



ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 632.24

doi: 10.17308/sorpchrom.2022.22/9226

Анализ хроматограмм секвенирования для идентификации грибковых патогенов ясеня на территории г. Воронежа

Инна Юрьевна Буракова^{1,2✉}, Артём Петрович Гуреев^{1,2},
Елена Юрьевна Аминева³, Станислав Геннадьевич Ржевский³
Василий Николаевич Попов^{1,2}

¹Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия

²Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

³Всероссийский научно-исследовательский институт лесной генетики, селекции и биотехнологии, Воронеж, Россия

✉ vitkalovai@inbox.ru

Аннотация. На территории г. Воронежа, как и во многих других регионах России, наблюдается интенсивное усыхание ясеня. Однако на данный момент для г. Воронежа исследования по изучению патогенов отсутствуют. Для идентификации видовой принадлежности грибов, поражающих ясеня, мы культивировали их на питательной среде, выделяли и очищали ДНК с использованием сорбционных спинколонок, амплифицировали и секвенировали ITS участки ДНК. Анализ полученных в результате секвенирования хроматограмм позволил определить видовую принадлежность грибов, поражающих ясени. Стоит отметить, что анализ хроматограмм, полученных в результате секвенирования ДНК изучаемых грибов, не выявил *Hymenoscyphus fraxineus*, грибковый патоген, который являлся наиболее очевидным кандидатом на основную причину усыхания ясеня, так как данный гриб сильно сократил популяцию ясеня в Центральной и Северной Европе, а также был ранее обнаружен в Воронежской области на территории Теллермановского опытного лесничества. Напротив, в одном из деревьев был идентифицирован *Fusarium avenaceum*, который считается эндофитом ясеня и, по некоторым данным, обладает антагонистической активностью по отношению к *H. fraxineus*. Но, тем не менее, на двух деревьях была определена ДНК *Erysiphe salmonii*, гриба вида мучнисторосяных грибов, который ранее поражал ясени на территории Восточной Европы. В свою очередь на хроматограммах были выявлены пики, которые соответствовали нуклеотидным последовательностям ДНК *Aspergillus niger*, *Coprinellus micaceus* и *S. ovatus*. Результаты данного исследования применимы в экономико-экологической отрасли лесного хозяйства Воронежской области для проектирования стратегии целенаправленной борьбы с эпидемией усыхания ясеня на территории г. Воронежа.

Ключевые слова: *Fraxinus excelsior* L.; *Hymenoscyphus fraxineus*; грибковый патоген; секвенирование; анализ хроматограмм

Благодарности: исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и Высшего образования Российской Федерации в рамках Государственного задания университетам в области научной деятельности на 2020–2022 годы (проект FZGU-2020-0044) и Гранта Президента для поддержки ведущих научных школ (Соглашение НШ-1375.2022.5).

Для цитирования: Буракова И.Ю., Гуреев А.П., Аминева Е.Ю., Ржевский С.Г., Попов В.Н. Анализ хроматограмм секвенирования для идентификации грибковых патогенов ясеня на территории г. Воронежа // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2022. Т. 22, № 2. С. 214–223. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2022.22/9226>



Original article

Analysis of sequencing chromatograms for the identification of ash fungal pathogens in the territory of Voronezh

Inna Yu. Burakova^{1,2✉}, Artem P. Gureev^{1,2}, Elena Yu. Amineva³,
Stanislav G. Rzhnevsky³, Vasily N. Vasily N.^{1,2}

¹Voronezh State University of Engineering Technologies, Voronezh, Russian Federation

²Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation

³All-Russian Research Institute of Forest Genetics, Breeding, and Biotechnology, Voronezh, Russian Federation

