

## Pušūnų spyglių grybinių ligų identifikavimas

Kristina Raitelaitytė<sup>1,2</sup>, Arvydas Rutkauskas<sup>1</sup>, Jana Radzijeuskaja<sup>1</sup>, Svetlana Markovskaja<sup>2</sup>,  
Judita Žukauskienė<sup>1</sup>, Algimantas Paulauskas<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Vytauto Didžiojo universitetas, <sup>2</sup> Gamtos tyrimų centras, Botanikos institutas

Pastaruoju metu vis daugėja pranešimų apie neįprastų patogeninių grybų sukeltus ligų protrūkius. Sunku įvardinti vieną pagrindinę priežastį, kodėl yra suaktyvėję grybinės ligos. Jos geba sukelti didelius nuostolius tiek privačioms, tiek valstybinėms įstaigoms auginančioms įvairias augalų kultūras ar rūšis. Todėl augalų patogenų aptikimas ir tikslus identifikavimas yra vienas iš svarbiausių strateginių žingsnių, kontroliuoti augalų ligas imantis prevencijos ar pradedant naudoti gydomasias priemones. Šiame tyrime grybinių ligų sukėlėjų *Dothistroma septosporum* ir *Lecanosticta acicola* nustatymui pušų spyglių mėginiuose surinktuose Lietuvoje panaudojame klasikinius bei molekulinis tyrimo metodus. Morfologiniu būdu (mikroskopuojant) pažeistuose spygliuose aptikome tiek *D. septosporum*, tiek *Lecanosticta acicola* konidijas. Polimerazės grandininės reakcijos (PGR) metodu su specifiniais pradmenimis identifikavome *D. septosporum*, tačiau nepavyko aptikti *L. acicola*. Atlikę tikro laiko polimerazės grandininės reakciją (TL-PGR) identifikavome abu *D. septosporum* ir *L. acicola* grybus. Tyrimo rezultatai parodė kad patogeninių grybų tiksliam ir greitam nustatymui tinkamiausias metodas yra tikro laiko PGR, kurio pagalba buvo galima identifikuoti tiek *D. septosporum*, tiek *L. acicola* net ir nepastebint pažeidimų spygliuose.

*Dothistroma septosporum, Lecanosticta acicola, Raudonžiedė spyglių degligė, Rudoji spyglių dėmėtligė, patogenas*

### Įvadas

Visuomenės dėmesys į patogeninius grybus išaugo tuomet, kai prasidėjo grybinių ligų protrūkiai. Tačiau grybinių ligų protrūkiai yra dažnesni nei manoma, taip pat pastaruoju metu vis daugėja pranešimų apie neįprastų patogeninių grybų sukeltus ligų protrūkius (Litvintseva ir kt., 2015). Sunku įvardinti vieną pagrindinę priežastį, kodėl yra suaktyvėję grybinės ligos. Tačiau ypatingai svarbu laiku pastebėti ligą ir imtis atitinkamų priemonių.

Miškas yra jautrus klimato kaitai, nes medžiai nespėja taip greit prisitaikyti prie besikeičiančios aplinkos (Lindner ir kt., 2010). Pasodintų miškų monokultūros yra jautresnės negu natūralių miškų kultūros. Visame pasaulyje apie 25 proc. pasodintų miškų susideda iš introdukuotų rūšių. Šiuo metu pasodinto miško plotas sparčiai auga, manoma, kad tokie miškai sudaro 7 proc. ploto visų pasaulio miškų. Europa ne išimtis, ji užima antrą vietą pagal turinčius didžiausią užsodintų miškų plotą (Lombardero ir kt., 2012).

Su klimato kaita yra susiję keletas veiksnių, turinčių poveikį miško ekosistemai, šie veiksniai gali veikti savarankiškai arba kompleksiskai (Lindner ir kt., 2010). Aukštesnės temperatūros, vandens trūkumas gali sumažinti augalų gyvybingumą ir atsparumą kenkėjams ir ligoms (Milad ir kt., 2011). Kaip vienos iš svarbiausių grėsmių miško želdiniams yra įvairūs kenkėjai ir patogenai (Lombardero ir kt., 2012).

