

VILNIAUS UNIVERSITETAS
GAMTOS TYRIMŲ CENTRAS

GODA NORKUTĖ

**TRIS SVARBIAS MIŠKO MEDŽIŲ LIGAS - ALKSNIŲ DŽIŪTĮ,
GUOBŲ MARĄ IR UOSIŲ DŽIŪTĮ SUKELIANČIŲ INVAZINIŲ
PATOGENŲ POPULIACIJŲ TYRIMAI**

Daktaro disertacijos santrauka
Biomedicinos mokslai, Ekologija ir aplinkotyra (03 B)

Vilnius, 2018 metai

Disertacija rengta 2014-2017 metais Gamtos tyrimų centre.

Mokslinis vadovas:

Dr. Vaidotas Lygis (Gamtos tyrimų centro Botanikos institutas, Biomedicinos mokslai, Botanika – 04B).

Disertacija ginama viešame disertacijos gynimo tarybos posėdyje

Pirmininkas:

Prof. Habil. dr. Zenonas Dabkevičius (Lietuvos agrarinių ir miškų mokslų centras, biomedicinos mokslai, ekologija ir aplinkotyra – 03B)

Nariai:

dr. Virgilijus Baliuckas (Lietuvos agrarinių ir miškų mokslo centras, biomedicinos mokslai, ekologija ir aplinkotyra – 03B)

dr. (HP) Dalius Butkauskas (Gamtos tyrimų centras, biomedicinos mokslai, ekologija ir aplinkotyra – 03B)

dr. Rein Drenkhan (Estijos gyvybės mokslų universitetas, žemės ūkio mokslai, miškotyra – 04A)

dr. Sigita Jurkonienė (Gamtos tyrimų centras, biomedicinos mokslai, ekologija ir aplinkotyra – 03B)

Disertacija bus ginama viešame disertacijos Gynimo tarybos posėdyje 2018 m. spalio mėn. 4 d. 14 val. Gamtos tyrimų centro Botanikos instituto Baltojoje salėje.

Adresas: Žaliųjų Ežerų g. 49, LT-08406 Vilnius, Lietuva

Disertacijos santrauka išplatinta 2018 m. rugsėjo mėn. 3 d.

Disertaciją galima peržiūrėti Gamtos tyrimų centro ir Vilniaus universiteto bibliotekose bei VU interneto adresu: www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius

ĮVADAS

Invazinių mikroorganizmų sukeltų ligų daroma žala tampa vis didesne problema pasaulyje (Santini *et al.*, 2013). Žmogaus veiklos pakeista aplinka yra vienas iš pagrindinių faktorių šioms ligoms plisti (Daszak *et al.*, 2000), kadangi natūralūs gamtiniai barjerai, apsaugantys ekosistemas nuo pavojingų mikroorganizmų (Holt *et al.*, 2013), dėl žmogaus veiklos šie barjerai pradeda prarasti savo apsaugines funkcijas, ir invaziniai organizmai (įskaitant augalų patogenus) gali nesunkiai įsiskverbti į naujas teritorijas ir jose įsitvirtinti (Fisher *et al.*, 2013). Vien Lietuvoje per pastarąjį šimtmetį aptikta daugiau kaip 100 naujų invazinių grybų rūšių (Motiejūnaitė *et al.*, 2017), o per pastaruosius tris dešimtmečius invazinių mikroorganizmų skaičius Europoje padvigubėjo (Santini *et al.*, 2013). Per pastarąjį šimtmetį bene daugiausiai žalos Europos miškams (konkrečiai, - kilmingųjų lapuočių - guobų ir uosių medynams) padarę invaziniai medžių patogenai: guobų maro sukėlėjas *Ophiostoma novo-ulmi* Brasier (Brasier, 1996) bei uosių džiūties sukėlėjas *Hymenoscyphus fraxineus* (T. Kowalski) Baral, Queloz & Hosoya (Kowalski, 2006).

Intensyvaus tranzito šalyse svetimžemių augalų patogenų invazijų tikimybė gerokai išauga (Santini *et al.*, 2013). Pavyzdžiui, Lietuva ir Šveicarija yra viena nuo kitos pakankamai geografiškai atskirtos panašaus dydžio šalys, kurias kerta svarbūs Europos Sąjungos transporto koridoriai (European Commission, 2014), todėl palyginamieji invazinių mikroorganizmų tyrimai tokiose šalyse yra ypač aktualūs ir įdomūs. Norint sėkmingai kovoti su naujai pasireiškiančiomis pavojingų invazinių mikroorganizmų sukeltomis ligomis, būtina ne tik surinkti kuo išsamesnius duomenis apie tokių ligų pasireiškimo mastą, jų sukėlėjų invazyvumą, plitimą, biologines bei ekologines savybes, populiacijų genetinę bei genotipinę įvairovę, tačiau šiuos duomenis taip pat svarbu palyginti su kitose šalyse surinkta informacija. Palyginamieji tyrimai ypač svarbūs atskleidžiant invazinių ligų sukėlėjų epidemiologiją, nustatant jų kilmę, patekimo į naujas teritorijas kelius bei tolimesnio plitimo perspektyvas.

Bene geriausiai žinomi invaziniai fitopatogenai, sukėlę masinę atitinkamų rūšių medžių džiūtį Europoje yra guobų maro sukėlėjas *Ophiostoma ulmi* (Buisman) Nannf. *sensu lato*, uosių džiūties sukėlėjas *H. fraxineus* ir alksnių džiūties sukėlėjas *Phytophthora alni* Brasier & S.A. Kirk *sensu lato*. Visos trys ligos yra plačiai paplitusios

visoje Europoje, iš kurių guobų maras yra seniausia ir bene geriausiai iširta; uosių džiūtis epidemija prasidėjo daugiau nei prieš 20 metų, ir laikoma daugiausiai paprastajam uosiui žalos padariusia liga; tuo tarpu alksnių džiūtis Europoje žinoma nuo 1990-ųjų ir yra mažiausiai iširta iš šių trijų ligų.

Pagrindinis šio darbo tikslas buvo apibūdinti trijų invazinių patogenų populiacijas: *Phytophthora alni* s. l. – septyniose Europos šalyse (daugiausiai dėmesio skiriant Lietuvai ir Šveicarijai), *Ophiostoma novo-ulmi* - tik Lietuvoje, ir *Hymenoscyphus fraxineus* - Lietuvoje ir Šveicarijoje.

Pagrindiniai uždaviniai:

1. Iširti ir apibūdinti oomicetų bei tikrųjų grybų bendrijas džiūtis pažeistų alksnių (juodalksnio ir baltalksnio) medienoje ir šių medžių aplinkoje (rizosferoje ir vandens telkiniuose) Lietuvoje ir Šveicarijoje;
2. Iširti invazinių patogenų *Phytophthora x alni* ir *Phytophthora uniformis*, *Ophiostoma novo-ulmi* ir *Hymenoscyphus fraxineus* populiacijų genetines savybes;
3. Palyginti dviejų skirtingų paprastojo uosio dirbtinio apkrėtimo eksperimentų (virulentiškumo testų) rezultatus, juose panaudojant anksčiau genotipuotus lietuviškos ir šveicariškos kilmės *H. fraxineus* izoliatų;
4. Iširti *H. fraxineus* micelio (kultūrų) augimo greičio santykį su tų pačių izoliatų virulentiškumu.

Mokslinis naujumas. Pirmą kartą Lietuvoje alksnių džiūtis sukėlėjas buvo išskirtas 1999-aisiais metais (Jovaišienė, 2002), Šveicarijoje – 2005-aisiais (Dr. Simone Prospero, asmeninis kontaktas), tačiau iki šių dienų nebuvo atlikta tyrimų, atskleidžiančių *Phytophthora alni* s. l. komplekso rūšių paplitimą ar jų populiacijų genetinės struktūros ypatybes abejose šalyse. Tokių žinių trūksta ne tik Lietuvoje ir Šveicarijoje, bet ir daugelyje kitų Europos šalių.

Šiame darbe pirmą kartą buvo iširti džiūstančių alksnių aplinkoje aptinkamų mikroorganizmų bendrijų skirtumai Lietuvoje ir Šveicarijoje. Penkios *Phytophthora* genties oomicetų rūšys: *Phytophthora gallica* T. Jung Nechwatal, *Phytophthora gonapodyides* (H.E Petersen) Buisman, *Phytophthora gregata* T. Jung, M.J.C. Stukely &

T. Burgess, *Phytophthora lacustris* Brasier, Cacciola, Nechw., Jung & Bakonyi, *Phytophthora* taxon *Oaksoil* buvo pirmą kartą identifikuotos Lietuvoje.

