

**PRIMERJAVA DVEH METOD ZA DETEKCIJO GLIV *Lecanosticta acicola*,
Dothistroma pini IN *D. septosporum***

Zina DEVETAK¹, Barbara PIŠKUR²

^{1,2} Gozdarski inštitut Slovenije, Oddelek za varstvo gozdov, Ljubljana

¹ Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana

IZVLEČEK

Drevesa iz rodu *Pinus* so ekološko in družbeno-ekonomsko pomemben del slovenskih gozdov. V zadnjih nekaj desetletjih njihovo zdravje in odpornost ogrožata tudi dve bolezn, in sicer rjavenje borovih iglic, ki jo povzročata gliva *Lecanosticta acicola*, ter rdeča pegavost borovih iglic, ki jo povzročata glivi *Dothistroma pini* in *D. septosporum*. V Sloveniji smo rjavenje borovih iglic prvič zaznali leta 2008, rdečo pegavost borovih iglic pa že leta 1971. Vse tri glive na gostiteljskih rastlinah povzročajo podobne simptome, lahko pa so tudi hkrati prisotne. Ker simptomi ne zadostujejo za identifikacijo povzročitelja, so za določitev patogena pomembne robustne molekularne metode. Preverili in primerjali smo učinkovitost dveh različnih obstoječih molekularnih metod detekcije s pomočjo specifičnih začetnih oligonukleotidov: polimerazno verižno reakcijo in polimerazno verižno reakcijo v realnem času. Metodama smo določili kritične parametre in limito detekcije in s tem verificirali njuno implementacijo v Laboratorij za varstvo gozdov na GIS. Dodatno smo primerjali tudi kritične parametre obeh metod.

Gljučne besede: *Dothistroma pini*, *Dothistroma septosporum*, *Lecanosticta acicola*, PCR v realnem času, verifikacija

ABSTRACT

COMPARISON OF TWO METHODS OF DETECTION OF FUNGI *Lecanosticta acicola*, *Dothistroma pini*, AND *D. septosporum*

Pine trees *Pinus spp.* are an ecologically and socio-economically important part of the Slovenian forests. Two pine needle diseases have been affecting vitality and future resilience of pine trees in the last few decades. The brown spot needle blight, caused by *Lecanosticta acicola* and the Dothistroma needle blight (DNB), caused by *Dothistroma pini* and *D. septosporum*. First detected in Slovenia in 1971 (DNB) and 2008 (*L. acicola*), the three fungi produce similar symptoms in the host plant and can even be present simultaneously. As the symptoms are not distinctive enough for identification of the fungus species causing them, robust molecular methods are needed to identify the pathogen infecting the host. We verified and compared the efficiency of

¹ univ. dipl. bioteh., Večna pot 2, SI-1000 Ljubljana in Jamnikarjeva ulica 101, SI-1000 Ljubljana, e-pošta: zina.devetak@gozdis.si

² dr., Večna pot 2, SI-1000 Ljubljana

two molecular methods for detection, a specific end-point PCR and a specific real-time PCR. We determined the critical parameters and the limit of detection for both methods, verifying the implementation of both protocols into the Laboratory of Forest Protection on the Slovenian Forestry Institute. Additionally, we compared the critical parameters of the two methods.

Key words: *Dothistroma pini*, *Dothistroma septosporum*, *Lecanosticta acicola*, real-time PCR, verification

1 UVOD

Bori (*Pinus* L.) predstavljajo pomembno vrsto v slovenskih gozdovih, tako iz ekološkega kot iz družbeno-ekonomskega vidika (povzeto po Ogris *et al.*, 2023). V Sloveniji bori predstavljajo okoli 5,4 % lesne zaloge gozdov (Poročilo ..., 2023). Na zdravstveno stanje borov vplivajo tudi številne bolezni, ki jih povzročajo glive. V zadnjih desetletjih se povečuje intenzivnost bolezni iglic in poganjkov borov. Med njimi sta tudi rjavenje borovih iglic, ki ga povzroča gliva *Lecanosticta acicola* (von Thümen) Sydow ter rdeča pegavost borovih iglic, ki jo povzroča kompleks dveh kriptičnih vrst gliv, *Dothistroma pini* Hulbary in *Dothistroma septosporum* (Dorogin) Morelet. V Evropski uniji (EU) so bile vrste umeščene na sezname karantenskih vrst, zaradi razširjenosti pa so od 2019 razvrščene med regulirane nekarantenske vrste (Izvedbena ..., 2019).

