

## ДІАГНОСТИКА ГРИБІВ РОДУ *FUSARIUM* У СІЯНЦЯХ СОСНИ ЗВИЧАЙНОЇ МЕТОДОМ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ

Найбільш поширеною та небезпечною хворобою сіянців хвойних порід є інфекційне вилягання, збудниками якого є гриби з родів *Fusarium*, *Alternaria*, *Botrytis* та інші. Актуальним завданням є розроблення чутливих і селективних методів ідентифікації патогену. Представлено методику детекції ДНК грибів роду *Fusarium* у тканинах сіянців сосни звичайної шляхом полімеразно-ланцюгової реакції із видоспецифічними праймерами. Розроблена методика дає змогу визначати 0,1 нг ДНК *Fusarium sporotrichella* на високому фоні ДНК сосни, що перевищує кількість ДНК патогену в десять тисяч разів. Методику апробовано на різновікових сіянцях сосни звичайної, вирощених у нестерильних умовах закритого ґрунту. Проведено діагностику тканин сіянців сосни, що вилягли, та візуально здорових рослин на присутність ДНК фузаріумів.

**Ключові слова:** фузаріоз, діагностика, сіянці сосни звичайної, полімеразно-ланцюгова реакція

**Вступ.** У природному середовищі сосна звичайна постійно стикається з різними стресорами біотичної та абіотичної природи. Найбільш небезпечними біотичними стресорами протягом усього онтогенезу цієї рослини є патогенні гриби. Вони уражають проростки, хвою молодих саджанців, деревину та корені зрілих дерев. Однією з основних проблем вирощування садивного матеріалу у лісових розсадниках є присутність збудників інфекційного вилягання. Виникнення і розвиток захворювань, головним чином, пов'язане з первинним ослабленням та зниженням стійкості сіянців внаслідок довготривалого несприятливого впливу кліматичних факторів або через порушення агротехніки вирощування. В умовах перезволоження у закритому ґрунті сіянці сосни

<sup>1</sup> ЮСИПОВИЧ Юрій Михайлович – кандидат біологічних наук, молодший науковий співробітник, Національний лісотехнічний університет України, м. Львів, Україна. Тел.: +38-(032)-237-95-23. E-mail: j-jusse@mail.ru

<sup>2</sup> КОВАЛЬОВА Валентина Андріївна – кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник, Національний лісотехнічний університет України, м. Львів, Україна. Тел.: +38-(032)-237-95-23. E-mail: vakovaleva@mail.ru

<sup>3</sup> ГУТ Роман Тарасович – член-кореспондент ЛАН України, доктор біологічних наук, професор кафедри лісівництва, Національний лісотехнічний університет України, м. Львів, Україна. Тел.: +38-(032)-237-95-23. E-mail: rgoutmollab@ukr.net

найчастіше вилягають внаслідок інфікування грибами роду *Fusarium*, *Alternaria*, *Botrytis*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Phytophthora*, що триває декілька тижнів і може пошкоджувати до 100 % посівів [3]. Процес визначення виду чи роду патогенного гриба традиційними мікробіологічними методами є тривалим у часі. Зазвичай, візуальні ознаки поширення інфекції помітні лише в момент масової загибелі сіянців, коли засоби захисту застосовувати вже запізно. Новітні молекулярні методи діагностики є дуже чутливими, точними і оперативними щодо детекції ДНК патогенного гриба у тканинах сіянців на ранніх етапах розвитку хвороби. Одним із таких методів є полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) із використанням специфічних до патогенів праймерів.

Мета роботи – розробити методику ідентифікації ДНК грибів роду *Fusarium* у тканинах сіянців сосни звичайної методом ПЛР.

**Об'єкти і методика досліджень.** Об'єкт досліджень – здорові та уражені інфекційним виляганням сіянці сосни звичайної. Предмет досліджень – молекулярно-генетична ідентифікація ДНК грибів з роду *Fusarium* у рослинному матеріалі.

У роботі використано культури грибів *Fusarium sporotrichella* УКМ F-55297 і *Fusarium solani* УКМ F-55793, які люб'язно надано Інститутом мікробіології і вірусології НАН України, а культури грибів *Fusarium* sp.1861, *Fusarium* sp. 20232, *Alternaria alternata* 2662 і *Phytophthora citophthora* – університетом Кордобі, Іспанія. Чисту культуру кореневої губки *Heterobasidion annosum* s.s. отримано із плодового тіла і проаналізовано мікроскопічно та за допомогою ПЛР зі специфічними до неї праймерами [4].