✉vitkalovai@inbox.ru

Abstract. Within the territory of the city of Voronezh, as in many other regions of Russia, intensive die-back of ash is observed. However, to date, the study of pathogens in the city of Voronezh have not been performed. For the identification of the species of ash-infecting fungi, we cultivated them on a nutrient medium, isolated and purified the DNA using sorption spin columns, and amplified and sequenced the ITS regions of DNA. Analysis of the chromatograms obtained as a result of sequencing made it possible to determine the species of fungi that infect ash trees. It should be noted that the analysis of chromatograms obtained as a result of DNA sequencing of the studied fungi did not reveal *Hymenoscyphus fraxineus*, a fungal pathogen that was the most obvious candidate for the main cause of ash die-back, since this fungus greatly reduced the population of ash in Central and Northern Europe, and was also found in the Voronezh region on the territory of the Tellerman experimental forestry. On the contrary, in one of the trees *Fusarium avenaceum* was identified, which is considered an endophyte of the ash tree and, according to some reports, has antagonistic activity against *H. fraxineus*. However, the DNA of *Erysiphe salmonii*, a powdery mildew fungus that previously affected ash trees in Eastern Europe, was determined on two trees. In turn, the chromatograms revealed peaks that corresponded to the nucleotide sequences of DNA of *Aspergillus niger*, *Coprinellus micaceus*, and *C. ovatus*. The results of this study are applicable in the economic and environmental sector of forestry in the Voronezh region for designing a strategy for targeted combating the epidemic of ash die-back in the city of Voronezh.

Keywords: *Fraxinus excelsior* L.; *Hymenoscyphus fraxineus*; fungal pathogen; sequencing; chromatogram analysis

Acknowledgments: the study was financially supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation as part of the State assignment for universities in the area of research for 2020–2022 (project FZGU-2020-0044) and the Grant of the President of the Russian Federation to Support Leading Scientific Schools of the Russian Federation (Agreement NSh-1375.2022.5).

For citation: Burakova I. Yu., Gureev A. P., Amineva E. Yu., Rzhnevsky S. G., Popov V. N. Analysis of sequencing chromatograms for the identification of ash fungal pathogens in the territory of Voronezh. *Sorbtsionnyye i khromatograficheskie protsessy*. 2022. 22(2): 214-223. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2022.22/9226>

Введение

Ясень обыкновенный (*Fraxinus excelsior* L.) – широко распространённое дерево на территории европейской части России. Его довольно часто можно встретить не только в составе лесных насаждений, но и на улицах, в парках, скверах. Считается декоративной древесной породой [1]. Обладая мощными защитными свойствами, ясень хорошо адаптируется к загрязнению атмосферы и достаточно устойчив к условиям городской среды,

что позволяет использовать его в качестве озеленителя [2]. Также ясень широко применяется при создании лесополос. В настоящее время значительное количество деревьев подвергается биотическим стрессам, вызванным интродуцированными патогенами и насекомыми-паразитами. В последние десятилетия во многих регионах наблюдаются вспышки эпидемий, связанных с патогенами, что сказывается на экономическом и / или экологическом состоянии стран [3].

Рубеж XX и XXI веков ознаменовался резким сокращением популяции некоторых видов ясеня на обеих сторонах света. Болезнь усыхания ясеня, вызванная грибковым патогеном *Hymenoscyphus fraxineus*, сильно сократила его популяцию в Центральной и Северной Европе [4]. Ясеновая изумрудная узкотелая златка (*Agrilus planipennis*) привела к сильному сокращению ясеновых лесов в Северной Америке [5]. Ареалы распространения вредителя и патогена совпали в Европейской части России, что привело к крайне резкому сокращению ясеновых лесов [6]. Согласно худшему сценарию, оба этих вредителя могут вызвать полное исчезновение отдельных видов ясеня [7].

На территории Воронежской области на долю ясеня приходится около 16.1 тыс. га, что составляет примерно 4.5% от всех лесных древесных пород [8]. В основном ясень встречается как спутник дуба в Теллермановском, Бутурлиновском, Воронцовском, Воронежском и других лесничествах [9].

В г. Воронеже *A. planipennis* был обнаружен еще в 2013 году [10], *H. fraxineus* впервые идентифицировали в 2016 г. в лесостепной зоне на юге области [11]. Данные исследования, где всего на ясене было выявлено более 60 видов грибов, 35% из которых являются возбудителями болезней, проводились сотрудниками Института лесоведения РАН на территории Теллермановского опытного лесничества [12]. Ввиду того, что подобные работы по изучению патогенов ясеня из других мест произрастания на территории г. Воронежа отсутствуют, а также в силу массовой гибели и деградации ясеня нами было инициировано настоящее исследование.

Целью работы является идентификация видовой принадлежности грибов, поражающих ясени, были использованы молекулярно-генетические методы, которые включают в себя выделение ДНК и очистку с использованием сорбционных спин-колонок, а также получение данных

о генетической последовательности с помощью прямого секвенирования по методу Сэнгера. Анализ полученных с помощью данного метода хроматограмм позволил идентифицировать видовую принадлежность грибов, поражающих ясени г. Воронежа на территории Воронежской нагорной дубравы.