Iki 2008 metų kai kur Lietuvoje vietiniuose pušnyuose buvo stebimos pušų spyglių defoliacijos bei ankstyvos mirtys, kurių priežastys buvo nesuprantamos. Po išsamių mikologinių tyrimų paaiškėjo, kad tai raudonžiedės degligės sukėlėjo *Dothistroma septosporum* pasekmės (Markovskaja ir Treigienė, 2009). Dabartiniu metu Lietuvoje prie dažniausiai pasitaikančių pušų spyglių ir pušų ūglių ligų želdiniuose galima priskirti pušų paprastąją spygliakritę, pušų raudonžiedę spyglių degligę, pušies spyglių rūdis, spyglių ūglių vėžį (Bagdžiūnaitė, 2013).

*Lecanosticta acicola* spyglinis rutulgrybis yra rudosis spyglių dėmėtligės sukėlėjas. Šis grybas sukelia rudas spyglių dėmes ant visų pušų rūšių spyglių, kuriuos užpuola. Rudoji spyglių dėmėtligė mažina bendrą pušaičių

metinį prieaugį. Ji ne tik slopina augimą, bet ir sukelia pušaičių mirtingumą. *L. acicola* yra įtraukta į Lietuvos karantininių organizmų sąrašą, bei, į A2 karantininių organizmų sąrašą Europos ir Viduržemio jūros augalų apsaugos organizacijos (EPPO, 2015).

Identifikuoti grybinės ligos sukėlėją tik pagal simptomus ant augalo arba grybo morfologiją pradinėse stadijose yra sudėtinga. Siekiant palengvinti ankstyvą diagnostiką ir pasirinkti tinkamas kontrolės priemones ligos plitimui stabdyti, vis dažniau grybų identifikavimui taikomi molekuliniai metodai. Molekulinis metodų privalumai prieš klasikinius metodus – greitis, specifiskumas, bei jautrumas (Zeng ir kt., 2005). Šiame straipsnyje aptarsime klasikinius ir molekulinis pušūnų spyglių grybinių ligų identifikavimo metodus ir *D. septosporum* ir *L. acicola* nustatymą pušų spyglių mėginiuose.

### Molekuliniai metodai naudojami grybinių ligų sukėlėjų aptikimui

Augalų patogenų aptikimas ir tikslus identifikavimas yra vienas iš svarbiausių strateginių žingsnių, kontroliuoti augalų ligas imantis prevencijos ar pradedant naudoti gydomasias priemones (Capote ir kt., 2012).

Polimerazinė grandininė reakcija (PGR) yra šiuolaikinis tyrimo metodas, puikiai tinkantis augalų patogenų aptikimui (Capote ir kt., 2012). Šis metodas leidžia gauti didelį kiekį specifinių DNR fragmentų iš nedidelio kiekio tiriamosios medžiagos. Metodas yra jautrus, greitas, specifiskas bei tikslus. Reakcijos sudaromos taip, kad būtų dauginamas tik tam tikras organizmo genomo DNR fragmentas. Šios PGR savybės leidžia nustatyti bakterijas, virusus, patogeninius mikroorganizmus, taip pat šis metodas tinkamas nustatant ir aprašant patogeninių organizmų genetinę įvairovę ir jų populiacinę struktūrą.

PGR metodas yra paremtas fermentiniu DNR fragmentų dauginimu panaudojant oligonukleotidinius pradmenis. Pradmenys polimerazės pagalba leidžia pagausinti norimas DNR sekas. Grybinių patogenų molekulinis nustatymas gali būti atliekamas skirtinguose

taksonominiuose lygmenyse (identifikuojant gentis, rūšis, kamienas) priklausomai nuo panaudojamų molekulinų žymenų specifikos (Capote ir kt., 2012).

Yra daugybė molekulinų metodų pagrįstų PGR *D. septospora* ir *L. acicola* grybų identifikavimui. Aptikti šiuos patogeninius grybus naudota:

- Dauginė PGR (angl. Multiplex PCR) (naudota *D. septosporum* identifikacijai) (Groenewald ir kt., 2007);
- RFIP (Restrikcinių fragmentų ilgio polimorfizmo, angl. Restriction fragment length polymorphism) metodas (naudota *D. septosporum*) (OEPP/EPPO, 2008; Pehl ir kt., 2004).
- Tikro laiko PGR metodas (angl. Real Time PCR) (naudota *D. septosporum* ir *L. acicola* identifikacijai) (Zhang ir kt., 2007; Ios ir kt., 2010; OEPP/EPPO, 2015).
- Lizdinė PGR (angl. Nested PCR) (*D. septosporum* identifikacijai) (Groenewald ir kt., 2007; Langrell, 2010).
- Paprastosios pasikartojančiosios (mikrosatelitinės) sekos (angl. SSR – Simple Sequence Repeats/Microsatellites) kitaip dar trumpi grupiniai pasikartojimai (angl. STR – Short Tandem Repeats) dar vadinamos mikrosatelitais (*D. septosporum* identifikacijai) (Drenkhan ir kt., 2013).

