

PATOGENI - SIMBIONTI - ENDOFITI: SINONIMI ALI SAMOSTOJNE KATEGORIJE ORGANIZMOV?

Maja Jurc¹

IZVLEČEK

Endofitne glive preraščajo notranja tkiva rastlin in ne povzročajo vidnih simptomov okužb. Raziskava endofitne glivne populacije v iglicah črnega bora je potekala na dveh avtohtonih in šestih alohtonih rastiščih črnega bora v razdobju treh let. Skupaj smo izolirali 99 različnih glivnih taksonov ter določili 56 vrst. Med izoliranimi endofiti se pojavljajo vrste, ki so opisane kot izraziti paraziti, fakultativni paraziti ali saprofiti. Šest vrst je izrazitih parazitov, jasno definiranih fakultativnih parazitov je sedem vrst, 34 vrst je opisanih kot saprofitov, ki se pojavljajo predvsem na mrtvem rastlinskem materialu in v tleh. Celoten vzorec je bil okužen 39% (2187 izolatov iz 5592 segmentov 1864 iglic). Definirali smo pojem saprofitov, patogenov in simbiotov glede na rezultate naše raziskave.

Ključne besede: črni bor (*Pinus nigra* Arn.), endofitne glive, latentna okužba, mutualistična simbioza, patogenost

ABSTRACT

PATHOGENS - SIMBIANTS - ENDOPHYTES: SYNONYMS OR INDEPENDENT CATEGORIES (CLASSES) OF ORGANISMS?

Endophytic fungi are overgrowing inner tissue of plants without causing visible symptoms of infection. Research on endophytic fungi in needles of Austrian pine was conducted on two autochthonous and six allochthonous growing sites of Austrian pine in the period of three years. Altogether 99 fungal taxa were isolated and 56 fungal species were determined. Among the isolated endophytes the species appear which are described as distinctive parasites, facultative parasites and saprophytes. There are six parasitic species, there are seven species of clearly defined facultative parasites, 34 species are described as saprophytes which occur first of all on dead plant material and in the soil. The whole sample was infected 39% (2187 isolations from 5592 segments of 1864 needles). We define a term of saprobs, pathogens and symbionts with respect of the results of our research.

Key words: Austrian pine (*Pinus nigra* Arn.), endophytic fungi, latent infection, mutualistic symbiosis, pathogenicity

1 UVOD

Izraz 'endofit' (gr. *endon*: notri, notranji; gr. *phyton*: rastlina) se v mikološki literaturi pojavlja že več kot 100 let. De Bary je leta 1866 z njim označil glive, katerih hife preraščajo tkiva ali celice živih, avtotrofnih organizmov. De Bary je definiral glive, ki živijo na površju svojih gostiteljev, kot epifite, tiste, ki živijo v rastlinskih tkivih, pa je imenoval endofite. Meja med obema skupinama ni jasna. Tako definiran izraz je tudi preširok, saj vključuje tako patogene glive v rastlinah kot tudi vse prehode do mikoriznih simbiotov. V sodobni mikologiji izraz endofit označuje glivo, ki živi v tkivu navidez zdrave rastline. Endofiti torej povzročajo nevidne - nesimptomatične

¹ Gozdarski inštitut Slovenije, Ljubljana

okužbe (Carroll, 1986). Še natančneje je endofite opredelil Petrini (1986), ki trdi, da so v to skupino vključeni vsi organizmi, ki v določeni fazi svojega razvojnega cikla lahko naselijo notranja tkiva rastline, ne da bi povzročali vidne poškodbe gostitelja. Intenzivno raziskovanje endofitov v zadnjih letih je pokazalo, da se med jasno označenimi skupinami gliv (epifiti, endofiti, paraziti, mikorize) pojavljajo tudi glive, ki jih ne moremo uvrstiti v eno od omenjenih skupin ali, da ista vrsta nastopa kot epifit, endofit, parazit in mutualistični simbiot. Tako se nekatere vrste gliv iz rodu *Fusarium* npr. lahko pojavijo kot epifiti (Miller *et al.*, 1985), endofiti (Leuchtman in Clay, 1988) ali paraziti na jajcih žuželk (Carroll, 1987; 1991). Odpira se vprašanje razlage pojmov saprofitov, parazitov in simbiotov glede na rezultate raziskav endofitnih gliv.