Phytophthora. x alni (Brasier & S.A. Kirk) Husson, Ioos & Marçais ir *Phytophthora uniformis* (Brasier & S.A. Kirk) Husson, Ioos & Aguayo populiacijų tyrimai buvo atlikti panaudojant medžiagą, surinktą net septyniose Europos šalyse. Tai vieni detaliausių tokio pobūdžio šių rūšių tyrimų ne tik Europoje, bet ir pasaulyje. Net keturiose šalyse: Lietuvoje, Šveicarijoje, Austrijoje ir Čekijoje, tokie tyrimai atlikti pirmą kartą. Mikrosatelitinė analizė leido identifikuoti 36 *P. x alni* genotipus, iš kurių net 24 yra nauji mokslui (iki šiol nebuvo aprašyti).

Lietuvoje detalūs guobų maro sukėlėjo *O. ulmi* s. l. (tuo metu rūšis tiksliai nebuvo identifikuota) tyrimai buvo atlikti tik praėjusio amžiaus viduryje (Žuklys, 1952), po kurių ilgus metus naujų duomenų nesukaupta. Disertacinio darbo metu surinkti duomenys leidžia teigti, kad pagrindinis guobų maro sukėlėjas (šiuo metu) yra *O. novo-ulmi*, o pirmosios guobų maro bangos sukėlėjas *O. ulmi sensu stricto* yra galimai išstumtas iš Lietuvos. Taip pat šiame darbe pirmą kartą Lietuvoje buvo identifikuoti vidurūšiniai *O. novo-ulmi* hibridai. Vegetatyvinio suderinamumo testai parodė, kad *O. novo-ulmi* Lietuvos populiacija pasižymi didele genotipine įvairove.

Pirmą kartą Lietuvoje, o ir visoje Šiaurės-Rytų Europoje atlikti tokio didelio masto *H. fraxineus* populiacijų genetinių savybių tyrimai (iš viso tirti 367 Lietuvoje išskirti *H. fraxineus* izoliatai). Pirmą kartą atlikti dirbtinių uosio medelių apkrėtimo *H. fraxineus* kultūromis eksperimentų pakartojamumo palyginamieji tyrimai (lygintas didžiausiu ir mažiausiu virulentiškumu pasižymėjusių grybo izoliatų virulentiškumas dviejuose skirtingu laiku atliktuose eksperimentuose), taip pat šiame darbe pirmą buvo siekiama palyginti *H. fraxineus* izoliatų micelio (kultūrų) augimo greitį su tų pačių izoliatų virulentiškumu lauko eksperimentuose (gebėjimu sukelti nekrozes gyviems uosiukams). Tokio pobūdžio tyrimai pasaulyje atlikti pirmą kartą.

Ginamieji teiginiai:

- Lietuvoje ir Šveicarijoje *Phytophthora alni* s. l. komplekso rūšys (*P. x alni* ir *P. uniformis*) yra dažnai sutinkamos džiūties pažeistų alksnių (*Alnus* spp.) medienoje, o *P. x multiformis* aptinkama retai;

- *P. x alni* ir *P. uniformis* populiacijos Europoje pasižymi žema genotipine įvairove;
- *Ophiostoma ulmi* s. s. Lietuvoje yra išstumta agresyvesnės invazinės rūšies - *Ophiostoma novo-ulmi*, kurios populiacijos pasižymi didele genotipine įvairove;
- Lietuvoje sutinkami du *Ophiostoma novo-ulmi* porūšiai: *O. novo-ulmi* ssp. *novo-ulmi*, *O. novo-ulmi* spp. *americana* bei šių porūšių hibridai,
- Lietuvoje *H. fraxineus* populiacijos pasižymi didele genotipine bei genetinė įvairove ir turi aiškų erdvinį (geografinį) pasiskirstymą;
- Atitinkamų *H. fraxineus* izoliatų virulentiškumas gerai koreliuoja pakartotinai atliekamuose dirbtinio apkrėtimo eksperimentuose;
- *H. fraxineus* izoliatų micelio (kultūrų) augimo greitis terpėje koreliuoja su tų pačių izoliatų virulentiškumu.

Disertacijos duomenų aprobavimas. Disertacijos rezultatai publikuoti trijuose straipsniuose žurnaluose, įrašytuose į *Clarivate Analytics Web of Science* duomenų bazę. Disertacijos metu gauti rezultatai taip pat buvo pristatyti šešiose tarptautinėse ir dvejose nacionalinėse (Lietuvos) konferencijose.

Darbo apimtis ir struktūra. Disertacijos apimtis yra 149 puslapiai (išskyrus priedus). Disertaciją sudaro Santrumpos, Įvadas, Literatūros apžvalga, Tyrimų medžiaga ir metodai, Tyrimų rezultatai, Diskusija, Išvados, Literatūros sąrašas (286 literatūros šaltiniai), Autorės publikacijos disertacijos tema, Priedai. Disertacija iliustruota 31-u paveikslu ir 14-a lentelių.

MEDŽIAGOS IR METODAI

Oomicetų ir tikrųjų grybų išskyrimas iš pažeistų alksnių (*Alnus* spp.) aplinkos

Alnus Mill. genties medžiai – juodalksniai (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn) ir baltalksniai (*Alnus incana* (L.) Moench), buvo tirti 27-ose vietovėse Lietuvoje ir 14-oje vietovių Šveicarijoje. Iš viso buvo paimta 201 medienos mėginys, 17 vandens mėginių iš įvairių vandens telkinių ir 110 dirvožemio mėginių. Medienos mėginiai buvo renkami remiantis Jung (2009) aprašyta metodika, bei pagal Dr. Simone Prospero (WSL, Birmensdorfas, Šveicarija; asmeninis kontaktas) pasiūlytą metodiką. Vandens mėginiai buvo renkami pagal JKI instituto (Braunšveigas, Vokietija) laboratorijoje naudojamą protokolą (dr. Sabine Werres; asmeninis kontaktas). Dirvožemio mėginiai buvo surinkti remiantis Tedersoo *et al.* (2014) metodika.

Oomicetų išskyrimas iš dirvožemio ir vandens mėginių buvo atliktas panaudojant rododendrų lapus (angl. *baiting tests*): oomicetų išskyrimui buvo naudojami sveiki *Rhododendron catawbiense* Michx. ar *R. catawbiense* formos „Cunningham’s White“ lapai. Dirvožemio ir vandens mėginiai buvo paruošti pagal JKI institute (Braunšveigas, Vokietija) naudojamą protokolą (dr. S. Werres, asmeniniai kontaktai). Išryškėjus nekrozėms, oomicetai iš rododendrų lapų buvo išskiriami pagal Themann ir Werres (2000) aprašytą metodiką. Oomicetų ir grybų išskyrimas iš alksnių medienos buvo atliktas pagal Jung (2009) metodiką. Grynosios oomicetų kultūros buvo išskiriamos ir auginamos ant PARPNH-V8 ir CA terpį 22° C temperatūroje, tamsoje.

Lietuvoje oomicetai iš dirvožemio buvo išskiriami paruošiant dirvožemio suspensiją, kuri vėliau buvo išglaištoma ant PARPNH-V8 terpės, 22° C temperatūroje, tamsoje. Vėliau grynosios kultūros buvo perkeliamos ant CA terpės ir auginamos 22° C temperatūroje, tamsoje.

***Phytophthora alni* s. l. komplekso rūšių genetiniai tyrimai**

P. x alni ir *P. uniformis* genetiniai tyrimai buvo atlikti su izoliatais surinktais 7-iose Europos šalyse: Lietuvoje, Šveicarijoje, Austrijoje, Čekijoje, Ispanijoje, Švedijoje ir Vengrijoje. *P. x alni* izoliatai į populiacijas buvo suskirstyti pagal šalis/vandenskyra/upė. Lietuvoje, Šveicarijoje, Austrijoje ir Ispanijoje toks (populiacijų) suskirstymas, dėl mažo

izoliatų skaičiaus, buvo negalimas, todėl izoliatai buvo priskirti atitinkamos šalies populiacijai. *P. uniformis* izoliatai į populiacijas buvo suskirstyti tik pagal šalis.

DNR išskyrimas Grynujų kultūrų DNR buvo išskirta iš *P. alni* s. l. izoliatų, kurie buvo auginami skystoje V8 sulčių terpėje. DNR buvo skiriama naudojant DNR skyrimo rinkinius DNeasy[®] Plant Mini kit ir DNeasy[®] 96Plant kit (Qiagen, Hildenas, Vokietija); dalis DNR mėginių buvo išskirta naudojant CTAB protokolą (Kårén *et al.*, 1997).