**Dauginė PGR** – tai reakcija, kurios metu padauginame keletą DNR sekų. Dauginės PGR metodas pagrįstas kelių ar keliolikos pradmenų porų naudojimu reakcijos mišinyje, tai leidžia vienu metu ir jautriai aptikti skirtingus DNR taikinius. Šios PGR privalumai, kad ji leidžia sutaupyti eksperimentinio darbo ir laiko sąnaudas, bei išlaidas. Būtent augalų patogenams šis metodas naudingas tuo, kad paprastai augalai būna užkrėsti daugiau nei vieno patogeno (Capote ir kt., 2012).

**Restrikcinių fragmentų ilgio polimorfizmo metodas** – tai žymenų sistema, leidžianti nustatyti nukleotidų sekų skirtumus esančius tarp DNR molekulių, pagal restriktažėmis sukarpytų ir specialių markerių pažymėtų DNR fragmentų dydį. Šio metodo veikimo principas DNR molekulės sukarpymas restriktažių pagalba, kartu veikiant elektros laukui, nevienodo dydžio DNR fragmentai juda nevienodai, sudarydami specifinius DNR fragmentų profilius. Šis metodas tinkamas identifikuoti mažas grupes gerai charakterizuotų grybų rūšių su maža genetinė variacija (Quaedvlieg ir kt., 2012).

**Lizdinė PGR**– šį metodas naudojamas, kai jautrumo ir/ar specifškumo aptikimo reakcijoje gerinimas yra būtinas. Metodas susideda iš dviejų nuoseklių etapų amplifikacijos. Pirmo etapo amplifikacijos metu, du išoriniai pradmenys pagausina didesnę DNR fragmentą, vėliau PGR reakcijos produktas naudojamas kaip taikiny antroje gausinimo reakcijoje panaudojant du vidinius pradmenis. Šis metodas taip pat plačiai naudojamas aptikti ir/arba apibūdinti daugelį grybų (Capote ir kt., 2012).

**Tikro laiko PGR metodas**– pagrįstas įprastiniais PGR principais. TL –PGR veikimo principas tai pastovus fluorescencijos signalo fiksavimas, kuris sklinda polimerazinės grandininės reakcijos visų ciklų metu. Nuo šio metodo atsiradimo, jo populiarumas tik auga. TL – PGR metodas pasižymi kaip labiausiai jautrus ir specifinis kiekybinis PGR metodas (Dorak, 2007). Šis metodas turi daugybę pliusų lyginant su standartiniu PGR, įskaitant, kad sistema nereikalauja, kad po PGR būtų atliktas papildomas

apdorojimas (elektroforezė, kolorimetrinė reakcija, hibridizacija), taip išvengiant rizikos perkeltant užteršti, sumažina medžiagų sąnaudas. Tikro laiko PGR yra laikomas „aukso standarto metodu“ aptinkant augalų patogenus (Capote ir kt., 2012). Metodas yra galingas įrankis, skirtas greitam ir jautriam aptikimui grybų (Kihara ir kt., 2015).

**Paprastosios pasikartojančiosios (mikrosatelitinės) sekos** yra motyvai nuo vieno iki šešių nukleotidų kartojamų keletą kartų, visuose eukariotų genomuose (paprastai nekoduojančių regionų). Šie nukleotidų vienetai gali skirtis tarp pasikartojančių skaičių individų ir pasiskirstymas genomo beveik atsitiktinis. Mikrosatelitai naudojami genetinei įvairovei augalų grybinių patogenų, genolinių žemėlapių konstravimui (Capote ir kt., 2012).

Savo atliktame tyrime mes naudojome klasikinę PGR ir TL-PGR rėmėms Ios ir kt. mokslininkais (2010).

