



EESTI MAAÜLIKOOL
Metsandus- ja maaehitusinstituut

Marili Laas

**MÄNNI-PUDETÕVE TEKITAJA (*LOPHODERMIUM
SEDITIOSUM*) VARAJANE DIAGNOSTIKA**

**EARLY DIAGNOSTICS OF LOPHODERMIUM NEEDLE
CAST (*LOPHODERMIUM SEDITIOSUM*)**

Bakalaureusetöö

Loodusvarade kasutamise ja kaitse õppekaval

Juhendajad: doktorant Kalev Adamson, *MSc*

dotsent Rein Drenkhan, *PhD*

Tartu 2015

| | | | |
|---|---|---|------------|
| Eesti Maaülikool Kreutzwaldi 1, Tartu 51014 | | Bakalaureusetöö lühikokkuvõte | |
| Autor: Marili Laas | | Õppekava: Loodusvarade kasutamine ja kaitse | |
| Pealkiri: Männi-pudetõve tekitaja (<i>Lophodermium seeditiosum</i>) varajane diagnostika | | | |
| Lehekülgi: 45 | Jooniseid: 9 | Tabeleid: 5 | Lisasid: 2 |
| Osakond: | Metsakasvatust | | |
| Uurimisvaldkond: | metsapatoloogia | | |
| Juhendajad: | Kalev Adamson, <i>MSc</i> , Rein Drenkhan, <i>PhD</i> | | |
| Kaitsmiskoht ja aasta: | Tartu, 2015 | | |
| <p>Männi-pudetõbi on patogeense kottseene tõve-pigihuul (<i>Lophodermium seeditiosum</i>) tekitatud okkahaigus harilikul männil (<i>Pinus sylvestris</i> L.). Pika latentse perioodi ning hariliku männi okastel leiduvate pigihuule perekonna liikide (<i>L. seeditiosum</i>, <i>L. conigenum</i>, <i>L. pinastri</i>) viljakahade ja puhaskultuuride morfoloogilise sarnasuse tõttu on keeruline tuvastada okaste nakatumist tõve-pigihuulega.</p> <p>Lõputöö eesmärkideks oli (1) testida tõve-pigihuule varajaseks tuvastamiseks disainitud liigispetsiifilisi PCR praimereid ja hinnata nende sobivust kasutamiseks labortööl patogeeni kiireks ja usaldusväärseks tuvastamiseks, (2) testida <i>L. conigenum</i>'i ja <i>L. pinastri</i>'i liigispetsiifilisi DNA praimereid ja välja selgitada nende sobivus lähedaste liikide täpseks eristamiseks, (3) edasisteks uuringuteks isoleerida <i>L. seeditiosum</i> puhaskultuuri 2013. aasta haiguspuhangust nakatunud okastest.</p> <p>2013. aastal kahest männinoorendikust kokku 41 puult kogutud okkaproovidest isoleeriti puhaskultuuri seened, mis vastasid sihtmärkliikide tunnustele. Praimerite testimiseks eraldati valitud kultuuridest DNA, valmistati PCR segu, viidi läbi PCR reaktsioonid ja geelelektroforees tulemuste kontrollimiseks. Katsetati kahte <i>L. seeditiosum</i>'i, ühte <i>L. conigenum</i>'i ja kahte <i>L. pinastri</i> tuvastamiseks disainitud praimerite paari. <i>L. seeditiosum</i>'i praimeritega testiti ka okastest eraldatud DNA-d.</p> <p>Töö tulemustest selgus, et praimereid kasutades on võimalik tuvastada kiirelt ja täpselt patogeeni tõve-pigihuul ning eristada seda lähedastest liikidest. Kõik kasutatud praimerid on kõrge spetsiifilisusega ehk nad amplifitseerivad ainult sihtmärkliigi DNA, kuid erinevused esinevad katsetatud DNA praimerite tundlikkuses. Edasisteks uuringuteks isoleeriti kokku 66 tõve-pigihuule puhaskultuuri.</p> <p>Kiire analüüsi teostamiseks on vajalik täpselt tuvastada okastest latentne <i>L. seeditiosum</i>'i nakkus ning eristada omavahel erineva patogeensusega lähedasi liike. Antud töö tulemuste põhjal saab otsustada, millised praimereid kasutada laborites patogeeni tuvastamiseks. Tõve-pigihuule isolaate 2013. aasta epideemiast on võimalik kasutada edasistes uurimustöodes, et hinnata muutuseid liigi populatsioonides ja välja selgitada võimalikud muutused patogeeni virulentsuses erinevate puhangute vahel.</p> | | | |
| Märksõnad: harilik mänd, männi-pudetõbi, <i>Lophodermium seeditiosum</i> , liigispetsiifilised PCR praimerid, diagnostika | | | |

| | | | |
|---|--------------------------------------|---|---------------|
| Estonian University of Life Sciences Kreutzwaldi 1, Tartu 51014 | | Abstract of Bachelor's Thesis | |
| Author: Marili Laas | | Specialty: Natural Resources Management | |
| Title: Early diagnostics of Lophodermium needle cast (<i>Lophodermium seeditiosum</i>) | | | |
| Pages: 45 | Figures: 9 | Tables: 5 | Appendixes: 2 |
| Department: | Silviculture | | |
| Field of research: | Forest pathology | | |
| Supervisors: | Kalev Adamson MSc, Rein Drenkhan PhD | | |
| Place and date: | Tartu, 2015 | | |
| <p>Lophodermium needle cast is a needle disease of Scots pine (<i>Pinus sylvestris</i> L.) caused by pathogenic ascomycete <i>Lophodermium seeditiosum</i>. It is difficult to identify if the needles are infected by <i>L. seeditiosum</i> because of the long latent phase of the infection and morphologically similar fruiting bodies and cultures of all <i>Lophodermium</i> species found in Scots pine needles (<i>L. seeditiosum</i>, <i>L. conigenum</i>, <i>L. pinastri</i>).</p> <p>The aim of this thesis was (1) to test species specific PCR primers designed for early detection of <i>Lophodermium seeditiosum</i> and to assess their suitability for fast and accurate detection of the pathogen in the laboratory work, (2) to test specific DNA primers designed for the detection of other <i>Lophodermium</i> species found on Scots pine needles (<i>L. conigenum</i> and <i>L. pinastri</i>) and to ascertain their suitability in accurately differentiating related species, (3) to isolate <i>Lophodermium seeditiosum</i> from epidemic of 2013 for further research.</p> <p>In 2013 needle samples were collected from two young Scots pine stands from a total of 41 trees. Fungi that matched the culture descriptions of the target species were isolated from needle samples. In order to test the primers, DNA was extracted from a selection of cultures, PCR mix was prepared, PCR reactions were carried out and the results were visualised by gelelectroforesis. Two primer pairs designed for the detection of <i>L. seeditiosum</i>, one for <i>L. conigenum</i> and two for <i>L. pinastri</i> were tested with DNA extracted from the cultures. With <i>L. seeditiosum</i> primers DNA extracted from needles was also analysed.</p> <p>The results showed that it is possible to use primers for fast and accurate detection of the pathogen <i>L. seeditiosum</i> and to distinguish it from closely related species. All tested primers are highly specific and they amplify only the DNA of the target-species. The sensitivity of named primers is different. For further research 66 cultures of <i>L. seeditiosum</i> were obtained.</p> <p>For a quick analysis, it is important to accurately detect <i>Lophodermium seeditiosum</i> infection in pine needles and to distinguish closely related species which have different pathogenicity. The results of this work help to decide which primers to use in laboratory work for the identification of the pathogen. The isolates of the pathogen from the epidemic of 2013 can be used for further research in order to assess changes in the population genetics of the pathogen and to find out possible changes in the pathogens virulence between disease epidemics.</p> | | | |
| <p>Keywords: Scots pine, Lophodermium needle cast, <i>Lophodermium seeditiosum</i>, species specific PCR primers, diagnostics</p> | | | |

SISUKORD

| | |
|--|----|
| SISSEJUHATUS | 5 |
| 1. KIRJANDUSÜLEVAADE MÄNNI-PUDETÕVE TEKITAJAST..... | 7 |
| 1.1. Taksonoomia ja teised olulised liigid perekonnas | 7 |
| 1.1.1. Puna-pigihuul | 8 |
| 1.1.2. Süva-pigihuul | 8 |
| 1.2. Tõve-pigihuule bioloogia..... | 9 |
| 1.3. Kahjustused puudele | 10 |
| 1.4. Tõrje..... | 11 |
| 2. MATERJALID JA METOODIKA | 12 |
| 2.1. Uuringualad | 12 |
| 2.2. Laboratoorsed tööd | 12 |
| 2.3. Molekulaarsed uuringud | 13 |
| 2.3.1. DNA eraldamine | 13 |
| 2.3.2. PCR segu valmistamine | 14 |
| 2.3.3. PCR produkti kontrollimine agarosgeelis | 15 |
| 2.3.4. DNA sekveneerimine | 16 |
| 3. TULEMUSED | 17 |
| 3.1. Perekonna <i>Lophodermium</i> liikide esinemine okkaproovides | 17 |
| 3.2. Perekonna <i>Lophodermium</i> liikide puhaskultuuride tunnused..... | 19 |
| 3.3. Sekveneeritud ITS regiooni järjestuste võrdlemine geenipanga andmetega | 21 |
| 3.4. Tulemused <i>Lophodermium conigenum</i> 'i liigispetsiifiliste praimeritega | 22 |
| 3.5. Tulemused <i>Lophodermium pinastri</i> liigispetsiifiliste praimeritega..... | 22 |
| 3.6. Tulemused <i>Lophodermium seditiosum</i> 'i liigispetsiifiliste praimeritega..... | 24 |
| 4. ARUTELU JA JÄRELDUSED..... | 28 |
| KOKKUVÕTE..... | 32 |
| KASUTATUD KIRJANDUS | 34 |
| EARLY DIAGNOSTICS OF LOPHODERMIUM NEEDLE CAST (<i>LOPHODERMIUM SEDITIOSUM</i>) | 38 |
| LISAD | 40 |
| Lisa 1. Okaste päritolu ja PCR analüüside tulemused | 41 |
| Lisa 2. Puhaskultuuridest eraldatud DNA-ga läbi viidud PCR analüüside tulemused | 42 |

SISSEJUHATUS

Männi-pudetõbi on eelkõige noori harilikke mände (*Pinus sylvestris* L.) kahjustav epideemiatena esinev okkahaigus, mida põhjustab patogeenne kottseen tõve-pigihuul (*Lophodermium seditiosum* Minter, Staley & Millar) (Hanso, Drenkhan 2007; Hanso, Drenkhan 2012; Eesti seenestik 2000). Seene eostega nakatunud männiokkad värvuvad nakatumisjärgse aasta kevadel punakaspruuniks ja varisevad (Drenkhan, Adamson 2013). Haigus põhjustab suurt kahju, olles Eestis kõige levinum okkahaigus harilikul männil metsataimlates ja noortes männikultuurides (Hanso, Drenkhan 2007).

Tõve-pigihuule nakkuse avastamise muudab keeruliseks asjaolu, et haigusel esineb pikk latentne periood – sümptomid avalduvad alles nakatumisjärgse aasta kevadel, kuid siis pole tõrjest enam abi (Stenström, Ihrmark 2005). Peale patogeense tõve-pigihuule on hariliku männi okastel levinud ka samasse perekonda kuuluvad puna-pigihuul (*Lophodermium pinastri*) ja süva-pigihuul (*Lophodermium conigenum*), mis pole patogeendid (Diwani, Millar 1987). Viljakehade ja kotteoste morfoloogiliste tunnuste põhjal on liike keeruline eristada (Minter *et al.* 1978).

Suurimat kahju tekitab haigus noortele mändidele taimlates ja metsakultuurides. Haigus vähendab puude juurdekasvu ning võib põhjustada männitaimede suremist (Stenström, Arvidsson 2001). Kuna sümptomid arenevad hilja, siis võib juhtuda, et nakatunud seemikuid transporditakse ja istutatakse metsakultuuri, kus nad võivad kiratseda või isegi hukkuda. Sel viisil soodustatakse kohalike epideemiate teket (Lazarev *et al.* 2007). Haiguse varajane diagnostika on vajalik, et planeerida fungitsiididega profülaktilist pritsimist taimlates, vältimaks epideemia kordumist või jätkumist järgmisel aastal ning et ennetada nakatunud seemikute transportimist ja haiguse levitamist (Stenström, Ihrmark 2005).