Экспериментальная часть

В качестве объектов исследования были использованы плесневые грибы и плодовые тела грибов, собранных со взрослых деревьев ясеня из насаждения естественного происхождения, располагающегося на территории государственного природного заказника областного значения «Воронежская нагорная дубрава», координаты которых предоставлены в таблице 1.

Культивирование плесневых грибов было произведено с использованием коммерческой питательной среды № 2 ГРМ (Сабура) (ФБУН «ГНЦ ПМБ», Россия). Культивирование проводилось при 37°C в течение 72 часов. Микробиологический высев на питательную среду был осуществлён методом мазка-отпечатка.

ДНК из образцов выделялась при помощи коммерческого набора «diaGene для выделения геномной ДНК» (Диаэм, Россия) согласно прилагаемому протоколу. Принцип метода заключается в очистке ДНК из биоматериала при помощи микроколонок, в составе которых находятся силикаты, в присутствии сорбента. На первом этапе выделения происходило избирательное связывание ДНК с сорбентом в присутствии хаотропной соли. Далее проводилось центрифугирование микроколонок с растворами разной ионной силы, что позволяет очистить связанную с сорбентом ДНК от примесей. Элюция ДНК из сорбента осуществлялась путем центрифугирования после добавления деионизированной воды. Визуализировали полученные образцы ДНК при помощи метода гель-электрофореза в



Таблица 1. Координаты расположения деревьев, с которых был собран материал для исследования

Table 1. The coordinates of the location of the trees from which the material for the study was collected

№ образца	Координаты расположения дерева
1	51°45'00.48"N / 39°13'35.9"E
7	51°45'01.03" N / 39°13'36.14" E
9	51°45'39.33" N / 39°13'33.35" E
11	51°45'23.71" N / 39°11'23.92" E
11(2)	51°45'23.55" N / 39°11'23.02" E
16	51°44'55.71" N / 39°13'26.63" E
33	51°45'13.04" N / 39°13'06.25" E
36	51°45'12.36" N / 39°13'06.94" E
37	51°45'06.52" N / 39°13'08.95" E
38	51°45'10.53" N / 39°13'07.39" E

2% агарозном геле в 1х трис-ацетатном буфере.

Для последующего секвенирования по методу Сэнгера предварительно амплифицировали ITS участки. Последовательности праймеров для амплификации представлены в таблице 2. Полимеразная-цепная реакция (ПЦР) проходила при следующих условиях: начальная денатурация при 94°C в течение 3 мин, 35 циклов: общая денатурация при 94°C в течение 30 сек; отжиг праймеров при 54°C в течение 30 сек; элонгация при 72°C в течение 45 сек; дополнительная элонгация при 72°C в течение 10 мин на термоциклере Eppendorf Mastercycler personal (Eppendorf, США). В состав реакционной смеси входили следующие компоненты: 1 мкл ДНК; 1 мкл смеси ITS1 и ITS4 праймеров (табл. 1); 4 мкл 5X окрашенной реакционной смеси для ПЦР ScreenMix-HS (Евроген, Россия); 14 мкл деионизированной воды.

Последующую визуализацию ПЦР продуктов проводили при помощи метода гель-электрофореза в 2% агарозном геле в 1х трис-ацетатном буфере. Далее

продукты ПЦР были механически вырезаны из агарозного геля для последующей очистки, которая проводилась с использованием коммерческого набора «Cleanup Standard» (Евроген, Россия). К фрагменту геля добавляли 3 объема «Связывающего раствора S», смесь инкубировали при 55°C до полного растворения геля в пробирке. Полученные раствор центрифугировали на сорбционной спин-колонке, где сорбируется только двухцепочечная ДНК, тогда как одноцепочечная ДНК, РНК, соли, ферменты, нуклеотиды и другие вещества остаются в растворе. Далее сорбент очищался от примесей промывочными растворами, а ДНК была элюирована для последующего секвенирования.