### ***Dothistroma septosporum* ir *Lecanosticta acicola* nustatymas pušų spygliuose**

Skirtingų pušų rūšių (*Pinus sylvestris*, *P. sugo*, *P. nigra*) spyglių mėginiai buvo surinkti 2016 m. Surinkta medžiaga, laboratorijoje buvo peržiūrėta naudojant mikroskopą. Pagal morfologinius požymius tiesioginio mikroskopavimo metodu pažeistuose spygliuose buvo aptikti *D. septosporum*, *L. acicola* bei *Alternaria* sp., *Neocatenulostroma* sp., *Cladosporium* sp. patogeniniai grybai. Identifikuojant morfologiniu būdu *D. septosporum* ir *L. acicola* kyla sunkumų, nes jų sukeltos ligos turi panašius simptomus, o ankstyvoje infekcijos stadijoje šių patogenų veiklos požymių dar nėra arba jie nežymūs. Iš spyglių kuriuose buvo pastebėti raudonžiedės spyglių degligės ir rudosios spyglių dėmėtligės simptomai, buvo išaugintos *D. septosporum* ir *L. acicola* grybų kultūros.

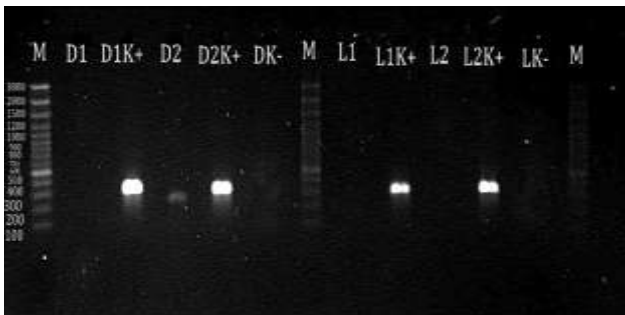
Pagrindinis sunkumas auginant patogeninių grybų *D. septosporum* ir *L. acicola* kultūras yra tas, kad jie lėtai auga ir būna nukonkuruojami kitais greitai augančiais grybais (saprotofais ir endofitais) (Ios ir kt., 2010). 2004 metais Barnes su kolegomis augino *D. septosporum* ir *L. acicola* kultūras ir pastebėjo, kad norint sumažinti augančių pašalinių grybų (saprofitų, endofitų), siekiant grynų kultūrų yra geriausia po mikroskopavimo grybų konidijas ištepti tiesiai ant terpės. Šis metodas sumažina užsikrėtimo tikimybę arba ją visiškai pašalina, tai palengvina grybo išskyrimą (Barnes ir kt., 2004). Mūsų tyrime patogeninių grybų konidijos taip pat buvo tiesiogiai tepamos ant terpės. Iš išaugintų grybų kultūros buvo išskirta DNR ir atlikta molekulinė analizė. *D. septosporum* ir *L. acicola* nustatymui panaudojame PGR-RFIP metodą, kurio pagalba buvo pagausinamas ITS (vidinės transkribuojamosios sekos; angl. *internal transcribed spacer*) regionas. Šį metodą pasirinkome todėl, kad juo pagalba galima atskirti vieną nuo kito *D. septosporum* ir *L. acicola* patogeninius grybus ir dar bent 10 dažniausiai Europoje pasitaikančių patogeninių grybų ant pušų spyglių (Ios ir kt., 2010). Patogeninių grybų ITS regionas buvo gausinamas PGR metu naudojant universalius pradmenis ITS4 ir ITS5 (esant *D. septosporum* infekcijai gausinamas 580 bp fragmentas, o *L. acicola* 600 bp) bei restriktažę HhaI kuriai veikiant esant *D. septosporum* susidaro vienas 180 bp fragmentas, o *L. acicola* susidaro du fragmentai

350 bp ir 150 bp. Siekiant optimizuoti PGR sąlygas, reakcija buvo vykdyta naudojant skirtingus PGR mišinio komponentus, komercinius rinkinius ir PGR reakcijos režimą.

Atlikus ITS regiono PGR-RFIP analizę ir sekoskaitą buvo identifikuoti *Alternaria* sp., *Neocatenulostroma* sp., *Cladosporium* sp. patogeniniai grybai bei 12 įvairių saprotrofinių ir endofitinių grybų rūšių. Tačiau *D. septosporum* ir *L. acicola* grybų iš išaugintos kultūros identifikuoti nepavyko dėl *D. septosporum* ir *L. acicola* lėtesnio augimo ir kitų grybų konkurencijos (surinkti spygliai buvo tik su pirminiais ligos simptomais). Kadangi kultūrų auginimas atima gan daug laiko, ir šis metodas netinka patogeninio grybo infekuoto augalo ankstyvos ligos detekcijai, tam kad nustatyti patogeninių grybų sukėlėjus būtų galima kuo greičiau, nelaukiant grybo pilnos brandos, šiame tyrime buvo pritaikytas tiesioginis patogenų nustatymas spygliuose. Patogeninių grybų DNR išskyrimas buvo atliekamas iš pušų spyglių. Šis metodas mikroskopinių grybų nustatymui iki šiol Lietuvoje naudojimas nebuvo.

