

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Gyvybės mokslų centras

Biomokslų institutas

Mikrobiologijos ir biotechnologijos bakalauro studijų programos

IV kurso studentė

Asta JARAŠIŪTĖ

Bakalauro baigiamasis darbas

**Uosių džiūtės sukėlėjo *Hymenoscyphus fraxineus* savybių tyrimai ir
antagonistų paieška**

Darbo vadovė dr. Goda Mizerienė

Vilnius 2020

TURINYS

SANTRUMPOS	4
ĮVADAS	5
LITERATŪRINĖ ANALIZĖ	7
1.1. UOSIŲ GENTIES MEDŽIŲ PAPLITIMAS IR REIKŠMĖ	7
1.2. UOSIŲ DŽIŪTIS PASAULYJE IR LIETUVOJE	8
1.3. <i>HYMENOSCYPHUS</i> GENTIES MIKROORGANIZMAI	11
1.4. UOSIŲ DŽIŪTIES SUKĖLĖJAS <i>HYMENOSCYPHUS FRAXINEUS</i>	12
1.4.1. <i>H. FRAXINEUS</i> BENDROJI CHARAKTERISTIKA	13
1.4.2. <i>H. FRAXINEUS</i> GYVENIMO CIKLAS	15
1.4.3. <i>H. FRAXINEUS</i> KILMĖ	16
1.4.4. <i>H. FRAXINEUS</i> POPULIACIJŲ GENETIKA	18
1.4.5. <i>H. FRAXINEUS</i> VIRULENTIŠKUMAS	19
1.5. UOSIŲ DŽIŪTIES PREVENCIJOS IR APSAUGOS PRIEMONĖS	21
1.5.1. ATSPARIŲ <i>F. EXCELSIOR</i> GENOTIPŲ SELEKCIJA	22
1.5.2. BIOLOGINĖS KONTROLĖS AGENTAI KOVAI SU MEDŽIŲ LIGOMIS	23
ĮRANGA, MEDŽIAGOS IR METODAI	27
2.1. PRIETAISAI IR ĮRANGA	27
2.2. MEDŽIAGOS	27
2.3. METODAI	30
2.3.1. MĖGINIŲ SURINKIMAS	30
2.3.2. GRYNŲJŲ KULTŪRŲ IŠSKYRIMAS	30
2.3.3. GRYNŲJŲ KULTŪRŲ SUSKIRSTYMAS Į MORFOLOGINES GRUPES	31
2.3.4. <i>H. FRAXINEUS</i> POPULIACINĖ ANALIZĖ IR IZOLIATŲ ATRANKA	31
2.3.5. OPTIMALIOS MITYBINĖS TERPĖS <i>H. FRAXINEUS</i> PAIEŠKA	32
2.3.6. PATOGENIŠKUMO TESTAI <i>IN VIVO</i> ANT UOSIO ŠAKELIŲ	32
2.3.7. ANTAGONIZMO TESTAI	33
2.3.8. DNR SKYRIMAS	34
2.3.9. POLIMERAZĖS GRANDININĖ REAKCIJA (PGR)	35
2.3.10. ENDOFITINIŲ ORGANIZMŲ IDENTIFIKAVIMAS	36
REZULTATAI	37
3.1. MĖGINIŲ SURINKIMAS	37

3.2.	GRYNŲJŲ KULTŪRŲ SUSKIRSTYMAS Į MORFOLOGINES GRUPES ...	38
3.4.	OPTIMALIOS MITYBINĖS TERPĖS <i>H. FRAXINEUS</i> PAIEŠKA	41
3.5.	PATOGENIŠKUMO TESTAI <i>IN VIVO</i> ANT UOSIO ŠAKŲ	44
3.6.	ANTAGONIZMO TESTAI	47
3.7.	ENDOFITINIŲ MIKROORGANIZMŲ IDENTIFIKAVIMAS	49
	IŠVADOS	54
	REZULTATŲ SKLAIDA	55
	PADĖKA	56
	LITERATŪROS ŠALTINIAI	57
	SANTRAUKA	79
	SUMMARY	80
	PRIEDAI	81

SANTRUMPOS

- AMEA – uosių ekstrakto agaras (angl. *Ash Extract Malt Agar*)
- AP-PGR – polimerazės grandininė reakcija (angl. *Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction*)
- AS – uosių ekstraktas (angl. *Ash Sapwood Extract*)
- BCA – biologinės kontrolės agentas (angl. *Biological Control Agents*)
- BIC – Bajeso informacinis kriterijus (angl. *Bayesian Information Criterion*)
- BMR – branduolių magnetinis rezonansas
- bp – bazių pora
- CEGs – pagrindiniai eukariotiniai genai (angl. *Core Eukaryotic Genes*)
- cSNP – kopijine DNR pagrįstas vieno nukleotido polimorfizmas (angl. *cDNA-based Single Nucleotide Polymorphisms*).
- CTAB – cetiltrimetilamonio bromidas
- DAPC – pagrindinių komponentų diskriminacinė analizė (angl. *Discriminant Analysis of Principal Components*)
- EDTA – diaminoetano tetraacetinė rūgštis
- HPLC – didelio efektyvumo skysčių parengiamosios chromatografijos metodas (angl. *Preparative-Scale High Performance Liquid Chromatography*)
- ITS – transkriptų vidinis skirtukas (angl. *Internal Transcribed Spacer*)
- LDA – tiesinė diskriminacinė analizė (angl. *Linear Discriminant Analysis*)
- MEA – salyklo ekstrakto agaras (angl. *Malt Extract Agar*)
- MLG – multilokusų genotipas (angl. *Multilocus Genotype*)
- MSN – genotipus jungiantis minimalus tinklas (angl., *Minimum Spanning Network*)
- NCBI – nacionalinis biotechnologinės informacijos centras (angl. *National Center for Biotechnology Information*)
- OMA – avižų ekstrakto agaras (angl. *Oatmeal agar*)
- PCA – pagrindinių komponentų analizė (angl. *Principal Component Analysis*)
- PGI – procentinė augimo inhibicija (angl. *Potential Growth Inhibition*)
- PGR – polimerazės grandininė reakcija (angl. *Polymerase Chain Reaction*)
- PPSI-PGR – paprastų pasikartojančių sekų tarpų polimerazės grandininė reakcija (angl. *Inter Simple Sequence Repeat Polymerase Chain Reaction*)
- SB – natrio borato buferis

IVADAS

Fraxinus L. genties medžiai šiuo metu yra stipriai veikiami uosių džiūtės, kurią sukelia invazinis patogeninis grybas *Hymenoscyphus fraxineus* (T. Kowalski) Baral, Queloz & Hosoya (Díaz-Yáñez et al., 2020). Europoje ligos simptomai pirmą kartą buvo aprašyti Lenkijoje 1992-ais metais (Przybył, 2002). Lietuvoje uosių džiūtis buvo pastebėta apie 1996-us metus ir greitai išplito po didžiąją dalį Europos (Juodvalkis & Vasiliauskas, 2002). Nuo tada, dėl sanitarinių kirtimų ir medžių išvirtimo, uosynų plotas Lietuvoje sumažėjo nuo 2,7 % (1998 m.) iki 0,7 % (2018 m.) – žuvo beveik 38 000 ha uosynų (Valstybinė miškų tarnyba, 2018). Šiuo metu šalyje liga yra chroninėje stadijoje, didžioji dalis šalies medžių yra užkrėsti ir jų būklė nuolatos prastėja (Lygis et al., 2014).

H. fraxineus yra heterotalinis grybas, pasižymintis didele genotipine ir morfologine įvairove (Gross et al., 2012). Patogenas į Europą išplito atsitiktinio introdukavimo būdu iš Rytų Azijos (McMullan et al., 2018). Kadangi grybas yra invazinis, Europai būdingos *Fraxinus* rūšys, ypač *F. excelsior* L., yra labai jam jautrūs. Nepaisant to, jog yra atlikta nemažai tyrimų, iki šiol nėra patikimų priemonių su šiuo patogenu kovoti. Tai skatina ieškoti būdų sustabdyti ar bent sulėtinti *H. fraxineus* plitimą. Tuo pačiu, siekiant užtikrinti ekologišką ir ekonomišką augalų ligų kontrolę, atsiranda poreikis rasti saugių alternatyvių metodų kovoti su augalų patogenais (Latz et al., 2018). Vienas jų galėtų būti biokontrolė. Biologinės kontrolės agentais (angl. *Biological Control Agents*, *BCA*) gali būti bakterijos, grybai ir virusai, turintys neigiamą poveikį konkrečiam organizmui. Viena palankiausių strategijų – naudoti augalams-šeimininkams būdingus endofitinius mikroorganizmus, nes jie bent dalį savo gyvenimo ciklo praleidžia kolonizuodami gyvo augalo audinius, nesukeldami jokio tiesioginio, akivaizdžiai neigiamo poveikio (Bacon & White, 2016; Card et al., 2016; Hardoim et al., 2015; Rabiey et al., 2019).

Kovojant su medžių ligomis, taip pat labai svarbu suprasti patogeno genetinę ir morfologinę struktūrą. Žinių apie patogenų biologiją ir sklidimo būdus gilinimas dažnai yra perspektyviausia apsisaugojimo nuo invazijų strategija (Xhaard et al., 2012). Išsamus patogeno populiacijos genetikos išmanymas leidžia nustatyti jo kilmę, įvairovę ir invazijos kelius (Grünwald & Goss, 2011), tokiu būdu atsiveria galimybė numatyti būsimus populiacijų pokyčius bei rasti optimalias ligų kontrolės priemones epidemijų valdymui (Gross et al., 2014).

Darbo tikslas:

Ištirti turimų *H. fraxineus* izoliatų morfologines savybes bei genetinę struktūrą, atrinkti ir įvertinti potencialiai efektyvius biologinės kontrolės agentus.

Darbo uždaviniai:

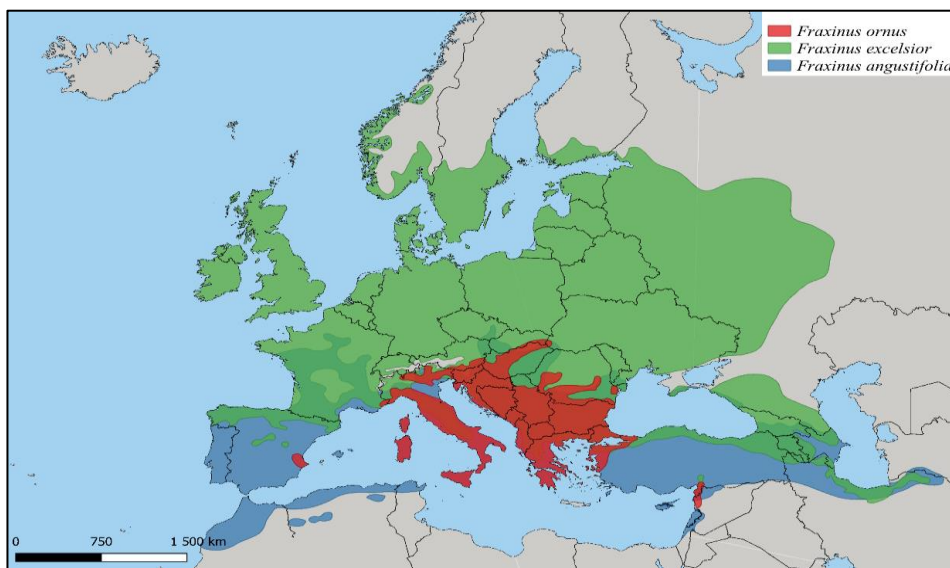
1. Atlikti turimų *H. fraxineus* izoliatų populiacinę analizę ir atrinkti reprezentatyvius izoliatų tolimesniems tyrimams;
2. Parinkti optimalią mitybinę terpę *H. fraxineus* kultivavimui;
3. Patikrinti *H. fraxineus* izoliatų patogeniškumą *in vivo* ant uosių šakelių;
4. Izoliuoti uosių endofitus, juos suskirstyti į morfologines grupes ir identifikuoti biologinei kontrolei tinkamus izoliatų;
5. Įvertinti uosių endofitų antagonistinį poveikį prieš *H. fraxineus*.

LITERATŪRINĖ ANALIZĖ

1.1. Uosių genties medžių paplitimas ir reikšmė

Uosiai – *Fraxinus* genties medžiai, priklausantys *Oleaceae* šeimai (eilė *Lamiales*, karalystė *Plantae*). Tai kosmopolitinė gentis, kurią sudaro apie 40 rūšių (Wallander, 2008) medžių ir krūmų, pasižyminčių įvairia morfologija ir augančių vidutinių platumų klimato juostoje. Genties arealas išsidėstęs Šiaurės pusrutulyje ir tęsiasi nuo Volgos upės Rytuose iki Šiaurės Amerikos krantų Vakaruose (Hinsinger et al., 2013).

Europoje natūraliai auga trys uosių rūšys: *Fraxinus excelsior* (paprastasis uosis), *F. angustifolia* Vahl (siauralapis uosis) ir *F. ornus* L. (maninis uosis) (Pav.1). Tai vasarą žaliuojantys 20 m – 30 m aukščio, iki 1,5 m kamieno skersmens medžiai, kuriems būdinga plati reta laja, dideli, neporomis plunksniški lapai. Uosiai greitai auga ir ima derėti 15 – 20 augimo metais (medelynuose 30 – 40 metais), gyvuoja 150 – 200 metų. Šie *Fraxinus* genties atstovai žydi anksti pavasarį, dar prieš skleidžiantis lapams (Butkus et al., 1976).



Pav.1. Žemėlapis vaizduoja teritorijas, kuriose aptinkami natūraliai augantys (neintrodukuoti) *F. ornus*, *F. excelsior* ir *F. angustifolia* medžiai. Rūšių pasiskirstymas žymimas skirtingomis spalvomis, dalis teritorijų persidengia, jas vaizduoja persidengiančios spalvos. Duomenys adaptuoti iš Caudullo et al. (2018).

Lietuvoje vienintelis gamtoje natūraliai augantis *Oleaceae* šeimos medis yra paprastasis uosis (*F. excelsior*) (Pliūra et al., 2017) (Pav.1), tačiau be *F. excelsior* Lietuvos miškuose dažnai auga introdukuotos *F. americana* L. (amerikinis uosis) ir *F. pennsylvanica* Marshall (pensilvaninis uosis) rūšys (Lietuvos miško genetiniai ištekliai, 2020). Kitos *Fraxinus* rūšys

Lietuvoje auginamos kaip pavieniai medžiai, dekoratyviniais tikslais (pvz., Botanikos soduose) (VU Botanikos sodas, 2020).

F. excelsior nuo kitų uosio genties rūšių skiriasi plačiais persuktais sėklų sparneliais ir juodais pumpurais. Šis medis yra reiklus dirvožemiui, geriau auga teritorijose, kuriose gausu saulės šviesos (Butkus et al., 1976). Tai didžiausias genties medis, iš kitų Europoje augančių *Fraxinus* medžių išsiskiriantis savo svarba pramonei (Douglas et al., 2013). Paprastojo uosio mediena yra kieta, lanksti ir atspari biologiniam poveikiui, pasižymi atsparumu deformacijai, yra lengvai apdorojama, todėl yra plačiai naudojama baldų, sporto įrangos bei įrankių gamybai (Douglas et al., 2013). *F. excelsior* taip pat pasižymi didele ekologine svarba: mediena, šakelės ir sėklos sudaro nemažą elninių, briedžių, stumbrų, mažesniųjų žinduolių (tokių kaip pilkieji kiškiai, miškinės pelės, rudieji pelėnai) maisto raciono dalį (Thomas, 2016). *F. excelsior* sėklos pasižymi didele maistine verte, todėl yra svarbus maisto šaltinis kai kurioms paukščių rūšims (pvz., *Pyrrhula* L.) (Thomas, 2016). Be to, daugiau nei 100 vabzdžių rūšių yra siejamos su uosiais, kurie jiems svarbūs ne tik mitybine prasme, bet ir kaip buveinė vabzdžių lervoms ar suaugėliams; dalis jų yra randami išskirtinai ant *F. excelsior* ar kitų *Fraxinus* genties medžių (Thomas, 2016). Šios genties medžiai taip pat yra svarbi kerpių, samanūnų, augalinių epifitų bei grybų buveinė (Coker et al., 2019; Johansson et al., 2007; Jönsson & Thor, 2012; Jūriado et al., 2008).

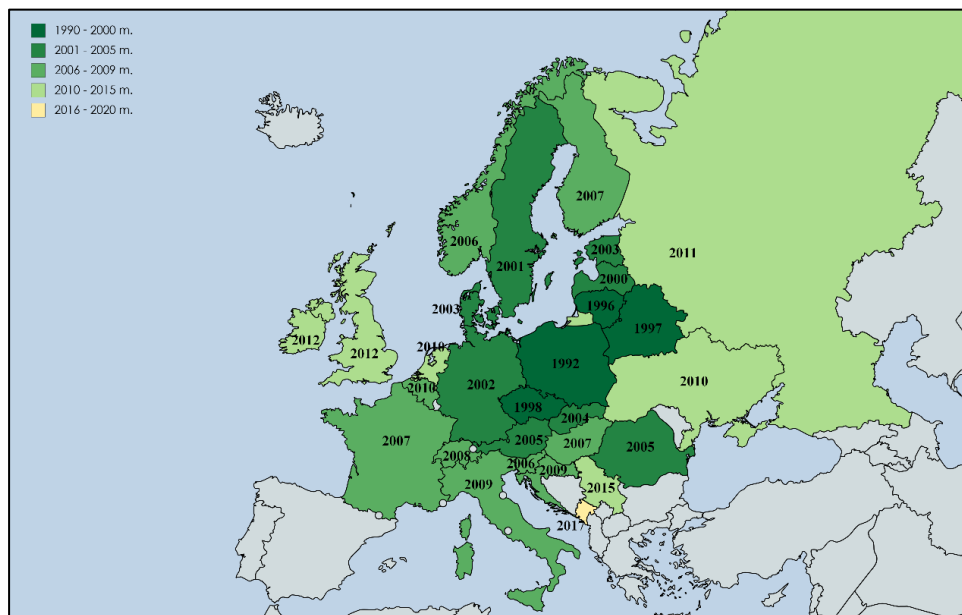
Kultūrine prasme uosis svarbus mitologijoje, jo lapai ir mediena pritaikomi tradicinėje liaudies medicinoje (Corp & Pendry, 2013; Flanagan et al., 2013; Thomas, 2016). Lietuvių mitologijoje uosis yra laikomasis kilminguoju medžiu ir simbolizuoja Pasaulio medį (siejamas su skandinavų mitologiniu Pasaulio medžiu uosiu Igdrasilu (sen. skand. *Yggdrasil*)) (Dundulienė, 2008).

Tokia neabejotina įvairiapusė šio medžio svarba padaro jo saugos klausimą aktualų kelioms skirtingoms sritims. Viena opiausių problemų, susijusių su *F. excelsior* šiuo metu, yra padidėjęs uosių mirtingumas dėl Europoje kilusios uosių džiūtės epidemijos (Díaz-Yáñez et al., 2020).

1.2. Uosių džiūtis pasaulyje ir Lietuvoje

Fraxinus genties medžiai šiuo metu yra stipriai veikiami uosių džiūtės, kurią sukelia invazinis patogeninis grybas *Hymenoscyphus fraxineus* (T. Kowalski) Baral, Queloz & Hosoya (Díaz-Yáñez et al., 2020). Europoje ligos simptomai pirmą kartą buvo pastebėti ir aprašyti Lenkijoje 1992-ais metais (Przybył, 2002) (Pav. 2). Nuo tada patogenas palaipsniui išplito po

didžiąją dalį Europos, įskaitant Jungtinės Karalystės salas (Bakys et al., 2009; Chandelier et al., 2011; Davydenko et al., 2013; Drenkhan & Hanso, 2010; Halmschlager & Kirisits, 2008; Luchi et al., 2015; Ogris, Hauptman, & Jurc, 2009; Ogris, Hauptman, Jurc, et al., 2009; Rytönen et al., 2011; Stocks et al., 2017; Szabó, 2009; Talgø et al., 2009). Šiuo metu uosių džiūtis oficialiai vis dar neaptikta Moldovoje, Bulgarijoje, Makedonijoje, Albanijoje, Graikijoje, Kosove, Bosnijoje-Hercegovinoje, Ispanijoje ir Portugalijoje (Pav. 2 pilkai pažymėtos valstybės) (CABI, 2020). Díaz-Yáñez su bendraautoriais (2020) atskleidė, jog uosių džiūtis Europoje padidino uosių medžių mirtingumą labiau, nei buvo tikimasi, – net 74 %, palyginus su duomenimis, surinktais prieš išplintant epidemijai. Mažo kamieno skersmens (5 cm – 10 cm) medžių mirtingumas padidėjo daugiau nei 2 kartus (Díaz-Yáñez et al., 2020). Tiesioginė koreliacija tarp sumažėjusio uosių augimo ir padidėjusio jų mirtingumo rodo galimą nišos praradimą, kurio metu uosiai būtų išstumti kitų, geriau prisitaikiusių medžių rūšių (Díaz-Yáñez et al., 2020).



Pav. 2. Žemėlapyje vaizduojamos valstybės, kuriose oficialiai buvo aptiktas *H. fraxineus*, su apytikslėmis uosių džiūtis pradžios datomis. Skirtingomis spalvomis žymimi skirtingi laikotarpiai, kuriais pasireiškė uosių džiūtis; tamsiai pažymėtose valstybėse liga buvo aptikta anksčiausiai. Iš žemėlapis galima spręsti apie *H. fraxineus* plitimo kryptis. Pilką spalvą pažymėtose valstybėse patogenas nebuvo aptiktas. Žemėlapis parengtas pagal CABI (www.cabi.org/isc) pateiktą informaciją.

Prasidėjus tendencingai uosių džiūčiai (XX a. paskutinis dešimtmetis), buvo manyta, jog tai abiotinio streso, ypač sausros, poveikis, kurį, galimai, sustiprino žvėrių ir vabzdžių sukelti pažeidimai (Navasaitis et al., 2003; Pukacki & Przybyl, 2005). Ligos simptomai (pvz.: medienos nekrozė ir lajos vytimas) taip pat buvo priskiriami kitų patogeninių grybų (pvz., *Armillaria* spp., *Nectria coccinea* Desm., *N. galligena* (Bres.) Rossman & Samuels,

Gleosporium sp., *Cytophoma pulchella* (Sacc.) Gutner) sukeliams pažeidimams (Juodvalkis & Vasiliauskas, 2002). Vėliau iš uosių džiūties simptomus turinčių medžių nekrotinės medienos buvo išskirtas patogeninis grybas *H. fraxineus* (Kowalski, 2006) ir taip išsiaiškintas tikrasis ligos sukėlėjas.

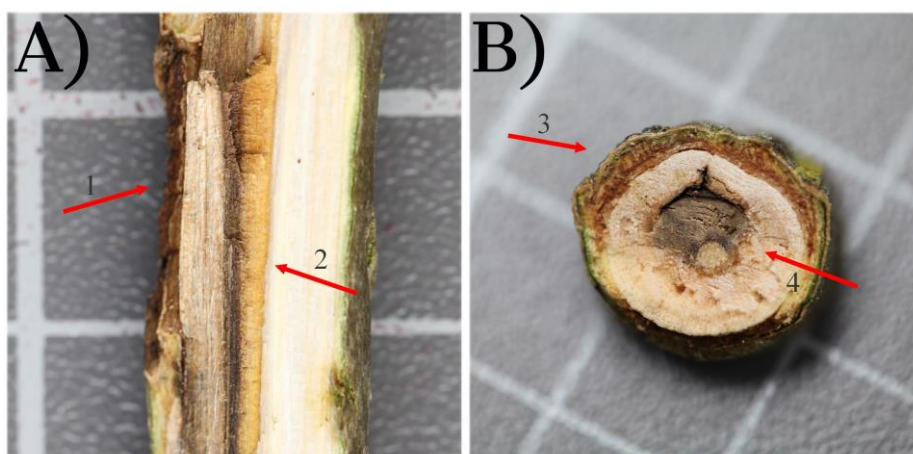
Uosių džiūčiai būdingi išoriniai simptomai apima stiprų lajos (Pav. 3 A) ir jaunų sodinukų viršūnių (Pav. 3 D) vytimą, lapų spalvos pokyčius ir ankstyvą jų kritimą, nekrotines



Pav. 3. Išoriniai uosių džiūties požymiai: A – priešlaikinis lajos vytimas, B – žievės nekrozė, C – vėžinis darinys, D – jaunų sodinukų viršūnių vytimas. Nuotraukos iš: A, D – Gamtos Tyrimų Centro Augalų patologijos laboratorijos; B, C – asmeninio archyvo.

dėmes ant stiebų ir šakelių, kurios išsivysto į žievės pažaidas (Pav. 3 B), o vėliau – į vėžinius darinius ant stiebų bei kamienų (Pav. 3 C).

Vidiniai ligos požymiai – medienos spalvos pokyčiai (Pav. 4 A, rodyklė 2), audinių nekrozė (Pav. 4 A, rodyklė 1), taip pat puviniai (Pav. 4 A, rodyklė 4) (Bakys et al., 2009). *H. fraxineus* sukelia vandens indų funkcijos sutrikimus – hifai, įaugdami į medieną, sukelia



Pav. 4. Vidiniai uosių džiūties požymiai: A – išilginis šakos pjūvis, B – skersinis šakos pjūvis. A – uosių džiūties pažeisto medžio šakos šerdies ir medienos pažeidimai (rodyklės 1, 2), B – audinių pažeidimai (rodyklės 3, 4), kurie toliau plinta į sveikus audinius. Nuotraukos iš asmeninio archyvo.

medienos ir karnienos audinių nekrozę ir taip pažeidžia vandens apytaką (Pav. 4 B, rodyklė 4) (Cleary et al., 2013; Kirisits et al., 2009). Pirmieji džiūtės simptomai pastebimi birželio – liepos mėnesiais lajos viršuje: ant šakelių ir lapkočių susiformuoja būdingos mažos nekrotinės dėmelės, vėliau, rugpjūčio – rugsėjo mėnesiais, matomas priešlaikinis lapų vytimas bei kritimas (Pav. 3 A); ligai paūmėjus, patogenas paveikia ir apatinę medžio dalį – lajos apačią, kamieną ir šaknis (Kowalski, 2006; Kräutler & Kirisits, 2012). Enderle et al. (2017) nustatė, jog džiūtės procesą labai paskatina kamieno ir šaknų puviniai, kuriuos sukelia tiek *H. fraxineus*, tiek antriniai medžių patogeniniai grybai, ypač *Armillaria* spp. Šie puviniai sergantiems medžiams yra labai pavojingi, kadangi jie sumažina medžio stabilumą ir skatina medžių virtimą, ypač audrų metu (Davydenko et al., 2019). Šaknų puviniai gali vystytis ilgą laiką, nepasireiškiant kitiems ligoms simptomams, pvz., lajos vytimui, dėl to įvertinti, ar medis serga ir kiek yra pažengusi džiūtis, sunku, kol ima virsti vizualiai sveiki medžiai (Enderle et al., 2017; Langer, 2017).

Lietuvoje uosių džiūtis buvo pastebėta apie 1996-us metus valstybės pietuose ir greitai išplito po visą šalį (Juodvalkis & Vasiliauskas, 2002). Nuo to laiko, dėl sanitarinių kirtimų ir medžių išvirtimo, uosių užimamas plotas Lietuvoje sumažėjo nuo 2,7 % (1998 m.) iki 0,7 % (2018 m.) – žuvo beveik 38 000 ha uosynų (Valstybinė miškų tarnyba, 2018). Šiuo metu Lietuvoje liga yra chroninėje stadijoje, didžioji dalis šalies medžių yra užkrėsti ir jų būklė nuolatos prastėja (Lygis et al., 2014). Kol kas vienintelė veiksminga priemonė užkirsti kelią uosių džiūčiai – sanitariniai užkrėstų miškų plotų kirtimai (Lygis et al., 2014).

1.3. *Hymenoscyphus genties mikroorganizmai*

Hymenoscyphus Gray gentis buvo išskirta 1821-ais metais, priklauso *Helotiaceae* šeimai (eilė *Helotiales*, klasė *Leotiomycetes*, skyrius *Ascomycota*) (Kirk et al., 2008). Tai plačiai pasaulyje paplitusi gentis, šiuo metu jai priskiriama apie 170-imt rūšių (Wijayawardene et al. 2017). Šios genties atstovai daugiausiai yra saprotrofai, augantys ant negyvos augalinės medžiagos, tokios kaip mediena, negyvos šakelės, vaisiai, lapai ir žoliniai stiebai (Kirk et al., 2008). Grybų vaisiakūniai – maži apoteciai, kurie varijuoja nuo baltos iki geltonos spalvos (Zheng & Zhuang, 2016). *In vitro* stebimas tik nelytinės stadijos augimas (Baral & Bemann, 2014). *Hymenoscyphus* rūšys yra identifikuojamos molekuliniiais metodais (Chandelier et al., 2010) arba vertinant morfologines organizmo charakteristikas: askomos formą, dydį ir spalvą, aukšlių formavimąsi ir jų savybes; taip pat labai svarbus kriterijus yra organizmo buveinė – daugelis *Hymenoscyphus* genties rūšių kolonizuoja medžių lapkočius ir ant jų formuoja

pseudoskleročius, iš kurių vėliau išauga vaisiakūniai (Baral & Bemmman, 2014; Zheng & Zhuang, 2016).

1.4. Uosių džiūtis sukėlėjas *Hymenoscyphus fraxineus*

Uosių džiūtis sukėlėjas pirmą kartą mokslškai aprašytas 2006-ais metais (Kowalski, 2006). Patogenas, remiantis jo morfologinėmis savybėmis, buvo įvardintas kaip *Chalara fraxinea* T. Kowalski – nauja rūšis *Chalara* gentyje (Kowalski, 2006). Vėliau, remiantis transkriptų vidinio skirtuko (angl. *Internal Transcribed Spacer, ITS*) 1¹, 5,8S ribosominės RNR geno ir ITS 2² sekoskaitos duomenimis, *C. fraxinea* buvo išskirta kaip teleomorfinė³ stadija *Hymenoscyphus albidus* (Gillet) W. Phillips (Kowalski & Holdenrieder, 2009). Nors, straipsnio autorių teigimu, buvo nustatyta, jog *C. fraxinea* ir *H. albidus* ITS sekos yra identiškos, šis faktas vėliau buvo paneigtas detalesniais tyrimais, kurie parodė keleto nukleotidų skirtumus tarp sekų (Baral & Bemmman, 2014; Bengtsson et al., 2012; Gross, Grünig, et al., 2012). *H. albidus* Europoje buvo žinomas kaip uosių endofitas jau nuo 1850-ųjų metų ir niekada anksčiau nebuvo įvardintas kaip patogenas (Queloz et al., 2011). Dėl šios priežasties buvo pradėti vykdyti detalesni tyrimai. Queloz et al. (2011) atliko genetinius ir morfologinius eksperimentus, kurių metu buvo paimti *H. albidus* mėginiai iš sveikai atrodančių uosių (Šveicarija) ir palyginti su *C. fraxinea* izoliatais iš epideminių (tuo metu) zonų (Lenkija, Šveicarija, Vokietija) bei turimais herbariumo mėginiais. *H. albidus* ir *C. fraxinea* genetinę įvairovę tyrėjai įvertino pagal morfologinius bruožus, rDNR ITS, paprastų pasikartojančių sekų intarpų polimerazės grandininės reakcijos (PPSI-PGR, angl. *Inter Simple Sequence Repeat Polymerase Chain Reaction, ISSR-PCR*) pirštų antspaudų atpažinimą (angl. *fingerprinting*), be to, norint atlikti tikslesnę filogenetinę analizę, kaip išorinė grupė buvo panaudotos *Hymenoscyphus fructigenus* (Bulliard) Gray lokusų sekos (Queloz et al., 2011). Tyrėjų atlikta filogenetinė analizė ir molekuliniai tyrimai parodė, jog tirti izoliatai gali būti suskirstyti į 2 atskiras grupes, kurių vieną sudarė izoliatai iš epideminių vietovių, kitą – išskirti iš sveikų uosių, o herbariumo mėginiai pateko į abi grupes (Queloz et al., 2011). Šie rezultatai autoriams leido padaryti išvadą, jog *H. albidus* ir *C. fraxinea* – tai dvi kriptinės rūšys (angl. *cryptic species*): jos yra identiškos morfologiškai, tačiau labai skirtingos genetiškai. Todėl *C. fraxinea* dėl savo morfologinio

¹ ITS 1 regionas yra išsidėstęs tarp 18S ir 5,8S rRNR genų.

² ITS 2 regionas yra išsidėstęs tarp 5,8S ir 28S rRNR genų.

³ Lytinis heterotalinio organizmo gyvenimo ciklo tarpsnis.

