и другие методы не позволяли однозначно определить вид патогена. Использовали следующую методологическую последовательность: выделение ДНК, классическую ПЦР, секвенирование по Сенгеру, обработка нуклеотидных последовательностей в программе Sequencing Analysis v6.0 и базе данных NCBI [99]. Результаты работы представлены в табл. 2.

Как видно из табл. 2 при обследовании выявлено 46 растительных объектов трех лиственных пород, на которых диагностировали различными методами 3 инвазивных фитопатогена. Два патогена (*Phytophthora alni* и *Hymenoscyphus fraxineus*) являются карантинными для страны. Таким образом, на основе их широкой встречаемости в Белорусском Полесье и других регионах страны, можно констатировать, что 3 инвазивных вида фитопатогенов, принадлежащих к различным таксономическим группам (оомицет, базидиомицет и аскомицет) натурализовались в лесных экосистемах Беларуси. Эколого-экономические

последствия инвазии *Phytophthora alni* и *Melampsorium hiratsukanum* еще не выявлены, но предварительный анализ фитосанитарных рисков по первому из них показывает высокую потенциальную вредоносность инвазии.

Последствия внедрения *Hymenoscyphus fraxineus* уже известны. Только по официальным данным лесного кадастра на начало 2023 г. мы потеряли 52% ясеневых насаждений (рис. 4).

Принимая во внимание 10-летний интервал лесостроительных циклов данная информация отстает от реальной картины примерно на 5–7 лет. Следовательно, с учетом наметившегося тренда можно предполагать, что к погибшим насаждениям относятся от 3/4 до 4/5 ясенников страны.

Выборочные рекогносцировочные обследования ясенников в 2023 г. подтверждают эту ситуацию. Например, во всех обследованных ясенниках Столинского, Осиповичского, Лепельского лесхозов и НП «Припятский» не подтвердилось наличие запасов ясеневой древесины, достаточных, для включения ясеня в качестве главной породы (рис. 5). В большинстве случаев ясень выпал из состава первого яруса насаждений или представлен там единичными экземплярами (рис. 6). Это также является ценной информацией, т.к. единичные экземпляры, пережившие порядка 20 лет инвазии, являются потенциальными носителями генов устойчивости и могут быть использованы для дальнейшей селекции

Таблица 1. Наиболее распространенные болезни, вызванные инвазивными видами патогенных организмов в Беларуси

Table 1. The most common diseases caused by invasive species of pathogenic organisms in Belarus

Болезнь	Возбудитель	Древесное растение-хозяин
Опасные болезни		
Мучнистая роса листьев дуба	<i>Erysiphe alphitoides</i> (Griffon & Maubl.) U. Braun & S. Takam.	Дуб
Халаровый некроз ясеня	<i>Hymenoscyphus fraxineus</i> (T. Kowalski) Baral, Queloz & Hosoya	Ясень
Дотистромоз хвои*	<i>Dothistroma septosporum</i> (<i>Mycosphaerella pini</i>)	Сосна
Ржавчина листьев	<i>Gymnosporangium sabiniae</i> (Dicks.) G. Winter	Груша, можжевельник
Ржавчина листьев	<i>Gymnosporangium tremelloides</i> R. Hartig	Яблоня, можжевельник
Шютте пихты	<i>Lirula nervisequa</i> (DC.) Darker	Пихта
Фомоз тиса	<i>Dothidella juniperi</i> (Desm.) Höhn. (<i>Phoma juniperi</i> (Desm.) Sacc.	Тис ягодный
Усыхание ветвей кипариса и кипарисовика	<i>Diplodia taxi</i> (Sowerby) De Not.	Кипарисовик
Усыхание ветвей туи	<i>Metadiplodia thujae</i> (Westend.) Zambett.	Туя западная, туя восточная.
Диплодиоз	<i>Sphaeropsis sapinea</i> (Fr.) Dyko & B. Sutton.	Сосна, ель
Шютте лиственницы	<i>Rhabdochline laricis</i> (Vuill.) J.K. Stone (<i>Meria laricis</i> Vuil.)	Лиственница
Потенциально опасные болезни		
Песталоциевое усыхание	<i>Pestalotiopsis funerea</i> (Desm.) Steyaert	Туя, тис, псевдотсуга
Ступенчатый рак	<i>Lachnellula willkommii</i> (R. Hartig) Dennis, (<i>Dasyscyphus willkommii</i> (R. Hartig) Rehm)	Лиственница, ель
Офиостомоз	<i>Ophiostoma complex</i>	Ель, сосна, лиственница
Склерофомоз	<i>Sydowia polyspora</i> (Bref. & Tavel) E. Müll. (<i>Sclerophoma pityophila</i> (Corda) Hohn.)	Сосна, ель, можжевельник
Ржавчина хвои	<i>Coleosporium complex</i>	Сосна
Некроз ветвей акации	<i>Diaporthe oncostoma</i> (Duby)	Акация желтая
Сосудистый микоз ильмовых пород	<i>Ceratocystis ulmi</i> (Buism.) Moreau (<i>Ophiostoma ulmi</i>)	Вяз, ильм, берест
Мучнистая роса листьев каштана	<i>Erysiphe flexuosa</i> (Peck) U. Braun & S. Takam.	Каштан конский
Мучнистая роса листьев акации	<i>Erysiphe palczewskii</i> (Jacz.) U. Braun & S. Takam.	Акация желтая
Ржавчина ольхи	<i>Melampsorium hiratsukanum</i> S. Ito ex Hirats.	Ольха
Усыхание каштана нематодное	<i>Pratylenchus penetrans</i> (Cobb) Filip. Et Sch. Stekh	Каштан конский
Малоопасные болезни		
Септориоз каштана	<i>Septoria aesculina</i> Thüm. и <i>S. hippocastani</i> Berk. et Broome	Каштан конский
Бурая пятнистость каштана	<i>Coniothyrium australe</i> Sacc.	Каштан конский

Таблица 2. Результаты идентификации инвазивных организмов, выделенных из тканей ольхи и ясеня (жирным шрифтом выделены патогены, находки которых подтверждены молекулярно-генетическими методами)

Table 2. Results of identification of invasive organisms isolated from alder and ash tissues (pathogens whose findings were confirmed by molecular genetic methods are highlighted in bold)