Morfološka identifikacija do nivoja vrste je pri omenjenih glivah, predvsem pri vrstah rodu *Dothistroma*, nezanesljiva, zato so za identifikacijo vrst danes uporabljajo molekularne metode, vključno s klasičnim PCR in PCR v realnem času (povzeto po Barnes *et al.*, 2004, Barnes *et al.*, 2016, Bradshaw, 2004, Ioos *et al.*, 2010, Piškur, 2021, Sadiković *et al.*, 2019, Schneider *et al.*, 2019). Ob uvedbi novih, že validiranih diagnostičnih metod ali ob razširitvi nabora matriksov, na katerih že vpeljane metode uporabljamo, je v posameznem laboratoriju potrebno vedno preveriti parametre izvedbe in potrditi, da se metoda v posameznem matriksu lahko izvede dovolj učinkovito. V Laboratoriju za varstvo gozdov Gozdarskega inštituta Slovenije redno analiziramo vzorce dreves iz rodu *Pinus* s sumom na bolezni, zato je pomembno, da imamo implementirane robustne metode za detekcijo gliv, ki povzročajo rdečo pegavost in rjavenje borovih iglic.

2 MATERIALI IN METODE

Preverili smo izvedbo dveh različnih metod detekcije treh vrst gliv *L. acicola*, *D. pini* in *D. septosporum* v ekstraktu DNA borovih iglic, ki smo mu dodali DNA tarčnih vrst gliv. Primerjali smo klasični PCR (PCR) in PCR v realnem času (qPCR), ki so ju razvili (Ioos *et al.*, 2010) in sta del diagnostičnega standarda EPPO PM 7/046 (03) *Lecanosticta acicola* (formerly *Mycosphaerella dearnessii*), *Dothistroma septosporum* (formerly *Mycosphaerella pini*) and *Dothistroma pini* (EPPO, 2015), obe metodi pa temeljita na uporabi specifičnih začetnih oligonukleotidov (in sonde).

Za oceno kritičnih parametrov smo pridobili neokužene iglice (*Pinus* sp., odsotnost tarčnih gliv potrjena po standardu PM7/046 (03) (EPPO, 2015)), izolate čistih kultur

tarčnih in netarčnih gliv iz Zbirke živih kultur Laboratorija za varstvo gozdov (ZLVG) ter posamezne strome *D. septosporum* (Preglednica 1).

Preglednica 1: Tipi materiala in vrste, uporabljene v postopkih celokupne ekstrakcije DNA.

Tip materiala	Vrsta (številka izolata čiste kulture)
Zdrave iglice (rastlinski material)	<i>Pinus</i> sp.
Posamezne strome	<i>Dothistroma septosporum</i>
Izolati čistih kultur – tarčne glive	<i>Lecanosticta acicola</i> (ZLVG284)
	<i>Dothistroma</i> (ZLVG359 = CBS134690)
	<i>Dothistroma septosporum</i> (ZLVG361 = CBS134691)
Izolati čistih kultur – netarčne glive	<i>Diplodia pinea</i> (ZLVG 902)
	<i>Neofusicoccum parvum</i> (ZLVG 960)
	<i>Botryosphaeria dothidea</i> (ZLVG961)

Iz vseh naštetih materialov smo opravili ekstrakcijo celokupne DNA z ekstrakcijskim kitom Nucleospin Plant II (Macherey Nagel, Nemčija) po navodilih proizvajalca z nekaj modifikacijami: homogenizacija 2 x 30 s pri 7800 rpm z vmesnim premorom 20 s (homogenizator Precellys Evolution, Bertin, Francija) in tubice Lysing Matrix A (MP Biomedicals, Združene države Amerike), čas inkubacije smo podaljšali na 1 uro, končno elucijo pa smo naredili z 50 µl priloženega elucijskega pufra. Ekstraktom DNA smo določili koncentracijo s pomočjo spektrofotometra Biophotometer Plus (Eppendorf, Nemčija) in µCuvette (Eppendorf, Nemčija).