Haiguse varajaseks diagnoosimiseks on vajalik meetod, mis suudaks patogeeni tuvastada ka sümptomiteta okastes haiguse latentses vormis. Kõige tundlikum tänapäeval seenhaiguste tuvastamisel kasutatav meetod põhineb polümeraasi ahelreaktsioonil (PCR)

ning võimaldab patogeeni tuvastada juba väga väikese DNA koguse põhjal (Capote *et al.* 2012). Seega on nimetatud meetod väga efektiivne latentses olekus taimehaiguste diagnostikas (McCartney *et al.* 2003). PCR reaktsioonis on olulised komponendid praimerid, mis on lühikesed nukleotiidijärjestused. Praimerid kinnituvad DNA erinevatele piirkondadele ning nende vahel sünteesitakse korduvalt sama pikki DNA-lõike (Heinaru 2012). Praimerite disainist sõltub, kas PCR analüüs annab õige tulemuse. On oluline, et liigispetsiifiline praimer annaks proovis sihtmärkliigi DNA esinemisel positiivse tulemuse ega annaks vale-positiivset tulemust mõne teise liigiga (Atkins, Clark 2004).

Bakalaureusetöö peamiseks eesmärgiks oli välja selgitada männi-pudetõve põhjustava patogeense seene (*Lophodermium seditiosum*) tuvastamiseks disainitud liigispetsiifiliste PCR praimerite toimimine ning hinnata praimerite sobivus kasutamiseks labortöodes haigusetkitaja varajaseks tuvastamiseks. Lisaks katsetati ka teiste Eestis hariliku männi okastel levinud *Lophodermium*'i perekonna liikide (s.o *L. pinastri* ja *L. conigenum*) tuvastamiseks disainitud praimereid eesmärgiga välja selgitada, kas praimereid kasutades on võimalik eristada lähedasi liike. Kasutati kahte *L. seditiosum*'i ja *L. pinastri* ning ühte *L. conigenum*'i liigispetsiifiliste PCR praimerite paari, kusjuures kolme praimeripaari (LoCon-F – LoCon-R, LoPi-F – LoPi-R2, LoSe-F – LoSe-R) (Riit 2014) pole varem praktilises uurimistöös kasutatud ega testitud. Üheks eesmärgiks oli ka edasisteks uuringuteks ja haigusetkitaja esinemise hindamiseks tõve-pigihuult puhaskultuuri isoleerida 2013. aasta haiguspuhangust.

Haigusetkitaja esinemise hindamiseks, isoleeriti okastest puhaskultuuri sihtmärkliigi tunnustega seened. Kontrollimaks praimerite toimimist sihtmärgiks oleva liigi tuvastamisel, viidi läbi labortööd, mille käigus katsetati praimereid männiokastest isoleeritud seente puhaskultuuridest eraldatud DNA-ga. Selgitamiseks välja *L. seditiosum*'i praimerite sobivust patogeeni varajaseks diagnostikaks, testiti praimereid ka okastest eraldatud DNA-ga. Töö tulemused kinnitavad, milline on erinevate praimeripaaride tundlikkus sihtmärkliigi tuvastamisel ning kas praimeritega on võimalik eristada lähedasi liike. Selle põhjal saab otsustada, millist praimerite paari ning protokollit saab kasutada praktilises metsanduses ja teaduslikel labortöödel kiireks ja usaldusväärseks haigusetkitaja tuvastamiseks.

1. KIRJANDUSÜLEVAADE MÄNNI-PUDETÕVE TEKITAJAST

1.1. Taksonoomia ja teised olulised liigid perekonnas

Tõve-pigihuul kuulub perekonda pigihuul (*Lophodermium* Chevall.), seltsi pigilaigulaadsed (*Rhytismatales*), kottseente (*Ascomycota*) hõimkonda (Eesti seenestik 2000; Drenkhan, Adamson 2013). Pigihuule perekond on levinud kogu maailmas (Lazarev *et al.* 2007). Perekonnale on omane anamorfne ehk mittesuguline arengujärk, mis tekib viljakehadest lahus ja kuulub perekonda *Leptostroma* (Eesti seenestik 2000). Mitmetele pigihuule liikidele on pööratud metsanduses palju tähelepanu, sest neid peetakse okaspuudel pudetõve tüüpi haiguste tekitajateks (Eesti seenestik 2000). Okaspuudelt on leitud enam kui 60 pigihuule liiki, kuid oluliseks patogeeniks peetakse neist vaid tõve-pigihuult (Sinclair, Howard 2005).

Kuni 1978. aastani ei eristatud üksteisest hariliku männi okastel esinevaid perekonna pigihuul liike. Arvati, et harilikul männil esineb üks pigihuule liik (*Lophodermium pinastri* (Schrud. ex Hook.) Chev.), mis on varieeruva morfoloogia ja ökoloogiaga (Minter 1981). 1978. aastal jagati takson mitmeks erinevaks liigiks. Nendeks liikideks on puna-pigihuul (*Lophodermium pinastri* (Schrud. ex Hook.) Chev.), tõve-pigihuul (*Lophodermium seditiosum* Minter, Staley & Millar), süva-pigihuul (*Lophodermium conigenum* Hiltzer) ja *Lophodermium pini-excelsae* Ahmad. (Minter *et al.* 1978). Viimane liik asustab enamasti viieokkalisi mände ning hariliku männi okastelt võib seda leida harva (Minter, Millar 1980).

Perekonda kuuluvatele liikidele on omased kuni 3 mm pikad, ühekaupa peremeestaime kudedesse süüvinud elliptilised kuni piklikud lehtereoslad. Sõltuvalt liigist ning peremeestaimest võivad viljakehad kujuneda okka, lehe, varre või käbi kudedesse. Küpsed

viljakehad avanevad ühe pikilõhega ning meenutavad huuli (Eesti seenestik 2000). Paljud pigihuule liigid tekitavad substraadile iseloomulikke ristjooni (Minter 1981).

1.1.1. Puna-pigihuul

Puna-pigihuul on tuntud saprotroofse okkavarise lagundajana (Diwani, Millar 1987; Drenkhan, Adamson 2013). Seen esineb endofüüdina tervetes rohelistes okastes haigussümptomeid tekitamata ning selle viljakehad kujunevad enamasti vananenud okastele nende kuivamise ja maapinnale varisemise järel (Minter 1981). Tänapäeval eristatakse juba kolme krüptilist *L. pinastri* liiki, mis erinevad kultuuride kasvukiiruse ning ITS piirkonna nukleotiidide järjestuse poolest (Reignoux *et al.* 2014).

Viljakehad on mustad, piklik-ovaalsed, 700-1200 µm pikad, ümbritsetud musta piirjoonega ning osaliselt okkakoega kaetud (Minter 1981). Puna-pigihuule viljakehad näivad tumedamad kui tõve-pigihuule omad, kuna neid kattev okkakoe kiht on õhem (Eesti seenestik 2000). Viljakeha avaneb ühe pikilõhega. Selle huuled on sageli punased, aga võivad olla ka hallid, kollased, oranžid või väga niisketes tingimustes ka rohelised. *L. pinastri* korral esineb okastel rohkesti viljakehasid omavahel eraldavaid tumedaid kitsaid ristjooni (Minter 1981).

1.1.2. Süva-pigihuul

Sarnaselt puna-pigihuulega on ka süva-pigihuult leitud haigustunnusteta rohelistest okastest, kus ta esineb endofüüdina puule kahju tekitamata (Minter 1981). Viljakehad kujunevad enamasti enneaegselt kuivanud okastele, mis on veel kinnitunud võrsele (Minter, Millar 1980). Tervete okaste enneaegset kuivamist võib põhjustada puu tüve või oksa kahjustada saamine looduslikel (nt. tuulemurd, ulukikahjustus, tüve- või juuremädanikud) või inimtekkelistel põhjustel (nt. laasimine) (*Ibid.*). Liik eelistab

viljumiseks okkaid, mis kuivamise ajal olid küpses eas, seda on harva leitud juba vananevatelt või väga noortelt okastelt (*Ibid.*). Seene suguta vormiks ehk anamorfiks on *Leptostroma pinorum* Sacc. (Minter 1981).

Seene sugulise järgu viljakehad on 900-2000 µm pikad ja osaliselt kaetud okka epidermiga. Lehtereosla keskosa, mis pole kaetud epidermiga, paistab mustana ning seda ümbritsev ala hallina. Viljakeha on ümbritsetud musta piirjoonega. Lehtereoslad avanevad mööda pikilõhe, huuled on enamasti rohelised, hallid või helepruunid. Okastel võivad esineda harvad pruunid ristjooned. Seene kotteosed on mõõtudega 90-130 x 2 µm (Minter 1981).

1.2. Tõve-pigihuule bioloogia

Männi-pudetõve epideemiad esinevad Eestis sageli, kuid mitte päris kindlate ajavahemike tagant (Hanso, Drenkhan 2007). Epideemiate esinemine sõltub palju keskkonnateguritest (Martinsson 1979), kuna patogeen vajab okaste nakatamiseks keskmisest niiskemat suve (Hanso, Drenkhan 2012). Niiskus on väga oluline eoste vabanemiseks ja okka pinnal idanemiseks (Diwani, Millar 1987). Epideemia tekkeks piisab juba ühest suvest, mil sademete hulk perioodil maist kuni augustini ulatub 300 mm-ni (Hanso, Drenkhan 2012). Kirjanduses on mainitud ka patogeeni vajadust mõnel määral pehmema talve järele (Stenstöm, Arvidsson 2001), kuid Hanso ja Drenkhani (2012) uurimus näitab, et kui suvi on piisavalt niiske, siis talvine madal temperatuur epideemia teket ei pärsi.

Okaste haigestumist põhjustavad seene sugulise järgu viljakehadest vabanevad hüaliinsed kotteosed, mis on mõõtudega 90-130 x 2 µm (Diwani, Millar 1990; Drenkhan, Adamson 2013; Minter 1981). Nakatumise esimeseks sümptomiks on väikesed kollased kuni pruunid täpid okastel, mis ilmuvad alates hilissügisest kuni varakevadeni (Hanso, Drenkhan 2012). Kevadel, ilmade soojenedes, värvuvad nakatunud okkad punakaspruuniks ja varisevad (Drenkhan, Adamson 2013).

Seene suguta arengujärgu (*Leptostroma austriaca*) algeoslad kujunevad okastele esimesena. *L. austriaca* pisikesi, tumedaid, piklikuid viljakehasid võib kuivanud okastelt leida juba enne nende varisemist (Drenkhan, Adamson 2013; Martinsson 1979). Sugulise

järgu viljakehad kujunevad okaste varisemise järgselt (Butin 2002). Need on piklik-ovaalsed, täielikult okka epidermiga kaetud, 800-1600 µm pikad ning võivad olla ümbritsetud musta piirjoonega. Viljakeha keskosa on must ning seda ümbritseb halli värvusega ala. Okastel võivad esineda ka harvad pruunid ristjooned (Drenkhan, Adamson 2013; Minter 1981). Valminud viljakehad avanevad niiskete ilmadega ning sulguvad, kui õhuniiskus langeb (Martinsson 1979). Huuled on enamasti roheka, sinaka või halli värvusega (Minter 1981).

1.3. Kahjustused puudele

Kuna patogeeni kotteosed on võimelised nakatama igas vanuses okkaid, siis võivad epideemia-aasta kevadel noortel mändidel pudeneda praktiliselt kõik okkad (Drenkhan, Hanso 2009). Puude produktiivse okastiku hulga vähenemise tõttu langeb ka nende võime fotosünteesida. Okkajälje meetodil on kindlaks tehtud, et männi juurdekasvu toidavad peamiselt vanemad, teise ja kolmanda aasta okkad (Drenkhan *et al.* 2006). Sellest tingituna on epideemia aastal ja sellele järgneval paaril aastal noorte mändide juurdekasv oluliselt väiksem (Hanso, Drenkhan 2007).

Üheaastane epideemia vähendab küll puude juurdekasvu, kuid ei tohiks taime veel tappa, kuna epideemiate vahelistel aastatel saab puu okkakaost taastuda (Drenkhan, Hanso 2009). Puu vanuse kasvades väheneb kahju, mida haigus puule tekitab. Enam kui 24 aasta vanuste puude juurdekasvu männi-pudetõve epideemia olulisel määral ei mõjuta (Hanso, Drenkhan 2012). Taimlas võib haigus aastaga võtta epideemia ulatuse, kuna okaste nakatumist soodustab ulatuslike tihedate monokultuuride kasvatamine suurel alal ning üheks põhjuseks on ka suhteliselt suur niiskustase (Lazarev *et al.* 2007; Stenstöm, Arvidsson 2001). Korduv või mitmeaastane epideemia võib kaasa tuua puude surma (Stenström, Ihrmark 2005).

1.4. Tõrje

Okaste nakatumist patogeeniga on võimalik fungitsiididega ennetada, kuid ravi haigusele puudub. Esmakordselt hakati haiguse tõrjeks fungitsiididega pritsimisi teostama 1890-ndatel Saksamaal (Reim 1925). Tõrjet tehakse ainult taimlates (Hanso, Hanso 2003) ja see on üsna edukas, kui seda teostatakse õigeaegselt ning korrektselt (Ostry, Nicholls 1989). Pritsimise tehnilist kvaliteeti peetakse isegi olulisemaks kui preparaadi valikut (Hanso, Hanso 2001).