Polimerazės grandininė reakcija. Polimerazės grandininė reakcija (PGR) buvo atlikta naudojant JumpStart[™] RedTaq[®] Ready Mix polimerazę bei PGR buferį (Sigma-Aldrich, Vokietija), bei naudojant ITS6 (Cooke *et al.*, 2000) bei ITS4 (White *et al.*, 1990) pradmenis. DNR buvo išvalyta su Illustra[™] ExoProStar[™] PCR and Sequence Reaction Clean-Up Kit rinkiniu (Sigma-Aldrich, Vokietija) vadovaujantis gamintojo instrukcijomis. Sekoskaitai buvo naudojamas BigDye[™] Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing Kit and BigDye[™] x-Terminator Purification Kit rinkinys (Applied Biosystems, Karlsbadas, JAV). Reakcijos atliktos vadovaujantis gamintojo instrukcijomis. Sekoskaita buvo atliekama naudojant genetinį analizatorių 3130xl DNA Analyzer (Applied Biosystems, JAV). Gautos sekos buvo tvarkomos naudojant bioinformacines programas: CLC Main Workbench (version 8.0 Beta 4) (QIAGEN Bioinformatics, Danija) ir Geneious (version R9.1.5) (Biomatters Ltd, Naujoji Zelandija). Sekos buvo sulyginamos su NCBI duomazėje esančiomis sekomis. Artimiausios kaimynystės metodas (angl. *neighbor-joining method*) buvo panaudotas norint įsitikinti, kad tiriami izoliatai buvo priskirti tinkamoms rūšims.

Mikrosatelitinė analizė. Tyrime buvo naudojama 10 polimorfinių mikrosatelitų lokusų. Vienos reakcijos lizdinė DNR (angl. *single-tube nested PCR*) su 5' – gale esančiu M13F700 pradmens fragmento junginiu. Mikrosatelitinė analizė buvo atlikta naudojant Type-it Microsatellite PCR Kit (Qiagen, Valencia, Jav) rinkinį, pagal Burokienė *et al.* (2015) aprašytą metodiką. Pritaikant Schuelke (2000) metodiką. Fragmentų analizei buvo panaudotas fragmentų dydžio standartas GeneScan[™] 500 LIZ[®] Size Standard (Applied Biosystems, Foster Sitis, JAV). Mikrosatelitinė analizė atlikta naudojant ABI 3730 xl genetinį analizatorių. Gauti duomenys buvo apdrototi GeneMapper v. 3.7 (Applied Biosystems, JAV) ir Geneious v. R9.1.5 (Biomatters Ltd, Naujoji Zelandija) kompiuterinių programų pagalba.

Populiacijų genetika. Izoliatai į multilokusų genotipus (MLGs) buvo suskirstyti naudojant GENODIVE v. 20b27 programą (Meirmans & Van Tienderen, 2004). Genotipinis turtingumas (angl. *genotypic richness*), įvairovė ir vienodumas, asociacijos indeksas (angl. *Index of Association*) ir standartizuotas asociacijos indeksas (angl. *standardized index of association*) buvo apskaičiuoti naudojantis POPPR programa (Kamvar *et al.*, 2014). Minimalaus jungiančio tinklo (angl. *Minimum Spanning Network, MSN*) sudarymas buvo paremtas Bruvo genetinio nuotolio skaičiavimais, naudojant POPPR programą (Kamvar *et al.*, 2014). Molekulinės genetinės įvairovės analizė (angl. *Analysis of Molecular Variance*) (AMOVA) skaičiavimai buvo atlikti naudojantis POPPR programa (Kamvar *et al.*, 2014). Įvairovės buvo ieškoma tarp populiacijų, populiacijų viduje ir tarp izoliatų. Pagrindinių komponentų analizė (angl. *Principal Components Analysis*) (PCA) buvo atlikta naudojantis AdeGenet v.2.1.1 (Jombart, 2008) ir ade4 v.1.7-10 (Dray & Dufour, 2007) paketais. Grafikas buvo nubraižytas naudojantis Factoextra v.1.0.5 (Kassambara, 2015) paketu.

Pažeistos *Ulmus spp.* medienos pavyzdžių surinkimo ir grybų izoliavimo metodika

Mėginių surinkimas. Medienos pavyzdžiai buvo renkami 2011-2012 metais, vasaros laikotarpiu. Iš viso buvo surinkti pažeistos medienos pavyzdžiai nuo 90 medžių (47 pavyzdžiai – nuo kalninės guobos (*Ulmus glabra* Huds) ir 43 – nuo paprastojo skirpsto (*Ulmus minor* Mill.)). Medžiaga buvo surinkta dvylikoje vietovių - skirtinguose Lietuvos rajonuose. Grybų grynujų kultūrų išskyrimas buvo atliktas Gamtos tyrimų centro Botanikos instituto Fitopatogeninių mikroorganizmų laboratorijoje vadovaujantis Brasier (1981) ir Bakys *et al.* (2009) metodikomis. Genominės DNR išskyrimas iš grynujų grybinių kultūrų ir po jo sekanti PGR buvo atlikta remiantis Kårén *et al.* (1997) protokolu, panaudojant universalius pradmenis ITS1 ir ITS4 (White *et al.*, 1990). Sekoskaita buvo atliekama kompanijoje Macogen Inc. (Seulas, Pietų Korėja). Gautos sekos buvo identifikuotos NCBI BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) duomenų bazėje.

***Ophiostoma novo-ulmi* populiacijų genetinių savybių tyrimas**

Restrikcijos fragmentų ilgio polimorfizmas (RFIP). Išskirti *O. novo-ulmi* DNR produktai buvo pagausinti PGR pagalba panaudojant rūšiai specifinius col-1 (Pereira *et al.*, 2000) ir cu (Pipe *et al.*, 1997) pradmenis. PGR produktai vėliau buvo sukarpyti panaudojant restrikcijos endonukleazes BfaI ir HphI (Fermentas, Lietuva). Gautieji fragmentai analizuoti horizontalios elektroforezės pagalba. Elektroforezė atlikta naudojant 2 % agarozės gelį. Elektroforezė vykdyta 1x natrio borato buferiniame tirpale, 1,5 val. 120 V įtampoje. DNR profiliai išryškinti UV šviesoje ir fotografuoti gelių dokumentacijos sistemos „Fire Reader“ (UVitec Inc., Kembridžas, JAV) pagalba.

Vegetatyvinio suderinamumo testai. Visų turimų 49-ių *O. novo-ulmi* izoliatų vegetatyvinio suderinamumo testai buvo atlikti pagal Brasier (1984) aprašytą metodiką. Visomis įmanomomis kombinacijomis suporuoti izoliatai buvo laikomi kambario temperatūroje, tamsoje 2-4 savaites. Išryškėję vegetatyvinio (ne)suderinamumo reakcijos buvo vertinamos pagal Brasier (1984) metodiką.

Medžiagos rinkimas ir grybų išskyrimas iš džiūtis pažeistų uosių medienos ir nukritusių lapkočių

Medžiaga tyrimui buvo surikta iš penkių vietovių Lietuvoje. Grynujų kultūrų išskyrimas iš lapkočių buvo atliekamas pagal Kirisits *et al.* (2013) metodiką (atlikta Lietuvos agrarinių ir miškų mokslo centro filiale Miškų institute, Miško apsaugos ir medžioklėtyros skyriuje), o iš medienos - vadovaujantis Schoebel *et al.* (2014) metodika (atlikta Gamtos tyrimų centro Botanikos instituto Fitopatogeninių mikroorganizmų laboratorijoje).

DNR išskyrimas. DNR išskyrimas buvo atliktas Šveicarijos federalinio miškų, sniego ir kraštovaizdžio instituto (WSL, Birmensdorfas, Šveicarija) Augalų apsaugos laboratorijoje pagal Schoebel *et al.* (2014) metodiką, panaudojant Norgen Total RNA Purification Kit (Norgen Biotek Corp., Kanada), vadovaujantis gamintojo protokolu, tačiau neatliekant DNazės valymo žingsnio.

H. fraxineus izoliatų genotipavimas mikrosatelitų pagalba. *H. fraxineus* genotipavimas buvo atliktas Šveicarijos federalinio miškų, sniego ir kraštovaizdžio instituto (WSL, Birmensdorfas, Šveicarija) Augalų apsaugos laboratorijoje. Genotipavimui buvo panaudota 11-a *H. fraxineus*-specifinių mikrosatelitinių pradmenų

(Gross *et al.*, 2012). Visos reakcijos su mikrosatelitiniais pradmenimis buvo atliktos dvejose daugybinėse (angl. *multiplex*) PGR. Reakcijos atliktos panaudojant Type-it Microsatellite PCR kit (Qiagen, Valencia, JAV) rinkinį, vadovaujantis gamintojo protokolu. Gauti duomenys apdoroti GeneMapper v.3.7 (Applied Biosystems, JAV) programa.

