

BOLEZNI BOROVIH IGLIC V SLOVENIJI, KI JIH POVZROČAJO GLIVE IZ RODU *Mycosphaerella*

Barbara PIŠKUR¹, Tine HAUPTMAN², Nikica OGRIS³, Dušan JURČ⁴

Gozdarski inštitut Slovenije, Oddelek za varstvo gozdov, Ljubljana

IZVLEČEK

Bore (*Pinus* spp.) pri nas pogosto poškodujejo številne avtohtone bolezni in škodljivci, posebno velika nevarnost pa jim grozi zaradi vnosa tujerodnih škodljivih organizmov. Predvidena škoda ob vnosu le-teh bo seštevek neposrednih škod zaradi poškodb in rigoroznih ukrepov za njihovo zatiranje ali preprečevanje širjenja, ki lahko dodatno izjemno negativno vplivajo na gozd. Določeni škodljivi organizmi so že prepoznani in uvrščeni na sezname Direktive Sveta št. 2000/29/ES in Evropske in mediteranske organizacije za varstvo rastlin (EPPO). Med njimi najdemo tudi dve bolezni: rjavenje borovih iglic, ki ga povzroča gliva *Mycosphaerella dearnessii* (anamorf *Lecanosticta acicola*) in rdečo pegavost borovih iglic, ki jo povzročata morfološko podobni vrsti *Dothistroma septosporum* (teleomorf *M. pini*) in *D. pini* (teleomorf ni znan). Povzročiteljici rdeče pegavosti borovih iglic so identificirali šele leta 2004 in ločiti ju je mogoče le s primerjavo molekularnih podatkov. Vse tri vrste gliv niso splošno razširjene v Evropi. V zadnjem času sta se povečali obseg razširjenosti in intenziteta bolezni zaradi vrst iz rodu *Dothistroma*, predvsem v Angliji in severnih državah. Novejše genetske analize kažejo, da je za nadaljnji razvoj bolezni pomembno, ali bo v evropski prostor vnesen do sedaj neodkrit paritveni tip *D. pini*, kar bi povzročilo večjo genetsko variabilnost in večjo možnost nastanka bolj patogenih oblik te glive. V letu 2012 smo zato v okviru posebnega nadzora spremljali zastopanost in vrstno sestavo gliv iz rodu *Dothistroma* in glive *M. dearnessii* v Sloveniji. Rezultati se ujemajo z izsledki podobnih raziskav v Evropi in dopolnjujejo poznavanje razširjenosti glive *D. pini*. Poleg tega so rezultati nakazali, da je spremljanje škodljivih organizmov pomembna osnova za ukrepanje ob najdbi bolezni oziroma pri njenem zatiranju.

Ključne besede: bolezni iglic, bori, *Dothistroma*, gozdovi

ABSTRACT

PINE NEEDLE DISEASES IN SLOVENIA, CAUSED BY FUNGI FROM THE *Mycosphaerella* GENUS

In Slovenia, pines (*Pinus* spp.) are frequently damaged by numerous autochthonous diseases and pests, but introductions of alien harmful organisms represent even higher dangers for pine trees. Estimated loss as a consequence of these introductions will be a sum of direct losses connected to the disease or damages and losses connected to rigorous measures taken to eradicate or to prevent the disease expansion, which could additionally negatively affect our forests. Some of these harmful organisms are already recognized and listed on the lists of the Council Directive 2000/29/EC and of the European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO). Among them the following two