2 MATERIALI IN METODE

Vzorci iglic smo nabirali s spodnjih vej 15-60 let starih dreves črnega bora marca, junija in oktobra, in sicer od marca 1993 do januarja 1995. Skupaj smo opravili šest vzorčenj na osmih lokacijah (šest alohtonih rastišč: Kobjeglava /y=54 08800, x=50 75700 po Gaus-Krügerju/, Vipava /y=54 19706, x=50 78672/, Veliko Trebeljevo /y=54 80100, x=50 96250/, Benko /y=54 60450, x=50 83500/, Krnica /y=54 06250, x=50 90300/, Konjska dolina /y=54 60250, x=50 85300/; dva avtohtona rastišča: Smolnik /y=54 34300, x=51 42100/, Dolina Krvavice /y=54 60700, x=50 84750/). Pri izbiri lokacij vzorčenja smo želeli zajeti čim bolj različna rastišča črnega bora v različnih fitogeografskih območjih (Wraber, 1969).

V laboratoriju smo zbrane (1-8 let stare) iglice sortirali po letnikih in iz vsakega letnega segmenta veje izbrali štiri pare zdravih in nepoškodovanih iglic, jih 30 min. spirali pod tekočo vodo, iz vsake iglice sterilno izrezali tri 3 mm dolge segmente (iz baze, sredine in vrha iglice), jih površinsko sterilizirali (Cabral *et al.*, 1993) in položili v petrijevke na gojišče (2% sladni agar: Malt Extract, Biolife S.r.l., 20 g l⁻¹, Agar Bios Special LL, Biolife S.r.l., 20 g l⁻¹). V vsako petrijevko smo položili 12 segmentov ter jih gojili pri sobni temperaturi. Če se trosišča izraslih gliv niso oblikovala, smo glive stimulirali z uporabo črnih UV-luč (Johnson in Booth 1983). Rast gliv iz segmentov smo v prvih treh tednih pregledovali vsak dan, v naslednjih treh mesecih pa enkrat na teden. Po treh mesecih smo sterilne kulture shranili pri +4°C in jih občasno pregledovali. Identifikacijo taksonov gliv smo opravili na podlagi značilnosti laboratorijskih kultur, morfološke trosišč in trosov, če so se le-ti oblikovali.

3 REZULTATI IN DISKUSIJA

Skupaj smo izolirali 99 različnih taksonov glivnih endofitov; določili smo 56 vrst, 30 taksonov smo določili do ravni rodu in 13 le do višjih taksonomskih kategorij (družina, poddeblo). Celoten vzorec je bil okužen 39% (2187 izolatov iz 5592 segmentov) (Jurc, 1996).

Med izoliranimi endofiti se pojavljajo vrste, ki so opisane kot izraziti paraziti, fakultativni paraziti ali saprofiti. Šest vrst je izrazitih parazitov: (*Cylindrocladium scoparium* Morg., *Dothistroma pini* Hulbary, *Phoma lingam* (Tode ex Schw.) Desm., *Ramichloridium pini* Hoog & Rahman, *Rhizosphaera kalkhoffii* Bub., *Sphaeropsis sapinea* Dyko & Sutton). Jasno definiranih fakultativnih parazitov je sedem vrst: (*Alternaria alternata* /Fr/ Keissler, *Cenangium ferruginosum* Fr., *Digitosporium piniphilum* Gremmen, *Kabatina* sp., *Truncatella hartigi* (Tubeuif) Steyaert, *Phomopsis lokoyae* Hahn, *Phomopsis occulta* (Sacc.) Traverso, *Pezicula livida* /Berk. et Br./