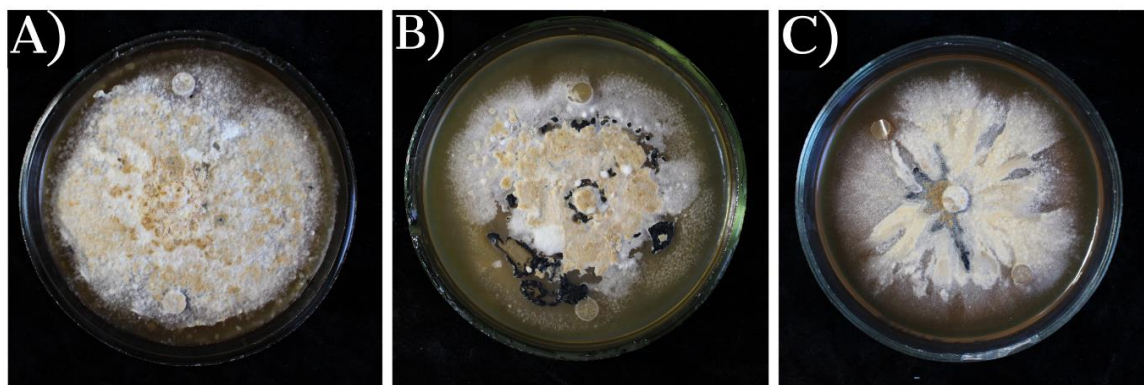
panašumo į *H. albidus* buvo perpavadinta į *Hymenoscyphus pseudoalbidus* V. Queloz, C.R. Grünig, R. Berndt, T. Kowalski, T.N. Sieber & O. Holdenrieder (Queloz et al., 2011).

Vėliau atlikti tyrimai parodė galimą *H. pseudoalbidus* paplitimą Azijos Tolimuosiuose Rytuose (Zhao et al., 2013), kur anksčiau grybas buvo identifikuotas kaip *Lambertella albida* (Gillet) Korf (sinonimas *Hymenoscyphus albidus*). Zhao et al. (2013) atlikto tyrimus, kurių metu tiriant *L. albida*, *Lambertella* spp., *Hymenoscyphus* spp. ir *Lachnum* Retzius genties atstovus (išorinė grupė), buvo palyginti jų morfologiniai ir genetiniai panašumai. Į filogenetinę analizę tyrėjai taip pat įtraukė ir Queloz et al. (2011) darbe tirtas *H. albidus* ir *H. pseudoalbidus* sekas. Mokslininkų atlikta filogenetinė analizė parodė, jog *L. albida* ir *H. pseudoalbidus* izoliatai yra priskiriami tam pačiam pogrupiui, o tai kartu su morfologinių tyrimų rezultatais patvirtino, jog *L. albida* ir *H. pseudoalbidus* yra viena rūšis, priklausanti *Hymenoscyphus* genčiai (Zhao et al., 2013). Palyginamoji sekų analizė atskleidė, jog Japonijos populiacija galimai turi didesnę genetinę įvairovę nei Europos populiacija, kas parodo įvykusį pradininko efektą (angl. *founder effect*) Europoje ir leidžia spręsti apie patogeno kilmę iš Azijos (Queloz et al., 2011; Zhao et al., 2013). Zhao et al. (2013) tyrimo metu buvo nustatyta, jog *H. albidus* ir *H. pseudoalbidus* nukleotidų sekos yra itin genetiškai stabilios ir turi aiškius tarpusavio skirtumus keliose nukleotidų pozicijose, dar kartą patvirtindami Queloz et al. (2011) tyrimo išvadas.

2014-ais metais suvienodinus nomenklatūros sistemą uosių džiūtės sukėlėjas buvo pavadintas *Hymenoscyphus fraxineus* (T. Kowalski) Baral, Queloz & Hosoya (bazionimas *Chalara fraxinea* T. Kowalski, sinonimas *Hymenoscyphus pseudoalbidus* Queloz et al.), taip oficialiai priskirtas *Hymenoscyphus* genčiai (šeima *Helotiaceae*, eilė *Helotiales*, klasė *Leotiomyces*, skyrius *Ascomycota*) (Baral et al., 2014).

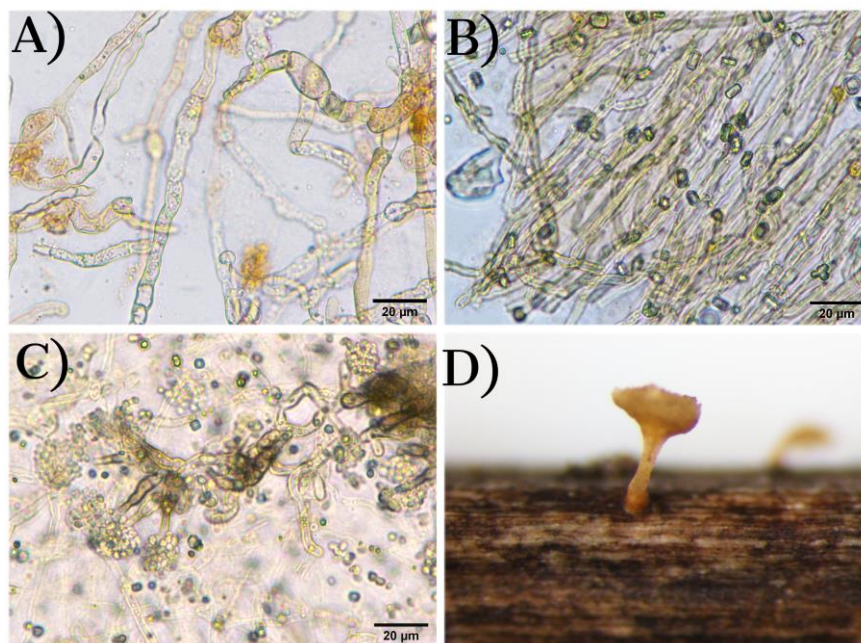
1.4.1. *H. fraxineus* bendroji charakteristika

H. fraxineus būdingos baltos, rusvos ar ryškiai rudos spalvos kultūros, tamsesnės sritys yra siejamos su sporuliacija (Gross et al., 2012) (Pav. 5). Grybas auga lėtai, maždaug 1,24 mm – 2,98 mm per dieną +21 °C temperatūroje (Carrari et al., 2015). Visgi buvo parodyta, jog kultūra gali augti greičiau ir būti morfologiškai stabilesnė auginama ant salyklo ekstrakto agaro (angl. *Malt Extract Agar*, MEA) terpės, praturtintos uosio ekstraktu (angl. *Ash Sapwood Extract*) (Gross et al., 2012). *H. fraxineus* būdingi 1,0 µm – 3,0 µm pločio hifai, kurių spalva varijuoja nuo permatomos iki tamsiai rudos (Kowalski, 2006) (Pav. 6 A ir B). Trumpos,



Pav. 5. Makroskopiniai *H. fraxineus* skirtumai. Trys izoliatai A ir B, išskirti iš uosio lapkočių bei C, išskirtas iš medienos, demonstruoja patogeno morfologinę įvairovę. Nuotraukose vaizduojamos 4 savaičių amžiaus kultūros, augintos +20 °C ant uosio ekstrakto agarą (AMEA) 10 cm skersmens Petri lėkštelėse. Nuotraukos iš asmeninio archyvo.

cilindrinės formos konidijos (Pav. 6 C), 2,0 μm – 4,0 μm $\times$ 2,0 μm – 2,5 μm dydžio, anksčiausiai kultūroje susiformavusios konidijos yra ilgesnės (Kowalski, 2006). Askomos išsisklaidę, paviršinės, nuo baltos iki kreminės spalvos, su amžiumi ir džiūdamos tamsėja, susidaro ant patamsėjusių lapkočių vietų ar negyvų ūglių (Pav. 6 D) (Kowalski, 2006). Aukšliai elipsės formos, plačiai suapvalinti viršuje, siauri apačioje, tiesūs arba šiek tiek išlenkti, 13 μm – 17 μm $\times$ 3,5 – 5,0 μm dydžio, rudi, turintys 8 askosporas (Kowalski, 2006).

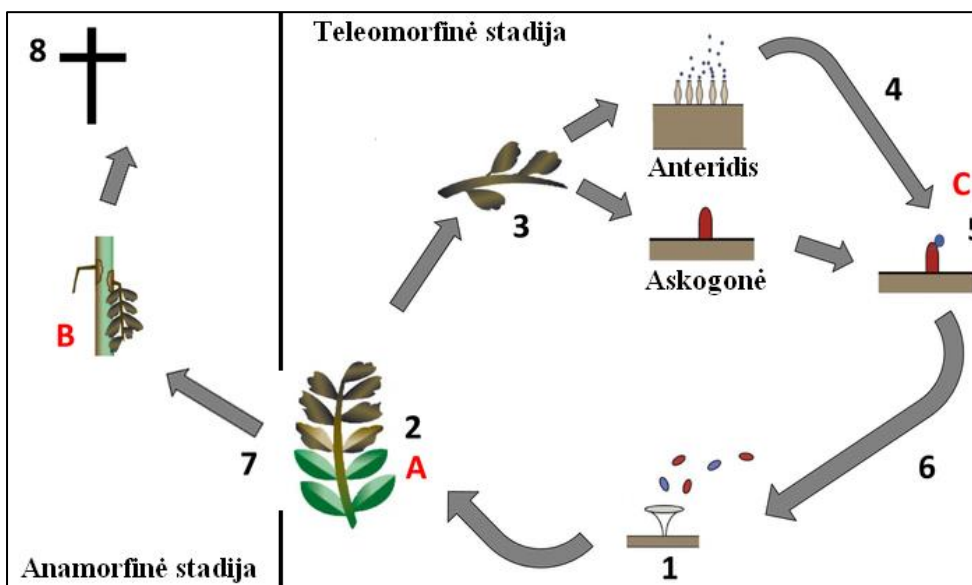


Pav. 6. Mikroskopiniai *H. fraxineus* skirtumai ir dauginimosi stadijos. Nuotraukose A – C vaizduojamos 4 savaičių amžiaus kultūros, augintos +20 °C ant AMEA terpės. Paveiksluose A ir B hifai skiriasi savo spalva ir dydžiu: A – hifai stambesni, varijuoja savo pločiu, permatomi – gelsvi, B – smulkesni, tolygaus pločio, permatomi – žalsvi. Nuotraukoje C vaizduojamos nelytinio dauginimosi struktūros – konidijos. Nuotraukoje D matoma lytinio dauginimosi stadija – makroskopinis askomos vaizdas. Nuotraukos iš asmeninio archyvo.

1.4.2. *H. fraxineus* gyvenimo ciklas

H. fraxineus yra heterotalinis⁴ grybas (Gross et al., 2012). Nelytinė šio mikroskopinio grybo stadija yra infekcinė (Pav. 7 – Anamorfinė stadija), o lytinė – atsakinga už plitimą (Pav. 7 – Teleomorfinė stadija). Visas patogeno gyvenimo ciklas vyksta ant *Fraxinus* genties medžių (Gross, Holdenrieder, et al., 2014) (Pav. 7 A, B).

Vaisiakūniai formuojasi ant pernykščių lapkočių ar šakelių vasaros – rudens laikotarpiu (Pav. 7 rodyklė 3) (Kowalski & Holdenrieder, 2009). Sporuliacija vyksta nuo birželio mėnesio iki rugsėjo pradžios, tačiau, vyraujant palankioms aplinkos sąlygoms, gali prasidėti anksčiau ir tęstis iki pat spalio mėnesio (Kowalski & Holdenrieder, 2009). Didžiausias aktyvumas stebimas liepos – rugpjūčio mėnesiais (Timmermann et al., 2011). Ant lapkočių susiformavusios lytinės, trumpai gyvuojančios askosporos (Pav. 7, rodyklė 1) yra pernešamos vėjo, prikimba prie sveikų medžių lapų ir ten sudygsa (Cleary et al., 2013). Rudenį, nukritus lapams, grybas pradeda



Pav. 7. *Hymenoscyphus fraxineus* gyvenimo ciklas: 1 – askoma ant nukritusių pernykščių lapų, produkuojanti vyriškas (mėlyna spalva) ir moteriškas (raudona spalva) aukšliasporas; 2 – lapų infekcija; 3 – negyvi lapkočiai nukrinta ant miško paklotės; 4 – anteridis ir askogonė – dvi skirtingų lytinių potencialų ląstelės, kurioms susiliejus įvyksta 5 – apvaisinimas; 6 – mejozė ir askomos formavimasis; 7 – medienos infekcija patogenų (nelytinė grybo stadija); 8 – medžio žūtis. Raudonos raidės žymi ekologinę ir evoliucinę prasme svarbius patogeno gyvenimo ciklo aspektus: A – uosių genetinę įvairovę labai svarbi jų tolerantiškumui; vienas lapas gali būti užkrėstas keletu skirtingų *H. fraxineus* genotipų; B – dėl šeiminingo gynybinių reakcijų gali prasidėti konkurencija tarp skirtingų patogeno genotipų, išliekant labiausiai virulentiškoms; C – lytinis dauginimasis lemia patogeno didelę genetinę įvairovę ir evoliucinį potencialą. Adaptuota iš Landolt et al. (2016).

⁴ Heterotalinis – turintis skirtingo lytinio potencialo individus.

formuoti juodus pseudoskleročius ant lapkočių, kartais ir ant lapų gyslų ar mažų šakelių (Kirisits et al., 2009; Kowalski & Holdenrieder, 2009) (Pav. 7, rodyklė 3). Kito vegetacinio laikotarpio metu, galimai net praėjus 1 – 2 metams, iš pseudoskleročio formuojasi nauji vaisiakūniai (Gross & Holdenrieder, 2013). Vienas lapkotis gali būti kolonizuotas keletu genetiškai skirtingų *H. fraxineus* kultūrų dėl kelių atskirų infekcijų (Pav. 7 A) (Gross et al., 2012). Konidijos – nelytinės sporos – gali būti pernešamos vėjo, patekti ant uosio lapų ar sėklų ir ten sudygti (Pav. 7, rodyklė 7). Užkrėsti lapai ir sėklos nukrinta ant miško paklotės, *H. fraxineus* toliau auga dirvožemyje bei ant nukritusių lapų ir sėklų, pasiekia uosių medžių šaknis ir jas kolonizuoja, sukeldamas naują infekciją (Cleary et al., 2012; Fones et al., 2016). Ant nukritusių lapų ir šakelių gali vykti sporuliacija (įskaitant lytinį dauginimąsi, jei yra priešingų poravimosi tipų), susiformavusios naujos sporos tuomet gali pakartotinai užkrėsti pirminį medį – šeimininką ir kitus netoliese esančius medžius (Fones et al., 2016). Toks *H. fraxineus* dauginimosi pobūdis leidžia patogenui greitai plisti – jis gali būti pernešamas vėjo, plisti per sodinukus, kurių šaknys yra infekuotos, tačiau nėra vizualių ligos simptomų; taip pat gabenant neapdorotą uosių medieną (Kirisits et al., 2009; Kowalski & Holdenrieder, 2009; Timmermann et al., 2011).

1.4.3. *H. fraxineus* kilmė

Augalų patogenų invaziją daugiausiai lemia žmonių veikla (Ghelardini et al., 2016). Taip pat labai svarbūs klimato pokyčiai, kurie gali sustiprinti patogeno prisitaikymą (angl. *fitness*), praplėsti jo buveinių plotą ar susilpninti augalą šeimininką ir taip palengvinti infekciją. (Ghelardini et al., 2016). Prisitaikymo naujoje aplinkoje sėkmė priklauso nuo patogeno genetinės įvairovės ir efektyvaus populiacijos dydžio: gausios populiacijos ir populiacijos, turinčios didelį evoliucinį potencialą, geba geriau prisitaikyti ir išgyventi (McDonald & Linde, 2002). Kita vertus, patogenų invazijos dažniausiai yra siejamos su butelio kaklelio (angl. *bottleneck effect*) arba pradininko efektais, kurie sumažina populiacijos polimorfizmą ir gebėjimą prisitaikyti. Toks reiškinys yra laikomas biologinių invazijų genetiniu paradoksu (Gladieux et al., 2015). *H. fraxineus* yra tipiškas sėkmingo atsitiktinio introdukavimo pavyzdys (Musolin et al., 2017).

Surinkus duomenis apie *H. fraxineus* genomo struktūrą bei paplitimą, buvo iškelta teorija, jog Europos populiacija galėjo kilti iš Azijos atsitiktinio introdukavimo būdu (Gross, Holdenrieder, et al., 2014; Queloz et al., 2011; Zhao et al., 2013). Šiems duomenims patvirtinti, Cleary et al. (2016) atliko tyrimą, kurio metu buvo mėginama aptikti *H. fraxineus* ant sveikų

Fraxinus mandshurica Rupr. medžių lapų, surinktų trijose skirtingose vietovėse Rusijos Tolimuosiuose Rytuose. Mokslininkai taip pat įvertino *F. mandshurica* endofitų įvairovę ir palygino su duomenimis iš Europos (Cleary et al., 2016). Mėginiai, kuriuose aptiktas patogenas, buvo atrinkti tolimesniems genetiniams tyrimams. Azijos *H. fraxineus* populiaciją tyrėjai palygino su Europos populiacija ir nustatė, jog visi izoliatai yra skirtingi (nebuvo rasta klonų), tačiau genetinė įvairovė yra didesnė Azijos populiacijoje (Cleary et al., 2016). Tyrėjai, įvertinę *F. mandshurica* endofitų įvairovę, ir palyginę ją su publikacijų duomenimis apie *F. excelsior*, nustatė, jog iš 20-ies identifikuotų organizmų 12-a yra aptinkami ir ant europinio uosio (M. Cleary et al., 2016). Tokie rezultatai leido mokslininkams padaryti išvadą, jog kolonizuodamas *F. mandshurica*, *H. fraxineus* turi dvifazį gyvenimo būdą ir gali pereiti iš endofitinės į saprotrofinę fazę. Tai paaiškina asimptominį lapų kolonizavimą, kuris lemia šeimininko toleranciją grybui (M. Cleary et al., 2016).

Drenkhan et al. (2017) atliko panašų tyrimą, kuriame buvo mėginama izoliuoti *H. fraxineus* iš džiūties simptomus turinčių *F. mandshurica* medžių medienos, lapų, vaisiakūnių, jaunų šakelių ir sėklų. Surinkti mėginiai buvo lyginami su turimais herbariumo mėginiais, surinktais 1962–2012 metais (Drenkhan et al., 2017). Tyrimo metu buvo įrodyta, jog *F. mandshurica* medžiai yra atsparesni vietinei *H. fraxineus* populiacijai; jis nėra pirminis patogenas, sukeliantis medienos pažaidas, šių medžių areale, nors ir yra atsakingas už epidemiją Europoje (Cleary et al., 2016; Drenkhan et al., 2017).

Kilmės iš mažo skaičiaus individų hipotezei patvirtinti, McMullan et al. (2018) atliko tyrimą, kuris parodė, jog patogeno populiacija Europoje iš tiesų kilo iš dviejų genetiškai skirtingų haploidinių individų. Buvo iširtas *H. fraxineus* genomas (62,27 Mbp, 20 chromosomų) bei palyginta genetinė įvairovė tarp 43-ų haploidinių izoliatų iš epideminės zonos (Jungtinės Karalystės, Norvegijos, Prancūzijos, Lenkijos ir Austrijos) ir 15-os haplotipų nuo vieno medžio iš patogeno natūralaus arealo (Japonija) (McMullan et al., 2018). Tyrimas atskleidė, jog Europos populiacijos genetinė įvairovė sudaro vos vieną aštuntąją Japonijos populiacijos genetinės įvairovės, kas leidžia teigti, kad europinėje *H. fraxineus* populiacijoje įvyko butelio kaklelio efektas (McMullan et al., 2018). Palygintos pagrindinių eukariotinių genų (angl. *core eukaryotic genes*, *CEGs*) trečiosios pozicijos (*CEGs* yra labai konservatyvių baltymų genai, būdingi visiems eukariotams (Parra et al., 2007)), parodė, jog butelio kaklelio efektas Europos populiacijoje *CEGs* skaičių sumažino nuo 12,6 (vidutinis *CEGs* skaičius Japonijos haplotipuose) iki 2,3 *CEGs* (McMullan et al., 2018). Autoriai Europos populiacijos *CEGs* sugrupavo į du skirtingus haplotipus ir iškėlė hipotezę, kad visa europinė *H. fraxineus* populiacija susiformavo iš dviejų haploidinių individų (McMullan et al., 2018). Šie rezultatai

patvirtina ankstesnėse publikacijose iškeltas hipotezes, kuriose nurodoma, kad į Europą pateko nedidelis patogeno pradų skaičius (Burokiene et al., 2015; Gross, Hosoya, et al., 2014). Įvertinus rezultatus, buvo parodyta, jog Europos *H. fraxineus* populiacijos įvairovę geriausiai atspindintis pradinės populiacijos dydis yra vidutiniškai 2,5 mln. individų – lygus vieno Japonijos medžio populiacijos skaičiui. Tai leidžia daryti išvadą, jog *H. fraxineus* į Europą galėjo patekti iš vienos vietovės, galimai – vienos askomos (McMullan et al., 2018).

1.4.4. *H. fraxineus* populiacijų genetika

Siekiant išsiaiškinti *H. fraxineus* populiacinę struktūrą, buvo atlikti detalūs molekuliniai tyrimai (Bengtsson et al., 2012; Gross, Grünig, et al., 2012; Haňáčková et al., 2015; McMullan et al., 2018). Gross ir Grünig (2012) su bendraautorais pirmieji sukūrė ir ištyrė 18 polimorfinių mikrosatelitų žymenų, leidusių tinkamai atskirti *H. fraxineus* nuo jo kriptinės rūšies *H. albidus*, ir taip palengvino tolimesnius genetinius tyrimus. Šie žymenys vėliau buvo naudoti kitų mokslininkų, tiriančių *H. fraxineus* Europos populiacijos struktūrą, kurių darbai parėmė anksčiau iškeltas hipotezes (Burokiene et al., 2015; Haňáčková et al., 2015; McMullan et al., 2018). Bengtsson et al. (2012) atliko panašią genetinę *H. fraxineus* analizę, kuria siekė iširti genetinę jo struktūrą ir patogeno ryšį su *H. albidus* rūšimi. Mokslininkai šiam tyrimui sukūrė 7 naujus mikrosatelitų žymenis ir atliko numatytą sekų polimerazės grandininę reakciją (angl. *Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction, AP-PCR*), naudodami M13 pradmenis. Išanalizavę gautus tyrimo duomenis, mokslininkai nustatė, jog tyrimo rezultatai paremia anksčiau iškeltą hipotezę apie *H. fraxineus* genetinę struktūrą (Gross, Grünig, et al., 2012). Haňáčková et al. (2015) komanda, panaudojusi 16-a Gross, Grünig, et al. (2012) sukurtų ir 5-is naujus mikrosatelitinius žymenis, ištyrė Čekijos *H. fraxineus* populiacijas 4-iose vietovėse ir pastebėjo itin žemą genetinę įvairovę, palyginus su Norvegijos ir Švedijos populiacijomis (Haňáčková et al., 2015). Mokslininkai taip pat pastebėjo netikėtai didelę diferenciaciją tarp 4-ių subpopuliacijų ir padarė išvadą, jog vietinės populiacijos dinamika gali daryti įtaką bendrai *H. fraxineus* populiacijos struktūrai (Haňáčková et al., 2015).

Svarbų indėlį atliekant *H. fraxineus* genetinės populiacijos tyrimus įdėjo ir Lietuvos tyrėjai. Burokiene et al. (2015) komanda atliko plataus masto eksperimentą, kurio metu buvo įvertinta *H. fraxineus* genetinė įvairovė ir populiacijos struktūra epideminėse (Šveicarija) bei post-epideminėse (Lietuva) vietovėse. Mokslininkai siekė nustatyti patogeno Europos populiacijos struktūrą bei galimus pokyčius jo genetinėje įvairovėje, atsiradusius epidemijai plintant. Autoriai ištyrė 847-is izoliatus (367 – iš Lietuvos, 480 – iš Šveicarijos), išskirtus iš

simptomatinių uosių lapų ir medienos, 11-oje mikrosatelitų lokusų, kuriuose aptiko 29-is skirtingus alelius (2 – 5 aleliai viename lokuse). Tyrėjai identifikavo 390 skirtingų MLG (mikrosatelitų multilokusų genotipai, angl. *microsatellite multilocus genotypes*) iš kurių 117 buvo bendrų abiem šalims (244 MLG Šveicarijos populiacijoje, 263 MLG Lietuvos populiacijoje) (Burokiene et al., 2015). Vieną MLG daugiausiai sudarė 13-a izoliatų, o 213-a jų turėjo tik po vieną atstovą. Nepaisant didelio genotipuotų izoliatų skaičiaus, buvo aptikti tik 5 nauji, prieš tai neaptikti aleliai (Burokiene et al., 2015). Priešingai nei tikėtasi, tyrėjai nepastebėjo jokios genetinės diferenciacijos ar skirtumų genetinėje įvairovėje tarp epideminių ir post-epideminių populiacijų ar tarp populiacijų nuo lapų ir populiacijų, išskirtų iš medienos (Burokiene et al., 2015). Lapų ir medienos populiacijų panašumas rodo, jog priešingai nei buvo manyta anksčiau (Gross, Holdenrieder, et al., 2014), *H. fraxineus* izoliatams nebūdingas nišų pasidalijimas (Burokiene et al., 2015). Šie rezultatai demonstruoja silpną pradininko efektą ir leidžia spręsti apie *H. fraxineus* populiacijos Europoje kilmę iš nedidelio skaičiaus skirtingų MLG, kurie vėliau lytinio dauginimosi būdu sudarė naujus MLG – visi ištirti MLG priklauso vienai grupei (Burokiene et al., 2015). Ši išvada sutampa su kitų mokslininkų tyrimų duomenimis (Bengtsson et al., 2012; Gross, Holdenrieder, et al., 2014; Schoebel et al., 2014).

1.4.5. *H. fraxineus* virulentiškumas

Nepaisant to, jog yra atlikta daugybė *H. fraxineus* molekulinį tyrimų, vis dar trūksta informacijos apie patogeno virulentiškumo priklausomybę nuo jo genetinės struktūros. Nors yra nemažai publikacijų, parodžiusių *H. fraxineus* patogeniškumą (Gross & Sieber, 2016; Kowalski & Holdenrieder, 2009a; Kowalski et al., 2015; Kräutler et al., 2015; Lösing, 2013), tik nedidelė jų dalis nagrinėja virulentiškumo skirtumus tarp atskirų patogeno izoliatų (Bakys et al., 2009; Kosawang et al., 2020; Lygis et al., 2016).

Bakys et al. (2009) komanda buvo vieni pirmųjų, kurie pasiūlė, jog *H. fraxineus* izoliatų virulentiškumas tarp izoliatų galimai skiriasi. Mokslininkų atlikti patogeniškumo tyrimai parodė, kad nors skirtumai tarp *H. fraxineus* izoliatų sukulto nekrozės ilgio nebuvo statistiškai reikšmingi (galimai dėl mažo ištirtų izoliatų skaičiaus), tačiau vidutinis kai kurių izoliatų pažeidimų ilgis buvo dvigubai ilgesnis nei kitų (Bakys et al., 2009). Autoriai iškėlė hipotezę, jog izoliatų agresyvumas gali priklausyti nuo jų genetinės struktūros (Bakys et al., 2009). Detalesnę analizę atliko Lygis et al. (2016), kurie įvertino 200-ų *H. fraxineus* izoliatų virulentiškumą. Izoliatai buvo išskirti iš dviejų tipų audinių (nekrotinės medienos ir lapkočių) bei reprezentavo 2-i vietas skirtingoje ligos stadijoje: Lietuvą (post-epideminė stadija) ir

Šveicariją (epideminė stadija). Šiuo tyrimu mokslininkai siekė įvertinti galimą uosių džiūties sunkumo sumažėjimą dėl patogeno agresyvumo mažėjimo laikui bėgant (Lygis et al., 2016). Eksperimento metu patogeniškumo testai buvo atlikti 1020-čiai *F. excelsior* sodinukų. Tyrėjai įvertino, jog 98 % visų izoliatų sukėlė nekrotines pažaidas, tačiau nei populiacijos amžius (post-epideminė / epideminė populiacijos), nei išskyrimo vieta (mediena / lapkočiai) neturėjo reikšmingos įtakos patogeno gebėjimui sukelti audinių nekrozę (Lygis et al., 2016). Autoriai pastebėjo didelius virulentiškumo skirtumus tarp izoliatų, tačiau jų nepastebėjo tarp patogeno populiacijų – mokslininkai padarė išvadą, jog *H. fraxineus* Europos populiacija yra vis dar per jauna (15 – 20 metų) skirtumams pasireikšti, arba augalo-šeimininko populiacijos dydis vis dar nėra kritinis *H. fraxineus* išgyvenamumui (Lygis et al., 2016). Mokslininkai taip pat iškėlė hipotezę, jog atskirų patogeno izoliatų virulentiškumo skirtumus galimai lemia ne vienas, o keletas genetinių faktorių (Lygis et al., 2016). Šias išvadas parėmė Kosawang et al. (2020) tyrėjų komandos neseniai atliktų eksperimentų rezultatai. Mokslininkai įvertino 19-os genetiškai skirtingų *H. fraxineus* izoliatų virulentiškumą, atlikdami *in vivo* patogeniškumo testus ant uosio sodinukų, ir palygino sukeltų nekrotinių pažaidų dydžio su izoliatų augimo greičiu *in vitro* (Kosawang et al., 2020). Tyrėjai parodė, jog nors kai kurie *H. fraxineus* izoliatai sukėlė progresuojančius pažeidimus, kiti izoliatai pasireiškė kaip labai silpni patogenai, o vienas izoliatas visiškai nepadarė jokių pažeidimų (Kosawang et al., 2020). Autorių teigimu, skirtumai tarp izoliatų gebėjimo sukelti nekrozę buvo statistiškai reikšmingi, tačiau nekoreliavo su patogeno izoliatų augimo ant mitybinės terpės intensyvumu (Kosawang et al., 2020). Tokios tyrėjų išvados parėmė anksčiau iškeltas hipotezes apie patogeno genetinį variabilumą (Bakys et al., 2009; Lygis et al., 2016), tačiau paneigė Orton et al. (2019) pasiūlytą *in vitro* kultūrų augimo greičio koreliacijos su izoliato agresyvumu hipotezę (Kosawang et al., 2020).

Nepaisant atskirų *H. fraxineus* izoliatų virulentiškumo skirtumų, didžioji dalis *F. excelsior* medžių (~95 %) yra labai jautrūs patogenui ir tik maža dalis turi dalinį genetinį atsparumą ligai (McMullan et al., 2018). *H. fraxineus* labiausiai kenkia jauniems sodinukams, kurie yra mažiausiai atsparūs patogenui ir todėl miršta per kelis pirmuosius metus (Heinze et al., 2017). Ilgaamžiuose medžiuose išsivystę džiūties simptomai ne tik juos silpnina tiesiogiai, bet ir sumažina jų atsparumą kitiems uosių patogenams (Heinze et al., 2017), kurių sukeltos ligos kartu su išoriniu aplinkos sąlygų poveikiu neretai ir tampa žūties priežastimi (Davydenko et al., 2019).

Pietinėje Europos dalyje paplitusios uosių rūšies *F. angustifolia* jautrumas ligai prilygsta *F. excelsior* arba yra šiek tiek mažesnis (T. Kirisits et al., 2009; Schwanda & Kirisits, 2016). Schwanda & Kirisits (2016) 2010–2011 m. atliko eksperimentus su visomis Europai būdingoms

uosių rūšims: *F. excelsior*, *F. angustifolia* ir *F. ornus*. Tyrėjai parodė, jog didžiausią atsparumą turi *F. ornus*, o labiausiai pažeisti buvo *F. excelsior* (2010 m.) ir *F. angustifolia* (2011 m.). Kadangi *F. ornus* nėra toks jautrus kaip kitos prieš tai paminėtos *Fraxinus* rūšys, autoriai teigia, jog jam uosių džiūtis Europoje kelia mažiausią grėsmę (Schwanda & Kirisits, 2016).

Nepaisant patogeniškumo kitoms *Fraxinus* rūšims, *H. fraxineus* Azijoje yra aptinkamas vizualiai sveikoje uosio medienoje ant *F. mandshurica* (Hosoya et al., 1993), o tai leidžia spręsti, jog mandžuriniam uosiui jis nėra patogenas (Gross & Han, 2015; Han et al., 2014; Hosoya et al., 1993; Zhao et al., 2013; Zheng & Zhuang, 2013).