¹ dr., Večna pot 2, SI-1000 Ljubljana

² univ. dipl. inž. gozd., prav tam

³ dr., prav tam

⁴ prof. dr., prav tam

diseases are found: brown spot needle blight caused by *Mycosphaerella dearnessii* (anamorph *Lecanosticta acicola*) and red band needle blight caused by two morphologically similar species *Dothistroma septosporum* (teleomorph *M. pini*) and *D. pini* (teleomorph unknown). The latter two species were identified in 2004 and can only be identified based on molecular data. All three mentioned species are not widely spread in Europe. But in the recent years the extent and the intensity of the disease, caused by *Dothistroma* species have increased, especially in England and Nordic countries. Latest genetic analyses have shown that for further disease development in Europe import of a not yet present mating type would be critical. This would trigger a higher genetic variability and the possibility of new pathogenic strains would be enhanced. Subsequently, a monitoring of the presence and diversity of *Dothistroma* fungi and *M. dearnessii* has been performed in 2012 in Slovenia in the context of the National survey program. The results of this survey are in accordance of the similar surveys performed in Europe and supplement the existing knowledge about the *D. pini* distribution. Also, the results indicate the value of regular monitoring, which could serve as an important basis for possible actions at disease outbreaks or to limit the disease spread.

Key words: needle diseases, pines, *Dothistroma*, forests

1 UVOD

Rjavenje borovih iglic (ang. brown spot needle blight) povzročata gliva *Mycosphaerella dearnessii* M. E. Barr (anamorf *Lecanosticta acicola* [Thümen] H. Sydow). Bolezen najverjetneje izvira iz Severne Amerike, je pa bila odkrita na posameznih lokacijah v Evropi (EPPO, 2008, 2013). V Sloveniji je bila najdena v letih 2008 in 2009 v Ljubljani in na Bledu na rušju (*Pinus mugo* Turra) in rdečem boru (*Pinus sylvestris* L.) (Jurc in Jurc, 2010); okužena drevesa so bila uničena in trenutni uradni status bolezni v Sloveniji je prehodni in pod nadzorom (EPPO, 2013).

Rdečo pegavost borovih iglic (ang. red band needle blight / *Dothistroma* needle blight) povzročata dve morfološko podobni glivi *Dothistroma septosporum* (Dorog.) Morelet (teleomorf *Mycosphaerella pini* Rostr.) in *D. pini* Hulbary (teleomorf ni znan), ki ju lahko ločimo le na osnovi molekularnih podatkov. Vrsti sta bili do leta 2004 obravnavani kot ena vrsta (Barnes in sod., 2004). Taksonomska zgodovina omenjene vrste je zapletena. Če povzamemo, je bila anamorfna oblika glive v Ameriki poimenovana *D. pini*, v Evropi pa *Cytosporina septosporum* Dorog. (Doroguine, 1911; Barnes in sod., 2004). Šele leta 1968 sta Gremmen (1968) in Morelet (1968) ugotovila, da sta glivi *C. septosporum* in *D. pini* morfološko identični in posledično je bila vrsta preimenovana v *D. septosporum*. Leta 2004 so Barnes in sod. (2004) na osnovi primerjav več genskih regij ugotovili, da je omenjena vrsta pravzaprav kompleks dveh kriptičnih vrst: *D. pini* in *D. septosporum*. Vrsta *D. septosporum* je splošno razširjena, vrsto *D. pini* pa so do sedaj ugotovili le na posameznih lokacijah v Severni Ameriki, Madžarski, Franciji, Ukrajini in Rusiji (Barnes in sod., 2011). V zadnjem času sta se povečali obseg razširjenosti in intenzivnosti bolezni zaradi vrst iz rodu *Dothistroma*, predvsem v Angliji in severnih evropskih državah (Barnes in sod., 2011). Novejše genetske analize kažejo, da je za nadaljnji razvoj bolezni pomembno, ali bo v evropski prostor vnesen do sedaj neodkrit paritveni tip *D. pini*, kar bi povzročilo večjo genetsko variabilnost in večjo možnost nastanka bolj patogenih oblik te glive (Barnes in sod., 2011). V Sloveniji je bila prva uradna zabeležka rdeče pegavosti borovih iglic leta 1971 (Maček, 1975), in sicer na črnem boru v okolici Ljubljane in Škofje Loke. V zadnjih letih tudi v Sloveniji opažamo posamične močno okužene sestoje z rdečo pegavostjo borovih iglic (Jurc, 2007).

