

VRSTE IZ RODU *Phytophthora* NA SADNEM DREVJU V SLOVENIJI

Alenka MUNDA¹, Metka ŽERJAV², Hans-Josef SCHROERS³

^{1,2,3}Kmetijski inštitut Slovenije, Ljubljana

IZVLEČEK

Vrste iz rodu *Phytophthora* so povzročiteljice številnih boleznih na sadnem drevju. V predstavljeni raziskavi smo obravnavali diverzitetu, ekologijo in patogenost teh vrst na sadnem drevju v Sloveniji. Za njihovo detekcijo smo uporabili različne tehnike izolacije iz okuženih rastlin in vab, za identifikacijo pa standardne mikroskopsko morfološke tehnike ter analizo molekularnih sekvenc predela ITS ribosomske DNK. Identificirali smo pet vrst, med temi štiri, ki so za Slovenijo nove: *P. citricola*, *P. citrophthora*, *P. taxon Pgchlamydo*, *P. cryptogea* ter vrsto *P. cactorum*, ki je pri nas že dolgo znana in je do sedaj veljala za edino povzročiteljico gnilobe korenin in koreninskega vratu. V prispevku predstavljamo ekologijo in patogenost novo odkritih vrst in razpravljamo o njihovem pomenu za sadno drevje.

Ključne besede: bolezni sadnega drevja, *Phytophthora* spp., Slovenija

ABSTRACT

Phytophthora SPECIES INFECTING FRUIT TREES IN SLOVENIA

Species of the genus *Phytophthora* are important pathogens of fruit trees. The aim of the present study was to identify prevailing *Phytophthora* species and to study their ecology and pathogenicity. Various isolation and detection techniques were used including baiting. Isolated strains were identified based on morphological characters observed with a light microscope and by sequence analysis of the internal transcribed spacer regions of the ribosomal gene cluster. Five species were identified: *P. cactorum*, *P. citricola*, *P. citrophthora*, *P. taxon Pgchlamydo* and *P. cryptogea*. *Phytophthora cactorum* is widely distributed and well known as the causative agent of root and collar rot of many fruit plants, while the other four species have not yet been reported from Slovenia. Ecology and pathogenicity of the encountered species is presented and their possible role in decline of fruit trees is discussed.

Key words: diseases of fruit trees, *Phytophthora* spp., Slovenia

1 UVOD

Vrste iz rodu *Phytophthora* povzročajo številne bolezni na sadnem drevju: trohnobo korenin in koreninskega vratu (t. i. gnilobo koreninskega vratu), rakaste razjede na deblu in vejah, sušenje vej, tudi sadno gnilobo. Okužene rastline imajo majhne, bledikave in zvite liste, pecelj, listne žile in listni rob so rdečkasti. Plodovi so drobni in prezgodaj dozori. Najbolj značilna bolezenska znamenja se pojavijo na dnišču debla, kjer je skorja rahlo uleknjena ter na meji med zdravim in okuženim delom globoko razpokana. V notranjosti

¹ dr., Hacquetova 17, SI-1000 Ljubljana

² univ. dipl. inž. agr., prav tam

³ dr. biol. znan., prav tam

lubja so rjave, rdeče rjave ali skoraj črne nekroze. Opisana bolezenska znamenja se pokažejo šele, ko odmre več kot polovica korenin in lubje na pretežnem delu koreninskega vratu. Drevesa lahko hirajo več let ali pa odmrejo naenkrat, tedaj navadno spomladi, po odganjanju ali cvetenju. V zmernem pasu je najbolj razširjena in pogosta povzročiteljica teh bolezni vrsta *P. cactorum*, pomembne pa so še: *P. citricola*, *P. megasperma*, *P. drechsleri*, *P. cambivora* in *P. cryptogea* (Bosshard *et al.*, 2003). Vsem ustrezajo vlažna rastišča s težkimi tlemi in zastajajočo vodo. Obseg bolezni, ki jih povzročajo, je zelo različen in odvisen od občutljivosti gostitelja, virulentnosti patogena in razmer v okolju. Tudi pri nas pogosto propada sadno drevje zaradi okužb z vrstami iz rodu *Phytophthora*. Namen naših raziskav je bil identificirati povzročitelje bolezni ter proučiti njihovo ekologijo in patogenost.

2 MATERIAL IN METODE

V letih 2003 – 2006 smo zbrali 23 vzorcev rastlin z znamenji okužbe z vrstami iz rodu *Phytophthora*. 18 vzorcev smo nabrali v nasadih jablan, češenj in breskev, štiri pa v zarodiščih jablanovih podlag in drevesnicah. Vzorčenje smo ponovili dvakrat, spomladi in pozno jeseni.

