

## POJAVI NEKROZ NA LISTIH JABLANE V POVEZAVI Z GLIVAMI IZ RODOV *Marssonina*, *Colletotrichum* IN *Alternaria* V SLOVENIJI

Alenka MUNDA<sup>1</sup>, Vojko ŠKERLAVAJ<sup>2</sup>, Domen BAJEC<sup>3</sup>

<sup>1,2</sup>Kmetijski inštitut Slovenije, Oddelek za varstvo rastlin, Ljubljana

<sup>3</sup>KGZS – Zavod Novo mesto, Služba za varstvo rastlin, Novo mesto

### IZVLE EK

Nekroze na listih jablane, ki smo jih zadnja leta pri nas že ve krat zasledili, so se v letu 2014 pojavile v epifitoti njih razsežnostih v številnih nasadih jablan. Obolelo listje je rumenelo, rjavelo in prezgodaj odpadlo, mo neje okužena drevesa pa so povsem ogolela že sredi avgusta. Najmo neje so bili prizadeti ekološki in travniški nasadi jablan, med sortami pa zlasti 'Topaz' in 'Zlati delišes'. Za raziskavo etiologije pojava smo zbrali 58 primerkov simptomati njih listov razli njih sort jablan. Pri vzor enju smo zajeli nasade z razli nimi na ini pridelave in razli na rastiš a. Rastlinski material smo v laboratoriju inkubirali na vlagi, izolirali povzro itelje bolezni in jih identificirali s standardnimi mikroskopsko morfološkimi tehnikami. Ugotovili smo, da je poglavitna povzro iteljica nekroz na listih jablane gliva *Marssonina coronaria*. Druge glive, ki smo jih izolirali iz nekroti njih listov jablane, so pripadale rodovoma *Alternaria* in *Colletotrichum*. V prispevku predstavljamo bolezenska znamenja, ki jih povzro ajo ugotovljene glive, ter povzemamo dosedanja spoznanja o njihovi razširjenosti, ekologiji in razvojnemu krogu v naših pridelovalnih razmerah.

334

**Ključ ne besede:** *Alternaria*, *Colletotrichum*, jablana, listna pegavost, *Marssonina*, Slovenija

### ABSTRACT

#### NECROSES ON APPLE LEAVES ASSOCIATED WITH *Marssonina*, *Colletotrichum* AND *Alternaria* SPECIES IN SLOVENIA

In 2014 the emergence of necrotic spots on apple leaves has been recorded in several orchards from our apple growing regions. Even though the disease has occasionally already been reported in the past few years, the epyphytotics of the disease have not been observed until now. The leaves of diseased trees were yellowing and browning and dropped prematurely. The damage was most severe in organic and meadow orchards where the entire crown of heavily affected trees could be defoliated already in the middle of August. The most affected cultivars were 'Topaz' and 'Golden Delicious'. 58 samples of symptomatic leaves were collected from different regions, productive systems and cultivars and sent for laboratory analysis. Leaves were incubated in wet chamber, the causative agents of the disease were isolated and identified on the basis of morphological characteristics using standard microscopic techniques. *Marssonina coronaria* was recognized as the main cause of leaf necroses. *Alternaria* and *Colletotrichum* species were also frequently encountered in the samples. In the paper we describe disease symptoms and present preliminary results of the distribution, ecology and disease cycle of each agent of the disease.