Populiacijų genetika. H. fraxineus izoliatai į multilokusų genotipus (MLG) buvo suskirstyti naudojantis POPPR programiniu paketu (Kamvar *et al.*, 2014). Genotipinis turtingumas ir genotipinė įvairovė (Šenono-Vynerio indeksas) buvo apskaičiuoti naudojantis VEGAN programiniu paketu (Dixon, 2003; R Development Core Team 2014). *t*-testo pagalba, panaudojant statistinių programų paketą SPSS Statistics v.17.0 (SPSS Inc., Čikaga, JAV), buvo apskaičiuotas patikimumas tarp tikėtinų MLG (angl. *expected MLG* - eMLG) aptiktų lapkočiuose ir medienoje. GENEPOP programinis paketas (Rousset, 2008) buvo panaudotas apskaičiuoti bendram alelių skaičiui (A_M). Alelinių variantų turtingumas (A_R) ir privačių alelių dažnis (A_{PR}) buvo suskaičiuoti naudojantis ADZE kompiuterine programa (Szpiech *et al.*, 2008); statistinis rezultatų patikimumas buvo apskaičiuotas *t*-testo pagalba. *H. fraxineus* populiacijos genetinė diferenciacija buvo apskaičiuota naudojantis kompiuterine programa FSTAT 2.9.3.2 (Goudet, 2001). Programinis paketas GENCLONE v.2.0 (Arnaud-Haond & Belkhir, 2007) padėjo apskaičiuoti atsitiktinio poravimosi (P_{Gen}) ir nepriklausomo lytinio dauginimosi (P_{Sex}) tikimybes. Asociacijos indeksas ir standartizuotas asociacijos indeksas buvo suskaičiuoti POPPR programa (Kamvar *et al.*, 2014). *H. fraxineus* genetinė struktūra buvo analizuota pagrindinių komponentų diskriminantinės analizės pagalba (DAPC) (angl. *Discriminant Analysis of Principal Components*) (Jombart *et al.*, 2010). Visi skaičiavimai buvo atlikti su klonų koreguotais duomenimis.

H. fraxineus virulentiškumo tyrimai. Virulentiškumo tyrimams izoliatai buvo atrinkti iš genotipuotų *H. fraxineus* izoliatų tarpo. Detalus pirmo dirbtinio uosio sodinukų apkrėtimo *H. fraxineus* izoliatais eksperimento („Seedlings 1“) aprašymas pateikiamas Lygis *et al.* (2017) publikacijoje. Antrasis apkrėtimo eksperimentas („Seedlings 2“) buvo atliktas 2015-2016 metų laikotarpiu. Penkiolika pirmajame eksperimente („Seedlings 1“) kaip labiausiai virulentiškų ir keturiolika kaip mažiausiai virulentiškų *H. fraxineus* izoliatų buvo pasirinkti norint patikrinti pirmojo eksperimento rezultatų patikimumą (atkartojamumą). Tyrimui buvo panaudoti 145 ketverių metų

paprastojo uosio sodinukai. Tuo pačiu izoliatu buvo apkrečiami penki medeliai. Eksperimentas „Seedlings 2” truko devynis mėnesius. Virulentiškumo įvertinimas buvo atliktas pagal Lygis *et al.* (2017) metodiką.

H. fraxineus augimo greičio testai. Augimo greitis buvo nustatomas 190 genotipuotų ir virulentiškumo testuose naudotų *H. fraxineus* izoliatų. Trijų savaitių amžiaus izoliatai buvo perkelti į naujas 90 mm skersmens Petri lėkšteles su AMEA terpe (Kirisits *et al.*, 2013), kiekvienam izoliatui skiriant po tris lėkšteles (pakartojimus). Lėkštelės su augančiomis kultūromis buvo laikomos tamsoje, kambario temperatūroje. Po 13 dienų buvo išmatuotas radialinis kiekvienos kultūros prieaugis. *H. fraxineus* izoliatų virulentiškumo ir augimo greičių palyginimas buvo atliktas *t*-testo pagalba, koreliacijas apskaičiuojant programos SPSS Statistics v.17.0 (SPSS Inc., Čikaga, JAV) pagalba.

REZULTATAI

Mikroorganizmų įvairovė džiūstančiuose alksniuose ir jų aplinkoje

Iš viso darbo metu buvo išskirtos 674 mikroorganizmų kultūros, iš jų 564 priskirtos oomicetams, o 110 - grybams. Daugiausiai kultūrų buvo išskirta iš dirvožemio (402 izoliatai), mažiausiai - iš alksnių medienos (80 izoliatų). Atlikus DNR sekoskaitą iš viso buvo identifikuoti 43 mikroorganizmų taksonai, iš kurių 24 priskirti oomicetams ir 19-- grybams.

Tyrimo metu buvo identifikuota 14 *Phytophthora* genties rūšių, iš kurių 6 rūšys: *P. x alni*, *P. gallica*, *P. gonapodyides*, *P. gregata*, *P. lacustris* ir *P. taxon Oaksoil* buvo išskirtos tiek Lietuvoje, tiek Šveicarijoje. Viena rūšis – *P. uniformis*, buvo rasta tik Lietuvoje, o tik Šveicarijoje buvo išskirtos 7 rūšys: *Phytophthora chlamydospora* Brasier, C. and E. Hansen, *Phytophthora citrophthora* (R.E. Smith & E.H. Smith) Leonian, *Phytophthora cryptogea* Pethybr. & Laff., *Phytophthora hydropathica* C. Hong & Gallegly, *Phytophthora niederhauserii* Z.G. Abad & J.A. Abad, *Phytophthora plurivora* T. Jung & T.I. Burgess, *Phytophthora pseudosyringae* T. Jung & Delatour. Abejose šalyse daugiausiai buvo izoliuota *P. lacustris*, ši rūšis buvo išskirta iš visų trijų tipų substrato (medienos, vandens ir dirvožemio). Dvi alksnių džiūties sukėlėjo *P. alni* s. l. komplekso rūšys – *P. x alni* ir *P. uniformis* Lietuvoje buvo išskirtos tik iš pažeistų

alksnių medienos, tuo tarpu Šveicarijoje *P. x alni* buvo izoliuota ir iš medienos, ir iš dirvožemio. Dažniausiai abeiose šalyse pasitaikiusi *Phytophthora* genties rūšis - *P. lacustris* (viso 147 izoliatai) išskirta iš visų trijų tipų substrato.

Phytophthium ir *Pythium* genčių organizmai buvo išskirti tik iš dviejų substrato tipų – dirvožemio ir vandens, jie buvo rasti tiek Lietuvoje, tiek Šveicarijoje.

Izoliatai, priklausantys grybų (*Fungi*) karalystei, buvo išskirti epizodiškai abeiose šalyse iš visų trijų tipų substrato, daugiausiai iš dirvožemio.

***Phytophthora alni* s. l. komplekso rūšių *P. x alni* ir *P. uniformis* genotipinės įvairovės tyrimai**

Tyrimo metu sėkmingai genotipuoti 245 *P. alni* s. l. izoliatai iš 7-ių Europos šalių - Lietuvos, Šveicarijos, Austrijos, Čekijos, Ispanijos, Švedijos ir Vengrijos. Priklausomai nuo rūšies, alelių skaičius varijavo nuo vieno (*P. x alni* ir *P. uniformis*) iki trijų (*P. uniformis*).

Iš viso buvo genotipuoti 159-i *P. x alni* izoliatai, kurie buvo suskirstyti į 36-ias multilokusų genotipų grupes (MLG), iš kurių 24 grupės buvo pirmą kartą aprašytos šiame darbe (t.y., publikuojamos pirmą kartą).

P. x alni populiacijų genotipinė įvairovė aprašyta 1 lentelėje, kurioje *P. x alni* kloninis MLG turtingumas (R) bei vienodumas (E₅) parodė, kad visose tirtose populiacijose vienas genotipas (Pxa-1) buvo dominantinis. Čekojoje buvo rasta daugiausiai genotipų - 21, o Šveicarijoje mažiausiai – 1.

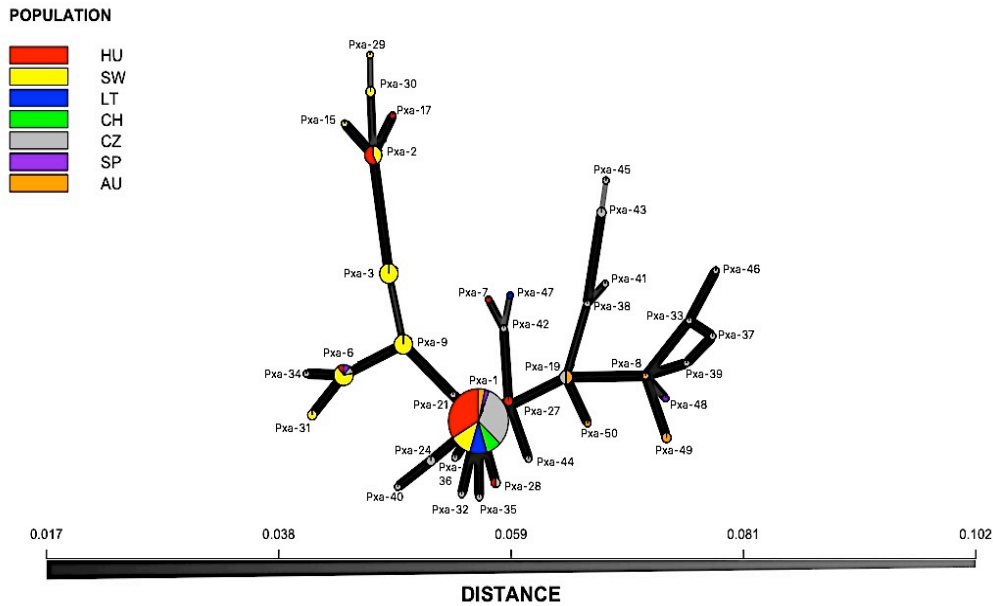
Minimalaus jungiančio tinklo (angl. *Minimum Spanning Network, MSN*) panaudojimas leido visus šiame darbe tirtus *P. x alni* genotipus suskirstyti į tris pagrindines grupes (1 pav.). Vieną grupę sudarė MLG, kurie daugiausiai buvo aptikti Švedijoje, antrą grupę buvo sudaryta iš MLG aptiktų Lietuvoje, Čekijoje, Austrijoje, Ispanijoje ir Vengrijoje, o trečią grupę sudarė pavieniai MLG, artimi dominuojančiam genotipui Pxa-1 (1 pav.).