Visiškai naują metodą *F. excelsior* genetinei įvairovei įvertinti pasiūlė Harper et al. (2016). Mokslininkų komanda pirmieji pasitelkė asociatyviąją transkriptomiką (angl. *associative transcriptomics*, AT) ieškodami žymenų, lemiančių *Fraxinus* medžių jautrumą uosių džiūčiai. Iš 5-ių uosių rūšių (*F. excelsior*, *Fraxinus mariesii* Hook. f., *F. mandshurica*, *F. americana*, *F. ornus*) buvo atrinkti džiūtės simptomus turintys medžiai iš skirtingų vietovių ir panaudoti kaip platforma asociacijų modeliui kurti. Tyrėjai nustatė, jog už uosių jautrumą ligai galima įvertinti pagal cSNP⁵ ir MADS-dėžutės⁶ motyvus. Gauti rezultatai atitiko kitų mokslininkų tyrimų išvadas, dar kartą patvirtindami *F. mariesii*, *F. mandshurica*, *F. americana*, *F. ornus* medžių atsparumą *H. fraxineus* (Harper et al., 2016; Schwanda & Kirisits, 2016; Zhao et al., 2013). Nors toks metodas niekada anksčiau nebuvo panaudotas šiuo tikslu, mokslininkams pavyko sukurti modelį, kuriuo naudojantis įmanoma įvertinti konkretaus uosio individo genetinį atsparumą uosių džiūčiai (Harper et al., 2016).

1.5. Uosių džiūtės prevencijos ir apsaugos priemonės

Sanitarinės priemonės, tokios kaip užkrėstų šakų ir šakelių pašalinimas, gali būti naudojamos užkirsti kelią ligos progresavimui pavieniui augančiuose medžiuose (Halecker et

⁵ Kopijine DNR pagrįstas vieno nukleotido polimorfizmas (angl. *cDNA-based single nucleotide polymorphisms*, cSNP).

⁶ MADS-dėžutė yra konservatyvus MADS domeno (apie 58 aminorūgščių ilgio seka) maždaug 174 DNR nukleotidų ilgio motyvas. Genai, kuriuose yra šis motyvas, yra vadinami MADS-dėžutės genų šeima (Schwarz-Sommer et al., 1990). Santrumpa „MADS“ ir terminas „MADS dėžutės baltymas“ buvo sugalvoti pagal keturis pirmuosius nustatytus genus: MINICHROMOSOME MAINTENANCE FACTOR 1 (MCM1) iš *S. cerevisiae*, AGAMOUS (AG) iš *A. thaliana*, DEFICIENS (DEF) iš *A. majus* ir *Homo sapiens* SERUM RESPONSE FACTOR (SRF) (Theissen & Gramzow, 2016). MADS domeno baltymai paprastai yra transkripcijos veiksniai (West et al., 1997).

al., 2020; McKinney et al., 2012), ypač miestuose ir parkuose, kur dažnai yra sodinami dėl savo gero prisitaikymo prie įvairių aplinkos sąlygų (Volke et al., 2019). Visgi tokia priemonė daugiausiai naudojama tik vizualiai pagerinti atvirose vietose augančių medžių išvaizdą (Halecker et al., 2020). Miestuose esančios aplinkos sąlygos (eismo metu išmetamos kenksmingos medžiagos, temperatūros ir oro drėgmės pokyčiai, paviršių priežiūra, pvz., lapų grėbimas, druskos barstymas keliuose žiemą ir kt.) neigiamai veikia *H. fraxineus* gyvenimo ciklą, todėl uosių džiūtis miestuose taip greitai neprogresuoja (Volke et al., 2019). Kita vertus, miškuose stebimas greitas ligos plitimas (30 km – 75 km per metus (Gross, Holdenrieder, et al., 2014)) – kuo didesnis uosio medžių tankis, tuo lengviau patogenui infekuoti šalia esančius sveikus medžius (Landolt et al., 2016; Rosenvald et al., 2015), be to, uosių džiūties simptomai sunkesni nei atvirose vietovėse (Landolt et al., 2016; Rosenvald et al., 2015). Deja, kol kas nėra rasta saugių ir efektyvių priemonių kovoti su liga miškuose (detaliau aptarta 1.5.2) (Lygis et al., 2014), todėl šiuo metu aktyviai ieškoma galimų sprendimo būdų bei metodų uosių džiūčiai sustabdyti ar gydyti, kuriuos būtų galima pritaikyti ateityje (Broome et al., 2019; Cleary et al., 2016; Davydenko et al., 2019; Enderle et al., 2017; Halecker et al., 2020; Haňáčková et al., 2017; Hrabětová et al., 2017; Kosawang et al., 2018; Lygis et al., 2014).

1.5.1. Atsparių *F. excelsior* genotipų selekcija

Kadangi individualūs medžiai varijuoja tarpusavyje savo pažeidžiamumu, vienas iš galimų būdų išsaugoti uosius yra ligai iš dalies atsparių genotipų selekcija (Enderle et al., 2015, 2017; Landolt et al., 2016; Pliūra et al., 2011, 2017). Pliūra (2011) su kolegomis atliko tyrimą, kurio tikslas buvo įvertinti genetinį kintamumą bei atsparumo *H. fraxineus* lygį uosių populiacijose ir parinkti iš dalies atsparius augalus tolimesniam jų selekcijai. Mokslininkai ištyrė 320 *F. excelsior* šeimų⁷ iš dešimties Lietuvos ir keturiolikos Europos populiacijų (iš viso 27 000 medžių) (Pliūra et al., 2011). Gauti rezultatai leido daryti išvadą, kad *F. excelsior* atsparumas uosių džiūčiai yra genetiškai nulemtas ir paveldimas, o tai leidžia iš anksto pasirinkti atsparius genotipus jų veisimui, siekiant išsaugoti uosių populiaciją (Pliūra et al., 2011). Atsižvelgiant į teigiamus pirminius rezultatus, mokslininkai vykdė tolimesnius tyrimus,

⁷ Miškininkystėje terminas „šeima“ naudojamas apibūdinti artimai susijusių genotipų grupę: organizmus, turinčius vieną (angl. *half-sib*) arba abu (angl. *full-sib*) bendrus tėvinius organizmus (Kshandakar, 2018).

kurių metu buvo atrinkti 50 uosių džiučiai atsparių medelių ir vykdyta transplantacija⁸ (Pliūra et al., 2014). Tyrimai parodė, jog po dviejų augimo sezonų po transplantacijos žymiai padidėjo ligos atvejų skaičius ir medžių pažeidimo laipsnis (Pliūra et al., 2014). Nepaisant to, mokslininkai įvertino, jog klonuose uosių džiuties pasireiškimo dažnis buvo mažesnis nei neigiamoje kontrolėje, kas suteikia geras perspektyvas atsparių genotipų veisimui ateityje (Pliūra et al., 2014). Šiuos rezultatus vėliau parėmė keletas kitų uosių genetinio atsparumo *H. fraxineus* tyrimų (Enderle et al., 2015, 2017; Landolt et al., 2016), tačiau kol kas išlieka poreikis atlikti ilgalaikius tyrimus, norint išsiaiškinti, ar klonai, kurie šiuo metu atrodo atsparūs *H. fraxineus*, išlaikys savo atsparumą patogenui (Enderle et al., 2015, 2017).

Kloninė selekcija, siekiant kovoti su kitomis medžių ligomis, buvo pritaikyta anksčiau (Bettinger et al., 2009; Franclet & Boulay, 1989; Leakey, 1987; Swedjemark et al., 1998; Xavier & Otoni, 2009). Vienas tokių pavyzdžių – kelių dešimtmečių darbas su šaknine pintimi (*Heterobasidion annosum* (fr.) bref.), sukeliančia margąjį korozinį spygliuočių šaknų puvinį (Asiegbu et al., 1994; Asiegbu et al., 2005; Laine, 1976). Siekiant išsaugoti *Pinus sylvestris* L. populiaciją, buvo atliekama kloninė selekcija, tačiau atsparių genotipų atranka labai apribojo medžių genetinę įvairovę (Rieksts-Riekstiņš et al., 2020; Vasiliauskas, 2001). Dėl to dažnai yra pažymima, jog kloninei miškininkystei neturėtų būti teikiama pirmenybė kovojant su medžių ligomis – ji riboja natūralią rūšių genetinę įvairovę, o klonai, būdami atsparūs vienai ligai, gali būti jautrūs kitoms ligoms ar kenkėjams (Kumar, 2016; Wu, 2019). Harper et al. (2016) pasiūlė, jog užuot atrinkę labai mažą skaičių labai tolerantiškų medžių (dėl kurių trūktų genetinės įvairovės), būtų galima nustatyti daugybę genetiškai skirtingų individų pagal šių mokslininkų sukurtą asociatyviosios transkriptomikos modelį. Tokiu būdu būtų išlaikyta genetinė įvairovė, tuo pačiu greitai atkuriant uosių medžių populiacijas (Harper et al., 2016). Visgi kol kas tokia strategija nebuvo praktiškai įgyvendinta ir reikalauja detalesnių tyrimų, todėl turėtų būti ieškoma ir kitų alternatyvų kovojant su uosių džiutimi.

1.5.2. Biologinės kontrolės agentai kovai su medžių ligomis

Hrabětová et al. (2017) parodė, jog įvairūs fungicidai, kaip ir buvo galima tikėtis, efektyviai naikina uosių džiuties patogeną, tačiau jie negali būti pritaikyti plačiu mastu dėl savo

⁸ Transplantacija yra terminas, naudojamas apibūdinti medžių persodinimą iš vienos vietos į kitą. Dėl medžių šaknų sistemos apimties ir morfologijos, persodinant medžius paprastai pašalinamos šaknys (Pryor & Watson, 2016).

kenksmingo poveikio kitiems organizmams. Siekiant užtikrinti ekologišką ir ekonomišką augalų ligų kontrolę, atsiranda poreikis rasti saugių alternatyvių metodų kovoti su augalų patogenais (Latz et al., 2018). Vienas jų – biokontrolė⁹. Biologinės kontrolės agentais gali būti bakterijos, grybai ir virusai, turintys neigiamą poveikį konkrečiam organizmui. Deja, jų kūrimas ir komercializavimas šiuo metu vis dar yra ribotas procesas (Latz et al., 2018). Daugybė biokontrolės tyrimų atliekama kontroliuojamomis laboratorinėmis sąlygomis (Spadaro & Gullino, 2005), todėl perkėlus į lauko sąlygas, biokontrolės agentų veiklą dažnai riboja įvairūs aplinkos veiksniai (Köhl et al., 2011). Šios problemos galima išvengti naudojant augalams-šeimininkams pritaikytus endofitinius¹⁰ mikroorganizmus, nes jie bent dalį savo gyvenimo ciklo praleidžia kolonizuodami gyvo augalo audinius, nesukeldami jokio tiesioginio, akivaizdžiai neigiamo poveikio (Bacon & White, 2016; Card et al., 2016; Hardoim et al., 2015; Rabiey et al., 2019). Kai kurie endofitiniai mikroorganizmai, naudodami augalą kaip buveinę ir mitybos šaltinį, yra naudingi augalui šeimininkui, nes skatina jo augimą, vystymąsi, adaptaciją ir atsparumą stresui bei ligoms (Bacon & White, 2016; Rabiey et al., 2019; Saikkonen et al., 1998; Wani et al., 2015). Biokontrolės agentams, taigi ir endofitams, paprastai yra būdingi keturi kontrolės principų tipai: 1) konkurencija dėl vietos ir maistinių medžiagų, 2) tiesioginis slopinimas (antibiozė), 3) mikoparazitizmas ir 4) sukeltas atsparumas augale suaktyvinus gynybos sistemą (Heydari & Pessarakli, 2010; Latz et al., 2018; Zabalgogezcoa, 2008). Dažnai vienu metu veikia keli mechanizmai (Latz et al., 2018).

Yra atlikta nemažai tyrimų, siekiant surasti galimų biokontrolės agentų uosių džiūties kontrolei (Čermáková et al., 2017; Halecker et al., 2020; Haňáčková et al., 2017; Kosawang et al., 2018; Schoebel et al., 2014). Schoebel (2014) su bendraautoriais atliko molekulinis *H. fraxineus* tyrimus 233-ims izolatams iš Šveicarijos, Lenkijos, Vokietijos, Lietuvos ir Japonijos, siekdami identifikuoti *H. fraxineus* mikovirusus, kuriuos būtų galima panaudoti kaip uosių džiūties biokontrolės agentus¹¹. Mokslininkams pavyko aptikti mikovirusą, kuris buvo

⁹ Biologinė kontrolė apibrėžiama kaip vabzdžių, piktžolių ir ligų valdymo būdas naudojant natūralius jų kenkėjus ar juos neigiamai veikiančius kitus organizmus.

¹⁰ Endofitai yra apibrėžiami kaip mikroorganizmai, kurie bent dalį savo gyvenimo ciklo praleidžia gyvuose šeimininko audiniuose (tarpląstelinėse erdmėse, audinių erdmėse ar apytakos induose), nesukelė akivaizdžios žalos augalui (Rabiey et al., 2019).

¹¹ Grybų virusai (mikovirusai) yra randami visose pagrindinėse augalų patogeninių grybų grupėse (Schoebel et al., 2014). Dauguma mikovirusų yra dvigrandės RNR virusai (Ghabrial & Suzuki, 2008). Nustatyta, kad kai kurie iš šių virusų sukelia sekinančias ligas savo grybams - šeimininkams arba mažina jų virulentiškumą (Pearson et al., 2009).

pavadintas *Hymenoscyphus fraxineus mitovirus 1* (HfMV1) (Schoebel et al., 2014). Nors jo patogeniškumas *H. fraxineus* nebuvo parodytas, tyrėjai nustatė greitus genetinius HfMV1 genomo pokyčius, kurie suteikia biokontrollei tinkamo HfMV1 varianto atsiradimo perspektyvą ateityje (Schoebel et al., 2014, 2017).

Šiuo metu yra atliekama nemažai tyrimų, siekiant įvertinti uosių endofitų įvairovę ir galimą antagonistinį jų poveikį *H. fraxineus* (Halecker et al., 2020; Haňáčková et al., 2017; Kosawang et al., 2018; Lahiri et al., 2019; Schlegel et al., 2016; Scholtysik et al., 2013). Haňáčková (2017) su kolegomis atliko tyrimą, kurio metu buvo įvertintas *F. excelsior* grybų bendruomenės kitimas priklausomai nuo medžio būklės (uosių džiūties pasireiškimo laipsnio) bei metų laiko ir atlikti antagonizmo testai tarp rastų endofitų ir *H. fraxineus* izoliatų (Haňáčková et al., 2017). Buvo nustatyta, jog dalis uosio aplinkoje rastų endofitų sumažino *H. fraxineus* augimą (Haňáčková et al., 2017). Mokslininkų teigimu, uosių džiūčiai atsparesni medžiai pasižymėjo didesne rūšine grybų įvairove, tačiau reikšmingų skirtumų tarp bendruomenės struktūrų nebuvo rasta (Haňáčková et al., 2017). Autoriai padarė išvadą, jog endofitų bendrija daro mažą poveikį *H. fraxineus* slopinimui, o geresnės sveikatos būklės medžiai ginasi kitais mechanizmais (Haňáčková et al., 2017). Nors *in vitro* patogeniškumo testai parodė endofitų įtaką *H. fraxineus* augimui, taip pat buvo pastebėtas neigiamas *H. fraxineus* poveikis endofitams. Dėl šių priežasčių mokslininkai padarė išvadą, jog daugelis ištirtų rūšių nėra kliūtis *H. fraxineus*, tačiau neatmetė galimybės, jog yra perspektyva ateityje atrasti endofitą (-us), kurį (-iuos) būtų galima panaudoti kaip biokontrolės agentą (-us) kovai su uosių džiūtimi (Haňáčková et al., 2017).

Kosawang (2018) su bendraautoriais iškėlė hipotezę, jog tolerantiškų ar iš dalies tolerantiškų uosių rūšių grybų endofitinės bendruomenės galimai apsaugo šias rūšis nuo uosių džiūties ir kad tokie endofitai galėtų būti panaudoti kaip biokontrolės agentai prieš *H. fraxineus*. Siekdami patikrinti šias hipotezes, tyrėjai išskyrė *Fraxinus lanuginosa* Koidz, *F. pennsylvanica*, *F. ornus*, *F. chinensis* subsp. *rhynchophylla* (Hance) A. E. Murray, ir *F. mandshurica* grybų bendruomenių narius ir juos identifikavo (Kosawang et al., 2018). Endofitų antagonistiniam poveikiui patikrinti, tyrėjai atliko *in vitro* testus prieš vieną *H. fraxineus* izoliatą (Kosawang et al., 2018). Mokslininkai nustatė, kad *H. fraxineus* slopinančių endofitų buvo visose uosių rūšyse, nors jų gebėjimas slopinti patogeną *in vitro* labai skyrėsi (Kosawang et al., 2018). Autorių teigimu, gauti rezultatai patvirtina ankstesnių tyrimų išvadas (Haňáčková et al., 2017; Schlegel et al., 2016), tačiau reikalauja eksperimentų *in vivo*, kad būtų galima ištirti endofitų įtaką šeimininko gynybos mechanizmomams ir galbūt apibūdinti endofitų išskiriamas

antimikrobines medžiagas, kurios galėtų būti naudojamos kaip biopesticidai prieš *H. fraxineus* (Kosawang et al., 2018).

Būtent tokius tyrimus atliko Halecker (2020) su bendraautoriais. Tyrėjai izoliavo 340 *F. excelsior* endofitinių grybų ir patikrino jų antagonistinį poveikį 5-iems *H. fraxineus* izoliatams *in vitro*. Mokslininkai taip pat inokuliavo akseninius¹² *F. excelsior* sodinukus 8-iais endofitais, kurie parodė antagonistinį poveikį *in vitro* eksperimente, siekdami užtikrinti, jog izoliatai geba kolonizuoti medelius, o jų kolonizacija nesukelia ligos simptomų. (Halecker et al., 2020). Testų rezultatai parodė, jog 7-i endofitai sukėlė ligos simptomus ir tik vienas endofitas *F. excelsior* kolonizavo asimptomiškai; autorių teigimu, toks dėsningumas pabrėžia *in vivo* eksperimentų svarbą, kadangi *in vitro* eksperimentai negali pilnai atspindėti patogeno–endofito–augalo šeimininko tikrųjų sąveikų (Halecker et al., 2020). Antagonistinį poveikį parodžiusį izoliatą mokslininkai identifikavo kaip askomicetą *Hypoxylon rubiginosum* (Persoon) Fries (gentis *Hypoxylon*, šeima *Xylariaceae*). Tyrėjai, panaudoję didelio efektyvumo skysčių parengiamosios chromatografijos metodą (angl. *preparative-scale high performance liquid chromatography, HPLC*), išskyrė metabolitus iš *H. fraxineus* ir *H. rubiginosum* kultūrų bei ištyrė jų struktūrą branduolių magnetinio rezonanso (BMR) spektroskopijos (angl. *Nuclear magnetic resonance spectroscopy, NMR*) ir masių spektrometrijos (angl. *High resolution mass spectrometry, HR-MS*) metodais (Halecker et al., 2020). Mokslininkams pavyko identifikuoti jau anksčiau žinomą fitotoksiną viridiolį kaip pagrindinį *H. fraxineus* metabolitą kultūroje su endofitu ir iš anksčiau žinomą priešgrybelinį metabolitą fomopsidiną kaip pagrindinį antrinį *H. rubiginosum* metabolitą; be to, tyrėjams pavyko išskirti naują šio metabolito derivatą 10-hidroksifomopsidiną (Halecker et al., 2020). Omopsidinas veikia eukariotų citoskeletą, taip slopindamas patogeno augimą, tačiau šis metabolitas taip pat turi silpną citotoksinį poveikį (Halecker et al., 2020). Visgi autoriai pabrėžia, jog tai, kad *H. rubiginosum* auga asimptomiškai ant uosio medžių leidžia tikėtis, jog ateityje *H. rubiginosum* arba kelių endofitų derinys gali būti pritaikyti kaip efektyvūs biokontrolės agentai prieš uosių džiūties patogeną (Halecker et al., 2020).

¹² Neužteršti ir nesusieti su jokiais kitais gyvais organizmais; kultūros, kuriose visiškai nėra kitų organizmų.

2.1. Prietaisai ir įranga

Tyrimo metu naudota įranga ir prietaisai:

- Mitybinių terpių ruošimui ir sterilizavimui: autoklavas Multicontrol 121/181 (CertoClav, Austrija).
- Grynųjų kultūrų išskyrimui: II-os klasės laminariniai boksai CellGard (NUAIRE, JAV); mikroskopas 102M (Motic, Didžioji Britanija); mikroskopas Eclipse Ci-E (Nikon, Didžioji Britanija), mikroskopas SMZ800N (Nikon, Didžioji Britanija).
- DNR išskyrimui ir koncentracijos nustatymui: homogenizatorius FastPrep Bio101 (Savant, JAV); centrifuga MiniSpin (Eppendorf, Vokietija); centrifuga Heraeus FRESCO 21 (Thermo Scientific, JAV); centrifuga Galaxy mini (VWR, JAV); kaitinimo blokas (Grant, Didžioji Britanija), nanospektrofotometras P330 (Implen, Vokietija).
- PGR metodei – termocikleris Veriti 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, JAV); termocikleris A6 (Nyx Technik, JAV).
- Elektroforezei – elektroforezės aparatas Sub-Cell® GT (Bio-Rad, JAV); DNR elektroforezės šaltinis EPS 301 (Amersham Biosciences, JAV).
- DNR fragmentų vizualizavimui – gelių dokumentavimo sistema Fire Reader (UVitec Cambridge, Didžioji Britanija).

2.2. Medžiagos

Tyrimo metu naudotos medžiagos:

- Tiriamojo darbo metu naudotų terpių ir tirpalų sudėtinės dalys ir jų koncentracijos pateiktos lentelėje (Lentelė 1). Mitybinės terpės autoklavuojamos 30 min. +121 °C temperatūroje 1,25 atm slėgyje.

Lentelė 1. Eksperimente naudotų terpių sudėtis ir medžiagų koncentracijos.

<i>Pavadinimas</i>	<i>Medžiagų sudėtinės dalys</i>	<i>Medžiagų koncentracijos</i>
<i>Uosių ekstrakto agaras (AMEA) (Kirisits et al., 2013)</i>	Agaras	25 g/l
	Uosio ekstraktas	200 ml/l
	Salyklo ekstraktas	20 g/l
	Distiliuotas vanduo	0,8 l
<i>Uosio ekstraktas (Philp et al., 1995)</i>	Paprastojo uosio (<i>Fraxinus excelsior</i>) mediena ir lapai	20 g/l
	Distiliuotas vanduo	1,0 l
<i>AS agaras (Brasier & Webber, 2013)</i>	Paprastojo uosio (<i>F. excelsior</i>) mediena ir lapai	20 g/l
	Agaras	25 g/l
	Salyklo ekstraktas	20 g/l
	Distiliuotas vanduo	1,0 l
<i>Avižų ekstrakto agaras (OMA) (Foster & Bills, 2011)</i>	Avižos	20 g/l
	Agaras	25 g/l
	Salyklo ekstraktas	20 g/l
	Distiliuotas vanduo	1,0 l
<i>AS + OMA terpė (Brasier & Webber, 2013; Foster & Bills, 2011)</i>	Avižų ekstraktas	200 ml/l
	Agaras	25 g/l
	Salyklo ekstraktas	20 g/l
	Paprastojo uosio (<i>F. excelsior</i>) mediena ir lapai	20 g/l
	Distiliuotas vanduo	0,9 l
	V8 ekstraktas	0,2 l
<i>V8 agaras (Miller et al., 1955)</i>	Salyklo ekstraktas	20 g/l
	Agaras	25 g/l
	Distiliuotas vanduo	0,8 l
	V8 ekstraktas	0,2 l
<i>V8 + AS agaras (Brasier & Webber, 2013; Miller et al., 1955)</i>	Salyklo ekstraktas	20 g/l
	Agaras	25 g/l
	Distiliuotas vanduo	0,8 l
	Paprastojo uosio (<i>F. excelsior</i>) mediena ir lapai	20 g/l
	V8 ekstraktas	0,2 l
	Salyklo ekstraktas	20 g/l

- Augalinės medžiagos paviršių sterilinimui naudotas etilo alkoholis (C_2H_5OH) (Stumbras, Lietuva).
- DNR skyrimui naudotos medžiagos: CTAB ($C_{19}H_{42}BrN$) (G Biosciences, JAV); druskos rūgštis (Tris-HCl) ($C_4H_{11}NO_3 \cdot HCl$) (Alfa Aesar, Vokietija); etilendiamintetraacto rūgštis (EDTA) ($C_{10}H_{16}N_2O_8$) (Fluka, Vokietija); natrio chloridas (NaCl) (Fluka, Vokietija); chloroformas ($CHCl_3$) (Fisher Chemical, Prancūzija); izopropanolis (C_3H_8O) (Fisher Chemical, Prancūzija), etilo alkoholis (C_2H_5OH) (Stumbras, Lietuva). (Lentelė 2)
- PGR metodui naudotos medžiagos: DNR polimerazė DreamTaq (Thermo Fisher Scientific, Lietuva), dNTP mišinys (Thermo Fisher Scientific, Lietuva), magnio chloridas ($MgCl_2$) (Thermo Fisher Scientific, Lietuva), 10X DreamTaq Green buferis (Thermo Fisher Scientific, Lietuva).
- Elektroforezei naudotos medžiagos: natrio šarmas (NaOH); boro rūgštis ($B(OH)_3$), agarozė, Gel Green dažas, molekulinio svorio markeris (Thermo Fisher Scientific, Lietuva).

Lentelė 2. Eksperimente naudotų cheminių medžiagų sudėtis ir koncentracijos.

<i>Pavadinimas</i>	<i>Naudotų medžiagų sudėtinės dalys</i>	<i>Naudotų medžiagų koncentracijos</i>
<i>CTAB tirpalas (3%)</i>	CTAB milteliai	0,03 g / ml
	Tris-HCl (1 M)	150 μ l / ml
	EDTA (0,5 M)	4 μ l / ml
	NaCl (5 M)	520 μ l / ml
	Distiliuotas vanduo	330 μ l / ml
<i>Natrio borato (SB) buferinis tirpalas</i>	NaOH	8 g/l
	$B(OH)_3$	47 g/l
	Dejonizuotas vanduo	Iki 1 l

Tiriamąjį darbo metu naudoti oligonukleotidiniai pradmenys, jų sekos bei PGR produkto dydžiai pateikti 3 lentelėje.

Lentelė 3. Tiriamojo darbo metu naudoti oligonukleotidiniai pradmenys.

Pradmuo	Seka 5'– 3'	Tipas	Pradmens autorius
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	Tiesioginis	White et al. (1990)
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	Atvirkštinis	White et al. (1990)

Visi eksperimentai vykdyti Augalų patologijos laboratorijoje (Gamtos tyrimų centras, toliau GTC).

2.3. Metodai

2.3.1. Mėginių surinkimas

Uosių endofitų įvairovei įvertinti, 2018 metų pavasario ir rudens laikotarpiu (vasario, kovo ir rugsėjo mėnesiais) buvo surinkta augalinė medžiaga nuo 10-ies asimptomatinių uosio medžių iš 3-ų Vilniaus miesto vietovių: Kairėnų, Verkių, Balsių. Mikroorganizmai buvo izoliuojami iš *F. excelsior* ir *F. pennsylvanica* pumpurų, medienos ir lapkočių (Priedas 1). Surinkta augalinė medžiaga buvo apdorojama tą pačią arba kitą dieną, mėginiai laikomi + 4 °C.

2.3.2. Grynųjų kultūrų išskyrimas

Mikroorganizmų išskyrimas buvo atliktas Augalų patologijos laboratorijoje, pagal Kirisits, Dämpfle & Kräutler (2013) aprašytą metodiką. Augalinė medžiaga buvo paruošta pagal Haňáčková et al. (2017) aprašytą metodiką. Pumpurai buvo pjaunami per pusę, o lapkočiai sukarpyti į 0,5 cm ilgio gabalėlius ir perpjaunami per pusę. Nedideli gabalėliai (0,5 cm x 0,3 cm x 0,1 cm) buvo sterilinami pamerkiant į 96 % etanolį 30 s. ir plaunami distiliuotu vandeniu, tuomet dedami ant salyklo ekstrakto agaro (angl. Malt Extract Agar, MEA) terpės, papildytos 2 % paprastojo uosio medienos ir lapų ekstraktu (Kirisits et al., 2013). Vienoje 9,0 cm Petri lėkštelėje buvo dedami 4 – 5 augalinės medžiagos gabalėliai. Petri lėkštelės buvo laikomos tamsoje, kambario temperatūroje (+20 °C) dvi savaites, nuolat stebint grybienos augimą. Pasirodžius grybienai, grynos grybų kultūros išskirtos gryną, gyvybingą grybieną (su agaro gabalėliu) sterilia adata imant iš kultūros pakraščio ir persėjant ant AMEA terpės. Išskirtos grynosios grybų kultūros buvo laikomos tokiomis pat sąlygomis, kol pakankamai išaugs ir susiformuos charakteringi morfologiniai kultūrų požymiai.

2.3.3. Grynųjų kultūrų suskirstymas į morfologines grupes

Grynosios endofitinių mikroorganizmų kultūros buvo suskirstytos į grupes naudojantis šviesiniu mikroskopu, stebint morfologinius 4 savaičių amžiaus kultūrų požymius. Buvo įvertintas hifų dydis ir spalva, sporuliacija ir sporų savybės, taip pat kolonijos išsidėstymas, spalva, forma (Lacey, 1997).

2.3.4. *H. fraxineus* populiacinė analizė ir izoliatų atranka

Šiame tyrime naudoti *H. fraxineus* izoliatai buvo paimti iš Augalų patologijos laboratorijos (GTC) kolekcijos. 367 izoliatai buvo išskirti 2012 – 2013 metais iš penkių Lietuvos vietovių – Biržų, Kėdainių, Kretingos, Ukmergės ir Vilniaus, bei iš dviejų tipų medžio audinių – nekrotinės medienos ir lapkočių (detali išskyrimo metodika aprašoma Kirisits et al. (2013) straipsnyje). Ankstesniuose tyrimuose šiems izoliatams buvo atlikta sekoskaita, po to jie buvo suskirstyti į grupes pagal multilokusų genotipus (MLG, angl. *multilocus genotype*) (Burokiene et al., 2015). Buvo nustatytas dalies izoliatų virulentiškumas (Lygis et al., 2016). Siekiant įvertinti galimas *H. fraxineus* izoliatų grupes pagal jų MLG, išskyrimo vietovę ir audinį bei tokių grupių tarpusavio genetinius ryšius, šiame tyrime buvo atlikta pagrindinių komponentų diskriminantinė analizė (angl. *Discriminant Analysis of Principal Components*, DAPC) ir sudarytas genotipus jungiantis minimalus tinklas (angl., *Minimum Spanning Network*, MSN). Duomenys apdoroti RStudio 1.2.5042 (R 4.0.0) *poppr* 2.8.5, *adegenet* 2.1.2, *pegas* 0.13 ir *vegan* 2.5-6 paketais. DAPC buvo pasirinktos 10 iš rastų grupių, turinčių informatyviausias kaupiamosios dispersijos (angl. *Cumulative variance*) vertes ir 10 diskriminanto verčių, pagal žemiausią Bajeso informacijos kriterijų (angl. *Bayesian information criterion*) (BIC). Minimalaus jungiančio tinklo sudarymui buvo naudojamas Bruvo¹³ kombinuotasis modelis. Visi skaičiavimai atlikti klonų-koreguotiems (angl. *clone-corrected*) duomenims.

Po rezultatų įvertinimo, siekiant patvirtinti suskirstymą, 30-čiai *H. fraxineus* izoliatų sekų buvo papildomai atlikta filogenetinė analizė ir sudarytas artimiausios kaimynystės medis (angl. *neighbour-joining tree*). Buvo pritaikytas Tamura 3 parametrų modelis, naudojant

¹³ Bruvo atstumas tarp dviejų individų apskaičiuoja minimalų atstumą tarp visų galimų alelių porų derinių vienoje lokuso vietoje ir tada apskaičiuojamas to atstumo vidurkis per visus lokusus (Bruvo et al., 2004).

diskretųjį gama paskirstymą, darant prielaidą, kad tam tikra dalis genomo vietų yra evoliuciškai nekintamos. Analizė atlikta MEGA 10.1.1 (Kumar, Stecher, Li, Knyaz, and Tamura 2018) programa.

2.3.5. Optimalios mitybinės terpės *H. fraxineus* paieška

Optimalios terpės paieška vykdyta pasirinkus 5-is *H. fraxineus* izoliatus iš Augalų patologijos laboratorijos mikroorganizmų kolekcijos (GTC), reprezentuojančius 5-ias skirtingas vietas, kuriose jie buvo išskirti (Biržai, Kėdainiai, Kretinga, Ukmergė, Vilnius), taip pat atsižvelgiant į jų genetinius skirtumus bei morfologines savybes (Burokiene et al., 2015).