**Key words:** *Alternaria*, apple, *Colletotrichum*, leaf blotch, *Marssonina*, Slovenia

<sup>1</sup> dr., univ. dipl. inž. agr., Hacquetova 17, SI-1000 Ljubljana, e-mail: alenka.munda@kis.si

<sup>2</sup> univ. dipl. inž. agr., prav tam

<sup>3</sup> univ. dipl. inž. agr., Šmihelska c. 14, SI-8000 Novo mesto

## 1 UVOD

V letu 2014 smo ob obilnih in dolgotrajnih padavinah v poletnih mesecih zabeležili močan pojav nekroz na listih jablane. Prizadeti so bili nasadi na celotnem pridelovalnem območju jablane v Sloveniji. Obolelo listje je rumenelo, rjavelo in prezgodaj odpadlo, močan neje okužena drevesa so povsem ogolela že sredi poletja. Najmočan neje so bili prizadeti ekološki in travniški nasadi jablan, med sortami pa zlasti 'Topaz' in druge na jablanov škrlup odporne sorte ter 'Zlati delišes'. Kljub temu, da se je bolezen v preteklih letih nekajkrat že pojavila v ekoloških nasadih, pa etiologija bolezni še ni bila proučena. Namen pri ugotovitvi dela je bil identificirati povzročitelje bolezni in povzeti spoznanja o njihovem razvojnem krogu in epidemiologiji bolezni.

## 2 MATERIAL IN METODE

V različnih pridelovalnih območjih jablane v Sloveniji smo zbrali 58 primerkov listov jablan z nekrotičnimi pegami. Pri vzorčenju smo zajeli različne sorte jablan, nasade z različnimi načinami pridelave in različna rastišča. V laboratoriju smo simptomične liste nekaj dni inkubirali v vlažni komori pri sobni temperaturi, da so se razvila trosišča in trosi povzročiteljev bolezni. Trose smo nato prenesli na krompirjevo gojišče (PDA) z dodanim antibiotikom in inkubirali v temi pri temperaturi 22 °C, izrasle kolonije pa osamili v isti kulturi in identificirali s standardnimi mikroskopsko morfološkimi tehnikami. Zabeležili smo velikost, obliko in nastanka trosov, izmerili prirast ter opisali obliko in barvo kolonije. Za identifikacijo gliv smo poleg morfoloških uporabili tudi molekulske tehnike. Vzgojili smo enotrosne izolate in s pomočjo komercialnega kompleta NucleoSpin plant II (Macherey-Nagel) izolirali DNA. ITS predel ribosomalne DNA smo v verižni reakciji s polimerazo (PCR) namnožili z dvema etnima oligonukleotidoma ITS1 in ITS4 (White *et al.*, 1990). Del gena za  $\alpha$ -tubulin smo namnožili z dvema etnima oligonukleotidoma T1 (O'Donnell in Cigelnik, 1997) in Bt-2b (Glass in Donaldson, 1995), gen za glutamin sintetazo pa z dvema etnima oligonukleotidoma GSR2 in GSF3 (Weir *et al.*, 2012). Dobljenim PCR produktom smo določili nukleotidno zaporedje (Macrogen), jih uredili in primerjali z zaporedji v javnih bazah s pomočjo orodja BLAST. Virulentnost izbranih izolatov gliv iz rodu *Alternaria* smo preverili tako, da smo površinsko razkužene in ranjene liste sorte 'Zlati delišes' okužili s suspenzijo trosov, ki je vsebovala  $10^4$  trosov / ml, jih inkubirali v vlažni komori pri sobni temperaturi (22-25 °C) in po 10 dneh izmerili velikost nastalih nekroz.

