



VILNIAUS UNIVERSITETAS

Gyvybės mokslų centras

Biomokslų institutas

Julija Šepetovskaja

Mikrobiologijos ir biotechnologijos studijų programa

Magistrinis darbas

Endofitiniai grybai *Pinus* genties augaluose

Darbo vadovė: dr. Daiva Burokienė

VILNIUS

2019

Endofitiniai grybai *Pinus* genties augaluose



Darbas atliktas: Gamtos tyrimų centre

Botanikos institute, Augalų patologijos laboratorijoje

Darbą atliko:

JULIJA ŠEPETOVSKAJA

Darbo vadovė:

Dr. DAIVA BUROKIENĖ

TURINYS

SANTRUMPOS.....	5
ĮVADAS.....	6
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	8
1.1 Pušų charakteristika ir paplitimas	8
1.2 Grybų biologija	11
1.3 Endofitiniai grybai augaluose	13
1.4 Patogeninių grybų daroma žala miškams.....	15
1.5 Invaziniai patogenai	15
1.6 Grybinių ligų paplitimas <i>Pinus</i> genties augaluose.....	17
1.6.1 <i>Dothistroma</i> spp.....	19
1.6.2 <i>Lecanosticta acicola</i>	20
1.6.3 <i>Neocatenulostroma germanicum</i>	21
1.6.4 <i>Lophodermium</i> spp.....	22
1.6.5 <i>Gibberella circinata</i>	23
1.7 Grybų identifikavimo metodai	25
2. TYRIMŲ MEDŽIAGOS IR METODAI.....	27
2.1. Medžiagos ir reagentai	27
2.2 Naudoti laboratoriniai prietaisai.....	29
2.3 Tyrimo objektas ir vieta	30
2.4 Tyrimo metodai.....	31
2.4.1 Mikroskopinių grybų išskyrimas iš augalo audinių	31
2.4.2 Izoliatų morfologinis grupavimas	31
2.4.3 Grynų kultūrų ilgalaikis saugojimas	31
2.4.4 <i>Dothistroma</i> spp. identifikavimas panaudojant polimerazės grandininę reakciją.....	32
2.4.5 Antagonistinių savybių turinčių grybų atrinkimas.....	34
2.4.6 Antagonistinio poveikio vertinimas	35
2.4.7 Antagonistinių savybių turinčių grybų patikra <i>in vivo</i>	35
3. REZULTATAI.....	37
3.1 Augalų ligos požymių/pažeidimų įvertinimas	37
3.2 Grynų mikroskopinių grybų kultūrų išskyrimas ir morfologinis grupavimas	38
3.3 Morfologinis patogenų identifikavimas	44
3.4 Molekulinis <i>Dothistroma</i> spp. identifikavimas.....	47
3.5 Antagonistinių savybių turinčių grybų atrinkimas.....	49
3.6 Pušų inokuliacija ir antagonistinių savybių patikrinimas <i>in vivo</i>	52
4. Rezultatų aptarimas.....	56

5. IŠVADOS	59
Magistrinio darbo santrauka.....	60
Master Thesis SUMMARY	61
LITERATŪROS SĄRAŠAS	62

SANTRUMPOS

Aps./min. – apsisukimų skaičius per minutę

MEA – mielių ekstrakto agaras

PDA – bulvių dekstrozės agaras

CTAB – heksadeciltrimetilamonio bromidas

g – gramas

μl – mikrolitras

μm – mikrometras

L – litras

ml – mililitras

m – metras

mm – milimetras

% – procentai

PGR – polimerazės grandininė reakcija

DNR – deoksiribonukleorūgštis

bp – bazių pora

IVADAS

Grybai yra esminė biologinės įvairovės dalis, ne tik dėl didelio rūšių skaičiaus, bet ir dėl jų ekologinės, evoliucinės, socialinės bei ekonominės reikšmės (Desprez-Loustau et al., 2010). Vis daugiau susidomėjimo kelia endofitiniai grybai, kurie nesukelia augalui ligos simptomų, o kaip tik padeda apsiginti nuo patogenų išpuolių ir apsaugo augalą (Nimali et al., 2019; Maršalkienė et al., 2018; Dapkus et al., 2018; Latz et al., 2019). Endofitinių grybų tyrimai reikalingi siekiant gauti informacijos, kuri yra svarbi vertinant pasaulinę grybų įvairovę ir pasiskirstymą (Torres ant White, 2012).

Kaip ir visi gyvi organizmai, augalai taip pat gali susirgti. Augalų ligos – tai vystymosi sutrikimai, kuomet augalai ar atskiros jų dalys yra pažeidžiamos ir augalas gali žūti. Ligos skirstomos į neparazitines, susijusias su įvairiais mechaniniais pažeidimais ir parazitines, kuomet augalui daug žalos padaro ir ligas sukelia įvairios bakterijos, virusai, grybai, mikoplazmos, laibagrybiai (Belova et al., 2000). Miškai šiuo metu susiduria su įvairiomis grėsmėmis, kurias sukelia vietiniai ir invaziniai kenkėjai bei patogenai (Perry et al., 2016). Patogeniniai grybai pažeidžia augalą, sukelia ligas ir daro didelius ekonominius nuostolius, todėl greitas jų aptikimas bei tikslus identifikavimas yra vienas iš pagrindinių žingsnių, kuris gali padėti kontroliuoti augalų ligas.

Pušys yra ekonomiškai svarbios kaip medienos, anglies, popieriaus, maisto, dervų ir dekoratyvinių medžiagų šaltinis (Le Maitre, 2000). Lietuvoje savaime auga tik viena rūšis – *Pinus sylvestris*. Ši rūšis turi platų geografinį paskirstymą visoje Eurazijoje dėl savo gebėjimo įsikurti ir išgyventi įvairiose aplinkose (Poyatos et al., 2007; Krakau et al., 2013). Dvi pušų rūšys – kalninė (*P. mugo*) ir pirėninė (*P. uncinata*) dirbtinai įveistos pajūryje, kad būtų apželdintos pustomos kopos, o senuose parkuose ir nedideliais plotais miškuose nuo XIX a. pab. XX a. pradžios augintos dar šešios rūšys – *P.cembra*, *P. contorta*, *P. nigra*, *P. rigida*, *P. sibirica*, *P. strobus* (Kareiva, 2014).

Tyrimo tikslas: ištirti skirtingų rūšių *Pinus* spp. augalų endofitinius grybus išskirtus iš skirtingų vietovių.

Darbo tikslui pasiekti iškelti uždaviniai:

1. Iš skirtingų *Pinus* spp. rūšių išskirti grynas mikroskopinių grybų kultūras.
2. Išskirtus grybus suskirstyti į morfologines grupes.
4. Molekulinių metodų pagalba iš pažeistos augalinės medžiagos išskirtos grybo DNR nustatyti patogeno rūšį panaudojus rūšiai specifinius pradmenis.
5. Atlikti antagonizmo tyrimus *in vitro* ir *in vivo*.

Padėka: noriu labai padėkoti savo darbo vadovei dr. Daivai Burokienei už beveik dvejus metus trukusią praktiką, kurios metu įgijau labai daug tiek teorinių tiek praktinių žinių. Dėkoju už pagalbą atliekant tyrimus ir rašant magistrinį darbą. Taip pat noriu padėkoti dr. Godai Norkutei, doktorantams Karoliui Sivickiui ir Dovilei Čepukoit už pagalbą renkant augalinę medžiagą tyrimams, grynų grybų kultūrų išskyrimą bei molekulinį tyrimų atlikimą. Dėkoju dr. Antanui Mateliui už pagalbą ruošiant magistrinį darbą ir mikroskopinių grybų identifikavimą.

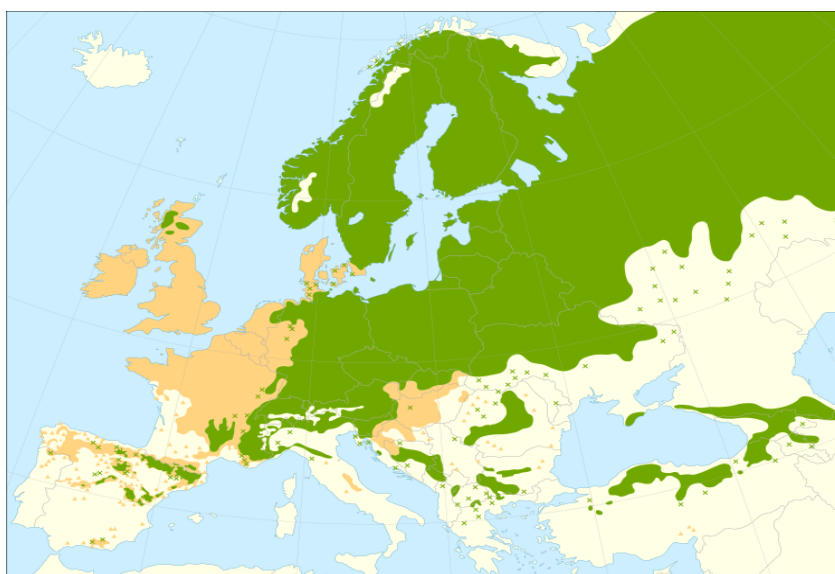
1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1 Pušų charakteristika ir paplitimas

Pušis su daugiau nei 100 rūšių, yra didžiausia spygliuočių gentis visame pasaulyje (Price et al., 1998; Gernandt et al., 2005). Mokslinė paprastosios pušies klasifikacija yra tokia:

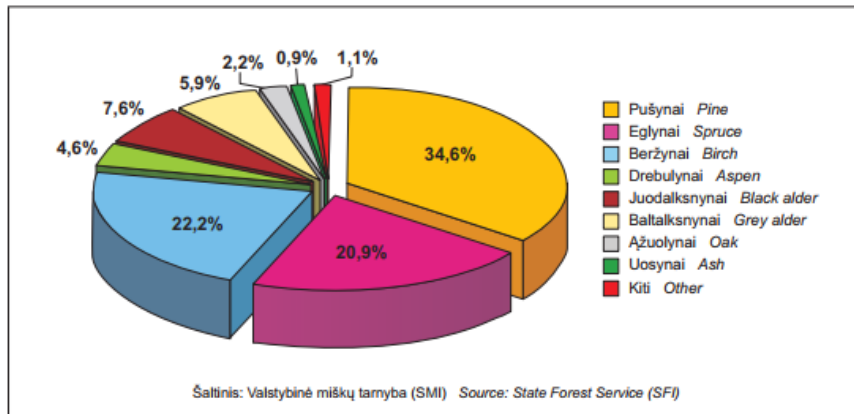
- Karalystė: *Plantae* – augalai;
- Skyrius: *Pinophyta* – pušūnai;
- Klasė: *Pinopsida* – pušainiai;
- Eilė: *Pinales* – pušiečiai;
- Šeima: *Pinaceae* – pušiniai;
- Gentis: *Pinus* – pušis;
- Rūšis: *Pinus sylvestris* – paprastoji pušis (L.).

Paprastoji pušis yra labiausiai paplitusi *Pinus* genties rūšis visame pasaulyje (Burns and Honkala, 1990) ir vienintelė savaime auganti Lietuvoje (Ozolinčius, 1998). Pušies kilmės centru yra laikoma Šiaurės Amerika, nes ten pasiskirstę daugiau nei pusė pušies rūšių (Danusevičius, 2000). Paprastosios pušies arealas labai platus ir pasiskirstęs tiek Rytų tiek Vakarų Europoje (1 pav.) (Schmidt – Vogt, 1998; Caudullo et al., 2017) ir šiuo metu priskaičiuojama daugiau nei 28 mln. hektarų, o tai sudaro daugiau kaip 20% produktyvaus miško ploto (Durrant et al., 2016).



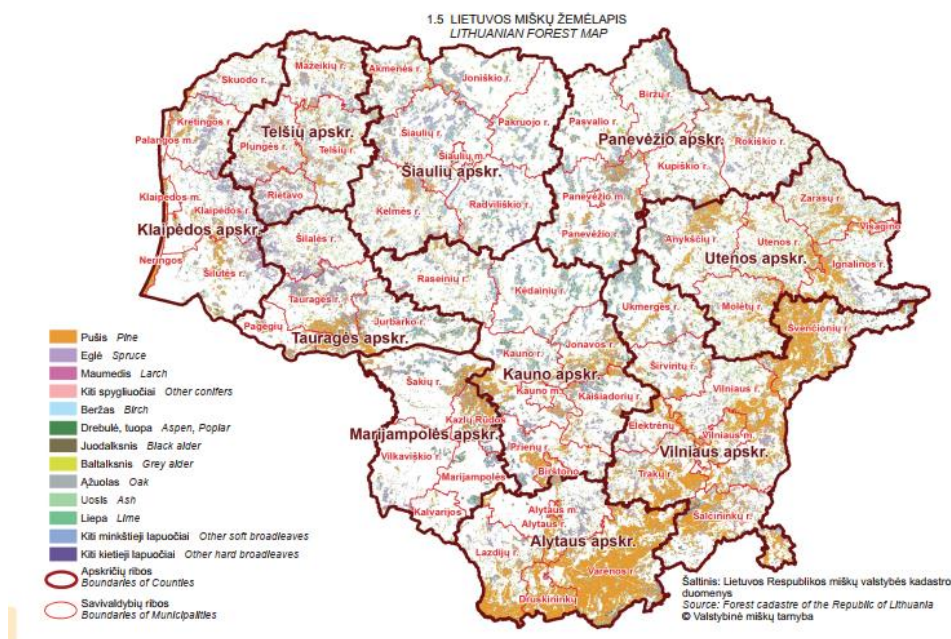
1 pav. Paprastosios pušies paplitimas Europoje (Caudullo et al., 2017)

Pietryčių Lietuvoje pušys pradėjo augti jau paleolito laikotarpyje – IX tūkstantmetyje pr. Kr. Šiuo metu Lietuvoje miškai užima 33,5% šalies teritorijos, didžiausią dalį užima pušynai – 713,2 tūkst. ha. – 34,6% (2 pav.) (Valstybinė miškų tarnyba, 2017).



2 pav. Lietuvos miškų rūšinė sudėtis (Valstybinė miškų tarnyba, 2017)

Didžioji dalis pušynų yra Pietų ir Pietryčių Lietuvoje (3 pav.). Iš didesnių masyvų pasižymi Dainavos, Labanoro – Pabradės, Rūdninkų, Kazlų Rūdos, Karšuvos pušynai, kurie užima 145-42,7 tūkst. ha. (Danusevičius, 2000).



3 pav. Pušų pasiskirstymas Lietuvoje (Valstybinė miškų tarnyba, 2017)

Paprastoji pušis paprastai siekia 30-40 m aukštį ir būna iki 1 m skersmens, o geros augavietėse, pušys pasiekia ir 42 m aukštį (Navasaitis, 2004). Stiebas yra tiesus, išskyrus atvejus, kai pažeidimai atsirado jauname amžiuje (1-3 metais) (Pravdin, 1964). Paprastoji

pušis yra sparčiai auganti rūšis, ypač 10-40 metų amžiaus. Ji nėra labai jautri klimatui ir tai rodo jos platus pasiskirstymo diapazonas (Burns and Honkala, 1990), ji gali toleruoti ir šaltas, ir karštas oro sąlygas, taip pat ji nėra reiklūs dirvožemio drėgmei ir trąšoms, tačiau šviesa yra svarbi ir reikalinga (Navasaitis, 2004). Lietuvoje yra našių medynų, ir taikant auginimo technologijas galima užauginti ypač didelio ploto pušynus. Ypač miškams svarbūs I-III grupių pušynai, kurie priskiriami draustiniams, rezervatams, miško parkams ir kt.). Šioms grupėms net 30% tenka pušynai (Ozolinčius, 1998).

Pušys labai svarbios tiek ūkine tiek ekologine prasme (Bužinskas ir Danusevičius, 2018). Ypač vertinama pušų mediena, kuri yra viena stipriausių, todėl naudojama tiek statybose, tiek baldų gamyboje. Pasaulio miškų plotas per pastaruosius tris šimtmečius sumažėjo 40%, visų pirma dėl žmogaus veiklos, dėl žvėrių, vabzdžių bei grybinių patogenų daromos žalos, ypač kenkėjai paveikia dideles plantacijas, kur jie gali plisti plačiu mastu (Durrant et al., 2016). Kiekvienais metais Lietuvoje nuo 1923 m. pastebimas pušų ploto mažėjimas: nuo 41.4% iki 34.6% (1 lentelė) o 1.5% identifiikuotų pažeidimų buvo sukelta grybinių ligų (2 lentelė)(Valstybinė miškų tarnyba, 2017).

1 lentelė. Paprastosios pušies kaita 1923-2017 m. (Valstybinė miškų tarnyba, 2017)

Medynai Forest type	Apskaitos metai Years									
	1923-1936*	1958-1963	1966-1977	1978-1987	1998	2001	2006	2011	2016	2017
Pušynai <i>Pine</i>	41,4	41,2	39,2	38,3	37,2	36,6	35,8	35,3	34,8	34,6

2 lentelė. Identifiikuotų pažeidimų pasiskirstymas pagal pažeidimų veiksnius 2016 m. (Valstybinė miškų tarnyba, 2017)

Rūšis Tree species	Pažeistų medžių skaičiaus dalis (% nuo visų stebėtų medžių) The share of damaged trees (% of all observed trees)							
	Žvėrių Animals	Vabzdžių Insects	Grybų, ligų Fungi, diseases	Dėl abiotinių veiksnių Abiotic agents	Žmogaus veiklos Human activities	Kiti Other	Iš viso Total	Iš viso 2015 Total 2015
Pušis <i>Pine</i>	4,1	0,3	1,5	3,3	3,1	7,2	19,5	19,0

1.2 Grybų biologija

Grybai – tai eukariotiniai, heterotrofiniai, fotosintezės neatliekantys organizmai, kurių kūnas sudarytas iš grybienos arba pavienių ląstelių. Grybienos šakoti vamzdeliai vadinami hifais, jie yra neapibrėžto ilgio, bet dažnai turi gana pastovų skersmenį, nuo 2 μm iki 30 μm ar daugiau (Deacon, 2006). Grybų ląstelės sienelė sudaryta iš chitino ir beta gliukanų, hifų viduje citoplazmoje yra mitochondrijos, branduoliai bei kiti organoidai. Grybų dauginimasis labai sudėtingas procesas, skirtingai nei bakterijų ar virusų. Jie gali daugintis vegetatyviniu, lytiniu ar nelytiniu būdu. Grybų dauginimosi galimybės yra ypač didelės, nes per vegetacijos laikotarpį jie geba suformuoti net kelias įvairių sporų generacijas, taip jų plitimas dar labiau padidėja (Dabkevičius ir Brazauskienė, 2007). Vegetatyviškai grybai dauginasi grybienos nuotrupomis, tokiu būdu dažniausiai grybai auginami ant mitybinių terpių, kuomet grybienos augimui sudaromos palankios sąlygos. Reprodukcinis grybų dauginimasis vyksta susidarius lytinėmis arba nelytinėmis sporomis. Anamorfinės (nelytinės) sporos tai sporangiasporos, konidijos ir chlamidiosporos, o lytinės sporos tai zygosporos, askosporos ir bazidiosporos. Daugumos vystymosi cikluose yra haploidinė (N) arba dikariotinė (N+N) stadijos (Windham, 2008).

Grybai maitinasi absorbcijos būdu. Jiems visiems reikalingos organinės maisto medžiagos – energijai palaikyti, ir anglies šaltinis – ląstelių sintezei vykdyti. Tirpias medžiagas absorbuoja per ląstelės sienelę ir plazminę membraną (Deacon, 2006). Grybams būdingi gyvenimo būdai yra trys: saprotrofinis, biotrofinis (parazitinis) ir simbiotrofinis (Lukošienė ir Kutorga, 2014). Saprotrofai yra grybai, kurie maitinasi negyva organine medžiaga. Šie grybai vaidina svarbų vaidmenį, nes jie gamina didelę įvairovę fermentų, kurie degraduoja kompleksinius polimerus, tokius kaip krakmolas, celiuliozė, baltymus, chitiną, aviacinį žibalą, keratiną. Biotrofiniai (parazitiniai) grybai maitinasi gyvomis šeiminingo ląstelėmis jų nenužudant (Deacon, 2006). Simbiozė, apibrėžiama kaip nuolatinis dviejų ar konkrečiau skirtingų organizmų ryšys (Singh et al., 2011). Yra keletas simbiozių formų: mutualistinė (abipusiai naudinga), komensalistinė (nežalinga) ir parazitinė (vienam organizmui naudinga, o kitam – žalinga) (Lukšienė ir Kutorga, 2014).

Apskaičiuota, kad biologinė grybų įvairovė siekia 1,5 mln. skirtingų rūšių grybų, tačiau iki šiol buvo aprašyta tik apie 100 000 rūšių. Grybų rūšių įvairovė pasaulyje ištirta netolygiai, ypač daug žinių trūksta apie mikroskopinių grybų rūšis. (Balevičius et al., 2007; Deacon, 2006; Wang et al., 2016). Miško dirvožemyje dažniausiai aptinkami *Basidiomycota* skyriaus grybai, o augalų audiniuose didele įvairove pasižymi *Ascomycota* skyriaus atstovai

(Terhonen et al., 2019). Grybai pasižymi didele įvairove funkcijų – gali būti augalų ar žmonių patogenai; organinių medžiagų skaidytojai; modeliniai organizmai, naudojami genetikos ir ląstelių biologijos tyrimuose; daugelio svarbių metabolitų gamintojai. Grybai vis dažniau naudojami kaip komercinės biologinės kontrolės medžiagos, teikiantys alternatyvas cheminiams pesticidams kovoti su vabzdžiais kenkėjais, nematodais, ir augalų patogeniniais grybais. Ypač paskutiniu metu atliekama daug tyrimų, kuriuose endofitus naudoja kaip potencialius biokontrolės agentus (Parsa et al., 2013; Busby et al., 2016; Schlegel et al., 2016; Bulman et al., 2013; Latz et al., 2019)

1.3 Endofitiniai grybai augaluose

Endofitais susidomėta jau labai seniai. Vokiečių botanikas, mikologas ir mikrobiologas De Bary, organizmus, kurie gyvena augalo audiniuose, pavadino endofitais (Bary, 1866). Terminas yra labai platus, kadangi apima labai daug mikroorganizmų, pradedant nuo patogenų ir baigiant šaknų mikorizės simbiotais. Bet daugelis autorių, endofitais vadina tik tuos grybus, kurie kolonizuoja vidinius augalo audinius ir nesukelia akivaizdžių ligos simptomų (Petrini, 1992). Šis apibrėžimas apima beveik visus simbiotinius ryšius tarp grybo ir augalo – parazitizmą, komensalizmą ir mutualizmą (Torres and White, 2012). Tai yra viena labiausiai paplitusių augalų simbiotų grupė su didelę rūšių įvairovę (Oono et al., 2014). Daugiausia endofitų suskaičiuojama askomicetų, bazidiomicetų, oomicetų ir zygotietų skyriams priklausančiams grybams (Rajamanikyam et al., 2017). Rūšių skaičius priklauso nuo biotinių ir abiotinių veiksnių, klimato sąlygų, šeimininko rūšies (Sieber, 2007).