Секвенирование по методу Сэнгера осуществлялось в коммерческой биотехнологической компании ООО «Евроген» (Россия). Методика секвенирования по Сэнгеру основана на физико-химических принципах капиллярного электрофореза: разделение веществ в жидкой полимерной фазе в тонких капиллярах под воздействием высокого напряжения. Во время прогона отрицательно заряженные

Таблица 2 Последовательности праймеров ITS участков

Table 2 Primer sequences of ITS regions

Название праймера	Последовательность 5' – 3'
ITS1 (прямой)	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G
ITS4 (обратный)	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC

молекулы ДНК попадали в капилляры за счёт миграции в сторону положительно заряженного электрода, тем самым создавалось электрическое поле между анодом и катодом. Данный процесс заставлял данные молекулы ДНК двигаться в полимере к противоположному концу капилляров (аноду). Более короткие фрагменты двигались быстрее, чем длинные; постепенно фрагменты ДНК мигрировали к окну детекции. В процессе прогона в окне детекции происходило возбуждение пришитых к фрагментам ДНК красителей узким пучком лазера; красители испускали флуоресценцию. Прибор собирал флуоресценцию со всех капилляров и проецировал на камеру ПЗС с помощью оптической системы. Сигналы флуоресценции разных красителей с ПЗС камеры конвертировался в хроматограмму, которая представляла собой многоцветные пики, которые, в свою очередь, соответствовали четырем видам нуклеотидов, составляющих молекулу ДНК. Объединение этих графиков при вторичной обработке позволило расшифровать нуклеотидную последовательность и определить длину фрагментов ДНК.

Полученные хроматограммы анализировали с помощью программного обеспечения Bio Edit Sequence Alignment Editor (version 7.0.4.1). Для множественного выравнивания последовательностей была использована программа «Clustal Omega». (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) с её помощью каждая полученная нуклеотидная последовательность была выровнена для дальнейшей работы с ней. После нуклеотидные последовательности были проанализированы с использованием программы «Basic Local Alignment Search Tool» (Blast) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) для нахождения области сходства между биологическими последовательностями. Данная программа позволяет сравнивать нуклеотидные или белковые последовательности с базами данных последовательностей.

Обсуждение и результаты

В исследовании анализировались 14 изолятов, которые были успешно амплифицированы и секвенированы. После чего была получена четырехцветная хроматограмма, демонстрирующая результаты секвенирования (рис.1).

Стандартные ошибки, которые наблюдаются в начале и в конце прочтений ДНК, были исключены из анализа. Для образцов под номерами 2, 11(a), 15 и 34 наблюдалось наложение пиков хроматограммы, что делало невозможным определение нуклеотидной последовательности ДНК. Наиболее вероятной причиной наложения пиков является наличие в изоляте двух или более организмов из разных таксономических групп. В некоторых случаях наложение пиков происходит при наличии полиморфизмов, в первую очередь, однонуклеотидных полиморфизмов. В таком случае следует анализировать амплитуды пиков хроматограмм, так как они могут нести информацию о пропорциях тех или иных аллелей в образце [13]. Однако степень наложения пиков хроматограмм в образцах под номерами 2, 11(a), 15 и 34 не позволила идентифицировать видовую принадлежность грибов.

Анализ хроматограмм для образцов под номерами 1, 7, 9, 11, 11(2), 16, 33, 36, 37, 38 выявил последовательности ДНК, что позволяет идентифицировать видовую принадлежность грибов. Ожидалось, что в ряде пораженных деревьев будет идентифицирован *H. fraxineus*. Данный грибок вызывает в Европе смертельное заболевание ясеня. Патоген, вероятно, был занесен из Восточной Азии, а болезнь впервые обнаружили в Польше в начале 90-х годов [14]. Впоследствии эпидемия распространилась на весь естественный ареал произрастания деревьев-хозяев. *H. fraxineus* вызывает некротические поражения всех органов, включая листья и побеги, что в конечном итоге приводит к увяданию и гибели всего дерева. [15]. На территории России *H. fraxineus* впервые