Сіянці сосни звичайної вирощували протягом п'яти місяців у контейнері з нестерильним ґрунтом (субстрат на основі торфу із рН 4,5) за кімнатної температури і високої вологості повітря, що сприяло інтенсивному розвитку грибної мікрофлори. Для визначення патогену використовували сіянці сосни звичайної, які вилягли у перший тиждень та через два місяці після появи сходів, а також п'ятимісячні сіянці, які вижили в умовах високого інфекційного фону. Контрольною групою слугували проростки сосни, пророщені у стерильних

умовах у чашках Петрі на фільтрувальному папері, змоченому дистильованою водою за температури 25°C.

Виділення сумарної ДНК здійснювали з усіх органів проростків і сіянців за допомогою ЦТАБ-методу [1, 2]. Полімеразну ланцюгову реакцію для визначення грибів роду *Fusarium* проводили за допомогою праймерів, запропонованих Kamel A. Abd-Elsalam та ін. [5], прямого ITS-Fu-f: 5'-CAACTCCCAAACCCCTGTGA-3' та зворотного ITS-Fu-r: 5'-GCGACGATTACCAGTAACGA-3'. Реакційна суміш для ПЛР містила 2,5 мМ MgCl<sub>2</sub>; 0,2 мМ дНТФ (Fermentas); 0,8 пМ кожного праймера, від 0,5 мкг до 0,01 пг ДНК та 1 U TaqPol ДНК-полімерази (Fermentas). ПЛР здійснювали за допомогою ампліфікатора Thermal Cycler TC020A (Labnet International Inc., США). Умови ПЛР: початкова денатурація – 95°C, 5 хв та 30-35 циклів: денатурація – 95°C, 30 с; віджиг – 60°C, 30 с; елонгація – 72°C, 50 с і після останнього циклу ще 7 хв елонгації за температури 72°C. Очікувані довжини ампліфікованих продуктів – 398 пар нуклеотидів (п.н.) та 550 п.н. Продукти ПЛР розділяли в 2%-му агарозному гелі у 0,5%-му трис-боратному буфері, рН 8,3, забарвлювали бромистим етидієм (0,5 мкг/мл), візуалізували за допомогою УФ-трансліюмінатора.

**Результати досліджень.** На сьогодні для ідентифікації представників роду *Fusarium* розроблено низку праймерів, як специфічних до цього роду, так і універсальних для визначення будь-якого виду грибів [6-8, 10]. В основному, їх створено на основі послідовностей окремих ділянок рибосомальної ДНК. Так, зокрема, ITS-праймери (ITS1, ITS4) ампліфікують фрагмент ITS1-5.8S rDNA-ITS2 [10]. Ці праймери були використані Baranov et al. для ідентифікації грибів, які колонізують сіянці сосни звичайної у лісових розсадниках, шляхом секвенування ампліфікованих фрагментів [9]. Цікаво, що гриби роду *Fusarium* у цьому дослідженні не було визначено, хоча вони є одними з основних збудників інфекційного вилягання сіянців. Варто зазначити, що необхідною умовою успішного використання методу ПЛР для діагностики ДНК збудників захворювань у тканинах рослин є висока чутливість і специфічність праймерів.

Проведений аналіз пари праймерів ITS1 та ITS4 показав, що чутливість ПЛР за участі цієї пари сягає 0,2 нг ДНК (рис. 1, доріжка 16, продукт 550 п.н.), що є недостатнім для ідентифікації патогену безпосередньо у рослинному матеріалі.