Endofitiniai grybai yra labai įvairi ekologinė ir taksonominė grupė (Torres and White, 2012). Visose iki šiol ištirtose augalų rūšyse buvo rasti endofitiniai grybai, gausa ypač pasižymėjo medžiai, žoliniai augalai, dumbliai (Rajamanikyam et al., 2017), tačiau jų tarpusavio ryšiai yra mažai žinomi (Ganley and Newcombe, 2006; Stefani and Bérubé, 2006). Manoma, kad augalas aprūpina endofitus maistinėmis medžiagomis, o endofitai išskirdami antrinius metabolitus gali šeimininkui padidinti atsparumą kenkėjų išpuoliams, stresui, padidinti biomasę ar atlikti kitas naudingas funkcijas (Trigiano et al., 2006; Jiang, 2013; Rodriguez et al., 2008; Rodriguez et al., 2009; Rajamanikyam et al., 2017). Buvo atlikti tyrimai, kuomet grybiniai endofitai suteikė druskos ir sausros toleranciją augalams tik aplinkoje, kuriai būdingas padidėjęs druskingumas ir sausumas (Rodriguez et al., 2008).

Pastaraisiais metais endofitai tapo ypač patrauklūs dėl savo numatomo potencialo kaip naujų ir unikalių bioaktyvių cheminių medžiagų šaltinio miškininkystės, farmacijos ir pramonės reikmėms (Terhohen, 2019). Endofitiniai grybai turi ypač didelį biotechnologinį susidomėjimą, nes jų sąvybės yra labai naudingos žemės ūkyje (Santos et al., 2019). Endofitai, kurie stabdo kitų mikroorganizmų veiklą išskirdami tam tikras medžiagas vadinami antagonistais (Šlapauskas ir kt., 1980). Tokių grybų pagalba, galima būtų imtis prevencinių priemonių kuriant biologinius preparatus ir kovojant su grybiniais patogeniais (Brodeur, 2012; Latz et al., 2019), todėl endofitų, pasižyminčių antagonistiniu poveikiu, paieška ypač aktuali, kadangi kaip jau buvo minėta anksčiau, nuo grybinių patogenų Lietuvoje nukentėjo net 1,5% pušų. Įdomu pastebėti, kad tokie endofitai kaip *Trichoderma*

spp. rūšys jau plačiai naudojamos biokontrolei prieš augalų ligų sukėlėjus (Nimali et al., 2019).

Endofitų vaidmuo miško struktūroje, vis dar neaiškus, sudėtingas ir besikeičiantis evoliuciniame ir ekologiniame kontekste (Saikkonen, 2007), nepaisant daugiau nei 100 metų trukusių tyrimų, kurių rezultatas – tūkstančiai žurnalų straipsnių, šių grybų ekologinė reikšmė tebėra silpnai apibūdinta (Rodriguez et al., 2009). Endofitų terminą visada sunku priskirti specialioms rūšims ir jis yra glaudžiai susijęs su terminu patogenas. Nors endofitai yra gausesni ir įvairesni negu augalų patogenai (Ganley et al., 2004), jų įvairovė labai priklauso nuo šeimininko savybių (Higgins et al., 2007) ir geografinės padėties (Thomas et al., 2008). Įrodyta, kad funkcinuose tyrimuose, endofitai gali tiek padidinti atsparumą patogeniui, tiek sumažinti. Endofitai gali slopinti šeimininko gynybinę sistemą, kad pats galėtų jį infekuoti, o tai palengvina ir patogenų išpuolius (Busby et al., 2016). Jau seniai yra žinoma, kad patogenai, sukeltys ligas, tam tikru gyvenimo ciklu gali gyvuoti endofitinėje būsenoje ir nesukelti jokių ligos simptomų – latentiniai patogenai (Helande, 1993; Górzyńska et al., 2019) arba endofitai patyrę stresinę būseną gali tapti patogenais, stresas gali pasireikšti ir introdukuotoms rūšims, kai augalas yra perkeliamas į jam naują, svetimą aplinką (Brown and Macaskill, 2005). Kai kurie organizmai pvz.: *Colletotrichum* spp., *Fusarium* spp. gali būti patogenais viename augale, o kitame, glaudžiai susijusioje augalo rūšyje gali būti endofitais (De Silva et al., 2017; Lofgren et al., 2018). Tačiau daug tyrimų rodo, kad augalų endofitai dažniausiai yra nekenksmingi sveikų augalų audinių kolonizatoriai. Nors kai kurie iš jų ir yra potencialiai patogeniški, tačiau liga atsiranda tik kartu su kitais, dažniausiai nežinomais veiksniais, bet svarbiausia, yra tai, kad grybiniai endofitai yra bet kuriame sveikame augalų audinyje (Sieber, 2007) ir jų įvairovė gali sustiprinti ne tik atskirų medžių fizinę būklę, bet ir visą miško ekosistemą (Terhonen et al., 2019).

1.4 Patogeninių grybų daroma žala miškams

Miškams daug žalos padaro įvairių grybų sukeltos ligos. Grybinių, kaip ir kitų ligų – bakterinių ar virusinių, žala augalams pasireiškia keliais būdais. Sunkesniais atvejais augalai visai žūva. Taip pat dažnai pažeidžiami atskiri jų organai: šaknys, kamienai, šakos, lapai, spygliai, žiedai ar vaisiai (Belova et al., 2000).

Grybai aptinkami visuose organiniuose junginiuose. Dauguma jų yra saprobiontai ir skaido negyvas organines medžiagas. Tačiau daugelis prisitaikę atakuoti ir užkrėsti gyvus organizmus. Kai kurie iš jų yra patogenai, ligos simptomai pasireiškia po palyginti trumpo inkubacijos laikotarpio (Sieber, 2007). Siekiant kovoti su patogenais, augalai gamina atsparumo baltymus, jie yra aktyvuojami per efektoriaus signalus ir yra atsakingi už signalų transdukcijos įvykius, kurie aktyvina augalų apsaugą ir blokuoja patogenų augimą. Galiausiai infekcijos rezultatas nustatomas pagal patogeno gebėjimą įveikti augalo imuninę sistemą ir augalo gebėjimą blokuoti patogeno invaziją (Jones and Dangl, 2006). Augalų patogenai geba kolonizuoti savo šeimininką, išvengdami jo apsaugos sistemos, įskaitant fizines ir chemines kliūtis, o augalų atsparumo baltymai yra nukreipiami į patogenų pagamintas molekules (Moller and Stukenbrock, 2017). Palyginus su kitomis infekcinėmis ligomis, daugiausia žalos miškams padaro būtent grybai (Belova et al., 2000).

Klimato kaitos kontekste, Europos miškai, kurie turi didelę medžių rūšių įvairovę (Nguyen et al., 2016), vis dažniau kenčia nuo grybinių patogenų ir jų sukeltos žalos bei sukeltų ligų (Stenlid et al., 2011; Jactel et al., 2012). Per pastaruosius kelis dešimtmečius dėl padidėjusios pasaulinės prekybos į Europos miškus patenkančių naujų patogenų skaičius išaugo eksponentiškai (Santini et al., 2013)..

1.5 Invaziniai patogenai

Invaziniai miško patogenai sukelia grėsmę miškams visame pasaulyje, dėl to didėja žala ir plinta ligos. Svarbiausi miško patogenų invazijos veiksniai yra: greitas prisitaikymas prie naujų aplinkos sąlygų; veiksmingas paskirstymas per ilgą ir trumpą laiką dideliais atstumais, pasinaudojant vabzdžiais kaip platinimo vektoriais; gebėjimas keistis genetinė medžiaga arba hibridizuotis su vietinėmis arba svetimomis rūšimis (Ghelardini et al., 2017). Patogenai, gyvenantys kaip endofitai ar epifitai jų gimtojoje aplinkoje, patekus į naujus regionus, gali pereiti prie vietinių augalų, keisti savo elgesį ir tapti agresyviu patogenu vietinėms rūšims (Burgess et al., 2016). Kai grybai įvežami iš kitų žemynų, jie susiduria su

augalų rūšimis, su kuriomis jie visiškai nesusiję, o augalai šiems grybams neturi atsparumo, todėl šeimininkai jiems yra ypač jautrūs (Sieber, 2007).

Pagrindinis faktorius, kodėl per pastaruosius dešimtmečius plinta patogenai, o kartu su jais ir ligos, tai yra žmogaus veiklos pakeista aplinka, kuri pradeda prarasti apsaugą ir geografinis barjeras, kuris milijonus metų saugojo biotos pasiskirstymą, buvo pažeistas (Richardson et al., 2000) dėl, to patogenams tampa vis lengviau įsitvirtinti naujose teritorijose ir jose plisti. Europoje per pastaruosius tris dešimtmečius invazinių mikroorganizmų skaičius padvigubėjo (Santini et al., 2013). Lietuvoje per pastarąjį šimtmetį aptikta daugiau kaip 100 naujų invazinių grybų rūšių. Daugiausia invazinių rūšių Lietuvoje buvo užregistruota 1980–2000 m., tas faktas atspindėjo padažnėjusį prekių transportavimą ir aktyviausią mikologų veiklos periodą šalyje. Remiantis klimato kaitos ir vis didėjančią nekontroliuojama augalų prekyba, Lietuvai prognozuojamas tolesnis invazinių grybų rūšių skaičiaus didėjimas (Motiejūnaitė et al., 2017).

1.6 Grybinių ligų paplitimas *Pinus* genties augaluose

Augalų ligų plitimui didelę reikšmę turi patogeno biologija ir jo sugebėjimas plisti dideliais atstumais, gyvybingumo išlaikymas atsiduriant nepalankiomis sąlygomis, sugebėjimas greitai įsiskverbti į augalą ir jame įsitvirtinti. Augalų patogenai naudoja įvairias gyvavimo strategijas. Grybai gali tiesiogiai patekti į augalų epidermio ląsteles arba išplėsti hifus ant augalų ląstelių, tarp jų arba per jas. Patogeniniai ir simbiotiniai grybai bei oomicetai gali įvesti savo maitinimosi struktūras (haustorijas) į šeimininko ląstelės plazminę membraną (Jones and Dangl, 2006). Grybai plinta grybienuose, grybienuose nuotrupomis, pakitusia grybienu ar jos dalimis, o taip pat pumpuruodamiesi (Dabkevičius ir Brazauskienė, 2007). Labiausiai plitimą įtakoja grybo sporos, kurių gali būti išauginama net keli šimtai milijonų, o jas išnešioja vėjas, vabzdžiai ar kiti gyvūnai bei vanduo (Karazija, 2008). Ligos išsivysto jautriuose augaluose, ir simptomai pasireiškia šeimininke. Manoma, kad šių simptomų sudėtingumo laipsnis priklauso nuo šeimininko genetinio jautrumo, patogenų virulentiškumo, ir abiotinės aplinkos, kuri skatina infekciją (Stevens, 1960). Medžių rūšių įvairinimas miškuose yra dažnai siūloma strategija, skirta padidinti atsparumą kenkėjams ir patogenams (Macpherson et al., 2017). Buvo atlikti tyrimai, kurie parodė, kad spygliuočiai augdami miške su turtinga rūšine įvairove, patogeninių grybų ligomis sirgo rečiau (Nguyen et al., 2016).

Jau seniai Lietuvoje buvo fiksuojamos ir tiriamos *Pinus* genties ligos, kurias sukelia grybai. 1968 m. S. Pileckis ir kt. paruošė leidinį, kuriame aprašė pušies ligas, kurias sukelia grybai, tokias kaip išgulimą, kurį sukelia *Fusarium*, *Alternaria*, *Pythium* ir kitų genčių grybai; puvinį, kurį sukelia *Phytophthora omnivora*; ūgliasukį, kurį sukelia *Melampsora pinitorqua* ir *Melampsora pinitorqua*; spyglių rūdis sukelia *Coleosporum* sp; rudą spygliakretę sukelia *Herpotrichia nigra*; iššutimus sukelia *Sclerotinia graminearum* ir *Typhula graminearum*; spygliakretę – *Lophodermium pinastri*; snieginę spygliakretę *Phacidium infestans*; pilkąją spygliakretę – *Hypodermella sulcigena*; viršūnių ir šakų džiuvimą sukelti gali *Cenangium abietis* ir *Nectria cucurbitula*; *Peridermium pini* ir *Cronartium flaccidum* sukelia saklį, kai ant stiebų arba šaknies kaklelio yra įvairių formų vaisiakūnių, užsmaugimus sukelia *Thelephora terrestris* (Pileckis ir kt., 1968). Minėta *Fusarium* gentis gali sukelti ne tik išgulimus, bet ir kitas ligas, pavyzdžiui *Fusarium subglutinans* sukelia daug rimtų ligų, vienas iš jų tai pušies vėžys. Patogenas užkrečia įvairias vegetatyvines ir reprodukcinės pušų struktūras įvairiais brandos etapais ir sukuria įvairius simptomus (Dwinell et al., 2001).

Per pastaruosius dešimtmečius visame pasaulyje buvo užfiksuoti sunkūs lapijos patogenų protrūkiai, sukelianys didelius miškų plotų pažeidimus, ar net medžių žūtį (Oliva et al., 2016). Pasaulio mastu paplitę *Pinus* genties grybiniai patogenai, pažeidžiantys spyglius tokie kaip *Melampsora pinitorqua*, *Dothistroma septosporum*, *Dothistroma pini*, *Phytophthora* ir *Diplodia sapinea* atsiranda kartu su nepalankiomis oro sąlygomis (Woods et al., 2016; Jung, 2009; Fabre et al., 2011; Desprez-Loustau et al., 2007). Pastaruoju metu prognozuojamas didelis šių ligų protrūkis, susijęs būtent su globaliniu pasaulio oro sąlygų pasikeitimu (Woods et al., 2016; Desprez-Loustau et al., 2007; Sturrock et al., 2011), nes miškai nespėja taip greit prisitaikyti prie besikeičiančios aplinkos (Lindner et al., 2009). Buvo atlikti tyrimai, kurie parodė, kad pušų ligų plitimui didelę reikšmę turi meteorologinės sąlygos, ypač tokioms grybinėms ligoms kaip: paprastoji pušų spygliakritė (*Lophodermium* spp.), spygliuočių ūglių vėžys (*Grammeniella abietina*), pušų ūgliasukis (*Melampsora pinitorqua*) (Stravinskas, 2013).

Iki 2008 metų, kai kuriuose Lietuvos pušynuose buvo pastebėti pušų spyglių pažeidimai bei ankstyvos žūtys, kurių priežastys buvo neaiškios, kol nebuvo atlikti tyrimai. Vėliau paaiškėjo, kad tai raudonžiedės degligės sukėlėjo *Dothistroma septosporum* padaryta žala (Markovskaja and Treigienė, 2009). Dabartiniu metu Lietuvoje prie dažniausiai pasitaikančių pušų spyglių ir pušų ūglių ligų galima būtų priskirti pušų paprastąją spygliakritę ir pušų raudonžiedę spyglių degligę. Pavojingiausi patogeniniai grybai bus apžvelgti sekančiuose skyreliuose.

1.6.1 *Dothistroma* spp.

Šiuo metu daugiausia dėmesio skiriama patogenui *Dothistroma* spp., nes jis sukelia daugiausia žalos *Pinus* genties augalams. Šis grybas užkrečia daugiau nei 80 spygliuočių rūšių, jo paplitimo diapozonas labai platus pasauliniu mastu, ir kiekvienai metais aptikimas vis didėja (Dvoram, 2012; Mullett et al., 2018). Mokslinė patogeno sisteminė padėtis yra tokia (EPPO Bulletin, 2015):

Karalystė: *Fungi*;
Skyrius: *Ascomycota*;
Klasė: *Dothideomycetes*;
Poklasis: *Dothideomycetidae*;
Eilė: *Capnodiales*;
Šeima: *Mycosphaerellaceae*;
Gentis: *Dothistroma*;
Rūšis: *D.septosporum* (Morelet, 1968);
D.pini (Hulbary).

Šis patogenas turi labai daug sinonimų: *Cytosporina septospora* G. Dorog., *Septoria septospora* (G. Dorog.) Arx, *Septoriella septospora* (G. Dorog.) Sacc., *Actinothyrium marginatum* Sacc., *Dothistroma pini* var. *lineare* Thyr and C.G. Shaw, *Dothistroma septosporum* var. *lineare* Thyr & C.G. Shaw, *Dothistroma pini* var. *keniense* M. H. Ivory (as 'keniensis'), *Dothistroma septosporum* var. *keniense* M. H. Ivory., *Mycosphaerella pini* E. Rostrup, *Eruptio pini* (Rostr.) M.E. Barr, *Scirrhia pini* Funk & A. K. Parker, *Actinothyrium marginatum* Sacc., *Dothistroma pini* var. *keniense* M. H. Ivory (as 'keniensis'), *Dothiostroma pini* var. *lineare* Thyr & C.G. Shaw (EPPO Bulletin, 2015).

Pušinis rutulgrybis (*D. septosporum*) sukelia pušų spyglių pažeidimus: parudavimus – raudonžiedę (raudonjuostę) spyglių degligę. Lietuvoje ši liga aptikta jau prieš septyniolika metų (2002 m.) ant kalninių pušų spyglių netoli Vilniaus, tačiau vėliau atliekant tyrimus šis patogenas kelis metus nebuvo aptiktas. O tik 2008 metais nustatyta, kad grybas (*D. septosporum*) gana plačiai paplitęs Pietų, Rytų ir Vakarų Lietuvoje (Markovskaja and Treigienė, 2009).

Ligos simptomai pirmiausia pasirodo ant geltonų dėmių, kurios vėliau išplinta iki smarkiai ribotos nekrotinės juostos, kuri apgaubia spyglį ir sukelia distalinių dalių žūtį. Sergantys spygliai dažnai būna su nudžiūvusiais galais, centrinės zonos su pažeidimais ar nekrozėmis, o spyglio pamatas žalias. Matomos rudos spalvos juostos, kurios yra apsuptos ryškia zona, dažnai plytų spalvos (4 pav.). Ta raudona spalva atsiranda dėl to, kad susidaro

dotistrominas – toksinas, kuris gaminamas tiek spyglio audinyje, tiek ir kultūroje (EPPO Bulletin, 2015).



4 pav. Simptomai ant spyglių, kuriuos sukelia patogenas *Dothistroma septosporum* (EPPO Bulletin, 2015)

1.6.2 *Lecanosticta acicola*

Tai vienas pavojingiausių patogenų, kuris yra įtraukta į Lietuvos karantininių organizmų sąrašą ir į Europos ir Viduržemio jūros augalų apsaugos organizacijos karantininių organizmų sąrašą (European and Mediterranean Plant Protection Organization EPPO, 2015). Šio patogeno morfologija, gyvenimo ciklas ir sukelti ligos simptomai labai panašūs į patogenus *D. septosporum* ir *D. pini* ir be molekulinė tyrimų šias rūšis atskirti sunku, o kultivuoti visus šiuos patogenus labai sudėtinga, nes jie auga labai lėtai, o dažniausiai juos nukonkuruoja kiti endofitai ar saprotrofai (Ioos et al., 2010).

L. acicola Lietuvoje pirmą kartą aptiktas 2009-2010 m. ant *Pinus mugo* pušies rūšies Lietuvos pajūryje (Markovskaja et al., 2011). Patogenas sukelia pušų rudąją spyglių demėtligę, nuo jo kenčia įvairaus amžiaus pušys. Iš pradžių atsiranda oranžinės/geltonos dėmės, kurių centre pasirodo ruda dėmė, kartais pažeisti spygliai būna trumpesni negu sveiki (5 pav.) (EPPO Bulletin, 2015).

Ankstesni tyrimai parodė, kad β -tubulino 2 (β -tub2) ir transliacijos elongacijos faktoriaus (EF1- α) genų sekos gali būti tinkamos *L. acicola*, *D. septosporum* ir *D. pini* identifikavimui, tam sukurti specifiniai pradmenys rūšims atskirti (Ioos et al., 2010).



5 pav. *L. acicola* patogenų pažeisti spygliai (EPPO Bulletin, 2015)

1.6.3 *Neocatenulostroma germanicum*

Ši rūšis pirmą kartą Lietuvoje buvo išskirta 2011 metais, iš pušų spyglių, kurie buvo su simptomais panašiais į raudonžiedės spyglių degligės. *Neocatenulostroma germanicum* iš pradžių buvo rasta ant *Pinus mugo* rūšies spyglių, pušis taip pat buvo užsikrėtusi *Lecanosticta acicola* patogeniniu grybu (6 pav.). Vėliau ši rūšis buvo nustatyta atskirai arba kartu su *D. septosporum*, ant *P. sylvestris* ir *P. mugo* pušų. *Neocatenulostroma germanicum* patogenas gali sukelti ligą veikdamas vienas, arba kartu su kitais minėtais patogenais – *L. acicola* ar *D. septosporum*.