Povzročitelje bolezni smo izolirali iz dnošča debla, korenin in tal, ki se je držala korenin bolnih dreves. Z roba nekroze v skorji smo izrezali koščke okuženega tkiva in jih prenesli na ustrezno gojišče (koruzni agar, korenjev agar in P₅ARP). Za ugotavljanje navzočnosti patogenov v zemlji smo uporabili tehniko vab (Themann, Werres, 1998): drobne koreninice okuženih dreves in obdajajočo prst smo prelili s sterilno destilirano vodo v razmerju 1:2 in nanje položili liste belocvetnega rododendrona (*Rhododendron catawbiense* 'Cunningham's White'). Po desetdnevni inkubaciji smo izolirali glive, ki so naselile rododendronove liste. Navzočnost oospor v koreninah smo preverili tako, da smo drobne in močno okužene korenine nekaj minut kuhali v raztopini KOH, nato obarvali z anilinskim modrilom in pregledali pod mikroskopom.

Za identifikacijo izoliranih vrst smo uporabili standardne mikroskopsko morfološke in molekularne tehnike. Iz čistih kultur smo izolirali DNK s komercialnimi kiti in jo namnožili z začetnima oligonukleotidoma ITS 4 in ITS 5. Pridobili smo podatke o specifičnem nukleotidnem zaporedju predela ITS ribosomske DNK in jih primerjali z objavljenimi podatki z uporabo BLAST poizvedbe (National Center for Biotechnology Information NCBI) ali filogenetske analize na osnovi poravnanih nukleotidnih zaporedij.

Patogenost pridobljenih izolatov smo preverili z umetnimi okužbami sadik gostiteljskih rastlin. Test smo izvedli po metodi Browne, Mircetich (1996). Sadike smo okužili s koščkom agarja, preraščenim z micelijem *Phytophthora* spp. Okužene rastline smo 3 mesece gojili v rastlinjaku in nato izmerili velikost nastale nekroze ter ponovno izolirali inokulirane vrste.

3 REZULTATI IN RAZPRAVA

3.1 Detekcija in identifikacija vrst iz rodu *Phytophthora*

Izolacija vrst iz rodu *Phytophthora* iz okuženih rastlin je težavna in manj uspešna kot pri večini gliv. Uporabiti moramo posebne tehnike izolacije, napraviti veliko število izolacij in postopek večkrat ponoviti. Ugotovili smo, da je uspeh izolacije vrst iz rodu *Phytophthora* med letom zelo različen. Največji je bil jeseni, ko so po daljšem obdobju padavin in nižjih temperatur nastale ugodnejše razmere za njihov razvoj, najslabši pa spomladi, med odganjanjem listja.

Iz analiziranih vzorcev smo izolirali pet vrst iz rodu *Phytophthora*. Prevladovala je vrsta *P. cactorum*, sledila je *P. citricola*, druge tri vrste pa so bile zastopane le z enim izolatom.

Preglednica 1. Vrste iz rodu *Phytophthora* na sadnem drevju v Sloveniji

Izolirane vrste	Gostitelji (število izolatov)
<i>Phytophthora cactorum</i>	jablana (11)
<i>Phytophthora citricola</i>	češnja (5)
<i>Phytophthora citrophthora</i>	oljka (1)
<i>Phytophthora taxon Pgchlamydo</i>	breskev (podlaga MRS 2/5) (1)
<i>Phytophthora cryptogea</i>	češnja (1)

3.2 Ekologija in patogenost identificiranih vrst

Phytophthora cactorum Lebert & Cohn) Schröeter. Vrsta je zelo pogosta in razširjena v zmernem pasu. Okuži več kot 200 rastlinskih vrst iz 150 rodov (Erwin, Ribeiro, 1996). Pri sadnem drevju povzroča različna bolezenska znamenja: trohno bo na deblu tik nad cepljenim mestom in na spodnjih vejah (značilno za nekatere sorte jablan npr. 'Topaz'), trohno bo koreninskega vratu in trohno bo korenin. Tudi v naši raziskavi je bila *P. cactorum* najpogostejša vrsta. Izolirali smo jo iz obolelih jablan, tako v nasadih kot v zarodiščih jablanovih podlag (MM106). Močnejše je bilo prizadeto drevje, ki je raslo na težkih tleh in v delih nasada, kjer je zastajala voda. Praviloma je bilo okuženo le drevje, ki je bilo cepljeno na podlago MM106. Znano je, da je le-ta za gnilobo koreninskega vratu zelo občutljiva, še zlasti, kjer raste v vlažnem okolju. Takšne razmere spodbujajo t. i. multiciklično namnoževanje, ki je značilno za vrste iz rodu *Phytophthora*. Močnejšo okužbo z vrsto *P. cactorum* smo zasledili tudi v nasadu jagod, kjer je povzročila propad večjega števila sadik.