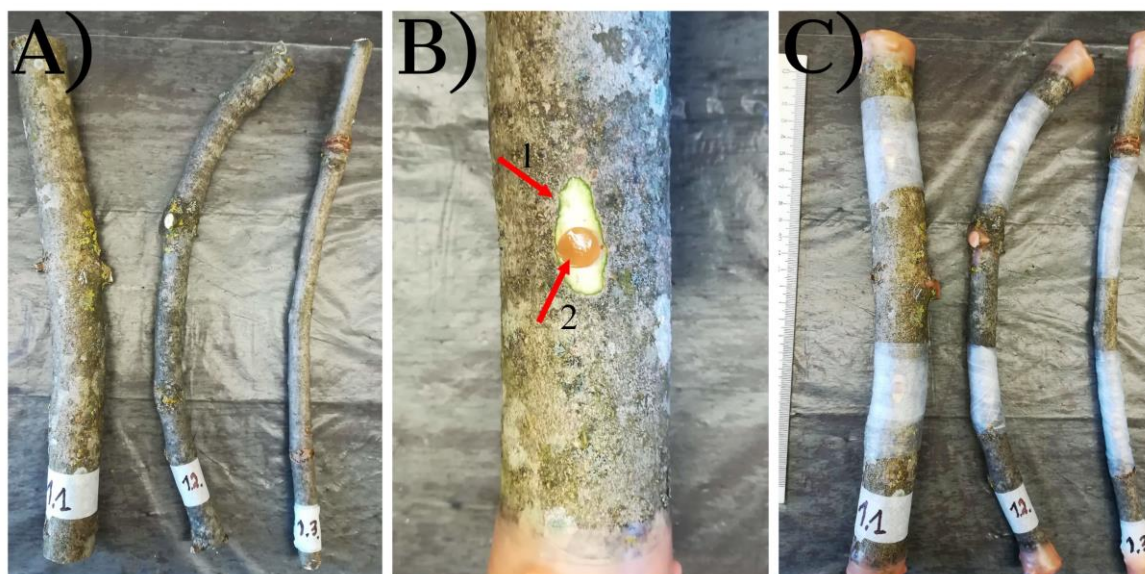
Tyrimo buvo naudojamos 7-ių dienų amžiaus kultūros, 0,5 cm diametro grybienes diskas buvo sėjamas ant 5-ių skirtingos sudėties terpių 3-mis pakartojimais: uosio ekstrakto agaras (AMEA) (Kirisits et al., 2013), avižų ekstrakto agaras (angl. *Oatmeal Agar*, OMA), avižų ir V8 sulčių agaras, tik V8 sulčių agaras, V8 ir uosio medienos agaras (Atlas, 2010). *H. fraxineus* izoliatų augimo greitis buvo stebimas 4-ias savaites, augimo greitį įvertinant išmatavus kolonijos poaugį kas 7-ias dienas ir braižant augimo kreivę (Hendricks et al., 2017).

Gauti duomenys išanalizuoti naudojantis RStudio Desktop 1.2.5042 (R 4.0.0) programa, *tidyverse* 3.0.0. ir *ggplot2* 3.2.1. paketais.

2.3.6. Patogeniškumo testai *in vivo* ant uosio šakelių

Patogeniškumo testas atliktas 14-ai *H. fraxineus* izoliatų, paimtų iš Augalų patologijos laboratorijos mikroorganizmų kolekcijos (GTC), pagal 5-ias skirtingas vietas, kuriose jie buvo išskirti (Biržai, Kėdainiai, Kretinga, Ukmergė, Vilnius) ir kolonizuojamą audinį (mediena, lapkočiai), taip pat atsižvelgiant į jų genetinius skirtumus bei morfologines savybes (Burokiene et al., 2015). Patogeniškumo testas atliktas pagal Soltaninejad et al. (2017). Naudotos 30 cm ilgio ir trijų skirtingų diametrų grupių (Pav. 8 A; Priedas 4) uosio šakelės, surinktos Verkių regioniniame parke nuo sveikai atrodančių *F. excelsior* medžių. Mediena paruošta ją dezinfekavus 96 % etanolio tirpalu, šakelių galai ir kitos atviros vietos buvo užlietos parafinu, siekiant palaikyti medienos drėgmę ir apsaugoti nuo užkrato (Reinprecht & Repák, 2019).

Ksilemoje skalpeliu buvo padarytos 2 nedidelės (1,0 cm × 2,5 cm) pažaidos (Pav. 8 B, rodyklė 1), 10,0 cm atstumu viena nuo kitos, 2,5 cm nuo šakos galų. Ant pažaidų buvo dedami 0,5 cm skersmens grybienos diskeliai (Pav. 8 B, rodyklė 2), kontrolei naudotas identiškas sterilios



Pav. 8. *H. fraxineus* patogeniškumo testas: A – eksperimente naudotos 3-ų skirtingų diametrų šakelės; B – uosio krėtimas patogenu: rodyklė 1 žymi medienoje padarytą pažaidą, rodyklė 2 – 0,5 cm agaro diskelis su grybiena; C – eksperimento eiga.

AMEA terpės diskelis, užkrėstos pažaidos apvyniotos Parafilm™ plėvele (Soltaninejad et al., 2017) (Pav. 8 C). Tyrimas vykdytas kambario temperatūroje (+20 °C), šakelės buvo laikomos plastikinėje dėžėje, pakeltos nuo dugno, į vidų įpilta 1 l distiliuoto vandens pastoviai drėgmei palaikyti. Rezultatai įvertinti po 6 savaičių nuo eksperimento pradžios (Kowalski et al., 2019).

2.3.7. Antagonizmo testai

Pirminiai antagonizmo testai buvo vykdomi 2018 m. lapkričio – gruodžio mėnesiais. Jų metu buvo pasirinkti 2 reprezentatyvūs uosių džiūties sukėlėjo *H. fraxineus* izoliatai, kurie skyrėsi savo morfologinėmis ir genetinėmis savybėmis (Burokiene et al., 2015). Iš 37-ių endofitų morfologinių grupių buvo pasirinkti 47 izoliatai, atrinkus po vieną atstovą 32-joms grupėms ir po 2 atstovus 5-ioms grupėms (dėl didelio šių izoliatų tarpusavio panašumo). Tyrimas buvo atliekamas remiantis Haňáčková et al. (2017) aprašyta metodika, ją šiek tiek modifikavus: 5 mm skersmens *H. fraxineus* grybienos diskeliai buvo dedami į 10,0 cm Petri lėkštelės centrą ir auginami vieną savaitę +20 °C, tamsoje. Praėjus savaitei, 2,5 cm atstumu nuo *H. fraxineus* agaro gabalėlio iš abiejų pusių buvo uždedami du 0,5 cm skersmens endofitų grybienos diskeliai. Neigiama kontrolė buvo paruošta tokiu pačiu metodu, vietoj endofitų

grybienos uždėjus 0,5 cm agarą diskeli (Haňáčková et al., 2017). Lėkštelės buvo laikomos kambario temperatūroje, tamsoje. Reakcijų vertinimas pradėtas po 7-ių dienų nuo testo pradžios, matavimai atlikti kas 7-ias dienas, 4-ias savaites. Reakcijos buvo vertinamos remiantis Brasier & Webber (2013) metodika ir buvo skirstomos į 2 tipus: S (kolonijų miceliai suauga) ir N (kolonijų miceliai nesuauga, formuojama inhibicinė zona). Izoliatų micelio suaugimas papildomai buvo vertinamas pagal jo laipsnį: S+ – izoliatai suauga pilnai, s+ – suauga pavieniai dviejų izoliatų hifai. Antagonistinės mikroorganizmų savybės buvo įvertintos procentine augimo inhibicija (angl. *Potential growth inhibition*, PGI) (Haňáčková et al., 2017):

$$PGI = \frac{(C-T)}{C} \times 100\%, \text{ kur}$$

C – *H. fraxineus* neigiamos kontrolės kolonijos diametras,

T – testinės kolonijos diametras;

Po pirminių testų buvo įvertintos kultūrų reakcijos. Inhibicinės zonos formavimasis (N tipo reakcija) buvo stebimas tarp patogeno izoliatų ir 18-os endofitinių mikroorganizmų. Šie 18-a endofitų buvo atrinkti kaip galimai turintys antagonistinių savybių. Vėliau, įvertinus PGI reikšmes ir reakcijų tipus, buvo atrinkti 4 potencialiai antagonistinės savybės prieš *H. fraxineus* turintys mikroorganizmai iš 3-jų skirtingų morfologinių grupių.

Toliau buvo atliekami antagonizmo testai 55-iems *H. fraxineus* izoliatams, atrinktiems iš Augalų patologijos laboratorijos kolekcijos (GTC), su 4-iais atrinktais endofitais. Eksperimentai vykdyti atlikti remiantis ta pačia metodika.

Antagonizmo testų duomenys apdoroti ir statistinė analizė atlikta RStudio Desktop 1.2.5042 (R 4.0.0) programa, naudojantis tidyverse 3.0.0. ir ggplot2 3.2.1. paketais. Duomenys ištirti atlikus Šapiro – Vilko testą (angl. *Shapiro-Wilk*) ir *t*-testą priklausomoms imtims (angl. *paired t-test*), pasirinkus 95 % pasikliautinąjį intervalą.

2.3.8. DNR skyrimas

DNR skyrimui atlikti naudotas modifikuotas CTAB metodas (Rosling et al., 2003). Užaugusi grybiena skalpeliu buvo sudėta į 2 ml talpos plastikinius mėgintuvėlius, kurie prieš tai buvo paruošti į juos įdedant 5 sterilizuotus 2,5 mm skersmens stiklo rutuliukus. Į mėgintuvėlius buvo įdėta po 0,5 ml grybienos. Mėginiai buvo užpilami 600 µl cetrimonio bromido (CTAB) tirpalo (3%) (Lentelė 2). Lėkštelės buvo ardamos mėgintuvėlius purtant homogenizatoriumi 30 s., esant 5,5 aps./min. greičiui; mėgintuvėliai centrifuguojami 1 min. 8 000 aps./min. greičiu, vėl purtomi homogenizatoriumi. Tuomet mėgintuvėliai buvo inkubuojami 1 val. +65 °C temperatūroje. Po kaitinimo, į mėgintuvėlius įpilta 600 µl

chloroformo, gerai sumaišyta ir centrifuguojama 30 min. 8 000 aps./min. greičiu. Tirpalui nusistovėjus, viršutinė skystoji fazė buvo perkelta į naują 1,5 ml talpos mėgintuvėlį ir užpilta izopropanoliu santykiu 1:2. Mėginiai gerai sumaišyti ir inkubuoti 30 min. – 24 val. +20 °C temperatūroje. Vėliau mėginiai buvo centrifuguojami 30 min. +4 °C temperatūroje, esant 13 000 aps./min. Tuomet vandeninė fazė buvo nupilta, DNR užpilta 200 µl 70 % etanolio ir centrifuguojama 5 min. +4 °C temperatūroje, 13 000 aps./min. greičiu. Nupylus supernatantą, buvo leidžiama išgaruoti etanolio likučiams. DNR tirpinta 20 µl molekulinės švaros vandenyje. Nanospektrofotometru buvo nustatyta DNR koncentracija ir jos grynumas. Mėginių DNR švara įvertinta nanospektrofotometru, matuojant DNR tirpalų koncentracijas ties 260 nm ir 280 nm bangų ilgiais. Jei nustatytas šviesos bangų absorbcijos A260/A280 santykis yra $\geq 1,8$, DNR laikyta švaria (IMPLEN®. NanoPhotometer® P Class User Manual, Version 2.1., 2011).

2.3.9. Polimerazės grandininė reakcija (PGR)

PGR reakcijos mišinys (vienam pavyzdžiui, 20 µl): DreamTaq DNA Polymerazė – 0,2 µl, 10X DreamTaq Green buferis – 2 µl, dNTP – 2 µl, MgCl₂ – 0,2 µl, sterilus vanduo (MiliQ) – 13,3 µl, pradmuo ITS1 – 0,4 µl, pradmuo ITS4 – 0,4 µl ir 1,5 µl DNR tirpalo (5 ng/µl koncentracijos). PGR vykdyta pagal parametrus, pateiktus lentelėje (Lentelė 4).

Lentelė 4. PGR parametrai.

Pradinis ciklas	95 °C	2 min.
35 ciklai	95 °C	30 s.
	55 °C	30 s.
	72 °C	60 s.
Paskutinis ciklas	72 °C	7 min.

Padauginta DNR buvo patikrinta elektroforezės pagalba. Elektroforezė atlikta naudojant 1 % agarozinį gelį (1,5 g agarozės ir 150 ml 1x SB buferio tirpalo (Lentelė 2)), Gel Green dažus ir 1 kb GeneRuler molekulinio svorio markerį. Elektroforezė vykdyta 105 V įtampos režimu 1x SB buferiniame tirpale 45 min. DNR fragmentai vizualizuoti UV šviesoje ir fotografuoti, naudojant gelių dokumentavimo sistemą.

Pavyzdžiai buvo išvalyti naudojantis egzonukleazę I (ExoI) ir *Calf Infestine Alkaline Phosphatase* (CIAP) (Thermo Fisher Scientific, Lietuva): 1 µl Exo I + 4 µl CIAP + 10 µl PGR

produkto. Gauti PGR produktai buvo nusiųsti kompanijos Nanodiagnostika (Lietuva) specialistams, kur buvo atlikta DNR pavyzdžių sekoskaita.

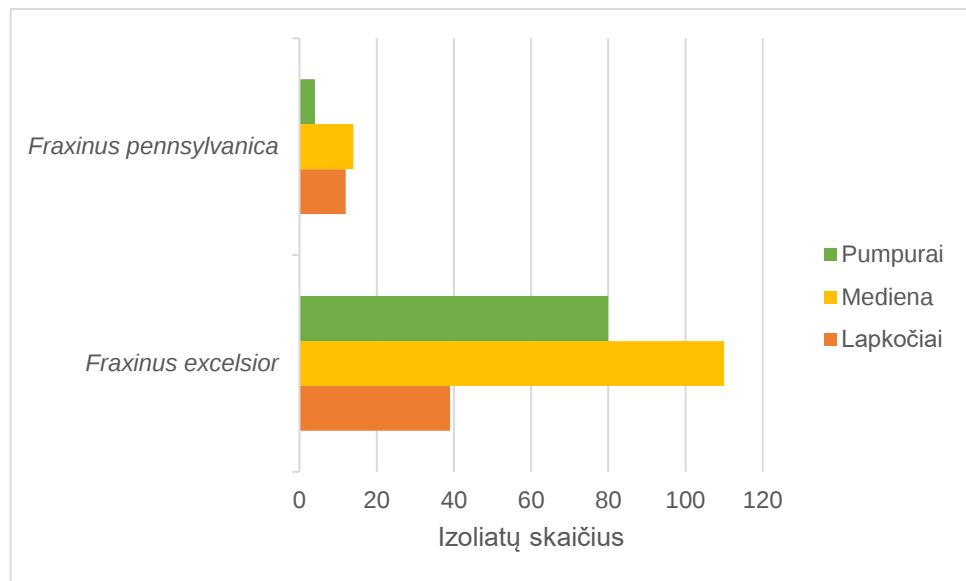
2.3.10. Endofitinių organizmų identifikavimas

Gautos sekos sutvarkytos Geneious Prime 2020.1.1 (<https://www.geneious.com>) programa ir identifikuotos, naudojantis NCBI (The National Center for Biotechnology Information) duomenų bazės BLASTN programa, pritaikant numatytuosius MEGABLAST algoritmo parametrus (nukleotidų duomenų bazė, didžiausia E-vertė = 10, išlyginimo vertės: sutapimas 1, nesutapimas – 2) (Blast Topics, 2020; Koonin & Galperin, 2003). Paieškos rezultatai įvertinti vadovaujantis Stover & Cavalcanti (2017) rekomendacijomis.

REZULTATAI

3.1. Mėginių surinkimas

Tyrimo metu nuo 10-ies asimptomatinių uosio medžių iš 3-ijų Vilniaus miesto vietovių (Kairėnų, Verkių, Balsių) iš viso buvo išskirti 259-i izoliatai: 229-i endofitai iš *F. excelsior* ir 30-imt iš *F. pennsylvanica* medžių (Pav. 9). 84-i endofitai buvo išskirti iš uosių pumpurų, 51-as – iš lapkočių ir 124-i – iš medienos.



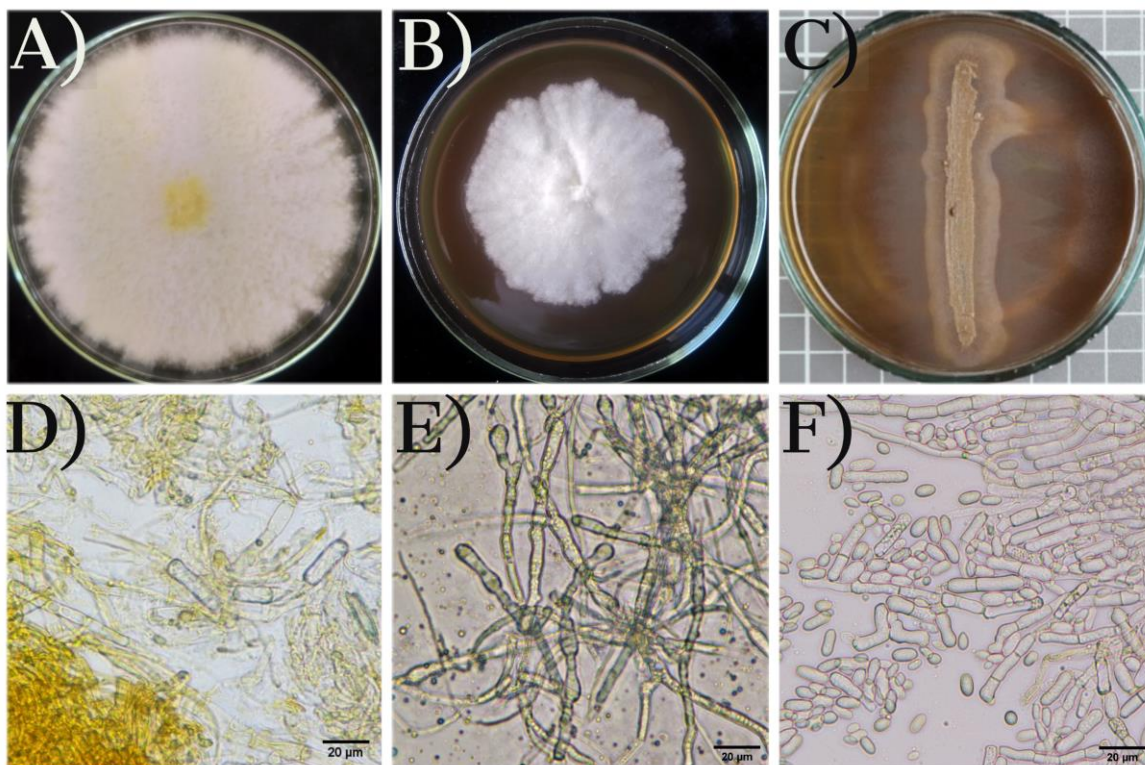
Pav. 9. Detali surinktų mėginių informacija ir pasiskirstymas pagal izoliavimo audinį.

Endofitų rūšinė įvairovė gali priklausyti ne vien nuo augalo šeimininko rūšies, bet ir daugelio kitų faktorių, tokių kaip metų laikas, apšvietimas, augavietė, medžio sveikatos būklė, taip pat gali varijuoti tarp atskirų individų (Kosawang et al., 2018; Power et al., 2017; Scholtysik et al., 2013). Siekiant išskirti kuo didesnę mikroorganizmų įvairovę, patartina augalinę medžiagą surinkti nuo kuo daugiau skirtingų medžių iš skirtingų vietovių su varijuojančiomis aplinkos sąlygomis. Deja, dėl Lietuvai būdingos mažos *Fraxinus* genties medžių įvairovės ir dabartinės uosių džiūties situacijos, prieinami ištekliai yra gana riboti. Nepaisant to, šiame tyrime buvo stengiamasi augalinę medžiagą surinkti taip, jog išskirti endofitai tarpusavyje skirtųsi augalu-šeimininku, išskyrimo vietoje ir kolonizuojamu audiniu. Dėl didesnio *F. excelsior* paplitimo ir atsižvelgiant į tai, jog tai vienintelė *Fraxinus* genties rūšis natūraliai auganti Lietuvoje, didžioji dalis endofitų buvo izoliuoti būtent iš šios rūšies medžių (Pav. 9). Daugiausiai endofitų – 48 % visų izoliatų – pavyko išskirti iš medienos, 32 % – iš pumpurų, o 20 % – iš lapkočių. Šie rezultatai atitinka kitų tyrimų duomenis, kurie rodo, jog

didžiausia sumedėjusių augalų endofitų įvairovė aptinkama jų medienoje (Harrison & Griffin, 2020).

3.2. Grynųjų kultūrų suskirstymas į morfologines grupes

Visi 259-i izoliatai buvo ištirti šviesiniu mikroskopu ir suskirstyti į 37-ias morfologines grupes (Pav. 10). Visas grupes, išskyrus vieną – 16-ą grupę, atstovavo daugiau nei vienas

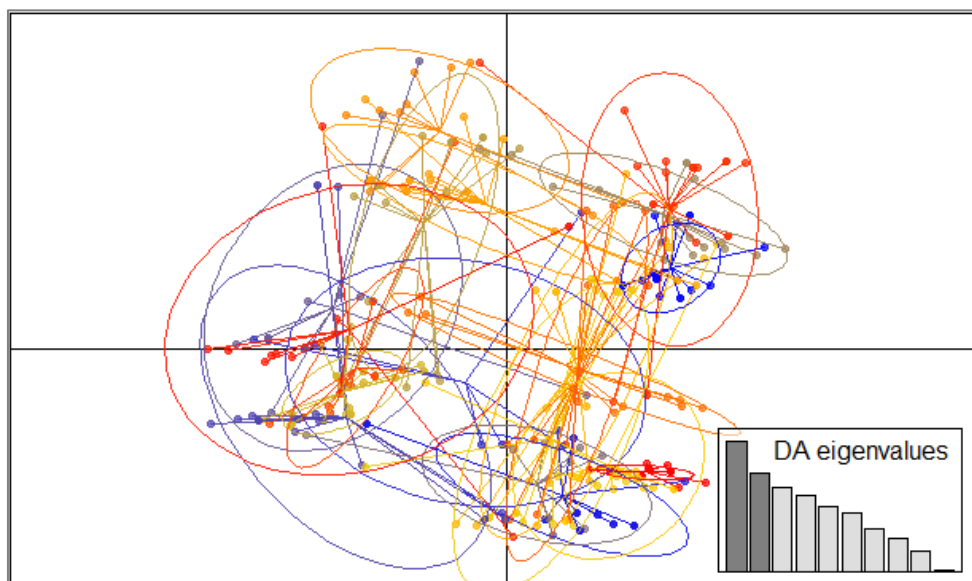


Pav. 10. Trys izoliatų, reprezentuojančių skirtingas morfologines grupes, pavyzdžiai. Nuotraukose vaizduojamos 4-ių savaičių amžiaus kultūros, augintos +20 °C ant uosio ekstrakto agaro (AMEA). Paveikslai A, B, C vaizduoja skirtingų endofitų kultūrų morfologiją. Paveiksluose D, E, F – atitinkamo izoliato mikroskopinis vaizdas. Nuotraukos iš asmeninio archyvo.

izoliatas, taip pat kiekvienai grupei buvo priskirti izoliatai iš skirtingų tipų audinių (medienos, lapkočių, pumpurų).

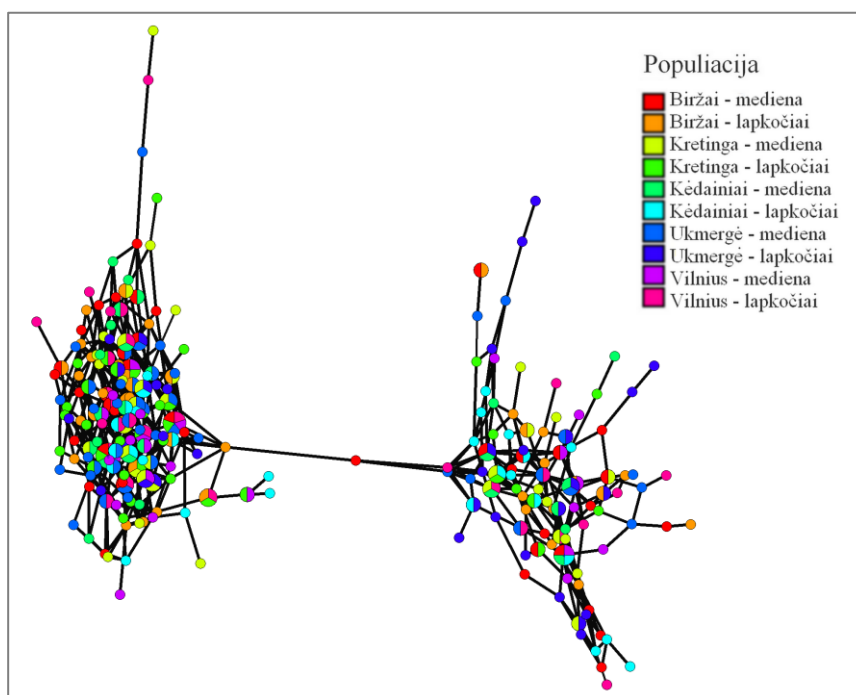
3.3. *H. fraxineus* populiacinė analizė ir izoliatų atranka

Atlikus DAPC analizę pasirinktiems 55-iems *H. fraxineus* izoliatams, buvo parodyta, kad izoliatai nesigrupuoja į aiškias populiacines struktūras (Pav. 12).



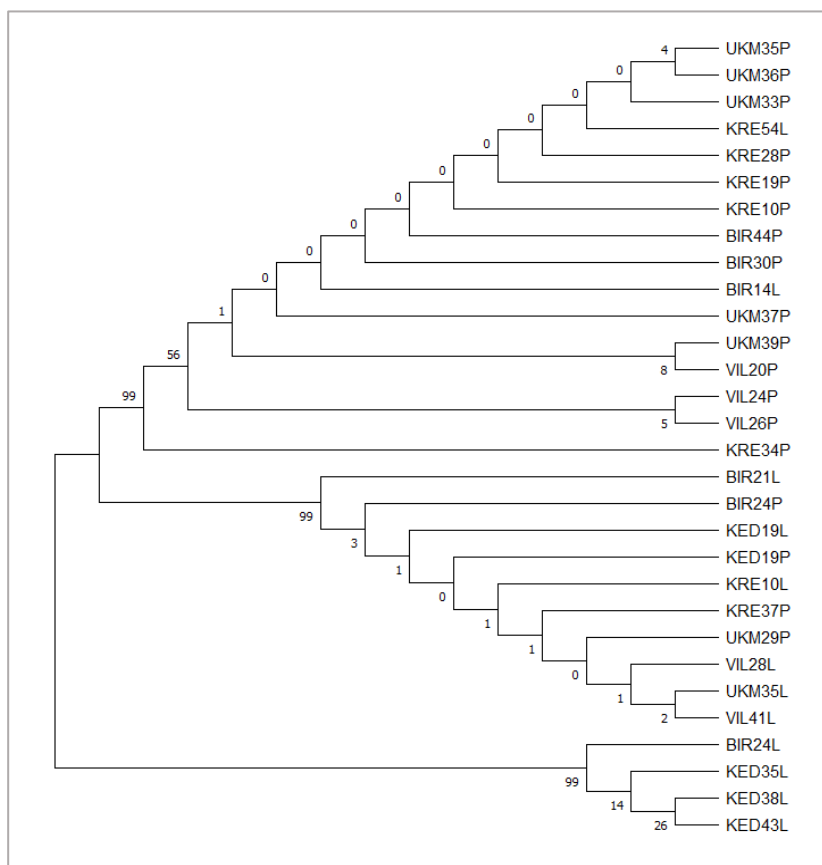
Pav. 12. DAPC grafikas, rodantis genetinius ryšius tarp išskirtų hipotetinių *H. fraxineus* izoliatų grupių, kurios vaizduojamos skirtingomis spalvomis. Kaip matyti iš paveikslo, grupės neatsiskiria viena nuo kitos ir neišsiskaido į atskiras subpopuliacijas.

DAPC neparodžius jokios diferenciacijos tarp nustatytų grupių, buvo sudarytas MSN, kuris demonstruoja genetinius ryšius tarp atskirų populiacijos individų. Ši analizė parodė tam tikrą *H. fraxineus* izoliatų pasiskirstymą į dvi atskiras grupes, tačiau neatskleidė jų priklausomybės nuo kolonizuojamo audinio, MLG grupės ar išskyrimo vietovės (Pav. 11).



Pav. 11. MSN, parodantis genetinį *H. fraxineus* izoliatų susiskirstymą į dvi atskiras grupes. Skirtingomis spalvomis vaizduojami izoliatai, priskirti tam tikrai išskyrimo vietovei ir audiniui.

Izoliatų susiskirstymui patvirtinti taip pat buvo sudarytas artimiausios kaimynystės medis, kuris irgi pademonstravo izoliatų pasidalijimą į dvi grupes (Pav. 13). Visgi šios dvi



Pav. 13. Artimiausios kaimynystės medis, aukštomis tikimybinėmis vertėmis (angl. *bootstrap values*) suskirstantis *H. fraxineus* izoliatus į dvi grupes.

grupės nėra pakankamai informatyvios, kad pagal jas būtų galima atrinkti izoliatus tolimesniems tyrimams. Remiantis DAPC (Pav. 12), MSN (Pav. 11) ir artimiausios giminystės medžio (Pav. 13) rezultatais, tolimesniems tyrimams atrinkti 15% visų izoliatų, taip, kad jie savo proporcijomis pagal išskyrimo vietovę, kolonizuojamą audinį ir MLG grupę atitiktų visą imtį (367 izoliatai). Iš viso buvo atrinkti 55-i *H. fraxineus* izoliatai iš skirtingų MLG grupių ir 5-ių skirtingų vietovių (Biržai, Kretinga, Kėdainiai, Ukmergė, Vilnius), remiantis tuo, jog tokie izoliatai pakankamai gerai atspindi patogeno genetinę įvairovę. Iš atrinktų MLG grupių atstovų, 53-ys izoliatai priklausė grupei, kurią sudarė daugiau nei vienas *H. fraxineus* izoliatas ir tik 2-u izoliatai buvo iš pavienių MLG. 42-u atrinkti izoliatai priklausė mišrioms MLG grupėms, t.y., buvo išskirti tiek iš lapkočių, tiek iš pažeistos nekrotinės medienos; 8 izoliatai priklausė MLG grupėms, sudarytoms iš izoliatų, išskirtų tik iš pažeistos medienos; 9 izoliatai priklausė MLG grupėms, sudarytoms iš izoliatų, kurie buvo išskirti tik iš nukritusių lapkočių (Burokiene et al., 2015). Taip pat yra žinomas dalies izoliatų virulentiškumo laipsnis: aukštas – 6 izoliatai, vidutinis – 3 izoliatai, mažas – 5 izoliatai. 19 izoliatų virulentiškumas nebuvo tirtas, tačiau buvo

tirtas kito izoliato, priklausančio tai pačiai MLG grupei, virulentiškumo laipsnis: aukštas – 7 izoliatai, vidutinis – 5 izoliatai, žemas – 6 izoliatai (Lygis et al., 2016). 23 izoliatų MLG grupių virulentiškumas nebuvo tirtas.

Analizės metu gauti rezultatai parodo, jog Lietuvoje tėra viena genetinė *H. fraxineus* MLG grupė, apimanti visas epidemijos populiacijas. Ši išvada atitinka ankstesnių tyrimų rezultatus (Bengtsson et al., 2012; Burokiene et al., 2015; Gross, Hosoya, et al., 2014).