№ образца	Происхождение	Пораженное растение	Болезнь	Возбудитель
14.1	Гомельский лесхоз	<i>Alnus glutinosa</i>	фитофтороз	<i>Phytophthora alni</i>
21.2	Столинский лесхоз	<i>Alnus glutinosa</i>	фитофтороз	<i>Phytophthora alni</i>
22.3	Столинский лесхоз	<i>Alnus glutinosa</i>	фитофтороз	<i>Phytophthora alni</i>
22.4	Осиповичский лесхоз	<i>Alnus glutinosa</i>	фитофтороз	<i>Phytophthora alni</i>
22.5	Осиповичский лесхоз	<i>Alnus glutinosa</i>	фитофтороз	<i>Phytophthora alni</i>
22.6	НП «Браславские озера»	<i>Alnus glutinosa</i>	фитофтороз	<i>Phytophthora alni</i>
22.6	НП «Браславские озера»	<i>Alnus glutinosa</i>	фитофтороз	<i>Phytophthora alni</i>
22.8	НП «Браславские озера»	<i>Alnus glutinosa</i>	фитофтороз	<i>Phytophthora alni</i>
22.9	НП «Браславские озера»	<i>Alnus incana</i>	фитофтороз	<i>Phytophthora alni</i>
22.10	НП «Браславские озера»	<i>Alnus incana</i>	фитофтороз	<i>Phytophthora alni</i>
22.11	НП «Браславские озера»	<i>Alnus incana</i>	фитофтороз	<i>Phytophthora alni</i>
22.12	НП «Браславские озера»	<i>Alnus glutinosa</i>	фитофтороз	<i>Phytophthora alni</i>
22.13	НП «Браславские озера»	<i>Alnus glutinosa</i>	фитофтороз	<i>Phytophthora alni</i>
22.14	НП «Браславские озера»	<i>Alnus glutinosa</i>	фитофтороз	<i>Phytophthora alni</i>
22.15	НП «Браславские озера»	<i>Alnus glutinosa</i>	фитофтороз	<i>Phytophthora alni</i>
22.16	НП «Браславские озера»	<i>Alnus incana</i>	фитофтороз	<i>Phytophthora alni</i>
23.1	Осиповичский лесхоз	<i>Fraxinus excelsior</i>	халаровый некроз	<i>Hymenoscyphus fraxineus</i>
23.2	Осиповичский лесхоз	<i>Alnus glutinosa</i>	ржавчина листьев	<i>Melampsorium hiratsukanum</i>
23.3	Осиповичский лесхоз	<i>Alnus glutinosa</i>	ржавчина листьев	<i>Melampsorium hiratsukanum</i>
23.4	Осиповичский лесхоз	<i>Alnus glutinosa</i>	фитофтороз	<i>Phytophthora alni</i>
23.5	Осиповичский лесхоз	<i>Alnus glutinosa</i>	фитофтороз	<i>Phytophthora alni</i>
23.6	Лунинецкий лесхоз	<i>Alnus glutinosa</i>	фитофтороз	<i>Phytophthora alni</i>
23.7	Лунинецкий лесхоз	<i>Alnus glutinosa</i>	фитофтороз	<i>Phytophthora alni</i>
23.8	Лунинецкий лесхоз	<i>Alnus glutinosa</i>	фитофтороз	<i>Phytophthora alni</i>
23.9	Лунинецкий лесхоз	<i>Alnus glutinosa</i>	фитофтороз	<i>Phytophthora alni</i>
23.10	Столинский лесхоз	<i>Fraxinus excelsior</i>	халаровый некроз	<i>Hymenoscyphus fraxineus</i>
23.11	Столинский лесхоз	<i>Fraxinus excelsior</i>	халаровый некроз	<i>Hymenoscyphus fraxineus</i>
23.12	Столинский лесхоз	<i>Fraxinus excelsior</i>	халаровый некроз	<i>Hymenoscyphus fraxineus</i>
23.13	Столинский лесхоз	<i>Alnus glutinosa</i>	фитофтороз	<i>Phytophthora alni</i>
23.14	Мозырский лесхоз	<i>Fraxinus excelsior</i>	халаровый некроз	<i>Hymenoscyphus fraxineus</i>
23.15	Пинский лесхоз	<i>Fraxinus excelsior</i>	халаровый некроз	<i>Hymenoscyphus fraxineus</i>
23.16	Пинский лесхоз	<i>Fraxinus excelsior</i>	халаровый некроз	<i>Hymenoscyphus fraxineus</i>
23.17	Негорельский лесхоз	<i>Fraxinus excelsior</i>	халаровый некроз	<i>Hymenoscyphus fraxineus</i>
23.18	Негорельский лесхоз	<i>Fraxinus excelsior</i>	халаровый некроз	<i>Hymenoscyphus fraxineus</i>
23.19	Негорельский лесхоз	<i>Fraxinus excelsior</i>	халаровый некроз	<i>Hymenoscyphus fraxineus</i>
23.20	Лепельский лесхоз	<i>Alnus incana</i>	фитофтороз	<i>Phytophthora alni</i>
23.21	Лепельский лесхоз	<i>Fraxinus excelsior</i>	халаровый некроз	<i>Hymenoscyphus fraxineus</i>
23.22	Лепельский лесхоз	<i>Fraxinus excelsior</i>	халаровый некроз	<i>Hymenoscyphus fraxineus</i>
23.23	Ивацевичский лесхоз	<i>Fraxinus excelsior</i>	халаровый некроз	<i>Hymenoscyphus fraxineus</i>
23.24	НП «Браславские озера»	<i>Alnus incana</i>	фитофтороз	<i>Phytophthora alni</i>
23.25	НП «Браславские озера»	<i>Alnus glutinosa</i>	фитофтороз	<i>Phytophthora alni</i>
23.26	НП «Браславские озера»	<i>Alnus glutinosa</i>	фитофтороз	<i>Phytophthora alni</i>
23.27	НП «Браславские озера»	<i>Alnus glutinosa</i>	фитофтороз	<i>Phytophthora alni</i>
23.28	НП «Браславские озера»	<i>Alnus glutinosa</i>	ржавчина листьев	<i>Melampsorium hiratsukanum</i>
23.29	НП «Браславские озера»	<i>Alnus glutinosa</i>	ржавчина листьев	<i>Melampsorium hiratsukanum</i>
23.30	НП «Браславские озера»	<i>Alnus incana</i>	фитофтороз	<i>Phytophthora alni</i>

ясеня с целью восстановления этой лесной формации. На обследованных площадях подрост ясеня в значительной мере является неблагонадежным вследствие пораженности некрозом и потрав дикими копытными животными. Однако доля потенциально устойчивых экземпляров среди молодых растений выше, чем в первом ярусе. Возможно, это является свидетельством адаптации и естественного отбора в популяции ясеня по отношению к новой угрозе.

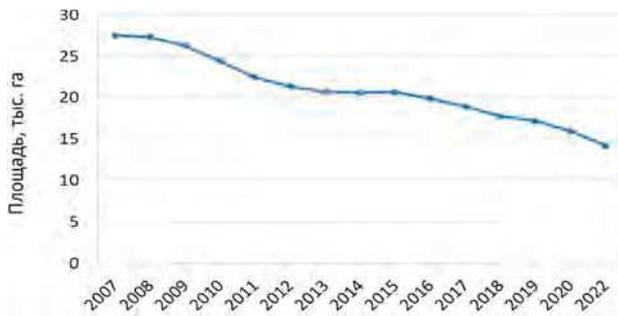


Рис. 4. Динамика площади ясеневых лесов в Беларуси

Fig. 4. Dynamics of the area of ash forests in Belarus

Только прямой ущерб в ясеневых насаждениях, рассчитанный на основе потерь ценной деловой древесины этого вида [100], составляет

около 6,4 млн \$ в год. Экологический ущерб, связанный со снижением биоразнообразия при разрушении лесов ясеновой формации, как и косвенные экономические потери сложно поддаются учету, но по мнению исследователей составляет не менее, а порой и превышает ущерб от ресурсных потерь.

В 2020 г. в Институте леса НАН Беларуси, под руководством Ю. О. Баранова и В. С. Пантелеева совместно с сотрудниками БГТУ (в т.ч. автором статьи) проведена верификация чистых культур возбудителя халарового некроза ветвей ясеня – 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) [101]. 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.



Рис. 5. Расстроенное ясеневое насаждение, где большинство деревьев ясеня из 1 яруса представлены валежом (Осиповичский лесхоз)

Fig. 5. Disordered ash plantation, where most of the ash trees from the 1st tier are represented by dead trees (Osipovich forestry)



Рис. 6. Единичное дерево ясеня на выделе с массовым усыханием (Осиповичский лесхоз)

Fig. 6. A single ash tree in an area with massive drying out (Osipovich forestry enterprise)

Анализ информативности полученных ДНК-профилей позволил отобрать для изучения внутривидовой изменчивости *Hymenoscyphus fraxineus* 5 праймеров: UBC-268, primer6, UBC-536, Oligo 85 и ОРА-09. По результатам RAPD-анализа для исследованных штаммов составлены генетические паспорта по 29 специфическим ДНК-локусам. Отмечено, что в исследованной белорусской популяции *H. fraxineus* высокий уровень внутривидового разнообразия (рис. 7).

Согласно данным RAPD-анализа уровень различий между штаммами в большинстве случаев варьировал в диапазоне 7–47% локусов ($DN = 0,0715–0,4769$).

Данное явление с учетом выявленного диффузного географического распределения генотипов можно объяснить гипотезой проникновения на территорию страны путем многократной инвазии спектра изолятов.