Rehmenae). 34 vrst je opisanih kot saprofiti, ki se pojavljajo predvsem na mrtvem rastlinskem materialu in v tleh. Nekatere vrste so doslej našli samo na listavcih (*Hypoxylon fragifirne* /Scop./ Kickx, *Phoma cava* Schulz, *Phoma eupyrena* Sacc.,). Nekatere vrste se pojavljajo kot paraziti pri živalih (npr. *Exophiala jeanselmei* /Langeron/ McGinnis & Petrini) ali so jih doslej izolirali samo iz določenih substratov (npr. *Pycnidella resinae* /Ehrenb. ex Fr./ Höhn., ki so jo izolirali samo iz smole iglavcev).

Kako lahko razlagamo pojav, da glive, ki so opisane kot izraziti paraziti ali kot fakultativni (pogojni) paraziti, živijo endofitno v gostiteljih, brez povzročanja vidnih znamenj okužbe? Po definiciji je parazit (*syn.* biotrof, nekrotrof) organizem, ki živi na gostitelju ali v njem in pridobiva potrebna hranila iz gostitelja ali drugih živih organizmov (Hawksworth *et al.*, 1995). Patogen je parazit, ki je sposoben povzročiti bolezen določenega gostitelja, ki se manifestira v vidnih simptomih okužbe - poškodbah in celo v propadu - sušenju gostitelja. Torej paraziti, ki smo jih izolirali iz navidez zdravih iglic črnega bora, živijo v iglicah svoje inkubacijsko obdobje. Tako smo npr. izolirali parazita *S. sapinea* z več krajev (na lokacijah: Vipava, 9.3.1994, triletna iglica, vršni segment: shranjena v mikoteki GIS kot živa kultura LJUFu3 - 51 ter v mikoteki IMI 368260; Kobjeglava, 19.10.1993, štiriletna iglica - zadnji obstoječi letnik iglic, bazni in srednji segment iglice; Benko, 7.3.1994, šestletna iglica, bazni segment). Za to glivo je znano, da okužuje popke in mlade iglice črnega bora in povzroča odmiranje terminalnih poganjkov gostitelja. Lahko sklepamo, da se je okužba pojavila v popku in na enoletnih iglicah, ni povzročila, tako kot bi pričakovali, zakrnitev in sušenje enoletnih iglic in poganjka temveč je latentno živela še 3-4 leta. O dolgoletnih latentno - endofitnih obdobjih parazitov poročajo tudi drugi avtorji. Gliva *Rhabdocline parkeri* Sherwood-Pike, Stone & Carroll, opisana kot parazitska, povzroča latentne okužbe duglazije, živi v navidezno zdravih 2 do 7 let starih iglicah, okužba je omejena na posamezne epidermalne celice, ki so s starostjo številnejše (Stone, 1987). S staranjem iglice se njena kolonizacija nadaljuje in se trosišča pojavljajo takoj po odpadanju iglice (Sherwood-Pike *et al.*, 1986; Stone, 1987; 1988). Glive torej ne moremo uvrstiti med patogene.

Fakultativni parazit pa ima sposobnost da občasno živi kot saprob, lahko ga gojimo na umetnih gojiščih (Hawksworth *et al.*, 1995). Sedem determiniranih fakultativnih parazitov verjetno tudi v endofitni fazi preživlja svoje latentno obdobje. Gliva *C. ferruginosum* potrebuje za optimalno rast relativno nizke temperature (pri 30°C ne raste več) in visoko relativno vlažnost substrata (med $a_{w1} = 0,98$ in $a_{w2} = 0,96$) (Jurc *et al.*, 1996, v tisku), v iglicah ima optimalne razmere za svoj razvoj. V sušnih stresnih razmerah za gostitelja pa postane patogena (Jurc, 1986). Tudi drugi avtorji poročajo da endofiti v stresnih okoliščinah za gostitelja lahko kažejo patogenost (Millar, 1981; Andrews *et al.*, 1985).