Tyrimai parodė, kad 24 nauji genotipai susiformavo evoliucijos eigoje netekus alelio/-ių. Daugiausiai tokių genotipų buvo rasta Čekijoje (16), o likusiose šalyse nauji genotipai aptikti žymiai rečiau. 18 genotipų susiformavo netekus alelių iš *P. x multiformis* tėvinio subgenomo, 4 – netekus alelių iš *P. uniformis* tėvinio subgenomo ir du – netekus alelių iš abiejų tėvinių subgenomų.

Atlikus molekulinės genetinės įvairovės analizę (AMOVA), *P. x alni* izoliatams iš Čekijos, Švedijos ir Vengrijos aiškus MLG pasiskirstymas nebuvo nustatytas. Tik Švedijos *P. x alni* populiacijoje buvo pastebėtas MLG pasiskirstymas pagal stambiųjų upių baseinus - visus *P. x alni* genotipus buvo galima suskirstyti į dvi grupes: rytinės ir vakarinės šalies dalių.

1 lentelė. Genotipinis *Phytophthora x alni* populiacijų charakterizavimas tirtose šalyse: Austrijoje, Čekijoje, Vengrijoje, Lietuvoje, Ispanijoje, Švedijoje ir Šveicarijoje. N – tirtų *P. x alni* izoliatų skaičius; MLG – realus (gautas) multilokusų genotipų skaičius; eMLG – tikėtinas multilokusų genotipų skaičius, esant mažiausiam tirtų izoliatų skaičiui (N = 4); SE – standartinis nuokrypis; Pxa-1 – genotipo Pxa-1 sutinkamumo dažnis, %; R – kloninis turtingumas; D – pakoreguotas Simpson'o indeksas; E₅ – genotipinis tolygumas; I_A – asociacijos indeksas; PI_A – asociacijos indekso patikimumas; rbarD – standartizuotas asociacijos indeksas; PrbarD – standartizuoto asociacijos indekso patikimumas; NaN – neįmanoma reikšmė (padalinimas iš nulio); NA – trūkstama reikšmė.

Šalis	N	MLG	eMLG (±SE)	Pxa-1, %	R	D	E.5	I _A (PI _A)	rbarD (PrbarD)
Austrija (AU)	9	5	5.00 (±0.00)	33.33	0.4	0.861	0.91	-0.41 (0.792)	-0.13 (1.00)
Čekija (CZ)	49	21	5.41 (±1.39)	54	0.04	0.699	0.33	0.52 (0.002)	0.07 (0.001)
Vengrija(HU)	39	7	3.19 (±1.00)	74.35	0.02	0.442	0.45	-0.5 (0.967)	-0.08 (0.999)
Lietuva (LT)	9	2	2.00 (±0.00)	88.88	0.03	0.222	0.59	NA	NA
Ispanija (SP)	4	3	3.00 (±0.00)	50	0.55	0.833	0.91	0.16 (0.33)	0.1 (0.214)
Švedija (SW)	41	9	5.56 (±0.97)	24.39	0.12	0.852	0.89	0.14 (0.262)	0.05 (0.053)
Šveicarija (CH)	7	1	1.00 (±0.00)	100	0	0.00	NaN	NA	NA
Viso	159	36	5.18 (±1.39)	54.08	0.014	0.695	0.3	-	-



1 pav. *Phytophthora xalni* genotipus jungiantis minimalus tinklas (angl. *Minimum Spanning Network*)

Iš viso genotipuoti buvo 87 *P. uniformis* izoliatai iš Austrijos, Čekijos, Ispanijos, Lietuvos, Švedijos ir Vengrijos. Iš jų 68 buvo priskirti dominantiniam Pu-E1 genotipui, likę 20 izoliatų priskirti Pu-E2 genotipui. Antrasis genotipas Pu-E2 buvo rastas tik Švedijos *P. uniformis* populiacijoje.

Guobų maro sukėlėjo *Ophiostoma novo-ulmi* paplitimo tyrimai

Pagal morfologines savybes visos grybų grynosios kultūros, išskirtos iš maro pažeistų guobų medienos buvo suskirstytos į 33-is grupes. Vienai grupei priskirti 49 izoliatai buvo identifikuoti kaip guobų maro sukėlėjas – *O. novo-ulmi*. Visi šio grybo izoliatai buvo išskirti iš džiūstančių *Ulmus glabra* bei *U. minor* medžių 8-iose Lietuvos vietovėse. Tyrimo metu pirmosios guobų maro bangos sukėlėjas *O. ulmi sensu stricto* išskirtas nebuvo.

Atlikus RFIP, visi 49-i *O. novo-ulmi* izoliatai buvo suskirstyti į porūšius (2 lentelė): 36-i izoliatai buvo identifikuoti kaip *O. novo-ulmi* ssp. *novo-ulmi* ir 13-a izoliatų - kaip vidurūšiniai dvejų porūšių hibridai: *O. novo-ulmi* ssp. *novo-ulmi* x *O. novo-ulmi* ssp. *americana*. Vidurūšiniai hibridai buvo rasti Plungės, Kėdainių, Vilniaus rajonuose bei Vilniaus mieste. Tik *O. novo-ulmi* ssp. *novo-ulmi* buvo išskirtas iš pažeistų

medžių, augusių Biržų, Kauno, Pasvalio ir Rokiškio rajonuose. Antrasis *O. novo-ulmi* porūšis – *O. novo-ulmi* ssp. *americana* šio darbo metu rastas nebuvo (2 lentelė).

2 lentelė. Maro pažeistų kalninės guobos (*Ulmus glabra*) ir paprastojo skirpsto (*Ulmus minor*) pavyzdžių paėmimo vietos ir išskirtieji *Ophiostoma novo-ulmi* porūšiai

Rajonas	Vieta (Populiacija)	Medis - šeimininkas	Porūšis ir <i>Ophiostoma novo-ulmi</i> hibridas (išskirtų izoliatų skaičius)
Biržai	Karajimiškis	<i>U. glabra</i>	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>novo-ulmi</i> (1)
Kaunas	Raudondvaris	<i>U. glabra</i>	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>novo-ulmi</i> (1)
Kėdainiai	Aristava	<i>U. minor</i>	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>novo-ulmi</i> (24); <i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>novo-ulmi</i> x ssp. <i>americana</i> (5)
Pasvalys	Gulbinėnai, Paberliai	<i>U. glabra</i>	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>novo-ulmi</i> (3)
Plungė	Kuliai	<i>U. glabra</i>	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>novo-ulmi</i> (4); <i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>novo-ulmi</i> x ssp. <i>americana</i> (2)
Rokiškis	Dusetos	<i>U. glabra</i>	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>novo-ulmi</i> (4)
Vilnius	Dūkštos	<i>U. glabra</i>	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>novo-ulmi</i> (3)
Vilnius miestas	Verkiai	<i>U. glabra</i>	<i>O. novo-ulmi</i> ssp. <i>novo-ulmi</i> x ssp. <i>americana</i> (2)

Vegetatyvinio *Ophiostoma novo-ulmi* izoliatų suderinamumo testai

Atlikus vegetatyvinio suderinamumo (VS) testus, visi 49-i *O. novo-ulmi* izoliatai buvo sugrupuoti į 38-as vegetatyvinio suderinamumo grupes (VSG), kurias geriau tiktų vadinti dispersiniais genotipais, kadangi daugelis izoliatų buvo genetiškai skirtingi nuo kitų ir grupių nesudarė. Nei vieno genotipo nesudarė daugiau kaip du izoliatai.