V prispevku bomo predstavili ključne ugotovitve spremljanja prisotnosti gliv *M. dearnessii* in *D. pini* ter *D. septosporum* v Sloveniji v letu 2012, ko je potekal Posebni nadzor za glivi

Mycosphaerella dearnessii in *Mycosphaerella pini*. Vključeni so tudi podatki spremljanja iz prejšnjih let ter podatki o paritvenih tipih.

2 MATERIALI IN METODE

Posebni nadzor za glive *M. dearnessii* in *D. septosporum* ter *D. pini* je potekal na celotnem ozemlju Republike Slovenije v letu 2012. Predmet pregleda so bile vse znane gostiteljske rastline za omenjene vrste gliv (črni bor, rdeči bor, rušje, ostale vrste borov ter duglazija, evropski macesen in navadna smreka). Pozornost smo namenjali predvsem vsem vrstam borov, kjer je bil opazen osip iglic in rjavo ali rdeče obarvanje iglic ter temno rdeči trakovi, ki so obdajali iglice ter vsem gostiteljskim rastlinam s povečano stopnjo osutosti krošnje. Po odvzemu vzorcev smo zaradi možnosti prenosa boleznih z delovnim orodjem izvajali dezinfekcijo uporabljenega orodja.

Laboratorijske analize vzorcev so bile izvedene po metodah Laboratorija za varstvo gozdov Gozdarskega inštituta Slovenije LVG SOP/SCIRPI in LVG SOP/SCIRAC. Omenjeni standardni postopki so pripravljani po priporočilih EPPO (diagnostični protokol PM7/46 (2)) ter po novejših diagnostičnih protokolih, ki vključujejo reakcije PCR s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi za glivi *D. pini* in *D. septosporum* (Ioos in sod., 2010) in ki jih lahko izvajamo tudi na ekstraktih DNA, pridobljenih direktno iz okužene iglice.

Pri vzorcih, kjer je bila ugotovljena gliva *D. septosporum* ali *D. pini* smo ugotavljali paritveni tip, in sicer po metodologiji, ki so jo razvili Groenewald in sod. (2007).

3 REZULTATI IN RAZPRAVA

59

V letu 2012 je bilo za namen posebnega nadzora za glivi *Mycosphaerella dearnessii* in *Mycosphaerella pini* v Laboratoriju za varstvo gozdov GIS pregledanih devet vzorcev s sumom na glivo, ki so bile predmet nadzora. Za omenjene glive je značilna počasna rast, kar otežuje izolacije v čiste kulture. Pogoste so tudi hkratne okužbe z drugimi glivami, ki lahko prikrijejo okužbe z glivami *M. dearnessii* oziroma *D. pini* in *D. septosporum*. Zato je za diagnostiko vzorcev s sumom na omenjene glive pomembna implementacija novejših molekularnih diagnostičnih postopkov (Ioos in sod., 2010). Pri večini vzorcev smo izolirali DNA direktno iz okuženih iglic ter izvedli postopek izolacij v čiste kulture. Te smo uspešno pridobili le iz treh lokacij, ki so bile predmet nadzora v letu 2012. V analize smo vključili tudi dva čista izolata, ki sta bila pridobljena v okviru terenskih pregledov JGS-PPD (GIS) v Panovcu in Ljubljani. Na osnovi nukleotidnih zaporedij treh genskih regij (ITS rDNA, EF- α , BT2) in primerjav z bazo zaporedij GenBank smo identificirali pridobljene čiste izolate do vrstnega nivoja: izolati iz Panovca, Pivke in Radencev – *D. pini*, izolata iz Ljubljane in Volčjega Potoka – *D. septosporum* (Piškur in sod., oddano). Zanimiva je primerjava z rezultati molekularnih analiz z DNA, izolirano direktno iz okuženih iglic. Uporaba vrstno specifičnih oligonukleotidov je namreč razkrila, da lahko na isti lokaciji in celo v isti iglici najdemo obe vrsti, torej *D. pini* in *D. septosporum* (Piškur in sod., oddano). Tako je bila npr. na lokaciji Pivka okužba z obema vrstama *Dothistroma*, vendar bi, če bi sklepali le na osnovi pridobljenega čistega izolata, imeli lažno negativni rezultat za pojav *D. septosporum*. Ravno tako bi sklepanje le na osnovi uspešnosti pridobljenih čistih kultur privedlo do lažno negativnih rezultatov na ostalih lokacijah, kjer je potekalo vzorčenje. Če povzamemo, vrste *M. dearnessii* v letih 2011 in 2012 nismo potrdili. Vrsti *D. pini* in *D. septosporum* sta bili na območju Slovenije najdeni v gozdnih drevesnicah, parkih, javnih površinah, vrtovih in gozdnih sestojih. V prizadetih borovih sestojih smo potrdili obe vrsti kompleksa *Dothistroma*. V primeru pozitivnih najdb vrst *Dothistroma* v drevesnicah smo priporočili uničenje (sežig) okuženih dreves. V primeru najdb na javnih površinah, vrtovih oziroma v gozdu v skladu s