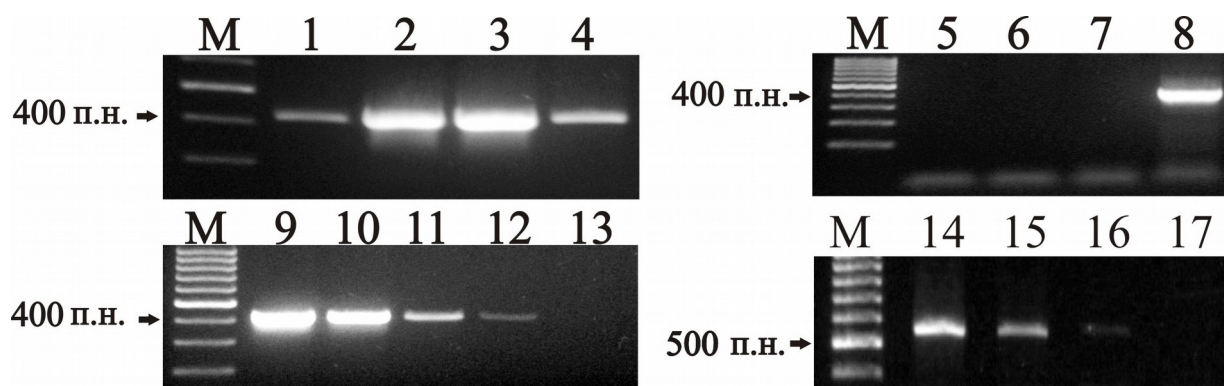
Для детекції грибів роду *Fusarium* у тканинах сіянців сосни звичайної використано таксон-специфічні праймери ITS-Fu-f/ITS-Fu-r [5]. Специфічність праймерів підтверджено у ПЛР із культурами грибів, що належать до різних таксономічних груп. Продуктів ампліфікації не знайдено у взірцях із ДНК *Alternaria alternata* (Fr.), *Phytophthora citophthora* (R.E. Sm., E.H. Sm.) Leonian і *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. (див. рис. 1, доріжки 5-7). Продукт на рівні 400 п.н. отримано із ДНК *Fusarium solani*, *Fusarium sporotrichella*, *Fusarium* sp.1861 та *Fusarium* sp. 20232 (див. рис. 1, доріжки 1-4, 8).

На перебіг реакції можуть впливати домішки рослинної ДНК. Для з'ясування впливу цього фактора на чутливість ПЛР використано серійне розведення ДНК *F. sporotrichella* від 100 пг до 0,01 пг у суміші з ДНК сосни від 100 пг до 10 нг (рис. 1, доріжки 9-13). Після проведення 30 циклів ПЛР 0,1 пг ДНК *F. sporotrichella* детектувалось на високому фоні ДНК сосни, що перевищував кількість ДНК патогену в десять тисяч разів (див. рис. 1, доріжка 12).

Для того щоб досягнути такої високої чутливості і специфічності реакції, було оптимізовано умови ПЛР для пари ITS-Fu-f / ITS-Fu-r: початкова денатурація за температури 95°C тривалістю 5 хв і 30 циклів (95°C, 30с; 60°C, 30с; 72°C, 50 с) і після останнього циклу ще 7 хв елонгації за температури 72°C.

Апробацію методики проведено на сіянцях сосни звичайної, вирощених за кімнатної температури у контейнері за умов, сприятливих для росту грибної мікрофлори. Протягом першого тижня після появи сходів виявлено незначне вилягання сіянців, які відбирали для діагностики на фузаріоз. Після двох місяців вирощування спостережено поодинокі поширення міцелію на нижніх частинах пагонів (рис. 2, Б), а також їх масове вилягання. Внаслідок ПЛР-аналізу на присутність ДНК фузаріуму у тканинах сіянців визначено присутність ДНК патогену у семидобових і двомісячних сіянців, що вилягли