2013 metais rūšis aptikta ir izoliuota Ukrainoje iš *Pinus nigra* pušies spyglių (Markovskaja et al., 2016). *Neocatenulostroma* gentis (Quaedvlieg et al., 2014) priklauso trimis rūšims, kurios yra filogenetiškai glaudžiai susijusios ir morfologiškai panašios, tai būtų – *N. abietis* (Butin & Pehl) Quaedvlieg & Crous, *N. germanicum* (Crous & U. Braun) Quaedvlieg & Crous ir *N. microsporum* (Joanne E. Taylor & Crous) Quaedvlieg & Crous. Šio patogeno geografinis pasiskirstymas ir genetinė įvairovė dar nėra ištirta (Markovskaja et al., 2016), todėl tyrimai labai svarbūs, norint išsiaiškinti, kokią grėsmę šis grybas daro pušynams.



6 pav. *N. germanicum* patogeno tipiniai simptomai ant spyglių kartu su patogenu *L. acicola* (Markovskaja et al., 2016)

1.6.4 *Lophodermium* spp.

Dar viena spyglių liga, kurią sukelia grybinis patogenas *Lophodermium* spp., yra paprastoji pušų spygliakritė. *Lophodermium* yra rimtas patogenas šiaurės Baltijos ir Skandinavijos šalyse esančiuose pušynuose (Hanso and Drenkhan, 2011). *Lophodermium* genčiai priklauso 16 grybų rūšių, ir trys iš jų randamos ant paprastosios pušies spyglių – *Lophodermium seditiosum*, *Lophodermium conigenum* ir *Lophodermium pinastri* (Reignoux et al., 2014; Diwani and Millar, 1985). *Lophodermium pinastri* dažniausiai užkrečia vyresnes pušis, daigai smarkiai pažeidžiami ir neretai visai sunaikinami. Ankstyvieji ligos simptomai susideda iš nedidelių rudų spalvos pakitimų ant spyglių, ant kurių atsiranda eilėmis piknidės ir apoteciai (Jones, 1935). Piknidės ovalios, beveik apvalios, išsidėsčiusios spyglių paviršiuje, apoteciai juodos spalvos, ovalo – elipsės formos, vienas nuo kito atskirti juodomis skersinėmis linijomis (7 pav.) (Dabkevičius ir kt., 2006; Stravinskas, 2013; Bernard, 2015).

Spygliakritė aptinkama beveik kasmet. Ligai vystytis svarbios oro sąlygos, jai labai palankus šiltas ir lietingas oras vasarą bei rudenį ir nešalta žiema. Po palankių metų, liga gali apimti labai didelius plotus (Belova et al., 2000). Lietuvoje, 2017 m. paprastoji pušų spygliakritė užregistruota 37,1 ha plote – 60% medžių dėl ligos neteko apie 60% spyglių (Lietuvos valstybinių miškų 2017 m. sanitarinės būklės apžvalga, 2017).



7 pav. *Lophodermium* spp. patogeno pažeistų spyglių simptomai (Bernard, 2015)

1.6.5 *Gibberella circinata*

Gibberella circinata (Nirenberg and O'Donnell) yra patogeninis grybas – askomicetas, kuris sukelia pušų vėžį. Pušų vėžys yra viena iš svarbiausių pušynų ligų visame pasaulyje (Pfenning et al., 2014; Bezos, 2017). Grybas pažeidžia daugelis pušų rūšių ir didžiosios pocūgės augalus. *Gibberella circinata* pirmą kartą buvo nustatyta pietryčių jungtinėse valstijose (Hepting and Roth 1946; Gordon et al., 2001). Vėliau aptikta Ispanijoje, Italijoje, Pietų Afrikoje, Japonijoje, Šiaurės Amerikoje. Šiuo metu žinoma, kad *Gibberella circinata* užkrečia daugiau kaip 50 pušų rūšių (Wingfield et al., 2008). *Fusarium circinata* (Nirenberg and O'Donnell) yra nelytinė forma, taip pat yra daug šio grybo sinonimų: *Fusarium subglutinans* f. sp. *pini* Hepting; *F. moniliforme* Sheldon var. *subglutinans* Wollenweber *F. lateritium* f. sp. *pini* Hepting; *Fusarium subglutinans* (Wollenweber & Reinking) Nelson et al. f. sp. *pini* Correll et al. (EPPO Bulletin 39, 2009).

Gibberella circinata pažeidžia tiek pušų sodinukus tiek bet kokio amžiaus augalą. Dažniausiai pažeidimai matomi ant spyglių, kamieno ir kankorėžių. Sodinukų spygliai pažeisti patogenu, paruduoja ar pageltonuoja, nudžiūsta augalo viršūnė arba visas augalas. Išrovus augalą su šaknimis, matyti parudavusi ir suskilinėjusi šaknų žievė. Medžiams taip pat pasireiškia panašūs požymiai: išsiskiria sakai ant šakelių, šakų ir kamieno paviršiaus, pageltonuoja arba paruduoja spygliai, pažeista lajos vieta tampa panaši į vėliavėlę, pastebimi daugybiniai šakų vėžio ir džiūvimo židiniai virš pirminio pažeidimo įvairiose lajos vietose, nudžiūsta augalo viršūnė, o galiausiai ir visas augalas (8 pav.) (EPPO Bulletin 39, 2009; Bezos et al., 2017).

Europoje *G. circinata* yra žinomas iš Ispanijos, Portugalijos, Prancūzijos ir Italijos ir yra laikomas rimtu potencialiu invaziniu miško patogenu Europoje, kuris plinta užterštomis sėklomis, sodinukais, medienos medžiaga, dirvožemiu, vėju, vabzdžių platinimo vektoriais, taip pat prie plitimo prisideda žmogaus veikla. Ateityje patogenas dažniau plėsis į pietų Europos pušynus, tačiau taip pat yra galimybė plisti Vidurio ir Šiaurės Europoje. Lietuvoje iki šiol kol kas nėra *G. circinata* aptikimo duomenų (Oszako Tomasz et al., 2018), bet pavojus labai didelis.



8 pav. *Gibberella circinata* pušies pažeidimai: A- sėjinukų džiūtis; B – kamieno vėžys; C – spyglių džiūtis; D – nudžiūvusi augalo viršūnė (EPPOBulletin 39, 2009; Bezos D. et al., 2017).

1.7 Grybų identifikavimo metodai

Patogenų identifikavimui vienas iš dažniausiai naudojamų metodų yra vizualinis, kuomet patogenas identifikuojamas pagal jam specifinius sukeltos ligos požymius, dažniausiai ant augalo atsiranda grybų piknidės, pustulės, sporos, ant pažeistų audinių matomos specifinės dėmės, dryžiai, puviniai ar išaugos. Pavyzdžiui pušų rūdžių sukelėjo žilinės raudonrūdės *Coleosporium senecionis* požymiai labai gerai matomi - ant spyglių išauga geltonos sporangės su balsvomis apnašomis pakraščiuose, todėl identifikavimui daugiau tyrimų nereikia. Norint nustatyti rūšį, dažnai taikomas mikroskopavimo metodas, kuomet nuo pažeisto augalo audinio dalies atsargiai adatele paimamas grybo grybienos gabalėlis su sporomis ir pamerkiamas į vandens lašą ir uždengiamas dengiamuoju stikleliu, paruoštas preaparatas mikroskopuojamas ir yra vertinamas. Labiausiai dėmesys atkreipiamas į grybo sporų dydį ir spalvą, hifų struktūrą ir pertvarėlių skaičių. Jeigu ant augalo nesimato grybo grybienos ir sporų, galima paruošti drėgną kamerą, kad sukelti dirbtinį augimą ir sporų susidarymą. Kitas metodas identifikuoti rūšis – grybų auginimas ant dirbtinės mitybinės terpės. Šio metodo privalumas, kad galima išskirti endofitinius grybus, kurie nesukelia ligos požymių ir yra „nepastebimi“. Norint išskirti endofitus, svarbu gerai nudezinfekuoti augalo audinio paviršių ir dedant ant terpės augalinę medžiagą supjaustyti mažais gabaliukais, kad grybas galėtų lengviau „užlipti“ ant mitybinės terpės. Užaugintos grynos kultūros micelis mikroskopuojamas ir analizuojamas. Jeigu ant augalo audinio matoma grybo sporų, galima paruošti sporų suspensiją: adatėlės pagalba paimti sporų, įmerkti į vandens lašą ir išglaistyti ant mitybinės terpės, tokiu būdu užauginama gryna kultūra (Dabkevičius ir Brazauskienė, 2007; EPPO Bulletin, 2015; Mullett and Barnes, 2012). Tačiau yra labai daug grybų rūšių kuomet identifikuoti tik pagal ligos simptomus apžiūrint augalą arba pagal grybo morfologiją pradinėse stadijose yra labai sudėtinga arba visai neįmanoma, ypač labai giminingoms rūšims. Siekiant kuo anksčiau aptikti ir identifikuoti ligos sukelėjus, kad galima būtų pasirinkti tinkamas kontrolės priemonės ligos plitimui stabdyti, vis dažniau grybų identifikavimui taikomi molekuliniai metodai. Grybų ląstelės viduje esančioje DNR yra sukaupta visa paveldima informacija, įdomu tai, jog grybuose DNR yra iki dešimties kartų daugiau negu bakterijose. Įvairios grybų rūšys savo DNR labai skiriasi, ir net 80-97% DNR sekos yra nesikartojančios (Dabkevičius ir Brazauskienė, 2007). Mikroskopinių grybų identifikavimui naudojamas polimerazės grandininės reakcijos (PGR) metodas, kuris skirtas specifinės DNR sekos padauginimui. PGR turi daug skirtingų metodikų ir yra labai greitas, efektyvus, patogus ir ganėtinai nebrangus metodas (Firantienė et al., 2009). Grybų molekuliniam identifikavimui buvo

sukurti PGR pradmenys, kuriuos panaudojus galima pagausinti grybų vidinio transkribuojamo tarpiklio (angl. *internal transcribed spacer* – *ITS*) sritį, kuri yra tarp branduolio rRNR genų (White et al., 1990). Tais atvejais, kai ITS regionas nėra idealus, pvz., kai nėra pakankamos rūšies identifikavimo raiškos tokioms rūšims kaip *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, ir *Trichoderma* arba kai dirbama su daugeliu morfologiškai panašių rūšių, turėtų būti analizuojami kiti baltymų kodavimo genų regionai. Svarbu suprasti, kad labai maža dalis grybų <1% buvo suskirstyti pagal ITS regioną (Raja et al., 2017).

Molekulinių tyrimų pagalba, panaudojus PGR reakciją galima atskirti *D. septosporum* ir *D. pini* rūšis, kurių pagal morfologiją ir sukeltus ligos simptomus atskirti neįmanoma. Panaudojus universalūs *D. septosporum* Dstub2-F, Dstub2 ir *D. pini* DPtef-F, DPtef-R rūšims specifinius pradmenis galima atskirti šias dvi rūšis. *D. septosporum* universalūs pradmenys koduoja β -tubulino, o *D. pini* elongacijos faktoriaus *ef1* – α genus (Ioos et al., 2010). Kitas būdas atskirti rūšis yra panaudojus lytinio suderinamumo tipo MAT (angl. mating type MAT) genams universalūs pradmenis *D. septosporum* – DseprMat1f, DseptoMat2f ir *D. pini* – D.piniMat1F, DpiniMat2f (Groenewald et al., 2007). *D. septosporum* ir *D. pini* yra heterotaliniai organizmai, t.y turintys skirtingo lytinio potencialo individus. Heterotalinio grybo lytinėms sporoms susiformuoti reikalingi du skirtalyčiai suderinami individai (Groenewald et al., 2007; Lukošienė ir Kutorga, 2014). Norint, kad vyktų lytinė reprodukcija, dvi vienodos rūšys turi turėti skirtingus MAT genus (MATI arba MATII) (Fraser et al., 2003).

Prieš teigiant, kad augalą tikrai užkrėtė grybinis patogenas, reikia užkrėsti augalą tariamu patogenu. Tyrimo metu galima augalą ar jo dalis (lapus, spyglius) apipurkšti grybo sporomis, galima krėsti per dirvą ar mirkyti augalą sporų suspensijoje. Jeigu po kurio laiko ant augalo išryškėja ligos simptomai, galima teigti jog tiriamas grybas yra patogenas ir sukelia ligą (Dabkevičius ir Brazauskienė, 2007). Šis metodas turi atitikti Kocho postulatus, kurie teigia, kad (Nelson, 1995):

1. Mikroorganizmas turi sukelti ligos simptomus.
2. Mikroorganizmas turi būti išskirtas iš augalo audinių ir auginamas grynoje kultūroje.
3. Liga turi pasireikšti ant sveiko augalo, kuomet jis yra užkrečiamas grybu iš išaugintos kultūros.
4. Mikroorganizmas turi būti vėl išskirtas iš eksperimentiškai užkrėsto augalo.

2. TYRIMŲ MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1. Medžiagos ir reagentai

Atliekant tyrimus ir eksperimentus, buvo naudoti Gamtos tyrimų centro, augalų patologijos laboratorijos cheminiai reagentai ir prietaisai.

3 lentelė. Cheminės medžiagos ir reagentai

Cheminės medžiagos pavadinimas	Gamintojas
Glicerolis ($C_3H_8O_3$)	Chempur (Lenkija)
Izopropanolis (2-propanolis) (C_3H_8O) Chloroformas ($CHCl_3$)	Fisher Chemical (Jungtinės Amerikos Valstijos)
Etanolis (C_2H_5OH)	AB „Stumbras“ (Lietuva)
Heksadeciltrimetilamonibromidas CTAB ($CH_3(CH_2)_{15}N(Br)(CH_3)_3$) Etilendiamintetraacto rūgštis EDTA ($C_{10}H_{16}N_2O_8$)	G – Biosciences (Jungtinės Amerikos Valstijos)
Druskos rūgštis (Tris-HCl)	Roth (Vokietija)
Natrio chloridas (NaCl)	Lachema (Čekija)
Dream Taq Green reakcijos buferis DreamTaq DNR polimerazė dNTP mišinys Magnio chloridas ($MgCl_2$) Agarozė (Agarose Standard low EEO)	ThermoFisher (Lietuva)
Pradmenys (DpiniMat1f2, DpiniMat2f, DseptoMat1f, DseptoMat2f, DPtef-F, DPet-R, , Dstub2-F, Dstub2-R, LAtef-F, LAtef-R	BaseClear (Nyderlandai)

4 lentelė. Naudoti tirpalai

Tirpalo pavadinimas	Sudėtinės dalys
CTAB tirpalas (3%)	CTAB Tris-HCl (1M) (druskos rūgštis) EDTA (0,5M) NaCl (5M) (natrio chloridas) H ₂ O (distiliuotas)
SB (natrio borato) buferis	NaOH (natrio šarmas) B(OH) ₃ (boro rūgštis) H ₂ O (distiliuotas)
Agarozės gelis (2%)	Agarozė Dažas Gel Green (Biotium) SB buferis

5 lentelė. Naudotos terpės

Terpės pavadinimas	Sudėtinės dalys	Koncentracija
2% MEA agarizuota terpė (Mullett and Barnes, 2012)	Agaras Malt ekstraktas Vanduo (distiliuotas)	18 g/l 16 g/l 800 ml/l
2% MEA skysta terpė	Malt ekstraktas Vanduo (distiliuotas)	16 g/l 800 ml/l
PDA (Bulvių dekstrozės agaras) (Lelliott, 1987)	D – gliukozė Agaras Pagamintas bulvių ekstraktas Vanduo (distiliuotas)	5 g/l 20 g/l 200 ml/l 800 ml/l

2.2 Naudoti laboratoriniai prietaisai

1. Autoklavas MultiControl (CertoClav; Austrija).
2. Laminarinė traukos spinta Cellgard (NUAIRE; Class II; Jungtinės Amerikos Valstijos).
3. Termostatas MEMMERT ICH 256 (Memmert; Vokietija).
4. Homogenizatorius FAST PREP BIO 101 (Thermo Savant; Jungtinės Amerikos Valstijos).
5. Centrifuga Heraeus FRESCO 21 (Thermo Scientific; Vokietija).
6. Centrifuga Galaxy mini (VWR; Korėja).
7. Kaitinimo blokas Eppendorf Thermomixer Comfort (Eppendorf; Vokietija).
8. Nanospektrofotometras P330 (Implen; Vokietija).
9. Termocikleris Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems; Jungtinės Amerikos Valstijos).
10. Elektroforezės aparatas Sub-Cell R GT (Bio-Rad); šaltinis EPS 301 (Amersham Biosciences; Švedija).
11. UV transiliuminatorius, gelių dokumentavimo sistema Fire Reader (UVitec; Jungtinės Amerikos Valstijos).
12. Analitinės svarstyklės KERN (ABJ; Vokietija).
13. Dirbtinio klimato kamera Fitotron (Weiss gallenkamp; Vokietija).
14. Mikroskopas Motic BA 300 (Meyer instruments; Jungtinės Amerikos valstijos)
15. Mikroskopas Nikon Eclipse Ci-L (Nikon; Japonija).

2.3 Tyrimo objektas ir vieta

Tyrimo objektas – *Pinus* spp. genties augalai.

Vieta – tyrimo metu buvo renkami pavyzdžiai nuo šių *Pinus* spp. augalų (6 lentelė):

6 lentelė. Tiriamųjų *Pinus* genties rūšys ir rinkimo vieta

Auglo rūšis	Vieta	Koordinatės
Paprastoji pušis (<i>Pinus sylvestris</i> L. 'Beuvronensis')	Kairėnai	54.7357207, 25.4012941
Kalninė pušis (<i>Pinus mugo</i> Turra 'Frisia')	Kairėnai	
Veimutinė pušis (<i>Pinus strobur</i> L.)	Kairėnai	
Juodoji pušis (<i>Pinus nigra</i> Arn.)	Kairėnai	
Bankso pušis (<i>Pinus banksiana</i> Lamb. x contorta)	Kairėnai	
Geltonoji pušis (<i>Pinus ponderosa</i> var. <i>scopulorum</i> Engelman in S. Watson)	Kairėnai	
Smulkiažiedė pušis (<i>Pinus parviflora</i> Siebold 'Glauca')	Kairėnai	
Paprastoji pušis (<i>Pinus sylvestris</i> L.)	Vilniaus miestas	54.712970, 25.186949
Paprastoji pušis (<i>Pinus sylvestris</i> L.)	Pagiriai	54.581729, 25.181708
Paprastoji pušis (<i>Pinus sylvestris</i> L.)	Zarasų raj.	55.708688, 26.185255

2.4 Tyrimo metodai

2.4.1 Mikroskopinių grybų išskyrimas iš augalo audinių

Surinkta medžiaga su sveikais ir vizualiai pastebimais pažeidimais ant augalo šakelių, pumpurų ir spyglių (EPPO Bulletin, 2015). Mikroskopinių grybų išskyrimui buvo naudojami keli metodai. Pirmojo metodo metu atskiros dalys buvo supjaustytos nedideliais gabalėliais ir sterilinamos. Augalinė medžiaga sterilizuota palaikant 30 sekundžių etanolyje (96%), nuskalauta steriliu vandeniu ir išdžiovinta filtrinio popieriaus gabalėliu. Mikroorganizmų išskyrimui paruošta medžiaga buvo įspaudžiama į MEA 2% terpę ir auginama kambario temperatūroje apie 22 °C, tamsoje (Jankowiak, 2006). Po keletos dienų, kuomet pasirodydavo grybo grybiena, ji buvo išpjauinama nedideliu gabalėliu ir persėta į Petri lėkštelę su paruošta MEA 2% terpe, grynos kultūros užauginimui. Antrojo metodo metu, sterilinami spygliai buvo taip pat, kaip ir pirmajame metode. Adatėlės pagalba buvo bandoma iš pažeidimo paimti grybo sporų. Sporos įmerkiamos į vandens lašą ir kilpelės pagalba paskirstomos į Petri lėkštelę (EPPO Bulletin, 2015).

2.4.2 Izoliatų morfologinis grupavimas

Morfologiniam grupavimui izoliatai buvo auginami ant MEA 2% terpės. Mėnesio amžiaus izoliatai buvo grupuojami į morfologines grupes, pirmiausiai pagal kolonijos vaizdą lėkštelėje t.y augimo išsidėstymą ir spalvą, tuomet visi izoliatai buvo mikroskopuojami ir grupuojami pagal hifus bei sporas jeigu jos susiformavo (pagal laboratorijos naudojamą metodiką). Mikroskopavimui buvo naudojamas binokuliarinis mikroskopas – Nikon Eclipse Ci-L, kultūros nagrinėjamos apžiūrint 40x padidiniu, kultūros buvo fotografuojamos naudojant kompiuterinę programą – NIS – Elements D 4.00.05.

2.4.3 Grynų kultūrų ilgalaikis saugojimas

Išskirtos ir morfologiškai sugrupuotos grynos kultūros buvo sudėtos ilgalaikiam saugojimui, kad galėtų būti panaudotos prireikus kitiems eksperimentams. Iš lėkštelės su gryna kultūra, buvo išpjautas gabalėlis agarą su grybo hifais ir įdėtas į 1,5 ml. mėgintuvėlius, tuomet buvo užpilta 1 ml 10% glicerino tirpalo ir laikoma ultra žemos temperatūros šaldiklyje -70 °C, tokios kultūros išlieka gyvybingos apie 9 mėnesius ir ilgiau (Singleton et al., 1992).