sprejetim programom posebnega nadzora ukrepov nismo priporočili. V primeru najdb v gozdu smo predlagali ustrezne gojitvene ukrepe.

Raziskave evropskih izolatov glive *D. septosporum* (teleomorf je *M. pini*) so pokazale visoko genetsko variabilnost, vzrok pripisujejo večkratnim vnosom gliv na območje Evrope in razširjanju glive kot posledici aktivnosti ljudi (npr. Tomšovský in sod., 2012; Groenewald in sod., 2007). Del variabilnosti najverjetneje izhaja tudi iz spolnega razmnoževanja glive, čeprav je najdba teleomorfa in askospor na območju Evrope omejena (Tomšovský in sod., 2012). Za vrsto *D. pini* do sedaj še niso potrdili obeh paritvenih tipov na območju Evrope (Barnes in sod., 2011). Analize vzorcev, pridobljenih v posebnem nadzoru v letu 2012 iz območja Slovenije ter vzorcev iz leta 2011, so pokazale, da sta v Sloveniji oba paritvena tipa glive *D. septosporum* in en paritveni tip vrste *D. pini*, kar je podobno situaciji v drugih evropskih državah, kjer so zasledili vrsto *D. pini* (Piškur in sod., oddano).

Populacija z visoko genetsko variabilnostjo ima močan evlucijski potencial in se lahko hitro prilagaja na nove razmere ter lahko predstavlja veliko nevarnost za razvoj novih patogenih oblik glive. Zato je v svetu in Evropi poudarek na omejevanju vnosa novih genotipov na nova območja in na uvedbi fitosanitarnih ukrepov za preprečitev razširjanja (Groenewald in sod., 2007). Za nadaljnji razvoj bolezni bo najverjetneje pomembno, ali bo v evropski prostor vnesen do sedaj neodkrit paritveni tip glive *D. pini*, kar bi povzročilo večjo genetsko variabilnost in večjo možnost nastanka bolj patogenih oblik te glive (Barnes in sod., 2011).