Рис. 7. Результаты генотипического картирования *Hymenoscyphus fraxineus* [101] (цветными точками выделены различные генотипы патогена)

Fig. 7. Results of genotypic mapping *Hymenoscyphus fraxineus* [101] (different genotypes of the pathogen are highlighted with colored dots)

Оценка вероятности проникновения на территорию Беларуси новых карантинных фитопатогенов как основа анализа фитосанитарных рисков

Для инвазии и успешной интродукции необходимо наличие трех благоприятных факторов: наличие вектора переноса; наличие восприимчивого хозяина; наличие благоприятных условий окружающей среды. Векторы переноса фитопатогенов хорошо изучены и включают антропо-, аэро-, гидро- и зоохорию. Как показывают последние исследования, относительно аскомицетов доминирует воздушный способ перемещения споровой инфекции, причем скорость перемещения может достигать 100 км в год [102]. Распространяющиеся преимущественно водным путем, оомицеты также могут преодолевать значительные расстояния за короткое время [103, 104]. Следовательно, удаленность известных очагов карантинных инфекций не является надежным

барьером и «успокаивающим» фактором. Даже при хорошей работе системы карантина растений проникновение патогена является лишь вопросом времени, при наличии породы-хозяина и подходящих эколого-климатических условий. Таким образом, важнейшим вопросом в прогнозировании вероятности инвазии на территорию Беларуси новых карантинных фитопатогенов является оценка соответствия условий местообитания экологическим предпочтениям определенных инвайдеров.

Для отработки методики оценки пригодности новых условий местообитания для конкретных инвайдеров был выбран метод компьютерного моделирования в среде Maxent, хорошо зарекомендовавший себя в других исследованиях [105].

В качестве модельных объектов использованы все виды опасных карантинных видов отсутствующих на территории стран ЕАЭС (Единый перечень карантинных объектов Евразийского экономического союза), но уже выявленные в Европе и наносящие существенный экономический и экологический ущерб. *Phytophthora ramorum* Weres et al., *Phytophthora kernoviae* Brasier, *Melampsora medusae* Thümen, *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner & Buhrer) Nickle характеризуются крайне широким кругом растений-хозяев, и их широкой представленностью в лесных и парковых насаждениях Беларуси. Возможные экономические потери от их инвазии потенциально могут быть весьма существенны для многих отраслей экономики страны и иметь существенные экологические последствия.

Результатом работы Махент, кроме изображения распределения видов на заданной территории, также являются несколько видов графиков и таблиц для проведения статистического анализа (рис. 8). Например, для *Phytophthora ramorum*, первый график говорит о том, что оmissия по тестовым точкам (голубая кривая) приближается к предсказанной динамике оmissии рассчитанной для тестовых данных (черная прямая), полученных из самого распределения Махент. И чем ближе она к черной прямой, тем лучше предсказано распределение.

Вторым видом проверки достоверности построенной модели является значение AUC, которое можно оценить как плохое ($AUC \leq 0,50$), приемлемое ($0,5 < AUC \leq 0,80$) и отличное ($0,80 < AUC \leq 1,00$). Показатель AUC хорошей модели стремится к 1. В нашем случае значения Training data $AUC = 0,952$ и Test data $AUC = 0,951$ указывают на высокий уровень прогностической эффективности, что подтверждается соответствующим графиком.

Красная кривая показывает, насколько хорошо модель описывает тренировочные данные. Синяя линия показывает, насколько хорошо модель описывает тестовые данные и является реальным тестом предсказательной способности модели. Черная линия показывает ситуацию, которую можно было бы ожидать, если бы надежность предсказаний модели была на случайном уровне. Если бы синяя или красная линии находились ниже черной, это означало бы, что уровень достоверных предсказаний модели даже ниже, чем случайный. Чем ближе к верхнему левому углу, находится синяя линия, как на примере, тем лучше модель предсказывает находки, содержащиеся в тестовой выборке.

Для оценки важности переменной используется таблица (см. рис. 8), из которой видно, что

наиболее влиятельный на распространение *Phytophthora ramorum* является BIO12 – годовое количество осадков.

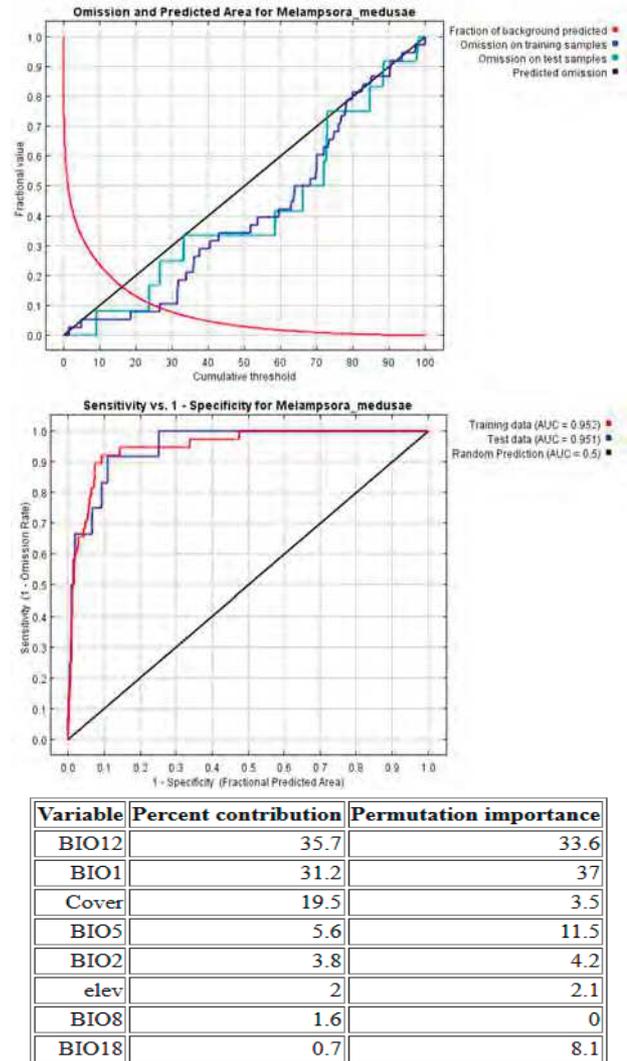


Рис. 8. Результаты статистического анализа точности моделирования распространения видов по тренировочным и тестовым точкам для *Phytophthora ramorum*

Fig. 8. Results of statistical analysis of the accuracy of species distribution modeling at training and test points for *Phytophthora ramorum*

В связи с глобальным распространением целевых фитопатогенов, модели строили с разрешением 2,5 минуты в мировом охвате. Полученные в Махент карты пригодности местности для четырех инвазивных видов обрезаны в QGIS по границам республики для дальнейшего анализа территории Беларуси по отношению к карантинным организмам. В результате площадь территории страны была поделена на пять уровней, где пригодность: отсутствует – 0–А, при А для *Phytophthora ramorum* равно 0,117, для *Bur-*

saphelenchus xylophilus – 0,271, для *Melampsora medusae* – 0,26 и для *Phytophthora kernoviae* – 0,116; минимальная – А–0,3; низкая – 0,3–0,5; средняя 0,5–0,7; высокая – 0,7–1 (рис. 9–12).

Рисунки хорошо иллюстрируют территориальное размещение локалитетов с различным уровнем пригодности эколого-климатических факторов для развития опасных карантинных организмов. На основе этих цифровых моделей по-

лучены площади территории страны с различным уровнем вероятности развития карантинных организмов. Общий балл пригодности территории рассчитывали от 0 (вероятность успешной акклиматизации патогена отсутствует) до 1 (высокая вероятность акклиматизации патогена) как средневзвешенной значение по площади территории, занимаемой различным уровнем пригодности для каждого вида (табл. 3).