## 3 REZULTATI IN RAZPRAVA

Iz simptomatičnih listov smo izolirali glivo *Marssonina coronaria* ter glive iz rodov *Colletotrichum* in *Alternaria*. Pogostost posameznih skupin patogenov je prikazana v preglednici 1. Poglavitna povzročiteljica pegavosti in nekroz na listih jablane je bila gliva *M. coronaria*. Njeno navzočnost smo potrdili pri 36 vzorcih. Pogosta je bila zlasti v ekoloških sadovnjakih, travniških nasadih in na vrtovih, kjer je prevladovala nad drugimi povzročiteljicami bolezni. Znamenja okužbe so se sprva kazala kot sivorjave nekrotične pege, ki so se postopoma združevale v večje lise, na katerih so se razvili rjavi acervuli. Po teh znamenjih je bolezen dobila ime rjavna pegavost jablane. Pozneje je listje rumenelo, rjavelo in odpadalo. Nekatera drevesa so povsem ogolela že sredi avgusta. Zgodnja defoliacija je negativno vplivala na količino in kakovost pridelka ter zmanjšala cvetni nastavek. Pri bolj utrljivejših sortah so se okužili tudi plodovi: na povrhnjici so se razvile okrogle, nekoliko udrte temno rjave nekroze, prekrite s trosiščnimi glivami. Gliva, ki smo jo izolirali iz simptomatičnih rastlinskih delov, je po morfoloških karakteristikah ustrezala opisu vrste *M. coronaria* (Lee in Shin, 2000). V isti kulturi na PDA je oblikovala temno rjavo do rjavno nagubano kolonijo, ki je prirastala zelo po strani, približno 5 mm v 30 dneh. Konidiji so

bili brezbarvni, dve- do trocelni ni, z dvema oz. tremi neenakimi celicami, ravni do rahlo ukrivljeni in veliki 10- 29  $\mu\text{m}$ .

Preglednica 1: Povzročitelji pegavosti in nekroz na listih jablane.

mesto vzor enja	št. vzorcev	povzročitelji (št. izolatov)
intenzivni sadovnjaki	ekološka pridelava, sorte: 'Topaz', 'Antares', 'Sansa', 'Goldrush'	8 <i>Marssonina coronaria</i> (8) <i>Alternaria</i> spp. (2) <i>Colletotrichum</i> spp. (1)
	integrirana pridelava, sorte: 'Fuji', 'Gala', 'Idared', 'Zlati delišes', 'Braeburn'	17 <i>Alternaria</i> spp. (13) <i>Colletotrichum</i> spp. (10) <i>Marssonina coronaria</i> (3)
travniški sadovnjaki		22 <i>Marssonina coronaria</i> (19) <i>Alternaria</i> spp. (1)
vrtovi		11 <i>Marssonina coronaria</i> (6) <i>Colletotrichum</i> spp. (1)

Domnevajo, da primarno okužbo opravijo askospore, ki se po prezimovanju razvijejo v apotecijah na odpadlem listju. Askospore, ki pripadajo teleomorfu *Diplocarpon mali*, so dvocelne, brezbarvne, ravne do nekoliko ukrivljene, na robovih priostrene in velike 23-33 x 5-6  $\mu\text{m}$  (Harada *et al.*, 1974). O najdbah askospor poročajo iz Azije, v Evropi pa jih še niso ugotovili. Sekundarne okužbe širijo konidiji, ki se v vlažnih razmerah razvijejo v acervulih na obolelih listih. Konidiji liste okužijo na spodnji ali zgornji strani, s pomočjo apresorijev ali pa neposredno s klinohifom (Zhao *et al.*, 2013). Okužbo in nadaljnji razvoj bolezni pospešujejo daljša obdobja visoke zračne vlage in omočenosti listja ter zmerne temperature med 20 in 22 °C.

336

*M. coronaria* je razširjena v vseh pridelovalnih območjih jablane, zlasti pogosta je v Aziji. Na območju Evropske zveze je znana od leta 2003. Tedaj so poročali o prvi najdbi v nasadu jablane v deželi Piemont na severozahodu Italije. V letih 2010 in 2011 so njeno zastopanost potrdili tudi v Nemčiji, Švici in Avstriji. V Sloveniji smo glivo *M. coronaria* z ustreznimi diagnostičnimi postopki prvi potrdili leta 2014; že od leta 2008 dalje pa je zaslediti številna, a pomanjkljivo dokumentirana opažanja o njenem pojavu (Škerlavaj, neobjavljeno). *M. coronaria* najbolj ogroža ekološke nasade jablan in sorte, ki so odporne na jablanov škrlup. Zaradi njenega vztrajnega širjenja in razmeroma velike škode, ki jih v deževnih in vlažnih letih povzročajo v sadovnjakih z ekološko pridelavo, jo je organizacija EPPO leta 2013 uvrstila na svoj opozorilni seznam.