Phytophthora citricola Sawada. Povzroča trohno bo korenin in debla ter propadanje poganjkov pri številnih lesnatih rastlinah. Znanih je preko 60 gostiteljev (Erwin, Ribeiro, 1996). Vrsto *P. citricola* smo izolirali iz korenin propadajočih češenj v Goriških Brdih. Propadanje češenj se je v letih 2003 in 2004 pojavilo na številnih lokacijah in v razmeroma velikem obsegu. S tehniko vab smo potrdili navzočnost vrste *P. citricola* tudi v zemlji ob prizadetih drevesih. Z umetnimi okužbami različnih podlag za češnje (sejanec, rešeljka in Gisela 5) smo preverili in potrdili njeno patogenost. Poleg vrste *P. citricola* smo iz obolelih dreves izolirali še glivo *Thielaviopsis basicola*. Menimo, da je bilo propadanje češenj posledica okužbe z obema patogenoma. O podobnem propadanju češenj so pred nekaj leti poročali v Švici in tudi tam kot glavne povzročiteljice bolezni identificirali glivo *Thielaviopsis basicola* in vrste iz rodu *Phytophthora* (Bosshard *et al.*, 2003).

P. cryptogea Perthybrige & Lafferty. Težave povzroča predvsem pridelovalcem okrasnih rastlin. Okuži rastline iz številnih rodov, zlasti iz družine košaric. V naši raziskavi smo jo izolirali iz korenin propadajoče češnje. Pridobljeni izolat je glede na rezultate analize molekularnih sekvenc ustrezal vrsti *P. cryptogea*.

Phytophthora citrophthora (R. E. Smith & E. H. Smith) Leonian. Vrsta je znana predvsem kot povzročiteljica bolezni na citrusih, kjer prizadene plodove, poganjke in korenine ter povzroča propadanje sadik (Erwin, Ribeiro, 1996). Navajajo pa še številne druge gostiteljske rastline, predvsem sadne in okrasne lesnate rastline. V našem primeru smo to vrsto ugotovili v substratu ob propadajočih oljčnih sadikah, vendar z umetnimi inokulacijami nismo uspeli ponovno okužiti oljčnih sadik in potrditi patogenosti pridobljenega izolata.

Phytophthora taxon Pgchlamydo je še neopisana vrsta iz rodu *Phytophthora*, ki so jo pred nedavnim odkrili v Patagoniji, v gozdnih sestojih *Austrocedrus chilensis* (Greslebin *et al.*,

2005). Njena razširjenost drugod po svetu ni znana, tudi njena patogenost in pomen še nista podrobneje raziskani. Pri nas smo izolat z identičnimi molekularnimi sekvencami izolirali iz zemlje, v nasadu breskev, cepljenih na podlago MRS 2/5. Z umetnimi okužbami smo sicer uspeli ponovno okužiti gostitelja, vendar je micelij priraščal počasi in ni dosegel večjega obsega.

4 SKLEPI

V raziskavi smo ugotovili, da je vrstna sestava parazitskih vrst iz rodu *Phytophthora*, ki okužujejo sadno drevje, zelo pestra. Identificirali smo pet vrst, med temi štiri, ki so za Slovenijo nove, ter vrsto *P. cactorum*, ki je pri nas že dolgo znana in je do sedaj veljala za edino povzročiteljico gnilobe korenin in koreninskega vratu. Ugotovimo lahko tudi, da je pomen bolezn, ki jih povzročajo vrste iz rodu *Phytophthora* podcenjen, saj jih pogosto pripisujemo drugim vzrokom, npr. pozebi, zadužitvi korenin, okužbi z lesnimi glivami, vrstami iz rodu *Fusarium* idr. Eden od razlogov je gotovo dejstvo, da vrste iz rodu *Phytophthora* težko izoliramo iz obolelih rastlin. Uporabiti moramo posebne tehnike in izolacijo opraviti v času, ko micelij intenzivno prirašča. Kmalu po okužbi se v odmrla tkiva naselijo sekundarne glive, ki povzročijo nadaljnji propad rastlin in zabrišejo sledove primarne okužbe z vrstami iz rodu *Phytophthora*.

5 LITERATURA

- Bosshard, E., Ruegg, J., Heller, W. 2003. Possible causes of stone fruit dieback: trunk, root neck and root rot. *Obst- und Weinbau*, 139, 13: 14-16.
- Browne, G. T., Mircetich S. M. 1996. Effects of month of inoculation on severity of disease caused by *Phytophthora* spp. in apple root crowns and excised shoots. *Phytopathology*, 86, 3: 290-294.
- Dick, M. W. 2001. *Straminipilous Fungi: systematics of the Peronosporomycetes including accounts of the marine straminipilous protists, the plasmodiophorids and similar organisms*. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers.
- Erwin, D. C., Ribeiro, O. K. 1996. *Phytophthora diseases worldwide*. St. Paul, Minnesota, APS Press: 562 str.
- Greslebin, A. G., Hansen, E. M., Winton, L. M., Rajchenberg, M. 2005. *Phytophthora* species from declining *Austrocedrus chilensis* forests in Patagonia, Argentina, *Mycologia*, 97: 218-228.
- Themann, K., Werres, S. 1998: Verwendung von Rhododendronblättern zum Nachweis von *Phytophthora*-Arten in Wurzel- und Bodenproben. *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes* 50, 2: 37-45.