4 SKLEPI

60

Na različnih lokacijah v Sloveniji smo na osnovi odvzetih vzorcev potrdili kompleks vrst iz rodu *Dothistroma*. Vrste *M. dearnassii* v letih 2011 in 2012 nismo zasledili. Na osnovi molekularnih informacij smo potrdili vrsti *D. septosporum* in *D. pini* na območju Slovenije. Določitev vrste *D. pini* je prvo poročilo o omenjeni vrsti v Sloveniji in je tretja najdba v Evropi (po Madžarski in Franciji). Rezultati posebnega nadzora se ujemajo z rezultati podobnih spremljanj v Evropi, ki nakazujejo hkratno zastopanost obeh vrst, ne le na istem gostitelju pač pa tudi v isti iglici. Ravno tako lahko na osnovi pregledanih vzorcev sklepamo, da so v Sloveniji isti paritveni tipi vrst *D. pini* in *D. septosporum* kot drugje v Evropi. Rezultati dopolnjujejo poznavanje razširjenosti glive *D. pini* v Evropi ter nakazujejo, da je spremljanje škodljivih organizmov pomembna osnova za ukrepanje ob najdbi bolezni oziroma pri sprejemanju smernic za njeno zatiranje.

5 Zahvala

Prispevek je nastal v okviru programske skupine Gozdna biologija, ekologija in tehnologija (P4-0107). Za financiranje spremljanja stanja okuženosti borov v Sloveniji se zahvaljujemo Fitosanitarni upravi RS, MKO in Direktoratu za gozdarstvo, lovstvo in ribištvo, MKO. Za sodelovanje pri posebnem nadzoru se zahvaljujemo Zavodu za gozdove Slovenije ter Fitosanitarni in gozdarski inšpekciji.

6 Literatura

- Barnes, I., Crous, P.W., Wingfield, B.D., Wingfield, M.J. 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., Kirisits, T., Wingfield, M.J., Wingfield, B.D. 2011. Needle blight of pine caused by two species of *Dothistroma* in Hungary. *Forest Pathology*, 41, 5: 361-369
- Doroguine, G. 1911. Une maladie cryptogamique du Pin. *Bulletin Trimestriel de la Société Mycologique de France*, 27: 105-106.
- EPPO. 2008. *Mycosphaerella dearnessii* and *Mycosphaerella pini*. EPPO Bulletin, 38: 349-362.
- EPPO. 2013. PQR-EPPO database on quarantine pests (available online). www.eppo.int

- Gremmen, J. 1968. The presence of *Scirrhia pini* Funk et Parker in Romania (Conidial stage: *Dothistroma pini* Hulb.). Bulletin Trimestriel de la Société Mycologique de France, 84: 489-492.
- Groenewald, M., Barnes, I., Bradshaw, R.E., Brown, A.V., Dale, A., Groenewald, J.Z., Lewis, K.J., Wingfield, B.D., Wingfield, M.J., Crous, P.W. 2007. Characterization and distribution of mating type genes in the *Dothistroma* needle blight pathogens. Phytopathology, 97, 7: 825-834.
- Jurc, D. 2007. Bori - *Pinus* spp.: boleznj iglic: *Lophodermium seditiosum*, *Mycosphaerella pini*, *Mycosphaerella dearnessii*, *Cyclaneusma minus* (Pines - *Pinus* spp.: diseases of needles). Gozdarski Vestnik, 65: 209-224.
- Jurc, D., Jurc, M. 2010. *Mycosphaerella dearnessii* occurs in Slovenia. Plant Pathology, 59: 808-808.
- Maček, J. 1975. *Scirrhia pini* Funk et Park., povzročitelj nove boleznj bora v Sloveniji (*Scirrhia pini* Funk et Park., the cause of the new disease of pine in Slovenia). Gozdarski vestnik, 33: 9-11.
- Morelet, M. 1968. De aliquibus in Mycologia novitatibus. Bulletin de la Société des Sciences Naturelles et d'Archéologie de Toulon et du Var, 177: 9.
- Piškur, B., Hauptman, T., Jurc, D. *Dothistroma* Needle Blight in Slovenia is caused by two cryptic species: *Dothistroma pini* and *Dothistroma septosporum*. (Oddano 2012).
- Tomšovský, M., Tomešová, V., Palovčíková, D., Kostovčík, M., Rohrer, M., Hanáček, P., Jankovský, L. 2013. The gene flow and mode of reproduction of *Dothistroma septosporum* in the Czech Republic. Plant Pathology, 62: 59–68.