2.4.4 *Dothistroma* spp. identifikavimas panaudojant polimerazės grandininę reakciją

Genominės DNR išskyrimas naudojant CTAB metodiką. *Dothistroma* spp. grybo DNR išskyrimui buvo naudojama augalinė medžiaga – spygliai su matomais simptomais. Kitų grynų grybų izoliatų DNR išskyrimui buvo naudota grybo grybiena. Į mėgintuvėlį su tiriamąja medžiaga buvo įpilta 600 µl CTAB tirpalo. Tiriama pavyzdžiai purtomi 5,5 aps./min. 30 sekundžių du kartus, tarp jų darant 30 sekundžių pertrauką. Kiekvieną kartą po purtymo mėgintuvėliai centrifuguoti 8 000 aps./min. 1 min. Mėgintuvėliai inkubuoti valandą 65 °C temperatūroje. Po inkubacijos, į mėgintuvėlius pilama 600 µl chloroformo ir gerai sukratoma, centrifuguota 10 minučių 10 000 aps./min. Viršutinė tirpalo frakcija buvo perkelta į 1,5 ml tūrio mėgintuvėlius ir įpilta 1 ml šalto (laikyto -20 °C temperatūroje) izopropanolio ir lengvai pavartoma. Mėgintuvėliai inkubuoti 30 minučių -20 °C temperatūroje. Po inkubacijos mėgintuvėliai centrifuguoti 30 min. 13 aps./min. 4 °C temperatūroje. Nupylus supernatantą ant dugno buvo matoma nusodinta DNR, kuri buvo užpilta 200 µl šalto etanolio 70% (-20 °C) ir centrifuguojama 5 min. 13 aps./min. greičiu 4 °C temperatūroje. Nupylus skystį mėgintuvėliai laikyti atviri kol išgaruos etanolis. DNR ištirpinta 20 µl steriliame vandenyje. Po 24 valandų išmatuota DNR koncentracija ir kokybė (Rosling et al. 2003).

***Dothistroma septosporum* rūšies patvirtinimas.** Nustačius išskirtos DNR koncentraciją ir kokybę Nanodrop (P330) ji buvo praskiedžiama iki darbinės – 10 ng/µl koncentracijos. Pirmojo eksperimento metu DNR fragmentai buvo dauginami panaudojant polimerazės grandininę reakciją su *D. pini*, *D. septosporum* ir *L. acicola* specifiniais pradmenimis – DPtef-F, DPet-R, Dstub2-F, Dstub2-R, LAtef-F, LAtef-R (Ioose et al., 2010). Buvo ruošiami trys reakcijos mišiniai su skirtingiais pradmenimis. Pirmasis reakcijos mišinys su *D. septosporum* specifiniais pradmenimis, kurio galutinis tūris 15 µl vienam mėginiui: 9,375 µl vandens, 1,5 µl Green buferio, 1,5 µl dNTP mišinio, 0,3 µl Dstub2-F pradmens, 0,3 µl DStub2-R pradmens, 0,45 µl MgCl₂, 0,075 µl DreamTaq polimerazės ir 1,5 µl amplifikuojamos DNR. Kiti du mišiniai buvo ruošiami tokiomis pat koncentracijomis tik su kitais rūšiai specifiniais pradmenimis (antrasis mišinys su *D. pini*, trečiasis su *L. acicola* pradmenimis).

D. septosporum:

Dstub2-F 5' CGAACATGGACTGAGCAAAAC 3'

DStub2-R 5' GCACGGCTCTTTCAAATGAC 3'

D. pini:

DPtef-F 5' ATTTTCGCTGCTCGTCACT 3'

DPtef-R 5'' CAATGTGAGATGTTCGTCGTG 3''

Lecanosticta acicola:

LAtef-F 5'' GCAAATTTTCGCCGTTTATC 3''

LAtef-R 5'' TGTGTTCCAAGAGTGCTTGC 3''

Amplifikavimo ciklai:

1. Denaturacija 95 °C 10 min.;
2. Denaturacija 95 °C 30 s; pradmenų prisitvirtinimas 60 °C 23 s ir pradmenų ilginimas 72 °C 60 s. Šie ciklai kartojami 40 kartų;
3. Galutinis pradmenų ilginimas 72 °C 10 min.

Antrojo eksperimento metu DNR fragmentai buvo dauginami panaudojant polimerazės grandininę reakciją su *D. septosporum* specifiniais pradmenimis: DpiniMat1f2, DpiniMat2f, DseptoMat1f, DseptoMat2f (Groenewald et al., 2007). Buvo ruošiami du reakcijos mišiniai su skirtingais pradmenimis, pirmasis reakcijos mišinys su *D. septosporum* MATI pradmenimis, kurio galutinis tūris 15 µl vienam mėginiui: 9,375 µl vandens, 1,5 µl Green buferio, 1,5 µl dNTP mišinio, 0,3 µl DseptoMat1f pradmens, 0,3 µl DotMat1r pradmens, 0,45 µl MgCl₂, 0,075 µl DreamTaq polimerazės ir 1,5 µl amplifikuojamos DNR. Antrasis reakcijos mišinys su *D. septosporum* MATII pradmenimis buvo ruošiamas tokiomis pat koncentracijomis kaip su MATI pradmenimis.

D. septosporum:

DseptoMat1f 5'' CGCAGTAAGTGATGCCCTGAC 3''

DotMat1r 5' TTGCCTGACCGGCTGCTGGTG 3'

DseptoMat2f 5'' GTGAGTGAACGCCGCACATGG 3''

DotMat2r 5' CTGGTCGTGAAGTCCATCGTC 3'

Reakcijos mišinys paruoštas pagal Groenewald et al. 2007 protokolą. Amplifikavimo ciklai:

1. Denaturacija 94 °C 5 min.;
2. Denaturacija 94 °C 20 s; pradmenų prisitvirtinimas 65 °C 20 s ir pradmenų ilginimas 72 °C 40 s. Šie ciklai kartojami 40 kartų;
3. Galutinis pradmenų ilginimas 72 °C 5 min.

PGR produktų analizė buvo vykdoma elektroforize 1,5% agarozės gelyje: 2,25 g agarozės, 150 ml SB (1x) buferio, 2% „GelGreen“ (10 000x) dažo. Visi mėginiai buvo skirstomi gelyje 100 V įtampoje 2 val. ir vizualizuojami naudojant gelių dokumentavimo sistemą Fire Reader (Jungtinė Karalystė).

2.4.5 Antagonistinių savybių turinčių grybų atrinkimas

Antagonistinis poveikis buvo tiriamas su trimis „Gamtos tyrimų centro, augalų patologijos laboratorijos, patogenų izoliatais (PATI; PATII ir PATIII) išskirtais iš *Pinus sylvestris* pušų augančių skirtingose vietovėse ir 78 endofitiniais izoliatais. 10 – ties parų patogeno grynos kultūros paruošta sporų suspensija buvo išglaištoma ant 2% MEA terpės po 300 µl: apie 5000 ląst./ml. Sporos buvo skaičiuojamos Gorajavo kameroje pagal formulę (Хабибуллина, 2007):

$$N = a \cdot 1000K/h \cdot S;$$

N – sporų skaičius viename mililitre;

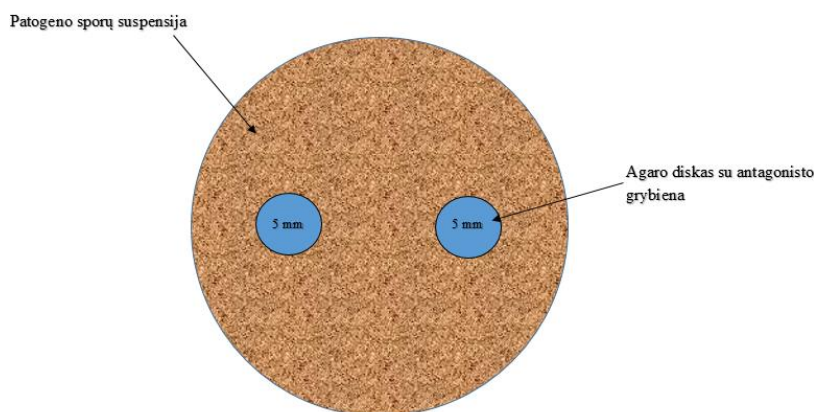
A – Vidutinis sporų skaičius, penkiuose mažuose kameros kvadratuose;

K – suspensijos skiedimas;

h – kameros gylis;

S – plotas mažo kvadrato, mm

Ant išglaiстыtų sporų uždedami du, 7 – nių parų, nepatogeninio grybo hifų diskai, kurie buvo išpjauti su steriliu 5 mm skersmens grąžtu ir uždėti ant abiejų vidinės Petri lėkštelės kraštų. Eksperimentas iki vertinimo laikomas 14 parų 22 °C temperatūroje (9 pav.).

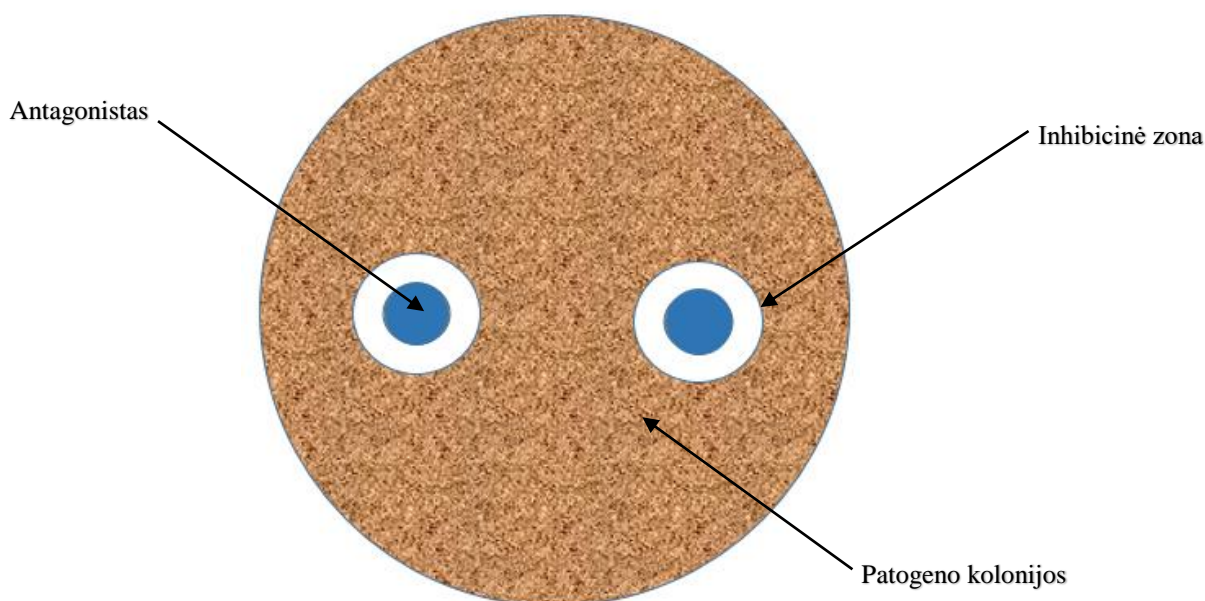


9 pav. Antagonistinio testo schema

2.4.6 Antagonistinio poveikio vertinimas

Antagonistinis poveikis buvo vertinamas pagal inhibicines zonas (10 pav.). Vertinimas buvo atliekamas po dviejų stebėjimo savaičių. Laboratorijoje buvo sudaryti vertinimo kriterijai, pagal kuriuos izoliatai buvo suskirstyti į tris grupes:

- 1) Turi didelį antagonistinį poveikį (patogenų sporos nesudygo);
- 2) Turi vidutinį antagonistinį poveikį (inhibicinė zona 0,5 mm ir daugiau);
- 3) Antagonistinio poveikio neturi (inhibicinės zonos nesusidarė).



10 pav. Antagonistinio poveikio vertinimas pagal inhibicines zonas

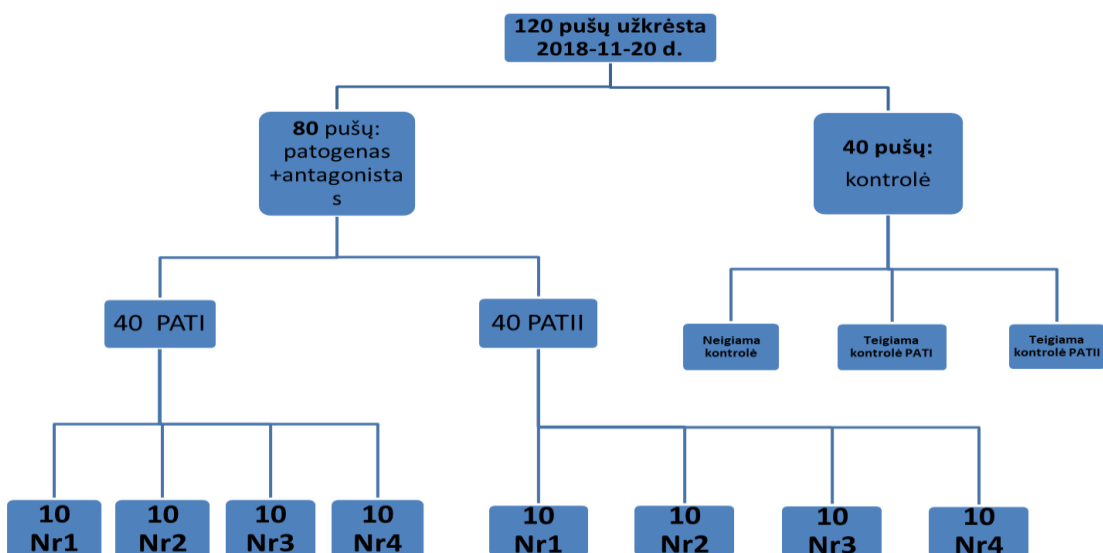
2.4.7 Antagonistinių savybių turinčių grybų patikra *in vivo*

Eksperimentui buvo auginamos pušys, kurių sėklos pasėtos steriliame dirvožemyje. Pušys buvo auginamos metus laiko, auginimo kameroje – Fitotron (Weiss Gallenkamp; Vokietija), kontroliuojamomis sąlygomis: drėgmė, temperatūra, dienos ir nakties režimas. Drėgmė 80%, dienos režimas 16 valandų ir 20 °C temperatūra, nakties režimas – 8 valandos ir 17 °C temperatūra (Perry et al., 2016). Pušų inokuliavimui buvo naudoti du patogeninių grybų izoliatai (PAT1 ir PATII) išskirti iš *Pinus* genties augalų ir 5 antagonistinį poveikį *in vivo* turėję grybų izoliatai: 722; Mt4Y29; Pst 1N1; RDŽ 5T 1.6 ir SC2.4.1, kurie yra iš laboratorijos kolekcijos. Pirmiausia, 2018-11-20 d. pušys buvo inokuliuotos nepatogeniniais, antagonistinį poveikį turinčiais grybais, o 2018-12-13 d. antagonistais

inokuliuotos pušys buvo užkrėstos patogeniniais grybais. Iš viso buvo inokuliuota 120 pušų, kurios suskirstytos į 12 grupių po 10 pušų:

- 10 pušų PATI + Mt4Y29;
- 10 pušų PATI+ RDŽ 5T 1.6;
- 10 pušų PATI + Pst 1N1;
- 10 pušų PATI+ 622;
- 10 pušų PATI+ SC2.4.1;
- 10 pušų PATII+SC2.4.1;
- 10 pušų PATII + Mt4Y29;
- 10 pušų PATII + RDŽ 5T 1.6;
- 10 pušų PATII + Pst 1N1;
- 10 pušų PATII+622;
- 10 pušų tik PATI be antagonistinio grybo;
- 10 pušų tik PATII be antagonistinio grybo;
- 20 pušų neigiama kontrolė – nieko nedaryta.

Inokuliacijai buvo naudota 10^6 sporų (Perry et al., 2016), suskaičiuotų Gorjajevo kameroje pagal formulę (Хабибуллина, 2007). Pušys buvo inokuliuotos jas apipurškiant, buvo naudotas sterilus rankinis purkštukas. Inokuliacijos schema pavaizduota 11 – tame paveikslėlyje.



11 pav. Pušų inokuliacijos schema

3. REZULTATAI

3.1 Augalų ligos požymių/pažeidimų įvertinimas

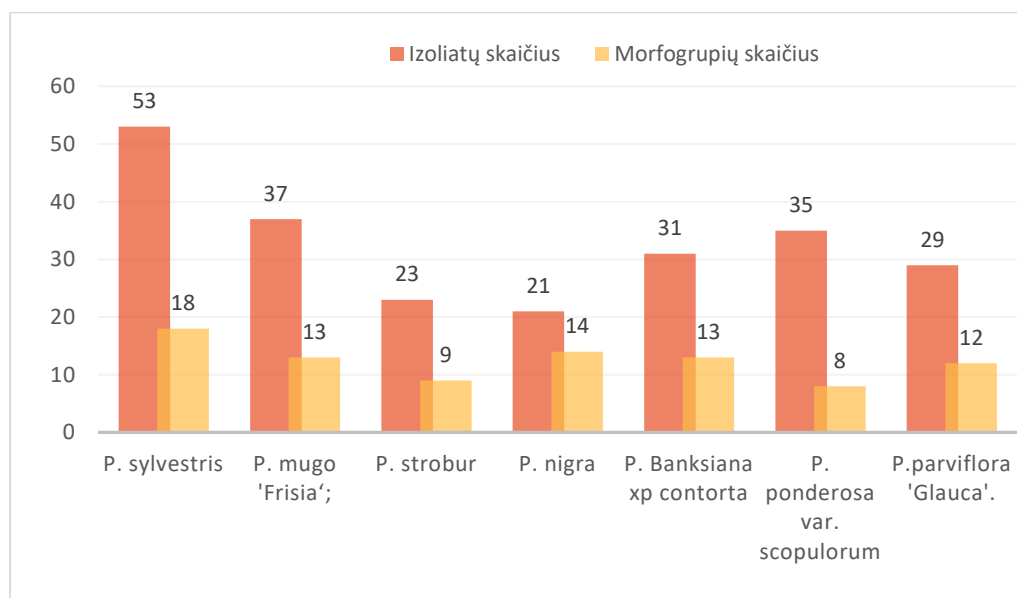
2018 m. buvo surinkta *Pinus* genties augalinė medžiaga tiek su ligų simptomais, tiek be jokių matomų pažeidimų. Medžiaga rinkta keturiose skirtingose vietovėse. Daugiausia pažeidimų buvo stebima ant augalo spyglių, pažeidimai buvo pastebimi ant spyglių centrinės bei viršutinės dalies, o spyglių pamatas buvo pažeistas mažiausiai. Labai daug spyglių buvo su nudžiuvusiais galais. Ypač didelis dėmesys buvo atkreiptas į įvairias dėmes, buvo rasta spyglių su geltonomis dėmėmis, kurių pamate buvo plytų raudonumo dėmės, taip pat buvo spyglių su pailgomis tamsiomis dėmėmis su įtrūkimais, kuriuose jau matėsi grybo vaisiakūniai (12 pav.).



12 pav. Spyglių pažeidimai ant *Pinus* genties augalų

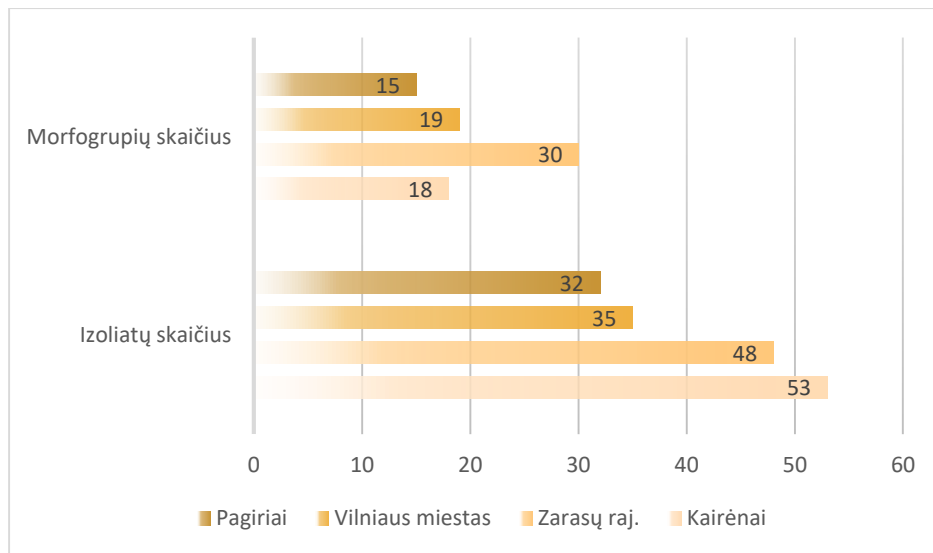
3.2 Grynų mikroskopinių grybų kultūrų išskyrimas ir morfologinis grupavimas

Mikroorganizmų išskyrimui, augalinė medžiaga buvo rinkta nuo dešimties *Pinus* genties augalų – keturių vietinių ir šešių introdukuotų. Buvo surinktos šakelės su pažeistais spygliais ir pumpurais. Pirmiausia tyrimas buvo atliekamas su augaline medžiaga surinkta Vilniaus botanikos sode Kairėnuose. Ten auga ne tik vietinė *Pinus sylvestris* rūšis, bet ir kitos introdukuotos rūšys. Tyrimo metu augalinė medžiaga mikroorganizmų išskyrimui buvo rinkta nuo šešių introdukuotų *Pinus* genties augalų: *Pinus mugo* 'Frisia'; *Pinus strobur*; *Pinus nigra*; *Pinus Banksiana* xp *contorta*; *Pinus ponderosa* var. *scopulorum* ir *Pinus parviflora* 'Glauca' bei vietinės *Pinus sylvestris* rūšies. Iš šių rūšių išskirta 229 grynos grybų kultūros. Kairėnuose daugiausiai izoliatų ir morfograpių buvo aptikta ant vietinės *Pinus sylvestris* rūšies, ant kitų rūšių tiek izoliatų, tiek morfograpių buvo aptikta mažiau (13 pav.).