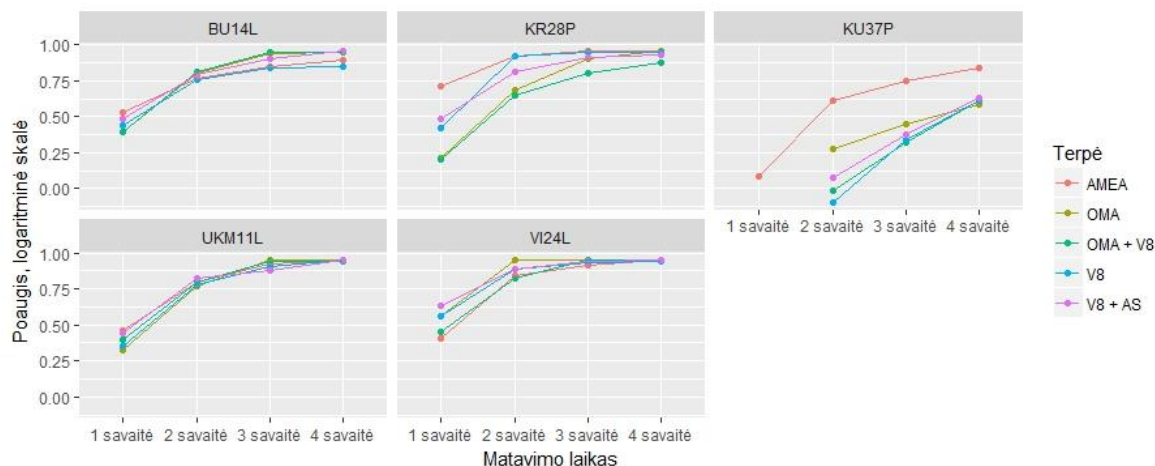
Nepaisant didelės tyrimo imties, genetiniai skirtumai, egzistuojantys tarp *H. fraxineus* izoliatų, nėra pakankamai gerai atspindimi ištirtų MLG grupių, todėl ateityje reikėtų atlikti tyrimus didesniai skaičiui lokusų. Taip pat gali būti, jog Europos populiacija yra vis dar per jauna (20 – 25 m.), kad dėl mutacijų ir atsitiktinės rekombinacijos atsiskirtų genetiškai skirtingos subpopuliacijos. Tokią hipotezę paremia Lygis et al. (2016) rezultatai, kurie atskleidžia, jog *H. fraxineus* vis dar nebūdingas virulentiškumo mažėjimas, kuris paprastai pasireiškia senesnėse patogenų populiacijose. Tai, jog nei viena analizė neparodė kolonizuojamo audinio įtakos, atitinka ankstesnių tyrimų išvadas (Burokiene et al., 2015).

Populiacijos struktūra parodo genetinės įvairovės pasiskirstymą tiek pačios populiacijos viduje, tiek tarp kelių subpopuliacijų, ypač pabrėžiant jų erdvinį išsidėstymą (Sbordoni et al., 2012). Patogenų populiacijos genetinę struktūrą formuoja pusiausvyra tarp mechanizmų, sukuriančių įvairovę, tokių kaip rekombinacijos ir mutacijos, ir ją mažinančių jėgų, pavyzdžiui, konkurencija tarp parazitų tipų (Gupta & Anderson, 1999). Populiacijų genetikos tyrimai svarbūs tobulinant ligų epidemijų prognozavimo modelius arba renkantis kontrolės priemones (Atallah & Subbarao, 2012). Pavyzdžiui, tyrimo metu gautų rezultatų apie *H. fraxineus* populiacijos struktūrą pasitelkimas veisiant atsparumą ligoms turinčius kamienus gali suteikti įžvalgų apie galimą ilgalaikį metodo veiksmingumą. Be to, žinios apie patogeno migracijos būdus ir mastą yra labai svarbios rengiant tarptautinę augalų prekybą reglamentuojančius teisės aktus (Atallah & Subbarao, 2012).

3.4. Optimalios mitybinės terpės *H. fraxineus* paieška

Optimalios kultivavimo terpės paieška buvo atlikta 5-iems genetiškai ir morfologiškai skirtingiems *H. fraxineus* izoliatams. Tyrimui buvo pasirinktos 5-ios skirtingos sudėties terpės, naudojamos grybų kultivavimui: uosio ekstrakto agaras (AMEA), avižų ekstrakto agaras (OMA), avižų ir V8 sulčių agaras (OMA + V8), V8 sulčių agaras, V8 ir uosio medienos agaras (V8 + AS).

Įvertinus atliktų matavimų rezultatus (Pav. 14), paaiškėjo, jog terpės sudėtis izoliatų BU14L, UKM11L ir VI24L augimo greičiui įtakos neturėjo. Izoliatas KR28P, auginamas ant



Pav. 14. Skirtingų *H. fraxineus* izoliatų augimo greičiai ant 5 skirtingų mitybinių terpių.

AMEA terpės, pirmąsias 7-ias dienas augo 1,7 karto greičiau nei ant V8 + AS terpės, 2 kartus greičiau nei ant V8 sulčių agaro ir 3 kartus greičiau nei ant OMA ar OMA + AS terpės (Lentelė 5). Šie rezultatai rodo AMEA terpės svarbą pirmosiomis augimo savaitėmis. Nepaisant to, jog vėliau KR28P izoliato kolonijos diametras ant AMEA, V8 bei V8 + AS terpių skyrėsi mažai (8,4 cm, 8,4 cm ir 6,5 cm atitinkamai), vidutinis augimo greitis vis tiek didžiausias kultivuojant ant AMEA terpės (Priedas 2).

Lentelė 5. Izoliato KR28P augimo greitis (cm) ant skirtingų mitybinių terpių.

	AMEA	OMA	V8	OMA + AS	V8 + AS
1 savaitė	5,1	1,6	2,6	1,6	3,0
2 savaitė	3,3	3,2	5,8	2,8	3,5
3 savaitė	0,6	3,2	0,5	2,0	1,6
4 savaitė	*	1,0	0	1,2	0,5
Vidutinis augimo greitis, cm / savaitę	3,0	2,3	2,2	1,9	2,2

* Izoliato augimas sustojo (kolonija pasiekė savo augimo potencialą – išaugo per visą lėkštelės plotą) prieš eksperimento pabaigą.

Vienintelis izoliatas, kurio augimo greičiui kultivavimo terpės sudėtis turėjo įtakos viso eksperimento metu, yra KU37P (Lentelė 6, Priedas 2). Šis izoliatas pasižymi itin lėtu augimu (Lentelė 6) – vidutiniškai 1,7 cm per savaitę ant AMEA terpės (apie 1 cm per savaitę ant kitos sudėties terpių), kai tuo tarpu kiti izoliatai auga vidutiniškai 2 cm – 3 cm per savaitę greičiau, kartais pasiekia 4 cm – 5 cm per savaitę greitį, t.y., auga 2 – 3 kartus greičiau (Priedas 2). Po 4-ių savaitių nuo eksperimento pradžios KU37P izoliato kolonija vis dar nebuvo išpildžiusi savo augimo potencialo (angl. *growth potential*), t.y. kolonija apėmė vos $\frac{2}{3}$ Petri lėkštelės, kai tuo tarpu kiti izoliatai po 4-ių savaitių buvo užaugę per visą lėkštelės perimetrą (dalis izoliatų Petri lėkštelę apaugo jau po 3-ių savaitių nuo eksperimento pradžios) (Priedas 2).

Lentelė 6. Izoliato KU37P augimo greitis (cm) ant skirtingų mitybinių terpių.

	AMEA	OMA	V8	OMA + AS	V8 + AS
1 savaitė	1,2	0	0	0	0
2 savaitė	2,9	1,9	0,8	1,0	1,2
3 savaitė	1,5	0,9	1,4	1,1	1,2
4 savaitė	1,2	1,0	1,9	2,0	1,9
Vidutinis augimo greitis, cm / savaitę	1,7	1,0	1,0	1,0	1,1

Rezultatai rodo, jog optimali mitybinė terpė KU37P izoliato kultivavimui yra uosio ekstrakto agaras (AMEA). Auginant ant kitų keturių terpių (OMA, OMA + V8, V8 ir V8+AS), grybienos augimas buvo pastebėtas tik praėjus 14-ai dienų nuo eksperimento pradžios (Priedas 2). Nepaisant to, šio vieno izoliato savybės neatspindi bendros tendencijos, kuri rodo, jog terpės sudėtis didžiai daliai *H. fraxineus* izoliatų (80 %) reikšmingos įtakos neturi.

Visgi daugelio kitų *H. fraxineus* optimalios terpės paieškos tyrimų rezultatai publikacijose rodo, jog *H. fraxineus* optimalus augimas stebimas ant mitybinės terpės, papildytos uosio augaline medžiaga (Botella et al., 2016; Carrari et al., 2015; Gross et al., 2012; Kirisits et al., 2013; Orton et al., 2019).

Mitybinės terpės, kurių dalies komponentų cheminė sudėtis yra žinoma, o kita komponentų dalis yra natūralios kilmės (nežinomos sudėties), yra vadinamos semi-sintetinėmis (Ahmad & Khan, 2010; Atlas, 2010). Visos šiame tyrime naudotos mitybinės terpės yra semi-sintetinės, jų sudėtis skiriasi mitybiniais komponentais dėl skirtingų organinių medžiagų panaudojimo. Organinėmis medžiagomis papildytos terpės yra naudojamos, kuomet konkretaus

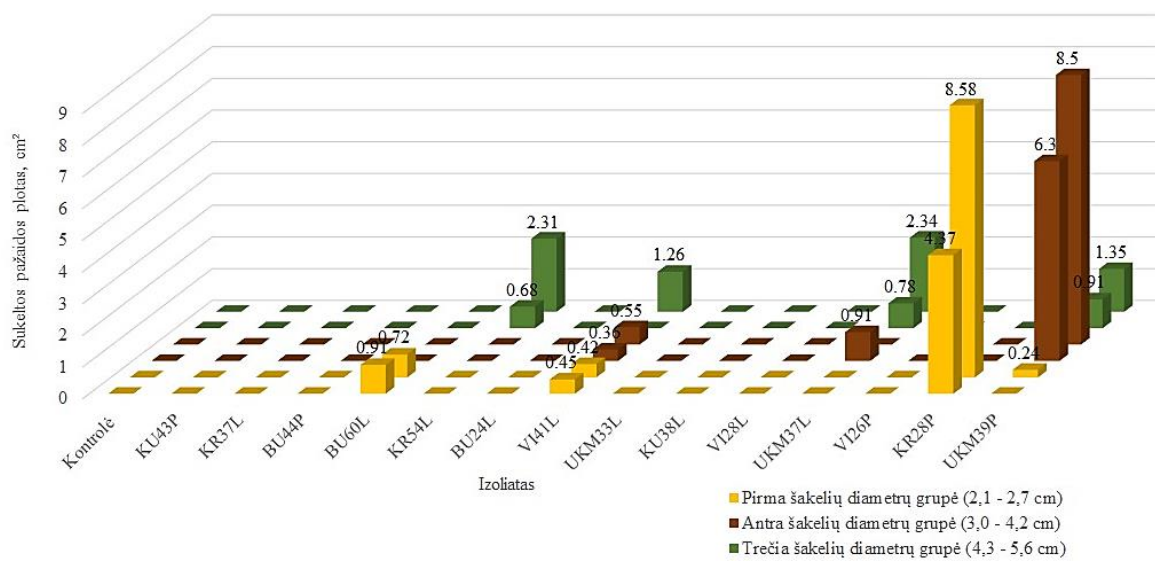
organizmo mitybiniai poreikiai nėra gerai žinomi arba sintetinių terpių, atitinkančių šiuos poreikius, ruošimas yra ekonomiškai nenaudingas (McNeil & Harvey, 2008). Grybai, kultivuojami ant semi-sintetinės terpės, dažniausiai auga greičiau, išskiria didesnius kiekius metabolitų ir yra morfologiškai stabilesni (Carlile et al., 2001). Kirisits et al. (2013) nustatė, kad *H. fraxineus* izoliatams būdingas morfologinis kintamumas juos auginant ant salyklo agaro (angl. *Malt Extract Agar*, MEA), tačiau izoliatai, auginami ant AMEA terpės, auga greičiau ir yra morfologiškai stabilesni, be to, greičiau sporuliuoja.

Šio eksperimento rezultatai patvirtina kitų tyrimų išvadas apie mitybinės terpės, papildytos uosio dalimis (lapais, šakelėmis), tinkamumą *H. fraxineus* kultivavimui (Botella et al., 2016; Carrari et al., 2015; Gross et al., 2012; Kirisits et al., 2013). Atsižvelgiant į tai, jog *H. fraxineus* yra išskirtinai uosių patogenas (Baral et al., 2014), nenuostabu, jog uosių dalys terpei galimai suteikia maistinių medžiagų, reikalingų šio grybo normaliam augimui ir vystymuisi.

Eksperimente naudoti izoliatai skiriasi savo savybėmis (Priedas 5). Įdomu pastebėti, jog izoliatai, geriau augantys ant AMEA terpės (KR28P ir KU37P), priklauso iš tokio pat skaičiaus izoliatų sudarytai MLG grupėms ir abu yra išskirti iš lapkočių, kai tuo tarpu likę izoliatai buvo išskirti iš nekrotinės medienos. Visgi tiek pat izoliatų turinčiai MLG grupei priklauso ir dar vienas izoliatas – VI24L, todėl labiau tikėtina, jog izoliatų augimo greičiui įtakos turi jų išskyrimo audinys. Gali būti, jog keletas skirtingų požymių (izoliato mitybiniai poreikiai, jo virulentiškumas, buveinės pasirinkimas) yra susiję, tačiau ši hipotezė reikalauja detalesnių tyrimų. Orton et al. (2019) parodė, jog izoliatų augimo greitis *in vitro* tiesiogiai koreliuoja su jų virulentiškumu. Kiek vėliau šį teiginį paneigė Kosawang et al. (2020). Tyrėjai iškėlė hipotezę, jog toks prieštaravimas galimai atsiranda dėl skirtingų audinių tipų (lapai ir stiebai) užkrėtimo *in vivo* eksperimento metu, dėl fiziologinių šių audinių skirtumų arba dėl genetinio atsparumo skirtumų tarp audinių tipų (Kosawang et al., 2020). Ši hipotezė galėtų paaiškinti, kodėl tik dalis eksperimente naudotų, būtent iš lapkočių išskirtų izoliatų, parodė geresnį augimą ant AMEA terpės, kai tuo tarpu kitų, iš nekrotinės medienos išskirtų izoliatų, augimo greitis ant visų mitybinių terpių buvo panašus.

3.5. Patogeniškumo testai *in vivo* ant uosio šakų

In vivo patogeniškumo testo ant uosių šakelių rezultatai buvo įvertinti pašalinus dalį žievės ir išmatavus sukeltų pažeidimų ilgį bei plotį. Po 6-ių savaičių nuo eksperimento pradžios, 50% izoliatų sukėlė audinių nekrozę (Pav. 15). Nekrotinių plotų dydis variavo nuo 0,24 cm² iki 8,58 cm². Didžiausias nekrotinės pažeidimas sukėlė izoliatas UKM39P ant pirmos grupės



Pav. 15. Patogeniškumo testo rezultatai: po 6 savaičių nuo testo pradžios 50 % izoliatų sukėlė nekrotines pažaidas. Sukeltų pažaidų dydis varijuoja nepriklausomai nuo šakos storio.

diametro šakos. Izoliatai KU43P, KR37L, BU44P, BU24L, UKM33L, KU38L, VI28L ir VI26P nesukėlė pažaidų ant nei vieno iš trijų diametrų grupių šakų. Yra žinomas dalies izoliatų virulentiškumas (Lentelė 7). Izoliatai VI41L ir UKM39P, pasižymintys aukštu virulentiškumu, eksperimento metu sukėlė pažaidas, tačiau dar vienas aukšto virulentiškumo izoliatas VI26P jų nesukėlė. Dviems izoliatams – KR28P ir KR37L – būdingas vidutinis virulentiškumas, tačiau pažaidas sukėlė tik vienas jų (Lentelė 7). Izoliatas su žinomu žemu virulentiškumu pažaidų ant medienos nesukėlė.

Lentelė 7. Patogeniškumo testui naudotų izoliatų savybės.

	Sukėlė audinio nekrozę	Virulentiškumas	MLG grupę sudarančių izoliatų skaičius	Išskyrimo audinys
<i>BU24L</i>	-	NA	4	Nekrotinė mediena
<i>BU44P</i>	-	NA	2	Lapkočiai
<i>BU60L</i>	+	NA	Vienintelis atstovas	Nekrotinė mediena
<i>KR28P</i>	+	Vidutinis	2	Lapkočiai
<i>KR37L</i>	-	Vidutinis	3	Nekrotinė mediena
<i>KR54L</i>	+	NA	4	Nekrotinė mediena
<i>KU38L</i>	-	NA	3	Nekrotinė mediena
<i>KU43P</i>	-	NA	2	Lapkočiai

7 lentelės tęsinys.

	Sukėlė audinio nekrozę	Virulentiškumas	MLG grupę sudarančių izoliatų skaičius	Išskyrimo audinys
UKM33L	-	NA	3	Nekrotinė mediena
UKM37L	+	NA	2	Nekrotinė mediena
UKM39P	+	Aukštas	Vienintelis atstovas	Lapkočiai
VI26P	-	Aukštas	3	Lapkočiai
VI28L	-	Žemas	2	Nekrotinė mediena
VI41L	+	Aukštas	2	Nekrotinė mediena

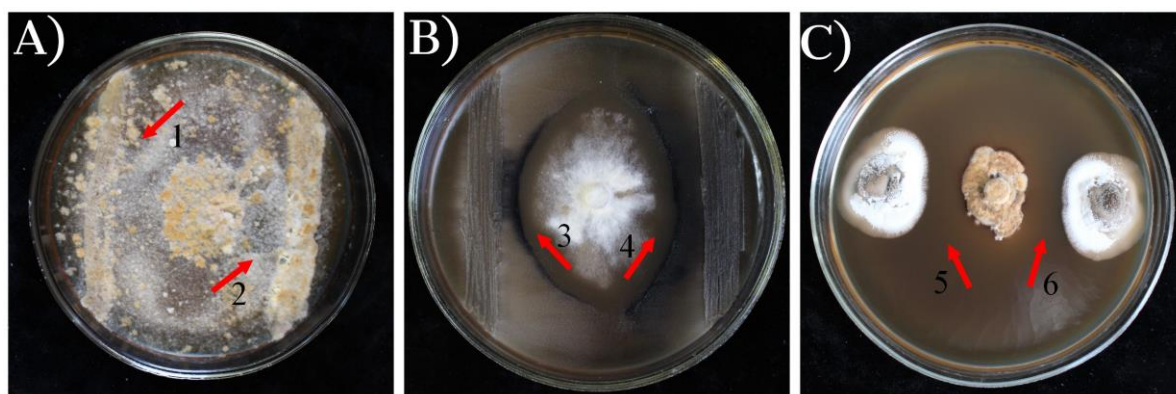
Didžiausias pažaidas sukėlęs izoliatas UKM39P turi aukštą virulentiškumą ir iš kitų izoliatų išsiskiria tuo, jog vienintelis atstovauja atskirą MLG grupę. Antras pagal sukeltų pažaidų dydį yra izoliatas KR28P, priklausantis MLG grupei, sudarytai iš 2-ų izoliatų. Visi pažaidas sukėlę izoliatai, išskyrus KR54L, priklauso MLG grupei, sudarytai iš 2-ų izoliatų, arba yra vieninteliai atstovaujantys savo MLG grupę (Lentelė 7). Gali būti, jog retesni genotipai bendrai pasižymi didesniu virulentiškumu.

Šiame eksperimente buvo panaudotas naujas metodas patogeniškumui tikrinti – paprastai tokie tyrimai yra atliekami ant sveikų jaunų sodinukų (Bakys et al., 2009; A. Gross & Sieber, 2016; T. Kowalski & Holdenrieder, 2009a; Kowalski et al., 2015; Lygis et al., 2016; Schwanda & Kirisits, 2016). Sodinukų naudojimas patogeniškumui tikrinti yra išstobulintas metodas, tačiau pasiruošimas jam ir pats eksperimento vykdymas reikalauja daug fizinio darbo ir yra ekonomiškai nenaudingas. Dėl to yra ieškoma alternatyvų, kurios ne tik prilygtų, bet turėtų pranašumų tokiame metodui (Orton et al., 2019; Soltaninejad et al., 2017). Medžio šakų naudojimas patogeniškumui tikrinti jau buvo pritaikytas ir anksčiau (Dissanayake et al., 2015; Elena & Vlahoyiannis, 2002; Soltaninejad et al., 2017), tačiau iki šiol nebuvo išbandytas su *Fraxinus* genties medžiais. Žemas pažaidų sukėlimo dažnis (50 % izoliatų) šiame eksperimente gali būti paaiškinamas netinkamai nustatytomis eksperimento sąlygomis arba per trumpu eksperimento vykdymo laikotarpiu – atsižvelgiant į itin lėtą kai kurių *H. fraxineus* augimą *in vitro*, gali būti, jog 6 savaitės nėra pakankamai ilgas laikas patogeniui jaugti į medieną. Ateityje vykdant tokio tipo eksperimentus reikėtų skirti laiko optimizuoti medienos atrankos ir paruošimo strategijas bei tyrimo sąlygas (eksperimento laiką, oro drėgmę, temperatūrą ir pan.), jas pakeisti taip, jog labiau atspindėtų lauko eksperimentų sąlygas.

Pakartojus patogeniškumo testus *H. fraxineus* izoliatams, būtų įdomu nustatyti, ar pažaidų dydis priklauso nuo izoliatų MLG grupės dydžio, kolonizuojamo audinio bei šakos storio.

3.6. Antagonizmo testai

Pirminiai antagonizmo testai parodė, jog iš 47-ių endofitinių mikroorganizmų 18-a gebėjo inhibuoti bent vieno iš dviejų eksperimente naudotų *H. fraxineus* izoliatų augimą. Šių endofitų antagonistinės savybės buvo įvertintos vizualiai pagal inhibicinės zonos formavimąsi (Pav. 16) bei apskaičiavus procentinę augimo inhibiciją (Priedas 6).



Pav. 16. Trys skirtingi reakcijų tarp patogeno ir endofito tipai: A – pilnai suaugę miceliai, N reakcija (rodyklės 1 ir 2); B – iš dalies suaugę pavieniai hifai, s+ reakcija (rodyklės 3 ir 4); C – miceliai nesuaugę – ryški inhibicijos zona, S+ reakcija (rodyklės 5 ir 6).

Kai PGI reikšmės turėjo panašias vertes, pirmenybė buvo teikiama izoliatui, kuris formavo platesnę inhibicinę zoną. Buvo remiamasi tuo, jog patogeno kolonijos dydžiui įtakos taip pat gali turėti jo pačio lėtas ir endofito greitas augimas, konkurencija dėl maisto medžiagų ir vietos, o ne konkretūs antagonistinį poveikį turintys išskiriami metabolitai. Todėl plati inhibicinė zona leidžia geriau įvertinti patogeno-endofito sąveikas.

Pagal šiuos du kriterijus buvo atrinkti 4-i didžiausią neigiamą poveikį patogenui turėję izoliatai – 7A, 7B, 15 ir 16, – priklausantys trimis morfologinėms grupėms. Šiems izoliatams buvo atlikti antriniai antagonizmo testai su 55-iais *H. fraxineus* izoliatais. Antrinių antagonizmo testų reakcijos įvertintos tuo pačiu principu kaip ir pirminiuose testuose: reakcijos buvo stebėtos vizualiai ir aprašytos, apskaičiuotos jų PGI vertės (Priedas 8, Priedas 9, Priedas 10, Priedas 11). Statistinė analizė parodė, jog *H. fraxineus* kolonijų diametrų vidurkių skirtumai tarp kontrolinės ir eksperimentinės lėkštelių su visais 4-iais endofitais yra statistiškai reikšmingi (Lentelė 8). PGI vertės svyravo labai plačioje skalėje nuo 0,2 % iki 93,0 % – įdomu pastebėti, jog mažiausią ir didžiausią vertes įgijo *H. fraxineus* reakcijoje su endofitu Nr. 7A. Kitų endofitų PGI vertės

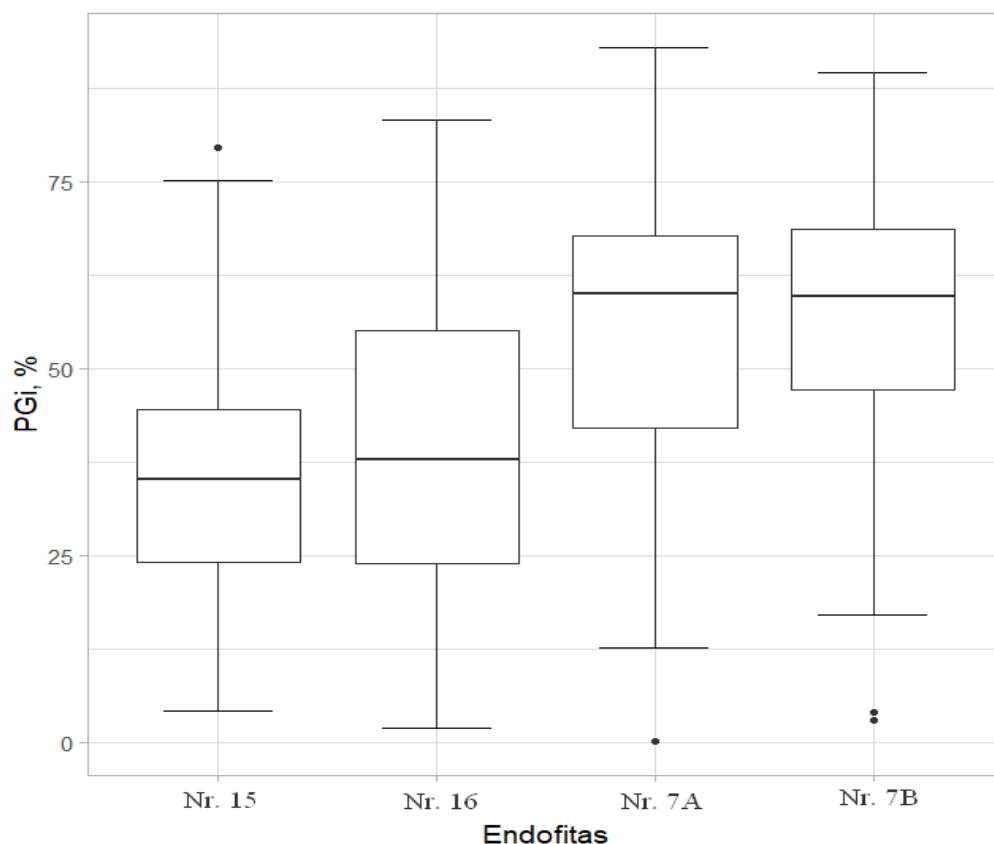
taip pat smarkiai skyrėsi: endofitas Nr. 15: 4,2 – 79,6 %, endofitas Nr. 16: 1,9 – 83,3 %, endofitas Nr. 7B: 3,0 – 89,7 %. Toks rezultatų nepastovumas dar kartą įrodo *H. fraxineus*

Lentelė 8. *t*-testo priklausomoms imtims rezultatai. Visi izoliatai parodė statistiškai reikšmingą patogeno izoliatų inhibiciją.

	Vidurkis	<i>p</i> - reikšmė
Kontrolė	35,79	
Endofitas nr. 15	23,69	< 0,001
Endofitas nr. 16	21,133	< 0,001
Endofitas nr. 7A	15,99	< 0,001
Endofitas nr. 7B	15,62	< 0,001

izoliatų genetinę ir morfologinę įvairovę, lemiančią jo savybių skirtumus tarp atskirų izoliatų.

Vidutiniškai stipriausią bendrą inhibiciją parodė endofitai 7A ir 7B, endofitai Nr. 15 ir Nr. 16 patogeno izoliatų inhibavo silpniau (Pav. 17). Taip pat buvo įvertintas visų endofitų poveikis konkrečiam *H. fraxineus* izoliatui (Priedas 7). Stipriausia inhibicija ($\text{PGI} \geq 60\%$) pastebėta izoliatams BU14L, BU24L, BU30L, BU37P, BU50L, KR28P, KR54L, KU37P, VI24L. Mažiausiai inhibuoti ($\text{PGI} \leq 30\%$) buvo BU12L, BU19P, BU49L, BU60L, KR19L,



Pav. 17. Vidutinės PGI vertės pagal endofitą – stipriausią inhibiciją (didžiausią PGI vertę) turi izoliatai 7A ir 7B.

KR24P, KR51L, KU35L, UKM11L, UKM36L ir VIL13P. Keleto šių izoliatų virulentiškumas yra žinomas (Lygis et al., 2016) (Lentelė 9). Nors būtų galima tikėtis, jog izoliatai, pasižymintys aukštu virulentiškumu, yra prasčiau inhibuojami, tokia tendencija nebuvo pastebėta.

Lentelė 9. Izoliatų PGI verčių ir virulentiškumo palyginimas.

<i>Izoliatas</i>	<i>Virulentiškumas</i>	<i>PGI, %</i>
<i>BU14L</i>	Aukštas	65,00
<i>BU24L</i>	Vidutinis	63,90
<i>BU50L</i>	Vidutinis	65,55
<i>KR54L</i>	Žemas	66,28
<i>KU37P</i>	Vidutinis	62,18
<i>BU12L</i>	Žemas	24,75
<i>KR19L</i>	Aukštas	11,03
<i>KU35L</i>	Žemas	12,48

PGI vertės taip pat buvo palygintos su turimais duomenimis apie izoliatų MLG grupes (Priedas 12). Vidutiniškai didžiausia PGI vertė yra iš 7-ių izoliatų sudarytoms MLG grupėms (56,48 %), 3-is ir 4-is izoliatas turinčių grupių vidutinis PGI yra gana panašus (atitinkamai 48,14 % ir 50,55 %), o MLG grupių, kurios yra sudarytos iš 2-ų izoliatų, PGI yra žemiausias – 43,95 %. Tai galima būtų paaiškinti tuo, jog tokia tendencija galimai parodo didesnę iš 2-ų izoliatų sudarytų MLG grupių atsparumą stresui (šiuo atveju – antagonistinį poveikį turintiems endofitams). Gali būti, jog dėl savo gebėjimo geriau išgyventi nepalankiomis aplinkos sąlygomis ar didesnio konkurencingumo, būtent šių MLG grupių atstovai yra plačiau paplitę (atspindi didesnę grupės imtis) (Priedas 12).

Tyrimo metu nepastebėta priklausomybė tarp PGI vertės ir izoliato kolonizuojamo audinio.

3.7. Endofitinių mikroorganizmų identifikavimas

Po pirminių antagonistinių testų atrinkti 4 izoliatai, parodę didžiausią inhibiciją *H. fraxineus* kultūroms, priklausė 3 morfologinėms grupėms: 7 (izoliatai A ir B), 15, 16. Šiems izoliatams buvo atlikta sekoskaita, o gautos sekos buvo identifikuotos naudojantis NCBI duomenų baze (2.3.10). Rezultatai parodė, jog izoliatai 7A ir 7B priklauso tai pačiai rūšiai ir buvo identifikuoti kaip *Aureobasidium pullulans* (De Bary) G. Arnaud ex Cif., Ribaldi & Corte. 15-ai grupei priklausančio izoliatas buvo identifikuotas kaip *Filobasidium wieringae* (Á. Fonseca, Scorzetti & Fell) Xin Zhan Liu, F.Y. Bai, M. Groenew. & Boekhout. 16-os grupės

endofitą pavyko identifikuoti iki genties lygmens – buvo nustatyta, jog jis priklauso *Phaeomoniella* Crous & W. Gams genčiai.

A. pullulans yra plačiai paplitęs juodasis mieliagrybis¹⁴ (angl. *black yeast-like fungus*), aptinkamas įvairiose aplinkose (dirvožemyje, vandenyje, ore) (Bozoudi & Tsaltas, 2018; Gostinčar et al., 2014; Singh et al., 2015). Jis yra žinomas kaip daugelio augalų epifitas ar endofitas (Barata et al., 2012; De Curtis et al., 2012). Šiam mieliagrybiui yra būdingas morfologinis plastiškumas, jis geba augti kaip mielių-tipo ląstelės arba sudaryti hifus, formuoti grybieną (Yurlova et al., 1995). Morfologinius *A. pullulans* izoliatų skirtumus lemia daugybė faktorių, svarbiausi jų – temperatūra, pH, deguonies koncentracija (Singh et al., 2015). Anglies, azoto bei mineralinių medžiagų šaltinis ir koncentracija lemia mielių-tipo ląstelių gebėjimą sintetinti antrinius metabolitus, tokius kaip polisacharidas pululanas¹⁵, kuris yra svarbus biotechnologine prasme (Chi et al., 2009b; Deshpande et al., 1992; Singh et al., 2015). Tamsių chlamidosporų formavimasis yra tipinis rūšies požymis – iš pradžių kolonijos yra šviesios, kreminės spalvos, tačiau ėmus formuoti sporoms, išsiskiria specifinis melaninas, suteikiantis tamsią kolonijos spalvą (de Hoog & Yurlova, 1994). *A. pullulans* yra svarbus biotechnologine prasme fermentų (amilazės, proteazės, lipazės, ksilazės ir kt.), sideroforų, poli- ir oligosacharidų gamybai (Chi et al., 2009a; Deshpande et al., 1992). Šis grybas gali būti naudojamas kaip aplinkos taršos rodiklis, kadangi menkiausias taršos kiekis stipriai veikia populiacijos dydį (Singh et al., 2015). *A. pullulans* yra perspektyvus organizmas kuriant naujas antimikrobines medžiagas mediciniais tikslais - išskiriamų ekstraląstelinų medžiagų antimikrobinis aktyvumas buvo įrodytas keliuose tyrimuose (Beniwal, 2014; McCormack et al., 1994; Prakitchaiwattana et al., 2004; Singh et al., 2015), daug bioaktyvių ir struktūriškai įvairių šio mieliagrybio metabolitų buvo panaudota vaistų kūrimui (Singh et al., 2015b). Kai kurie *A. pullulans* kamienai turi antagonistinį poveikį daugelio fitopatogeninių grybų atžvilgiu ir yra laikomi galimomis biokontrolės priemonėmis (Mounir et al., 2007). Pavyzdžiui, *A. pullulans* kamienas L47, kuris buvo išskirtas nuo vynuogių uogų paviršiaus Pietų Italijoje, buvo panaudotas kontroliuoti įvairių vaisių ir daržovių ligas po derliaus nuėmimo (Schena et al.,

¹⁴ Juodieji mieliagrybiai yra įvairi lėtai augančių mikroskopinių grybų grupė, kuriai būdingas nelytinis dauginimasis, morfologinis plastiškumas, melanino sintezė sienelėje, apsauginių metabolitų, tokių kaip karotenoidai ir mikosporinai, sintezė, kuri suteikia didelį atsparumą aplinkos stresui (Gostinčar et al., 2009; Rosa & Peter, 2006).