Vietinėje Kėdainių rajono Aristavos populiacijoje išskirti 29-i *O. novo-ulmi* izoliatai buvo suskirstyti į 24-is dispersinius genetus. Penki genotipai buvo sudaryti iš dvejų izoliatų; visi kiti izoliatai buvo genetiškai skirtingi ir grupių nesudarė. Šioje vietinėje populiacijoje išskirti 23 *O. novo-ulmi* ssp. *novo-ulmi* porūšio atstovai ir šeši vidurūšiniai hibridai. Vietinėje Pasvalio rajono Paberlių-Gulbinėnų populiacijoje išskirti trys *O. novo-ulmi* izoliatai, kurie buvo suskirstyti į du dispersinius genotipus. Vieną genotipą sudarė du *O. novo-ulmi* ssp. *novo-ulmi* porūšio izoliatai. Vietinėje Rokiškio rajono Dusetų populiacijoje išskirti keturi *O. novo-ulmi* izoliatai buvo suskirstyti į tris dispersinius genotipus. Vieną genotipą sudarė du *O. novo-ulmi* ssp. *novo-ulmi* porūšio izoliatai. Vietinėje Plungės rajono Kulių populiacijoje išskirti šeši *O. novo-ulmi* izoliatai.

buvo suskirstyti į tris dispersinius genotipus, kurių kiekvieną sudarė po du izoliatus - *O. novo-ulmi* ssp. *novo-ulmi* porūšio atstovus bei du vidurūšinius hibridus. Vietinėje Vilniaus rajono Dūkštų populiacijoje išskirti trys vidurūšinių hibridų izoliatai buvo suskirstyti į du dispersinius genotipus. Vilniaus miesto Verkių populiacijoje išskirti du vidurūšinių hibridų izoliatai buvo genetiškai skirtingi – VSG nesuformavo. Kauno ir Biržų rajonų populiacijose buvo išskirta tik po vieną izoliatą, taigi, čia VSG taip pat negalėjo būti suformuotos.

Lietuvos *Hymenoscyphus fraxineus* populiacijų apibūdinimas

Šiame tyrime buvo tirtos penkios *H. fraxineus* populiacijos iš Lietuvos. Iš viso 367-i izoliatai buvo genotipuoti mikrosatelitinės analizės pagalba, iš kurių 181 buvo išskirtas iš paprastojo uosio lapkočių ir 186 - iš pažeistos uosio medienos. Visi izoliatai buvo suskirstyti į 224-ias multilokusų genotipų (MLG) grupes. Tik 71-as genotipas buvo pasikartojantis. Kiekvienoje populiacijoje MLG skaičius kito nuo 56-ių iki 87-ių (3 lentelė). Tirtosios *H. fraxineus* populiacijos pasižymėjo aukšta genotipine, bet žema genetinė įvairove. Privačių alelių pasireiškimo dažnio skaičiavimai (A_{PR}) parodė, kad *H. fraxineus* populiacijos nepasižymi tik konkrečiai populiacijai būdingomis savybėmis, šis indeksas (A_{PR}) variavo tarp 0.00 ir 0.09 (3 lentelė). Standartizuotas asociacijos indeksas (r_{barD}) parodė, kad *H. fraxineus* populiacijose dominuoja lytinis dauginimasis (3 lentelė).

Atlikus fiksacijos indeksų (F_{ST}) palyginimą tarp populiacijų, tarp pastarųjų nebuvo pastebėta esminių genetinių skirtumų. Didžiausias, tačiau visvien labai mažas, genetinis atstumas buvo rastas tarp Biržų ir Vilniaus populiacijų ($F_{ST} = 0.014$) bei Biržų ir Kėdainių ($F_{ST} = 0.006$) populiacijų. Visų populiacijų fiksacijos indeksų reikšmės buvo statistiškai nepatikimos ($P > 0.05$). Pagrindinių komponentų diskriminantinė analizė aiškios erdvinės (geografinės) *H. fraxineus* populiacijų struktūros taip pat neparodė.

3 lentelė. Genotipinė uosių džiūtis sukėlėjo *Hymenoscyphus fraxineus* įvairovė penkiose Lietuvos populiacijose

Populiacija	Izoliatų skaičius			Surastų multilokusų genotipų skaičius (MLG) ir tikėtinas MLG skaičius					H ^a	A _R ^b		A _{PR} ^c		F _{ST} ^d
	Lapkočiai	Mediena	Viso	Lapkočiai	eMLG (±SE)	Mediena	eMLG (±SE)	Viso		Lapkočiai	Mediena	Lapkočiai	Mediena	
Biržai (BIR)	43	44	87	43	25.0 (±0.00)	41	23.9 (±0.84)	81	3.94	1.96 (0.08)	2.08 (0.16)	0.01 (0.01)	0.10 (0.06)	-0.006
Kėdainiai (KED)	32	28	60	28	22.6 (±0.89)	25	22.6 (±0.65)	50	3.77	1.78 (0.12)	1.84 (0.09)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.013
Kretinga (KRE)	38	43	81	37	24.6 (±0.49)	37	23.0 (±1.05)	70	3.93	1.96 (0.07)	1.96 (0.08)	0.04 (0.03)	0.03 (0.03)	-0.005
Ukmergė (UKM)	37	46	83	35	24.1 (±0.69)	43	24.1 (±0.76)	75	3.98	1.89 (0.11)	1.89 (0.11)	0.03 (0.03)	0.02 (0.02)	0.009
Vilnius (VIL)	31	25	56	28	23.1 (±0.78)	24	24.0 (±0.00)	49	2.1	1.87 (0.05)	1.87 (0.05)	0.00 (0.00)	0.03 (0.02)	0.029
Viso	181	186	367	148	NA	144	NA	244	NA	NA	NA	NA	NA	-0.001

SE – standartinis nuokrypis

NA – trūkstama reikšmė

^a Šenono-Vynerio indeksas, parodantis genotipinę įvairovę (suskaiciuotas pagal mažiausią populiacijoje išskirtų izoliatų skaičių: VIL, N = 56)

^b Alelinis turtingumas (lokuse)

^c Privačių alelių skaičius (lokuse)

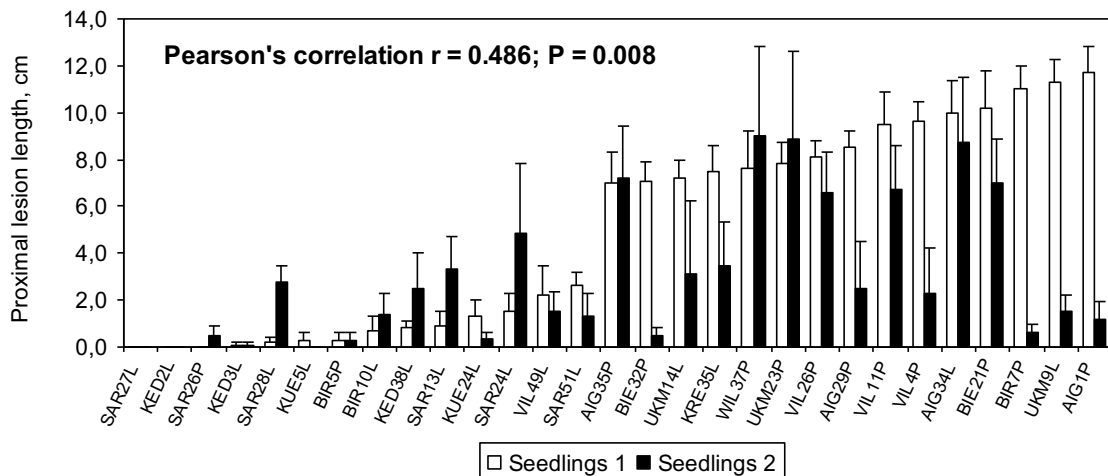
^d Fiksacijos indeksas

Dirbtinis uosio sodinukų apkrėtimas *Hymenoscyphus fraxineus* izoliatais

Pakartotinio uosio sodinukų apkrėtimo eksperimento „Seedlings 2“ metu buvo apkrėsti 145-i *Fraxinus excelsior* sodinukai, iš kurių eksperimento pabaigoje vertinimui tiko 128 (17-ai medelių pasireiškė natūralios nekrozės, neleidusios objektyviai vertinti eksperimento rezultatų). Praėjus 9 mėnesiams po apkrėtimo, ant 81 (63.3 %) apkrėstųjų sodinukų inokuliacijų vietose susiformavo įvairaus dydžio žievės pažeidimai (nekrozės). Iš 29-ių eksperimente naudotų *H. fraxineus* izoliatų, 26-i (89.7 %) sukėlė žievės nekrozes apkrėtimo vietose.

Vidutinis proksimalinis nekrozės ilgis eksperimento „Seedlings 2“ pabaigoje siekė 3.1 ± 0.6 cm. Patikimų proksimalinių nekrozės ilgių skirtumų tarp sodinukų, apkrėstų lietuviškos ir šveicariškos kilmės *H. fraxineus* izoliatais, nenustatyta ($P > 0.05$, *t*-testas). Didžiausios nekrozės (4.2 ± 1.5 cm) buvo sukeltos lietuviškų *H. fraxineus* izoliatų, išskirų iš uosio lapkočių (saprofitinė patogeno stadija), tačiau lietuviški izoliatai, išskirti iš *F. excelsior* medienos (parazitinė stadija), sukėlė mažiausias nekrozes (1.7 ± 0.5 cm). Tačiau palyginus lietuviškų ir šveicariškų *H. fraxineus* izoliatų, išskirtų iš lapkočių ir medienos, virulentiškumo rezultatus (proksimalinius nekrozės ilgius), skirtumai buvo nepatikimi ($P > 0.05$, *t*-testas).