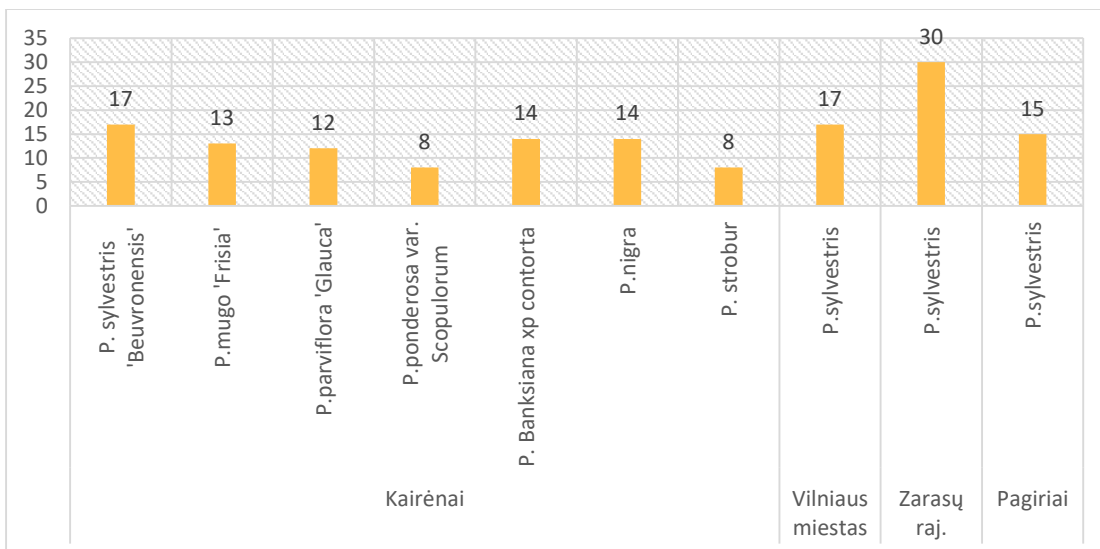
13 pav. Izoliatų ir morfograpių skaičius išskirtas iš Vilniaus Botanikos sodo Kairėnuose

Vėliau augalinė medžiaga buvo rinkta dar trijose skirtingose vietovėse: Zarasų rajone, Vilniaus mieste ir Pagiriuose. Buvo palyginta, kiek izoliatų ir morfograpių išskirta iš vietinės *Pinus sylvestris* rūšies. Daugiausiai izoliatų iš *P. sylvestris* buvo išskirta Vilniaus botanikos sode Kairėnuose, nors palyginus su kitomis vietovėmis morfograpių ten buvo nedaug. Daugiausia morfograpių – 30, buvo aptikta Zarasų rajone, nutolus nuo miesto kelis kilometrus (14 pav.).



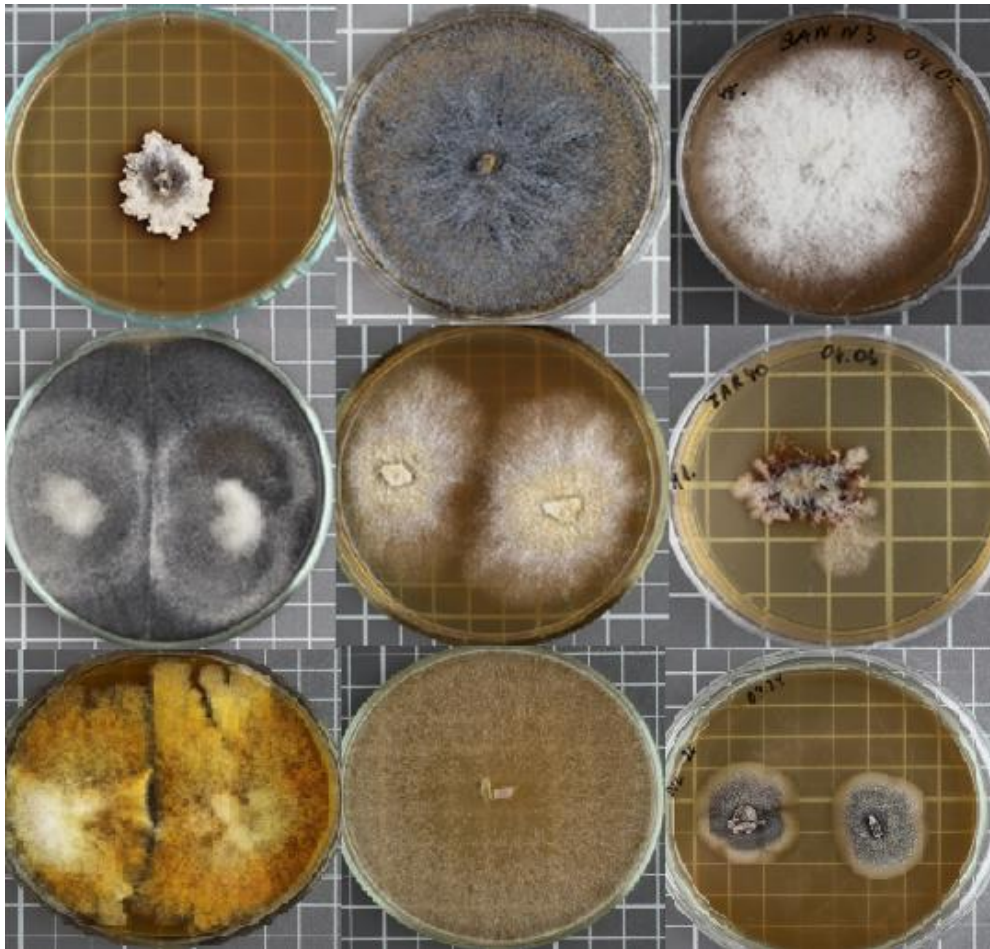
14 pav. Izoliatai išskirti iš *P. sylvestris* skirtingose vietovėse

Tyrimo metu nuo dešimties *Pinus* genties augalų iš viso išskirtos 344 grynai grybų izoliatai iš augalo spyglių, pumpurų ir šakelių. Morfo grupių suskaičiuota 75. Sudėjus visas tirtas pušų rūšis, tirtas skirtinguose vietovėse, buvo pastebėta, kad daugiausia morfo grupių aptikta Zarasų rajone – 30, mažiau Vilniaus mieste – 17. Mažiausia morfograpių aptikta Vilniaus universiteto botanikos sode Kairėnuose ant nevietinių *P. ponderosa* var. *scopulorum* ir *P. strobur* rūšių (15 pav.).



15 pav. Morfograpių įvairovė pagal vietovę

Visi išskirti izoliatai buvo suskirstytos į morfologines grupes. Pirmiausia kultūros buvo apžiūrimos ir surūšiuotos pagal kolonijos išvaizdą lėkštelėje ant terpės, buvo žiūrima kolonijos spalva ir augimas (16 pav.).

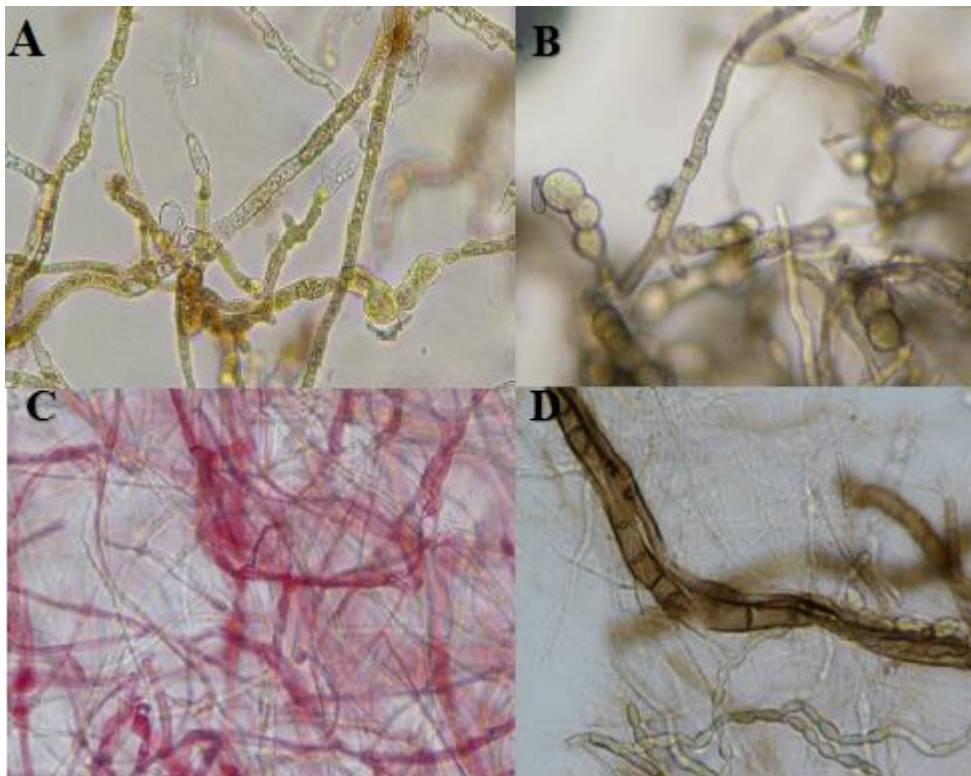


16 pav. Reprezentatyvūs morfo grupės atstovai

Tuomet visos kultūros buvo mikroskopuojamos ir rūšiuojamos pagal sporas, jeigu jos susiformavo (17 pav.), bet daugiausia izoliatai buvo grupuojami pagal hifus (18 pav.), kadangi sporų formavimuisi didžiajai daliai grybų reikia rūšiai specifinės terpės, o mes izoliatų grupavimui naudojome 2% MEA terpę, kuri tinkama daugelis rūšių grybų kultivavimui. Buvo atkreiptas dėmesys į hifų formą, praplatėjimus, spalvą, šakojimąsi, hifų pertvarėles jeigu jos buvo.



17 pav. A – aukšliai su aukšliasporėmis; B – sporos; C – konidiakotis su konidijomis. 40x priartinimas



18 pav. Kai kurių morfo grupių hifai: A – 11-ta morfo grupė; B – 51-ma morfo grupė; C – 9-ta morfo grupė; D – 36-ta morfo grupė. 40x padidinimas

Morfogrupės buvo sugrupuotos nuo 1 iki 75. Buvo stebėta, kokios morfogrupsės aptiktos pavienės, tai yra kiek morfogrupsės aptikta tik ant tam tikros rūšies *Pinus* augalo ir neaptikta ant kitų rūšių, 7-ntoje lentelėje tokios rūšys pažymėtos žalia spalva, pavyzdžiui: pirma morfo grupė aptikta tik ant *P. sylvestris* rūšies. Net 43 morfogrupsės iš 75 buvo aptiktos ant tam tikros *Pinus* rūšies ir nebuvo aptikta ant kitų, ypač rūšių įvairovė pasižymėjo vietinė *P. sylvestris* rūšis. Taip pat buvo stebėta, kokios morfogrupsės kartojosi tarp skirtingų rūšių

pušų, labiausiai kartojosi 36-ta morfo grupė, kuri aptikta ant visų tirtų *Pinus* genties augalų išskyrus *P. sylvestris* Zarasų rajone, kur buvo aptikta daugiausia morfograpių.

7 lentelė. Morfo grupių pasiskirstymas ant *Pinus* spp. augalų

Morfo grupė	Kairėnai							Vilniaus miestas	Zarasų raj.	Pagiriai
	<i>P. sylvestris</i> 'Beuvronensis'	<i>P. mugo</i> 'Frisia'	<i>P. parviflora</i> 'Glauca'	<i>P. ponderosa</i> var. <i>Scopulorum</i>	<i>P. Banksiana</i> x <i>contorta</i>	<i>P. nigra</i>	<i>P. strobur</i>			
1	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0
2	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0
4	0	0	0	0	0	0	1	2	0	1
5	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
7	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	2	0	0	2	4	2	0	4	2	0
9	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
11	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
12	0	0	0	0	0	0	0	4	0	1
13	1	0	0	0	1	0	0	0		0
14	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0
15	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1
17	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
19	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0
21	1	1	2	0	0	0	1	0	1	0
22	2	3	1	0	0	0	0	0	0	1
23	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
26	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
27	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
28	0	0	5	0	0	1	0	0	0	0
29	0	0	0	0	1		0	0	0	0
30	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
31	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
32	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0
33	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0
34	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0

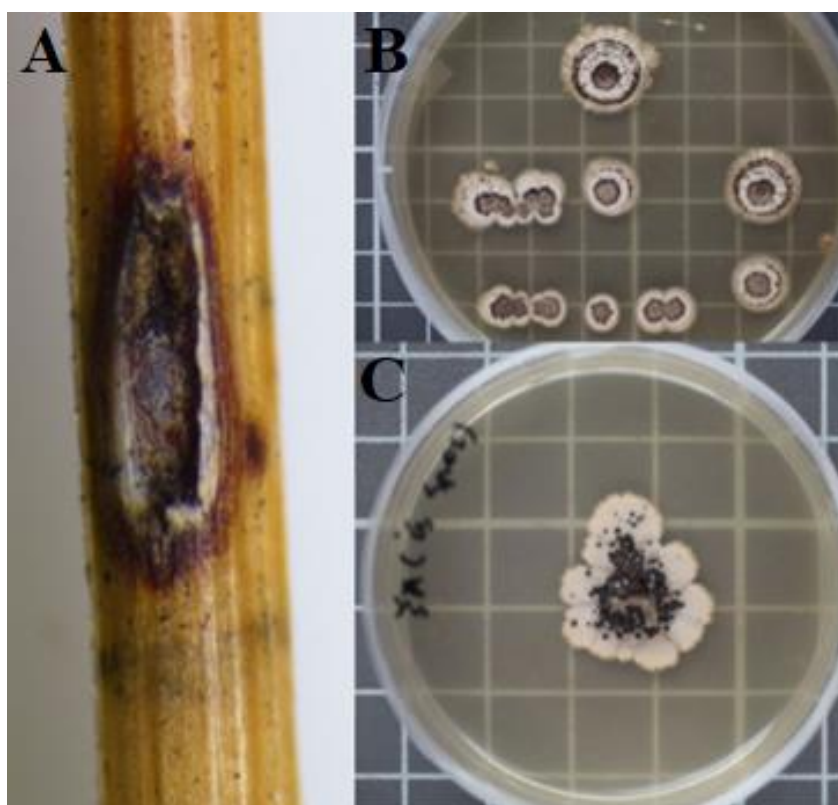
7 lentelė (tęsinys).

35	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
36	19	19	7	24	16	7	13	2	0	4
37	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
38	1	0	0	0	0	0	2	2	0	4
39	0	2	0	2	0	0	0	1	1	0
40	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
41	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
42	0	0	0	0	0	1	0	2	1	9
43	0	2	0	0	1	0	2	0	1	0
44	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
45	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
46	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
47	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0
48	0	0	1	0	0	0	0	0	2	1
49	0	0	0	0	0	0	0	4	0	2
50	2	1	0	0	0	2	0		0	0
51	2	0	0	0	0	0	0	1	0	0
52	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0
53	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
54	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
55	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
56	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
57	13	0	0	0	0	0	0	0	1	0
58	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0
59	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
60	0	1	7	2	0	1	1	0	0	0
61	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0
62	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
63	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0
64	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
65	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
66	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
67	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
68	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
69	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0
70	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
71	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
72	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
73	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
74	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
75	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0

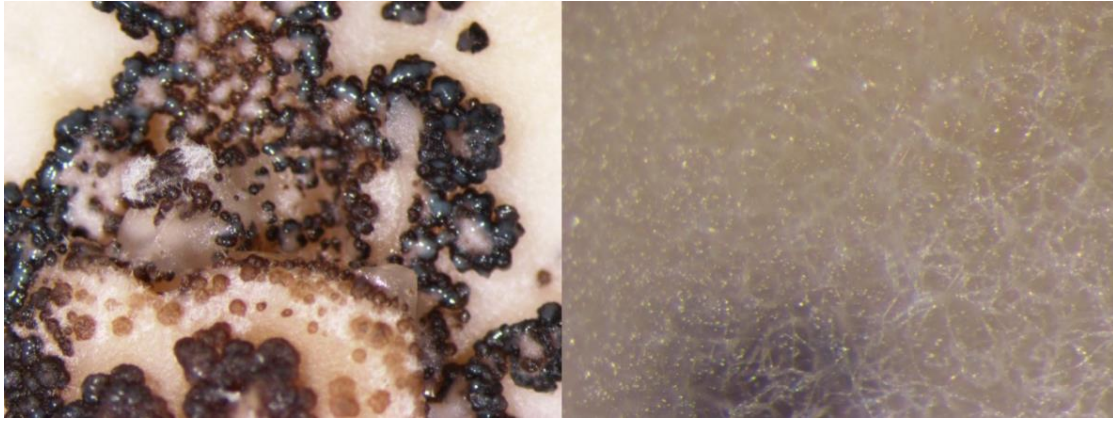
3.3 Morfologinis patogenų identifikavimas

Grupuoiant grybus į morfologines grupes, 72 grupės buvo priskirtos endofitams – nepatogeniniams izoliatams, o 3 grupės priskirtos ligos sukelėjams, nes morfologiškai buvo panašūs į patogenus. Tyrimo metu morfologiškai iki genties buvo identifikuota trys patogenai: *Lophodermium* sp., *Fusarium* sp. ir *Neocatenulostroma* sp.

Pagal simptomus ant spyglio ir grybo kolonijos išvaizdą, lėtą augimo greitį (19 pav.), morfologiškai buvo identifikuotas *Lophodermium* sp. patogenas. Taip pat mikroskopuojant išmatuoti grybo hifų storis – 2,5-3,2 μm (20 pav.). Šis grybas buvo išskirtas iš vietinės *Pinus sylvestris* rūšies Pagiriuose. Kad nustatyti, kokia būtent rūšis buvo išskirta, reikia atlikti tolimesnius molekulinis tyrimus.

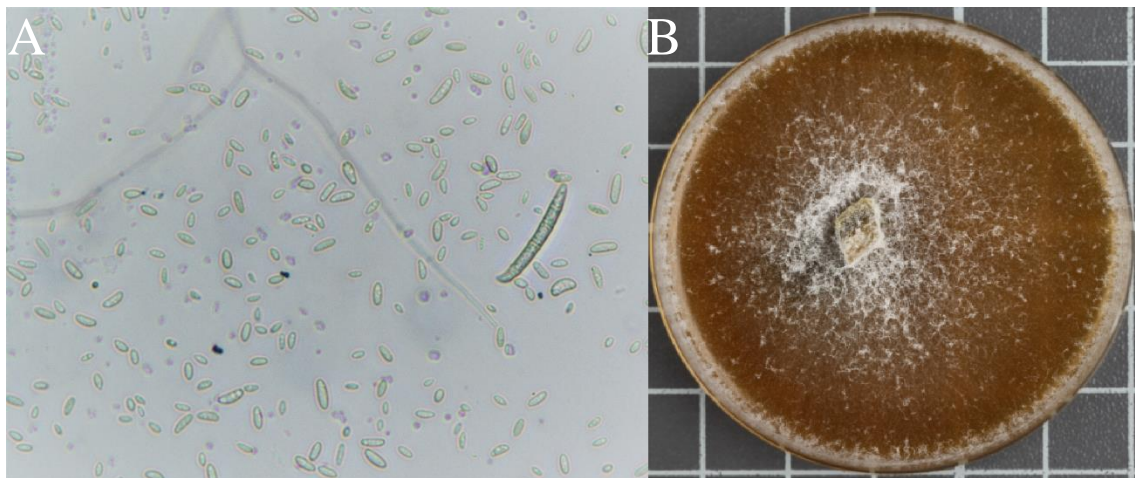


19 pav. A – patogeno pažeistas spyglys; B – iš sporų suspensijos užaugusios *Lophodermium* spp. kultūros; C – Persėta *Lophodermium* spp. kultūra



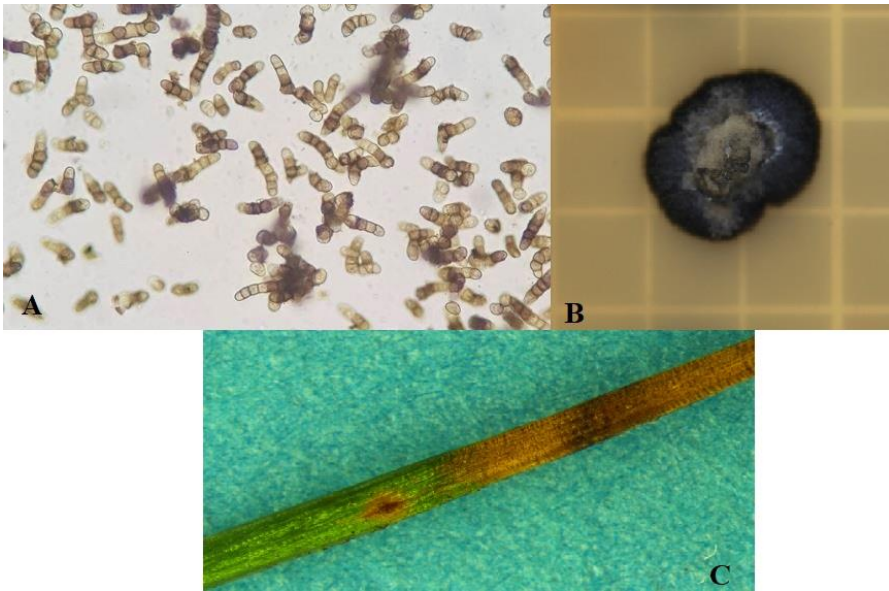
20 pav. *Lophodermium* spp. kultūra, 10x padidimas

Mikroskopuojant izoliatą JS9 buvo pastebėta, kad šio mikroskopinio grybo sporos panašios į *Fusarium* spp. patogeno. Buvo matomos grybo mikro ir makro konidijos (21 pav.). Buvo išmatuota konidijų ilgiai: mikrokonidijų ilgis siekė 7,5-12,5 μm , o makrokonidijų ilgis siekė 35-45 μm . Pagal morfologiją gentis labai panaši į *Fusarium oxysporum* (Teixeira et al., 2017; Fovo, 2017), bet rūšiai patvirtinti reikia atlikti molekulinis tyrimus. Izoliatas buvo išskirtas iš vietinės rūšie *Pinus sylvestris* pušies spyglio, kuris neturėjo ligos simptomų.



21 pav. A – grybo mikro ir makro konidijos (40x); B – gryna dviejų savaičių kultūra ant 2% MEA terpės.