¹⁵ Pululanas yra vandenyje tirpus linijinis polisacharidinis polimeras, sintetinamas *A. pullulans* iš krakmolo, apsaugantis ląsteles nuo išdžiūvimo, svarbus apsauginių mechanizmų veiklai (Chi et al., 2009a). Pramonėje pululanas naudojamas kaip maisto priedas (Cheng et al., 2011).

2002). Šis kamienas užtikrina aukštą apsaugą nuo *Penicillium digitatum* Sacc. ant greipfrutų, *Botrytis cinerea* Pers., *Aspergillus niger* Tiegh. ir *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.) Vuill. ant vynuogių, *B. cinerea* ir *Monilia lax* (Ehrenb.) Sacc. & Voglino ant saldžiųjų vyšnių, *B. cinerea* ant kivių, vyšnių, pomidorų, obuolių ir braškių, *B. cinerea* ir *R. stolonifer* ant vyšninių pomidorų (Mounir et al., 2007; Schena et al., 1999). Mieliagrybio *A. pullulans* kamienas Ach1-1 buvo pritaikytas kontroliuoti *Penicillium expansum* Link augimą ant obuolių (Bencheqroun et al., 2007). *A. pullulans* antagonistinė veikla gali būti paaiškinama jo konkurencija su patogenais dėl maistinių medžiagų ir vietos (Benbow & Sugar, 1999; Vero et al., 2002), priešgrybelinių junginių sekrecija (McCormack et al., 1994), fermentų chitinazės ir gliukanazės išskyrimu (Ippolito et al., 2000), bioplėvelės formavimu, lakiųjų organinių junginių gamyba, taip pat augalų šeimininko atsparumo indukcija (Liu et al., 2013).

A. pullulans taip pat yra dažnai izoliuojamas kaip uosių endofitas (Bakys, 2013; Bakys et al., 2009b; Chen, 2012; Davydenko et al., 2013b; Haňáčková et al., 2017b; Kowalski et al., 2016; Lahiri, 2020; Lygis et al., 2005; Power et al., 2017; Pukacki & Przybył, 2005; Scholtysik et al., 2013b).

F. wieringae (sin. *Cryptococcus wieringae*) yra mieliagrybis (kai kuriuose šaltiniuose – mielė), kurį aprašė Fonseca et al. (2000), persikirstęs *Cryptococcus albidus* (Saito) C.E. Skinner kamienų taksonomiją ir išskyręs *F. wieringae* kaip naują rūšį. *F. wieringae* daugiausiai randamas asociacijoje su augalais ar dirvožemyje (Arenz et al., 2006; Kurtzman et al., 2011; Li et al., 2020), tačiau buvo išskirtas ir iš ledynų (Branda et al., 2010). Šis mieliagrybis yra plačiai paplitęs, daugiausiai jo izoliuojama iš beržų (Yurkov et al., 2015), vynuogių medžių ir uogų paviršiaus (Cordero-Bueso et al., 2017; Lederer et al., 2013; Milanović et al., 2013), vaismedžių (Glushakova & Kachalkin, 2017; Lutz et al., 2012), taip pat yra aptiktas ant paprastojo erškėčio ir naminės slyvos (Rashmi, 2019). Dėl savo paplitimo *F. wieringae* yra laikomas svarbiu augalų endofitu (Yurkov et al., 2015). Yra žinoma, jog šis mieliagrybis geba sintetinti hidrolizinius, pektinolizinius ir celiuliozinius fermentus, visgi jų reikšmė grybo gyvenimo ciklui kol kas nebuvo įvertinta ir reikalauja detalių tyrimų (Inácio, 2003). Nepaisant eksperimentų su šiuo mieliagrybiu stokos (galimai dėl klaidingos identifikacijos kaip *C. albidus*), kelios publikacijos aprašo galimą *F. wieringae* antagonistinį potencialą. Janisiewicz et al. (2010) komanda parodė, jog *F. wieringae* neigiamai veikia *Monilinia laxa* (Aderh. & Ruhland) Honey ir *Monilinia fructigena* (Pers.) Pers., sukeliančius kaulavaisių rudąjį puvinį (moniliozę). Hilber-Bodmer et al. (2017) įvertino šio mieliagrybio savybę inhibuoti filamentinius grybus, o Pauvert et al. (2020) neseniai parodė *F. wieringae* antagonistinį poveikį prieš vynuogių miltligę sukeliantį patogeninį grybą *Erysiphe necator* Schw..

F. wieringae pavyko izoliuoti ir iš *F. excelsior* sėklų, taip pat buvo parodyta, jog šis mieliagrybis dažniau aptinkamas ant uosių džiučiai jautresnių medžių (Hayatgheibi, 2013).

Phaeomoniella genčiai (šeima *Phaeomoniellaceae*, eilė *Phaeomoniellales*) priklauso 9 rūšys (Robert et al., 2013): *Phaeomoniella capensis* Crous & A.R. Wood (buvo išskirtas nuo *Encephalartos altensteinii* Lehmann lapų), *Phaeomoniella chlamydospora* (W. Gams, Crous, M.J. Wingf. & Mugnai) Crous & W. Gams (išskirtas iš *Vitis vinifera* L. (tikrojo vynmedžio) nekrotinės medienos), *Phaeomoniella dura* Damm & Crous (buvo išskirtas iš *Prunus salicina* Linn. (japoninės slyvos) nekrotinės medienos), *Phaeomoniella effusa* Damm & Crous izoliuotas (iš *Prunus persica* (L.) Batsch (persiko) nekrotinės medienos), *Phaeomoniella niveniae* Crous, (izoliuotas nuo *Nivenia stokoei* (L. Guthrie) N.E. Br. lapų paviršiaus), *Phaeomoniella pinifoliorum* Huang B. Lee, J.Y. Park, R.C. Summerbell & H.S. Jung (išskirta nuo *Pinus densiflora* Siebold & Zucc (japoninės raudonosios pušies) spyglių), *Phaeomoniella prunicola* Damm & Crous (iš *P. persica* ir *P. salicina* nekrotinės medienos), *Phaeomoniella tardicola* Damm & Crous (iš *Prunus armeniaca* L. (abrikoso) šviesių nekrotinių dėmių) ir *Phaeomoniella zymoides* Huang B. Lee, J.Y. Park, Summerb. & H.S. Jung (izoliuota nuo *P. densiflora* spyglių). Šios rūšys skiriasi tiek savo arealu, tiek gyvenimo būdu – vienos jų yra laikomos patogeniškoms, kitos yra svarbūs augalų epifitai (Crous, 2000; Crous et al., 2008, 2011; Damm et al., 2010; Lee et al., 2006). Nors kai kurios genties rūšys laikomos patogeniškoms, tačiau tyrimai ant abrikosų, persikų ir slyvų daugeliui jų (išskyrus *P. dura*) sukeltų nekrozių neparodė statistiškai reikšmingų skirtumų palyginus su kontrole (Damm et al., 2010). *P. prunicola*, nors iš buvo išskirtas iš pažeistų medžio audinių, eksperimento metu nekrozės visiškai nesukėlė nei ant vieno iš medžių (Damm et al., 2010).

Šios genties grybai buvo izoliuoti ir iš *Fraxinus* genties medžių kaip jų endofitai, tačiau nėra plačiai paplitę (Power et al., 2017).

Kadangi visi trys endofitiniai mikroorganizmai jau anksčiau buvo išskirti iš *Fraxinus* genties medžių kaip jų endofitai, o du mieliagrybiai pasižymi antagonistinėmis savybėmis prieš kitus fitopatogenus ir buvo sėkmingai pritaikyti biokontrolėi (Bencheqroun et al., 2007; Hayatgheibi, 2013; Lygis et al., 2005; Pauvert et al., 2020; Power et al., 2017), tai suteikia vilčių, jog šie trys organizmai galėtų būti pritaikyti ir uosių džiučies gydymui ar prevencijai. Tolimesni tyrimai turėtų apimti antagonizmo eksperimentus *in vivo*, siekiant įsitikinti, jog lauko sąlygomis endofitai nepraranda savo pranašumo prieš *H. fraxineus* (Haňáčková et al., 2017). Taip pat būtų naudinga išskirti ir identifikuoti atrinktų izoliatų produkuojamus metabolitus, įvertinti jų citotoksiškumą bei galimas pritaikymo medžių ligų gydymui galimybes (Halecker et al., 2020; Pourmoghaddam et al., 2020).

Šiame eksperimente pirmą kartą buvo tirtas antagonistų poveikis prieš žinomo virulentiškumo *H. fraxineus* izoliatus. Nors koreliacija tarp PGI ir virulentiškumo nebuvo pastebėta, būtų įdomu patikrinti, ar tokia tendencija išlieka ir padidinus eksperimento imtį arba patį eksperimentą vykdant *in vivo*.

IŠVADOS

1. Pagal multilokusų genotipų grupių duomenis atlikta *H. fraxineus* populiacinė analizė parodė izoliatų susiskirstymą į dvi subpopuliacijas; tolimesniems tyrimams atrinkti 55-i reprezentatyvūs izoliatai.
2. Pasirinkta optimali augimo terpė *H. fraxineus* kultivuoti – uosio ekstrakto agaras (AMEA).
3. Atlikti patogeniškumo testai *in vivo* iki šiol netaikytu metodu ant uosio šakų parodė dalies izoliatų (50%) gebėjimą sukelti audinių nekrozę, su perspektyva metodo optimizavimui ateities tyrimuose.
4. Išskirti 259-i *F. excelsior* ir *F. pennsylvanica* endofitiniai grybai buvo ištirti mikroskopu ir suskirstyti į 37-ias morfologines grupes.
5. Atlikus antagonizmo testus, buvo atrinkti 4-i statistiškai reikšmingą inhibicinį poveikį *H. fraxineus* izoliatams turintys endofitiniai grybai, kurie buvo identifikuoti kaip 3-ys organizmai: dvi skirtingos *Aureobasidium pullulans* morfologijos, *Filobasidium wieringae* ir *Phaeomoniella* sp..

REZULTATŲ SKLAIDA

1. Norkutė G., **Jarašiūtė A.**, Sivickis K., Burokienė D. (2019 m., gegužė). „*In Vitro* Antagonistic Dual-Culture Assays Against Causal Agent Of Ash Dieback *Hymenoscyphus Fraxineus*“. Stendinis pranešimas, pristatytas 3-oje tarptautinėje mokslinėje konferencijoje „Smart Bio“, Kaunas, Lietuva.

PADĖKA

Noriu nuoširdžiai padėkoti savo darbo vadovei dr. Godai Mizerienei už visapusę pagalbą darbo metu, duotus patarimus ir pastabas, skirtą laiką, dėmesį, neišsenkančią kantrybę bei nuolatinį palaikymą ir paskatinimą tyrimo eigoje.

Taip pat noriu padėkoti dr. Daivai Burokienei už suteiktą galimybę profesinę praktiką atlikti Gamtos Tyrimų Centro Augalų patologijos laboratorijoje bei šios laboratorijos darbuotojams ir praktiką atliekantiems studentams už jaukią atmosferą bei pagalbą darbuojantis.

LITERATŪROS ŠALTINIAI

- Ahmad, D. S. M., & Khan, R. (2010). *A Book of Biotechnology*. Laxmi Publications.
- Arenz, B., Held, B., Jurgens, J., Farrell, R., & Blanchette, R. (2006). Fungal diversity in soils and historic wood from the Ross Sea Region of Antarctica. *Soil Biology and Biochemistry*, 38, 3057–3064. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2006.01.016>
- Asiegbu, Adomas, & Stenlid. (2005). Conifer root and butt rot caused by *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. S.l. *Molecular Plant Pathology*, 6(4), 395–409. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2005.00295.x>
- Asiegbu, Daniel, & Johansson. (1994). Defence related reactions of seedling roots of Norway spruce to infection by *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 45(1), 1–19. [https://doi.org/10.1016/S0885-5765\(05\)80015-3](https://doi.org/10.1016/S0885-5765(05)80015-3)
- Atallah, Z. K., & Subbarao, K. V. (2012). Population Biology of Fungal Plant Pathogens. In M. D. Bolton & B. P. H. J. Thomma (Eds.), *Plant Fungal Pathogens* (Vol. 835, pp. 333–363). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-501-5_20
- Atlas, R. (2010). *Handbook of Microbiological Media*, Fourth Edition. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/EBK1439804063>
- Bacon, C., & White, J. (2016). Functions, mechanisms and regulation of endophytic and epiphytic microbial communities of plants. *Symbiosis*, 68, 87–98. <https://doi.org/10.1007/s13199-015-0350-2>
- Bakys, R., Vasaitis, R., Barklund, P., Ihrmark, K., & Stenlid, J. (2009). Investigations concerning the role of *Chalara fraxinea* in declining *Fraxinus excelsior*. *Plant Pathology*, 58(2), 284–292. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2008.01977.x>
- Bakys, Remigijus. (2013, January 23). Dieback of *Fraxinus excelsior* in the Baltic Sea Region [Doctoral thesis]. <https://pub.epsilon.slu.se/9391/>
- Bakys, Remigijus, Vasaitis, R., Barklund, P., Thomsen, I., & Stenlid, J. (2009). Occurrence and pathogenicity of fungi in necrotic and non-symptomatic shoots of declining common ash (*Fraxinus excelsior*) in Sweden. *European Journal of Forest Research*, 128, 51–60. <https://doi.org/10.1007/s10342-008-0238-2>
- Baral, H.-O., & Bemann, M. (2014). *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*, 5(4), 228–290. <https://doi.org/10.1080/21501203.2014.963720>

- Baral, H.-O., Queloz, V., & Hosoya, T. (2014). *Hymenoscyphus fraxineus*, the correct scientific name for the fungus causing ash dieback in Europe. *IMA Fungus*, 5(1), 79–80. <https://doi.org/10.5598/ima fungus.2014.05.01.09>
- Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., & Loureiro, V. (2012). The microbial ecology of wine grape berries. *International Journal of Food Microbiology*, 153(3), 243–259. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.11.025>
- Benbow, J. M., & Sugar, D. (1999). Fruit Surface Colonization and Biological Control of Postharvest Diseases of Pear by Preharvest Yeast Applications. *Plant Disease*, 83(9), 839–844. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1999.83.9.839>
- Bencheqroun, S., Bajji, M., Sebastien, M., Labhilili, M., Jaafari, S., & Jijakli, M. (2007). *In vitro* and *in situ* study of postharvest apple blue mold biocontrol by *Aureobasidium pullulans*: Evidence for the involvement of competition for nutrients. *Postharvest Biology and Technology*, 46, 128–135. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2007.05.005>
- Bengtsson, S. B. K., Vasaitis, R., Kirisits, T., Solheim, H., & Stenlid, J. (2012). Population structure of *Hymenoscyphus pseudoalbidus* and its genetic relationship to *Hymenoscyphus albidus*. *Fungal Ecology*, 5(2), 147–153. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2011.10.004>
- Beniwal, M. S. D. and N. (2014). Antibacterial activity of *Aureobasidium pullulans*. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, Volume 5 Issue 3. <http://ijpbs.net/abstract.php?article=3522>
- Bettinger, P., Clutter, M., Siry, J., Kane, M., & Pait, J. (2009). Broad implications of southern United States pine clonal forestry on planning and management of forests. <https://doi.org/info:doi/10.1505/for.11.3.331>
- Botella, L., Čermáková, V., Bačová, A., & Dvořák, M. (2016). ADA, a fast-growth medium for *Hymenoscyphus fraxineus*. *Forest Pathology*, 46(1), 85–87. <https://doi.org/10.1111/efp.12251>
- Bozoudi, D., & Tsaltas, D. (2018). The Multiple and Versatile Roles of *Aureobasidium pullulans* in the Vitivinicultural Sector. *Fermentation*, 4, 85. <https://doi.org/10.3390/fermentation4040085>
- Branda, E., Turchetti, B., Diolaiuti, G., Pecci, M., Smiraglia, C., & Buzzini, P. (2010). Yeast and yeast-like diversity in the southernmost glacier of Europe (Calderone Glacier, Apennines, Italy). *FEMS Microbiology Ecology*, 72(3), 354–369. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.00864.x>

- Brasier, C., & Webber, J. (2013). Vegetative incompatibility in the ash dieback pathogen *Hymenoscyphus pseudoalbidus* and its ecological implications. *Fungal Ecology*, 6(6), 501–512. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2013.09.006>
- Broome, A., Ray, D., Mitchell, R., & Harmer, R. (2019). Responding to ash dieback (*Hymenoscyphus fraxineus*) in the UK: Woodland composition and replacement tree species. *Forestry: An International Journal of Forest Research*, 92(1), 108–119. <https://doi.org/10.1093/forestry/cpy040>
- Bruvo, R., Michiels, N. K., D'Souza, T. G., & Schulenburg, H. (2004). A simple method for the calculation of microsatellite genotype distances irrespective of ploidy level: Microsatellite distances in polyploids. *Molecular Ecology*, 13(7), 2101–2106. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2004.02209.x>
- Burokiene, D., Prospero, S., Jung, E., Marčiulynienė, D., Moosbrugger, K., Norkute, G., Rigling, D., Lygis, V., & Schoebel, C. (2015). Genetic population structure of the invasive ash dieback pathogen *Hymenoscyphus fraxineus* in its expanding range. *Biological Invasions*. <https://doi.org/10.1007/s10530-015-0911-6>
- Butkus, V., Galinis, V., & Jankevičienė, R. (1976). Lietuvos TSR flora. 5 / V. Butkus, V. Galinis, R. Jankevičienė ... [et al.]; Lietuvos TSR mokslų akademija. Botanikos institutas; [redakcinė kolegija: K. Jankevičius (atsak. redaktorius) ... [et al.]; redagavo M. Natkevičaitė-Ivanauskienė. Mokslas.
- CABI, 2020. Invasive Species Compendium. Wallingford, UK: CAB International. www.cabi.org/isc (Accessed 2 May 2020)
- Card, S., Johnson, L., Teasdale, S., & Caradus, J. (2016). Deciphering endophyte behaviour: The link between endophyte biology and efficacious biological control agents. *FEMS Microbiology Ecology*, 92(8). <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw114>
- Carlile, M. J., Watkinson, S. C., & Gooday, G. W. (2001). The Fungi. Gulf Professional Publishing.
- Carrari, E., Capretti, P., Santini, A., & Luchi, N. (2015). *Hymenoscyphus fraxineus* mycelial growth on media containing leaf extracts of different Oleaceae. *Forest Pathology*, 45(6), 540–543. <https://doi.org/10.1111/efp.12238>
- Čermáková, V., Eichmeier, N., & Botella, L. (2017). HfMV1 and another putative mycovirus in Central European populations of *Hymenoscyphus fraxineus*, the causal agent of Ash Dieback in Europe. *Baltic Forestry*, 23, 107–115.

- Chandelier, A., André, F., & Laurent, F. (2010). Detection of *Chalara fraxinea* in common ash (*Fraxinus excelsior*) using real time PCR. *Forest Pathology*, 40(2), 87–95. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0329.2009.00610.x>
- Chandelier, A., Delhay, N., & Helson, M. (2011). First Report of the Ash Dieback Pathogen *Hymenoscyphus pseudoalbidus* (Anamorph *Chalara fraxinea*) on *Fraxinus excelsior* in Belgium. *Plant Disease*, 95(2), 220–220. <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-10-0540>
- Chen, J. (2012, May 4). Fungal community survey of *Fraxinus excelsior* in New Zealand [Second cycle, A2E]. SLU, Dept. of Forest Mycology and Plant Pathology. <https://stud.epsilon.slu.se/4172/>
- Cheng, K.-C., Demirci, A., & Catchmark, J. M. (2011). Pullulan: Biosynthesis, production, and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3477-y>
- Chi, Z., Wang, F., Chi, Z., Yue, L., Liu, G., & Zhang, T. (2009). Bioproducts from *Aureobasidium pullulans*, a biotechnologically important yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82(5), 793–804. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-1882-2>
- Cleary, M., Nguyen, D., Marčiulygienė, D., Berlin, A., Vasaitis, R., & Stenlid, J. (2016). Friend or foe? Biological and ecological traits of the European ash dieback pathogen *Hymenoscyphus fraxineus* in its native environment. *Scientific Reports*, 6, 21895. <https://doi.org/10.1038/srep21895>
- Cleary, M. R., Arhipova, N., Gaitnieks, T., Stenlid, J., & Vasaitis, R. (2012). Natural infection of *Fraxinus excelsior* seeds by *Chalara fraxinea*. *Forest Pathology*, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1111/efp.12012>
- Cleary, M. R., Daniel, G., & Stenlid, J. (2013). Light and scanning electron microscopy studies of the early infection stages of *Hymenoscyphus pseudoalbidus* on *Fraxinus excelsior*. *Plant Pathology*, 62(6), 1294–1301. <https://doi.org/10.1111/ppa.12048>
- Coker, T. L. R., Rozsypálek, J., Edwards, A., Harwood, T. P., Butfoy, L., & Buggs, R. J. A. (2019). Estimating mortality rates of European ash (*Fraxinus excelsior*) under the ash dieback (*Hymenoscyphus fraxineus*) epidemic. *PLANTS, PEOPLE, PLANET*, 1(1), 48–58. <https://doi.org/10.1002/ppp3.11>
- Cordero-Bueso, G., Mangieri, N., Maghradze, D., Foschino, R., Valdetara, F., Cantoral, J. M., & Vigentini, I. (2017). Wild Grape-Associated Yeasts as Promising Biocontrol Agents against *Vitis vinifera* Fungal Pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02025>

- Corp, N., & Pendry, B. (2013). The role of Western herbal medicine in the treatment of gout. *Journal of Herbal Medicine*, 3(4), 157–170. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2013.08.002>
- Crous, P. W. (2000). *Phaeomoniella chlamydospora*. Gen. Et Comb. Nov., a Causal Organism of Petri Grapevine Decline and Esca. *South African Journal of Science - S AFR J SCI*, 39, 112–118. https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-1530
- Crous, P. W., Summerell, B. A., Shivas, R. G., Romberg, M., Mel'nik, V. A., Verkley, G. J. M., & Groenewald, J. Z. (2011). Fungal Planet description sheets: 92–106. *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 27(1), 130–162. <https://doi.org/10.3767/003158511X617561>
- Crous, P. W., Wood, A. R., Okada, G., & Groenewald, J. Z. (2008). Foliicolous microfungi occurring on Encephalartos. *Persoonia : Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 21, 135–146. <https://doi.org/10.3767/003158508X380612>
- Damm, U., Fourie, P. H., & Crous, P. W. (2010). *Coniochaeta (Lecythophora)*, *Collophora* gen. Nov. And *Phaeomoniella* species associated with wood necroses of *Prunus* trees. *Persoonia : Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 24, 60–80. <https://doi.org/10.3767/003158510X500705>
- Davydenko, K. V., Borysova, V., Shcherbak, O., Kryshchuk, Y., & Meshkova, V. (2019). Situation and perspectives of European ash (*Fraxinus* spp.) in Ukraine: Focus on eastern border. *BALTIC FORESTRY*, 25(2), 193–202.
- Davydenko, K., Vasaitis, R., Stenlid, J., & Menkis, A. (2013). Fungi in foliage and shoots of *Fraxinus excelsior* in eastern Ukraine: A first report on *Hymenoscyphus pseudoalbidus*. *Forest Pathology*, 43(6), 462–467. <https://doi.org/10.1111/efp.12055>
- De Curtis, F., de Felice, D. V., Ianiri, G., De Cicco, V., & Castoria, R. (2012). Environmental factors affect the activity of biocontrol agents against ochratoxigenic *Aspergillus carbonarius* on wine grape. *International Journal of Food Microbiology*, 159(1), 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.07.023>
- de Hoog, G. S., & Yurlova, N. A. (1994). Conidiogenesis, nutritional physiology and taxonomy of *Aureobasidium* and *Hormonema*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 65(1), 41–54. <https://doi.org/10.1007/BF00878278>
- Deshpande, M. S., Rale, V. B., & Lynch, J. M. (1992). *Aureobasidium pullulans* in applied microbiology: A status report. *Enzyme and Microbial Technology*, 14(7), 514–527. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(92\)90122-5](https://doi.org/10.1016/0141-0229(92)90122-5)

- Díaz-Yáñez, O., Mola-Yudego, B., Timmermann, V., Tollefsrud, M. M., Hietala, A. M., & Oliva, J. (2020). The invasive forest pathogen *Hymenoscyphus fraxineus* boosts mortality and triggers niche replacement of European ash (*Fraxinus excelsior*). *Scientific Reports*, 10(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61990-4>
- Dissanayake, A., Zhang, W., Li, X., Zhou, Y., Chethana, T., Chukeatirote, E., Hyde, K., Yan, J., Zhang, G., & Zhao, W. (2015). First report of *Neofusicoccum mangiferae* associated with grapevine dieback in China. *Phytopathologia Mediterranea*, 54(2), 414–419. https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-15159
- Douglas, G. C., Pliura, A., Dufour, J., Mertens, P., Jacques, D., Fernandez-Manjares, J., Buiteveld, J., Parnuta, G., Tudoroiu, M., Curnel, Y., Thomasset, M., Jensen, V., Knudsen, M. A., Foffová, E., Chandelier, A., & Steenackers, M. (2013). Common Ash (*Fraxinus excelsior* L.). In L. E. Pâques (Ed.), *Forest Tree Breeding in Europe* (Vol. 25, pp. 403–462). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-007-6146-9_9
- Drenkhan, R., & Hanso, M. (2010). New host species for *Chalara fraxinea* . *New Disease Reports*, 22, 16–16. <https://doi.org/10.5197/j.2044-0588.2010.022.016>
- Drenkhan, R., Solheim, H., Bogacheva, A., Riit, T., Adamson, K., Drenkhan, T., Maaten, T., & Hietala, A. M. (2017). *Hymenoscyphus fraxineus* is a leaf pathogen of local *Fraxinus* species in the Russian Far East. *Plant Pathology*, 66(3), 490–500. <https://doi.org/10.1111/ppa.12588>
- Dundulienė, P. (2008). Gyvybės medis lietuvių mene ir tautosakoje. Mokslo ir Enciklopedijų Leidybos Institutas.
- Elena, K., & Vlahoyiannis, D. (2002). First report of *Botrytis cinerea* causing shoot blight of pistachio in Greece. *New Disease Reports*, 7, 32–32.
- Enderle, R., Fussi, B., Lenz, H. D., Langer, G., Nagel, R., & Metzler, B. (2017). Ash dieback in Germany: Research on disease development, resistance and management options.
- Enderle, R., Nakou, A., Thomas, K., & Metzler, B. (2015). Susceptibility of autochthonous German *Fraxinus excelsior* clones to *Hymenoscyphus pseudoalbidus* is genetically determined. *Annals of Forest Science*, 72(2), 183–193. <https://doi.org/10.1007/s13595-014-0413-1>
- Flanagan, J., Meyer, M., Pasamar, M. A., Ibarra, A., Roller, M., Alvarez i Genoyer, N., Leiva, S., Gomez-García, F., Alcaraz, M., Martínez-Carrasco, A., & Vicente, V. (2013). Safety evaluation and nutritional composition of a *Fraxinus excelsior* seed extract, FraxiPure™. *Food and Chemical Toxicology*, 53, 10–17. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.11.030>

- Fones, H. N., Mardon, C., & Gurr, S. J. (2016). A role for the asexual spores in infection of *Fraxinus excelsior* by the ash-dieback fungus *Hymenoscyphus fraxineus*. *Scientific Reports*, 6(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep34638>
- Fonseca, A., Scorzetti, G., & Fell, J. W. (2000). Diversity in the yeast *Cryptococcus albidus* and related species as revealed by ribosomal DNA sequence analysis. *Canadian Journal of Microbiology*, 46(1), 7–27.
- Foster, M. S., & Bills, G. F. (2011). Biodiversity of Fungi: Inventory and Monitoring Methods. Elsevier.
- Franclet, A., & Boulay, M. (1989). Rejuvenation and Clonal Silviculture for Eucalyptus and Forest Species Harvested through Short Rotation. In J. S. Pereira & J. J. Landsberg (Eds.), *Biomass Production by Fast-Growing Trees* (pp. 267–274). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-009-2348-5_15
- Ghabrial, S. A., & Suzuki, N. (2008). Fungal Viruses. *Encyclopedia of Virology*, 284–291. <https://doi.org/10.1016/B978-012374410-4.00563-X>
- Ghelardini, L., Pepori, A. L., Luchi, N., Capretti, P., & Santini, A. (2016). Drivers of emerging fungal diseases of forest trees. *Forest Ecology and Management*, 381, 235–246. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2016.09.032>
- Gladieux, P., Feurtey, A., Hood, M. E., Snirc, A., Clavel, J., Dutech, C., Roy, M., & Giraud, T. (2015). The population biology of fungal invasions. *Molecular Ecology*, 24(9), 1969–1986. <https://doi.org/10.1111/mec.13028>
- Glushakova, A. M., & Kachalkin, A. V. (2017). Endophytic yeasts in *Malus domestica* and *Pyrus communis* fruits under anthropogenic impact. *Microbiology*, 86(1), 128–135. <https://doi.org/10.1134/S0026261716060102>
- Gostinčar, C., Grube, M., De Hoog, S., Zalar, P., & Gunde-Cimerman, N. (2009). Extremotolerance in fungi: Evolution on the edge. *FEMS Microbiology Ecology*, 71(1), 2–11. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00794.x>
- Gostinčar, C., Ohm, R. A., Kogej, T., Sonjak, S., Turk, M., Zajc, J., Zalar, P., Grube, M., Sun, H., Han, J., Sharma, A., Chiniquy, J., Ngan, C. Y., Lipzen, A., Barry, K., Grigoriev, I. V., & Gunde-Cimerman, N. (2014). Genome sequencing of four *Aureobasidium pullulans* varieties: Biotechnological potential, stress tolerance, and description of new species. *BMC Genomics*, 15, 549. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-549>
- Gross, A., Grünig, C. R., Queloz, V., & Holdenrieder, O. (2012). A molecular toolkit for population genetic investigations of the ash dieback pathogen *Hymenoscyphus*