Kaitsev fungitsiidikiht tuleb okastele kanda enne seene eoste levimise algust. Õige aja saab määrata hinnates viljakehade küpsust või eoste hulka õhus (Butin 2002). Keemilist taimekaitset tuleks rakendada ainult siis, kui ilmastikutingimused on olnud tõve-pigihuule kotteoste levikule soodsad. Seega kuival ja kuumal suvel on pritsimise vajadus väiksem või puudub üldse (*Ibid.*). Soovitav on püüda taimlat kaitsta ka muude profülaktiliste meetoditega. Valida tuleks haiguskindlamad kloonid, vältida liigniiskeid kohti, liialt tihedaid külve ning umbrohtumist (*Ibid.*). Metsateadlase E. Kohh-i poolt taimlas läbi viidud katsed näitasid, et häid tulemusi tõrjel annab peenra laiuse vähendamine ja reavahe suurendamine (Kohh 1933).

2. MATERJALID JA METOODIKA

2.1. Uuringualad

Töös analüüsiti hariliku männi (*Pinus sylvestris* L.) okkaproove, mis koguti kahest männinoorendikust 2013. aastal. Analüüsimiseks koguti puistutes juhuslikult valitud puudelt võra alumisest osast võrse. Iga proov sisaldas ainult ühelt puult kogutud okkaid. Proove koguti kokku 41 puult ning kuni analüüsimiseni säilitati neid sügavkülmas.

5. juunil koguti proove Vastse-Kuuste vallast 21-lt puult (kvartal KJ095, eraldis 15) (58°09.158'N, 27°02.836'E). Tegemist on istutuskultuuriga, mille vanus okaste kogumise ajal oli 7 aastat (Metsaregister). 13. juunil koguti proove 20-lt puult Põlva vallast Partsi külast (58°01.070'N, 27°10.094'E), kus tegemist oli looduslikult endisele põllumaale tekkinud puistuga ning puude keskmine vanus oli 10 aastat.

Lisaks analüüsiti töös liigispetsiifiliste praimeritega ka kümmet varasemate uuringute tarbeks (Drenkhan *et al.* 2013a) männiokastest eraldatud DNA proovi. Proovide päritolu ning analüüside tulemusi iseloomustav tabel on esitatud lisa 1. Nimetatud okaste hulgas oli nii pruune kui ka nakkuspunktidega rohelisi okkaid.

2.2. Laboratoorsed tööd

Labortööd viidi läbi Eesti Maaülikooli Metsandus- ja maaehitusinstituudi Metsapatoloogia ja –geneetika laboris. Igast kogutud proovist valiti juhuslikult vähemalt 30 analüüsitavat okast, nende hulgas oli nii rohelisi kui ka pruune okkaid. Valitud okastest lõigati umbes 5 mm pikkused tükid, mida pindsteriliseeriti lähtudes mõningate muudatustega Drenkhan *et*

al. (2013b) kirjeldatud meetodikast. Pindsteriliseerimine toimus süstlas, kus okkatükke hoiti üks minut 96% piirituses, neli minutit 2% naatriumhüpokloriidi (NaOCl) lahuses, seejärel taas üks minut 96% piirituses ning lõpetuseks loputati kaks korda destilleeritud veega. Pindsteriliseeritud okkatükid asetati vastava proovi tähisega Petri tassidesse kunstlikule söötmele, ühele söötmetassile 5-6 okkatükki, eraldi tassidesse pruunidest ja rohelistest okastest lõigatud tükid. Kokku külvati okkatükke 224 Petri tassile, mida säilitati toatemperatuuril (21°C).

Söötmena kasutati 2%-list virdeagarit ja nn. okkaagarit. Okkaagari valmistamisel lähtuti Drenkhan *et al.* (2013b) kirjeldatud meetodikast. Kasutati 100 grammi männi (*Pinus* spp.) okkaid, mida keedeti kahes liitris kraanivees 20 minutit. Saadud vedelikust kurnati okkad välja, vedelikule lisati 10 grammi kuivpärmis Veski Mati (Balti Veski AS, Eesti), 30 grammi OXOID Malt Extract-i, LP0039 (Oxoid, Inglismaa) ja 30 grammi OXOID Agar Technical-i (Agar no.3), LP0013 (Oxoid, Inglismaa). Virdeagar valmistati Kattai (2012) poolt kirjeldatud meetodil.

Söötmele okastest välja kasvanud seened, mis vastasid uuritavate liikide tunnustele (Minter *et al.* 1978), külvati ümber uuele steriilsele söötmele Petri tassile.

2.3. Molekulaarsed uuringud

2.3.1. DNA eraldamine

DNA eraldati puhaskultuuridest. Laminaarkapis viidi puhaskultuurist osa seene mütseeli steriilsesse 2 ml mikrotuubi, mida säilitati kuni DNA eraldamiseni sügavkülmas temperatuuril -20°C. DNA eraldamisel lähtuti Drenkhan *et al.* (2014) kirjeldatud meetodikast. Mütseeli rakkude purustamiseks lisati tuubidesse steriilsed metallkuulid (läbimõõt 2,5 mm) ja liiv ning purustati homogenisaatoriga Retsch MM400 (Retsch GmbH, Saksamaa). DNA eraldamiseks kasutati seentele mõeldud kit-i E.Z.N.A. Fungal DNA Mini Kit (Omega Bio-Tek Inc., USA) ning järgiti spetsiaalset tootjapoolset

protokolli. Eraldatud DNA-d säilitati kuni PCR segu valmistamiseni sügavkülmas -20°C juures.

Töös analüüsiti liigispetsiifiliste praimeritega ka juba varasemate uuringute tarbeks männiokastest eraldatud DNA-d. Okastest oli DNA eraldatud Kattai (2012) kirjeldatud meetodikat kasutades.

2.3.2. PCR segu valmistamine

PCR analüüsid viidi läbi puhaskultuuridest ja okastest eraldatud DNA-ga. DNA regioonide amplifitseerimiseks kasutati termotsüklerit TProfessional (Biometra, Saksamaa).

Seente universaalpraimeritega PCR segu valmistati Drenkhan *et al.* (2013a) kirjeldatud meetodil. Segu sisaldas ühe proovi kohta: 4 µl PCR segu 5 x HOT FIREPol® Blend Master Mix-i (10,0 mM MgCl₂) (Solis BioDyne, Tartu), 0,5 µl kõrgemate seenerühmade praimerit ITS1-F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') (Gardes, Bruns 1993), 0,5 µl seente universaalpraimerit ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White *et al.* 1990), 14 µl destilleeritud vett ja 1 µl analüüsivat DNA-d. PCR reaktsioon viidi läbi Drenkhan *et al.* (2014) kirjeldatud protokolliga kohaselt.

Liigispetsiifiliste praimeritega PCR segu sisaldas ühe proovi kohta: 4 µl PCR segu 5 x HOT FIREPol® Blend Master Mix Ready to Load (vastavalt 7,5 mM või 10,0 mM MgCl₂) (Solis BioDyne, Tartu), 0,5 µl vastavat 20 µM forward ja reverse praimerit, 14 µl destilleeritud vett ja 1 µl analüüsivat DNA-d.

Igal analüüsi korral kasutati positiivset ja negatiivset kontrolli. Positiivsesse kontrolli lisati juba eelnevalt kontrollitud DNA-d, mis nukleotiidide järjestuse kohaselt kuulub kindlasti vastava praimerit sihtmärkliigile. Positiivse kontrollina kasutatud liikide DNA-de ehk referentside järjekorranumbrid olid järgmised: *L. seditiosum* (nr. 1286), *L. conigenum* (nr. 1283), *L. pinastri* (nr. 56). Negatiivsesse kontrolli lisatakse DNA asemel destilleeritud vett ning see ei tohi ei tohi geelelektroforeesil tulemust anda.

Lophodermium seditiosum'i tuvastamiseks kasutati kahte erinevat liigispetsiifiliste praimerite paari: Ls11 (5'-CACCCCTTTGTTTACCACACTCA-3') ja Ls12 (5'-CGGCACCTGCTGTCCTTC-3') (Stenström, Ihrmark 2005) ning LoSe-F ja LoSe-R (Riit 2014). Praimeritega Ls11 – Ls12 PCR segus kasutati 7,5 mM MgCl₂ sisaldusega PCR segu, praimeritega LoSe-F ja LoSe-R kasutati 10,0 mM MgCl₂ sisaldusega PCR segu. PCR reaktsioonid viidi läbi vastavalt protokollile (Stenström, Ihrmark 2005; Riit 2014). Kuna praimerid LoSe-F ja LoSe-R ei andnud alati protokollis ettenähtud reaktsioonitingimuste korral tulemust, siis sellistel juhtudel korrati analüüsi, tõstes PCR tsükli arvu protokollis ettenähtult, s.o nt 35-lt 45-ni. See oli oluline osa praimerite sobivuse testist.

Lophodermium conigenum'i tuvastamiseks kasutati liigispetsiifilisi primereid LoCon-F ja LoCon-R (Riit 2014). Valmistatud PCR segu sisaldas 10,0 mM MgCl₂ sisaldusega segu ning PCR reaktsioon viidi läbi vastavalt protokollile (Riit 2014).

Lophodermium pinastri tuvastamiseks kasutati kahte liigispetsiifiliste praimerite paari: Lp3 (5'-GCCAGTGGACAGAAACCCT-3') ja Lp6 (5'-GCCTAGGCCTCTCCTTCC-3') (Stenström, Ihrmark 2005) ning LoPi-F ja LoPi-R2 (Riit 2014). Praimeritega LoPi-F ja LoPi-R2 segus kasutati 10,0 mM MgCl₂ sisaldusega PCR segu ning praimeritega Lp3 ja Lp6 PCR segu valmistamisel kasutati 7,5 MgCl₂ sisaldusega segu. Reaktsioonid viidi läbi vastavalt protokollile (Stenström, Ihrmark 2005; Riit 2014). Kuna praimerid LoPi-F ja LoPi-R2 ei andnud protokollikohasel kasutamisel tulemusi, siis alandati nende seondumistemperatuuri protokollis ettenähtud 64°C-lt 61°C-ni.

2.3.3. PCR produkti kontrollimine agarogeelis

PCR produkte kontrolliti geelelektroforeesis vastavalt Drenkhan *et al.* (2013a) kirjeldatud meetodikale. Valmistati 1%-ne agarogeel, mis sisaldas 100 ml 0,5 x TBE puhvrit (Tris-Borate-EDTA buffer, Sigma), 1 g agarosi (SeaKem® LE Agarose, Lonza) ja 9 µl etiidumbromiidi (EtBr, Naxo OÜ). Peale tardumist asetati geel elektrodidega piiratud puhvrianni ning sellesse laeti DNA Ladder, DNA fragmendi pikkusega vahemikus 100-1000 bp (Naxo OÜ), ja PCR produktid. Liigispetsiifiliste praimeritega PCR produkt sisaldas juba rohelist värvi ning selle proovid sai kanda geeli kohe peale viimase tardumist.

Seente universaalpraimeritega PCR produkt oli värvusetu ning seda segati enne geeli kandmist 6 x Blue Loading Dye-ga (Naxo OÜ).

PCR produktidega laetud agarosgeeli elektroforeesiti 75 V pinge juures 55 minutit. Amplifitseeritud DNA lõigu olemasolu geelil tehti kindlaks UV kiirte all kasutades selleks transilluminaatorit Quantum ST4-3026/WL/25M. Geelipilti töödeldi tarkvaraga Quantum ST4 Express v16.04.

2.3.4. DNA sekveneerimine

Eraldatud DNA ITS regiooni sekveneerimiseks kasutati praimerit ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') (White *et al.* 1990). Liigi tuvastamiseks võrreldi tulemusi rahvusvahelises geenipangas (National Center for Biotechnology Information) olevate andmetega. Sekveneerimine tehti Tartus Eesti Biokeskuses. Töö autor ei tegele isiklikult sekveneerimisega.

3. TULEMUSED

3.1. Perekonna *Lophodermium* liikide esinemine okkaproovides

Pruunidest okastest lõigatud tükke külvati kokku 122 tassile. Kuues tassis ei kasvanud okastest välja ühtki seent, kolmes tassis esines bakter ning kahes vohas hallitus. Puhassöötmele külvati ümber 109 erinevat seent, mis esialgsel hinnangul vastasid uuritavate *Lophodermium*'i liikide tunnustele. 17-l seenel kujunesid puhaskultuuris välja tunnused, mille põhjal sai välistada nende kuulumise perekonda *Lophodermium*. Molekulaarseteks uuringuteks valiti 50 puhaskultuuri, mis olid perekonna *Lophodermium* liikidele iseloomulike tunnustega ning veel 17 kultuuri, mida visuaalselt hinnates oli keeruline otsustada, kas tegemist on mõnega sihtmärkliikidest. 25 kultuuri liik määrati ainult morfoloogiliste tunnuste põhjal.