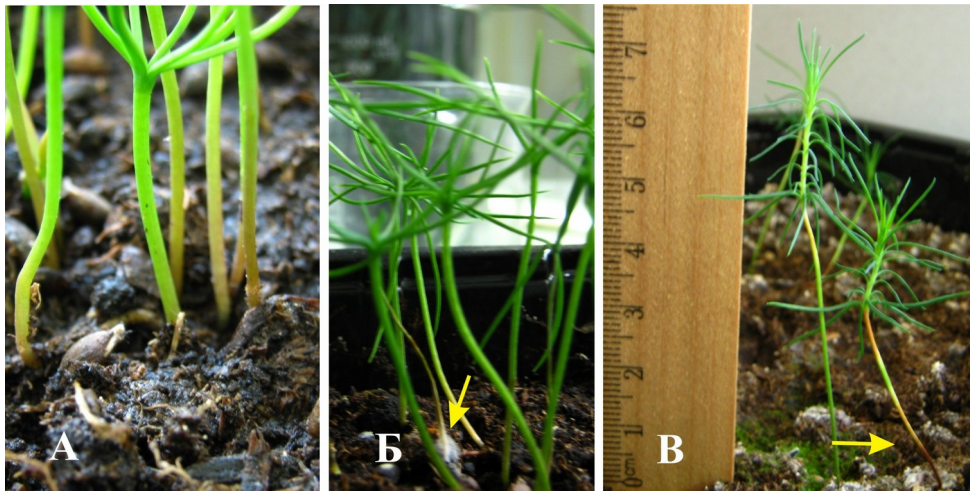
(рис. 3, доріжки 5-7, 12, 13). Окрім того, візуально здорові двомісячні сіянці, які було відібрано для аналізу, також містили ДНК патогену (див. рис. 3, доріжки 1-4), що було причиною подальшого їхнього відпаду, який становив 90% після п'яти місяців вирощування.



**Рис. 1. Специфічність і чутливість ПЛР із парами праймерів ITS-Fu-f/ITS-Fu-r та ITS1/ITS4:** М – маркери 100 п.н; 1-8 – кількість ДНК в реакції - 0,5 мкг. 1-13 – ПЛР з парою праймерів ITS-Fu-f/ITS-Fu-r; 14-17 – ПЛР із праймерами ITS1/ITS4; 1 – ДНК *Fusarium solani*; 2 – *Fusarium sporotrichella*; 3 – *Fusarium sp.*1861; 4 – *Fusarium sp.* 20232; 5 – *Alternaria alternata*; 6 – *Phytophthora citophthora*; 7 – *Heterobasidion annosum*; 8 – *Fusarium sporotrichella*; 9 – 100 пг ДНК *Fusarium sporotrichella* + 1 пг ДНК *Pinus sylvestris*; 10 – 10 пг ДНК *F. sporotrichella* + 10 пг ДНК *P. sylvestris*; 11 – 1 пг ДНК *F. sporotrichella* + 100 пг ДНК *P. sylvestris*; 12 – 0,1 пг ДНК *F. sporotrichella* + 1 нг ДНК *P. sylvestris*; 13 – 0,01 пг ДНК *F. sporotrichella* + 10 нг ДНК *P. sylvestris*; 14 – 20 нг ДНК *F. Sporotrichella*; 15 – 2 нг ДНК *F. sporotrichella*; 16 – 0,2 нг ДНК *F. sporotrichella*; 17 – 0,02 нг ДНК *F. sporotrichella*

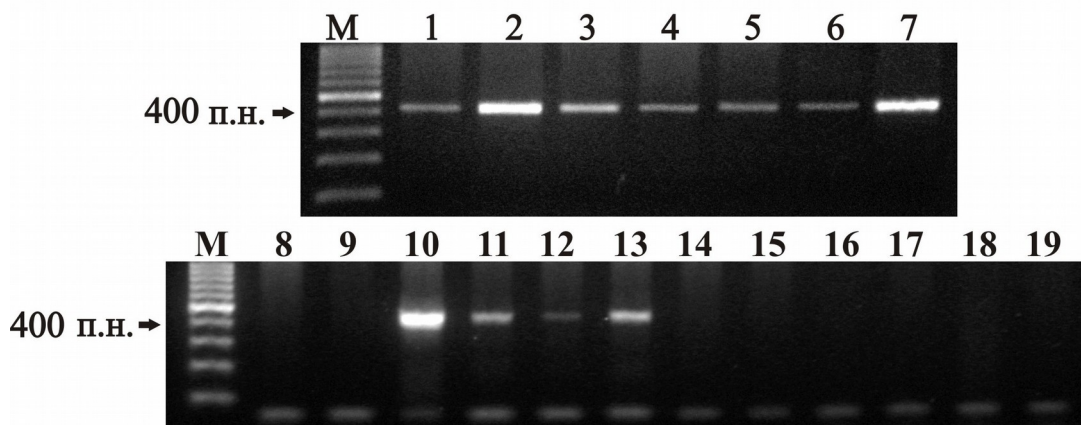
Для аналізу на присутність фузаріуму відібрано стійкі до ураження грибами сіянці п'ятимісячного віку, у яких почався процес інтенсивної лігніфікації пагонів, який робив їх нечутливими до ураження фузаріозами (див. рис. 2, В). У деяких із цих сіянців також визначено ДНК фузаріуму (див. рис. 3, доріжки 10-11), що свідчить про латентний перебіг інфекційного процесу. Варто зазначити, що у 50% сіянців, які вилягли, не було виявлено ДНК *Fusarium sp.* (див. рис. 3, доріжки 14, 15). Це є свідченням того, що крім *Fusarium sp.*, сіянці

були масово колонізовані й іншими патогенними грибами, які здатні спричиняти вилягання.