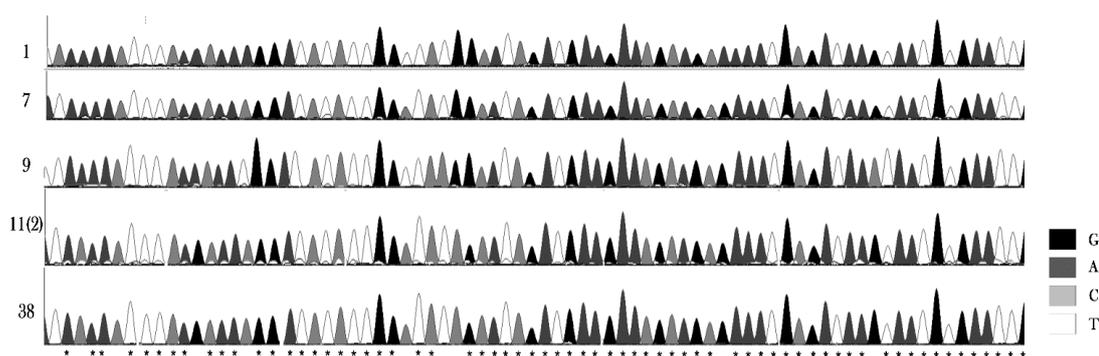


Рис. 1. Хроматограммы, полученные в результате секвенирования ДНК грибковых патогенов, выделенных из исследуемых образцов Ясеня. 1. Хроматограмма последовательности ДНК гриба вида *Fusarium avenaceum*; 7. Хроматограмма последовательности ДНК гриба вида *Erysiphe salmonii*; 9. Хроматограмма последовательности ДНК гриба вида *Aspergillus niger*; 11 (2). Хроматограмма последовательности ДНК гриба вида *Coprinellus micaceus*; 38. Хроматограмма последовательности ДНК гриба вида *Coprinellus ovatus*.

Fig. 1. Chromatograms, obtained as a result of DNA sequencing of fungal pathogens isolated from the studied ash samples. 1. Chromatogram of the DNA sequence of fungi *Fusarium avenaceum*; 7. Chromatogram of the DNA sequence of fungi *Erysiphe salmonii*; 9. Chromatogram of the DNA sequence of fungi *Aspergillus niger*; 11(2). Chromatogram of the DNA sequence of fungi *Coprinellus micaceus*; 38. Chromatogram of the DNA sequence of fungi *Coprinellus ovatus*.

был обнаружен в 2005 году в Приморском крае на другом виде ясеня *F. mandshurica* [16]. В Европейской части России *H. Fraxineus* впервые зарегистрирован в 2011 году в Санкт-Петербурге [6]. Позже усыхания ясеня отмечали на всей протяженности Федеральной трассы М1 от Беларуси до Москвы [17].

Однако анализ хроматограмм, полученных в результате секвенирования, не выявил ДНК, которая принадлежала бы *H. fraxineus*. В пробах 9, 11 и 34 был идентифицирован гриб *Aspergillus niger* – патогенный гриб-сапрофит из рода *Aspergillus*. Данный вид грибов, который сильно влияет на здоровье людей, животных и растений во всем мире [18]. Основным субстратом для роста *Aspergillus niger* является почва, однако считается, что он один из наиболее распространенных грибов в мире [19]. Есть данные, которые свидетельствуют о том, что споры гриба рода *Aspergillus* являются одними из наиболее часто определяемых грибковых конидий в атмосфере [20]. По этой причине обнаружение колоний *Aspergillus niger* не удивительно.

В образцах под номерами 7 и 16 был идентифицирован *Erysiphe salmonii* – гриб вида мучнисторосяных грибов. Мучнистая роса, образующаяся микроскопическими эктопаразитическими грибами, споры которых легко разносятся по воздуху, поражает многие породы древесных растений. На растении, которое заражено, появляется белый налет мицелия, на котором после вызревания спор образуются капли жидкости, похожей на росу. Обычно она распространяется снизу вверх по растению. Листья пораженных культур покрываются пятнами, вянут и опадают. Представители двух родов данного заболевания: *Erysiphe* и *Phyllactinia*, были зарегистрированы и ранее у видов *Fraxinus* [21]. Из четырёх зарегистрированных представителей рода *Erysiphe* на ясеню наиболее распространены *E. fraxinicola* и *E. salmonii*. Оба вида встречаются только в Восточной Азии, например, в Китае, Корее и Японии, но *E. salmonii* недавно был зарегистрирован и в Восточной Европе [22,23], а теперь идентифицирован на территории г. Воронежа.