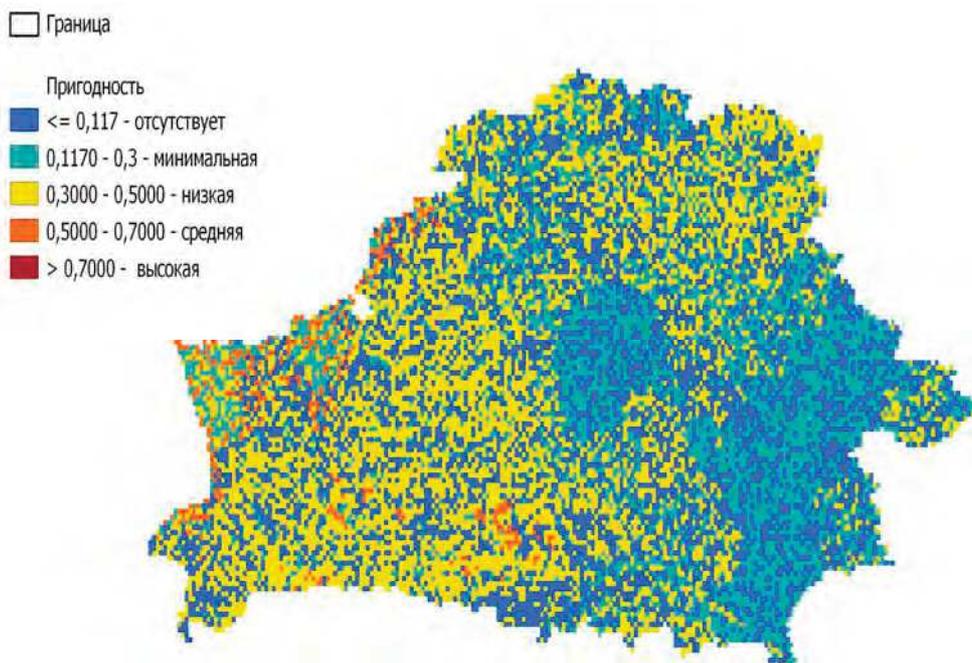


Рис. 9. Пригодность территории Беларуси для распространения *Phytophthora ramorum*

Fig. 9. Suitability of the territory of Belarus for the spread of *Phytophthora ramorum*

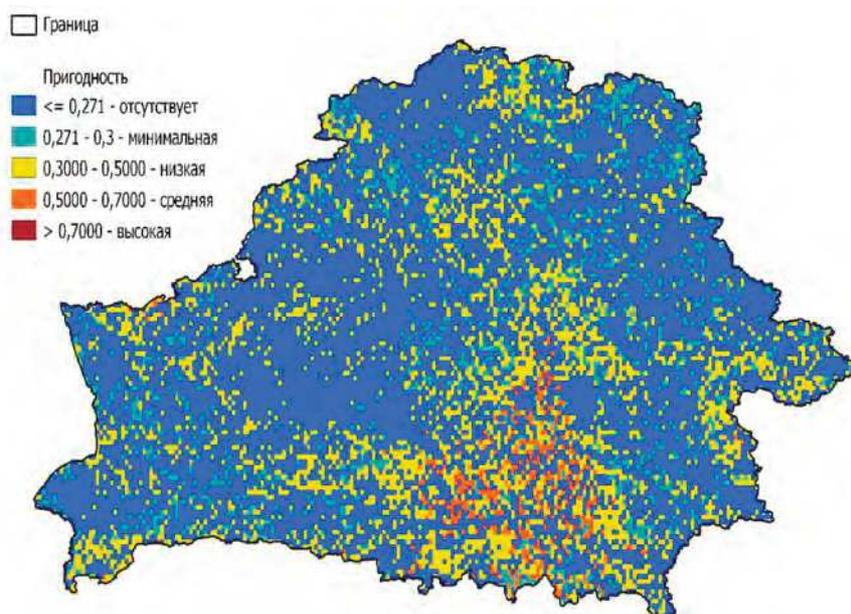


Рис. 10. Пригодность территории Беларуси для распространения *Bursaphelenchus xylophilus*

Fig. 10. Suitability of the territory of Belarus for the spread of *Bursaphelenchus xylophilus*

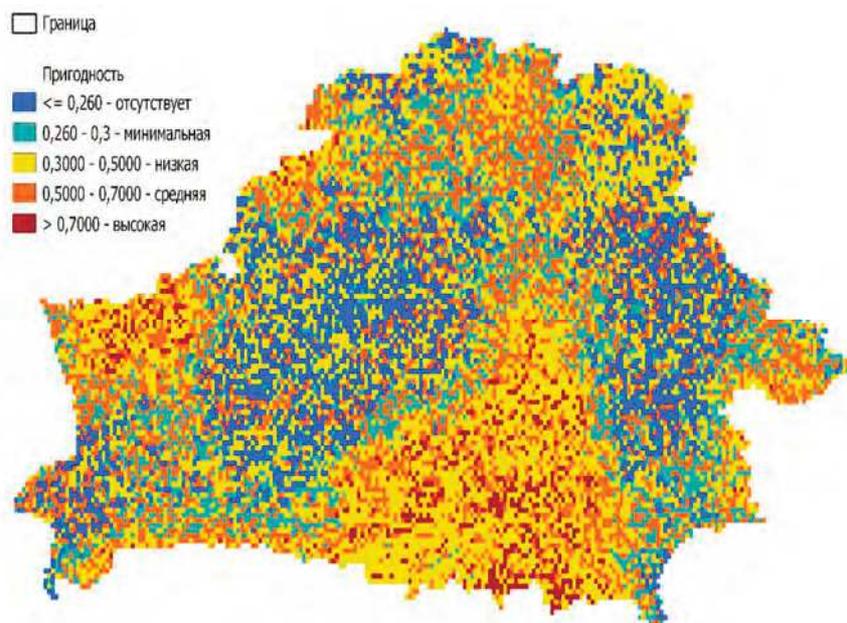


Рис. 11. Пригодность территории Беларуси для распространения *Melampsora medusa*

Fig. 11. Suitability of the territory of Belarus for the spread of *Melampsora medusae*

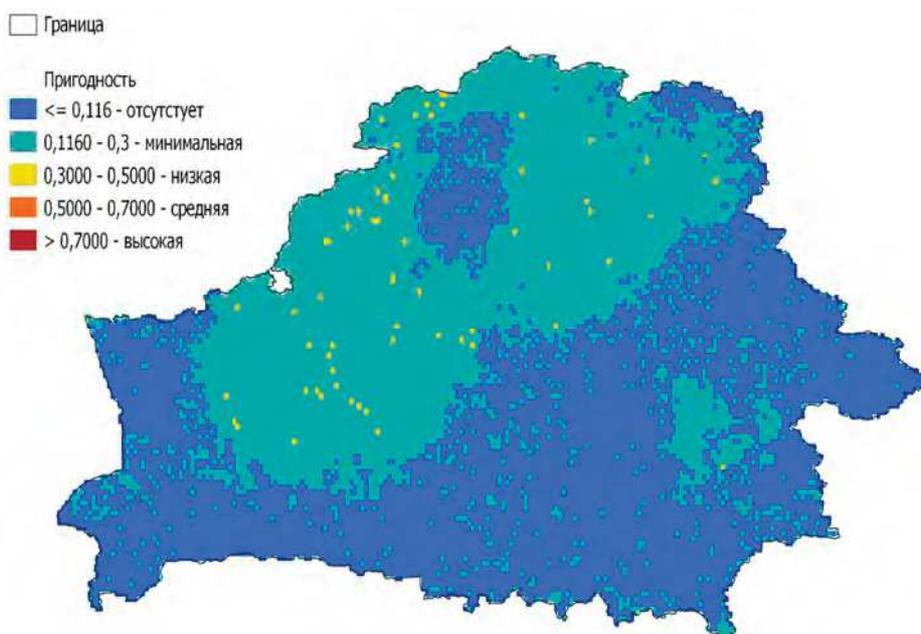


Рис. 12. Пригодность территории Беларуси для распространения *Phytophthora kernoviae*

Fig. 12. Suitability of the territory of Belarus for the spread of *Phytophthora kernoviae*

Таблица 3. Результаты оценки пригодности территории Беларуси для развития карантинных организмов

Table 3. Results of assessing the suitability of Belarus territory of for the development of quarantine organisms

Вид карантинного организма	Площадь территории страны с различным уровнем вероятности развития карантинного организма, %					Общий балл пригодности
	отсутствует	минимальная	низкая	средняя	высокая	
<i>Phytophthora ramorum</i>	35,2	27,1	35,5	2,2	0	0,26
<i>Phytophthora kernoviae</i>	52,1	47,5	0,4	0	0	0,12
<i>Melampsora medusae</i>	18,4	15,7	36,4	26,1	3,4	0,45
<i>Bursaphelenchus xylophilus</i>	68,5	9,2	19,9	2,4	0	0,14