Patogeninių grybų identifikavimui buvo naudojami  $\beta$ -*tub2* geno (*D. septosporum*) ir *EF1-a* geno (*L. acicola*) specifiniai pradmenys. Atlikus PGR su specifiniais pradmenimis buvo identifikuoti tik *D. septosporum* patogenais užkrėsti mėginiai.

Gautų rezultatų pavyzdys pateiktas 1 paveiksle.

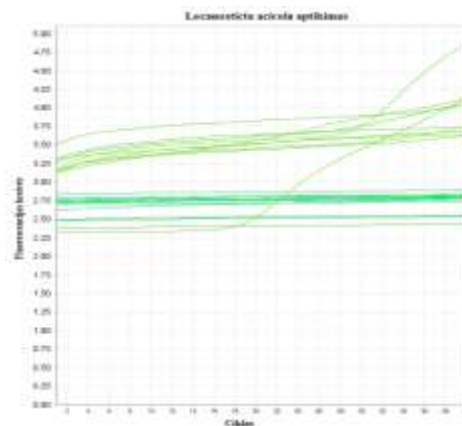


**1 pav.** 2016 metais atlikto tyrimo metu aptikome *Dothistroma septosporum* (M- markeris 100 bp Plus; D1K<sup>+</sup>, D2K<sup>+</sup>, L1K<sup>+</sup>, L2K<sup>+</sup> – teigiamos kontrolės, DK<sup>-</sup>, LK<sup>-</sup> – neigiamos kontrolės, D1, D2 – mėginiai tikrinami dėl *Dothistroma septosporum*, L1, L2 – mėginiai tikrinami dėl *Lecanosticta acicola*).  
**Fig. 1.** In 2016 we detected *Dothistroma septosporum* (M- marker 100 bp Plus; D1K<sup>+</sup>, D2K<sup>+</sup>, L1K<sup>+</sup>, L2K<sup>+</sup>, - positive control, DK<sup>-</sup>, LK<sup>-</sup> - negative control, D1, D2 - the samples are checked for *Dothistroma septosporum*, L1, L2 - samples tested for *Lecanosticta acicola*).

Manome, kad *L. acicola* nepavyko aptikti dėl mažos patogeninio grybo DNR kiekio tirtuose mėginiuose.

Siekiant padidinti metodo jautrumą šių grybų nustatymui buvo panaudotas TL-PGR metodas. TL-PGR reakcijai naudoti specifiniai pradmenys gausinant *D. septosporum*  $\beta$ -*tubulin* geno fragment ir *L. acicola* *EF1-a* geno fragmentą. Atlikus TL-PGR buvo identifikuoti *D. septosporum* ir *L. acicola* patogenai.

1 paveiksle matome TL-PGR rezultatus - nustatyti du teigiami mėginiai, kuriuose aptiktas užsikrėtimas *Lecanosticta acicola*.



**2 pav.** *L. acicola* nustatymas TL-PGR metodu. Vieno mėginio fluorescencijos signalo linija, rodančia specifinio DNR fragmento amplifikaciją, pradeda kilti ties 18 ciklu, t.y. patogeno koncentracija ganėtinai didelė. Kito mėginio fluorescencijos linija pradeda kilti ties 28 ciklu, kas taip pat parodo patogeno buvimą mėginyje.

**Fig. 2.** *L. acicola* detection with RT-PCR. One sample fluorescence signal line indicating a specific DNA fragment amplification, begins to rise at 18 cycle, i.e., pathogen concentration is quite high. Another sample fluorescence line rise at 28 cycle, which also shows the presence of the pathogen in the sample.