**Рис. 2. Вирощування сіянців сосни у нестерильних умовах закритого ґрунту:** А – семидобові неуражені сіянці; Б – стрілкою показано двомісячний сіянець, уражений міцелієм; В – 5-місячні сіянці з ознаками лігніфікації стебел

Для негативного контролю використано семидобові проростки сосни звичайної, які вирощувались у стерильних умовах. У жодної із цих рослин ДНК *Fusarium sp.* не було знайдено (див. рис. 3, доріжки 16-19).



**Рис. 3. Детекція ПЛР-методом *Fusarium sp.* у тканинах сіянців сосни звичайної:** 1-4 – двомісячні візуально здорові сіянці; 5-7 – семидобові сіянці, які вилягли; 8-11 – 5-місячні візуально здорові сіянці; 12-15 – двомісячні сіянці, які вилягли; 16-19 – семидобові проростки, вирощені у стерильних умовах у чашці Петрі

**Висновки.** Пропонований метод дає змогу у візуально здорових сіянців на ранніх етапах розвитку захворювання діагностувати ДНК *Fusarium sp.* і диференціювати його від інших збудників інфекційного вилягання сіянців сосни звичайної. Такий підхід дає змогу запобігти поширенню збудника із зараженим садивним матеріалом із розсадників.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Гут Р.Т. Порівняльний аналіз різних методів виділення ДНК з хвої сосни звичайної (*Pinus sylvestris L.*) / Р.Т. Гут, Ю.В. Вербовицька // Наук. вісник Нац. лісотех. ун-ту України: зб. наук-техн. праць. – 2005. – Вип. 15.5. – С. 116-121.

2. Топчій Н. Сучасні методи виділення ДНК вищих рослин / Н. Топчій // Вісник Львівського ун-ту: Серія біологічна. – 2006. – Вип. 42. – С. 26-31.

3. Цилюрик А.В. Лісова фітопатологія : підруч. [для студ. вищ. навч. закл.] / А.В. Цилюрик, С.В. Шевченко. – К.: КВІЦ, 2008. – 410 с.

4. Юсипович Ю.М. Діагностика кореневої губки (*Heterobasidion annosum s.str.*) методом полімеразно-ланцюгової реакції / Ю.М. Юсипович, В.А. Ковальова, Р.Т. Гут // Наук. вісник Нац. лісотех. ун-ту України: зб. наук-техн. праць. – 2012. – Вип. 22.6. – С. 43-49.

5. Abd-Elsalam K.A. PCR identification of *Fusarium* genus based on nuclear ribosomal-DNA sequence data / K.A. Abd-Elsalam, I.N. Aly, M.A. Abdel-Satar [and others] // African Journal of Biotechnology. – 2003. – Vol. 2, № 4. – P. 82-85.

6. Baranov O.Yu. Genetic identification of fungi colonising seedlings of the Scots pine (*Pinus sylvestris L.*) in the forest nursery in Korenevka (Belarus) / O.Yu. Baranov, T. Oszako, J.A. Nowakowska [and others] // Folia Forestalia Polonica, series A. – 2010. – Vol. 52, № 1. – P. 61-64.

7. Gardes M. ITS-primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rusts / M. Gardes, T.D. Bruns // Molecular Ecology. – 1993. – Vol. 2. – P. 113-118.

8. Li S. Molecular detection of *Fusarium solani* f. sp. *glycines* in soybean roots and soil / S. Li, G.L. Hartman // Plant Pathology. – 2003. – Vol. 52. – P. 74-83.