Таблица 3. Виды грибов, обнаруженные в исследуемых образцах Ясеня
 Table 3. Species of fungi found in the studied ash samples

Название грибов № пробы	<i>Fusarium avenaceum</i>	<i>Erysiphe salmonii</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Coprinellus micaceus</i>	<i>Coprinellus ovatus</i>
1					
7					
9					
11					
11(2)					
16					
33					
36					
37					
38					

В образце под номером 1 был идентифицирован вид грибов-аскомицетов *Fusarium avenaceum*. Ранее было показано, что данный гриб в большом количестве встречаются на ясенях, которые усыхали по причине поражения *H. fraxineus*. Однако данный гриб не является сильным патогеном [24]. Даже напротив, было показано, что грибы *Fusarium* sp являются эндофитом ясеня обыкновенного и обладают антагонистической активностью по отношению к *H. fraxineus* [25].

В образцах 11(2), 36, 37 идентифицирован *Coprinellus micaceus* – гриб семейства *Psathyrellaceae*. Он является типичным сапротрофным грибом, который обычно обитает на пнях и древесине лиственных пород деревьев [26]. Мы предполагали, что образец 38 является грибом из рода *Armillaria*. Наиболее часто встречаются *A. gallica* и *A. cepistipes*. Эти грибы обычно колонизируют камбий у основания дерева, что приводит к его постепенной гибели [27]. Однако анализ хроматограмм, полученных после сиквенса, позволил идентифицировать данный гриб как *Coprinellus ovatus* (табл. 3).

Список литературы/References

1. Fedorova A.I., Mikheeva M.A. Tree plants of Voronezh (biodiversity and sustainability). Voronezh, Publishing and Printing Center of Voronezh State University. 2008. 100 p. (In Russ.).

Заключение

Таким образом, анализ хроматограмм, полученных в результате секвенирования ДНК исследуемых грибов, не позволил нам выявить *H. fraxineus*, являющийся наиболее очевидным кандидатом на причину усыхания ясеня на территории г. Воронежа. Напротив, в одном из деревьев был обнаружен *Fusarium avenaceum*, который считается эндофитом ясеня обыкновенного и, по некоторым данным, обладает антагонистической активностью по отношению к *H. fraxineus*. Но, тем не менее, на двух деревьях была идентифицирована ДНК *E. salmonii*, гриба вида мучнисторосяных грибов, который поражает ясени на территории Восточной Европы.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет известных финансовых конфликтов интересов или личных отношений, которые могли бы повлиять на работу, представленную в этой статье.

2. Antipov V.G. Resistance of woody plants to industrial gases. Minsk. Science and Technology. 1979. 215 p. (In Russ.).

3. Boyd I.L., Freer-Smith P.H., Gilligan C.A., Godfray H.C.J., The consequence of tree pests and diseases for ecosystem services. *Science*. 2013; 342(6160): 1235773-