Из всех проанализированных видов карантинных организмов климатические и экологические условия Беларуси наиболее благоприятны для возбудителя ржавчины осины, базидиомицета *Melampsora medusae*. Общий балл пригодности природно-климатических условий страны для развития патогена составляет 0,45. *M. medusae* является облигатным патогеном, изменяющим физиологические и метаболические процессы в организме хозяина. Следовательно, инфекция ржавчины замедляет рост осины и, используя хвойные породы в качестве промежуточных хозяев, патоген вызывает их ослабление и снижение продуктивности [106–108]. Вместе с тем ржавчинные грибы известны своей высокой способностью к распространению с воздушными массами на дальние расстояния. Установлено, что споры желтой ржавчины могут переноситься ветром на расстояние до 2400 км от основного источника инфекции, их обнаруживали на высоте 2100–4200 м и даже 6000 м [109]. Ближайшие к нам очаги карантинного объекта *M. medusae* расположены во Франции, на расстоянии не более 2 тыс. км. Это дает основание предполагать, что занос и акклиматизация *M. medusae* в Беларусь весьма вероятны.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На базе проведённого мониторинга лесных насаждений Полесского региона и других фоновых территорий, анализа гербарных материалов с применением микологических и молекулярно-генетических методов, дана оценка распространённости опасных карантинных объектов и инвазивных видов фитопатогенов в лесных насаждениях, проведено прогнозирование их дальнейшего распространения на территории страны с использованием методов компьютерного моделирования и приведен анализ фитосанитарного риска наиболее вредоносных инвазивных организмов.

Было выявлено 46 растительных объектов трех лиственных пород, на которых диагностировали различными методами 3 инвазивных фитопатогена. Два патогена (*Phytophthora alni* и *Hymenoscyphus fraxineus*) являются карантинными для страны. На основе их широкой встречаемости в Белорусском Полесье и других регионах страны, можно констатировать, что 3 инвазивных вида фитопатогенов, принадлежащих к различным таксономическим группам (оомицет, базидиомицет и аскомицет) натурализовались в лесных экосистемах Беларуси. Эколого-экономические последствия инвазии *Phytophthora alni* и *Melampsorium hiratsukanum* еще не выяв-

В тоже время модели пригодности условий страны для оомицета *Phytophthora kernoviae* и фитонематоды *Bursaphelenchus xylophilus* показали 0,12 и 0,14 баллов соответственно. Это говорит о низкой вероятности проникновения и акклиматизации патогенов, что, возможно, связано с их высокой требовательностью к отдельным факторам среды. Так, *B. xylophilus* массово распространялся в зонах с преимущественно тропическим и субтропическим климатом, в то же время, условия умеренного и, тем более, холодного климата лимитируют развитие вида [110]. Однако, в последнее время появляются сообщения о выявлении у личинок сосновой стволовой нематоды способностей к криоконсервации, что способствует резкому продвижению патогена на север, например, в Китае [111]. Северный вектор экспансии вида может быть обусловлен и процессами глобального изменения климата, сопровождающимися потеплением во многих регионах Земли. Следовательно, получаемые прогностические оценки необходимо воспринимать как основание для дальнейшего комплексного взгляда на анализ фитосанитарного риска, который должен учитывать еще и тренды динамики распространения вторичных ареалов инвазиверов.

лены, но анализ фитосанитарных рисков по первому из них показывает высокую потенциальную вредоносность инвазии.

Вызывает опасение выявление 6 новых локалитетов инфекции карантинного организма *Phytophthora alni*. Столь быстрое распространения инвазивного организма вдали от водоемов и водотоков является свидетельством энтомохорного способа перемещения инфекции *Phytophthora alni*, который, как и большинство оомицетов, считался ранее исключительно гидрохорно распространяемым видом.

Выявлено, что только прямой ущерб в ясеневых насаждениях от заболевания, вызываемого *Hymenoscyphus fraxineus*, рассчитанный на основе потерь ценной деловой древесины этого вида, составляет около 6,4 млн \$ в год. Экологический ущерб, связанный со снижением биоразнообразия при разрушении лесов ясеневой формации, как и косвенные экономические потери сложно поддаются учету, но по мнению исследователей составляет не менее, а порой и превышает ущерб от ресурсных потерь. Это подтверждает крупный эколого-экономический ущерб от биологических инвазий дендропатогенных организмов в нашей стране.

На всех видах опасных карантинных видов отсутствующих на территории стран ЕАЭС (Единый перечень карантинных объектов Евразийского экономического союза), но уже выявленных в Европе (*Phytophthora ramorum* Werese et al., *Phytophthora kernoviae* Brasier, *Melampsora medusae* Thümen, *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner & Buhner) Nickle) показана высокая эффективность метода компьютерного моделирования в среде Махен распространения инвазивных видов, позволяющего вести вариационную оценку пригодности среды обитания в конкретных эколого-климатических условиях для расширения неареалов опасных организмов. Все вновь выявленные локалитеты располагались на прогнозной модели в диапазоне пригодности среды от 40 до 60%. Разработана бальная оценка пригодности местообитаний определенных территорий, которая по Беларуси составила для *Ph. ramorum*

– 0,26, *Ph. kernoviae* – 0,12, *M. medusae* – 0,45, *B. xylophilus* – 0,14.

Из всех проанализированных видов карантинных организмов климатические и экологические условия Беларуси наиболее благоприятны для возбудителя ржавчины осины, базидиомицета *Melampsora medusae*. Проведенный анализ дает основание предполагать, что занос и акклиматизация этого вида в Беларуси весьма вероятны.

Полученные новые сведения о распространности и вредности инвазивных дендропатогенов свидетельствуют о необходимости дальнейшего совершенствования карантинных мер в естественных и антропогенно-трансформированных биоценозах в том числе и путем проведения оценки фитосанитарных рисков и разработки мер локализации и ликвидации их очагов карантинных возбудителей болезней в лесном фонде и зеленых насаждениях.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа проведена в рамках выполнения ГПНИ «Природные ресурсы и окружающая среда» (подпрограмма «Биоразнообразие, биоресурсы, экология», задание 10.2.02 НИР 7 «Чужеродный компонент в составе микобиоты сосудистых растений в условиях подзоны широколиственно-сосновых лесов Беларуси»).

ЛИТЕРАТУРА

1. Секретариат МККЗР. Глоссарий фитосанитарных терминов // Международный стандарт по фитосанитарным мерам № 5. – Рим: ФАО, 2021. – 48 с.
2. Biological invasions are as costly as natural hazards / A. J. Turbelin [et al.] // Perspectives in Ecology and Conservation. – 2023. – Vol. 21 (2). – С. 143–150.
3. Unveiling the hidden economic toll of biological invasions in the European Union / M. Henry [et al.] // Environmental Sciences Europe. – 2023. – Vol. 35 (1). – С. 1–6.
4. Economic costs of invasive alien species across Europe / P. J. Haubrock [et al.] // NeoBiota. – 2021. – Vol. 6. – С. 153–190.
5. Biological invasions in forest ecosystems / A. M. Liebhold [et al.] // Biological Invasions. – 2017. – Vol. 19. – P. 3437–3458.
6. Charles, H. Impacts of invasive species on ecosystem services / H. Charles, J. S. Dukes // Biological Invasions. – Germany, 2007. – P. 217–237.
7. Langor, D. W. Ecological impacts of non-native invertebrates and fungi on terrestrial ecosystems / D. W. Langor, J. Sweeney // Biol. Invasions. – 2009. – Vol. 11. – P. 1–3.
8. Ecological effects of invasive alien insects. Ecological impacts of non-native invertebrates and fungi on terrestrial ecosystems / M. Kenis [et al.] // Springer. – Netherlands, 2008. – P. 21–45.
9. Allen E. Phytosanitary measures to reduce the movement of forest pests with the international trade of wood products / E. Allen, M. Noseworthy, M. Ormsby // Biological invasions. – 2017. – Vol. 19. – P. 3365–3376.
10. Воронин, Б. А. Карантин растений: история правового регулирования; современная практика / Б. А. Воронин, И. А. Тухбатов, Я. В. Воронина // Аграрный вестник Урала. – 2014. – № 12 (130). – С. 58–62.
11. Купина, Н. Г. Полномочия государственной службы карантина растений в области правоотношений на государственной границе / Н. Г. Купина, С. А. Кайтанджян // Таможенная политика России на Дальнем Востоке. – 2008. – № 4 (45). – С. 62–69.
12. Pennycook, S. R. Index to Fries's *Epicrisis Systematis Mycologici* (1838). 2: Polyporei, Hydnei, Auricularini, Clavariaceae Tremellinae / S. R. Pennycook // Mycotaxon. – 2006. – Vol. 98. – P. 75–118.
13. Petersen, R. H. The mycological legacy of Elias Magnus Fries / R. H. Petersen, H. Knudsen // IMA Fungus. – 2015. – Vol. 6 (1). – P. 99–114.
14. De Bary, H. A. Researches into the nature of the potato-fungus *Phytophthora infestans* / H. A. De Bary // Journal of the Royal Agricultural Society of England. – 1876. – Vol. 12. – P. 239–269.
15. History of the IPPC [Electronic resource]. – Mode of accesses: <https://www.ippc.int/en/history-of-the-ippc/>. – Date of accesses: 25.11.2023.