Druge glive, ki smo jih izolirali iz simptomatičnih listov jablane, so pripadale rodovoma *Alternaria* (16 izolatov) in *Colletotrichum* (12 izolatov). Glive iz rodu *Alternaria*, ki povzročajo alternarijsko pegavost, so bile najbolj pogoste v intenzivnih nasadih jablan z integrirano pridelavo. Na okuženih listih so se pozno spomladi pokazale drobne, nekaj mm velike, okrogle rjave pege, ki so se pozneje veale in združevale v nepravilne, pogosto koncentrično nagubane lise. Pri močni okužbi se tudi na plodovih razvijejo drobne, rjave, rdeče obrobljene pege, ki zmanjšujejo tržno vrednost plodov. Alternarijska pegavost listov in plodov je najbolj razširjena v Severni Ameriki in Avstraliji, kjer lahko povzročijo tudi do 25-odstotni izpad pridelka (Harteveld *et al.*, 2014). Prizadene zlasti sorte 'Gala', 'Zlati delišes', 'Pink Lady' in 'Fuji'. Tudi v Evropi se v zadnjih letih širi v jablanovih nasadih na severu Italije (Rotondo *et al.*, 2012).

Alternarijske pegavosti ne povzročajo ena sama gliva, temveč različne morfološke in filogenetske skupine iz kompleksov vrst *A. alternata*, *A. arborescens*, *A. tenuissima* in *A. longipes* (Rotondo *et al.*, 2012; Harteveld *et al.*, 2014). Preliminarna morfološka analiza izolatov, ki smo jih pridobili iz listov z znamenji alternarijske pegavosti, je pokazala, da

pripadajo razli nim morfološkim skupinam. Za dokon no potrditev identitete posameznih izolatov so potrebne nadaljnje molekulske analize. Pri preizkusu virulentosti na listih sorte 'Zlati delišes' se je pokazalo, da so vsi izolati patogeni, v velikosti nastale nekroze pa ni bilo zna ilnih razlik.

Epidemiologija alternarijske pegavosti je zapletena in se razlikuje glede na vrsto povzro itelja, geografsko regijo in dejavnike okolja. V splošnem velja, da povzro itelji bolezn i prezimijo v odpadlem listju, ki je tudi najpomembnejši vir spomladanskih okužb. Ohranijo se tudi v okuženih poganjk ih in spe ih brstih. Med rastno dobo pa kot vir okužbe služijo okuženi listi v krošnji jablane. Pogosto deževje, visoka relativna zra na vlaga in temperature med 25 in 30 °C pospešujejo tvorbo in kalitev trosov ter širjenje okužbe.