1235773. <https://doi.org/10.1126/science.1235773>
4. Coker T.L.R., Rozsypálek J., Edwards A., Harwood T.P., Butfofy L., Buggs, R.J.A., Estimating mortality rates of European ash (*Fraxinus excelsior*) under the ash dieback (*Hymenoscyphus fraxineus*) epidemic. *PLANTS, PEOPLE, PLANET*. 2018; 1(1): 48-58. <https://doi.org/10.1002/ppp3.11>
5. Orlova-Bienkowskaja M.J., Drogvalenko A.N., Zabaluev I.A., Sazhnev A.S., Peregudova E.Y., Mazurov S.G., Komarov E.V., Struchaev V.V., Martynov V.V., Nikulina T.V., Bieńkowski A.O. Current range of *Agrilus planipennis* Fairmaire, an alien pest of ash trees, in European Russia and Ukraine. *Annals of Forest Science*. 2020; 77(2): 1-14. <https://doi.org/10.1007/s13595-020-0930-z>
6. Musolin D.L., Selikhovkin A.V., Shabunin D.A., Zviagintsev V.B., Baranchikov Yu.V. Between Ash Dieback and Emerald Ash Borer: Two Asian Invaders in Russia and the Future of Ash in Europe. *Baltic Forestry*. 2017; 23(1): 316-333.
7. Herms D.A., McCullough D.G., Emerald Ash Borer Invasion of North America: History, Biology, Ecology, Impacts, and Management. *Annual Review of Entomology*. 2014; 59(1): 13-30. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-011613-162051>
8. Forest plan of the Voronezh region. Decree of the Governor of the Voronezh Region of August 15. 2011 N 303-u (as amended on October 17, 2017). Access mode: <https://www.govrn.ru/1462> (date of access: 12.11.2021) (In Russ.). The first timber industry portal. Forestry news. Access mode: <http://www.wood.ru/ru/lonewsid-75837.html>. wood.ru (date of treatment 11/12/2021)
9. Orlova-Benkovskaya M.Ya. "Ash emerald narrow-bodied goldfish (*Agrilus planipennis*) settled in nine regions of European Russia: from Yaroslavl to Voronezh", Materials of the international conference, St. Petersburg, November 25-27, 2013. VII Readings in memory of O.A. Kataeva. Pests and diseases of woody plants in Russia. Ed. A.V. Selikhovkin and D.L. Musolina. SPb. SPbGLTU, 2013: 65-66. (In Russ.).
10. Kolganikhina GB, Panteleev SV. "First report of the harmful phytopathogenic fungus *Hymenoscyphus fraxineus* in Tellermanovsky forest (south forest-steppe of the European part of Russia)" Proceedings of the 2d International Conference "Biology, systematic and ecology of fungi and lichen in natural and agricultural ecosystems". Minsk. Kolorgrad. 2016: 115-118. (In Russ.).
11. Kolganikhin G.B., Pathogenic and saprotroph fungi on ash in plantings of the tellerman experimental forest area. *Forestry Bulletin*. 2018; 22(6): 40-48. <https://doi.org/10.18698/2542-1468-2018-6-40-48>(In Russ.).
12. Fantin Yu., Favorov A., Neverov A., Mironov A.A., Chulanov V. Analysis of complex chromatograms of population sequencing. Access mode: <http://itas2011.iitp.ru/pdf/1569459319.pdf> (date of access 12.11.2021) (In Russ.).
13. Kowalski T., Łukomska A., Badania nad zamieraniem jesionu (*Fraxinus excelsior* L.) w drzewostanach Nadleśnictwa Włoszczowa [The studies on ash dying (*Fraxinus excelsior* L.) in the Włoszczowa Forest Unit stands]. *Acta Agrobotanica*. 2005; 58(2): 429-440. <https://doi.org/10.5586/aa.2005.068> (In Russ.).
14. Gross A., Holdenrieder O., Pautasso M., Queloz V., Sieber T. N. *Hymenoscyphus pseudoalbidus*, the causal agent of European ash dieback. *Molecular Plant Pathology*. 2014; 15(1): 5-21. <https://doi.org/10.1111/mpp.12073>
15. Baral H.O., Bemmann M., *Hymenoscyphus fraxineus* vs. *Hymenoscyphus albidus* – A comparative light microscopic study on the causal agent of European ash dieback and related foliicolous, stroma-forming species. *Mycology*. 2014; 5(4): 228-290. <https://doi.org/10.1080/21501203.2014.963720>
16. Zviagintsev V.B., Baranov O.Yu., Panteleev S.V. "Distribution of ash dieback



disease caused by invasive mycopathogen *Hymenoscyphus fraxineus* Baral et al., in Moscow region and along the route M1". Problems of forest phytopathology and mycology. Materials of the IX international conference. Belarussian State Technological Institute. Minsk. 2015: 87-89.

17. Erfandoust R., Habibipour R., Soltani J. Antifungal activity of endophytic fungi from Cupressaceae against human pathogenic *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus niger*. *Journal de Mycologie Médicale*. 2020; 100987. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2020.100987>

18. Martínez J., Nevado A., Suñén E., Gabriel M., Vélez-Del-Burgo A., Sánchez P., Postigo I. The *Aspergillus niger* Major Allergen (Asp n 3) DNA-Specific Sequence Is a Reliable Marker to Identify Early Fungal Contamination and Postharvest Damage in *Mangifera indica* Fruit. *Front Microbiol*. 2021; 12: 663323. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.663323>

19. Dijksterhuis J. Fungal spores: Highly variable and stress-resistant vehicles for distribution and spoilage. *Food Microbiology*. 2018; 81: 2-11. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.11.006>

20. Braun U., Cook R.T.A., Taxonomic Manual of the Erysiphales (powdery mildews). CBS Biodiversity Series no 11. *Utrecht: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre*. 2012; 707.