16. Поспелов, С. М. Основы карантина сельскохозяйственных растений / С. М. Поспелов, З. И. Шестиперова, И. К. Долженко. – М: Агропромиздат, 1985. – 183 с.
17. Animal and Plant Health Inspection Service [Electronic resource]. – Mode of accesses: <https://www.aphis.usda.gov/aphis/ourfocus/business-services/ies/IES/>. – Date of accesses: 21.10.2024.
18. Желдакова, Р. А. Фитопатогенные микроорганизмы: учебно-методический комплекс для студентов биологического факультета специальности 1–31 01 01 «Биология» / Р. А. Желдакова. – Минск: БГУ, 2006. – 116 с.
19. Ячевский, А. А. Мучнистая роса дуба / А. А. Ячевский // Труды по микологии и фитопатологии. – СПб: ГУЗиЗ, 1910. – 17 с.
20. Hidden invasion and niche contraction revealed by herbaria specimens in the fungal complex causing oak powdery mildew in Europe / A. Grosset [et al.] // Biological invasions. – 2021. – Vol. 23. – P. 885–901.
21. Bradshaw, M. Powdery mildews on *Quercus*: A worldwide distribution and rediscovered holotype provide insights into the spread of these ecologically important pathogens / M. Bradshaw, U. Braun, D. H. Pfister // Forest Pathology. – 2022. – Т. 52. – № 3. – 127 с.
22. Beenken, L. First records of the powdery mildews *Erysiphe platani* and *E. alphitoides* on *Ailanthus altissima* reveal host jumps independent of host phylogeny / L. Beenken // Mycological progress. – 2017. – № 16. – P. 135–143.
23. Mougou, A. New insights into the identity and origin of the causal agent of oak powdery mildew in Europe / A. Mougou, C. Dutech, M. L. Desprez-Loustau // Forest Pathology. – 2008. – Vol. 38(4). – P. 275–287.
24. Межвидовое и внутривидовое разнообразие мучнистой росы дуба в Европе: история коэволюции и адаптация к хозяевам / М. Л. Деспре-Лустай [и др.] // Mycoscience. – 2011. – 52 (3). – С. 165–173.
25. Селочник, Н. Н. Многолетняя динамика старовозрастных насаждений теллермановских дубрав / Н. Н. Селочник // Лесоведение. – 2014. – № 2. – С. 59–68.
26. Сазонов, А. А. Региональные закономерности усыхания ветвей дуба (*Quercus robur* L.) в период депрессии дубрав Беларуси (2003–2008 гг.) / А. А. Сазонов // Известия Санкт-Петербургской лесотехнической академии. – 2015. – № 211. – С. 161–173.
27. Reproductive fitness of fungal phytopathogens: Deriving co-evolution of host–pathogen systems / R. Balodi [et al.] // The Phytopathogen. – Apple Academic Press, 2017. – P. 41–64.
28. Arora, J. Co-evolution of pathogens, mechanism involved in pathogenesis and biocontrol of plant diseases: an overview / J. Arora, S. Goyal, K. G. Ramawat // Plant Defence: Biological Control. – 2012. – P. 3–22.
29. The population biology of Dutch elm disease: its principle features and some implications for other host-pathogen systems / C. M. Brasier [et al.] // The population biology of Dutch elm disease. – 1986. – P. 53–118.
30. Brasier, C. M. Episodic selection as a force in fungal microevolution, with special reference to clonal speciation and hybrid introgression / C. M. Brasier // Canadian Journal of Botany. – 1995. – Vol. 73 (S1). – P. 1213–1221.
31. Lamb, R. World without trees / R. Lamb // London: Wildwood House, 1979. – 228 p.
32. Heybroek, H. M. Why bother about the elm? / H. M. Heybroek // Dutch elm disease research: cellular and molecular approaches. – New York, 1993. – P. 1–8.
33. Черпаков, В. В. Об этиологии голландской болезни язвов / В. В. Черпаков // Актуальные проблемы лесного комплекса. – 2017. – Вып. 49. – С. 135–142.
34. The status and development of elm disease in Britain / T. R. Peace [et al.] // Bull. For. Commn. – London, 1960. – Vol. 33. – 44 p.
35. The dying of twigs of Elms, Weeping Willows, and Peach trees / M. B. Schwarz [et al.] // The dying of twigs of Elms, Weeping Willows, and Peach trees. – 1922. – 73 p.
36. Mitchell, A. G. Contrasting structure of European and North American populations of *Ophiostoma ulmi* / A. G. Mitchell, C. M. Brasier // Mycological Research. – 1994. – Vol. 98 (5). – P. 576–582.
37. Brasier, C. M. Rapid evolutionary changes in a globally invading fungal pathogen (Dutch elm disease) / C. M. Brasier, K. W. Buck // Biological Invasions. – 2001. – Vol. 3. – P. 223–233.
38. Brasier, C. M. New horizons in Dutch elm disease control / C. M. Brasier // Report on forest research. – 1996. – Vol. 1996. – P. 20–28.
39. Brasier, C. M. Origin of the Dutch elm disease epidemic in Britain / C. M. Brasier, J. N. Gibbs // Nature. – 1973. – Vol. 242 (5400). – P. 607–609.
40. Семенкова, И. Г. Лесная фитопатология / И. Г. Семенкова, Э. С. Соколова // М.: Экология. – 1992. – 324 с.
41. Гниненко, Ю. И. Голландская болезнь ильмовых – исторический аспект в России / Ю. И. Гниненко, Г. Б. Колганихина, В. А. Синкевич // 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 : БГТУ, 2020. – С. 80–83.
42. Калько, Г. В. Голландская болезнь язвов в Санкт-Петербурге / Г. В. Калько // Микология и фитопатология. – 2008. – Т. 42. – Вып. 6. – С. 564–572.
43. Фирсов, Г. А. Современное состояние язвов (*Ulmus* L., *Ulmaceae*) в парке-дендрарии Ботанического сада Петра Великого в условиях эпифитотии голландской болезни язвов / Г. А. Фирсов, Т. С. Булгаков // Hortus botanicus. – 2017. – Т. 12. – С. 214–234.
44. Калько, Г. В. Офиостомовое увядание язвов в Санкт-Петербурге / Г. В. Калько // Защита и карантин растений. – 2009. – № 3. – С. 48–49.