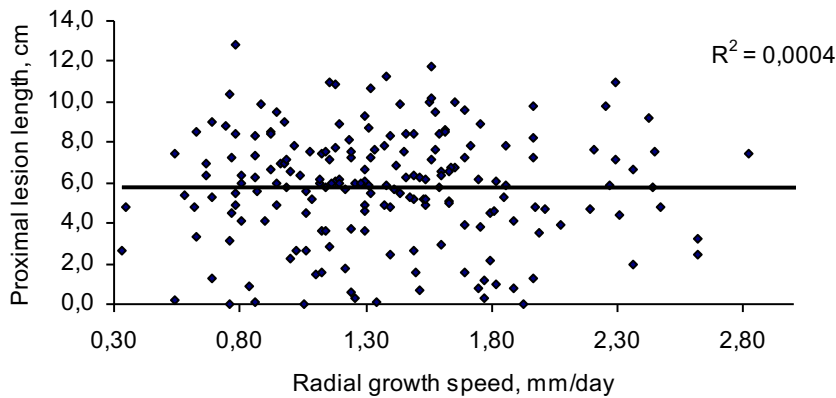
Patikima teigiama koreliacija ($r = 0.418$; $P = 0.024$) buvo rasta palyginus 14-os mažiausiai virulentiškų ir 15-os labiausiai virulentiškų *H. fraxineus* izoliatų sukeltų proksimalinius nekrozių ilgius pirmajame („Seedlings 1“) ir antrajame eksperimente („Seedlings 2“) (2 pav.). Abiejuose eksperimentuose patikimi skirtumai ($P \leq 0.005$; *t*-testas) tarp proksimalinių nekrozės ilgių buvo rasti tarp virulentiškiausių ir mažiausiai virulentiškų *H. fraxineus* izoliatų. Tačiau virulentiškumo (proksimalinio nekrozių ilgio) skirtumai tarp lietuviškų ir šveicariškų *H. fraxineus* izoliatų nebuvo patikimi.



2 pav. Proksimalinių nekrozių, susidariusių ant paprastojo uosio sodinukų žievės dirbtinio apkrėtimo grybu *Hymenoscyphus fraxineus* eksperimentų pasėkoje, ilgiai. Pateikiami 14-os mažiausiai virulentiškų ir 15-os labiausiai virulentiškų *H. fraxineus* izoliatų sukeltų nekrozių ilgiai (šių izoliatų virulentiškumas nustatytas pirmojo eksperimento „Seedlings 1” metu (žr. Lygis *et al.* 2017). Tyrime naudoti izoliatai yra iš penkių Šveicarijos populiacijų AIG=Aigle, BIE=Bière, KUE=Kuessnacht, SAR=Sargans ir WIL=Wil) ir penkių Lietuvos populiacijų: BIR=Biržai, KED=Kėdainiai, KRE=Kretinga, UKM=Ukmergė, VIL=Vilnius.

***Hymenoscyphus fraxineus* izoliatų augimo greičio ir jų virulentiškumo palyginimas**

H. fraxineus izoliatų grybienos augimo greičiai *in vitro* kultūrose nekoreliavo su tų pačių izoliatų sukeltų nekrozių ilgiais eksperimente „Seedlings 1“ (3 pav.). Palyginus labiausiai ir mažiausiai virulentiškus *H. fraxineus* izoliatų, taip pat nebuvo rasta patikimų skirtumų tarp šių izoliatų augimo greičio ir jų virulentiškumo. Taip pat, nebuvo pastebėta patikimų augimo greičio skirtumų tarp izoliatų, išskirtų skirtingose šalyse (Lietuvoje ir Šveicarijoje).



3 pav. Koreliacija tarp vidutinio radialinio *Hymenoscyphus fraxineus* grybienos augimo greičio kultūroje (Petri lėkštelėse, praėjus trylikai dienų po užsėjimo) ir vidutinio proksimalinio tų pačių izoliatų uosio sodinukams sukeltų nekrozių ilgio.

IŠVADOS

- Iš *Phytophthora alni* s. l. rūšių komplekso Lietuvoje aptiktos dvi rūšys – *P. x alni* ir *P. uniformis*, Šveicarijoje – tik *P. x alni*, o trečioji komplekso rūšis – *P. x multiformis* neaptikta nei vienoje šalyje;
- Tirtose septyniose Europos šalyse užfiksuota gana didelė *P. x alni* genotipinė įvairovė: iš viso identifikuoti 36 multilokusų genotipai, iš kurių 24 Europoje nustatyti pirmą kartą; *P. uniformis* visose tirtose šalyse identifikuoti tik du genotipai, tiek *P. x alni*, tiek *P. uniformis* rūšių europinėse populiacijose dominuoja vienas genotipas (*P. x alni* - Pxa-1; *P. uniformis* – Pu-E1);
- Lietuvoje surinktus guobų maro sukėlėjo izoliatų RFIP identifiko kaip *Ophiostoma novo-ulmi* porūšius ir vidurūšinius hibridus (*O. ulmi* s.s. nebuvo rastas nei vienoje Lietuvos populiacijoje, taigi tikėtina, kad pastaroji rūšis jau yra išstumta agresyvesnės *O. novo-ulmi* rūšies): 36-is *O. novo-ulmi* ssp. *novo-ulmi* izoliatų ir 13-a vidurūšinio *O. novo-ulmi* ssp. *novo-ulmi* x *O. novo-ulmi* ssp. *americana* hibrido izoliatų.
- Lietuvoje tirtos *O. novo-ulmi* populiacijos pasižymi didele genotipine įvairove, kas rodo aukštą vidurūšinės rekombinacijos laipsnį;
- Lietuviškosios *H. fraxineus* populiacijos pasižymi aukšta genotipine, bet žema genetinė įvairove: visi tyrimų metu rasti multilokusų genotipai pateko į vieną genetinį klasterį be pastebimo erdvinio pasiskirstymo;

- Dviejų dirbtinio uosio sodinukų apkrėtimo tais pačiais *H. fraxineus* izoliatais eksperimentų rezultatai reikšmingai koreliavo tarpusavyje, kas leidžia daryti prielaidą, kad tokie eksperimentai suteikia patikimus duomenis apie atskirų uosių džiūties sukėlėjo izoliatų virulentiškumą;
- *H. fraxineus* izoliatų virulentiškumas nekoreliuoja su tų pačių izoliatų grybienos augimo greičiais kultūroje (*in vitro*), kas leidžia daryti prielaidą, kad grybienos augimo greitis nėra pats svarbiausias faktorius *H. fraxineus*-*F. excelsior* patosistemoje.

AUTORĖS PUBLIKACIJOS DISERTACIJOS TEMA:

1. Lygis V, Prospero S, Burokiene D, Schoebel CN, Marciulyniene D, **Norkute G**, Rigling D, 2017. Virulence of the invasive ash pathogen *Hymenoscyphus fraxineus* in old and recently established populations. *Plant Pathology* **66**, 783–791.
2. Motiejūnaitė J, Kutorga E, Kasparavičius J, Lygis V, **Norkutė G**, 2016. New records from Lithuania of fungi alien to Europe. *Mycotaxon* **131**, 49–60.
3. Burokienė D, Prospero S, Jung E, Marciulyniene D, Moosbrugger K, **Norkute G**, Rigling D, Lygis V, Schoebel CN, 2015. Genetic population structure of the invasive ash dieback pathogen *Hymenoscyphus fraxineus* in its expanding range. *Biological Invasions* **17**, 2743–2756.

KONFERENCIJŲ PRANEŠIMŲ TEZĖS

1. **Norkutė G**, Čepukoit D, Lygis V, Prospero S, 2016. *Phytophthora alni* s. l. and *Phytophthora plurivora* species complex virulence test on *Alnus glutinosa* seedlings, - International Conference of Young Scientists for Advance of Agriculture, 2016 m. lapkričio 11 d., Lietuvos Mokslų Akademija, Vilnius, Lietuva.
2. Lygis V, Rigling D, Burokienė D, Marčiulynienė D, Schoebel CN, **Norkutė G**, 2015. Virulence of *Hymenoscyphus fraxineus* isolates from Lithuanian (post-epidemic) and Swiss (epidemic) populations, - Joint IUFRO Working Party Meetings: 7.02.02 "Foliage, shoot and stem diseases of forest trees" and 7.03.04 "Diseases and insects in forest nurseries" 2015 birželio 7-12, Swedish University of Agricultural Sciences, Upsala, Švedija.
3. **Norkutė G**, Lygis V, Prospero S, 2015. *Phytophthora* diversity in declining alder stands in Lithuania and Switzerland, - Joint IUFRO Working Party Meetings: 7.02.02 "Foliage, shoot and stem diseases of forest trees" and 7.03.04 "Diseases and insects in forest nurseries" 2015 birželio 7-12, Swedish University of Agricultural Sciences, Upsala, Švedija..
4. Lygis V, Rigling D, Burokienė D, Marčiulynienė D, Schoebel CN, **Norkutė G**, 2015. Virulence of *Hymenoscyphus fraxineus* isolates from Lithuanian (post-epidemic) and Swiss (epidemic) populations, - COST Action Nr. FP1103 FRAXBACK participants meeting-symposium, 2015 kovo 12-16, University of Zagreb, Dubrovnikas, Kroatija.
5. **Norkutė G**, Lygis V. 2014: Occurrence and characterization of *Phytophthora alni sensu lato* populations in Lithuania, - 11th Conference of the European Foundation for Plant Pathology "Healthy Plants - Healthy People", 2014 rugsėjo 8-13, Krokva, Lenkija.
6. Lygis V, Rigling D, Marčiulynienė D, Burokienė D, Schoebel CN, **Norkutė G**, 2014. Virulence of *Hymenoscyphus pseudoalbidus* isolates originating from Lithuanian (post-epidemic) and Swiss (epidemic) populations, - 11th Conference of the European Foundation for Plant Pathology Healthy Plants - Healthy People, 2014 rugsėjo 8-13, Krokva, Lenkija.