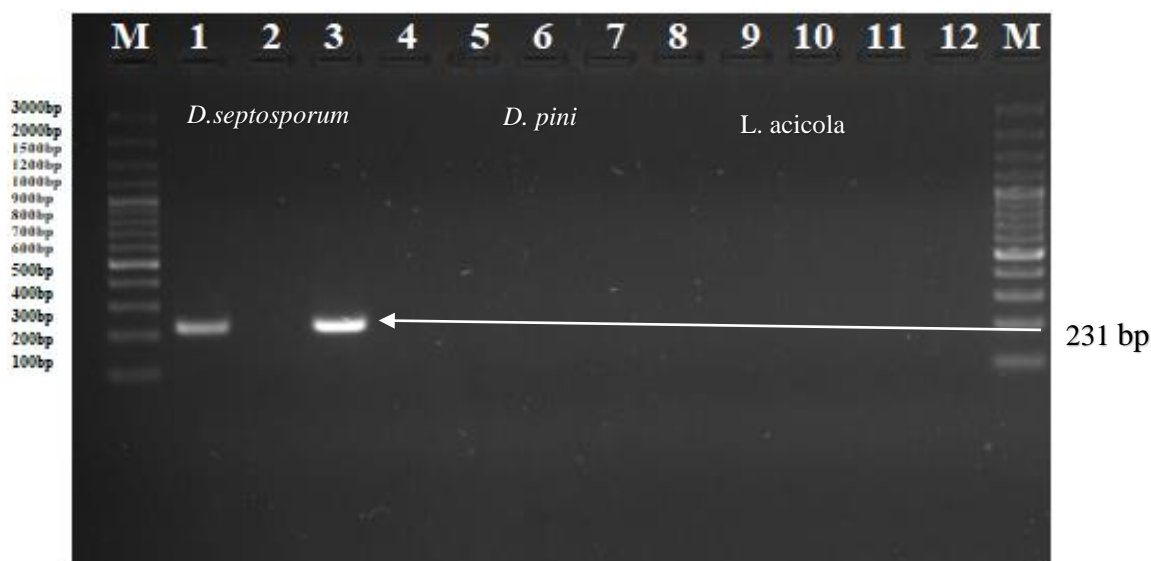
Taip pat buvo rasti izoliatai, morfologiškai labai panašūs į *Neocatenulostroma germanicum* patogeną, išskirta iš spyglių su simptomais panašiais į *Dothistroma* spp. ir *Lecanosticta acicola* patogenų sukeltas ligas (22 pav.) (Markovskaja et al., 2016). Šis patogenas pasižymėjo lėtu augimo greičiu ant terpės.



22 pav. A – grybo konidiasporos (40x), B – gryna trijų savaitių laiko kultūra ant 2% MEA terpės, C – patogeno pažeistas spyglys

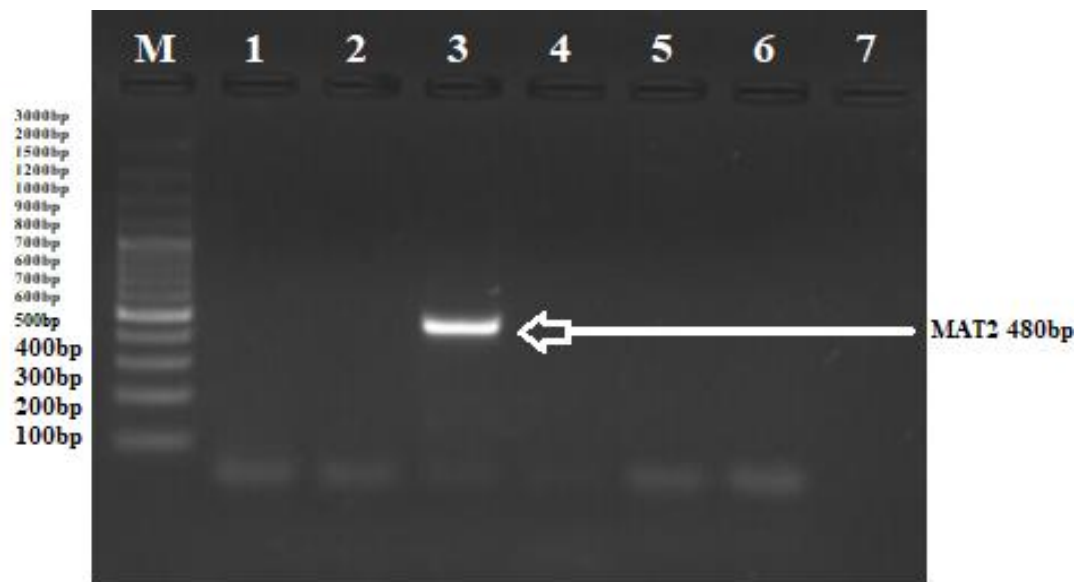
3.4 Molekulinis *Dothistroma* spp. identifikavimas

Tyrimo metu, buvo rasti pušų spygliai su simptomais panašiais į patogenų *D. septosporum*, *D. pini* ir *Lecanosticta acicola*. Kadangi pagal simptomatiką šias rūšis atskirti labai sunku, buvo atlikta polimerazės grandininė reakcija, su šioms rūšims specifiniais pradmenimis. Atlikus PGR reakciją buvo identifikuoti du *D. septosporum* izoliatai, kurie turėjo 231 bp produktus (23 pav.).



23 pav. Tiriamų izoliatų DNR polimerazinė grandininė reakcija (PGR) 1,5% agaroziniame gelyje (M – markeris; 1-3 reakcijos mišiniai su *D. septosporum* specifiniais pradmenimis; 5-7 reakcijos mišiniai su *D. pini* specifiniais pradmenimis; 9-11 reakcijos mišiniai su *L. acicola* specifiniais pradmenimis; 4,8 ir 12 – neigiama kontrolė

Iš penkių tiriamų mėginių, kurie buvo tikrinami su *D. septosporum* specifiniais pradmenimis, kurių taikiniai buvo lytinio suderinamumo (MAT) genai, buvo patvirtinta viena *D. septosporum* rūšis, kuri turėjo MAT2 geną. Atlikus PGR reakciją buvo gautas 480 bp produktas (24 pav.). Iki šiol Lietuvoje šie pradmenys nebuvo naudojami. Rūšis išskirta iš VU botanikos sodo *Pinus ponderosa* var. *scopulorum* pažeisto spyglio.

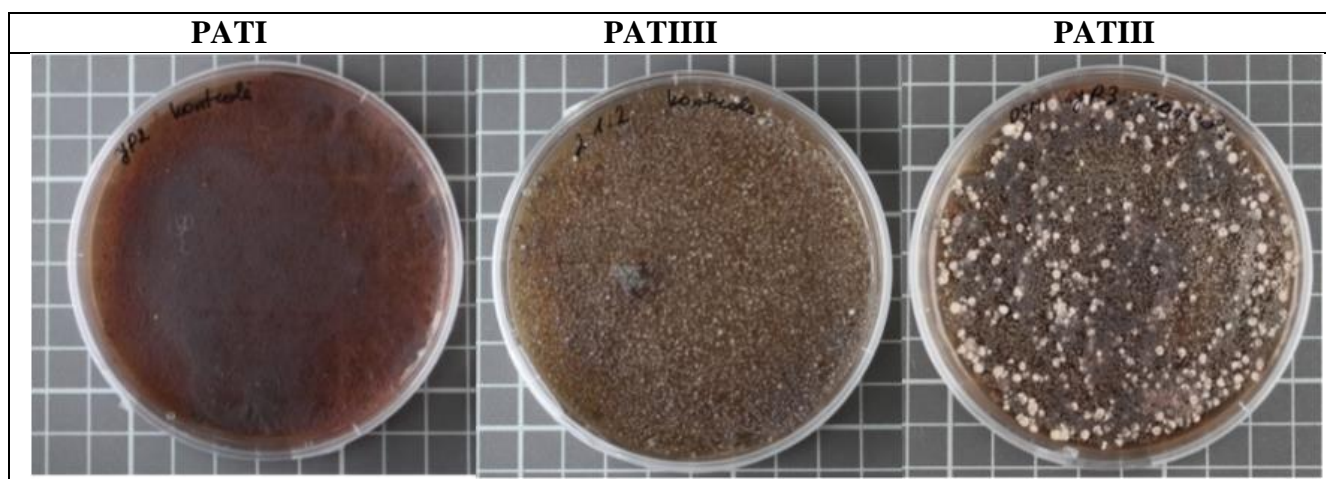


24 pav. Tiriamų izoliatų DNR polimerazinė grandininė reakcija (PGR) 1,5% agaroziniame gelyje (M – markeris; 5-6 – neigiama kontrolė; 1;2;4 – pavyzdžiai, kuriuose neaptikta *D. septosporum* rūšis; 3 – aptikta *D. septosporum* rūšis

3.5 Antagonistinių savybių turinčių grybų atrinkimas

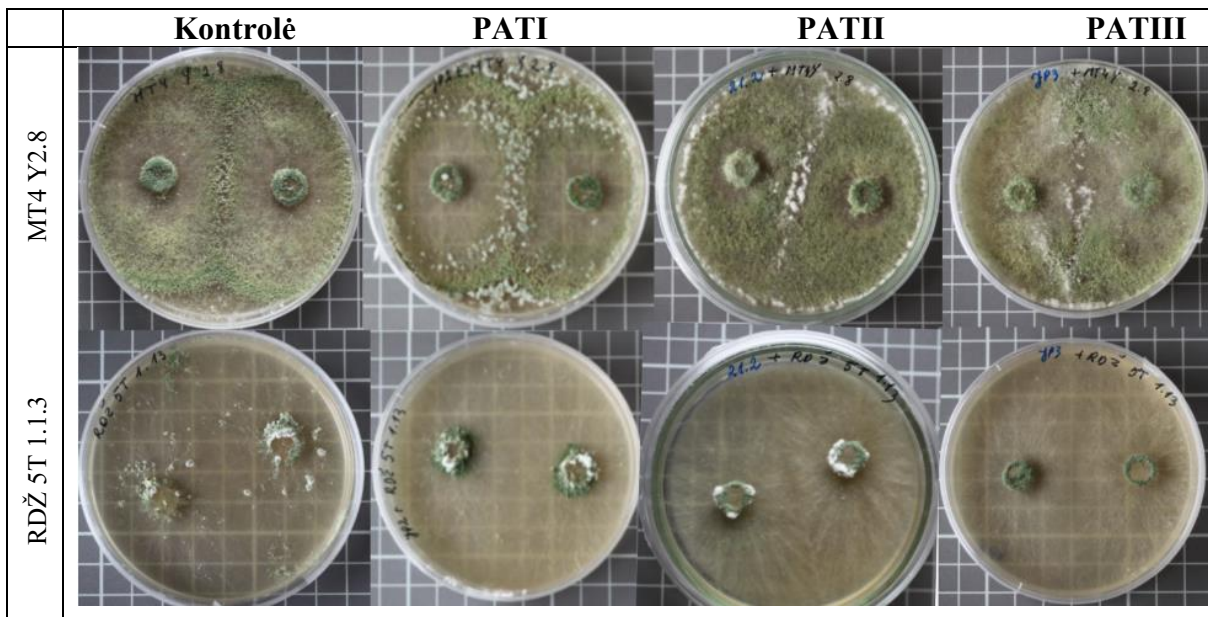
Antagonistinio poveikio tyrimas yra labai svarbus ieškant efektyvių ir natūralių priemonių augalų ligų, kurias sukelia patogeniniai grybai, kontrolei. Antagonistinių savybių tyrimas buvo atliekamas panaudojant *Pinus* genties augalus pažeidžiantį patogeninį grybą iš augalų patologijos laboratorijos kolekcijos. Antagonistinės savybės buvo tikrinamos su 78 nepatogeniniais grybais. 55 izoliatai buvo naudojami išskirti iš *Pinus* genties augalų, kurie buvo išskirti tyrimo metu, o 23 izoliatai buvo naudojami iš laboratorijos kolekcijos, su kuriais buvo anksčiau atlikti tyrimai, ir kurie parodė gerą antagonistinį poveikį prieš kitus patogenus.

Tyrimas buvo atliekamas su trimis patogenų izoliatais – PATI; PATII ir PATIII, išskirtais iš skirtingų vietovių. Kad galima būtų palyginti, ar tiriamas grybas turi antagonistinių savybių buvo naudojama teigiama kontrolė (25 pav.), lėkštelės buvo išglaištytos tik su patogenų sporomis.



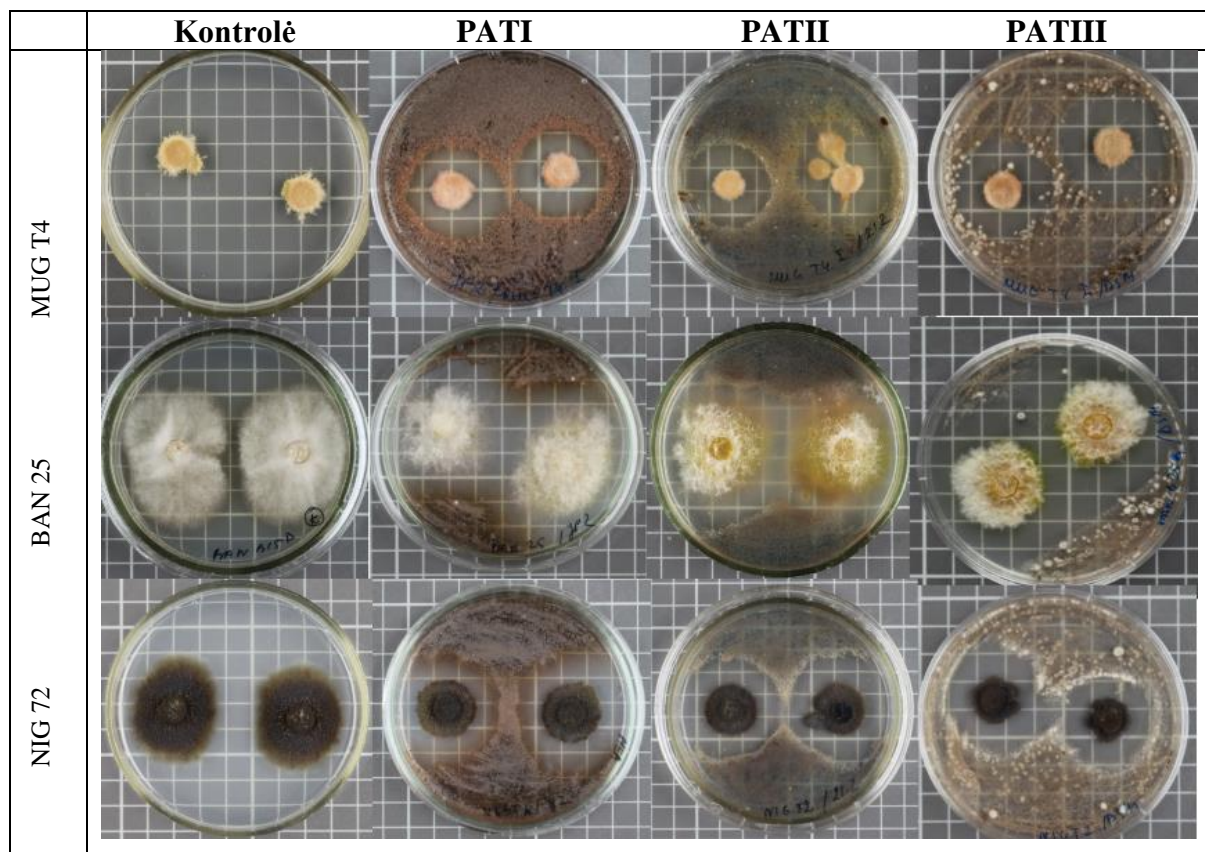
25 pav. Petri lėkštelės tik su patogenų kolonijomis išaugintomis iš sporų suspensijos

Atlikus tyrimą buvo nustatyti skirtingi grybų poveikiai patogeniniams grybams. Buvo rasti grybų izoliatai, kurie efektyviai stabdė patogeno augimą ir tokie, kurie nedarė jokio poveikio patogenų augimui, tokie grybų izoliatai buvo laikomi antagonistinių savybių neturinčiais. Tyrimo metu buvo rasta net **14** izoliatų, kurie visiškai stabdė patogenų augimą, ir po 14 – kos stebėjimo dienų nesimatė patogenų kolonijų lėkštelėse. Tokie izoliatai buvo laikomi ypač didelėmis antagonistinėmis savybėmis pasižyminčiais grybais (26 pav). Geriausiu antagonistiniu poveikiu pasižymėjo iš laboratorijos kolekcijos gauti izoliatai, kurie buvo priskirti *Trichoderma* spp. genčiai.



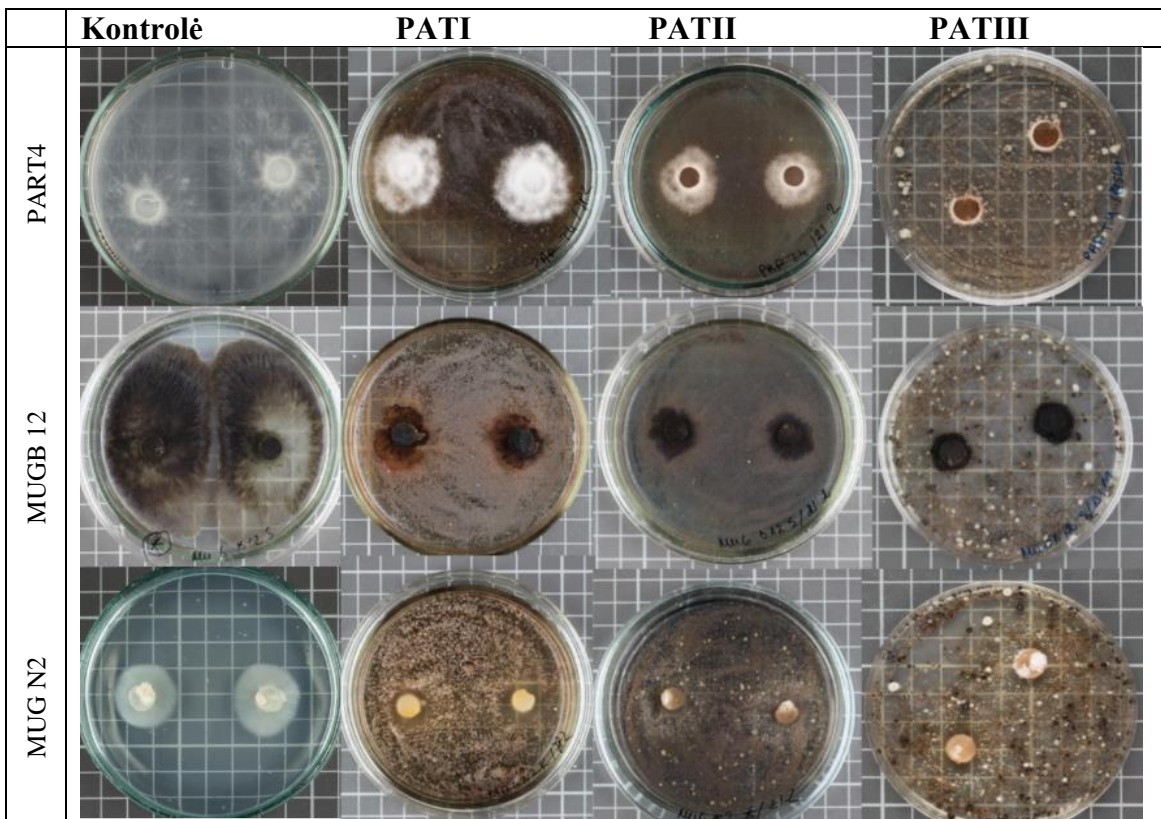
26 pav. Izoliatai, kurie visiškai sustabdė patogeno sporų formavimą

Eksperimento metu, pastebėta, kad kai kuriuose pavyzdžiuose patogenų kolonijos pasirodė, bet susidarė inhibicinės zonos. Tai reiškia, kad grybas pasižymėjo antagonistinėmis savybėmis, ir šalia savęs stabdė patogeno augimą. Pagal laboratorijoje paruoštą metodiką buvo apskaičiuota, kad tokių izoliatų buvo **10**, jie pasižymėjo vidutiniu antagonistiniu poveikiu. Inhibicinės zonos buvo $\geq 0,5$ mm. (27 pav.).



27 pav. Izoliatai, kurie turėjo vidutinį antagonistinį poveikį ir sudarė inhibicines zonas

Vienas izoliatas buvo paimtas iš laboratorijos kolekcijos, o devyni izoliatai išskirti iš *Pinus* genties augalų tyrimo metu. Trys izoliatai pasižymėję vidutiniu antagonistiniu poveikiu išskirti iš *Pinus mugo* „Frisia“ rūšies, du iš *Pinus banksiana xp contorta*, du iš *Pinus nigra* ir po vieną iš *Pinus nigra* ir *Pinus parviflora* 'Glauca' pušies rūšių, kurie buvo išskirti iš Vilniaus botanikos sodo Kairėnuose. 54 izoliatai neparodė antagonistinio poveikio – patogenas apaugo nepatogeninio grybo grybieną (28 pav.). Tokie izoliatai buvo laikomi antagonistinio poveikio neturinčiais.