Mūsų tyrimo rezultatai parodė kad patogeninių grybų tiksliam ir greitam nustatymui tinkamiausias metodas yra TL-PGR, kurio pagalba buvo galima identifikuoti tiek *D. septosporum*, tiek *L. acicola* net ir nepastebint pažeidimų spygliuose. TL-PGR metodas *D. septosporum* ir *L. acicola* patogeninių grybų nustatymui Lietuvoje buvo panaudotas pirma kartą.

Atliekant tyrimą ir renkantis tyrimo metodą svarbu įsisavinti kelis dalykus. Pirmas, norint nebrangaus aptikimo metodo, kuris neturi būti labai tikslus tam puikiai tinka tiesioginio mikroskopavimo metodas. Tačiau svarbu suprasti, kad su šiuo metodu pradinėse stadijose ligos nesurasime. Taip pat tiesioginiam mikroskopavimui atlikti reikalinga didelė patirtis, nes kartais susiduriant su panašių grybų identifikavimu, gali būti ganėtinai sudėtinga atskirti grybą vieną nuo kito. Galima tiesioginį mikroskopavimą kombinuoti su kultūrų auginimu, tačiau kultūrų auginimas mažiausiai užtrunka dvi savaites, po to tenka laukti sekvenavimo rezultatų, visa tai atima gan daug laiko (Bradshaw ir kt., 2006). Be to kultūrų auginimas taip pat netinka patogeninio grybo infekuoto augalo ankstyvos ligos detekcijai, kol augalo audiniai besimptomiai (Zeng ir kt., 2005). Norint greito ir tikslaus identifikavimo, tačiau kiek brangesnio galima rinktis klasikinę PGR, jei norima labai jautraus metodo puikiai tiks TL-PGR.

Mūsų atliktame tyrime taikant skirtingus molekulinis metodus patogeninių grybų identifikavimui patikimi rezultatai buvo gauti naudojant specifinius pradmenis ir labai jautrią polimerazę. Klasikinė PGR pavyko identifikuoti *D. septosporum*, atlikę TL-PGR aptikome abu *D. septosporum* ir *L. acicola* patogenus.

#### Literatūra

- BAGDŽIŪNAITĖ A. Phytopathological monitoring and protection against fungal diseases in young pine pinus sylvestris L. Stands in Lithuania. *Journal of International Scientific Publications: Agriculture & Food*, 2013, p. 49- 56.
- BARNES, I., CROUS, P. W., WINGFIELD, B. D., WINGFIELD, M. J. Multigene phylogenies reveal that red band needle blight of