45. Exploration of a rare population of Chinese chestnut in North America: stand dynamics, health and genetic relationships / A. C. Miller [et al.] // *AoB Plants*. – 2014. – Vol. 6. – С. 1–2.
46. Rogerson, C. T. Mycology at The New York Botanical Garden, 1895–1995 / C. T. Rogerson, G. J. Samuels // *Brittonia*. – 1996. – С. 389–398.
46. Лукмазова, Е. А. Лесопатологическое состояние каштановых лесов Западного Закавказья: автореф. дис. ... канд. биол. наук : 06.03.02 / Е. А. Лукмазова; СПб гос. лесотехнич. ун-т. – СПб, 2013. – 21 с.
47. Grente, J. Les formes hypovirulentes d'*Endothia parasitica* et les espoirs de lutte contre le chancre du chataignier / J. Grente // *CR Acad. Agric. France*. – 1965. – Vol. 51. – С. 1033–1037.
48. Rigling, D. *Cryphonectria parasitica*, the causal agent of chestnut blight: invasion history, population biology and disease control / D. Rigling, S. Prospero // *Molecular plant pathology*. – 2018. – Vol. 19 (1). – P. 7–20.
49. Richardson, D. M. 1958: The ecology of invasions by animals and plants. London: Methuen / D. M. Richardson, P. Pyšek, C. S. Elton // *Progress in Physical Geography*. – 2007. – Vol. 31 (6). – P. 659–666.
50. Elton C. S. The ecology of invasions by animals and plants / C. S. Elton // Springer Nature. – 2020. – 181 p.
51. Попов, А. В. Лесная генетика и селекция: учебно-методическое пособие: [для обучающихся средне-специальных и высших образовательных учреждений в области лесного хозяйства и ландшафтной архитектуры] / А. В. Попов, О. И. Полякова. – Томск: Издательство Томского государственного университета, 2020. – С. 40–46.
52. Bjorkman, E. Resistance to snow blight (*Phacidium infestans* Karst.) in different provenances of *Pinus silvestris* L. / E. Bjorkman // *Studia Forestalia Suecica*. – 1963. – Vol. 5. – P. 1–16.
53. Андрюшкявичене, И. С. Изучение семенного потомства по росту у сосны обыкновенной / И. С. Андрюшкявичене // Состояние и перспективы развития лесной генетики. – Рига, 1974. – С. 14–16.
54. Nijboer, R. Vier «resistente ieren» – generaties op een rij / R. Nijboer // *Special Bomenmonitor*. – 2014. – № 1. – P. 29–31.
55. Dengler, A. Über die Entwicklung künstlicher Kiefernkreuzungen / A. Dengler // *Zeitschrift für Forst-und Jagdwesen*. – 1939. – Vol. 71. – P. 457–485.
56. Dengler, A. Herkunfts-und Kreuzungsversuche im Versuchsgarten des Waldbauinstituts Eberswalde/ A. Dengler // *Mitt Deutsch. Dendrol. Ges.* – 1942. – Vol. 55. – P. 157–169.
57. Kowalski, T. *Chalara fraxinea* sp. nov. associated with dieback of ash (*Fraxinus excelsior*) in Poland / T. Kowalski // *Forest Pathology*. – 2006. – Vol. 36. – P. 264–270.
58. Kirisits, T. The current situation of ash dieback caused by *Chalara fraxinea* in Austria / T. Kirisits [et al.] // *Proceedings of the conference of IUFRO working party*. – 2009. – Vol. 7 (2). – P. 97–119.
59. Распространение инвазивного возбудителя некроза ветвей ясеня аскомицета *Hymenoscyphus fraxineus* в европейской части России / В. Б. Звягинцев [и др.] // *Известия Санкт-Петербургской лесотехнической академии*. – 2023. – № 244. – С. 88–117.
60. Ash Dieback in Forests and Rural Areas – History and Predictions / A. Pacia [et al.] // *Forests*. – 2023. – №14 (11). – P.21–51.
61. The susceptibility of Asian, European and North American *Fraxinus* species to the ash dieback pathogen *Hymenoscyphus fraxineus* reflects their phylogenetic history / L. R. Nielsen [et al.] // *European Journal of Forest Research*. – 2017. – № 136. – P. 59–73.
62. Occurrence and pathogenicity of fungi in necrotic and non-symptomatic shoots of declining common ash (*Fraxinus excelsior*) in Sweden / R. Bakys [et al.] // *European Journal of Forest Research*. – 2009. – V. 128. – P. 51–60.
63. Ash dieback in Lithuania: disease history, research on impact and genetic variation in disease resistance, tree breeding and options for forest management in Dieback of European Ash (*Fraxinus* spp.): Consequences and Guidelines for Sustainable Management / A. Pliura [et al.] // *Swedish University of Agricultural Sciences*. – 2017. – P. 150–165.
64. Ash and ash dieback in Sweden: a review of disease history, current status, pathogen and host dynamics, host tolerance and management options in forests and landscapes / M. Cleary [et al.] // *Dieback of European Ash (Fraxinus spp.): Consequences and Guidelines for Sustainable Management*. – Swedish University of Agricultural Sciences, 2017. – P. 195–208.
64. Звягинцев, В. Б. Селекция ясеня обыкновенного на устойчивость к халаровому некрозу / В. Б. Звягинцев, А. В. Потапова // *Материалы VI Всероссийской науч.-практ. конф. с междунар. участием «Фундаментальные и прикладные аспекты продовольственной безопасности»*, 21–23 ноября 2023 г., Большие Вяземы; ФГБНУ ВНИИФ; под ред. М. Г. Барышева. – 2023. – С. 95–97.
65. Полимеразная цепная реакция. История открытия. Новый этап развития / Ф. Н. Гильмиярова [и др.] // *Ремедиум Приволжье*. – 2017. – №4 (154). – С. 17–21.
66. 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.
67. History of the IPPC [Electronic resource]. – Mode of accesses: <https://www.ippc.int/en/history-of-the-ippc/>. – Date of accesses: 25.11.2023.
68. Brief history of EPPO [Electronic resource]. – Mode of accesses: https://www.eppo.int/ABOUT_EPPO/brief_history. – Date of accesses: 25.11.2023.
70. IUCN SSC Invasive Species Specialist Group: invasive alien species information management supporting practitioners, policy makers and decision takers / S. Pagad [et al.] // *Management of Biological Invasions*. – 2015. – Vol. 6 (2). – P. 127–135.
71. ABOUT GRIIS [Electronic resource]. – Mode of accesses: <https://griis.org/>. – Date of accesses: 25.11.2023.