Rohelistest okastest lõigatud tükke külvati 102 tassile. 48 tassis ei kasvanud ühestki okkast seent välja ning kahes tassis vohas hallitus. Puhassöötmele külvati ümber 19 okastest välja kasvanud seent. Seene edasisel arengul kujunenud tunnuste põhjal välistati kaheksa kultuuri kuulumine perekonda *Lophodermium*. Molekulaarseteks uuringuteks valiti viis kultuuri, mis visuaalsel vaatlusel võisid olla perekond *Lophodermium* liigid ning üks kultuur, mille morfoloogiliste tunnuste põhjal oli keeruline otsustada, kas tegemist võiks olla perekonna *Lophodermium* liigiga. Viie kultuuri liik määrati ainult morfoloogiliste tunnuste alusel.

Praimerite katsetamiseks eraldati DNA kokku 73-st puhaskultuurist. PCR analüüside tulemusena osutus *Lophodermium*'i perekonna liigiks 65 puhaskultuuri. Lisas 2 on esitatud kõigi puhaskultuuridest eraldatud DNA-dega tehtud PCR analüüside tulemused. Tabel 1 annab ülevaate rohelistest ja pruunidest okastest isoleeritud puhaskultuuride liigilisest jagumisest liigispetsiifiliste PCR praimeritega läbi viidud analüüside tulemuste põhjal.

Tabel 1. Liigispetsiifilisi praimereid kasutades tuvastatud liigid puhaskultuurides

| Liik | Puhaskultuuride arv | |
|--------------------------------|---------------------|------------------|
| | pruunid okkad | rohelistes okkad |
| <i>Lophodermium conigenum</i> | 15 | 1 |
| <i>Lophodermium pinastri</i> | 1 | 0 |
| <i>Lophodermium seditiosum</i> | 44 | 4 |

Molekulaarselt määratud puhaskultuuride tunnuseid hinnati ning nendele toetuti nende kultuuride liigi määramisel, mida molekulaarselt ei määratud. Morfoloogiliste tunnuste põhjal määrati 30 kultuuri, mis olid selgelt liigileomaste tunnustega. Otsus tehti enam kui kahe kuu vanuste kultuuride kohta, mille kasv oli peatunud ja tunnused väljakujunenud. Ainult morfoloogiliste tunnuste alusel tuvastatud liikide jagunemine puhaskultuurides on esitatud tabelis 2.

Tabel 2. Ainult morfoloogiliste tunnuste põhjal tuvastatud liigid puhaskultuurides

| Liik | Puhaskultuuride arv | |
|--------------------------------|---------------------|----------------------|
| | pruunidest okastest | rohelistest okastest |
| <i>Lophodermium conigenum</i> | 10 | 2 |
| <i>Lophodermium pinastri</i> | 0 | 0 |
| <i>Lophodermium seditiosum</i> | 15 | 3 |

Kokku isoleeriti puhaskultuuri 128 okastest välja kasvanud seent, millest molekulaarsete analüüside või morfoloogiliste tunnuste põhjal määramise tulemusena osutus perekond *Lophodermium* liigiks 95 isolaati. Tabel 3 annab ülevaate liikide jagunemisest puhaskultuurides ning arvestatud on nii molekulaarselt kui ka morfoloogiliste tunnuste põhjal tuvastatud kultuure.

Tabel 3. Pruunidest ja rohelistest okastest isoleeritud puhaskultuuride liigiline jagunemine

| Liik | Puhaskultuuride arv | |
|--------------------------------|---------------------|------------------|
| | pruunid okkad | rohelistes okkad |
| <i>Lophodermium conigenum</i> | 25 | 3 |
| <i>Lophodermium pinastri</i> | 1 | 0 |
| <i>Lophodermium seditiosum</i> | 59 | 7 |

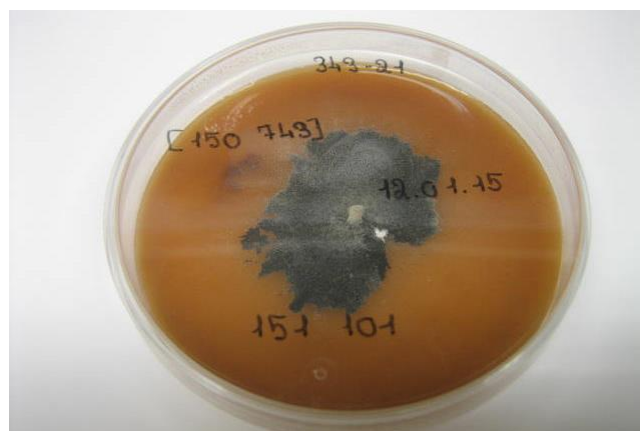
L. seditiosum õnnestus isoleerida 33 puu pruunidest ja viie puu rohelistest okastest. *L. conigenum* tuvastati 14-1 puul pruunidest ja kahel puul rohelistest okastest. *L. pinastri* õnnestus isoleerida ainult ühe puu okastest. Tabel 4 annab ülevaate, mitmel puul tuvastati visuaalse hindamise järgi puhaskultuuris või molekulaarsete analüüside põhjal okaste nakatumine erinevate perekond *Lophodermium* liikidega.

Tabel 4. Perekonna *Lophodermium* liikidega nakatunud puude arv

| Liik | Puude arv, tk | |
|--------------------------------|-------------------|--------------------|
| | pruunides okastes | rohelistes okastes |
| <i>Lophodermium conigenum</i> | 14 | 2 |
| <i>Lophodermium pinastri</i> | 1 | 0 |
| <i>Lophodermium seditiosum</i> | 33 | 5 |

3.2. Perekonna *Lophodermium* liikide puhaskultuuride tunnused

Lophodermium pinastri kultuur on aeglasekasvuline, alguses valge värvusega, kuid sellele on iseloomulik musta mütseeli tekitamine valge seeneniidistiku pinnale (joonis 1). Musta mütseeli kujunemine algas alles siis, kui kultuuri radiaalne kasv oli saavutanud lähedased mõõtmed joonisel 1 nähtavale ning olulist laienemist enam ei toimunud (3-4 nädalal peale isoleerimist).



Joonis 1. *Lophodermium pinastri* puhaskultuur okkasöötmel (Foto: Marili Laas 2015)

Lophodermium conigenum'i kultuuridele on iseloomulik valge või kreemikas värvus ja need on suhteliselt kiire kasvuga. *L. conigenum*'i kultuuridele ei kujune ka vananedes selliseid pruune laike nagu võib näha *L. seditiosum*'il. Virdeagari söötmel (joonis 2) kasvanud kultuurid on väga iseloomuliku välimusega, mis säilib ka kultuuri vananedes. Virdeagaril on *L. conigenum* substraadile liibunud ja katab selle õhukese läbikumava kirmena. Okkaagaril võib kultuur omandada ka heleda pruunika tooni.

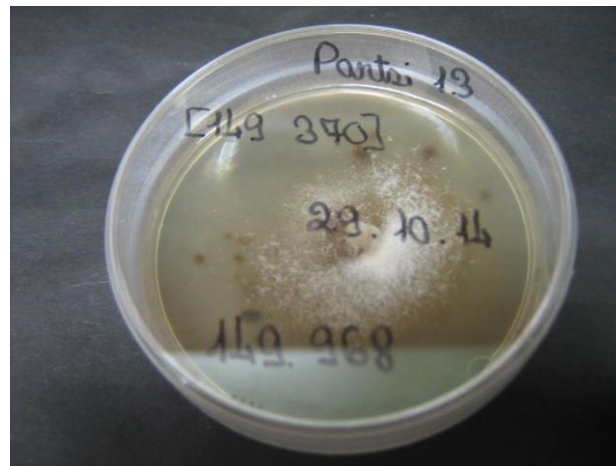


Joonis 2. *L. conigenum*'i puhaskultuur 2%-l virdeagari söötmel (Foto: Marili Laas 2015)

Lophodermium seditiosum'i kultuurid on söötmele liibuvad, valge või kreemika värvusega. Noored kultuurid on nii virdeagaril kui ka okkaagaril valge värvusega ning arengu algstaadiumis eristamatud *L. conigenum*'i kultuuridest. Alates kolmandast kuni neljandast nädalast, tekivad kultuuri pinnale sageli hajusad või konkreetselt piiritletud heledamad või tumedamad pruunikad laigud. Näide tüüpilisest *L. seditiosum*'i puhaskultuurist okkaagaril on esitatud joonisel 3. Taolist kultuuri arengut võib tähendada nii virde- kui ka okkaagaril. Okkaagaril esines palju ka kultuure, mis ei omanda pruunikamat tooni ning nendel juhtudel on ka juba vanemate *L. conigenum*'i ja *L. seditiosum*'i puhaskultuuride visuaalne eristamine keeruline. Joonisel 4 on kujutatud *L. seditiosum*'i kultuur virdeagaril. Kultuuri liik määrati molekulaarselt enne kui kujunes *L. seditiosum*'ile iseloomulik kultuuri ümbritsev kerge pruunikas varjund söötmel ning siis ei olnud võimalik veel aru saada, kumma liigiga tegemist on.



Joonis 3. *Lophodermium seditiosum*'i puhaskultuur okkasöötmeel (Foto: Marili Laas 2015)



Joonis 4. *L. seditiosum*'i puhaskultuur 2%-l virdeagari söötmeel (Foto: Marili Laas 2015)

3.3. Sekveneeritud ITS regiooni järjestuste võrdlemine geenipanga andmetega

Kahest puhaskultuurist eraldatud DNA ITS regioonid sekveneeriti ning saadud nukleotiidide järjestusi võrreldi rahvusvahelises geenipangas (National Center for Biotechnology Information) olevate andmetega. Geenipanga ITS regiooni nukleotiidide järjestuste andmetega võrdlemise ning PCR analüüside tulemused on esitatud tabelis 5. Liigispetsiifiliste praimeritega testiti mõlemat puhaskultuuri. Tulemused kinnitasid

praimerite töökindlust ja *Lophodermium seditiosum*'i olemasolu proovis. Sekveneeritud ehk kontrollitud tüvesid on edaspidi võimalik kasutada liigispetsiifiliste praimerite toimimise kontrollimiseks.

Tabel 5. *Lophodermium seditiosum* tüvede analüüsi tulemused

| DNA nr. | Geenipanga andmetega sarnasus, % | Liik | PCR liigi spets. <i>L. seditiosum</i> analüüs (Stenström, Ihrmark. 2005) | PCR liigi spets. <i>L. seditiosum</i> analüüs (Riit 2014) |
|---------|----------------------------------|----------------------|--|---|
| 3436 | 100% | <i>L. seditiosum</i> | positiivne | positiivne |
| 3439 | 100% | <i>L. seditiosum</i> | positiivne | positiivne |

3.4. Tulemused *Lophodermium conigenum*'i liigispetsiifiliste praimeritega

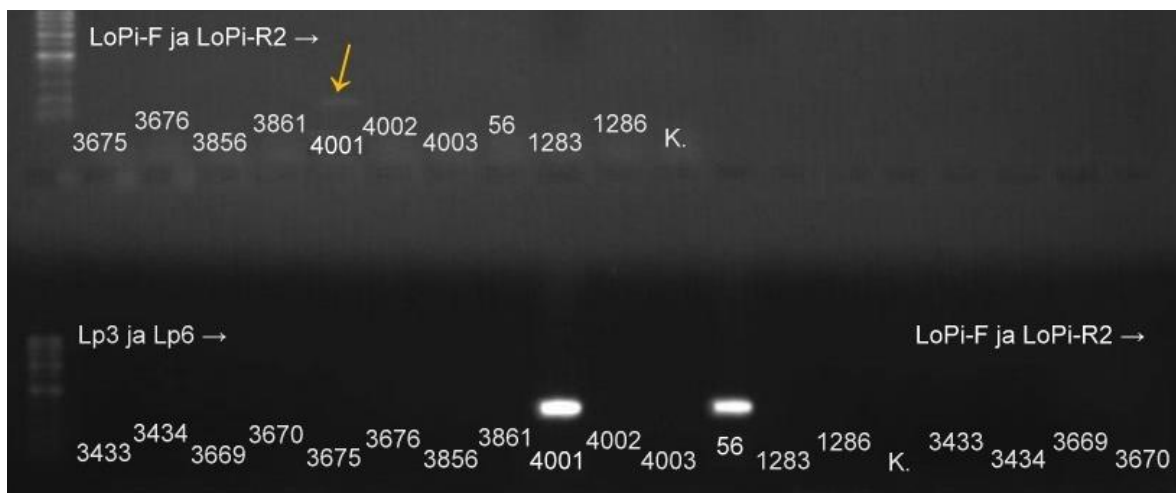
Testimaks *L. conigenum*'i liigispetsiifiliste praimerite LoCon-F ja LoCon-R (Riit 2014) funktsionaalsust sihtmärkliigi DNA tuvastamisel, viidi läbi PCR reaktsioonid 73-st puhaskultuurist eraldatud DNA-ga. Praimerite testimisel kasutati positiivse kontrollina juba varem sekveneeritud tüve (nr. 1283). PCR produktide kontrollimisel geelelektroforeesi teel andsid geelil triibu 16 proovil ehk 16 puhaskultuuri osutus *L. conigenum*'iks. Analüüside tulemused esitatud lisas 2. Praimerid ei amplifitseerinud nende kultuuride DNA-d, mis said positiivse tulemuse *L. seditiosum*'i või *L. pinastri* praimeritega. Lisas 2 on esitatud kõigi puhaskultuuridest eraldatud DNA-dega tehtud PCR analüüside tulemused.