- Pinus is caused by two distinct species of Dothistroma, *D. septosporum* and *D. pini*. *Studies in mycology*. 50. 2004, p. 551–565
3. CAPOTE, N., PASTRANA, A. M., AGUADO, A., SÁNCHEZ-TORRES, P. Molecular Tools for Detection of Plant Pathogenic Fungi and Fungicide Resistance. *Plant Pathology. Intech*. 2012. 362 p.
  4. DORAK, M.T. Real-Time PCR. *Taylor&Francis* 2007. 333 p.
  5. DRENKHAN, R., HANTULA, J., VUORINEN, M., JANKOVSKÝ, L., MÜLLER, M. M. Genetic diversity of *Dothistroma septosporum* in Estonia, Finland and Czech Republic. *European Journal of Plant Pathology*. 136 (10). 2013, p. 71–85. 13.
  6. EPPO Bulletin. PM 7/46 (3) *Lecanosticta acicola* (formerly *Mycosphaerella dearnessii*), *Dothistroma septosporum* (formerly *Mycosphaerella pini*) and *Dothistroma pini*. 45(2). 2015. p. 163–182.
  7. GROENEWALD, M., BARNES I, BRADSHAW, R. E., BROWN, A. V., DALE, A., GROENEWALD J. Z., LEWIS, K. J., WINGFIELD, B. D., WINGFIELD, M. J., CROUS, P. W. Characterization and distribution of mating type genes in the dothistroma needle blight pathogens. *Phytopathology*. 97(7). 2007, p. 825–834.
  8. IOOS, R., FABRE, B., SAURAT, C., FOURRIER, C., FREY, P., MARÇAIS, B. Development, comparison, and validation of real-time and conventional PCR tools for the detection of the fungal pathogens causing brown spot and red band needle blights of pine. *Phytopathology*. 100 (1). 2010, p. 105–114.
  9. KIHARA, J., UENO, M., ARASE, S. PCR-Mediated Detection of Endophytic and Phytopathogenic Fungi from Needles of the Japanese Black Pine, *Pinus thunbergii*. *Open Journal of Forestry*. 5. 2015, p. 431–442.
  10. LANGRELL, S. R. H. Nested polymerase chain reaction-based detection of *Dothistroma septosporum*, red band needle blight of pine, a tool in support of phytosanitary regimes. *Molecular Ecology Resources*. 11(4). 2010, p. 749–752.
  11. LINDNER, M., MAROSCHEK, M., NETHERER, S., KREMER, A., BARBATI, A., GARCIA-GONZALO, J., SEIDL, R., DELZON, S., CORONA, P., KOLSTROOMA, M., LEXER, M. J., MARCHETTI, M.. Climate change impacts, adaptive capacity, and vulnerability of European forest ecosystems. *Forest Ecology and Management*. N259. 2010, p. 698–709.
  12. LITVINTSEVA, A. P., BRANDT, M. E., MODY, R. K., LOCKHART, S. R. Investigating Fungal Outbreaks in the 21st Century. *PLOS Pathogens*, 2015, Vol 11 Iss 5, p. 1–6.
  13. LOMBARDEO, M. J., ALONSO-RODRÍGUEZ, M., ROCA-POSADA, E. P. Tree insects and pathogens display opposite tendencies to attack native vs. non-native pines. *Forest Ecology and Management*. N281. 2012, p. 121–129.
  14. MARKOVSKAJA, S., TREIGIENĖ, A. New data on invasive pathogenic fungus *Dothistroma septosporum* in Lithuania. *Botanica Lithuanica*, 15(1). 2009, p. 41–45.
  15. MILAD, M., SCHAICH, H., BÜRGI M., KONOLD, W. Climate change and nature conservation in Central European forests: A review of consequences, concepts and challenges. *Forest Ecology and Management*. N261, 2011, p. 829–843.
  16. OEPP/EPPO, 2008
  17. PEHL, L., BURGERMEISTER, W., WULF, A. *Mycosphaerella-Nadelpilze der Kiefer: Identifikation durch ITS-RFLP-Muster (Mycosphaerella needle fungi: Identification by means of ITS-RFLP patterns)*. *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes* 56(10). 2004, p. 239–244.
  18. OEPP/EPPO, 2015
  19. QUAEDVLIEG, W., GROENEWALD, J. Z., DE JESÚS YÁÑEZ-MORALES, M., CROUS, P.W. DNA barcoding of *Mycosphaerella* species of quarantine importance to Europe. *Persoonia*. 29. 2012, p. 101–115.
  20. ZHANG, S., SCHWELM, A., JIN, H., COLLINS, L. J., BRADSHAW, R. E. A fragmented aflatoxin-like gene cluster in the forest pathogen *Dothistroma septosporum*. *Fungal Genetics and Biology*. 44. 2007, p. 1342–1354.
  21. ZENG, Q.Y., HANSSON, P., WANG, X.R. Specific and sensitive detection of the conifer pathogen *Gremmeniella abietina* by nested PCR. *BMC Microbiology*, 565 (10). 2005, p. 1186–1471.

Kristina Raitelaitytė, Arvydas Rutkauskas, Jana Radzijeuskaja, Svetlana Markovskaja, Judita Žukauskienė, Algimantas Paulauskas

### Pinophyta needles fungal disease identification

#### Summary

Fungal outbreaks are more common and reports of outbreaks caused by unusual fungal pathogens are increasing. It's hard to describe one reason, why fungal outbreaks are more common. They are causing significant losses, both private and public institutions, who are raising plant crops or other plant species. Therefore, the plant pathogen detection and accurate identification is one of the most important strategic steps to control plant diseases by taking preventive or curative measures into use. 2016 in Lithuania, needles were collected from three species of pine. We analyzed needle samples collected from the three species of pine in Lithuania for presence of *Lecanosticta acicola* and *Dothistroma septosporum* pathogenic fungus. Morphological identification (microscopic examination) allowed to detect both *D. septosporum* and *L. acicola* conidia. Using polymerase chain reaction (PCR) method with specific primers only *D. septosporum* was identified. Applying real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) were identified both *D. septosporum* and *L. acicola* pathogenic fungus.

*Dothistroma septosporum*, *Lecanosticta acicola*, Red band needle blight, Brown spot needle blight, Pathogen

Gauta 2017 m. kovo mėn., atiduota spaudai 2017 m. balandžio mėn.