9. Mishra R.K. Detection of *Fusarium* wilt pathogens of *Psidium guajava L.* in soil using culture independent PCR (ciPCR) / R.K. Mishra, B.K. Pandey, M. Muthukumar [and others] // Saudi Journal of Biological Sciences. – 2013. – Vol. 20. – P. 51-56.

10. Zhang S. Molecular detection of *Fusarium oxysporum* in the infected cucumber plants and soil / S. Zhang, X. Zhao, Y. Wang [and others] // Pak. J. Bot. – 2012. – Vol. 44, № 4. – P. 1445-1451.

*Ю.М. Юсипович, В.А. Ковалева, Р.Т. Гут*

### **ДИАГНОСТИКА ГРИБОВ РОДА *FUSARIUM* В СЕЯНЦАХ СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНО-ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ**

Инфекционное полегание является одним из самых распространенных заболеваний сеянцев при выращивании сосны обыкновенной в лесных питомниках. Оно вызывается грибами родов *Fusarium*, *Alternaria*, *Botrytis* и др. Внешние признаки распространения инфекции заметны только в момент массовой гибели сеянцев, когда средства защиты применять уже слишком поздно. Современные молекулярные методы диагностики позволяют точно и быстро определять ДНК патогена в тканях сеянцев на ранних этапах развития болезни. Одним из таких методов является полимеразно-цепная реакция (ПЦР). Целью работы была разработка методики идентификации ДНК грибов рода *Fusarium* в тканях сеянцев сосны обыкновенной путем ПЦР.

Сеянцы сосны обыкновенной выращивали в контейнере с нестерильным грунтом при комнатной температуре и высокой влажности воздуха. Диагностике подвергались семидневные, двухмесячные и пятимесячные сеянцы. Контрольная группа проростков сосны выращивалась в стерильных условиях в чашках Петри. Выделение суммарной ДНК осуществляли из всех органов сеянцев ЦТАБ-методом. Реакционная смесь для ПЦР содержала 2,5 мМ MgCl<sub>2</sub>; 0,2 мМ дНТФ (Fermentas); 0,8 пМ каждого праймера, от 0,5 мкг до 0,01 пг ДНК и 1 U TaqPol ДНК-полимеразы (Fermentas). Продукты ПЦР разделяли в 2%-ном агарозном геле в 0,5%-ном трис-боратном буфере, окрашивали бромистым этидием (0,5 мкг/мл), визуализировали с помощью УФ-трансиллюминатора.

Для детекции грибов рода *Fusarium* в тканях сеянцев сосны обыкновенной использованы праймеры ITS-Fu-f/ITS-Fu-r, предложенные Kamel A. Abd-Elsalam et al. Специфика праймеров подтверждена в ПЦР с культурами грибов, которые принадлежат к разным таксономическим группам. Продукты амплификации не обнаружены в образцах с ДНК *Alternaria alternata*, *Phytophthora citophthora* и *Heterobasidion annosum*. Продукты на уровне 400 п.н.



образовывались с ДНК *Fusarium solani*, *Fusarium sporotrichella*, *Fusarium* sp.1861 и *Fusarium* sp. 20232.

Использовано серийное разведение ДНК *Fusarium sporotrichella* от 100 пг до 0,01 пг в смеси с ДНК сосны от 100 пг до 10 нг. После проведения 30 циклов ПЦР 0,1 пг ДНК *F. sporotrichella* детектировалось на высоком фоне ДНК сосны, которое превышало количество ДНК патогена в десять тысяч раз. Были также оптимизированы условия ПЦР для пары ITS-Fu-f / ITS-Fu-r: первоначальная денатурация при температуре 95°C длительностью 5 мин, 30 циклов (95°C, 30 с; 60°C, 30 с; 72°C, 50 с) и после последнего цикла еще 7 мин элонгации при температуре 72°C.

Диагностика осуществлена на сеянцах сосны обыкновенной разных возрастов. Присутствие ДНК фузариума определено в семидневных и двухмесячных сеянцев, которые полегли. Кроме того, визуально здоровые двухмесячные сеянцы содержали ДНК патогена. Спустя пять месяцев отпад сеянцев составил 90 %. В некоторых визуально здоровых сеянцах пятимесячного возраста также была обнаружена ДНК фузариума, что свидетельствует о латентном течении инфекционного процесса. В 50 % сеянцев, которые полегли, ДНК *Fusarium* sp. не была обнаружена. Это свидетельствует о том, что кроме *Fusarium* sp., сеянцы были массово колонизированы и другими патогенными грибами, которые вызвали их гибель. В проростках сосны обыкновенной, которые выращивались в стерильных условиях, ДНК *Fusarium* sp. не было найдено.