711

Pri posameznem postopku PCR in qPCR smo pridobili kritične parametre analitične občutljivosti in ponovljivosti s pomočjo treh redčitvenih vrst DNA tarčnih vrst v matriksu DNA zdravih iglic v razmerju 1:10. Limita detekcije je bila določena pri redčitvi, kjer je postopek pri vseh ponovitvah zaznal prisotnost DNA tarčne glive. Analitično specifičnost (ekskluzivnost) smo preverili z navzkrižnim testiranjem tarčnih vrst in testiranjem netarčnih vrst gliv. Pri qPCR smo selektivnost preverili s primerjavo Cq vrednosti s t-testom za neodvisna vzorca s stopnjo zaupanja 95% s pomočjo statističnega programa R različica 4.2.2 (R Core Team, 2022) med postopki z redčitvenimi vrstami DNA tarčnih vrst v matriksu DNA zdravih iglic in postopki redčitvenih vrst, kjer je ekstrakt DNA zdravih iglic nadomestila voda (Molecular Grade Water, Sigma Aldrich, Združene države Amerike). S stopnjo uspešnosti zaznave ekstraktov posameznih strom *D. septosporum* smo preverili tudi analitično občutljivost ekstrakcije.

Mešanico za PCR (20 µl) smo pripravili z Amplitaq Gold 360 MM (ThermoFisher Scientific, Združene države Amerike): 0.4 µl GC Enhancer, posamezen par začetnih oligonukleotidov (loos *et al.*, 2010) v 0,6 µM koncentraciji (Sigma Aldrich, Združene države Amerike) ter 2 µl DNA. V primeru redčitvenih vrst v matriksu zdravih borovih iglic smo v reakcijo dodali 1 µl DNA v posamezni redčitvi in 1 µl (33, 6 ng) DNA zdravih borovih iglic. Pogoji PCR so sledili pogojem, ki so jih opredelili loos *et al.* (2010), reakcije PCR pa so potekale na napravi X50S (Eppendorf, Nemčija). Uspešnost postopka je bila ocenjena s prisotnostjo pomnožka pričakovane dolžine (193 bp pri *D. pini*, 237 bp pri *L. acicola* in 231 bp pri *D. septosporum*) v 1 % agaroznem gelu.

Pri qPCR je bila detekcija posameznih gliv izvedena v ločenih postopkih (monopleksih). Reakcijsko mešanico (10 µl) smo pripravili s Perfecta qPCR ToughMix LowRox (QuantaBio, Združene države Amerike): posamezen par začetnih oligonukleotidov (loos *et al.*, 2010) v 0,3 µM koncentraciji (IDT, Združene države Amerike) in ustrezne sonde v 0,1 µM koncentraciji po loos *et al.* (2010), vendar modificirane z barvilom FAM na 5' in BHQ1 na 3' koncu. V reakcijo smo dodali tudi 2 µl DNA v posamezni redčitvi. V primeru

redčitvenih vrst v matriksu zdravih borovih iglic sta bila v reakcijo dodana 1 µl DNA v posamezni redčitvi in 1 µl (33, 6 ng) DNA zdravih borovih iglic. Reakcije so bile izvedene na napravi QuantStudio 3 (Applied Biosystems, Združene države Amerike) po postopku s strani Ios *et al.* (2010), s podaljšano začetno denaturacijo (15 min) in povečanim številom ciklov (50). Ovrednotenje rezultatov in izris grafov smo izvedli v programu QuantStudio Design & Analysis (ThermoFisher Scientific, Združene države Amerike).