Simbioza (gr. *symbiosis*: skupno življenje, sožitje) je definirana kot skupno življenje različnih rastlinskih in živalskih organizmov, po novejših avtorjih obsega parazitsko (škodljivo), komenzalsko (neškodljivo) ter mutualistično (koristno) razmerje med organizmoma v povezavi (Hawksworth *et al.*, 1995). Mutualistična povezava povečuje sposobnost preživetja, prehranjenost s hranili, reprodukcijo in rast obeh udeleženih organizmov. V mutualistično simbiozo med glivami in rastlinami uvrščajo mikorize (Gogala, 1971), lišaje in endofite (Carroll in Carroll, 1978). Ker se endofitne

glive pogosto pojavljajo v rastlinah, ne povzročajo pa vidnih poškodb gostiteljske rastline, so prvi raziskovalci medsebojnih odnosov med endofitom in rastlino domnevali, da živijo v mutualistični simbiozi (Carroll in Carroll, 1978). Številne raziskave v zadnjih 20 letih so potrdile, da med nekaterimi endofitnimi glivami in gostitelji obstaja simbiotsko razmerje. Dokazano je, da npr. endofiti iz družine *Clavicipitaceae* v travah tvorijo v tkivih svojega gostitelja fiziološko aktivne alkaloidne. Ti predstavljajo kemijsko podlago simbiotske skupnosti obrambnega mutualizma. V tovrstni simbiozi gliva varuje svojega gostitelja pred herbivori, žuželkami in mikroorganizmi in tako tudi svoj življenjski prostor in vir hrane (Clay, 1988; Jurc, 1994).

Najnovejše raziskave interakcij med glivami in gostiteljsko rastlino ponujajo nedvoumne dokaze o njihovi mutualistični simbiotski življenjski skupnosti. Chapela in sod. (1993) ugotavljajo, da specifične sestavine ekstrakta bukovega lubja povzročajo kalitev askospor endofita *Hypoxylon fragiforme* /Scop./ Kickx. Mehanizem, ki omogoča prepoznavanje gostitelja imenujejo eklozija. Ta se sestoji iz luščenja zunanje plasti askospore (eksosporija) in iz nabrekanja trosa ter sproščanja klične pore. Prvo fazo, trajajočo nekaj milisekund, sprožijo monoglikol glukozidi gostitelja, ki se verjetno vežejo na receptorje v steni ali membrani trosa in povzročijo hiter vdor vode v celico, nabrekanje in luščenje eksosporija. Aktivno vlogo v ekloziji imajo snovi, ki jih izloča gostitelj. Glivo *H. fragiforme* smo izolirali na lokaciji Benko 21.6.1993, iz srednjega segmenta enoletne iglice (v mikoteki GIS shranjena kot živa kultura LJUFu3-32; v zbirki IMI 368257) ter na lokaciji Veliko Trebeljevo, 22.10.1993, iz baznega, srednjega in vršnega segmenta 5 let stare iglice.

Schulz in sod. (1995) raziskujejo biotično aktivnost sekundarnih metabolitov ((R)-melein, (-)-mikorizin A, (+)-kriptosporiopsin, 4-epi-etiosolid in drugi) endofitnih vrst rodu *Pezizula*, ki so bili izolirani iz vej desetih vrst iglavcev in listavcev. Izolirane snovi kažejo fungicidne, herbicidne, algicidne in baktericidne aktivnosti. Sintezo teh snovi v glivah povezujejo z mutualističnim razmerjem gliv in gostiteljev in prispevkom glivnega partnerja k inhibiranju rasti drugih gliv - parazitov gostiteljev, ki konkurirajo za isti življenjski prostor. V naši raziskavi smo izolirali vrsto *P. livida*, na lokaciji Dolina Krvavice, 21.10.1993, 29.6.1994 ter 10.1.1995, iz eno, dvo in triletnih iglic, iz vršnih, srednjih in baznih segmentov (shranjena kot posušena kultura v mikoteki GIS LJUFu1-266, 715; kot živa kultura LJUFu3 - 28,31). Torej, za nekatere endofitne glive, ki smo jih tudi mi izolirali iz iglic črnega bora obstajajo dokazi, da imajo z gostiteljsko rastlino simbiotske odnose.