3.5. Tulemused *Lophodermium pinastri* liigispetsiifiliste praimeritega

Lophodermium pinastri liigispetsiifiliste praimeritega LoPi-F ja LoPi-R2 (Riit 2014) viidi läbi PCR analüüsid 22 puhaskultuuri DNA-ga, mis polnud seniste analüüside tulemusena osutunud ühekski teiseks liigiks või mis morfoloogiliste tunnuste põhjal võisid olla *L.*

pinastri. Protokollis (Riit 2014) ettenähtud reaktsioonitingimustel ei tuvastanud nimetatud praimerid *L. pinastri* DNA-d üheski proovis. Kuna praimerid ei amplifitseerinud ka referentsi, siis analüüsi korrati samadel tingimustel, et välistada mõnes töö järgus tehtud võimaliku vea mõju, kuid tulemused jäid endiseks.

Järgmisel kordusanalüüsil alandati protokollis ettenähtud seondumistemperatuuri (64°C) kolme kraadi võrra. Analüüsitavate proovide hulgast jäeti välja nende puhaskultuuride DNA-d, mis olid osutunud mõneks teiseks liigiks, kuid praimerite spetsiifilisuse kontrollimiseks lisati proovide hulka liigispetsiifiliste praimeritega tuvastatud *L.conigenum*'i (nr. 4003) ja *L. seditiosum*'i (nr. 4002) kultuuri DNA ning nimetatud liikide referentsid (nr. 1283 ja nr. 1286). Positiivse kontrollina kasutati *L. pinastri* juba varem sekveneeritud tüve (nr. 56). PCR reaktsioon viidi samade proovidega läbi ka praimeritega Lp3 ja Lp6 protokollis ettenähtud reaktsioonitingimustele (Stenström, Ihrmark 2005). Geelipilt PCR reaktsioonide tulemustest on kujutatud joonisel 5.

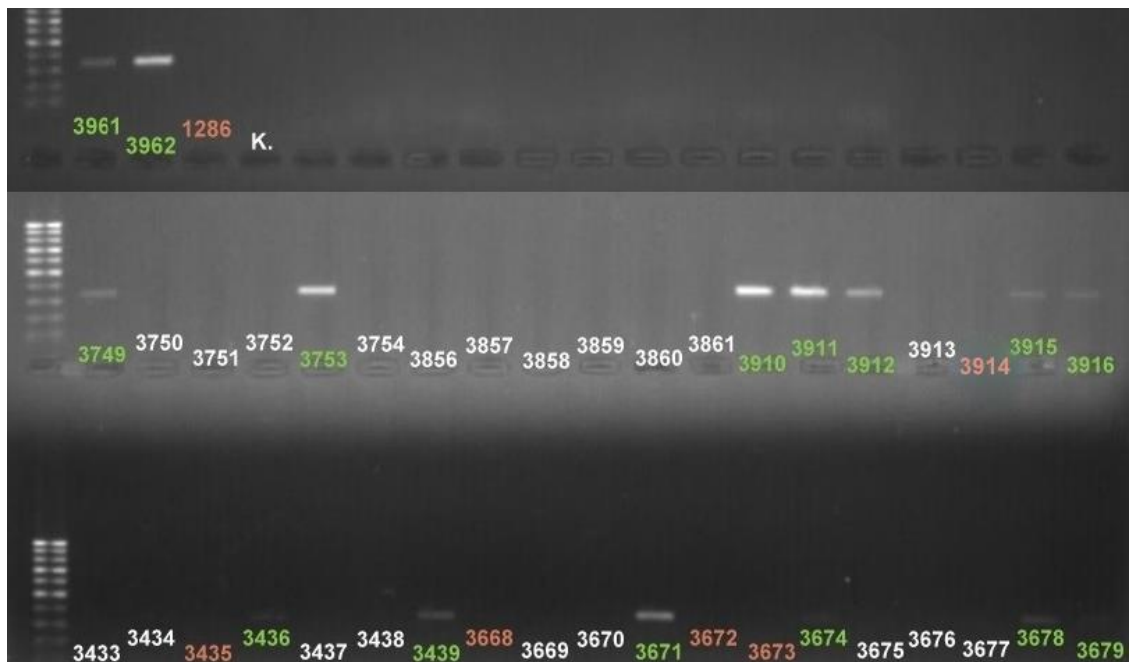


Joonis 5. Geelipilt *L. pinastri* liigispetsiifiliste praimeritega läbi viidud PCR reaktsioonide tulemustest. Praimeritega Lp3 ja Lp6 andsid geelil triibu proov nr. 4001 ning referents (nr. 56). Praimeritega LoPi-F ja LoPi-R andis väga nõrga triibu proov nr. 4001. Negatiivne kontroll (K.), *L. seditiosum*'i kontrollitud DNA-ga proovid (nr. 4002 ja nr. 1286) ja *L. conigenum*'i kontrollitud DNA-ga proovid (nr. 4003 ja nr. 1283) on tühjad mõlema praimerite paariga.

Analüüside tulemusel osutus sihtmärkliigiks üks puhaskultuur (nr. 4001), mille mõlemad praimerid tuvastasid, kuid praimeritega LoPi-F ja LoPi-R2 saadud triip geelil oli oluliselt nõrgem. Samuti ei amplifitseerinud nimetatud praimerid referentsi (nr. 56).

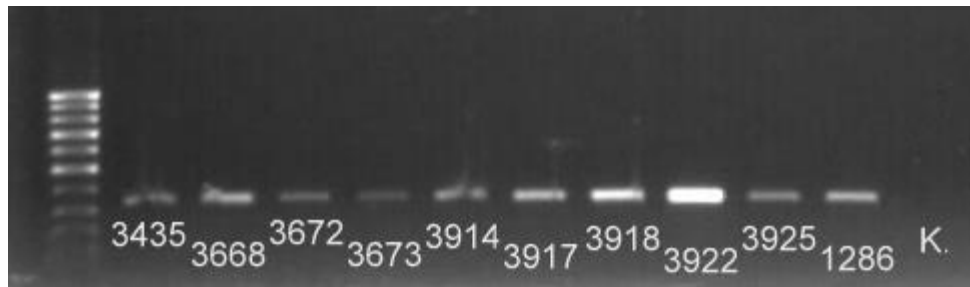
3.6. Tulemused *Lophodermium seditiosum*'i liigispetsiifiliste praimeritega

L. seditiosum'i liigispetsiifiliste praimerite Ls11 ja Ls12 (Stenström, Ihrmark 2005) ning LoSe-F ja LoSe-R (Riit 2014) toimimist sihtmärkliigi tuvastamisel testiti, viies kummagi praimerite paariga läbi PCR reaktsioonid 73 puhaskultuuri DNA-ga. Praimerid Ls11 ja Ls12 tuvastasid 48 ning praimerid LoSe-F ja LoSe-R 39 kultuuri. Praimerid ei amplifitseerinud nende kultuuride DNA-d, mis said positiivse tulemuse *L. conigenum*'i või *L. pinastri* praimeritega. Geelipilt praimeritega LoSe-F ja LoSe-R 35 PCR tsükli kasutades saadud tulemustest valiku proovidega on kujutatud joonisel 6.



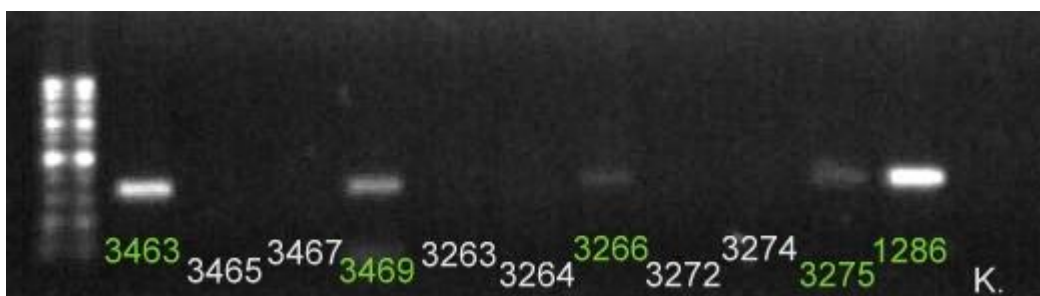
Joonis 6. Geelipilt praimerite LoSe-F ja LoSe-R PCR reaktsiooni tulemustest 35 tsükliga. Rohelise värviga märgitud nende puhaskultuuride DNA järjekorranumbrid, mida praimerid LoSe-F ja LoSe-R amplifitseerisid. Punasega märgitud nende kultuuride DNA tähised, mis praimerite Ls11 ja Ls12 järgi olid *L. seditiosum*, kuid mida praimerid LoSe-F ja LoSe-R ei tuvastanud. Positiivne kontroll (nr. 1286) ja negatiivne kontroll (K.) on tühjad.

PCR analüüse korrati praimeritega LoSe-F ja LoSe-R nende proovidega, mis nimetatud praimeritega esimesel korral tulemust ei andnud, kuid andsid tulemuse praimeritega Ls11 ja Ls12. Kordusanalüüsil tõsteti PCR tsüklite arv protokollis ettenähtud 35-lt 45-le. 45 PCR tsükli kasutamisel tuvastasid praimerid sihtmärkliigi DNA ka nendes 9 proovis, mis madalama tsüklite arvu juures andsid negatiivse tulemuse (joonis 7). Seega, tsüklite suurendamine parandas nimetatud praimerite tundlikkust sihtliigile.

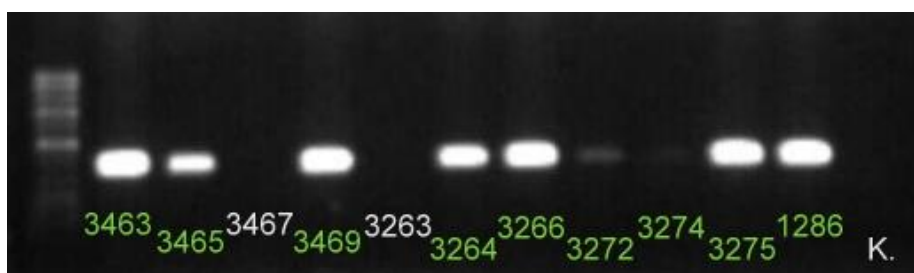


Joonis 7. Geelipilt praimerite LoSe-F ja LoSe-R PCR analüüsi tulemustest 45 tsükliga. Kõik proovid andsid vöödi geelil, seega sisaldasid *L. seditiosum*'i DNA-d. Praimerid amplifitseerisid ka positiivse kontrolli (nr. 1286), negatiivne kontroll (K.) on tühi.

Eelnevate analüüside tulemused tõestasid, et praimerid on liigispetsiifilised ega amplifitseeri lähedaste liikide DNA-d. Oluline on, et *L. seditiosum*'i praimerid suudaksid tuvastada patogeeni esinemise ka otse okkast eraldatud DNA-st, kuna see võimaldaks vahele jätta ajakuluka puhaskultuuride isoleerimise ning seega kiirendada tulemuste saamist. Kontrollimaks, kas praimerid suudavad tuvastada okka nakatumise patogeeniga, viidi läbi PCR analüüsid, milles *L. seditiosum*'i praimeritega testiti kümnest okkaproovist eraldatud DNA-d. Liigispetsiifilised praimerid LoSe-F ja LoSe-R tuvastasid *Lophodermium seditiosum*'i esinemise neljas proovis 10-st (joonis 8) ning praimerid Ls11 ja Ls12 kaheksas proovis 10-st (joonis 9). Sellest võib järeldada, et praimerid Ls11 ja Ls12 on tundlikumad. Koondtabel okaste päritolu ning analüüside tulemustega on esitatud lisas 1.



Joonis 8. Geelipilt okastest eraldatud DNA-ga läbi viidud liigispetsiifilise PCR analüüsi tulemustest praimeritega LoSe-F ja LoSe-R. Rohelise järjekorranumbriga on tähistatud 4 proovi, milles praimerid *L. seditiosum*'i DNA tuvastasid (3463, 3469, 3266, 3275) ja positiivne kontroll (nr. 1286). Negatiivne kontroll (K.) on tühi.



Joonis 9. Geelipilt okastest eraldatud DNA-ga läbi viidud liigispetsiifilise PCR analüüsi tulemustest praimeritega Ls11 ja Ls12. Rohelise järjekorranumbriga on tähistatud 8 proovi, milles praimerid *L. seditiosum*'i DNA tuvastasid (3463, 3465, 3469, 3264, 3266, 3272, 3274, 3275) ja positiivne kontroll (nr. 1286). Negatiivne kontroll (K.) on tühi.