3 REZULTATI IN RAZPRAVA

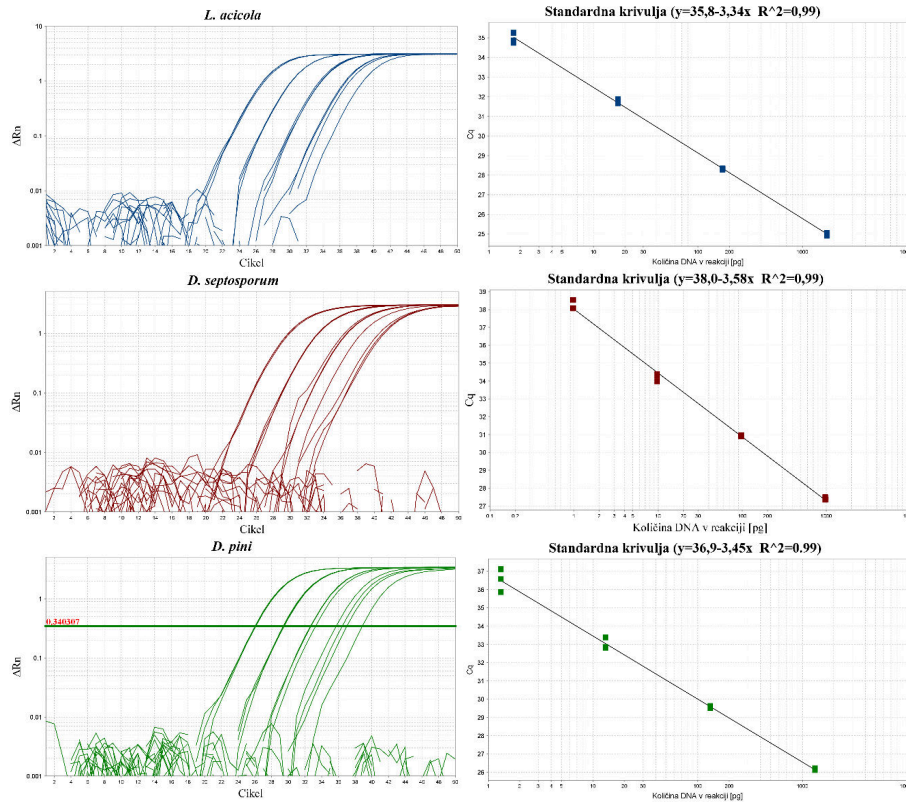
Limita 100% detekcije je bila pri obeh metodah za vse tri tarčne organizme pri enaki redčitvi, 1: 10⁵. Pri *L. acicola* je to pomenilo 1,72 pg DNA na reakcijo, pri *D. septosporum* 0,97 pg DNA na reakcijo, pri *D. pini* pa 1,32 pg DNA na reakcijo (Preglednica 2). Limita detekcije v originalni publikaciji je bila določena pri stopnji detekcije 95% in je znašala 2 pg DNA na reakcijo za postopke PCR in 0,2 pg na reakcijo za postopke qPCR. Pri postopkih PCR smo tako zaznali nižjo koncentracijo kot Ios *et al.* (2010), pri postopkih qPCR pa nekoliko višjo, vendar še vedno v primerljivem velikostnem razredu. Kljub primerljivosti limite 100% detekcije med obema metodama pa se je metoda qPCR izkazala kot bolj uspešna pri detekciji nižjih koncentracij gliv (Preglednica 2). Postopki detekcije za vse tri tarčne glive so bili dovolj učinkoviti (povprečni R >0.99 in povprečna učinkovitost >97%), da so uporabni za detekcijo v vzorcih borovih iglic (Slika 1).

712

Preglednica 2: Rezultati testiranja redčitvenih vrst posameznih tarčnih gliv *L. acicola*, *D. septosporum* in *D. pini* v matriksu DNA ekstrakta zdravih borovih iglic z PCR in qPCR metodo.

Redčitev	<i>L. acicola</i>			<i>D. septosporum</i>			<i>D. pini</i>		
	Količina DNA v reakciji [pg]	Detekcija (%)		Količina DNA v reakciji [pg]	Detekcija (%)		Količina DNA v reakciji [pg]	Detekcija (%)	
		PCR	qPCR		PCR	qPCR		PCR	qPCR
1:10	1720	100	100	973.33	100	100	1320	100	100
1:100	172	100	100	97.33	100	100	132	100	100
1:1000	17,2	100	100	9.73	100	100	13,2	100	100
1:10 ⁴	1,72	100	100	0.97	100	100	1,32	100	100
1:10 ⁵	0,172	0	67	0.097	11	56	0,132	33	44
1:10 ⁶	0,0172	0	33	0.01	0	0	0,013	11	22
1:10 ⁷	0,00172	0	0	0.001	0	0	0,001	0	0

713



Slika 1: Graf pomnožitve redčitvene vrste DNA ekstraktov posameznih gliv v matriksu DNA zdravih borovih iglic (levo) in umeritvena krivulja, pridobljena med istim postopkom (desno).

Analična občutljivost - zaznava *D. septosporum* v celokupnem ekstraktu DNA iz 1 same strome je bila pri obeh uporabljenih metodah detekcije 66,6 % (Preglednica 3).

Preglednica 3: Stopnja uspešnosti zaznave *D. septosporum* v ekstraktih DNA iz strom.