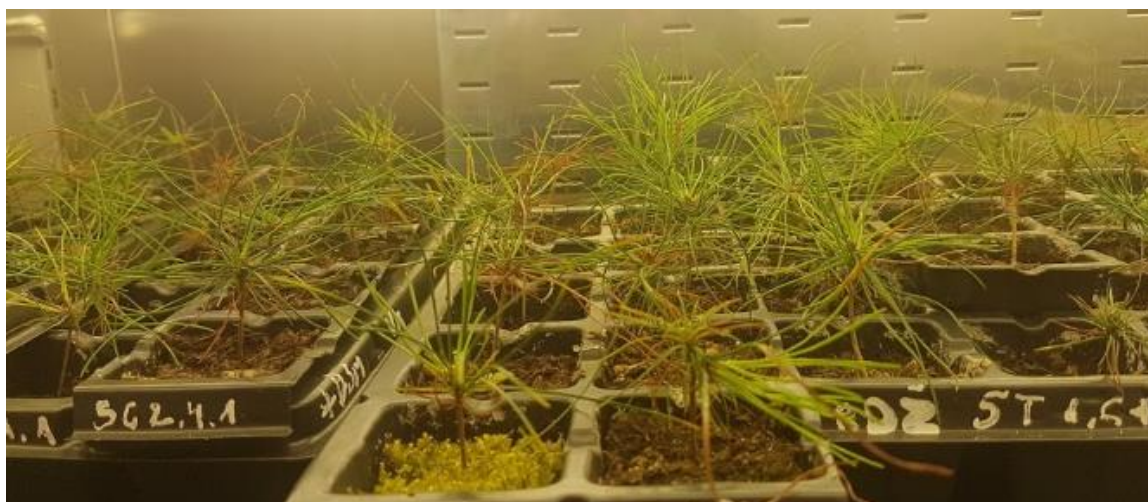


28 pav. Izoliatai, kurie neturėjo antagonistinio poveikio

Atlikus tyrimą buvo atrinkta 18% izoliatų, kurie pasižymėjo ypač aukštu antagonistiniu poveikiu, 13% izoliatų, kurie pasižymėjo vidutiniu poveikiu ir buvo atmesta 69% izoliatų, kurie nestabdė patogeno augimą. Geru ir vidutiniu antagonistiniu poveikiu pasižymėjusių grybų izoliatų DNR buvo išskirta ir paruošta sekoskaitai, rūšių patvirtinimui.

3.6 Pušų inokuliavimas ir antagonistinių savybių patikrinimas *in vivo*

Inokuliuojamus pušis patogeniniais ir nepatogeniniais izoliatais, pušys buvo nufotografuotos (29 pav.), kad galima būtų palyginti kai atsiras ligos simptomų. Ekperimento pradžioje pušų spygliai pažeisti nebuvo, matomų ligos simptomų taip pat nepastebėta.



29 pav. Eksperimento pradžia. Inokuliuotos pušys patogeniniais ir nepatogeniniais izoliatais

Pirmieji ligos simptomai pasirodė po 28 dienų ant PATII kontrolės pušies spyglių (30 pav.). Dar po 1-3 savaičių ligos simptomai pradėjo ryškėti ant kitų inokuliuotų pušų spyglių, jie pradėjo džiuoti, ruduoti, atsirado geltonos dėmės.



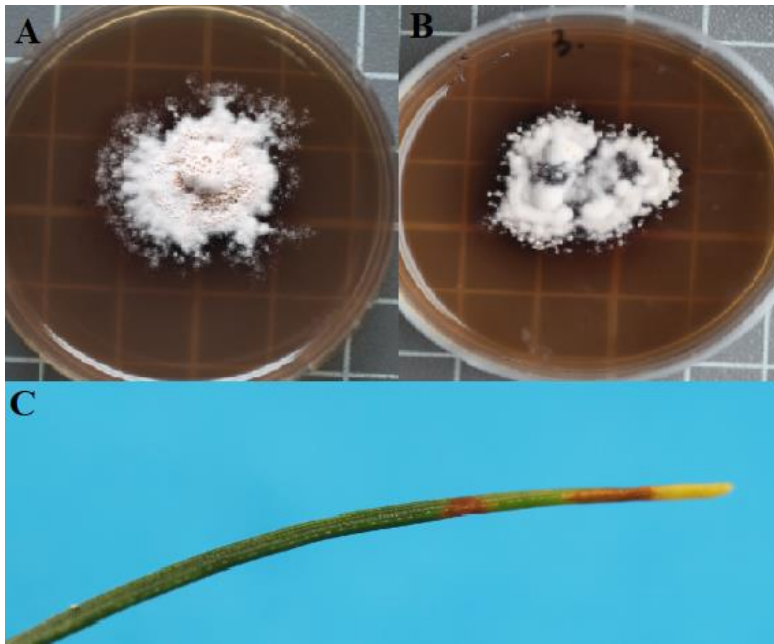
30 pav. Spygliaus pažeidimai ant inokuliuotos PATII pušies

Praėjus trims mėnesiams po inokuliavimo, visų pušų spygliai buvo suskaičiuoti ir buvo užfiksuota, kiek spyglių buvo nudžiūvusių, gyvų, pažeistų ir sveikų. Neigiama kontrolė, kuri nebuvo inokuliuota patogeno, turėjo mažiausiai pažeistų, be ligos simptomų spyglių – 27. Visi antagonistai *in vitro* pasižymėjo ypač geru antagonistiniu poveikiu stabdant patogeno augimą, bet eksperimentas *in vivo* parodė kitus rezultatus. Iš penkių antagonistų, praėjus trims mėnesiams geriausią rezultatą parodė 722 grybinis izoliatas, juo ir patogeno inokuliuotos pušys turėjo daugiausiai gyvų ir sveikų spyglių ir mažiausiai turėjo ligos simptomų (8 lentelė).

8 lentelė: Inokuliuotų pušų spyglių būklė po trijų mėnesių

	Nudžiuvę	Gyvi	Pažeisti	Sveiki
PATI				
PATI kontrolė	82	301	58	243
PATI + Pstn1	90	215	67	148
PATI + Rdž 5T 1.6	96	227	40	187
PATI +722	116	428	38	390
PATI + MT4Y2.9	96	330	39	291
PATI + SC 2.4.1	67	367	67	300
PATII				
PATII kontrolė	80	301	58	243
PATII + Pstn1	85	360	42	318
PATII + Rdž 5T 1.6	85	390	25	365
PATII + 722	80	341	29	312
PATII + MT4Y2.9	65	348	38	310
PATII + SC 2.4.1	76	252	40	212
Neigiama kontrolė				
	30	259	27	232

Tyrimo metu, remiantis Kocho postulatais, buvo įrodyta, kad tiriamas grybas yra patogenas. Po inokuliavimo patogeno sporomis, kuomet atsirado ligos simptomų – po 3-jų mėnesių, iš pažeisto spyglio buvo išskirta gryna patogeno kultūra, kuri atrodė taip pat kaip pradinė, iš kurios buvo gaminama sporų suspensiją pušų inokuliavimui (31 pav.).



31 pav. A – pradinė kultūra, iš kurios buvo gaminama sporų suspensija pušų inokuliavimui; B – gryna patogeno kultūra išskirta iš inokuliuoto, pažeisto augalo spyglio; C – pažeistas patogenų spyglių, iš kurio buvo išskirta gryna grybo kultūra

Praėjus penkiems mėnesiams po inokuliavimo patogenais, dauguma pušų nudžiuvo ir augalai visiškai žuvo (32 pav.).



32 pav. Pušys praėjus keturiems mėnesiams po inokuliavimo

Buvo skaičiuojama kiek gyvų (turėjo žalių spyglių) ir kiek negyvų (augalas visiškai sudžiuvo) pušų išliko (9 lentelė).

9 lentelė. Gyvų ir nudžiuvusių augalų skaičius eksperimento pabaigoje

	Gyvi augalai	Nudžiuvę augalai
PATI		
PATI kontrolė	1	9
PATI + Pstn1	0	10
PATI + Rdž 5T 1.6	2	8
PATI +722	1	9
PATI + MT4Y2.9	5	5
PATI + SC 2.4.1	2	8
PATII		
PATII kontrolė	2	8
PATII + Pstn1	0	10
PATII + Rdž 5T 1.6	2	8
PATII +722	2	8
PATII + MT4Y2.9	3	7
PATII + SC 2.4.1	4	6
Neigiama kontrolė	7	3

Labiausiai nukentėjo PATI ir PATII patogenais ir Pstn1 izoliatu apipurkštos pušys, po keturių mėnesių laiko šios pušys žuvo, spygliai visiškai nudžiuvo ir pradėjo kristi. Nors Pstn1 izoliatas *in vitro* parodė gerą antagonistinį poveikį, *in vivo* tyrimuose šis izolatas parodė blogus rezultatus ir neapsaugojo pušų nuo patogeno išpuolių. Taip pat daug pušų nudžiuvo kontrolinėse grupėse, kuriose pušys inokuliuotos buvo tik patogeno sporomis: PATI grupėje nudžiuvo 9 – nios pušys ir gyva liko tik viena, o PATII nudžiuvo ir žuvo 8 – nios pušys, o su žaliais spygliais liko 2. Daugiausia gyvų pušų liko kontrolinėje grupėje, kuri nebuvo paveikta patogenais, ten nudžiuvo tik 3 pušys iš 10 – ties.

4. Rezultatų aptarimas

Apie 300 000 augalų rūšių, augančių skirtingose žemės vietose, tampa endofitų šeimininkais (Strobel and Daisy, 2003). Endofitiniai grybai yra svarbūs biotechnologiniai įrankiai, nes jie gamina daug antrinių metabolitų, todėl labai svarbu ištirti endofitinių grybų įvairovę. Tyrimo metu iš *Pinus* genties augalų iš viso išskirta 344 grybų izoliatai, kurie priskirti 75-ioms morfogrupėms, dauguma iš jų buvo priskirtos endofitams, kurie nesukelia augalui ligos. Lietuvoje apie pušų endofitų tyrimus informacijos nėra, daugiau dėmesio skiriama pušų patogeniniams grybams tokiems kaip *Dothistroma* spp. ir *Lecanosticta acicola* (Markovskaja and Treigienė, 2009; Markovskaja et al., 2011; Raitelaitytė et al., 2017). Lenkijoje tris metus trukusiame tyrime ant *Pinus sylvestris* buvo išskirta net 3671 izoliatai, kuriuos priskyrė 86 endofitų rūšims (Kowalski., 1993). Dažniausiai tam tikrų šeimininkų grybiniai patogenai taip pat yra izoliuoti kaip endofitai. Tokie grybai paprastai nėra tarp gausiausių izoliatų (Torres and White, 2012). Tyrimo metu morfologiškai identifikavome tik 3 morfogrupes, kurias priskyrėme patogenams. Šiose morfogrupėse buvo tik po vieną izoliatą.

Vis daugėja pranešimų apie endofitus antagonistus, kurie apsaugo nuo patogenų daromos žalos. Tyrimo metu *in vitro* atrinkome 14 izoliatų, kurie visiškai stabdė patogeno augimą, šie izoliatai pagal morfologiją buvo priskirti *Trichoderma* spp. genčiai. Kadangi patogenas augo terpėje lėčiau, *Trichoderma* spp. dėl savo greito augimo ir išskirtų ekstralątelinių fermentų (Mishra, 2010) visiškai sustabdė patogeno augimą. Literatūroje aprašyta daug eksperimentų, kurių metu *Trichoderma* gentys stabdė patogenų augimą (Mishra, 2010; Bendahmane et al., 2012; Chen et al., 2016; Vieira et al., 2018; Maršalkienė et al., 2018; Dapkus et al., 2018). *Trichoderma* spp. grybų tyrimai atliekami ir Lietuvoje, dėl jų didelio potencialo ir panaudojimo. Jiems būdingas didelis fermentinis aktyvumas, mikoparazitizmas ir antagonizmas, nes jie efektyviai konkuruoja dėl mitybinių substratų su kitais mikroorganizmais. Lietuvoje geru antagonistiniu poveikiu pasižymėjo *T. hamatum* ir *T. viride* ir *T. harzianum* rūšys (Maršalkienė et al., 2018). Taip pat 2018 metais atliktuose tyrimuose, su patogenais, visos, išskyrus vieną, tirtos *Trichoderma* spp. rūšys pasižymėjo geru antagonistiniu poveikiu (Dapkus et al., 2018). Kad nustatytumėme *Trichoderma* rūšis, kurios tyrimo metu pasižymėjo geru antagonistiniu poveikiu reikia atlikti molekulinis tyrimus. Dar atrinkta 10 izoliatų, kurie taip pat neblogai stabdė patogeno augimą, jie sudarė inhibicines zonas. Šių izoliatų identifikavimui reikia atlikti molekulinis tyrimus, kad sužinotumėme gentį ir rūšį.

Atlikus PGR reakciją su *D. septosporum*, *D. pini* ir *L. acicola* specifiniais pradmenimis, buvo patvirtinta *D. septosporum* rūšis, specifiniais pradmenimis gausinant β -tubulino geno fragmentą. Lietuvoje jau buvo aptikta ši rūšis 2017 metais panaudojus šiuos specifinius pradmenis (Raitelaitytė et al., 2017). Kadangi *D. septosporum* yra heterotalinis organizmas, buvo įdomu sužinoti, kokį lytinio suderinamumo tipą MATI ar MATII turi tyrimo metu išskirtas patogenas. Buvo atlikta PGR reakcija su *D. septosporum* MATI ir MATII specifiniais pradmenimis. Nustatyta, kad išskirtas patogenas turi MATII lytinio suderinamumo tipą. Lietuvoje dar nėra paskelbta duomenų su atliktais *D. septosporum* lytinio suderinamumo tipais. Pirmieji tyrimai buvo atlikti 2007 metais kurių metu buvo lyginta šių genų paplitimas pagal šalis. Šio tyrimo metu buvo nustatyta, kad patogenas yra heterotalinis ir, kad vyktų lytinė reprodukcija, reikalingi abu lytinio suderinamumo tipai MATI ir MATII. Abu tipai buvo rasti Europoje (Lenkijoje, Austrijoje) ir Kanadoje, Pietų Afrikoje, Jungtinėje Karalystėje o tai padidina patogeno plitimą, nes gali daugintis tiek lytiniu tiek nelytiniu būdu, todėl šiose šalyse stebimas ligos progresavimas. Daugelis šalių buvo rastas tik MATII tipas – Čilė, Australija, Naujoji Zelandija, abiejų tipų nebuvimas galėtų paaiškinti, kad patogenas yra introdukuotas ir į kitas šalis pateko su užkrėsta augaline medžiaga, ir jeigu bus įvesta MATII tipas šiose šalyse, gali kilti rimtų problemų ir liga gali tapti nekontroliuojama (Groenwald et al., 2007). Todėl labai svarbu atlikti daugiau tyrimų Lietuvoje ir išsiaiškinti ar abu lytinio suderinamumo MATI ir MATII tipai egzistuoja.

Antagonistinio tyrimo metu *in vivo* buvo gauti ne visai tokie rezultatai, kurių buvo tikimasi, nes po penkių mėnesių inokuliavimo žuvo beveik visos pušys, tiek inokuliuotos tik patogenais, tiek inokuliuotos patogenais ir antagonistais. Ypač blogus rezultatus parodė Pstn1 antagonistu inokuliuotos pušys, nes tiek su PATI ir Pstn1, tiek su PATII ir Pstn1 inokuliuotos pušys žuvo 100%, tai rodo, kad tiriamas patogenas pasižymėjo labai dideliu patogeniškumo laipsniu. Literatūroje rašoma, kad antagonistinis poveikis, kurį kai kurie grybai parodė patogenams dirbtinės kultūros terpėje, ne visada buvo palaikomi augale šeimininke. Todėl, nepaisant gerų rezultatų *in vitro*, manoma, kad būtent lauke, augalo natūralioje aplinkoje turi būti atliktas eksperimentas *in vivo*. (Martínez-Álvarez et al., 2016; Perry et al., 2016). Tyrimuose buvo pastebėta, kad inokuliuotus augalą pirmiau endofitu o tik po kurio laiko patogenais, kaip buvo atliekama ir šiame tyrime, antagonistinio poveikio nebuvo. Teigiami rezultatai buvo kuomet eksperimento metu pirmiau augalas buvo inokuliuotas patogenais, o po kelių dienų endofitu, arba vienu metu inokuliuojant augalą patogenais ir antagonistais, antagonistinis poveikis buvo geras (Wang et al., 2013; Adame Alvarez et al., 2014). Nors dauguma atliekamų tyrimų tiriant antagonistinį poveikį, pirmiausia augalą inokuliuoja

endofitu, kad jis spėtų kolonizuoti augalo audinius ir neleistų vėliau patogeniui užimti jo nišos (Khastini et al., 2014; Martínez-Medina et al., 2014), pavyzdžiui Martínez-Medina ir kt. eksperimento metu tiriant *Trichoderma* antagonistinį poveikį prieš patogeną *Fusarium* sp., pirmiau augalus šeimininkus inokuliavo antagonistais ir tik po septynių savaičių augalus inokuliavo patogenais, jiems pavyko įrodyti, kad tiriami antagonistai *in vivo* pasižymėjo geru antagonistiniu poveikiu (Martínez-Medina et al., 2014). Todėl prieš atliekant eksperimentą *in vivo* reikia labai gerai išstudijuoti literatūrą, ir apgalvoti kokia metodika bus pasirinkta.

5. IŠVADOS

1. Iš septynių *Pinus* genties augalų rūšių išskirti 344 grynai grybų izoliatai.
2. Visi izoliatai sugrupuoti į 75 morfologines grupes, 72 kultūros priskiros endofitams, kurie nesukelia ligų, o 3 morfologinės grupės priskirtos patogenams.
3. Atlikta Polimerazės grandininė reakcija panaudojus *Dothistroma pini*, *Dothistroma septosporum* ir *Lecanosticta acicola* specifinius pradmenis ir identifikuota *Dothistroma septosporum* rūšis išskirta iš augalo pažeisto spyglio.
4. Atlikus antagonizmo tyrimus *in vitro* atrinkta 18% izoliatų, kurie pasižymėjo labai dideliu antagonistiniu poveikiu ir 13% izoliatų, kurie turėjo vidutinį antagonistinį poveikį. Tyrimo *in vivo* metu tiriami antagonistai neparodė gero rezultato, bet buvo patvirtinta, kad tiriamas grybas yra patogenas.

Magistrinio darbo santrauka

Endofitiniai grybai vieni iš labiausiai paplitusių augalų simbiotų ir aptinkami visuose augaluose. Vienas iš endofitų privalumų tai, kad nesukeldami augalui šeiminkui ligos, jie gali padėti apsiginti nuo patogenų išpuolių, tokie endofitai vadinami antagonistais. Lietuvoje auga tik viena *Pinus sylvestris* pušies rūšis. Pagal naujausius duomenis, net 1,5% pušų yra pažeisti grybiniais patogenais. Magistrinio darbo tikslas ištirti *Pinus* genties endofitus.

Tyrimo metu iš septynių *Pinus* genties augalų rūšių (*P. sylvestris*, *P. mugo* 'Frisia', *P. strobur*, *P. nigra*, *P. banksiana* xp *contorta*, *P. ponderosa* var. *scopulorum* ir *P. parviflora* 'Glauca') buvo išskirtos 344 grynos grybų kultūros, kurios mikroskopuojant suskirstytos į 75 morfologines grupes: 72 morfogrups buvo priskirtos endofitams, o 3 – patogenams.

Antagonistiniai tyrimai *in vitro* buvo atliekami su trim patogeniniais vienos rūšies izoliatais (PATI, PATII ir PATIII) išskirtais iš skirtingų vietų ir 78 nepatogeniniais izoliatais. Buvo atrinkta 14 izoliatų, kurie visiškai stabdė patogeno augimą, tokie izoliatai buvo laikomi dideliu antagonistiniu poveikiu pasižyminčiais, 10 izoliatų turėjo vidutinį poveikį, o 54 – jokie poveikio neturėjo iš viso. Tyrimams *in vivo* buvo pasirinkti 5 antagonistų izoliatai, kurie parodė gerą antagonistinį poveikį *in vitro*. Po penkių mėnesių beveik visos tiek patogenais, tiek antagonistais inokuliuotos pušys žuvo. Buvo įrodyta, kad tiriamas grybas yra patogenas remiantis Kocho postulatais.

Master Thesis SUMMARY

Endophytes are found in all plants, they are plant-associated microorganisms that colonize and live the part of their life cycle within a plant without causing harm or disease to their host. Only one species of *Pinus sylvestris* pine grows in Lithuania. According to the latest data, even 1.5% of pine trees are damaged by fungal pathogens.

2018 plant material from native and introduced trees of seven species of *Pinus* (*P. sylvestris*, *P. mugo* 'Frisia', *P. strobur*, *P. nigra*, *P. banksiana* x *P. contorta*, *P. ponderosa* var. *scopulorum* and *P. parviflora* 'Glauca') was selected. During the study, 344 fungal isolates were obtained, which were divided into 75 morphogroups – 73 morphogroups were attributed to the endophytic fungi and 3 morphogroups were classified as pathogens. 54 fungal isolates obtained from *Pinus* spp. and 24 fungal isolates from Laboratory of Plant Pathology (Nature Research Centre, Vilnius) collection for antagonistic activity against fungal pathogens PATI, PATII and PATIII were investigated. 14 out of 78 isolates had a high antagonistic effect, 10 isolates had a middle effect, and 54 isolates had no effect. The study *in vivo* showed that all pines that were inoculated with pathogenic fungi and 5 antagonists died five months later.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Adame-A´lvarez R.M., Mendiola-Soto J., Heil M., 2014. Order of arrival shifts endophyte-pathogen interactions in bean from resistance induction to disease facilitation. *FEMS Microbiol Lett*, 355: 100–107.
2. Belova O., Milišauskas Z., Padaiga V., Valenta V., Vasiliauskas A., Zolubas P., Žiogas A., 2000. Miško apsaugos vadovas. Kaunas.
3. Bendahmane B. S., Mahiout D., Benzohra, I. E., Benkada, M. Y., 2012. Antagonism of three *Trichoderma* species against *Botrytis fabae* and *B. cinerea*, the causal agents of chocolate spot of faba bean (*Vicia faba* L.) in Algeria. *World Applied Sciences Journal*, 17: 78–283.
4. Bezos D., Martínez A. P., Fernandez F. M. M., 2017. Epidemiology and management of pine pitch canker disease in Europe. *Baltic Forestry*, 23: 279-293.
5. Bulman L. D., Margaret J. G., McDougal R., Schwelm R., Bradshaw A.R., 2013. Dothistroma needle blight. *Infectious Forest Diseases*, 436-457.
6. Burgess T. I, Crous C.J, Slippers B., Wingfield M.J., 2016. Tree invasions and biosecurity: eco-evolutionary dynamics of hitchhiking fungi. *AoB Plants* 8: plw076.
7. Burns R. M., Honkala B. H., 1990. *Silvics of North America*, Vol. 1, Conifers. Washington DC: U.S.D.A. Forest Service Agriculture Handbook. 654.
8. Busby E., Ridout M., Newcombe G., 2016. Fungal endophytes: modifiers of plant disease. *Plant Molecular Biology* 90(6): 645–655.
9. Bužinskas L., Danusevičius D., 2018. Pietinių paprastosios pušies (*Pinus sylvestris* L.) perkėlimo efektas Lietuvos klimato sąlygomis. *Žemės ūkio mokslai*. Nr. 1: 27–42.
10. Carlisle A. and Brown A. H. F., 1968. *Pinus sylvestris* L. *Journal of Ecology*, 56, 269-307.
11. Caudullo G., Welk E., San-Miguel-Ayanz J., 2017. Chorological maps for the main European woody species. *Data in Brief* 12: 662-666.
12. Chen J. L., Sun S. Z, Miao C. P., Wu K., Chen Y. W, Xu L. H, Guan H. L., Zhao L. X., 2016. Endophytic *Trichoderma gamsii* YIM PH30019: a promising biocontrol agent with hyperosmolar, mycoparasitism, and antagonistic activities of induced volatile organic compounds on root-rot pathogenic fungi of *Panax notoginseng*. *J Ginseng Res.*, 40(4): 315-324.