4. ARUTELU JA JÄRELDUSED

Patogeenide täpne liigini tuvastamine on vajalik nii nende bioloogiat ja levikut puudutavateks uuringuteks kui ka nende poolt põhjustatavate haiguste diagnostikaks ja tarvilike meetmete (nt. karantiin või tõrje) kasutuselevõtu planeerimiseks (McCartney *et al.* 2003). Tavapäraselt on haigusetekiitajaid tuvastatud nakatunud taimel esinevate nähtavate sümptomite, haigust põhjustava patogeeni viljakehade, puhaskultuuride või eoste morfoloogiliste tunnuste põhjal (McCartney *et al.* 2003; Atkins, Clark 2004; Stenström, Ihrmark 2005), kuid vaid nimetatud meetoditele tuginedes pole võimalik kiiresti ja täpselt tuvastada okaste nakatumine erinevate patogeenidega, s.h tõve-pigihuulega. Pika latentse perioodi tõttu avalduvad sümptomid okastel alles nakatumisjärgse aasta kevadel (Stenström, Ihrmark 2005), kuid ka siis võivad isegi spetsialistid visuaalse hinnangu põhjal haiguse tuvastamisel eksida (Hanso, Hanso 2003). Hariliku männi okastel leiduvaid perekond pigihuul liike on oluline omavahel eristada, sest patogeeniks peetakse neist vaid tõve-pigihuult (Diwani, Millar 1987), liikide viljakehad ja kotteosed on aga morfoloogiliste tunnuste poolest väga sarnased ning viljakehade põhjal on liike keeruline eristada isegi labortingimustes mikroskopeerimise teel (Minter 1981; Hanso, Hanso 2003).

Puhaskultuuride meetodit kasutades on võimalik kultuuride morfoloogiliste tunnuste põhjal lähedasi liike üksteisest eristada ja tuvastada okaste nakatumist tõve-pigihuulega (Minter *et al.* 1978; Stenström, Ihrmark 2005). Nimetatud meetodil on aga mitmeid puuduseid, millest üks olulisemaid on ajakulukus. Käesoleva töö jaoks männiokastest haigusetekiitajate puhaskultuuri isoleerimine näitas, et võib kuluda mitmeid nädalaid, kuni okkast seenemütseel välja kasvab. Peale puhassöötmele külvamist võtab liigile iseloomulike tunnuste kujunemine vähemalt sama kaua aega. Virdeagari söötmel on *L. seditiosum* ja *L. conigenum* enamasti eristatavad alates kolmandast nädalast. Nooremate kultuuride põhjal pole liike võimalik eristada ei virde- ega okkaagaril. *L. pinastri* puhaskultuur on kergesti äratuntav, kui selle valge seeneniidistiku pinnale on kujunemas liigile iseloomulik must mütseel. Enne seda on puhaskultuuri tunnuste põhjal liiki keeruline tuvastada.

Labortööde käigus isoleeriti okastest välja kasvanud seeni nii virde- kui ka okkaagarile. Võrreldes liikide tunnuseid erinevatel söötmetel, on näha, et kultuuri morfoloogilised tunnused olenevad ka söötmetest, millel see kasvab. Morfoloogiliste tunnuste põhjal saab määrata ainult kultuure, mis on liigile väga iseloomulike tunnustega. Palju esines aga kultuure, millele ei kujunenud ka vananedes selgeid tunnuseid. Okastest puhaskultuuride isoleerimisel põhineva haiguse tuvastamise nõrga küljena võib välja tuua ka selle, et okastes leidub alati mitmeid seeni. Kui need on kiirema kasvuga kui sihtmärkliik, siis uuritava liigi olemasolu okkas jääb paratamatult märkamatuks (Stenström, Ihrmark 2005). Morfoloogiliste tunnuste põhjal liigi määramine on alati hinnanguline, sest võib sõltuda määraja kogemusest antud valdkonnas ning põhineda isegi tema subjektiivsele arvamusele (McCartney *et al.* 2003).

Kuna laboritelt nõutakse kiireid ja täpseid vastuseid, siis pole morfoloogial põhinevad meetodid efektiivsed. Kiireim võimalus tuvastamiseks, kas okkad on nakatunud tõvepigihuulega, on otse okastest DNA eraldamine ning kontrollimine, kas selles esineb patogeeni DNA-d (Stenström, Ihrmark 2005). DNA-l põhinevad meetodid on tundlikud ning suure spetsiifilisuse tõttu võimaldavad eristada ka lähedasi liike (Capote *et al.* 2012). Liigispetsiifilistel praimeritel põhinev polümeraasi ahelreaktsioon võimaldab *in vitro* tuvastada sihtmärkliigi DNA esinemise analüüsitavas proovis ning luua sellest korduvate PCR tsüklite käigus kõigest mõne tunni jooksul miljoneid koopiaid (Mullis, Faloona 1987). Nimetatud meetodi kasutamine labortöödel võimaldab kiiresti tuvastada patogeeni esinemise okastes juba haiguse latentse vormis ning annab objektiivsed, määrajast sõltumatud tulemused.

Kuna PCR reaktsiooni liigispetsiifilisus ja efektiivsus sõltub praimerite disainist ja protokollide optimaalsusest (Capote *et al.* 2012), siis enne, kui praimerid saab kasutusele võtta praktilise metsanduse (nt taimlast pärit taimede haigusetehtaja määramine) või teaduslike uurimistööde tarvis tehtavates labortöödes, on oluline neid testida, et hinnata nende võimet sihtmärkliik tuvastada ja eristada seda lähedastest liikidest. Oluline on, et praimerid amplifitseeriks ainult sihtmärkliigi DNA-d ega annaks vale-positiivseid tulemusi lähedaste liikidega. Sageli valitakse praimerite sihtmärgiks olev piirkond ribosomaalse DNA (rDNA) ITS piirkonnast, kuna see on paljudel liikidel liigisiselt suhteliselt konserveerunud, kuid liikidevaheliselt üsna varieeruv (White *et al.* 1990). Ka käesolevas töös vaadeldud liigispetsiifiliste praimerite paaridest neli on disainitud ITS1 ja ITS2 regioonide põhjal (Stenström, Ihrmark 2005; Riit 2014). *L. pinastri* praimerid LoPi-F

ja LoPi-R2 on disainitud mitokondriaalse ribosoomi väikese subühiku DNA järjestuse põhjal (Riit 2014). Käesolevas töös kasutatud praimeritest ei amplifitseerinud ükski nende kultuuride DNA-d, mis sai positiivse tulemuse mõne teise liigi praimeritega. Seega võime järeldada, et vaadeldavate liikide ITS piirkond on piisavalt varieeruv, et selle põhjal liike eristada ning uuritud praimerite nukleotiidide järjestused on spetsiifilised sihtmärkliikidele.

Sama oluline on, et praimerid oleksid piisavalt tundlikud ega annaks vale-negatiivseid tulemusi proovidega, mis sisaldavad sihtmärkliigi DNA-d (McPherson, Møller 2006). Kui PCR ei anna tulemusi, siis põhjuseks võib olla näiteks halb praimerid disain, liiga madal analüüsitava DNA sisaldus proovis, DNA halb kvaliteet ning ebasobivad reaktsioonitingimused (ebapiisav PCR tsüklite arv või vale seondumistemperatuur) (*Ibid.*).

Töö tulemustest selgus, et *L. seditiosum*'i spetsiifilised praimerid Ls11 ja Ls12 (Stenström, Ihrmark 2005) on tundlikumad kui sama liigi tuvastamiseks disainitud praimerid LoSe-F ja LoSe-R (Riit 2014). Seda saab järeldada nii puhaskultuuridest kui ka okkast eraldatud DNA-ga tehtud analüüside põhjal. Praimerid LoSe-F – LoSe-R andsid paljudel juhtudel vaid vaevumärgatava triibu geelil proovidele, mis praimeritega Ls11 – Ls12 andis selge ja tugeva tulemuse (joonis 8 ja 9). Proovid, mis praimeritega Ls11 ja Ls12 andsid vaid nõrga triibu geelil, ei andnud praimeritega LoSe-F ja LoSe-R samade PCR tsüklite juures üldse tulemust. PCR tsüklite arvu, võrreldes esialgse protokolliga, tuli tõsta, et praimerid LoSe-F ja LoSe-R praimeritega Ls11 ja Ls12 sama tundlikkuse saavutaksid. Kuna nõrkade triipude põhjuseks võib olla analüüsitava DNA madal sisaldus või selle halb kvaliteet proovis (McPherson, Møller 2006), siis võib oletada, et nendes proovides ilmselt ongi sihtmärkliigi DNA sisaldus väiksem või selle kvaliteet madalam ning praimerid LoSe-F ja LoSe-R pole piisavalt tundlikud, et sellise kvaliteediga DNA-d tuvastada. Seega peaks labortööl eelistama praimereid Ls11 ja Ls12, kuna tõve-pigihuule varases diagnostikas on väga oluline, et praimerid suudaksid tuvastada ka väikese koguse patogeeni DNA esinemise proovis.

Sarnane probleem esines ka *L. pinastri* praimeritega. Praimerid Lp3 ja Lp6 (Stenström, Ihrmark 2005) suutsid tuvastada sihtmärkliigi DNA, andes geelil selge ja tugeva triibu (joonis 5). Praimerid LoPi-F ja LoPi-R2 (Riit 2014) ettenähtud reaktsioonitingimuste juures sihtmärkliiki tuvastada ei suutnud. Reaktsioonitingimusi muudeti, langetades seondumistemperatuuri kolme kraadi võrra. Optimaalne seondumistemperatuur on väga oluline PCR reaktsiooni õnnestumiseks. Liiga kõrge seondumistemperatuur raskendab

praimerite seondumist DNA ahelaga, väheneb reaktsiooni käigus juurde kopeeritud DNA ahelate hulk ja langeb PCR produkti kvaliteet. Mida madalam on seondumistemperatuur võrreldes optimaalsega, seda suuremad erinevused võivad esineda praimerite ning amplifitseeritava lõigu nukleotiidide järjestuste vahel ehk praimer ei pruugi olla piisavalt liigispetsiifiline (Rychlik *et al.* 1990; McPherson, Møller 2006). Sellistel tingimustel tuvastasid praimerid ühes proovis (mis oli ka ainus positiivne proov) *L. pinastri* DNA, kuid amplifitseeritud DNA triip geelil oli väga nõrk ning praimerid ei amplifitseerinud ka referentsi. Käesoleva töö tulemuste põhjal võib seega soovitada *L. pinastri* tuvastamiseks kasutada primereid Lp3 ja Lp6 järgides vastavat protokollit. Primerid LoPi-F ja LoPi-R2 vajavad edaspidi veel katsetamist ning nende reaktsioonitingimused optimeerimist.

Kuna *L. conigenum*'i tuvastamiseks kasutati ainult ühte praimerite paari, siis pole antud praimerite tundlikkuse kohta järeldusi tehtud, sest pole võrdlusmaterjali. Kuna praimerid ei amplifitseerinud mõne teise liigi puhaskultuuri DNA-d, siis võib järeldada, et nende järjestus on spetsiifiline ainult sihtmärkliigile. Üllatuslikult saadi molekulaarselt määratud seeneliikidest kokku 16 tüve *L. conigenum*'it, s.o 25% kõigist primereid kasutades tuvastatud puhaskultuuridest. Kui arvestada ka morfoloogia põhjal tuvastatud kultuure, siis õnnestus *L. conigenum* isoleerida kokku 15 puu okastest. See on oluline tulemus, kuna senini oli Eestis *L. conigenum* vähetuntud ja selle liigi esinemine ebaselge (Rein Drenkhan, suulised andmed). Käesoleva töö tulemusena ja uue liigispetsiifilise praimerite valguses selgus aga, et nimetatud liiki esines pruunides okates isegi enam kui saprotroofset *L. pinastri*'t. Samuti esineb liik meil rohelistes hariliku männi okastes.

Patogeense liigi ning ka sellele lähedaste liikide täpne tuvastamine võimaldab uurida nende bioloogiat, ökoloogiat, virulentsust ja levikut ning neid teadmisi rakendada efektiivsema tõrje planeerimisel. Molekulaarseid meetodeid kasutatakse ka selleks, et uurida erinevuseid patogeenide populatsioonides (McCartney *et al.* 2003). Seni on veel kontrollimata tõvepigihuule virulentsuses puhangutevahelistel aastatel toimuvad muutused. Selle kontrollimiseks on vaja kahe järjestikkuse epideemia haigusetekitaja tüvesid molekulaarselt võrrelda (Hanso, Hanso 2003). Taoliste uurimuste tegemisel on oluline, et liike suudetaks täpselt eristada.

KOKKUVÕTE

Käesoleva bakalaureusetöö peamiseks eesmärgiks oli välja selgitada tõve-pigihuule tuvastamiseks disainitud praimerite tundlikkus ja liigspetsiifilisus ning hinnata nende sobivust kasutamiseks labortööl patogeeni varajaseks diagnostikaks. Kuna raskesti eristatavatel, kuid erineva patogeensusega liikidel on oluline vahet teha, siis hinnati ka puna- ja süva-pigihuule liigspetsiifiliste praimerite võimet sihtmärkliigid tuvastada.