ПЦР-детекция позволяет во внешне здоровых сеянцах на ранних этапах развития болезни диагностировать ДНК *Fusarium* sp. и дифференцировать его от других возбудителей инфекционного полегания сеянцев сосны обыкновенной.

**Ключевые слова:** фузариоз, диагностика, сеянцы сосны обыкновенной, полимеразно-цепная реакция

*Yu. Yusyovych, V. Kovaleva, R. Gout*

## DIAGNOSIS OF FUNGI OF THE GENUS *FUSARIUM* IN SCOTS PINE SEEDLINGS BY POLYMERASE CHAIN REACTION

Infectious diseases are one of the most important problem during growing of Scots pine in forest nursery gardens caused by fungi of genus *Fusarium*, *Alternaria*, *Botrytis* and others. Visual symptoms of infection spreading are observed at the

moment of mass seedling death only, when applying of defense mechanisms is too late. Modern molecular methods of diagnostic allow to determine pathogen DNA very precisely in seedling tissues on early stages of disease development. One of those methods is polymerase chain reaction (PCR). Therefore, we decided to develop PCR-method to identify *Fusarium* genus DNA in seedling tissues of Scots pine.

Scots pine seedling have been grown in a box in unsterile soil at room temperature and high humidity. Seven days old, two months old and five months old seedlings were selected for fusarium detection. Seedlings from control group have been grown in sterile conditions on Petri dishes. Isolation of total DNA was performed using all part of seedlings by CTAB-method. PCR solution consisted of 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0.2 mM dNTP (Fermentas); 0.8 pM each of primers, from 0.5 µg до 0.01 pg DNA and 1 U TaqPol DNA-polymerase (Fermentas). PCR-products were separated in 2 % agarose gel in 0.5% TBE and stained with etidium bromide (0.5 µg/ml).

We used primers ITS-Fu-f/ITS-Fu-r suggested by Kamel A. Abd-Elsalam et al. for detection DNA of *Fusarium* genus. We confirmed that this pair of primers is specific to DNA of *Fusarium* genus. No products were detected after amplification with DNA from fungi, which belong to other taxonomic groups: *Alternaria alternata*, *Phytophthora citophthora* and *Heterobasidion annosum*. The product about 400 bp was got by PCR with DNA from *Fusarium solani*, *Fusarium sporotrichella*, *Fusarium* sp.1861 and *Fusarium* sp. 20232.

Step-by-step dilution of *Fusarium sporotrichella* DNA from 100 pg to 0,01pg together with DNA of Scots pine from 100 pg to 10 ng was used. After 30 cycles of PCR, 0.1 pg of *F. sporotrichella* DNA was detected on high background of Scots pine DNA, were the amount of pathogen DNA was ten thousand time less. We also optimized PCR conditions for primers ITS-Fu-f / ITS-Fu-r: first denaturation 95°C for 5 min and 30 cycles (95°C, 30 s; 60°C, 30 s; 72°C, 50 s) and last cycle – 7 min elongation at temperature 72°C.

We diagnosed different by age Scots pine seedlings. In tissues of seven days old and two months old seedlings, which have fallen was identified DNA of *Fusarium*. But in visually healthy two months old seedlings the presence of pathogen DNA also was detected. After five months of growing, 90 % of seedlings have fallen. In tissues of some survived five months old seedlings, also was determined *Fusarium* DNA, that confirms latent course of infectious process. In 50% of all fallen seedlings the presence of *Fusarium* DNA wasn't detected. This is evidence that except *Fusarium* sp., seedlings could be colonized by other pathogens causing fusariosis. In tissues of Scots pine seedlings which have been grown in sterile conditions DNA from *Fusarium* sp. not found.

PCR-detection allows to diagnose DNA from *Fusarium sp.* in visually healthy seedlings on earlier stages of infection development and to distinguish the pathogen from others causative agents of Scots pine seedling diseases.

**Key words:** fusariosis, diagnostics, Scots pine seedlings, polymerase chain reaction