Characterization of populations of invasive pathogens - causal agents of three major forest tree diseases: alder decline, Dutch elm disease and ash dieback

SUMMARY

Emerging infectious diseases are usually associated with biological invasions – introduction of alien pathogenic microorganisms (Santini *et al.*, 2013). Human-caused environmental change is one of the main forces in the emergence of plant EIDs that are mainly caused by organisms accidentally introduced to new geographical areas (Daszak *et al.*, 2000). In Lithuania, during the past century more than 100 invasive plant pathogens have been identified (Motiejunaite *et al.*, 2017). In case of intensive transit through a certain country, the risk to introduce alien plant pathogens is higher (Santini *et al.*, 2013). Lithuania and Switzerland are countries of similar size and both serve as important European Union transport corridors (European Commission, 2014), thus investigation and comparison of communities and populations of alien organisms that have invaded both countries is highly desired.

Probably the best-known examples of forest epidemics caused by invasive forest pathogens in both Lithuania and Switzerland are Dutch elm disease (DED) caused by *Ophiostoma novo-ulmi*, ash dieback caused by *Hymenoscyphus fraxineus* (Kowalski, 2006) and alder decline caused by *Phytophthora alni sensu lato* (species complex). All three diseases are widely present throughout Europe and deserve extensive studies to find effective ways for pathogen control.

During the present study of alder decline, the use of oomycete-specific isolation methods allowed recovering of a large variety of oomycetes in three substrate types – wood, soil and water. The microorganism communities have been compared in two geographically separated and distinct countries – Lithuania and Switzerland. In Lithuania, two causal agents of alder decline were isolated - *Phytophthora x alni* and *P. uniformis*, while in Switzerland only *P. x alni* has been detected.

Microsatellite analysis of *P. x alni* revealed relatively high genotypic diversity across Europe. In 7 investigated countries, a total of 36 multilocus genotypes (MLGs) were identified, of which 24 MLGs were identified for the first time in Europe, whereas genotypic diversity of the investigated *P. uniformis* populations was very low. Both species had one dominant genotype across Europe, which confirmed effective microorganisms spreading by asexual reproduction. *P. x alni* population in Sweden is probably distributed locally by the waterbodies, while in other countries *P. x alni* populations did not show such character.

During the research of Dutch elm disease, only *Ophiostoma novo-ulmi* was isolated from symptomatic *Ulmus* spp. trees. RFLP allowed identification of the subspecies - *O. novo-ulmi* ssp. *novo-ulmi* and intraspecific hybrids of *O. novo-ulmi* ssp. *americana* x *O. novo-ulmi* ssp. *novo-ulmi*. Vegetative compatibility tests revealed high genotypic diversity across Lithuanian *O. novo-ulmi* populations.

Microsatellite analysis of *Hymenoscyphus fraxineus* indicated high genotypic, but low genetic diversity in all populations in Lithuania, with no observed spatial structure, - all identified *H. fraxineus* multilocus genotypes fell into one genetic cluster. Moreover, no differentiation between isolates recovered from ash bark lesions (pathogenic phase) and fallen leaf petioles (saprophytic phase) was detected during this study.

H. fraxineus inoculation experiments showed a significant correlation in performance (virulence) of the same set of *H. fraxineus* isolates used in two *F. excelsior* inoculation experiments, indicating that such seedling inoculation experiments provide reliable results of *H. fraxineus* virulence assessment (ranking), and that results of the repeated experiments are reproducible. The results of this study also showed that isolate virulence doesn't correlate with *in vitro* mycelium growth rate of the same isolates.

CURRICULUM VITAE

Vardas, pavardė

Goda Norkutė

Gimimo metai

1988 m. birželio 16 d.

Adresas

Gamtos tyrimų centro Botanikos institutas

Augalų patologijos laboratorija
Žaliųjų Ežerų g. 47, LT-08406 Lietuva
Tel: (8-5)269 72 91
El. paštas: goda.norkute@gamtc.lt

Išsilavinimas

2013 – 2017
Vilnius,

Doktorantūros studijos, Gamtos tyrimų centre,
Lietuva

2011 – 2013

Mikrobiologijos ir biotechnologijos magistro laipsnis,
Vilniaus Universitetas, Vilnius, Lietuva

2007 – 2011

Biologijos bakalauro laipsnis, Vilniaus Universitetas,
Vilnius, Lietuva

Darbo patirtis

2017 lapkritis – dabartis

Jaunesnioji mokslo darbuotoja, Augalų patologijos
laboratorija, Botanikos institutas, Gamtos tyrimų
centras, Vilnius, Lietuva

2017 vasaris – 2017 lapkritis

Biologė, Fitopatogeninių mikroorganizmų
laboratorija, Botanikos institutas, Gamtos tyrimų
centras, Vilnius, Lietuva

2015 lapkritis – 2017 vasaris

Vyresnioji laborantė, Fitopatogeninių
mikroorganizmų laboratorija, Botanikos institutas,
Gamtos tyrimų centras, Vilnius, Lietuva

Mokslinės stažuotės, mokymai

2014.10.20 – 2015.10.31

SCIEX projektas: „ALDERDECLINE - Occurrence
and genetic diversity of the invasive alder pathogen
Phytophthora alni s. l. in Switzerland and Lithuania.
Šveicarijos stipendijų fondo SCIEX NMSch -
Scientific Exchange Programme NMS.CH (part of the
Swiss Contribution to the New Member States of the
EU). Šveicarijos federaliniame miškų, sniego ir
kraštovaizdžio institutas (Swiss Federal Research
Institute WSL), Birmensdorfas, Šveicarija.

2014.04.01-30

Trumpalaikė mokslinė stažuotė (Short-Term Scientific
Mission) pagal COST veiklą Nr. FP1002 "PERMIT"
(Pathway Evaluation and pest Risk Management in
Transport) Julius Kühn institutas (Julius Kühn Institut,
JKI) Braunšveigas, Vokietija.

2013.07.1-5

Mokymai pagal COST veiklą Nr. FP 1002 PERMIT (Pathway Evaluation and pest Risk Management In Transport) EU COST Training School 2013: Field and laboratory methods for detection of invasive pests and pathogens. Sarajevas, Bosnija ir Hercegovina.

PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju savo mokslinio darbo vadovui Dr. Vaidotui Lygiui už visokeriopą pagalbą ir vertingus patarimus ruošiant disertacijos rankraštį. Už konsultacijas rengiant rankraštį taip pat nuoširdžiai dėkoju Dr. Daivai Burokienei, Dr. Antanui Mateliui ir Dr. Simone Prospero.

Esu dėkinga GTC Botanikos instituto Augalų patologijos bei WSL Augalų apsaugos bendradarbiams už gerą nuotaiką ir moralinį palaikymą. Dėkoju užsienio mokslininkams, kurie sutiko pasidalinti turimais *Phytophthora x alni* ir *P. uniformis* DNR tirpalais, taip suteikdami galimybę išplėsti mano mokslinį darbą.

Nuoširdžiai dėkoju savo šeimai ir artimiems draugams už didelį supratingumą, paramą ir domėjimąsi mano atliekamu darbu.

Šiame darbe pristatyti moksliniai tyrimai dalinai buvo finansuojami Lietuvos-Šveicarijos bendradarbiavimo programų, kuriomis siekiama sumažinti ekonominius ir socialinius skirtumus išsiplėtusioje Europos Sąjungoje: SCIEX NMSch - Scientific Exchange Programme NMS.CH) ir projektu Nr. CH-3-ŠMM-01/12 ("CONTROLDIEBACK") (part of the Swiss Contribution to the New Member States of the EU).

Dėkoju COST programai už finansinę paramą trumpalaikiai mokslinei stažuotei Julius Kühn institute (JKI), Braunšveige, Vokietijoje, bei už galimybę sudalyvauti Sarajeve (Bosnija ir Hercegovina) vykusiuose mokymuose (COST Action No. FP1002 "PERMIT" (Pathway Evaluation and pest Risk Management in Transport)).

Taip pat už gautą finansinę paramą dėkoju Lietuvos Mokslo Tarybai.