2013. aastal koguti okkaproovid kahest männinoorendikust kokku 41 puult. Antud proovidest isoleeriti puhaskultuuri *Lophodermium*'i perekonna liikide tunnustega seened. Praimerite testimiseks eraldati 73-st puhaskultuurist DNA ning viidi läbi PCR analüüsid kasutades liigspetsiifilisi praimereid. Katsetati kahte *Lophodermium seditiosum*'i, ühte *L. conigenum*'i ja kahte *L. pinastri* tuvastamiseks disainitud liigspetsiifilist praimerite paari. Analüüside oluline tulemus on, et kõik katsetatud praimerid on kõrge spetsiifilisusega ega anna vale-positiivseid tulemusi lähedaste liikidega. Samas on praimerite tundlikkus erinev ja vähem tundlikud praimerid annavad vale-negatiivseid tulemusi.

Kiire diagnostika teostamiseks on oluline, et *L. seditiosum*'i praimerid suudaksid tuvastada patogeeni esinemise ka okkast eraldatud DNA-st. Selle kontrollimiseks viidi praimeritega läbi PCR analüüsid kokku kümnest okkast eraldatud DNA-ga. Testitud kahest praimerite paarist osutus nii puhaskultuuridest kui ka okkastest eraldatud DNA-ga läbi viidud PCR analüüside tulemuste põhjal tundlikumaks praimerite paar Ls11 ja Ls12.

Kuigi testitud *L. conigenumi* praimeri tundlikkuse kohta järeldusi ei tehtud, oli see spetsiifiline sihtmärkliigile ning seda kasutades oli võimalik eristada väga sarnaseid *L. seditiosum*'i ja *L. conigenum*'i puhaskultuure. Töö oluliseks tulemuseks võib pidada, et 14 puu pruunidest okkastest ja kahe puu rohelistest okkastest õnnestus puhaskultuuri isoleerida *L. conigenum*, mida seni on perekond *Lophodermium* liikidest vähe uuritud.

Uurimuses testitud *L. pinastri* praimeritest on tundlikumad ning sobivad liigi määramiseks praimerid Lp3 ja Lp6. Praimerid LoPi-F ja LoPi-R2 vajavad veel testimist ning nende protokollis ettenähtud reaktsioonitingimusi tuleb parandada.

Töö üheks eesmärgiks oli ka isoleerida puhaskultuuri *L. seditiosum*'i tüved 2013. aasta haiguspuhangust. Töö tulemusena isoleeriti okastest 48 *L. seditiosum*'i kultuuri, mille liik on tuvastatud spetsiifiliste praimeritega, ja 22, mis on määratud morfoloogilistele tunnustele tuginedes. Kasutades kogutud isolaate saab tulevikus uurida patogeeni geneetilist muutlikkust erinevate haiguspuhangute vahel ning sellest tulenevalt hinnata haigusetekiitaja virulentsust.

Kuna morfoloogilistele tunnustele tuginedes on okaste tõve-pigihuulega nakatumise tuvastamine aeganõudev ja sageli vaid määraja hinnangul põhinev, siis on oluline kasutada molekulaarseid meetodeid, mis võimaldavad haigusetekiitaja täpset tuvastamist. Kuna praktilise metsanduse ja teaduslike uurimuste tarvis tehtavates labortöodes on oluline, et okaste nakatumine patogeeniga oleks võimalik tuvastada juba nakkuse latentstes arengujärgus, siis käesoleva töö tulemuste põhjal peaks *L. seditiosum*'i tuvastamiseks eelistama praimereid Ls11 ja Ls12, kuna nimetatud praimerid on sihtmärkliigi tuvastamisel tundlikumad kui praimerid LoSe-F ja LoSe-R.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Atkins, S. D., Clark, I. M.** (2004). Fungal molecular diagnostics: a mini review. – *Journal of Applied Genetics*. Vol. 45, No. 1, pp. 3-15.
- Butin, H.** (2002). *Tree Diseases and Disorders: Causes, biology, and control in forest and amenity trees*. (2. tr.). Oxford: Oxford University Press. 252 pp.
- Capote N., Pastrana, A. M., Aguado, A., Sánchez-Torres, P.** (2012). Molecular Tools for Detection of Plant Pathogenic Fungi and Fungicide Resistance. pp. 151-202. In: *Plant Pathology*. Ed. C. J. Cumagun. 362 pp. [on-line] <http://www.intechopen.com/books/plant-pathology> (26.05.15)
- Diwani, S. A., Millar, C. S.** (1987). Pathogenicity of three *Lophodermium* species on *Pinus sylvestris* L. - *European Journal of Forest Pathology*. Vol. 17, No. 1, pp. 53-58.
- Diwani, S. A., Millar, C. S.** (1990). Sources of inoculum of *Lophodermium seditiosum* on *Pinus sylvestris*. – *European Journal of Forest Pathology*. Vol. 20, No. 1, pp. 1-7.
- Drenkhan, R., Adamson, K.** (2013). *Perekond männi (Pinus) okkahaiguste tekitajate lühimääraja*. Tartu: Eesti Maaülikool, Metsandus- ja maaehitusinstituut, metsakasvatuse osakond. 26 lk. [WWW] http://ph.emu.ee/~drenkhan/okas/manni_okkahaiguste_lyhimaaraja.pdf (20.05.15)
- Drenkhan, R., Adamson, K., Hanso, M.** (2013a). Karantiinse pruunvöötaudi ja teiste ohtlike vöötaudide seire, diagnostika ja tõrjestrategia: KIK projekti täitmise lühiaruanne. Tartu: Eesti Maaülikool, Metsandus- ja maaehitusinstituut, metsakasvatuse osakond. 32 lk. [WWW] <http://www.kik.ee/sites/default/files/Uuringud/projekt2173.pdf> (19.05.15)
- Drenkhan, R., Adamson, K., Jürimaa, K., Hanso, M.** (2014). *Dothistroma septosporum* on firs (*Abies* spp.) in the northern Baltics. – *Forest Pathology*. Vol. 44, No. 3, pp. 250-254.
- Drenkhan, R., Hanso, M.** (2009). Recent invasion of foliage fungi of pines (*Pinus* spp.) to the Northern Baltics. – *Forestry Studies*. Vol. 51, pp. 49-64.

- Drenkhan, R., Hantula, J., Vuorinen, M., Jankovský, L., Müller, M. M.** (2013b). Genetic diversity of *Dothistroma septosporum* in Estonia, Finland and Czech Republic. – *European Journal of Plant Pathology*. Vol. 136, No. 1, pp. 71-85.
- Drenkhan, R., Kurkela, T., Hanso, M.** (2006). The relationship between the needle age and the growth rate in Scots pine (*Pinus sylvestris*): a retrospective analysis by needle trace method (NTM). – *European Journal of Forest Research*. Vol. 125, No. 4, pp. 397–405.
- Eesti seenestik. (2000). [CD-ROM] Tartu: Eesti Põllumajandusülikooli Zooloogia ja Botaanika Instituut. /Toim. K. Kalamees. 558 lk.
- Gardes, M., Bruns, T. D.** (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rusts. – *Molecular Ecology*. Vol. 2, No. 2, pp. 113-118.
- Hanso, M., Drenkhan, R.** (2007). Retrospective Analysis of *Lophodermium seeditiosum* Epidemics in Estonia. – *Acta Silvatica & Lignaria Hungarica*. Special Edition, pp. 31-45.
- Hanso, M., Drenkhan, R.** (2012). Lophodermium needle cast, insect defoliation and growth responses of young Scots pines in Estonia. – *Forest Pathology*. Vol. 42, No. 2, pp. 124-135.
- Hanso, M., Hanso, S.** (2001). Männi-pudetõve epideemia. – *Eesti Mets*. Nr 4-6, lk 22-23.
- Hanso, M., Hanso, S.** (2003). Seenhaiguste genees metsataimlates, -kultuurides ja puistutes. - *Metsanduslikud Uurimused*. Vol. 38, pp. 74-84.
- Heinaru, A.** (2012). Geneetika. Tartu: Tartu Ülikooli Kirjastus. 1135 lk.
- Kattai, K.** (2012). Uus ja karantiinne seenhaigus pruunvöötaud (*Mycosphaerella dearnessii*) Eestis. (Magistritöö). Eesti Maaülikooli Metsandus- ja maaehitusinstituut. Tartu.
- Kohh, E.** (1933). Mõnd männi pudetõvest. – *Eesti Mets*. Nr 5, lk 150-151.
- Lazarev, V., Karadžić, D., Marković, M., Pap, P., Poljaković-Pajnik, L.** (2007). The Most Frequent Lophodermium spp. on Scots Pine and Austrian Pine and Their Role in the Appearance of Other Fungi on the Needles. – *Acta Silvatica & Lignaria Hungarica*. Special Edition, pp. 53-59.
- Martinsson, O.** (1979). Testing Scots Pine for Resistance to Lophodermium Needle Cast. – *Studia Forestalia Suecica*. No. 150, pp. 1-63.
- McCartney, H. A., Foster, J. S., Fraaije, A. B., Ward, E.** (2003). Molecular diagnostics for fungal plant pathogens. - *Pest Management Science*. Vol. 59, No. 2, pp. 129-142.

- McPherson, M. J., Møller, S. G.** (2006). PCR: The Basics. (2. ed.). New York: Taylor & Francis. 292 pp.
- Metsaregister. [WWW] [<http://register.metsad.ee/avalik/>] (15.05.2015)
- Minter, D. W.** (1981). Lophodermium on Pines. Kew: Commonwealth Mycological Institute. 54 pp.
- Minter, D.W., Millar, C. S.** (1980). Ecology and biology of three Lophodermium species on secondary needles of Pinus sylvestris. – *European Journal of Forest Pathology*. Vol. 10, No. 2-3, pp. 169-181.
- Minter, D. W., Staley, J. M., Millar, C. S.** (1978). Four species of *Lophodermium* on *Pinus sylvestris*. – *Transactions of the British Mycological Society*. Vol. 71, No. 2, pp. 295-301.
- Mullis, K. B., Faloona, F. A.** (1987). Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. - *Recombinant DNA*. Part F. /Ed: R. Wu. Methods in Enzymology. Vol. 155, pp. 335-350.
- National Center for Biotechnology Information. - GenBank. [WWW] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> (24.05.15)
- Ostry, M. E., Nicholls, T. H.** (1989). Effect of *Lophodermium seditiosum* on Growth of Pine Nursery Seedlings in Wisconsin. – *Plant Disease*. Vol. 73, No. 10, pp. 798-800.
- Reignoux, S. N., 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*. Vol. 118, No. 9-10, pp. 835-845.
- Reim, P.** (1925). „Lophodermium pinastri“ küsimus. – *Eesti Mets*. Nr 4, lk 79-84.
- Riit, T.** (2014). PCR praimerid taimede seenpatogeenide tuvastamiseks. (Magistritöö). Tartu Ülikooli Loodus- ja Tehnoloogiateaduskond, Molekulaar- ja Rakubioloogia instituut. Tartu.
- Rychlik, W., Spencer, W. J., Rhoads, R. E.** (1990). Optimization of the annealing temperature for DNA amplification *in vitro*. - *Nucleic Acids Research*. Vol. 18, No. 21, pp. 6409-6412.
- Sinclair, W. A., Howard, H. L.** (2005). Diseases of Trees and Shrubs. (2. ed.) London: Cornell University Press. 660 pp.
- Stenström, E., Arvidsson, B.** (2001). Fungicidal Control of *Lophodermium seditiosum* on *Pinus sylvestris* Seedlings in Swedish Forest Nurseries. – *Scandinavian Journal of Forest Research*. Vol. 16, No. 2, pp. 147-154.

Stenström, E., Ihrmark, K. (2005). Identification of *Lophodermium seditiosum* and *L. pinastri* in Swedish forest nurseries using species-specific PCR primers from the ribosomal ITS region. – *Forest Pathology*. Vol. 35, No. 3, pp. 163-172.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. pp. 315-322. In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Eds. M. Innis, D. Gelfand, J. Sninsky, T. White. London: Academic Press. 482 pp.

EARLY DIAGNOSTICS OF LOPHODERMIUM NEEDLE CAST (*LOPHODERMIUM SEDITIOSUM*)

Summary

Lophodermium seditiosum (anamorph *Leptostroma austriaca*) is known as a serious needle pathogen of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.), causing considerable damage in nurseries and young plantations. The ability to detect and accurately identify the pathogen is important in order to initiate preventive methods to avoid the pathogen from spreading. It is difficult to detect if the needles are infected by *L. seditiosum* because of the long latent phase between infection and symptom development. Because of morphologically similar fruiting bodies and pure cultures it is also difficult to distinguish between *Lophodermium* species found in Scots pine needles (*L. seditiosum*, *L. conigenum* and *L. pinastri*).