Količina materiala, iz katere je bil pridobljen ekstrakt celokupne DNA	PCR			qPCR		
	P	N	Detekci	P	N	Detekci
5 strom <i>D. septosporum</i>	2	0	100 %	2	0	100 %
1 stroma <i>D. septosporum</i>	2	1	66,6 %	2	1	66,7 %

Pri detekciji s pomočjo qPCR matriks ekstrakta DNA iz zdravih borovih iglic ni statistično pomembno vplival na višino Cq vrednosti (Preglednica 4, 5 in 6). Za vse tri tarčne glive so p-vrednosti primerjave postopkov v obeh matriksih presegale vrednost 0,05 ($p = 0,996$ pri *L. acicola*, $p = 0,957$ pri *D. septosporum*, $p = 0,892$ pri *D. pini*). Ker

vsebnost inhibitorjev v iglicah najverjetneje ni konstantna, smo v standardni diagnostični postopek za detekcijo vseh treh tarčnih gliv vključili tudi testiranje redčitve ekstrakta v razmerju 1:10 in s tem še dodatno zmanjšali tveganje za morebitno inhibicijo.

Preglednica 4: Primerjava analitične občutljivosti detekcije *L. acicola* z in brez dodatka ekstrakta zdravih borovih iglic (33,5 ng na reakcijo).

Redčitev	Količina DNA v reakciji [pg]	V matriksu DNA borovih iglic		V matriksu MGW	
		Povpr. Cq (± SD)	Detekcija	Povpr. Cq (± SD)	Detekcija
1:10	1720	24,924 (± 0,080)	100 %	24,918 (± 0,058)	100 %
1:100	172	28,173 (± 0,288)	100 %	28,193 (± 0,116)	100 %
1:1000	17,2	31,472 (± 0,138)	100 %	31,632 (± 0,080)	100 %
1:10 ⁴	1,72	35,553 (± 1,225)	100 %	35,414 (± 0,487)	100 %
1:10 ⁵	0,172	38,122 (± 0,141)	66,7 %	37,618 (± 0,502)	66,7 %
1:10 ⁶	0,0172	/	0 %	/	0 %
1:10 ⁷	0,00172	/	0 %	/	0 %

714

Preglednica 5: Primerjava analitične občutljivosti detekcije *D. pini* z in brez dodatka ekstrakta zdravih borovih iglic (33,5 ng na reakcijo).

Redčitev	Količina DNA v reakciji [pg]	Matriks DNA borovih iglic		Matriks MGW	
		Povpr. Cq (± SD)	Detekcija	Povpr. Cq (± SD)	Detekcija
1:10	1320	26,011 (± 0,038)	100 %	26,036 (± 0,069)	100 %
1:100	132	29,400 (± 0,060)	100 %	29,319 (± 0,021)	100 %
1:1000	13,2	32,847 (± 0,320)	100 %	32,614 (± 0,211)	100 %
1:10 ⁴	1,32	36,358 (± 0,632)	100 %	35,769 (± 0,682)	100 %
1:10 ⁵	0,132	/	0 %	45,024	33,3 %
1:10 ⁶	0,013	38,831	33,3 %	/	0 %
1:10 ⁷	0,001	/	0 %	/	0 %

Preglednica 6: Primerjava analitične občutljivosti detekcije *D. septosporum* z in brez dodatka ekstrakta zdravih borovih iglic (33,5 ng na reakcijo).

Redčitev	Količina DNA v reakciji [pg]	Matriks DNA borovih iglic		Matriks MGW	
		Povpr. Cq (± SD)	Detekcija	Povpr. Cq (± SD)	Detekcija
1:10	973,33	26,011 (± 0,038)	100 %	26,039 (± 0,069)	100 %
1:100	97,33	29,400 (± 0,060)	100 %	29,319 (± 0,021)	100 %

1:1000	0,97	32,847 (\pm 0,320)	100 %	32,614 (\pm 0,211)	100 %
1:10 ⁴	0,097	36,358 (\pm 0,632)	100 %	35,769 (\pm 0,682)	100 %
1:10 ⁵	0,01	/	0 %	45,024	33,3 %
1:10 ⁶	0,01	38,831	33,3 %	/	0 %
1:10 ⁷	0,001	/	0 %	/	0 %

Pri preverjanju analitične specifičnosti – ekskluzivnosti pri nobeni od obeh metod nismo dobili lažno pozitivnega rezultata, tako da sta za testirane izolate obe metodi za vse tri glive 100% ekskluzivni.