13. Dabkevičius Z., Vasiliauskas A., Žiogas A., 2006. Miško fitopatologija.. Kaunas: Lututė.
14. Danusevičius J., 2000. Pušies selekcija: kilmių atranka, introdukcija, hibridizacija, selekcinė sėklininkystė. Kaunas: Lututė. P. 352.
15. Dapkus S., Raudonienė V., Bridžiuvienė D., Švedienė J., 2018. *Trichoderma* genties grybų fermentinis aktyvumas ir įtaka fitopatogeniniams mikroorganizmams. Žmogaus ir gamtos sauga, 134-137.
16. De Bary A., 1866. Morphologie und physiologie der Pilze. Flechten und Myxomyceten. Engelmann, Leipzig.
17. De Silva D. D., Crous P. W., Ades P. K., Hyde K. D., Taylor P. W. J., 2017. Life styles of Colletotrichum species and implications for plant biosecurity. Fungal Biology Reviews, 31: 155-168.
18. Deacon J. W., 2006. Fungal Biology. Institute of cell and molecular biology, University of Edinburgh, UK.
19. Desprez-Loustau M. L., Robin C., Reynaud G., Déqué M., Badeau V., Piou D., Husson C., Marçais B., 2007. Simulating the effects of a climate-change scenario on the geographical range and activity of forest-pathogenic fungi. Plant Pathology, 29(2): 101-120.
20. Diwani S. A., Millar C. S., 1987. Pathogenicity of three *Lophodermium* species on *Pinus sylvestris* L. Forest Pathology, 17(1): 53-58.
21. Durrant H., De Rigo T., Coudullo G., 2016. *Pinus sylvestris* in Europe: distribution, habitat, usage and threats. European Atlas of Forest Tree Species
22. Dvořák M., Drapela K., Jankovsky L., 2012. *Dothistroma septosporum*: Spore production and weather conditions. Forest Systems, 21(1).
23. Dwinell L. D., Fraedrich Stephen W., Adams D., 2001. Diseases of pines caused by the pitch canker fungus. Paul E. Nelson Memorial Symposium: 225-232.
24. EPPO Bulletin. PM 7/46 (3) *Lecanosticta acicola* (formerly *Mycosphaerella dearnessii*), *Dothistroma septosporum* (formerly *Mycosphaerella pini*) and *Dothistroma pini*. 2015; 45(2): 163–82.
25. Fabre B., Piou D., Desprez-Loustau M., Marçais B., 2011. Can the emergence of pine Diplodia shoot blight in France be explained by changes in pathogen pressure linked to climate change? Global Change Biology, 17: 3218–3227.
26. Fovo J. D., 2017. Influence of culture media and temperature on growth and sporulation of *Lasiodiplodia theobromae*, *Pestalotiopsis microspora* and *Fusarium*

- oxysporum* isolated from *ricinodendron heudelotii* in Cameroon. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 6(6): 3098-3112.
27. Fraser A. J., Heitman J., 2003. Fungal mating-type loci. Current biology, 13(20): 792-795.
 28. Ganley R. J, Newcombe G., 2006. Fungal endophytes in seeds and needles of *Pinus monticola*. Mycological Research 110: 318–327.
 29. Gernandt S., López D. G., García O. G., Aaron S. L., 2005. Phylogeny and classification of *Pinus*. Taxon. 54. 29.
 30. Ghelardini L., Luchi N., Pecori F., Pepori A. L, Danti R., Della Rocca G., Capretti P., Tsopeles P., Santini, A., 2017. Ecology of invasive forest pathogens. Biological invasions, 19(11): 3183-3200.
 31. *Gibberella circinata*. EPPO Bulletin, 2009. PM 7/91(1): 39: 298-309.
 32. Górzyńska K., Węgrzyn E., Sandecki R., Lembicz M., 2019. Endophytic fungi and latent pathogens in the sedge *Carex secalina* (*Cyperaceae*), a critically endangered species in Europe. Plant Protect. Sci., 55: 102–108.
 33. Groenewald M., Barnes I., Bradshaw R. E., Brown A. V., Dale A., Johannes Z. Groenewald J. Z., Lewis K. J., Wingfield B. D., Wingfield M. J., Crous P. W., 2007. Characterization and Distribution of Mating Type Genes in the Dothistroma Needle Blight Pathogens. Phytopathology, 97(7): 825-834.
 34. Groenewald M., Groenewald J. Z., Harrington T. C., Abeln E. C. A., Crous, P. W., 2006. Mating type gene analysis in apparently asexual *Cercospora* species is suggestive of cryptic sex. Fungal Genet. Biol., 43: 813-825.
 35. Hanso M., Drenkhan R., 2011. Lophodermium needle cast, insect defoliation and growth responses of young Scots pines in Estonia. Forest Pathology, 42: 124–135.
 36. Ioos R., Fabre B., Saurat C., Fourrier C., Frey P., Marçais, B., 2010. Development, composition, and validation of real-time and conventional PCR tools for the detection of the fungal pathogens causing brown spot and red band needle blight of pine. Phytopathology 100 (1): 105-114.
 37. Jactel H., Petit J., Desprez – Loustau M., Delzon S. , Piou D., Battisti A., Koricheva J., 2012. Drought effects on damage by forest insects and pathogens: a meta-analysis. Glob. Change Biol., 18: 267-276.
 38. Jankowiak R., 2006. Fungi associated with *Tomicus piniperda* in Poland and assessment of their virulence using Scots pine seedlings. Annals of Forest Science, Springer Verlag/EDP Sciences, 63 (7): 801-808.

39. Jiang S., Qian D., Yang N., Tao J., Duan J., 2013. Biodiversity and antimicrobial Activity of endophytic fungi in *Angelica sinensis*. Chinese Herbal Medicines, 5(4): 264-271.
40. Jin-Lian C., Shi-Zhong S., Cui-Ping M., Kai W., You-Wei C., Li-Hua X., Hui-Lin G., Li-Xing Z., 2016. Endophytic *Trichoderma gamsii* YIM PH30019: a promising biocontrol agent with hyperosmolar, mycoparasitism, and antagonistic activities of induced volatile organic compounds on root-rot pathogenic fungi of *Panax notoginseng*, Journal of Ginseng Research, 40(4): 315-324.
41. Jones J. D. and Dangl J. L., 2006. The plant immune system. Nature, 16 (444): 323–329.
42. Jones S.G., 1935. The structure of *Lophodermium pinastri*. Annals of Botany, 49(196): 699-728.
43. Karazija S., 2007. Miško ekologija. Enciklopedija, Valiulio Leidykla.
44. Kowalski T., 1993. Fungi in living symptomless needles of *Pinus sylvestris* with respect to some observed disease processes. Journal of Phytopathology 139: 129–145.
45. Krakau U., Liesebach M., Aronrn T., Walter L. M. , Volker S. 2013. *Scots Pine (Pinus sylvestris L.)*. Forest tree breeding in Europe: Current state-of-the-art and Perspectives, 25.
46. 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 and Diversity: 1-32.
47. Le Maitre D. C., 2000. Pines in cultivation: A global view. In: Richardson DM (Ed) Ecology and Biogeography of *Pinus* Cambridge university Press, Cambridge, UK pp, 407-431.
48. Lelliott R. A, Stead D., 1987. Methods for the diagnosis of bacterial diseases of pants (Methods in Plant Pathology).
49. Lindner M., Maroschek M. , Netherer S. , Kremer A, Barbati A., Garcia-Gonzalo J., Seidl R., Delzon S., Corona P., Kolstro M., Lexer M. J., Marchetti M., 2010. Climate change impacts, adaptive capacity, and vulnerability of European forest ecosystems. Forest Ecology and Management, 259: 698–709.
50. Lofgren L. A., LeBlanc N. R., Certano A. K., Nachtigall J., LaBine K. M., Riddle J., Broz K., Dong Y. H., Bethan B., Kafer C. W., Kistler H. C., 2018. Fusarium

- graminearum: pathogen or endophyte of North American grasses? *New Phytologist*, 217: 1203-1212.
51. Lukošienė P. I., Kutorga E., 2014. Mikologijos laboratoriniai darbai / Mokomoji knyga. – Vilnius: Vilniaus universitetas, Vilniaus universiteto leidykla, 132 psl.
 52. Macpherson M. F., Kleczkowski A., Healey J. R., Quine C. P., Hanley N., 2017. The effects of invasive pests and pathogens on strategies for forest diversification. *Ecological modelling*, 350: 87–99.
 53. Macpherson M. F., Kleczkowski A., Healey J. R., Quine C. P., Hanleyd N., 2017. The effects of invasive pests and pathogens on strategies for forest diversification. *Ecol Modell*, 350: 87–99.
 54. Markovskaja S., Kačergius A., Davydenko K., Fraser S., Sieber T., 2016. First record of *Neocatenulostroma germanicum* on pines in Lithuania and Ukraine and its co-occurrence with *Dothistroma* spp. and other pathogens. *Forest Pathology*, 46(5): 522-533.
 55. Markovskaja S., Treigienė A., 2009. New data on invasive pathogenic fungus *Dothistroma septosporum* in Lithuania [Nauji duomenys apie invazinį patogeninį grybą *Dothistroma septosporum* Lietuvoje]. *Botanica Lithuanica*, 15(1): 41–45.
 56. Maršalkienė N., Savickaitė Š., Stankevičienė A., 2018. *Trichoderma* pers. ex fr. tyrimai Lietuvoje. *Scientific articles*, 9 (14): 28-36.
 57. Martinez-Medina A., Del Mar Alguacil M., Pascual J. A., Van Wees S. C. M., 2014. Phytohormone profiles induced by *Trichoderma* isolates correspond with their biocontrol and plant growthpromoting activity on melon plants. *J Chem Ecol* 40: 804–815.
 58. Mishra V. K., 2010. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against *Pythium aphanidermatum*. *Journal of Phytology*, 2: 28–35.
 59. Möller M. H., Stukenbrock E., 2017. Evolution and genome architecture in fungal plant pathogens. *Nature Reviews Microbiology*, 15: 756–771.
 60. Motiejūnaitė J., Markovskaja S., Kutorga E., Iršėnaitė R., Kasparavičius J., Kačergius A., Lygis V., 2017. Alien fungi in Lithuania: list of species, current status and trophic structure. *Botanica Lithuanica*, 23(2): 139–152.
 61. Mullett M. and Barnes I., 2012. *Dothistroma* isolation and molecular identification methods. Cost action FP1102.
 62. Navasaitis M., 2004. *Dendrologija*. Vilnius: Margi raštai, 855 p.

63. Nelson E.B. 1995. Identification of unknown turfgrass pathogens: Koch's Postulates. *Turfgrass Trends* 4(7): 11-12.
64. Nguyen D., Castagnyrol B., Bruelheide H., Bussotti F., Guyot V., Jactel H., Jaroszewicz B., Valladares F., Stenlid J., Boberg J., 2016. Fungal disease incidence along tree diversity gradients depends on latitude in European forests. *Ecology and Evolution*, 6 (8).
65. Nimali I. D. S., Siraprapa B., Saisamorn L., Hyde K. D., 2019. Use of endophytes as biocontrol agents. *Fungal Biology Reviews*, 33(2): 133-148.
66. Oliva J., Stenlid J., Grönkvist-Wichmann L., Wahlström K., Jonsson M., Drobyshev I., tenström E., 2016. Pathogen-induced defoliation of *Pinus sylvestris* leads to tree decline and death from secondary biotic factors. *Forest Ecology and Management*, 379: 273–280.
67. Oono R., Lutzoni F., Arnold A. E., Kaye L., U'Ren J. M., May G., Carbone I., 2014. Genetic variation in horizontally transmitted fungal endophytes of pine needles reveals population structure in cryptic species. *American Journal of Botany*, 101(8): 1362-1374.
68. Oszako T., Markovskaja S., Paulauskas A., Radzijeuskaja J., Raitelaitytė K., 2018. *Fusarium circinatum* research on *pinus sylvestris* of different provenances and interaction with other pine – inhabiting fungi. Abstracts book. Kaunas: Vytautas Magnus University: 172-172.
69. Ozolinčius R. 1998. Lietuvos spygliuočiai: morfologinės struktūros transformacijos bei jas indukuojantys veiksniai. Kaunas: Lututė. 298 p.
70. Parsa S., Ortiz V., Vega F.E., 2013. Establishing Fungal Entomopathogens as Endophytes: Towards Endophytic Biological Control. *J. Vis. Exp.* (74).
71. Perry A., Wachowiak W., Brown A. V., Ennos R. A., Cottrell J. E., Cavers S., 2016. Substantial heritable variation for susceptibility to *Dothistroma septosporum* within populations of native British Scots pine (*Pinus sylvestris*). *Plant Pathology*, 65(6): 987-996.
72. Petrini O., 1992. Fungal endophytes of tree leaves. *Microbial ecology of leaves*. New York: Springer-Verlag; 179-97.
73. Pileckis S., Valenta V., Vasiuliauskas A., Žuklys L., 1968. Svarbiausių miško medžių kenkėjai ir ligos. *Žemės ūkio mokslai*. Vilnius.
74. Poyatos R. M. V., Cermák J., Ceulemans J., Granier R., Irvine A., Köstner J., Lagergren B., Meiresonne F., Nadezhdina L., Zimmermann N., Llorens R.,

- Maurizio P. M., 2007. Plasticity in hydraulic architecture of Scots pine across Eurasia. *Oecologia*, 153: 245-59.
75. Pravdin L. F., (Правдин Л. Ф., 1964. Сосна обыкновенная. Изменчивость, внутривидовая систематика и селекция. М.: Наука, 191 с.).
76. Price R. A., Liston A., Strauss S. H., 1998. Phylogeny and systematics of *Pinus*. In: richardson, D.M., Ed., *Ecology and Biogeography of Pinus*, Cambridge University Press, Cambridge, 49-68.
77. Raja H. A, Miller A. N, Pearce C. J, Oberlies N. H., 2017. Fungal identification using molecular tools: a primer for the natural products research community. *J Nat Prod.*, 80(3): 756–770.
78. Rajamanikyam M., Vadlapudi V., Ramars A., Upadhyayula S. M., 2017. Endophytic fungi as novel resources of natural therapeutics. *Braz. arch. biol. technol.*, 60.
79. Reignoux S. N. A., Green S., Ennos R. A., 2014. Molecular identification and relative abundance of cryptic *Lophodermium* species in natural populations of Scots pine, *Pinus sylvestris* L. *Fungal biology*, 118(9-10): 835-45.
80. Rodriguez R. J, Henson J., Van Volkenburgh E., Hoy M., Wright L., Beckwith F., Kim Y-O, Redman R.S, 2008. Stress tolerance in plants via habitat – adapted symbiosis. *ISME J* 2: 404–416.
81. 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.
82. Santini A., Ghelardini L., De Pace C., Desprez-Loustau M. L., Capretti P., Chandelier A., Cech T., Chira D., Diamandis S., Gaitniekis T., Hantula J., Holdenrieder O., Jankovsky L., Jung T., Jurc D., Kirisits T., Kunca A., Lygis V., Malecka M., Marçais B., Schmitz S., Schumacher J., Solheim H., Solla A., Szabo I., Tsopelas P., Vannini A., Vettraino A. M., Webber J., Woodward S., Stenlid J., 2013. Biogeographical patterns and determinants of invasion by forest pathogens in Europe. *New Phytologist*, 197: 238–250.
83. Santos C. M, Ribeiro A. S, Garcia A., Polli A. D, Polonio J. C, Azevedo J. L, Pamphile J. A., 2019. Enzymatic and antagonist activity of endophytic fungi from *Sapindus saponaria* L. (Sapindaceae). *Acta biol. Colomb.*, 24(2): 322-330.
84. 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).

85. Sieber T., 2007. Endophytic fungi in forest trees: are they mutualists?. *Fungal Biology Reviews*, 21: 75-89.
86. Singh L. P, Gill S. S, Tuteja N., 2011. Unraveling the role of fungal symbionts in plant abiotic stress tolerance. *Plant Signal Behav.*, 6(2): 175–191.
87. Singleton L. L., Mihail J. D., Rush C. M., 1992. *Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi*. American Phytopathological Society, second Printing edition, 266.
88. Stefani F., Bérubé J. A., 2006. Biodiversity of foliar fungal endophytes in white spruce (*Picea glauca*) from southern Québec. *Canadian Journal of Botany*, 84(5): 777-790.
89. Stravinskas H., 2013. Prevencinės priemonės vė Šiaulių miškų urėdijos Vainagių medelyno sanitarinei būklei gerinti. Kauno miškų ir aplinkos inžinerijos kolegija, 16-26.
90. Strobel G. A., Daisy B., 2003. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology*, 67: 491-502.
91. Sturrock R. N., Frankel S. J., Brown A. V., Hennon P. E., Kliejunas J. T., Lewis K. J., Worrall J. J., Woods A. J., 2011. Climate change and forest diseases. *Plant Pathology*, 60: 133-149.
92. Šlapauskas V., Aniulytė G., Dastikaitė A., Pranaitis P., Ramanauskienė K., 1980. *Botanika ir mikrobiologijos pagrindai*. Vilnius, „Mokslas“.
93. Teixeira L. M, Coelho L., Tebaldi N. D., 2017. Characterization of *fusarium oxysporum* isolates and resistance of passion fruit genotypes to fusariosis. *Revista brasileira de fruticultura*, 39(3): e-415.
94. Terhonen E., Blumenstein K., Kovalchuk A., Asiegbu F.O., 2019. Forest Tree Microbiomes and Associated Fungal Endophytes: Functional Roles and Impact on Forest Health. *Forests*, 10(1): 42.
95. Torres M., White J., 2012. Endophytic Fungi. 10.13140/2.1.3835.2169.
96. Valstybinė miškų tarnyba, 2017. Lietuvos valstybinių miškų 2017 m. sanitarinės būklės apžvalga. Miško sanitarinės apsaugos skyrius: Kaunas, 82 p.
97. Vieira P., Zeilinger S., Brandão R., Vianna G., Georg R., Gruber S., Aragão F., Ulhoa, C., 2018. Overexpression of an aquaglyceroporin gene in the fungal biocontrol agent *Trichoderma harzianum* affects stress tolerance, pathogen antagonism and *Phaseolus vulgaris* development. *Biological control*, 126.

98. Wang Y. L., Liu S.Y., Mao X.Q., Zhang Z., Jiang, H., Chai R.Y., Qiu H.P., Wang J.Y., Du X.F., Li B., Sun G.C., 2013. Identification and characterization of rhizosphere fungal strain MF-91 antagonistic to rice blast and sheath blight pathogens. *J. Appl. Microbiol.*, 114: 1480–1490.
99. Wang Z., Nilsson H. R, James T. Y, Dai Y., Townsend J. P., 2016. Future Perspectives and Challenges of Fungal Systematics in the Age of Big Data. *Biology of Microfungi, Fungal Biology*.
100. White T. J., Bruns T., Lee S., Taylor J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics. *PCR - Protocols and Applications - A Laboratory Manual*: 315-322.
101. Windham M. T., 2009. Introduction to the groups of plant pathogens. *Plant Pathology Concepts and Laboratory Exercises*. 2nd edition. 11-17.
102. Woods A. J., Martin-Garcian J., Bulman L., Vasconcelos M. W., Boberg J., La Porta N., Peredo H., Vergarab G., Ahumada R., Brown A., Diez J. J., 2016. Dothistroma needle blight, weather and possible climatic triggers for the disease's recent emergence. *Forest Pathology*, 46: 443–452.
103. Хабибуллина Ф. М., 2007. Основы микробиологии и биотехнологии: сб. описаний лабораторных работ для подготовки дипломированного специалиста по направлению 656600 «Защита окружающей среды» спец. 280201 «Охрана окружающей среды и рациональное использование природных ресурсов» оч. и оч.-заоч. форм обуч. СЛИ. – Сыктывкар, 36.

Internetiniai šaltiniai:

104. EPPO A2 List of pests recommended for regulation as quarantine pests. Atnaujinta: 2018.09. Adresas: <https://www.eppo.int/QUARANTINE/listA2.htm> [žiūrėta 2019. 04. 10]
105. American conifer society. Adresas: <https://conifersociety.org/conifers/pinus-mugo> [žiūrėta 2019-05-10].
106. Flora of North America. Adresas: http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=1&taxon_id=233500948 [žiūrėta 2019. 04. 10].

107. Rimvydas Kareiva. Dubravos eksperimentinė mokomoji miškų urėdija.
Atnaujinta: 2014. 02. 07 13:33. Adresas: <http://www.dendrologai.lt/straipsniai/163-puys> [žiūrėta 2019-04-30].
108. *Lophodermium sur aiguilles* de *Pinus sylvestris*. Bernard Clesse. Atnaujinta:
2015. 01. 12 12:07. Adresas: <http://ascofrance.com/forum/39229/lophodermium-suraiguilles-de-pinus-sylvestris> [žiūrėta 2019-04-30]