- pseudoalbidus*. *Forest Pathology*, 42(3), 252–264. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0329.2011.00751.x>
- Gross, A., & Holdenrieder, O. (2013). On the longevity of *Hymenoscyphus pseudoalbidus* in petioles of *Fraxinus excelsior*. *Forest Pathology*, 43(2), 168–170. <https://doi.org/10.1111/efp.12022>
- Gross, A., & Sieber, T. N. (2016). Virulence of *Hymenoscyphus albidus* and native and introduced *Hymenoscyphus fraxineus* on *Fraxinus excelsior* and *Fraxinus pennsylvanica*. *Plant Pathology*, 65(4), 655–663. <https://doi.org/10.1111/ppa.12450>
- Gross, A., Zaffarano, P. L., Duo, A., & Grünig, C. R. (2012). Reproductive mode and life cycle of the ash dieback pathogen *Hymenoscyphus pseudoalbidus*. *Fungal Genetics and Biology*, 49(12), 977–986. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2012.08.008>
- Gross, Andrin, & Han, J. (2015). *Hymenoscyphus fraxineus* and two new *Hymenoscyphus* species identified in Korea. *Mycol Progress*, 14, 1–13. <https://doi.org/10.1007/s11557-015-1035-1>
- Gross, Andrin, Holdenrieder, O., Pautasso, M., Queloz, V., & Sieber, T. N. (2014). *Hymenoscyphus pseudoalbidus*, the causal agent of European ash dieback. *Molecular Plant Pathology*, 15(1), 5–21. <https://doi.org/10.1111/mpp.12073>
- Gross, Andrin, Hosoya, T., & Queloz, V. (2014). Population structure of the invasive forest pathogen *Hymenoscyphus pseudoalbidus*. *Molecular Ecology*, 23(12), 2943–2960. <https://doi.org/10.1111/mec.12792>
- Grünwald, N. J., & Goss, E. M. (2011). Evolution and Population Genetics of Exotic and Re-Emerging Pathogens: Novel Tools and Approaches. *Annual Review of Phytopathology*, 49(1), 249–267. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-072910-095246>
- Gupta, S., & Anderson, R. M. (1999). Population Structure of Pathogens: The Role of Immune Selection. *Parasitology Today*, 15(12), 497–501. [https://doi.org/10.1016/S0169-4758\(99\)01559-8](https://doi.org/10.1016/S0169-4758(99)01559-8)
- Halecker, S., Wennrich, J.-P., Rodrigo, S., Andrée, N., Rabsch, L., Baschien, C., Steinert, M., Stadler, M., Surup, F., & Schulz, B. (2020). Fungal endophytes for biocontrol of ash dieback: The antagonistic potential of *Hypoxylon rubiginosum*. *Fungal Ecology*, 45, 100918. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2020.100918>
- Halmschlager, E., & Kirisits, T. (2008). First report of the ash dieback pathogen *Chalara fraxinea* on *Fraxinus excelsior* in Austria. *Plant Pathology*, 57(6), 1177–1177. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2008.01924.x>

- Han, J.-G., Shrestha, B., Hosoya, T., Lee, K.-H., Sung, G.-H., & Shin, H.-D. (2014). First Report of the Ash Dieback Pathogen *Hymenoscyphus fraxineus* in Korea. *Mycobiology*, 42(4), 391–396. <https://doi.org/10.5941/MYCO.2014.42.4.391>
- Haňáčková, Z., Koukol, O., Havrdová, L., & Gross, A. (2015). Local population structure of *Hymenoscyphus fraxineus* surveyed by an enlarged set of microsatellite markers. *Forest Pathology*, 45(5), 400–407. <https://doi.org/10.1111/efp.12185>
- Haňáčková, Zuzana, Černý, K., Koukol, O., Havrdová, L., & Zahradník, D. (2017). Fungal Endophytes in Ash Shoots – Diversity and Inhibition of *Hymenoscyphus fraxineus*. *Baltic Forestry*, 23, 89–106.
- Hardoim, P. R., van Overbeek, L. S., Berg, G., Pirttilä, A. M., Compant, S., Campisano, A., Döring, M., & Sessitsch, A. (2015). The Hidden World within Plants: Ecological and Evolutionary Considerations for Defining Functioning of Microbial Endophytes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 79(3), 293–320. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00050-14>
- Harper, A. L., McKinney, L. V., Nielsen, L. R., Havlickova, L., Li, Y., Trick, M., Fraser, F., Wang, L., Fellgett, A., Sollars, E. S. A., Janacek, S. H., Downie, J. A., Buggs, R. J. A., Kjær, E. D., & Bancroft, I. (2016). Molecular markers for tolerance of European ash (*Fraxinus excelsior*) to dieback disease identified using Associative Transcriptomics. *Scientific Reports*, 6, 19335. <https://doi.org/10.1038/srep19335>
- Harrison, J. G., & Griffin, E. A. (2020). The diversity and distribution of endophytes across biomes, plant phylogeny, and host tissues—How far have we come and where do we go from here? *BioRxiv*, 793471. <https://doi.org/10.1101/793471>
- Hayatgheibi, H. (2013). Studies on the microflora associated with the seeds of European ash (*Fraxinus excelsior*) and the infection biology of the pathogen *Hymenoscyphus pseudoalbidus* causing ash dieback.
- Heinze, B., Tiefenbacher, H., Litschauer, R., & Kirisits, T. (2017). Ash dieback in Austria—History, current situation and outlook. *Dieback of European Ash (Fraxinus Spp.) - Consequences and Guidelines for Sustainable Management*, 33–52.
- Hendricks, K. E., Christman, M. C., & Roberts, P. D. (2017). A Statistical Evaluation of Methods of *In Vitro* Growth Assessment for *Phyllosticta citricarpa*: Average Colony Diameter vs. Area. *PLOS ONE*, 12(1), e0170755. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170755>

- Heydari, A., & Pessarakli, M. (2010). A Review on Biological Control of Fungal Plant Pathogens Using Microbial Antagonists. *Journal of Biological Sciences*, 10(4), 273–290. <https://doi.org/10.3923/jbs.2010.273.290>
- Hilber-Bodmer, M., Schmid, M., Ahrens, C., & Freimoser, F. (2017). Competition assays and physiological experiments of soil and phyllosphere yeasts identify *Candida subhashii* as a novel antagonist of filamentous fungi. *BMC Microbiology*, 17, 4. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0908-z>
- Hinsinger, D. D., Basak, J., Gaudeul, M., Cruaud, C., Bertolino, P., Frascaria-Lacoste, N., & Bousquet, J. (2013). The Phylogeny and Biogeographic History of Ashes (*Fraxinus*, *Oleaceae*) Highlight the Roles of Migration and Vicariance in the Diversification of Temperate Trees. *PLoS ONE*, 8(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080431>
- Hosoya, T. (Sankyo C. L., Otani, Y., & Furuya, K. (1993). Materials for the fungus flora of Japan, 46. *Transactions of the Mycological Society of Japan (Japan)*. <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=JP9407168>
- Hrabětová, M., Černý, K., Zahradník, D., & Havrdová, L. (2017). Efficacy of fungicides on *Hymenoscyphus fraxineus* and their potential for control of ash dieback in forest nurseries. *Forest Pathology*, 47(2), e12311. <https://doi.org/10.1111/efp.12311>
- IMPLEN®. NanoPhotometer® P Class User Manual, Version 2.1. (2011).
- Inácio, J. (2003). Yeast occurrence and diversity on the phylloplane of selected plants from the Arrábida Natural Park. PhD thesis (in Portuguese). Universidade Nova de Lisboa, Portugal.
- Ippolito, A., El Ghaouth, A., Wilson, C. L., & Wisniewski, M. (2000). Control of postharvest decay of apple fruit by *Aureobasidium pullulans* and induction of defense responses. *Postharvest Biology and Technology*, 19(3), 265–272. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(00\)00104-6](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(00)00104-6)
- Janisiewicz, W. J., Kurtzman, C. P., & Buyer, J. S. (2010). Yeasts associated with nectarines and their potential for biological control of brown rot. *Yeast*, 27(7), 389–398. <https://doi.org/10.1002/yea.1763>
- Johansson, P., Rydin, H., & Thor, G. (2007). Tree age relationships with epiphytic lichen diversity and lichen life history traits on ash in southern Sweden. *Ecoscience*, 14(1), 81–91. [https://doi.org/10.2980/1195-6860\(2007\)14\[81:TARWEL\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2980/1195-6860(2007)14[81:TARWEL]2.0.CO;2)
- Jönsson, M. T., & Thor, G. (2012). Estimating Coextinction Risks from Epidemic Tree Death: Affiliate Lichen Communities among Diseased Host Tree Populations of *Fraxinus excelsior*. *PLOS ONE*, 7(9), e45701. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045701>

- Juodvalkis, A., & Vasiliauskas, A. (2002). Lietuvos uosynų džiūvimo apimtys ir jas lemiantys veiksniai. *Vagos Mokslo Darbai*, 56, 17–22.
- Jüriado, I., Liira, J., Paal, J., & Suija, A. (2008). Tree and stand level variables influencing diversity of lichens on temperate broad-leaved trees in boreo-nemoral floodplain forests. *Biodiversity and Conservation*, 18(1), 105. <https://doi.org/10.1007/s10531-008-9460-y>
- Kirisits, T., Dämpfle, L., & Kräutler, K. (2013). *Hymenoscyphus albidus* is not associated with an anamorphic stage and displays slower growth than *Hymenoscyphus pseudoalbidus* on agar media. *Forest Pathology*, 43(5), 386–389. <https://doi.org/10.1111/efp.12042>
- Kirisits, T., Matlakova, M., Mottinger-Kroupa, S., Halmschlager, E., & Lakatos, F. (2009). *Chalara fraxinea* associated with dieback of narrow-leaved ash (*Fraxinus angustifolia*). *New Disease Reports*, 19, 43–43.
- Kirisits, Thomas, Matláková, M., Mottinger-Kroupa, S., Cech, T. L., & Halmschlager, E. (2009). The current situation of ash dieback caused by *Chalara fraxinea* in Austria. <https://www.semanticscholar.org/paper/The-current-situation-of-ash-dieback-caused-by-in-Kirisits-Matl%C3%A1kov%C3%A1/618f012641d0ff27c04afcde83316e377c4f2b68>
- Kirk, P., Cannon, P., Stalpers, J., & Minter, D. W. (2008). Dictionary of the Fungi. 10th ed. *CABI Publishing. Great Britain*.
- Köhl, J., Postma, J., Nicot, P., Ruocco, M., & Blum, B. (2011). Stepwise screening of microorganisms for commercial use in biological control of plant-pathogenic fungi and bacteria. *Biological Control*, 57, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2010.12.004>
- Koonin, E. V., & Galperin, M. Y. (2003). Principles and Methods of Sequence Analysis. In *Sequence—Evolution—Function: Computational Approaches in Comparative Genomics*. Kluwer Academic. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK20261/>
- Kosawang, C., Amby, D. B., Bussaban, B., McKinney, L. V., Xu, J., Kjær, E. D., Collinge, D. B., & Nielsen, L. R. (2018). Fungal communities associated with species of *Fraxinus* tolerant to ash dieback, and their potential for biological control. *Fungal Biology*, 122(2), 110–120. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2017.11.002>
- Kosawang, C., McKinney, L. V., Nielsen, L. R., & Kjær, E. D. (2020). Variation in aggressiveness of *Hymenoscyphus fraxineus* genotypes amid the ash dieback epidemic. *Plant Pathology*, 69(4), 677–684. <https://doi.org/10.1111/ppa.13158>
- Kowalski, T. (2006). *Chalara fraxinea* sp. Nov. Associated with dieback of ash (*Fraxinus excelsior*) in Poland. *Forest Pathology*, 36(4), 264–270. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0329.2006.00453.x>

- Kowalski, T., & Holdenrieder, O. (2009a). Pathogenicity of *Chalara fraxinea*. *Forest Pathology*, 39(1), 1–7. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0329.2008.00565.x>
- Kowalski, T., & Holdenrieder, O. (2009b). The teleomorph of *Chalara fraxinea*, the causal agent of ash dieback. *Forest Pathology*, 39(5), 304–308. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0329.2008.00589.x>
- Kowalski, T., Kraj, W., Bednarz, B., & Rossa, R. (2019). The association of *Boeremia lilacis* with necrotic lesions on shoots and leaf petioles and its pathogenicity towards *Fraxinus excelsior*. *European Journal of Plant Pathology*, 154(4), 961–974. <https://doi.org/10.1007/s10658-019-01715-0>
- Kowalski, Tadeusz, Bilański, P., & Holdenrieder, O. (2015). Virulence of *Hymenoscyphus albidus* and *H. fraxineus* on *Fraxinus excelsior* and *F. pennsylvanica*. *PLoS ONE*, 10(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141592>
- Kowalski, Tadeusz, Kraj, W., & Bednarz, B. (2016). Fungi on stems and twigs in initial and advanced stages of dieback of European ash (*Fraxinus excelsior*) in Poland. *European Journal of Forest Research*, 135(3), 565–579. <https://doi.org/10.1007/s10342-016-0955-x>
- Kräutler, K., Treitler, R., & Kirisits, T. (2015). *Hymenoscyphus fraxineus* can directly infect intact current-year shoots of *Fraxinus excelsior* and artificially exposed leaf scars. *Forest Pathology*, 45(4), 274–280. <https://doi.org/10.1111/efp.12168>
- Kräutler, Katharina, & Kirisits, T. (2012). The ash dieback pathogen *Hymenoscyphus pseudoalbidus* is associated with leaf symptoms on ash species (*Fraxinus* spp.). *Journal of Agricultural Extension and Rural Development*, 4(9). <https://doi.org/10.5897/JAERD12.065>
- Kshandakar, S. (2018). Clonal Progeny Selection for Tree Improvement. 3, 21–24.
- Kumar, V. (2016). Clonal forestry: Benefits and limitation. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.2657.2889>
- Kurtzman, C., Fell, J. W., & Boekhout, T. (2011). *The Yeasts: A Taxonomic Study*. Elsevier.
- Lacey, L. A. (Ed.). (1997). *Manual of techniques in insect pathology*. Acad. Press.
- Lahiri, A. (2020). Endophytic diversity of *Fraxinus excelsior* L.(European ash) and its interaction with the dieback pathogen *Hymenoscyphus fraxineus*.
- Lahiri, A., Douglas, G. C., Murphy, B. R., & Hodkinson, T. R. (2019). *In Vitro* Methods for Plant–Microbe Interaction and Biocontrol Studies in European Ash (*Fraxinus excelsior* L.). In T. R. Hodkinson, F. M. Doohan, M. J. Saunders, & B. R. Murphy (Eds.),

- Endophytes for a Growing World* (1st ed., pp. 328–340). Cambridge University Press.
<https://doi.org/10.1017/9781108607667.016>
- Laine, L. (1976). The occurrence of *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. In woody plants in Finland. *Metsäntutkimuslaitoksen Julkaisu*, 90(3).
<https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19771333327>
- Landolt, J., Gross, A., Holdenrieder, O., & Pautasso, M. (2016). Ash dieback due to *Hymenoscyphus fraxineus*: What can be learnt from evolutionary ecology? *Plant Pathology*, 65(7), 1056–1070. <https://doi.org/10.1111/ppa.12539>
- Langer, G. (2017). Collar rots in forests of Northwest Germany affected by ash dieback. *Baltic Forestry*, 23, 4–19.
- Latz, M. A. C., Jensen, B., Collinge, D. B., & Jørgensen, H. J. L. (2018). Endophytic fungi as biocontrol agents: Elucidating mechanisms in disease suppression. *Plant Ecology & Diversity*, 11(5–6), 555–567. <https://doi.org/10.1080/17550874.2018.1534146>
- Leakey, R. R. B. (1987). Clonal forestry in the tropics—A review of developments, strategies and opportunities. *The Commonwealth Forestry Review*, 66(1 (206)), 61–75. JSTOR.
- Lederer, M. A., Nielsen, D. S., Toldam-Andersen, T. B., Herrmann, J. V., & Arneborg, N. (2013). Yeast species associated with different wine grape varieties in Denmark. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B — Soil & Plant Science*, 63(1), 89–96.
<https://doi.org/10.1080/09064710.2012.723738>
- Lee, H., Jung, H., & Summerbell, R. (2006). *Phaeomoniella zymoides* and *Phaeomoniella pinifoliorum* spp. Nov., new acid-tolerant epiphytic fungi isolated from pine needles in Korea. *Mycologia*, 98, 598–611. <https://doi.org/10.1080/15572536.2006.11832663>
- Li, A.-H., Yuan, F.-X., Groenewald, M., Bensch, K., Yurkov, A. M., Li, K., Han, P.-J., Guo, L.-D., Aime, M. C., Sampaio, J. P., Jindamorakot, S., Turchetti, B., Inacio, J., Fungsin, B., Wang, Q.-M., & Bai, F.-Y. (2020). Diversity and phylogeny of basidiomycetous yeasts from plant leaves and soil: Proposal of two new orders, three new families, eight new genera and one hundred and seven new species. *Studies in Mycology*, 96, 17–140.
<https://doi.org/10.1016/j.simyco.2020.01.002>
- Lietuvos miško genetiniai ištekliai. (2020). <https://www.forestgen.mi.lt/> (Accessed 13 January 2020)
- Liu, J., Sui, Y., Wisniewski, M., Droby, S., & Liu, Y. (2013). Review: Utilization of antagonistic yeasts to manage postharvest fungal diseases of fruit. *International Journal of Food Microbiology*, 167(2), 153–160.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.09.004>

- Lösing, H. (2013). Susceptibility of *Fraxinus* species to ash dieback caused by *Chalara fraxinea*. *Acta Horticulturae*, 1014, 201–203. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2013.1014.46>
- Luchi, N., Ghelardini, L., Santini, A., Migliorini, D., & Capretti, P. (2015). First Record of Ash Dieback Caused by *Hymenoscyphus fraxineus* on *Fraxinus excelsior* in the Apennines (Tuscany, Italy). *Plant Disease*, 100(2), 535. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-15-0975-PDN>
- Lutz, M. C., Lopes, C. A., Sosa, M. C., & Sangorrín, M. P. (2012). A new improved strategy for the selection of cold-adapted antagonist yeasts to control postharvest pear diseases. *Biocontrol Science and Technology*, 22(12), 1465–1483. <https://doi.org/10.1080/09583157.2012.735223>
- Lygis, V., Bakys, R., Gustiene, A., Burokiene, D., Matelis, A., & Vasaitis, R. (2014). Forest self-regeneration following clear-felling of dieback-affected *Fraxinus excelsior*: Focus on ash. *European Journal of Forest Research*, 133(3), 501–510. <https://doi.org/10.1007/s10342-014-0780-z>
- Lygis, V., Prospero, S., Burokiene, D., Schoebel, C., Marčiulynienė, D., Norkute, G., & Rigling, D. (2016). Virulence of the invasive ash pathogen *Hymenoscyphus fraxineus* in old and recently established populations. *Plant Pathology*. <https://doi.org/10.1111/ppa.12635>
- Lygis, V., Vasiliauskas, R., Larsson, K.-H., & Stenlid, J. (2005). Wood-inhabiting fungi in stems of *Fraxinus excelsior* in declining ash stands of northern Lithuania, with particular reference to *Armillaria cepistipes*. *Scandinavian Journal of Forest Research*, 20(4), 337–346. <https://doi.org/10.1080/02827580510036238>
- McCormack, P. J., Wildman, H. G., & Jeffries, P. (1994). Production of antibacterial compounds by phylloplane-inhabiting yeasts and yeastlike fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(3), 927–931.
- McDonald, B. A., & Linde, C. (2002). Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 40, 349–379. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.40.120501.101443>
- McKinney, L. V., Thomsen, I. M., Kjær, E. D., & Nielsen, L. R. (2012). Genetic resistance to *Hymenoscyphus pseudoalbidus* limits fungal growth and symptom occurrence in *Fraxinus excelsior*. *Forest Pathology*, 42(1), 69–74. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0329.2011.00725.x>

- McMullan, M., Rafiqi, M., Kaithakottil, G., Clavijo, B. J., Bilham, L., Orton, E., Percival-Alwyn, L., Ward, B. J., Edwards, A., Saunders, D. G. O., Accinelli, G. G., Wright, J., Verweij, W., Koutsovoulos, G., Yoshida, K., Hosoya, T., Williamson, L., Jennings, P., Ioos, R., ... Clark, M. D. (2018). The ash dieback invasion of Europe was founded by two genetically divergent individuals. *Nature Ecology & Evolution*, 2(6), 1000. <https://doi.org/10.1038/s41559-018-0548-9>
- McNeil, B., & Harvey, L. (2008). Practical Fermentation Technology. John Wiley & Sons.
- Milanović, V., Comitini, F., & Ciani, M. (2013). Grape berry yeast communities: Influence of fungicide treatments. *International Journal of Food Microbiology*, 161(3), 240–246. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.12.019>
- Miller, P. M., Miller, P. W., Miller, P., Miller, P. M., Miller, P. M., & Miller, P. M. (1955). V-8 juice agar as a general purpose medium for fungi and bacteria. <https://www.scienceopen.com/document?vid=27cba193-88e2-48b3-a2ab-f47474228610>
- Mounir, R., Durieux, A., Bodo, E., Allard, C., Simon, J.-P., Achbani, E.-H., El-Jaafari, S., Douira, A., & Jijakli, M.-H. (2007). Production, formulation and antagonistic activity of the biocontrol like-yeast *Aureobasidium pullulans* against *Penicillium expansum*. *Biotechnology Letters*, 29(4), 553–559. <https://doi.org/10.1007/s10529-006-9269-2>
- Musolin, D., Selikhovkin, A., Shabunin, D., Viacheslav, Z., & Baranchikov, Y. (2017). Between Ash Dieback and Emerald Ash Borer: Two Asian Invaders in Russia and the Future of Ash in Europe. *Baltic Forestry*, 23, 316–333.
- Navasaitis, M., Ozolinčius, R., Smaliukas, D., & Balevičienė, J. (2003). Lietuvos dendroflora. Lututė.
- National Center for Biotechnology Information (NCBI)[Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; [1988] – [cited 2020 Apr 06]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- Ogris, N., Hauptman, T., & Jurc, D. (2009). *Chalara fraxinea* causing common ash dieback newly reported in Slovenia. *Plant Pathology*, 58(6), 1173–1173. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2009.02105.x>
- Ogris, N., Hauptman, T., Jurc, D., Floreancig, V., Marsich, F., & Montecchio, L. (2009). First Report of *Chalara fraxinea* on Common Ash in Italy. *Plant Disease*, 94(1), 133–133. <https://doi.org/10.1094/PDIS-94-1-0133A>

- Orton, E. S., Clarke, M., Brasier, C. M., Webber, J. F., & Brown, J. K. M. (2019). A versatile method for assessing pathogenicity of *Hymenoscyphus fraxineus* to ash foliage. *Forest Pathology*, 49(2). <https://doi.org/10.1111/efp.12484>
- Parra, G., Bradnam, K., & Korf, I. (2007). CEGMA: A pipeline to accurately annotate core genes in eukaryotic genomes. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 23(9), 1061–1067. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm071>
- Pauvert, C., Fort, T., Calonnec, A., Faivre d’Arcier, J., Chancerel, E., Massot, M., Chiquet, J., Robin, S., Bohan, D. A., Vallance, J., & Vacher, C. (2020). Microbial association networks give relevant insights into plant pathobiomes [Preprint]. *Ecology*. <https://doi.org/10.1101/2020.02.21.958033>
- Pearson, M. N., Beever, R. E., Boine, B., & Arthur, K. (2009). Mycoviruses of filamentous fungi and their relevance to plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 10(1), 115–128. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2008.00503.x>
- Philp, R. W., Bruce, A., & Munro, A. G. (1995). The effect of water soluble Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) and Sitka spruce [*Picea sitchensis* (Bong.) carr.] heartwood and sapwood extracts on the growth of selected *Trichoderma* species. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 35(4), 355–367. [https://doi.org/10.1016/0964-8305\(95\)00053-9](https://doi.org/10.1016/0964-8305(95)00053-9)
- Pliūra, A., Bakys, R., Suchockas, V., Marčiulyrienė, D., Gustienė, A., Verbyla, V., & Lygis, V. (2017). 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* (pp. 150–165). Uppsala : Swedish University of Agricultural Sciences.
- Pliūra, A., Lygis, V., Suchockas, V., & Bartkevičius, E. (2011). Performance of Twenty Four European *Fraxinus excelsior* Populations in Three Lithuanian Progeny Trials with a Special Emphasis on Resistance to *Chalara Fraxinea*. *BALTIC FORESTRY*, 17(1), 18.
- Pliūra, A., Marčiulyrienė, D., Bakys, R., & Suchockas, V. (2014). Dynamics of Genetic Resistance to *Hymenoscyphus pseudoalbidus* in Juvenile *Fraxinus excelsior* Clones. *BALTIC FORESTRY*, 20(1), 18.
- Pourmoghaddam, M. J., Lambert, C., Surup, F., Khodaparast, S. A., Krisai-Greilhuber, I., Voglmayr, H., & Stadler, M. (2020). Discovery of a new species of the *Hypoxylon rubiginosum* complex from Iran and antagonistic activities of *Hypoxylon* spp. Against the Ash Dieback pathogen, *Hymenoscyphus fraxineus*, in dual culture. *MycKeys*, 66, 105–133. <https://doi.org/10.3897/mycokeys.66.50946>

- Power, M. W. P., Hopkins, A., Chen, J., Bengtsson, S. B. K., Vasaitis, R., & Cleary, M. (2017). European *Fraxinus* species introduced into new Zealand retain many of their native endophytic fungi. *Baltic Forestry*, 23, 74–81.
- Prakitchaiwattana, C. J., Fleet, G. H., & Heard, G. M. (2004). Application and evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to analyse the yeast ecology of wine grapes. *FEMS Yeast Research*, 4(8), 865–877. <https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2004.05.004>
- Pryor, M., & Watson, G. (2016). Mature tree transplanting: Science supports best management practice. *Arboricultural Journal*, 38(1), 2–27. <https://doi.org/10.1080/03071375.2016.1157401>
- Przybył, K. (2002). Fungi associated with necrotic apical parts of *Fraxinus excelsior* shoots. *Forest Pathology*, 32(6), 387–394. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0329.2002.00301.x>
- Pukacki, P. M., & Przybył, K. (2005). Frost Injury as a Possible Inciting Factor in Bud and Shoot Necroses of *Fraxinus excelsior* L. *Journal of Phytopathology*, 153(9), 512–516. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2005.01010.x>
- Queloz, V., Grünig, C. R., Berndt, R., Kowalski, T., Sieber, T. N., & Holdenrieder, O. (2011). Cryptic speciation in *Hymenoscyphus albidus*: Speciation in *Hymenoscyphus albidus*. *Forest Pathology*, 41(2), 133–142. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0329.2010.00645.x>
- Rabiey, M., Hailey, L. E., Roy, S. R., Grenz, K., Al-Zadjali, M. A. S., Barrett, G. A., & Jackson, R. W. (2019). Endophytes vs tree pathogens and pests: Can they be used as biological control agents to improve tree health? *European Journal of Plant Pathology*, 155(3), 711–729. <https://doi.org/10.1007/s10658-019-01814-y>
- Rashmi, M. (2019). A worldwide list of endophytic fungi with notes on ecology and diversity. *Mycosphere*, 10(1), 798–1079. <https://doi.org/10.5943/mycosphere/10/1/19>
- Reinprecht, L., & Repák, M. (2019). The Impact of Paraffin-Thermal Modification of Beech Wood on Its Biological, Physical and Mechanical Properties. *Forests*, 10(12), 1102. <https://doi.org/10.3390/f10121102>
- Rieksts-Riekstiņš, R., Zeltiņš, P., Baliuckas, V., Brūna, L., Zaļuma, A., & Kāpostiņš, R. (2020). *Pinus sylvestris* Breeding for Resistance against Natural Infection of the Fungus *Heterobasidion annosum*. *Forests*, 11(1), 23. <https://doi.org/10.3390/f11010023>
- Robert, V., Vu, D., Amor, A. B. H., van de Wiele, N., Brouwer, C., Jabas, B., Szoke, S., Dridi, A., Triki, M., ben Daoud, S., Chouchen, O., Vaas, L., de Cock, A., Stalpers, J. A., Stalpers, D., Verkley, G. J. M., Groenewald, M., dos Santos, F. B., Stegehuis, G., ... Crous, P. W. (2013). MycoBank gearing up for new horizons. *IMA Fungus*, 4(2), 371–379. <https://doi.org/10.5598/ima fungus.2013.04.02.16>

- Rosa, C. A., & Peter, G. (2006). Black yeasts and meristematic fungi: Ecology, diversity and identification. In *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*. Springer Science & Business Media.
- Rosenvald, R., Drenkhan, R., Riit, T., & Lõhmus, A. (2015). Towards silvicultural mitigation of the European ash (*Fraxinus excelsior*) dieback: The importance of acclimated trees in retention forestry. *Canadian Journal of Forest Research*, 45(9), 1206–1214. <https://doi.org/10.1139/cjfr-2014-0512>
- Rosling, A., Landeweert, R., Lindahl, B. D., Larsson, K.-H., Kuyper, T. W., Taylor, A. F. S., & Finlay, R. D. (2003). Vertical distribution of ectomycorrhizal fungal taxa in a podzol soil profile. *New Phytologist*, 159(3), 775–783. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2003.00829.x>
- Rytkönen, A., Lilja, A., Drenkhan, R., Gaitnieks, T., & Hantula, J. (2011). First record of *Chalara fraxinea* in Finland and genetic variation among isolates sampled from Åland, mainland Finland, Estonia and Latvia. *Forest Pathology*, 41(3), 169–174. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0329.2010.00647.x>
- Saikkonen, K., Faeth, S. H., Helander, M., & Sullivan, T. J. (1998). Fungal endophytes: A continuum of interactions with host plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*. <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201302917830>
- Sbordoni, V., Allegrucci, G., & Cesaroni, D. (2012). Population Structure. In W. B. White & D. C. Culver (Eds.), *Encyclopedia of Caves (Second Edition)* (pp. 608–618). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-383832-2.00090-6>
- Schena, Ippolito, A., Zahavi, T., Cohen, L., Nigro, F., & Droby, S. (1999). Genetic diversity and biocontrol activity of *Aureobasidium pullulans* isolates against postharvest rots. *Postharvest Biology and Technology (Netherlands)*. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=NL2000001612>
- Schena, L., Sialer, M. F., & Gallitelli, D. (2002). Molecular Detection of Strain L47 of *Aureobasidium pullulans*, a Biocontrol Agent of Postharvest Diseases. *Plant Disease*, 86(1), 54–60. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2002.86.1.54>
- Schlegel, M., Dubach, V., von Buol, L., & Sieber, T. N. (2016). Effects of endophytic fungi on the ash dieback pathogen. *FEMS Microbiology Ecology*, 92(9). <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw142>
- Schoebel, C. N., Botella, L., Lygis, V., & Rigling, D. (2017). Population genetic analysis of a parasitic mycovirus to infer the invasion history of its fungal host. *Molecular Ecology*, 26(9), 2482–2497. <https://doi.org/10.1111/mec.14048>

- Schoebel, C. N., Zoller, S., & Rigling, D. (2014). Detection and genetic characterisation of a novel mycovirus in *Hymenoscyphus fraxineus*, the causal agent of ash dieback. *Infection, Genetics and Evolution*, 28, 78–86. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.09.001>
- Scholtysik, A., Unterseher, M., Otto, P., & Wirth, C. (2013). Spatio-temporal dynamics of endophyte diversity in the canopy of European ash (*Fraxinus excelsior*). *Mycological Progress*, 12(2), 291–304. <https://doi.org/10.1007/s11557-012-0835-9>
- Schwanda, K., & Kirisits, T. (2016). Pathogenicity of *Hymenoscyphus fraxineus* towards leaves of three European ash species: *Fraxinus excelsior*, *F. angustifolia* and *F. ornus*. *Plant Pathology*, 65(7), 1071–1083. <https://doi.org/10.1111/ppa.12499>
- Schwarz-Sommer, Z., Huijser, P., Nacken, W., Saedler, H., & Sommer, H. (1990). Genetic Control of Flower Development by Homeotic Genes in *Antirrhinum majus*. *Science*, 250(4983), 931–936. <https://doi.org/10.1126/science.250.4983.931>
- Singh, R., Gaur, R., Biswas, P., Bansal, shikha, Jamal, P., & Gaur, S. (2015). *Aureobasidium pullulans*—An Industrially Important Pullulan Producing Black Yeast. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, Volume 4, 605–622.
- Singh, R. K., Gaur, R., Gaur, M. K., Pandey, P. K., & Jamal, F. (2015). Antimicrobial activity of a thermotolerant *Aureobasidium pullulans* strain isolated from Faizabad region of Uttar Pradesh in India. Undefined. <https://www.semanticscholar.org/paper/Antimicrobial-activity-of-a-thermotolerant-strain-Singh-Gaur/740b9c47fadc85cc278e99ad3496f277d09e5477>
- Soltaninejad, N., Mohammadi, H., & Massumi, H. (2017). Isolation, identification and pathogenicity of *Botryosphaeriaceae* and *Phaeoacremonium* species associated with decline of *Prunus* species in Iran. *JOURNAL OF PLANT PATHOLOGY*, 99, 571–581. <https://doi.org/10.4454/jpp.v99i3.3937>
- Spadaro, D., & Gullino, M. (2005). Improving the efficacy of biocontrol agents against soilborne pathogens. *Crop Protection*, 24, 601–613. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2004.11.003>
- Stocks, J. J., Buggs, R. J. A., & Lee, S. J. (2017). A first assessment of *Fraxinus excelsior* (common ash) susceptibility to *Hymenoscyphus fraxineus* (ash dieback) throughout the British Isles. *Scientific Reports*, 7(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16706-6>
- Stover, N., & Cavalcanti, A. (2017). Using NCBI BLAST. In *Current Protocols in Essential Laboratory Techniques* (Vol. 2017, pp. 11.1.1-11.1.34). <https://doi.org/10.1002/cpet.8>