4 SKLEPI

Molekularne metode omogočajo hitro detekcijo gliv povzročiteljic glivnih bolezni, tudi neposredno v rastlinskem tkivu. V okviru verifikacije smo glede na pridobljene kritične parametre ocenili, da sta obe metodi za detekcijo gliv *L. acicola*, *D. pini* in *D. septosporum* neposredno iz rastlinskega materiala dovolj natančni, specifični in robustni za uporabo v diagnostiki vzrokov bolezni v Laboratoriju za varstvo gozdov Gozdarskega inštituta Slovenije.

715

5 ZAHVALA

Raziskava je bila opravljena v okviru programske skupine P4-0107, ki jo financira Javna agencija za raziskovalno dejavnost RS ter v okviru Strokovnih nalog s področja zdravstvenega varstva rastlin v gozdarstvu (UVHVVR). Za pomoč pri laboratorijskem delu se avtorici zahvalujeta Špeli Hočevar in Špeli Jagodic.

6 LITERATURA

- Barnes, I., Crous, P., Wingfield, B. in Wingfield, M. 2004. Multigene phylogenies reveal that red band needle blight of *Pinus* is caused by two distinct species of *Dothistroma*, *D. septosporum* and *D. pini*. *Studies in Mycology*, 50, 551-565.
- Barnes, I., Van Der Nest, A., Mullett, M. S., Crous, P. W., Drenkhan, R., Musolin, D. L. in Wingfield, M. J. 2016. Neotypification of *Dothistroma septosporum* and eptyfication of *D. pini*, causal agents of *Dothistroma* needle blight of pine. *Forest Pathology*, 46, 388-407.
- Bradshaw, R. E. 2004. *Dothistroma* (red-band) needle blight of pines and the dothistromin toxin: a review. *Forest Pathology*, 34, 163-185.
- Eppo 2015. PM 7/46 (3) *Lecanosticta acicola* (formerly *Mycosphaerella dearnessii*), *Dothistroma septosporum* (formerly *Mycosphaerella pini*) and *Dothistroma pini*. *EPPO Bulletin*, 45, 163-182.
- Ioos, R., Fabre, B., Saurat, C., Fourier, C., Frey, P. in Marçais, B. 2010. Development, comparison, and validation of real-time and conventional PCR tools for the detection of the fungal pathogens causing brown spot and red band needle blights of pine. *Phytopathology*, 100, 105-114.
- Izvedbena uredba Komisije (EU) 2019/2072 z dne 28.novembra 2019 o določitvi enotnih pogojev za izvajanje Uredbe (EU) 2016/2031 Evropskega parlamenta in Sveta, kar zadeva ukrepe varstva pred škodljivimi organizmi rastlin, ter razveljavitvi Uredbe Komisije (ES) št.690/2008 in spremembi Izvedbene uredbe Komisije (EU) 2018/2019. 2019. Uradni list Evropske unije, L 319: 1–279

- Ogris, N., Drenkhan, R., Vahalík, P., Cech, T., Mullett, M. in Tubby, K. 2023. The potential global distribution of an emerging forest pathogen, *Lecanosticta acicola*, under a changing climate. *Frontiers in Forests and Global Change*, 6, 1221339.
- Piškur, B. 2021. *Dothistroma septosporum* (Dorogin) M. Morelet (1968) in *Dothistroma pini* Hulbary (1941), sin. *Scirrhia pini*, sin. *Mycosphaerella pini*: rdeča pegavost borovih iglic. V: Ogris, N. (ur.) Najpomembnejši povzročitelji poškodb tujerodnih vrst gozdnega drevja in sadik domačih vrst gozdnega drevja ter ukrepi na sadikah. Ljubljana: Gozdarski inštitut Slovenije, Založba Silva Slovenica, 2021: 178-179.
- Poročilo Zavoda za gozdove Slovenije o gozdovih za leto 2022. 2023. Ljubljana, Zavod za gozdove Slovenije
- Sadiković, D., Piškur, B., Barnes, I., Hauptman, T., Diminić, D., Wingfield, M. J. in Jurc, D. 2019. Genetic diversity of the pine pathogen *Lecanosticta acicola* in Slovenia and Croatia. *Plant Pathology*, 68, 1120-1131.
- Schneider, S., Jung, E., Queloz, V., Meyer, J. B. in Rigling, D. 2019. Detection of pine needle diseases caused by *Dothistroma septosporum*, *Dothistroma pini* and *Lecanosticta acicola* using different methodologies. *Forest Pathology*, 49, e12495.
- Team, R. C. 2022. R: A language and environment for statistical computing. 4.2.1 ed. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.