In this study species-specific PCR primers designed for detection of *Lophodermium seditiosum* and primers specific to close species of it (*L. conigenum* and *L. pinastri*) were tested. It was the first time primer pairs LoSe-F – LoSe-R, LoCon-F – LoCon-R and LoPi-F – LoPi-R2 were used in research. The aim of this study was to assess the specificity and sensitivity of the primers. Based on the results of this study it is possible to decide which primers should be used in the laboratory work for pathogen detection. Another purpose of the study was to isolate the pathogen from epidemic of 2013 for future research.

In the summer of 2013 needle samples were collected from two young Scots pine stands in Põlva County. Samples were collected from 41 trees, one sample containing needles collected only from one tree. In order to isolate fungi from collected samples, 15 apparently healthy, green and 15 brown needles were selected from every sample and about 5 mm long pieces were cut from them. The pieces of needles were surface-sterilized and placed on malt extract agar or pine needle agar on Petri dishes and were incubated at room temperature. Mycelium growing out of the needles, that matched the culture

descriptions of *L. seditiosum*, *L. conigenum* or *L. pinastri*, were transferred to fresh agar plate.

Total of 128 cultures were obtained in that way. Decided on the appearance of the culture, 25 of them turned out not to be any of target-species. Species of 30 cultures were determined based on morphology. In order to test primers, DNA was extracted from 73 cultures. From the 73 cultures that were analysed with species-specific primers 48 turned out to be *L. seditiosum*, 16 *L. conigenum* and 1 *L. pinastri*. If also counting in the morphologically determined cultures, then a total of 66 *L. seditiosum* cultures were obtained for future investigations. All tested primers were specific to target-species and did not amplify DNA of another species while the sensitivity of the primers varied. The primer pair Ls11 – Ls12 was more sensitive in detecting *L. seditiosum* than primer pair LoSe-F – LoSe-R, and the primer pair Lp3 – Lp6 was more sensitive than LoPi-F – LoPi-R2.

It is also important that PCR primers would be able to detect latent infection of *L. seditiosum* in DNA extracted from infected needles. In that way it would be possible to skip the time consuming pure culture isolation. In order to control that, PCR analyses were carried out with DNA extracted from 10 needles. Primers Ls11-Ls12 detected pathogen in 8 needles, primers LoSe-F – LoSe-R in 4 needles.

It is important to detect latent *Lophodermium seditiosum* infection in pine needles in order to avoid transportation and cultivation of infected seedlings that would result in the occurrence of local epidemics. Based on the results of this study primers Ls11 and Ls12 should be used in laboratory for detection of *L. seditiosum*. This primer pair was sensitive and accurate in detecting *L. seditiosum* DNA extracted from pure cultures or from needles. Using cultures of *L. seditiosum* isolated from epidemic of 2013, in the future it is possible to assess changes in the genome of the pathogen between epidemic years and to find out possible changes in the pathogens virulence.

LISAD

Lisa 1. Okaste päritolu ja PCR analüüside tulemused

| DNA nr. | Proovi päritolu | PCR liigi spets. <i>L. seditiosum</i> analüüs (Stenström, Ihrmark 2005) | PCR liigi spets. <i>L. seditiosum</i> analüüs (Riit 2014) |
|---------|--|--|---|
| 3263 | <i>Pinus mugo</i> , 14.11.2013, Venemaa, Sankt-Peterburg. | - | - |
| 3264 | <i>Pinus sylvestris</i> , 13.11.2013, Venemaa, Sankt-Peterburg. | + | - |
| 3266 | <i>Pinus sylvestris</i> , 14.11.2013, Venemaa, Sankt-Peterburg | + | + |
| 3272 | <i>Pinus nigra</i> , 13.11.2013, Venemaa, Sankt-Peterburg. | + | - |
| 3274 | <i>Pinus nigra</i> , 13.11.2013, Venemaa, Sankt-Peterburg. | + | - |
| 3275 | <i>Pinus sylvestris</i> , 14.11.2013, Venemaa, Sankt-Peterburg, noor puu, ~10 a. | + | + |
| 3463 | <i>Pinus sylvestris</i> , 13.10.2014, rohelised okkad, Eesti | + | + |
| 3465 | <i>Pinus sylvestris</i> , 13.10.2014, rohelised okkad, Eesti | + | - |
| 3467 | <i>Pinus sylvestris</i> , 13.10.2014, rohelised okkad, Eesti | - | - |
| 3469 | <i>Pinus sylvestris</i> , 13.10.2014, rohelised okkad, Eesti | + | + |

Märkused:

1. „-“ tähistab negatiivset tulemust ehk praimerid ei tuvastanud antud proovis sihtmärkliigi DNA-d.
2. „+“ tähistab positiivset tulemust ehk praimerid tuvastasid antud proovis sihtmärkliigi DNA.

Lisa 2. Puhaskultuuridest eraldatud DNA-ga läbi viidud PCR analüüside tulemused

| DNA nr. | Proovi tähis | Substraat | Seente spetsiifiline PCR, praimerid ITS4 ja ITS1-F | PCR liigi spets. <i>L. seditiosum</i> analüüs (Stenström, Ihrmark 2005) | PCR liigi spets. <i>L. seditiosum</i> analüüs (Riit 2014) | | PCR liigi spets. <i>L. conigenum</i> analüüs (Riit 2014) | PCR liigi spets. <i>L. pinastri</i> analüüs (Riit 2014) | PCR liigi spets. <i>L. pinastri</i> analüüs (Stenström, Ihrmark 2005) |
|---------|--------------|----------------|--|---|---|---------------|--|---|---|
| | | | | | 35 PCR tsükli | 45 PCR tsükli | | | |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| 3433 | Partsi 3 | pruunid okkad | + | - | - | | - | - | - |
| 3434 | Partsi 6 | pruunid okkad | + | - | - | | - | - | - |
| 3435 | Partsi 8 | pruunid okkad | + | + | - | + | - | | |
| 3436 | Partsi 8 | rohelist okkad | + | + | + | | - | | |
| 3437 | Partsi 16 | pruunid okkad | + | - | - | | + | | |
| 3438 | Partsi 1 | pruunid okkad | + | - | - | | + | | |
| 3439 | Partsi 4 | rohelist okkad | + | + | + | | - | | |
| 3668 | Partsi 2 | pruunid okkad | + | + | - | + | - | | |
| 3669 | Partsi 3 | pruunid okkad | + | - | - | | - | - | - |
| 3670 | Partsi 4 | pruunid okkad | + | - | - | | - | - | - |
| 3671 | Partsi 4 | pruunid okkad | + | + | + | | - | | |
| 3672 | Partsi 5 | pruunid okkad | + | + | - | + | - | | |
| 3673 | Partsi 6 | pruunid okkad | + | + | - | + | - | | |
| 3674 | Partsi 6 | rohelist okkad | + | + | + | | - | | |
| 3675 | Partsi 7 | pruunid okkad | + | - | - | | - | - | - |
| 3676 | Partsi 7 | pruunid okkad | + | - | - | | - | - | - |
| 3677 | Partsi 11 | rohelist okkad | + | - | - | | + | | |
| 3678 | Partsi 13 | rohelist okkad | + | + | + | | - | | |
| 3679 | Partsi 16 | pruunid okkad | + | + | + | | - | | |
| 3749 | Partsi 15 | pruunid okkad | + | + | + | | - | | |
| 3750 | Partsi 20 | pruunid okkad | + | - | - | | + | | |
| 3751 | Partsi 20 | pruunid okkad | + | - | - | | + | | |
| 3752 | Partsi 2 | pruunid okkad | + | - | - | | + | | |
| 3753 | Partsi 7 | pruunid okkad | + | + | + | | - | | |

Lisa 2 järg

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|------|-----------|----------------|---|---|---|---|---|---|----|
| 3754 | Partsi 17 | pruunid okkad | + | - | - | | + | | |
| 3856 | Partsi 1 | rohelist okkad | + | - | - | | - | - | - |
| 3857 | Partsi 18 | pruunid okkad | + | - | - | | + | | |
| 3858 | Partsi 7 | pruunid okkad | + | - | - | | + | | |
| 3859 | Partsi 15 | pruunid okkad | + | - | - | | + | | |
| 3860 | Partsi 14 | pruunid okkad | + | - | - | | + | | |
| 3861 | Partsi 7 | pruunid okkad | + | - | - | | - | - | - |
| 3910 | 343-12 | pruunid okkad | + | + | + | | - | | |
| 3911 | 343-2 | pruunid okkad | + | + | + | | - | | |
| 3912 | 343-3 | pruunid okkad | + | + | + | | - | | |
| 3913 | 343-6 | pruunid okkad | + | - | - | | + | | |
| 3914 | 343-14 | pruunid okkad | + | + | - | + | - | | |
| 3915 | 343-14 | pruunid okkad | + | + | + | | - | | |
| 3916 | 343-1 | pruunid okkad | + | + | + | | - | | |
| 3917 | 343-2 | pruunid okkad | + | + | - | + | - | | |
| 3918 | 343-2 | pruunid okkad | + | + | - | + | - | | |
| 3919 | 343-6 | pruunid okkad | + | + | + | | - | | |
| 3920 | 343-8 | pruunid okkad | + | + | + | | - | | |
| 3921 | 343-8 | pruunid okkad | + | + | + | | - | | |
| 3922 | 343-10 | pruunid okkad | + | + | - | + | - | | |
| 3923 | 343-15 | pruunid okkad | + | + | + | | - | | |
| 3924 | 343-21 | pruunid okkad | + | + | + | | - | | |
| 3925 | 343-21 | pruunid okkad | + | + | - | + | - | | |
| 3926 | 343-15 | pruunid okkad | + | + | + | | - | | |
| 3927 | 343-19 | pruunid okkad | + | + | + | | - | | |
| 3928 | 343-15 | pruunid okkad | + | + | + | | - | | |
| 3929 | Partsi 12 | pruunid okkad | + | + | + | | - | | |
| 3955 | 343-19 | pruunid okkad | + | + | + | | - | | |
| 3956 | 343-14 | pruunid okkad | + | + | + | | - | | |
| 3957 | 343-12 | pruunid okkad | + | + | + | | - | | |
| 3958 | Partsi 11 | pruunid okkad | + | + | + | | - | | |

Lisa 2 järg

| | | | | | | | | | |
|------|-----------|---------------|---|---|---|--|---|---|---|
| 3959 | 343-17 | pruunid okkad | + | + | + | | - | | |
| 3960 | 343-6 | pruunid okkad | + | + | + | | - | | |
| 3961 | 343-5 | pruunid okkad | + | + | + | | - | | |
| 3962 | 343-6 | pruunid okkad | + | + | + | | - | | |
| 3992 | Partsi 1 | pruunid okkad | + | + | + | | - | | |
| 3993 | Partsi 4 | pruunid okkad | + | - | - | | + | | |
| 3994 | Partsi 5 | pruunid okkad | + | + | + | | - | | |
| 3995 | Partsi 7 | pruunid okkad | + | - | - | | + | | |
| 3996 | Partsi 3 | pruunid okkad | + | + | + | | - | | |
| 3997 | Partsi 18 | pruunid okkad | + | + | + | | - | | |
| 3998 | Partsi 18 | pruunid okkad | + | - | - | | + | | |
| 3999 | Partsi 18 | pruunid okkad | + | + | + | | - | | |
| 4000 | 343-19 | pruunid okkad | + | + | + | | - | | |
| 4001 | 343-21 | pruunid okkad | + | - | - | | - | + | + |
| 4002 | 343-5 | pruunid okkad | + | + | + | | - | - | - |
| 4003 | Partsi 5 | pruunid okkad | + | - | - | | + | - | - |
| 4004 | 343-3 | pruunid okkad | + | + | + | | - | | |
| 4005 | 343-20 | pruunid okkad | + | + | + | | - | | |

Märkused:

1. Substraadi all on mõeldud okkaklassi, millest puhaskultuur pärineb.
2. „-“ tähistab negatiivset tulemust ehk praimerid ei amplifitseerinud antud proovi DNA-d.
3. „+“ tähistab positiivset tulemust ehk praimerid amplifitseerisid antud proovi DNA.
4. Hallid lahtrid tähistavad, et vastavat analüüsi ei tehtud.

Lihtlitsents lõputöö salvestamiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks ning juhendaja(te) kinnitus lõputöö kaitsmisele lubamise kohta

Mina, Marili Laas,

(sünnipäev 14/01/1993, 49301142739)

1. annan Eesti Maaülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud lõputöö Mäni-pudetõve tekitaaja (*Lophodermium seditiosum*) varajane diagnostika,

mille juhendajad on Rein Drenkhan ja Kalev Adamson,

- 1.1. salvestamiseks säilitamise eesmärgil,
- 1.2. digiarhiivi DSpace lisamiseks ja
- 1.3. veebikeskkonnas üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile;

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Lõputöö autor

_____ allkiri

Tartu, 26.05.2015

Juhendaja(te) kinnitus lõputöö kaitsmisele lubamise kohta

Luban lõputöö kaitsmisele.

_____ (juhendaja nimi ja allkiri)

_____ (kuupäev)

_____ (juhendaja nimi ja allkiri)

_____ (kuupäev)