- Swedjemark, G., Stenlid, J., & Karlsson, B. (1998). Genetic variation among clones of *Picea abies* in resistance to growth of *Heterobasidion annosum*. <https://www.semanticscholar.org/paper/Genetic-variation-among-clones-of-Picea-abies-in-to-Swedjemark-Stenlid/4dea947d2493ebcdae1fad8c15be237ac2d19c6d>
- Szabó, I. (2009). First report of *Chalara fraxinea* affecting common ash in Hungary. *Plant Pathology*, 58(4), 797–797. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2009.02032.x>
- Talgø, V., Sletten, A., Brurberg, M. B., Solheim, H., & Stensvand, A. (2009). *Chalara fraxinea* Isolated from Diseased Ash in Norway. *Plant Disease*, 93(5), 548–548. <https://doi.org/10.1094/PDIS-93-5-0548A>
- Theißen, G., & Gramzow, L. (2016). Chapter 8—Structure and Evolution of Plant MADS Domain Transcription Factors. In D. H. Gonzalez (Ed.), *Plant Transcription Factors* (pp. 127–138). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800854-6.00008-7>
- Thomas, P. A. (2016). Biological Flora of the British Isles: *Fraxinus excelsior*. *Journal of Ecology*, 104(4), 1158–1209. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.12566>
- Timmermann, V., Børja, I., Hietala, A. M., Kirisits, T., & Solheim, H. (2011). Ash dieback: Pathogen spread and diurnal patterns of ascospore dispersal, with special emphasis on Norway*. *EPPO Bulletin*, 41(1), 14–20. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.2010.02429.x>
- Valstybinė miškų tarnyba, L. R. aplinkos ministerija. (2018). *Miškų ūkio statistika*. <http://www.amvmt.lt/> (Accessed 18 April 2020)
- Vasiliauskas. (2001). Šakninės pinties (*Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref.) paplitimas pušynuose, įveistuose žemės ūkio naudmenuose, kovos su ja priemonės ir kovos rezultatai.
- Vero, S., Mondino, P., Burgueño, J., Soubes, M., & Wisniewski, M. (2002). Characterization of biocontrol activity of two yeast strains from Uruguay against blue mold of apple. *Postharvest Biology and Technology*, 26(1), 91–98. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(01\)00199-5](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(01)00199-5)
- Volke, V., Knapp, S., & Roloff, A. (2019). Survey of *Hymenoscyphus fraxineus* in a central European urban area and exploration of its possible environmental drivers. *Urban Forestry & Urban Greening*, 40, 165–173. <https://doi.org/10.1016/j.ufug.2018.05.013>
- VU Botanikos sodas. (2020). <https://www.botanikos-sodas.vu.lt/> (Accessed 5 May 2020)
- Wallander, E. (2008). Systematics of *Fraxinus* (*Oleaceae*) and evolution of dioecy. *Plant Systematics and Evolution*, 273(1–2), 25–49. <https://doi.org/10.1007/s00606-008-0005-3>

- Wallander, E. (2012). Systematics and floral evolution in *Fraxinus* (*Oleaceae*). 22.
- Wani, Z. A., Ashraf, N., Mohiuddin, T., & Riyaz-Ul-Hassan, S. (2015). Plant-endophyte symbiosis, an ecological perspective. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(7), 2955–2965. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6487-3>
- West, A. G., Shore, P., & Sharrocks, A. D. (1997). DNA binding by MADS-box transcription factors: A molecular mechanism for differential DNA bending. *Molecular and Cellular Biology*, 17(5), 2876–2887. <https://doi.org/10.1128/MCB.17.5.2876>
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR Protocols* (pp. 315–322). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>
- Wu, H. X. (2019). Benefits and risks of using clones in forestry – a review. *Scandinavian Journal of Forest Research*, 34(5), 352–359. <https://doi.org/10.1080/02827581.2018.1487579>
- Xavier, A., & Otoni, W. C. (2009). Applications of micropropagation of Eucalyptus in clonal silviculture in Brazil. *Agronomía Costarricense*, 33(2), 303–307.
- Xhaard, C., Barrès, B., Andrieux, A., Bousset, L., Halkett, F., & Frey, P. (2012). Disentangling the genetic origins of a plant pathogen during disease spread using an original molecular epidemiology approach. *Molecular Ecology*, 21(10), 2383–2398. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05556.x>
- Yurkov, A., Inácio, J., Chernov, I. Y., & Fonseca, Á. (2015). Yeast Biogeography and the Effects of Species Recognition Approaches: The Case Study of Widespread Basidiomycetous Species from Birch Forests in Russia. *Current Microbiology*, 70(4), 587–601. <https://doi.org/10.1007/s00284-014-0755-9>
- Yurlova, N. A., Mokrousov, I. V., & de Hoog, G. S. (1995). Intraspecific variability and exopolysaccharide production in *Aureobasidium pullulans*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 68(1), 57–63. <https://doi.org/10.1007/BF00873293>
- Zabalgogezcoa, I. (2008). Fungal endophytes and their interaction with plant pathogens: A review. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 6(S1), 138–146. <https://doi.org/10.5424/sjar/200806S1-382>
- Zhao, Y.-J., Hosoya, T., Baral, H.-O., Hosaka, K., & Kakishima, M. (2013). *Hymenoscyphus pseudoalbidus*, the correct name for *Lambertella albida* reported from Japan. *Mycotaxon*, 122(1), 25–41. <https://doi.org/10.5248/122.25>

- Zheng, H.-D., & Zhuang, W.-Y. (2013). *Hymenoscyphus albidoides* sp. Nov. And *H. pseudoalbidus* from China. *Mycol Progress*, 13, 625–638.
<https://doi.org/10.1007/s11557-013-0945-z>
- Zheng, H.-D., & Zhuang, W.-Y. (2016). Five new species of *Hymenoscyphus* (*Helotiaceae*, *Ascomycota*) with notes on the phylogeny of the genus. *Mycotaxon*, 130(4), 1017–1038.
<https://doi.org/10.5248/130.1017>

SANTRAUKA

Asta Jarašiūtė

Uosių džiūtės sukėlėjo *Hymenoscyphus fraxineus* savybių tyrimai ir antagonistų paieška

H. fraxineus yra invazinis patogeninis grybas, Europoje sukėlęs uosių džiūtės epidemiją. Nepaisant ilgos ligos istorijos, šiuo metu vis dar nėra rasta efektyvių priemonių jai stabdyti. Šio tyrimo tikslas buvo ištirti turimų *H. fraxineus* izoliatų morfologines savybes bei genetinę struktūrą, o taip pat atrinkti ir įvertinti potencialiai efektyvius biologinės kontrolės agentus, kurie galėtų būti panaudoti ligos progresavimui stabdyti.

Pagal MLG duomenis atlikta *H. fraxineus* populiacinė analizė neparodė aiškos genetinės struktūros, tačiau išskyrė izoliatų į dvi subpopuliacijas. Pagal MLG grupes, kolonizuojamą audinį ir išskyrimo vietovę tolimesniems tyrimams buvo pasirinkti 55-i reprezentatyvūs izoliatai. Buvo atlikti optimalios augimo terpė paieškos eksperimentai, kurie parodė, jog geriausia terpė *H. fraxineus* kultivuoti – uosio ekstrakto agaras (AMEA). Vėliau, siekiant įsitikinti, jog ilgojo saugojimo metu nebuvo prarastos izoliatų savybės, buvo atlikti patogeniškumo testai *in vivo* iki šiol netaikytu metodu ant uosio šakų. Buvo parodytas tik dalies izoliatų (50%) gebėjimas sukelti audinių nekrozę, galimai dėl poreikio optimizuoti eksperimentno sąlygas.

Antagonizmo testams atlikti buvo išskirti 259-i *F. excelsior* ir *F. pennsylvanica* endofitiniai grybai. Ištyrus mikroskopu, jie suskirstyti į 37 morfologines grupes. Antagonizmo testai atlikti dviem etapais – iš pradžių patikrintas visų morfologinių grupių atstovų inhibicinis potencialas prieš 2 *H. fraxineus* izoliatų, tuomet geriausius rezultatus parodę endofitai tirti su visais patogeno izoliatais. Atlikus antagonizmo testus, buvo atrinkti 4-i statistiškai reikšmingą inhibicinį poveikį *H. fraxineus* izoliatams turintys endofitiniai grybai, kurie buvo identifikuoti kaip 3 organizmai: dvi skirtingos *Aureobasidium pullulans* morfologijos, *Filobasidium wieringae* ir *Phaeomoniella* sp. Šie organizmai ateityje galėtų būti pritaikyti kaip biokontrolės agentai kovoje su uosių džiūtimi.

SUMMARY

Asta Jarašiūtė

Study of The Causal Agent of Ash Dieback *Hymenoscyphus fraxineus* Properties and Search for Antagonistic Microorganisms

H. fraxineus is an invasive pathogenic microscopic fungus that has caused the ash dieback epidemic in Europe. Despite a long history of the disease, no effective measures have yet been found to stop it. This study aimed to investigate the morphological characteristics and genetic structure of available *H. fraxineus* isolates, as well as to select and evaluate potentially effective biological control agents that could be used to treat disease or to slow down its progression.

Population analysis of *H. fraxineus* based on MLG data did not show a clear genetic structure but grouped isolates into two subpopulations. 55 representative isolates were selected for further studies based on their MLG groups, colonized tissue, and isolation site. Optimal growth medium search experiments were performed and showed that the best medium for culturing *H. fraxineus* is ash extract agar (AMEA). Subsequently, to ensure that the properties of the isolates were not lost during long-term storage, *in vivo* pathogenicity tests were performed on ash branches. The ability of only a fraction of isolates (50%) to induce tissue necrosis was demonstrated, possibly due to the need to optimize experimental conditions.

259 *F. excelsior* and *F. pennsylvanica* endophytic fungi were isolated and divided into 37 morphological groups based on their colony features. Antagonism tests were performed in two steps - initially, the inhibition potential of all morphological groups against 2 *H. fraxineus* isolates was tested. Afterwards 4 endophytes with the best results were tested with all 55 pathogen isolates. Four endophytic fungi with statistically significant inhibitory effects on *H. fraxineus* isolates were identified as 3 organisms: two different morphologies of *Aureobasidium pullulans*, *Filobasidium wieringae* and *Phaeomoniella* sp. These organisms could be used in the future as biocontrol agents to fight ash dieback disease.

PRIEDAI

Priedas 1. Išskirtų mėginių pasiskirstymas pagal išskyrimo vietovę, laiką ir vietą.

Vietovė	Išskyrimo laikotarpis	Išskyrimo vieta			
		Pumpurai	Lapkočiai	Mediena be žievės	Mediena su žieve
Kairėnai	Vasaris	+	-	+	+
Verkiai	Kovas	+	-	+	+
Balsiai	Kovas	+	-	+	+
Verkiai	Rugsėjis	+	+	+	+

Priedas 2. 5-ių genetiškai ir morfologiškai skirtingų *H. fraxineus* izoliatų kolonijų skersmuo, juos auginant ant 5-ių skirtingų mitybinių terpių. Eksperimentas vykdytas 4-ias savaites, matavimus atliekant kas 7-ias dienas (eksperimento sąlygos aprašytos 2.3.5).

	1 matavimas					2 matavimas				
	AMEA	OMA	V8	OMA + AS	V8 + AS	AMEA	OMA	V8	OMA + AS	V8 + AS
<i>Izoliatai</i>										
<i>VI24L</i>	2.5	3.6	3.6	2.8	4.3	6.9	9	7.7	6.7	7.7
<i>KR28P</i>	5.1	1.6	2.6	1.6	3	8.4	4.8	8.4	4.4	6.5
<i>BU14L</i>	3.4	2.5	2.7	2.5	3	5.8	6.3	5.7	6.4	6.3
<i>UKM11L</i>	2.9	2.1	2.2	2.5	2.8	6.3	5.9	6	6.2	6.7
<i>KU37P</i>	1.2	0	0	0	0	4.1	1.9	0.8	1	1.2
	3 matavimas					4 matavimas				
	AMEA	OMA	V8	OMA + AS	V8 + AS	AMEA	OMA	V8	OMA + AS	V8 + AS
<i>VI24L</i>	8.3	9	8.6	9	8.7	9	9	8.7	9	9
<i>KR28P</i>	9	8	8.9	6.4	8.1	9	9	8.9	7.6	8.6
<i>BU14L</i>	7	8.6	6.9	8.8	8	7.7	8.8	7.1	8.8	9
<i>UKM11L</i>	8.4	9	8	8.8	7.6	9	9	9	8.8	9
<i>KU37P</i>	5.6	2.8	2.2	2.1	2.4	6.8	3.8	4.1	4.1	4.3

Priedas 3. *H. fraxineus* izoliatų VI24L, BU14L ir UKM11L augimo greitis (cm / savaitę) ant 5-ių skirtingų mitybinių terpių.

		AMEA	OMA	V8	OMA + AS	V8 + AS
VI24L	1 savaitė	2,5	3,6	3,6	2,8	4,3
	2 savaitė	4,4	5,4	4,1	3,9	3,4
	3 savaitė	1,4	*	0,9	2,3	1,0
	4 savaitė	0,7	*	0,1	*	0,3
	Vidutinis augimo greitis, cm / savaitę	2,3	4,5	2,2	3,0	2,3
BU14L	1 savaitė	3,4	2,5	2,7	2,5	3,0
	2 savaitė	2,4	3,8	3,0	3,9	3,3
	3 savaitė	1,2	2,3	1,2	2,4	1,7
	4 savaitė	0,7	0,2	0,2	0,0	1,0
	Vidutinis augimo greitis, cm / savaitę	1,9	2,2	1,8	2,2	2,3
UKM11L	1 savaitė	2,9	2,1	2,2	2,5	2,8
	2 savaitė	3,4	3,8	3,8	3,7	3,9
	3 savaitė	2,1	3,1	2,0	2,6	0,9
	4 savaitė	0,6	*	1,0	0,0	1,4
	Vidutinis augimo greitis, cm / savaitę	2,3	3,0	2,3	2,2	2,3

* Izoliato augimas sustojo (kolonija pasiekė savo augimo potencialą – išaugo per visą lėkštelės plotą) prieš eksperimento pabaigą.

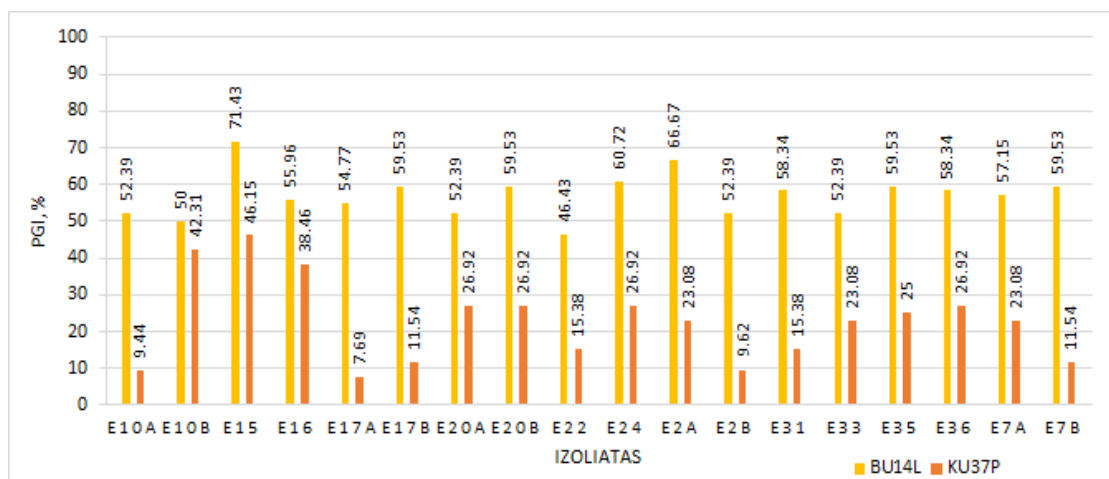
Priedas 4. *In vivo* patogeniškumo testų šakų vidutinis diametras pagal izoliatą, kuriuo šaka buvo apkrėsta.

Izoliatas	Šakos diametras Nr. 1	Šakos diametras Nr. 2	Šakos diametras Nr. 3
<i>Kontrolė</i>	2,65	3,95	5,20
<i>KU43P</i>	2,40	3,80	4,50
<i>KR37L</i>	2,35	3,95	4,95
<i>BU44P</i>	2,35	4,15	4,65
<i>BU60L</i>	2,50	3,80	4,70
<i>KR54L</i>	2,60	3,50	4,30
<i>BU24L</i>	2,35	3,90	5,50
<i>VI41L</i>	2,45	3,30	5,25
<i>UKM33L</i>	2,15	3,50	5,35
<i>KU38L</i>	2,05	3,65	5,05
<i>VI28L</i>	2,55	3,50	4,55
<i>UKM37L</i>	2,50	3,05	5,60
<i>VI26P</i>	2,55	3,35	4,40
<i>KR28P</i>	2,45	3,40	4,55
<i>UKM39P</i>	2,35	4,00	4,70
<i>Vidurkis</i>	2,42	3,65	4,88

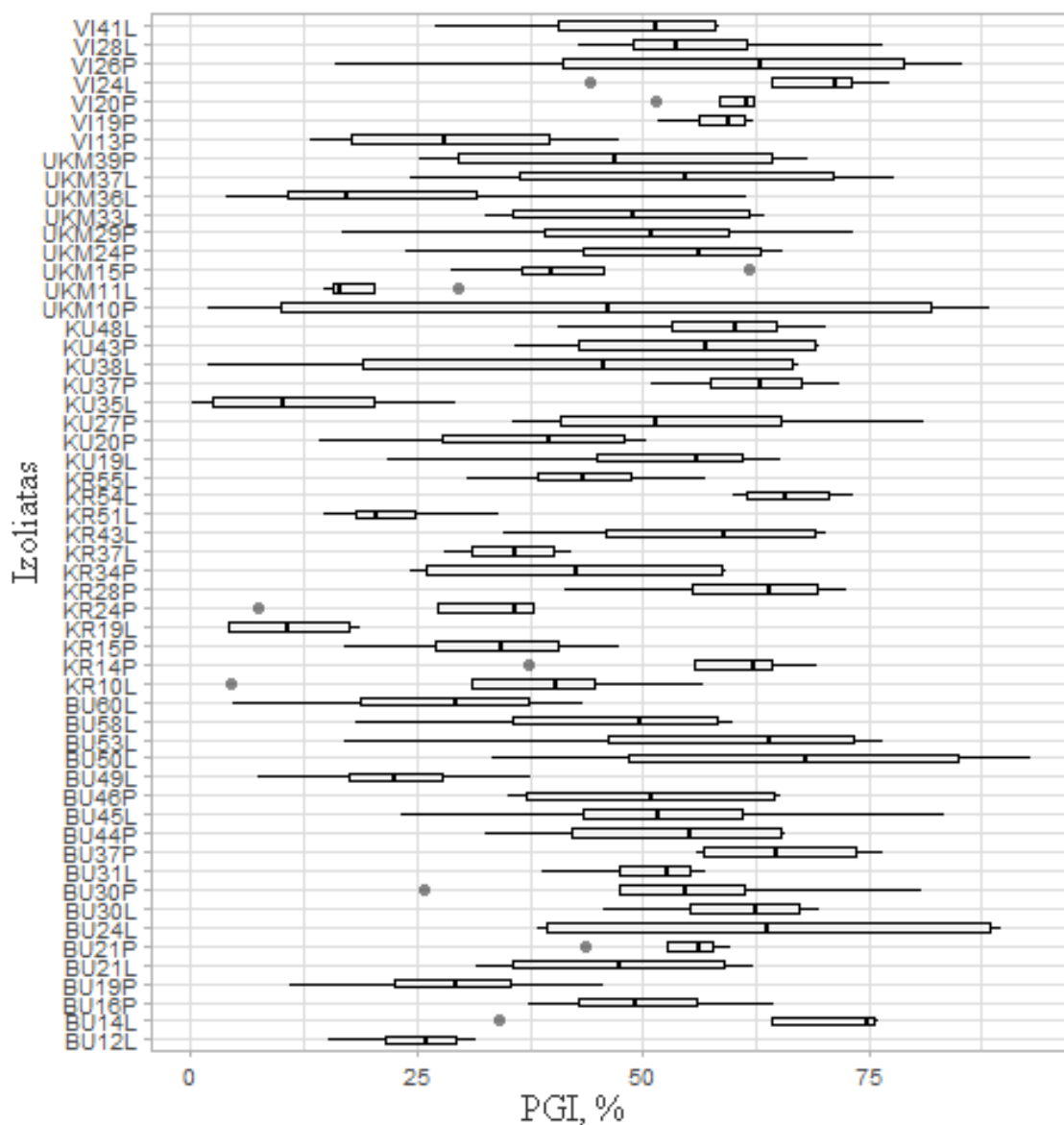
Priedas 5. Mitybinės terpės atrankos eksperimente naudotų *H. fraxineus* izoliatų savybių palyginimas.

Izoliatas	Virulentiškumas	MLG grupę sudarančių izoliatų skaičius	Išskyrimo audinys
<i>BU14L</i>	Aukštas	7	Nekrotinė mediena
<i>KR28P</i>	Vidutinis	2	Lapkočiai
<i>KU37P</i>	NA	2	Lapkočiai
<i>UKM11L</i>	NA	3	Nekrotinė mediena
<i>VI24L</i>	NA	2	Nekrotinė mediena

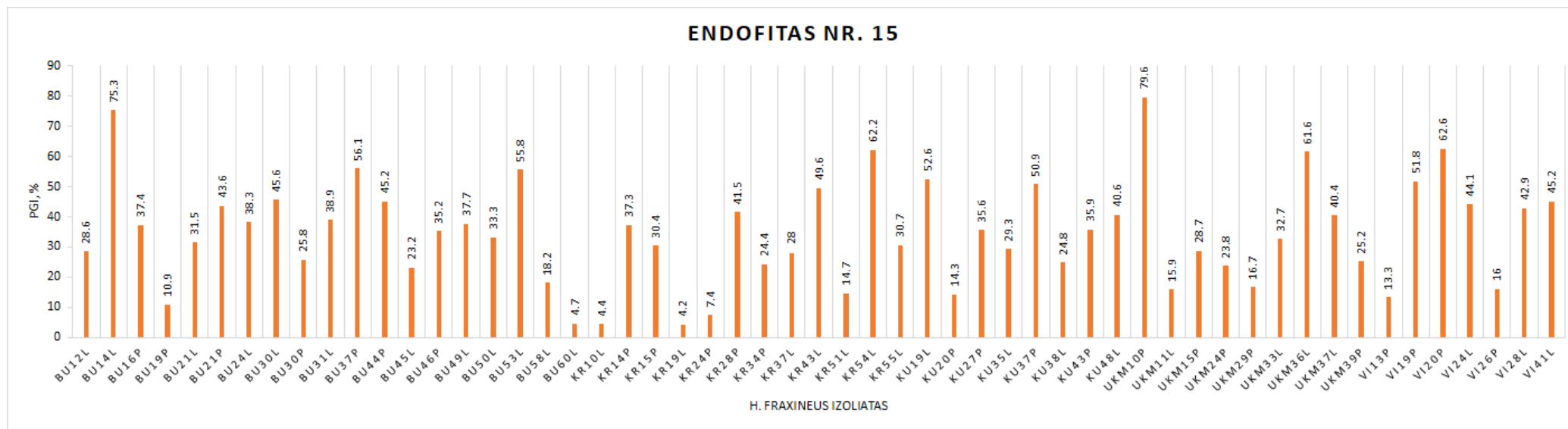
Priedas 6. Pirminių antagonizmo testų PGI vertės.



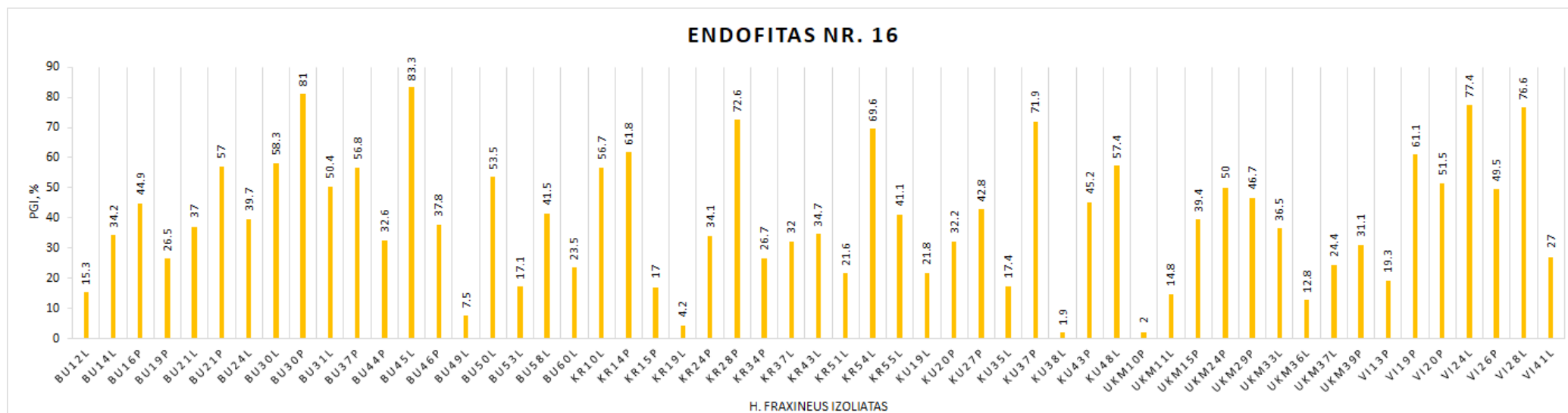
Priedas 7. PGI verčių pasiskirstymas pagal *H. fraxineus* izoliatą – inhibicinis endofitų potencialas priklauso pagal patogeno genetinių ir morfologinių savybių.



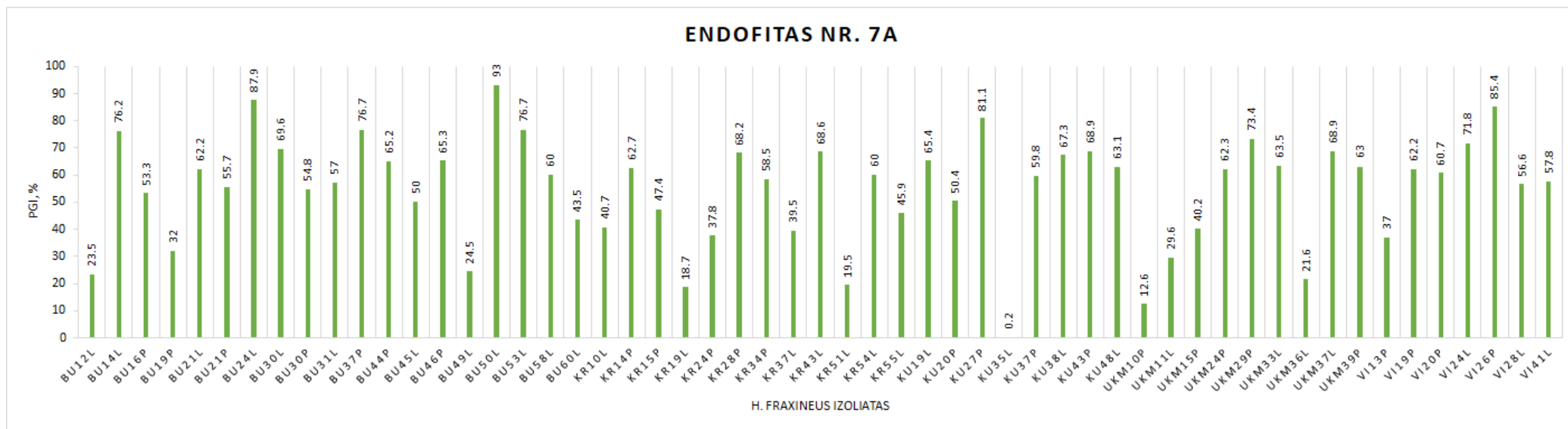
Priedas 8. Endofito Nr. 15 (*Filobasidium wieringae*) antrinio antagonizmo testų PGI vertės 55-iems *H. fraxineus* izoliatams.



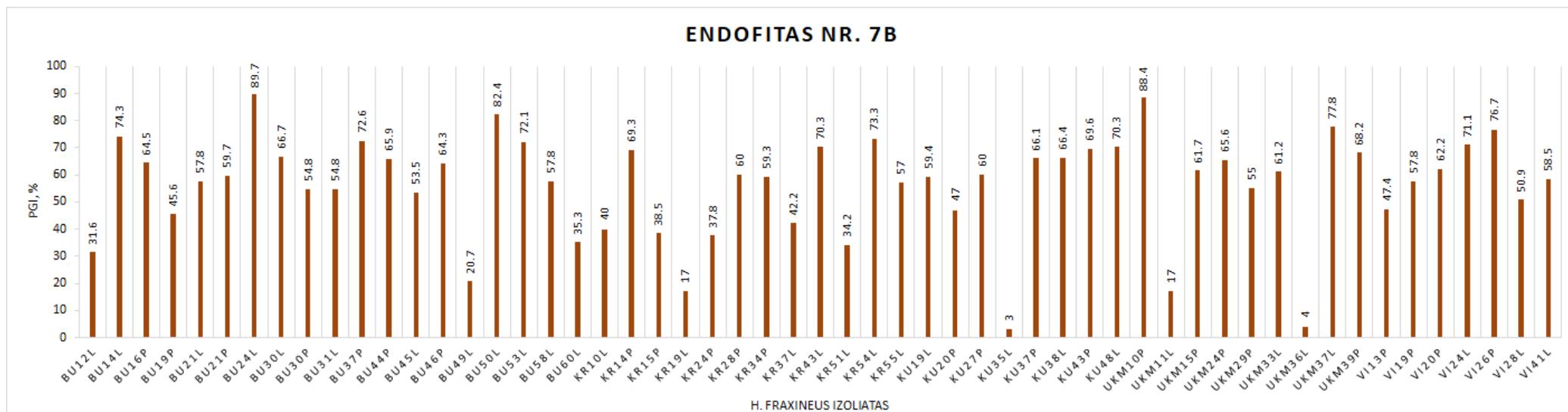
Priedas 9. Endofito Nr. 16 (*Phaemoniella* sp.) antrinio antagonizmo testų PGI vertės 55-iems *H. fraxineus* izoliatams.



²**Priedas 10.** Endofito Nr. 7A (*Aureobasidium pullulans* morfologijos A) antrinio antagonizmo testų PGI vertės 55-iems *H. fraxineus* izoliatams.



Priedas 11. Endofito Nr. 7B (*Aureobasidium pullulans* morfologijos B) antrinio antagonizmo testų PGI vertės 55-iems *H. fraxineus* izoliatams.



Priedas 12. Antrinių antagonizmo testų vidutinių PGI verčių ir MLG grupių palyginimas pagal *H. fraxineus* izoliatus. Spalvomis pažymėtos žemiausios (raudonai) ir aukščiausios (žaliai) PGI vertės.

Izoliatas	PGI, %	MLG grupę sudarančių izoliatų skaičius	Izoliatas	PGI, %	MLG grupę sudarančių izoliatų skaičius
BU19P	28,75	2	BU16P	50,03	3
BU21L	47,13	2	BU30L	60,05	3
BU21P	54,00	2	BU37P	65,55	3
BU30P	54,10	2	BU46P	50,65	3
BU31L	50,28	2	BU53L	55,43	3
BU44P	52,23	2	KR37L	35,43	3
BU45L	52,50	2	KR51L	22,50	3
BU49L	22,60	2	KR55L	43,68	3
BU58L	44,38	2	KU19L	49,80	3
KR14P	57,78	2	KU27P	54,88	3
KR15P	33,33	2	KU38L	40,10	3
KR19L	11,03	2	UKM11L	19,33	3
KR24P	29,28	2	UKM33L	48,48	3
KR28P	60,58	2	VI19P	58,23	3
KU20P	35,96	2	VI20P	59,25	3
KU35L	12,48	2	VI26P	56,90	3
KU37P	62,18	2	BU12L	24,75	4
KU43P	54,90	2	BU24L	63,90	4
KU48L	57,85	2	BU50L	65,55	4
UKM10P	45,65	2	KR10L	35,45	4
UKM15P	42,50	2	KR34P	42,23	4
UKM36L	25,00	2	KR43L	55,80	4
UKM37L	52,88	2	KR54L	66,28	4
VI13P	29,25	2	UKM24P	50,43	4
VI24L	66,10	2	BU14L	65,00	7
VI28L	56,75	2	UKM29P	47,95	7
VI41L	47,13	2	BU60L	26,75	Vienintelis atstovas
			UKM39P	46,88	Vienintelis atstovas