21. Heluta V.P., Takamatsu S., Siahaan, S.A.S. *Erysiphe salmonii* (Erysiphales, Ascomycota), another East Asian powdery mildew fungus introduced to Ukraine. *Ukrainian*

Botanical Journal. 2017; 74: 212-219. <https://doi.org/10.15407/ukrbotj74.03.212>

22. Yamaguchi Y., Meeboon J., Heluta V.P., Liu S-Y., Feng J., Takamatsu S. Phylogeny and taxonomy of *Erysiphe* species (powdery mildew: Erysiphaceae) occurring on the ash trees (*Fraxinus* spp.). *Mycoscience*. 2021; 62(2): 205-211. <https://doi.org/10.47371/mycosci.2020.11.009>

23. Kowalski T., Bilański P., Kraj W. Pathogenicity of fungi associated with ash dieback towards *Fraxinus excelsior*. *Plant Pathology*. 2017; 66(8): 1228-1238. <https://doi.org/10.1111/ppa.12667>

24. Kosawang C., Amby D.B., Bussaban B., McKinney L.V., Xu J., Kjær E.D., Collinge, D.B., Nielsen L.R. Fungal communities associated with species of *Fraxinus* tolerant to ash dieback, and their potential for biological control. *Fungal Biology*. 2018; 122(2-3): 110-120. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2017.11.002>

25. Wang S., Zhang J., He Y., Chang M., Meng J. Characterization of the complete mitochondrial genome of *Coprinellus micaceus*, a wild saprobic mushroom in China. *Mitochondrial DNA Part B*. 2021; 6(7): 1979-1981. <https://doi.org/10.1080/23802359.2021.1938717>

26. Papic S., Longauer R., Milenković I., Rozsypálek J. Genetic predispositions of common ash to the ash dieback caused by ash dieback fungus. *Genetika*. 2018; 50(1): 221-229.

<https://doi.org/10.2298/GENSR1801221P>

Информации об авторах / Information about the authors

И.Ю. Буракова – аспирант кафедры биохимии и биотехнологии ВГУИТ, Воронеж; младший научный сотрудник кафедры биохимии и физиологии клетки, ВГУ, Воронеж младший научный сотрудник лаборатории метагеномики и пищевых биотехнологий ВГУИТ, Воронеж, Россия

А.П. Гуреев – старший преподаватель кафедры генетики, цитологии и биоинженерии медико-биологического факультета ВГУ, Во-

I.Yu. Burakova – Postgraduate student, Department of Biochemistry and Biotechnology, VSUET, Voronezh, Russian Federation, e-mail: vitalovai@inbox.ru

A.P. Gureev – Senior Lecturer, Department of Genetics, Cytology and Bioengineering, Faculty of Medicine and Biology, VSU, Voronezh; Junior Researcher,



ронеж; младший научный сотрудник лаборатории метагеномики и пищевых биотехнологий ВГУИТ, Воронеж, Россия

Е.Ю. Аминаева – научный сотрудник отдела лесной генетики и биотехнологии ФГБУ «ВНИИЛГИСбиотех», Воронеж, Россия

С.Г. Ржевский – младший научный сотрудник отдела лесной генетики и биотехнологии ВНИИЛГИСбиотех, Воронеж, Россия

В.Н. Попов – д.б.н., профессор, заведующий кафедрой генетики, цитологии и биоинженерии медико-биологического факультета ВГУ, Воронеж; ректор ВГУИТ, Воронеж, Россия

Laboratory of Metagenomics and Food Biotechnologies, Voronezh, Russian Federation, e-mail: gureev@bio.vsu.ru

E.Yu. Amineva – researcher, Department of Forest Genetics and Biotechnology, All-Russian Research Institute of Forest Genetics, Breeding and Biotechnology (In Russian: VNIILGISbiotech), Voronezh, Russian Federation, e-mail: clena.pardaeva@mail.ru

S.G. Rzhhevskiy – Junior Researcher, Department of Forest Genetics and Biotechnology, All-Russian Research Institute of Forest Genetics, Breeding and Biotechnology (In Russian: VNIILGISbiotech), Voronezh, Russian Federation, e-mail: slavaosin@yandex.ru

V.N. Popov – Doctor of Biological Sciences, Professor, Head of the Department of Genetics, Cytology and Bioengineering, Faculty of Medicine and Biology, VSU, Voronezh; Rector of VSUET, Voronezh, Russian Federation, e-mail: pvn@bio.vsu.ru

Статья поступила в редакцию 16.11.2021; одобрена после рецензирования 08.02.2022; принята к публикации 15.02.2022.

The article was submitted 16.11.2021; approved after reviewing 08.02.2022; accepted for publication 15.02.2022.