4 SKLEPI

Populacije endofitov, ki naseljujejo zelene, navidez zdrave iglice, predstavljajo uravnovešeno skupnost določenih vrst do tedaj, ko se spremenijo metabolne razmere v iglici (na primer staranje iglic, posledice sušnega stresa). V iglicah torej nenehno poteka spreminjanje glivnih populacij v odvisnosti od biokemijskih in fizioloških procesov v iglici. Iglice v prvi, endofitni fazi naseljujejo nepatogene vrste ali vrste, ki so sicer opisane kot patogeni, v iglici pa živijo latentno in ne kažejo patogenih lastnosti. Lahko rečemo, da izraz endofit vključuje vse patogene in fakultativne parazite, ki so v inkubacijski razvojni fazi bolezni. Bolezen se razvije le v določenih

razmerah, ki stimulirajo parazita ali slabijo gostitelja. Izrazi endofit, parazit in simbiot se torej po pomenu prekrivajo. Isti organizem lahko označimo z vsemi tremi izrazi, vendar ti veljajo le za posamezna obdobja v njegovem življenjskem razvoju. Uporaba teh izrazov je smiselna, saj prikažejo odnos glive do gostitelja, pri čemer je izraz endofit najbolj širok.

Saprofiti so naključni endofitni prebivalci notranjih tkiv rastlin, iglice okužijo skozi stome ali direktno skozi epiderme listov ali iglic. Kakšen je njihov pomen za rastlino, kakšne so medsebojne interakcije gliv in gostitelja ter medsebojne interakcije navadno večjega števila endofitnih gliv, ki hkrati naseljujejo rastlinsko tkivo, ne vemo. Številne raziskave določenih skupin ali posameznih vrst endofitnih gliv pa dokazujejo, da so te lahko v simbiotskih odnosih z gostiteljsko rastlino.

Endofitna skupnost je pod vplivom nenehnega sukcesijskega razvojnega spreminjanja. Starajoča tkiva porjavelih iglic, ki so še na vejicah, naseli nova skupnost gliv, ki je sestavljena iz večinoma saprofitnih vrst. V enem ali dveh mesecih po odpadanju iglic prejšnjo skupnost popolnoma nadomesti populacija glivnih saprofitov, značilnih za opad.