72. Introducing the global register of introduced and invasive species / S. Pagad [et al.] // Scientific data. – 2018. – Vol. 5 (1). – P. 1–12.
73. What is GBIF? [Electronic resource]. – Mode of accesses: <https://www.gbif.org/what-is-gbif>. – Date of accesses: 25.11.2023.
74. What is EPPO Global Database? [Electronic resource]. – Mode of accesses: <https://gd.eppo.int>. – Date of accesses: 25.11.2023.
75. Азиатский банк развития (АБР) 2019. Модернизация санитарных и фитосанитарных мер в ЦАРЭС: Оценка и дельнейшие шаги. – Филиппины, 2019. – С. 13–15.
76. Звягинцев, В. Б. Глобализация проблем лесной фитопатологии В. Б. Звягинцев // Проблемы лесной фитопатологии и микологии: материалы IX Международной конференции, посвященной 90-летию со дня рождения проф. Н. И. Федорова, Минск-Москва-Петрозаводск, 19–24 октября 2015 г.; БГТУ [и др.]; редкол. И. М. Жарский [и др.]. – Минск, 2015. – С. 89–90.
77. Moricca, S. Recent Advances in the Monitoring, Assessment and Management of Forest Pathogens and Pests / S. Moricca, T. Panzavolta // Forests. – 2021. – Vol. 12 (12). – P. 1623.
78. Invasive and quarantine pests in forests in Slovakia. / M. Zubrik [et al.] // EPPO Bulletin. – 2006. – Vol. 36(2). – P. 402–408.
79. Alien invasive pathogens and pests harming trees, forests, and plantations: Pathways, global consequences and management / T. Panzavolta [et al.] // Forests. – 2021. – Vol. 12 (10). – P. 1364.
80. Звягинцев, В. Б. Молекулярно-генетическая диагностика в мониторинге инвазивных фитопатогенов / В. Б. Звягинцев, Л. О. Иващенко // Молекулярная диагностика: сборник трудов XI междунар. конф.; ФГБУ «ЦСП» ФМБА [и др.]; под ред. А. Г. Шипулин. – М., 2023. – С. 396–398.
81. Drivers of emerging fungal diseases of forest trees / L. Ghelardini [et al.] // Forest Ecology and Management – 2016. – Vol. 381. – P. 235–246.
82. Luchi, N. Fast and reliable molecular methods to detect fungal pathogens in woody plants / N. Luchi, R. Ioos, A. Santini // Applied microbiology and biotechnology. – 2020. – Vol. 104 (6). – P. 2453–2468.
83. Comparison of qPCR and metabarcoding methods as tools for the detection of airborne inoculum of forest fungal pathogens / A. Chandelier [et al.] // Phytopathology. – 2021. – Vol. 111 (3). – P. 570–581.
84. Molecular tools for detection of plant pathogenic fungi and fungicide resistance / N. Capote [et al.] // Plant pathology. – 2012. – Vol. 7. – P. 151–202.
85. Moricca, S. Recent Advances in the Monitoring, Assessment and Management of Forest Pathogens and Pests / S. Moricca, T. Panzavolta // Forests. – 2021. – Vol. 12 (12). – P. 1623.
86. Rapid and accurate detection of *Ceratocystis fagacearum* from stained wood and soil by nested and real-time PCR / C. P. Wu [et al.] // Forest Pathology. – 2011. – Vol. 41 (1). – P. 15–21.
87. Rapid in planta detection of *Chalara fraxinea* by a real-time PCR assay using a dual-labelled probe / R. Ioos [et al.] // European Journal of Plant Pathology. – 2009. – Vol. 125. – P. 329–335.
88. Detection of DNA polymorphisms in a single ure-diniospore-derived culture of *Cronartium quercuum* f. sp. *fusiforme* R. L. Doudrick [et al.] // Phytopathology: New York and Baltimore Then St Paul. – 1993. – Vol. 83. – P. 388–388.
89. A sensitive real-time PCR assay for the detection of the two *Melampsora medusae* formae speciales on infected poplar leaves / A. L. Boutigny [et al.] // European Journal of Plant Pathology. – 2013. – Vol. 136. – P. 433–441.
90. Detection of pine needle diseases caused by *Dothistroma septosporum*, *Dothistroma pini* and *Lecanosticta acicola* using different methodologies / S. Schneider [et al.] // Forest Pathology. – 2019. – Vol. 49 (2). – P. 9.
91. SCAR-based PCR primers to detect the hybrid pathogen *Phytophthora alni* and its subspecies causing alder disease in Europe / R. Ioos [et al.] // European Journal of Plant Pathology. – 2005. – Vol. 112. – P. 323–335.
92. The epidemiology of *Phytophthora ramorum* and *P. kernoviae* at two historic gardens in Scotland / M. Elliot [et al.] // Sudden Oak Death Fifth Science Symposium. – 2013. – P. 23.
93. Development of a one-step real-time polymerase chain reaction assay for diagnosis of *Phytophthora ramorum* K. J. D. Hughes [et al.] // Phytopathology. – 2006. – Vol. 96 (9). – P. 975–981.
94. Broders, K. D. Molecular diagnostic assay for detection of the butternut canker pathogen *Sirococcus clavigignenti-juglandacearum* / K. D. Broders, G. J. Boland // Plant disease. – 2010. – Vol. 94 (8). – P. 952–958.
95. An effective PCR-based diagnostic method for the detection of *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Aphelenchoididae) in wood samples from lodgepole pine / I. Leal [et al.] // Nematology. – 2005. – Vol. 7 (6). – P. 833–842.
96. Hariharan, G. Recent advances in molecular diagnostics of fungal plant pathogens: A mini review / G. Hariharan, K. Prasannath // Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. – 2021. – Vol. 10. – 14 p.
97. Защита леса: учебно-методическое пособие / В. Б. Звягинцев [и др.]. – Минск: БГТУ, 2019 – 164 с.
98. Азовская, Н. О. *Sphaeropsis sapinea* как основной возбудитель усыхания побегов *Pinus sylvestris* L. в Беларуси / Н. О. Азовская, В. А. Ярмолович, О. Ю. Баранов // Проблемы лесной фитопатологии и микологии: материалы IX Международной конференции, посвященной 90-летию со дня рождения проф. Н. И. Федорова, Минск-Москва-Петрозаводск, 19–24 октября 2015 г.; БГТУ [и др.]; редкол. И. М. Жарский [и др.]. – Минск, 2015. – С. 17–20.
99. Падутов, В. Е. Методы молекулярно-генетического анализа / В. Е. Падутов, О. Ю. Баранов, Е. В. Воропаев. – Минск: Юнипол, 2007. – 176 с.
100. Сазонов, А. А. Оценка ущерба от усыхания ясенников на примере отдельных насаждений / А. А. Сазонов, В. Б. Звягинцев // Труды БГТУ. Сер. I, Лесн. хоз-во. – 2008. – Вып. 16. – С. 362–366.

101. Генетическое разнообразие инвазивного аскомицета *Hymenoscyphus fraxineus* Baral et al. на территории Беларуси / С. В. Пантелеев [и др.] // Труды БГТУ. Серия 1: Лесное хозяйство, природопользование и переработка возобновляемых ресурсов. – 2020. – № 2 (234). – С. 120–129.
102. Звягинцев, В. Б. Распространение инвазивного возбудителя некроза ветвей ясеня аскомицета *Hymenoscyphus fraxineus* в европейской части России / В. Б. Звягинцев, Д. А. Демидко, С. В. Пантелеев // Известия Санкт-Петербургской лесотехнической академии. – 2023. – № 244. – С. 88–117.
103. Моделирование ареалов распространения карантинных организмов на примере оомицета *Phytophthora alni* Brasier et S.A. Kirk / В. Б. Звягинцев [и др.] // Ботаника (исследования) / НАН Беларуси [и др.]. – Минск, 2023. – Вып. 52. – С. 167–175.
104. Звягинцев, В. Б. Продвижение инвазии оомицета *Phytophthora alni* Brasier et S.A. Kirk на восток – первая находка патогена в Беларуси / В. Б. Звягинцев, О. Ю. Баранов, С. В. Пантелеев // Защита лесов от вредителей и болезней: научные основы, материалы, методы: материалы Всероссийской конференции с международным участием; Иркутск-Танхой, 14–17 сентября 2015 года; СИФИБР СО РАН. – Иркутск, 2015. – С. 102–104.
105. Global risks of biological invasions of phytopathogenic organisms and improvement of the quarantine monitoring system using computer modeling / V. Zviagintsev [et al.] // Reliability: Theory & Applications. – 2023. – Vol. 18. – N. S 5 (75). – P. 569–581.
106. Bulk segregant analysis identifies molecular markers linked to *Melampsora medusae* resistance in *Populus deltoides* / G. M. Tabor [et al.] // Phytopathology. – 2000. – Vol. 90. – № 9. – P. 1039–1042.
107. Rust severity in bioenergy willow plantations treated with additional nutrients / M. Toome [et al.] // Forest Pathology. – 2009. – Vol. 39. – № 1. – P. 28–34.
108. Poplar leaf rust reduces dry mass accumulation and internal nitrogen recycling more markedly under low soil nitrogen availability, and decreases growth in the following spring / F. Gortari [et al.] // Tree physiology. – 2019. – Vol. 39. – № 1. – P. 19–30.
109. Цадокс, И. К. Эпифитотиология ржавчины в Европе / И. К. Цадокс. – Москва: Изд. ВИНТИСХ, 1970. – 238 с.
110. Сосновая стволовая нематода *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner & Buhrer) Nickle и возможности ее акклиматизации в Республике Карелия / А. А. Чалкин [и др.] // Труды Карельского научного центра Российской академии наук. – 2022. – № 1. – С. 63–75.
111. Third-stage dispersal juveniles of *Bursaphelenchus xylophilus* can resist low-temperature stress by entering cryptobiosis / L. Pan [et al.] // Biology. – 2021. – Vol. 10. – № 8. – P. 785.

Поступила в редакцию 18.09.2024