**Kristina RAITELAITYTĖ.** Vytauto Didžiojo universiteto Gamtos mokslų fakulteto kartu su Gamtos tyrimų centru botanikos institutu biologijos doktorantūros studentė. Adresas: Vileikos g. 8, LT-44404 Kaunas. Tel. (+370)62496129, el. paštas: [kristina.raitelaityte@gmail.com](mailto:kristina.raitelaityte@gmail.com).

**Kristina RAITELAITYTĖ.** Vytautas Magnus University Faculty of Natural Sciences with Nature Research Center Institute of Botany, biology PhD student. Address: Vileikos st 8, LT-44404 Kaunas. Tel. (+370)62496129, e-mail: [kristina.raitelaityte@gmail.com](mailto:kristina.raitelaityte@gmail.com).

**Arvydas RUTKAUSKAS.** Vytauto Didžiojo universiteto Gamtos mokslų fakulteto biologijos doktorantūros studentas. Adresas: Vileikos g. 8, LT-44404 Kaunas. Tel. (+370)69815477, el. paštas: [arvydasru@gmail.com](mailto:arvydasru@gmail.com).

**Arvydas RUTKAUSKAS.** Vytautas Magnus University Faculty of Natural Sciences biology PhD student. Address: Vileikos st 8, LT-44404 Kaunas. Tel. (+370)69815477, e-mail: [arvydasru@gmail.com](mailto:arvydasru@gmail.com).

**Jana RADZIJEVSKAJA.** Vytauto Didžiojo universiteto Gamtos mokslų fakultetas, biochemijos mokslų daktaras, docentas. Adresas: Vileikos g. 8, LT-44404 Kaunas. Tel. (8 37) 327 905, el. paštas: [jana.radzijeuskaja@vdu.lt](mailto:jana.radzijeuskaja@vdu.lt)

**Jana RADZIJEVSKAJA.** Vytautas Magnus University Faculty of Natural Sciences, doctor of biochemistry sciences, assoc. Address: Vileikos st 8, LT-44404 Kaunas. Tel. (+370 37) 327 905, e-mail: [jana.radzijeuskaja@vdu.lt](mailto:jana.radzijeuskaja@vdu.lt)

**Svetlana MARKOVSKAJA.** Gamtos tyrimų centras botanikos institutas, biologijos mokslų daktaras. Adresas: Žalųjų Ežerų g. 49, LT-08406 Vilnius. Tel. (85) 269 72 51, el. paštas: [svetlana.markovskaja@botanika.lt](mailto:svetlana.markovskaja@botanika.lt)

**Svetlana MARKOVSKAJA.** Nature Research Center Institute of Botany, doctor of biology. Address: Žalųjų Ežerų st 49, LT-08406 Vilnius. Tel. (+370 5) 269 72 51, e-mail: [svetlana.markovskaja@botanika.lt](mailto:svetlana.markovskaja@botanika.lt)

**Judita ŽUKAUSKIENĖ.** Vytauto Didžiojo universiteto Gamtos mokslų fakultetas, biochemijos mokslų daktaras, docentas. Adresas: Vileikos g. 8, LT-44404 Kaunas. Tel. (8 37) 327 905, el. paštas: [judita.zukauskiene@vdu.lt](mailto:judita.zukauskiene@vdu.lt)

**Judita ŽUKAUSKIENĖ.** Vytautas Magnus University Faculty of Natural Sciences, doctor of biochemistry sciences, assoc. Address: Vileikos st 8, LT-44404 Kaunas. Tel. (+370 37) 327 905, e-mail: [judita.zukauskiene@vdu.lt](mailto:judita.zukauskiene@vdu.lt)

**Algimantas PAULAUSKAS.** Vytauto Didžiojo universiteto Gamtos mokslų fakultetas, biomedicinos mokslų daktaras, prof. habil. Adresas: Vileikos g. 8, LT-44404 Kaunas. Tel. (8 37) 327 905, el. paštas: [algimantas.paulauskas@vdu.lt](mailto:algimantas.paulauskas@vdu.lt)

**Algimantas PAULAUSKAS.** Vytautas Magnus University Faculty of Natural Sciences, doctor of Biomedical science, prof. habil. Address: Vileikos st 8, LT-44404 Kaunas. Tel. (+370 37) 327 905, e-mail: [algimantas.paulauskas@vdu.lt](mailto:algimantas.paulauskas@vdu.lt)