5 LITERATURA

- Andrews, J. / Heht, E. P. / Bashirian, S., 1985. Association between the fungus *Acremonium curvulum* and Eurasian water milfoil, *Myriophyllum scipatum*.- Can. J. Bot., 1985, 60, s. 1216-1221.
- Cabral, D. / Stone, J. K. / Carroll, G. C., 1993. The internal mycobiota of *Juncus* spp. : microscopic and cultural observations of infection patterns.- Mycol. Res., 1993, 97, 3, s.367-376.
- Carroll, G. C. / Carroll, F. E., 1978. Studies on the incidence of coniferous needle endophytes in the Pacific Northwest.- Can. J. Bot., 1978, 56, 24, s. 3034-3043.
- Carroll, G. C., 1986. The biology of endophytism in plants with particular reference to woody perennials.- V : Microbiology of the Phyllosphere.N.J. Fokkema & J. van den Heuvel (eds). Cambridge University Press, Cambridge, England, 1986, s. 205-222.
- Carroll, G. C., 1987. Fungi isolated from gypsy moth egg-masses.- Mycotaxon, 1987, 29, s. 299-305.
- Carroll, G.C., 1991. Fungal associates of woody plants as insect antagonists in leaves and stems.- V : Microbial Mediation of Plant-Herbivore Interactions. P. Barbosa, V.A.Krischik & C.G. Jones (eds). J. Wiley & Sons, Inc., 1991, s. 253-271.
- Chapela, I. H. / Petrini, O. / Bielser, G., 1993. The physiology of ascospore eclosion in *Hypoxylon fragiforme*: mechanisms in the early recognition and establishment of an endophytic symbiosis.- Mycol. Res., 1993, 97, 2, s. 157-162.
- Clay, K., 1988. Fungal endophytes of grasses : a defensive mutualism between plants and fungi.- Ecology, 1988, 69, 1, s. 10-16.
- Gogala, N., 1971. Vloga rastnih substanc pri mikorizi med glivo *Boletus pinicola* Vitt. in borom *Pinus sylvestris* L.- Doktorska disertacija, Oddelek za biologijo BF, Ljubljana, 1971, 173 s.
- Johnston, A. / Booth, C., 1983. Plant Pathologist's Pocketbook.- Second Edition, Commonwealth Mycological Institute, UK, 1983, 439 s.
- Jurc, D., 1986: The epiphytotic of *Cenangium ferruginosum* Fr. in Slovenia in 1986.- 18th IUFRO World Congress, Ljubljana, Congress report, 1986, s. 653.
- Jurc, D. / Jurc, M. / Sieber, T. N. / Bojović, S., 1996. Occurrence of *Cenangium ferruginosum* Fr. as endophyte in Austrian pine (*Pinus nigra* Arn.) needles.- 12 s. (v tisku: Eur. J. For. Path.).
- Jurc, M., 1994. Glivni endofiti v višjih rastlinah.- Zbornik gozdarstva in lesarstva, 1994, 44, s. 5-43.

- Jurc, M., 1996. Endofitne glive in njihove značilnosti v iglicah črnega bora (*Pinus nigra* Arn.).- Doktorska disertacija, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo, Ljubljana, 1996, 198 s.
- Leuchtman, A. / Clay, K., 1988. *Atkinsonella hypoxylon* and *Balansia cyperi*, epiphytic members of the Balansiae.- *Mycologia*, 1988, 80, s. 192-199.
- Hawksworth, D. L. / Kirk, P. M. / Sutton, B. C. / Pegler, D. N., 1995. Dictionary of the Fungi.- CAB International, University Press, Cambridge, 1995, 616 s.
- Millar, C. S., 1981: Infection processes on conifer needles.- In *Microbial Ecology of the Phylloplane*, ed. J.P. Blakeman, London, Academic Press, 1981, s. 185-209.
- Miller, J. D. / Strongman, D. / Whitney, N. J., 1985. Observations of fungi associated with spruce budworm-infested balsam fir needles.- *Canad. J. For. Res.*, 1985, 15, s. 896-901.
- Petrini, O., 1986. Taxonomy of endophytic fungi of aerial plant tissues.- V : *Microbiology of the Phyllosphere*. N.J. Fokkema & J. van den Heuvel (eds). Cambridge University Press, Cambridge, England, 1986, s. 175-187.
- Schulz, B. / Sucker, J. / Aust, H. J. / Krohn, K. / Ludewig, K. / Jones, P. G. / Döring, D., 1995. Biologically active secondary metabolites of endophytic *Pezizula* species.- *Mycol. Res.*, 1995, 99, 8, s. 1007-1015.
- Stone, J. K., 1987. Initiation and development of latent infections by *Rhabdocline parkeri* on Douglas-fir.- *Can. J. Bot.*, 1987, 65, s. 2614-2621.
- Stone, J. K., 1988. Fine structure of latent infections by *Rhabdocline parkeri* on Douglas-fir, with observations on uninfected epidermal cells.- *Can. J. Bot.*, 1988, 66, 1, s. 45-54.
- Sherwood-Pike, M. / Stone, J. K. / Carroll, G. C., 1986. *Rhabdocline parkeri*, a ubiquitous foliar endophyte of Douglas-fir.- *Can. J. Bot.*, 1986, 64, 9, s. 1849-1855.
- Wraber, M., 1969. Pflanzengeographische Stellung und Gliederung Sloweniens.- *Vegetatio*, 17, 1969, s. 176-199.