Na simptomi ni h listih so bile pogosto zastopane tudi vrste iz rodu *Colletotrichum*. Najve krat smo jih zasledili v intenzivnih nasadih z integrirano pridelavo, pogosto skupaj s povzro iteljicami alternarijske pegavosti. Najpogosteje sta bili okuženi sorti 'Gala' in 'Zlati delišes'. Glive iz rodu *Colletotrichum* povzro ajo ve gospodarsko pomembnih bolezn i na sadnem drevju. Pri jablani je najpomembnejše gnitje plodov oziroma grenka sadna gniloba, ki jo povzro ajo vrste iz kompleksa *C. acutatum*. Na vlažnih rastiš ih in v letih z obilnimi padavinami lahko povzro ijo znaten izpad pridelka. Bolezenska znamenja, ki jih povzro ajo glive iz rodu *Colletotrichum*, imenujemo antraknoza in se na plodovih kažejo kot uleknjene, bolj ali manj okrogle temne pege, na katerih se razvijejo trosiš a (acervuli) in rožnati do oranžni skupki trosov. Na listju pa se razvijejo razmeroma nezna ilne rjave nekroze nepravilnih oblik, na katerih se v vlažnih razmerah razvijejo trosiš a in trosi. Ob mo ni okužbi listje rumeni in odpada. Iz vzorcev okuženega listja smo izolirali tri glive iz rodu *Colletotrichum*: *C. fioriniae* in *C. godetiae*, ki pripadata kompleksu *C. acutatum* (Damm *et al.*, 2012) in še neidentificirao vrsto iz kompleksa *C. gloeosporioides* (Weir *et al.*, 2012). Okužbo in razvoj bolezn i pospešujejo pogoste padavine, visoka vlažnost in zmerne temperature med 24 in 26 °C. Do okužbe najverjetneje pride že v asu cvetenja. Vir okužb so poganjki, brsti in mumije okuženih plodov, v katerih gliva prezimi.

337

#### 4 SKLEPI

Pegavosti in nekroze na listih jablane, ki smo jih zadnja leta pri nas že ve krat zasledili, so se v letu 2014 pojavile v epifitoti ni h razsežnostih. Vzroki za tako obsežen pojav bolezn i niso znani. Med najverjetnejšimi sta opuš anje rabe nekaterih pripravkov za varstvo rastlin in izredne vremenske razmere z obiljem padavin. V raziskavi smo identificirali povzro iteljice listnih pegavosti in nekroz pri jablani, glive *Marssonina coronaria*, *Colletotrichum fioriniae*, *C. godetiae* in *C. gloeosporioides* s. l. ter *Alternaria* spp. Nadaljevati pa je potrebno s preu evanjem razvojnega kroga povzro iteljic bolezn i, virov primarnih in sekundarnih okužb ter drugih epidemioloških dejavnikov, ki so klju nega pomena za na rtovanje u inkovitih varstvenih ukrepov za prepre evanje širjenja bolezn i v naših pridelovalnih razmerah.

#### 5 LITERATURA

- Damm, U., Cannon, P. F., Woudenberg, J. H. C., Crous, P. W. 2012. The *Colletotrichum acutatum* species complex. *Studies in Mycology*, 73: 37–113.
- Glass, N. L., Donaldson, G. 1995. Development of primer sets designed for use with PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61: 1323-1330.
- Harada, Y., Sawamura, K., Konno, K. 1974. *Diplocarpon mali* sp.nov., the perfect state of apple blotch fungus *Marssonina coronaria*. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 40: 412–418.
- Hartveld, O. O. C., Akinsanmi, O. A., Drenth, A. 2013. Multiple *Alternaria* species groups are associated with leaf blotch and fruit spot diseases of apple in Australia. *Plant Pathology*, 62: 289-297.

- Harteveld, O. O. C., Akinsanmi, O. A., Drenth, A. 2014. Pathogenic variation of *Alternaria* species associated with leaf blotch and fruit spot of apple in Australia. *Eur. J. Plant Pathol.*, 139: 789-799.
- Lee H.-T., Shin H.-D. 2000. Taxonomic studies on the genus *Marssonina* in Korea. *Mycobiology*, 281: 39-46.
- O'Donnell, K., Cigelnik, E. 1997. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 7: 103-116.
- Rotondo, F., Collina, M., Brunelli, A., Pryor, B. M. 2012. Comparison of *Alternaria* spp. collected in Italy from apple with *A. mali* and other AM-toxin producing strains. *Phytopathology*, 102:1130-1142.
- Weir, B. S., Johnston, P. R., Damm, U. 2012. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Studies in Mycology*, 73: 115–180.
- White, T. J., Bruns, T. D., Lee, S., Taylor, J. W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. V: Innis, Gelfand, Sninsky, White (ur). *PCR protocols: a guide to methods and applications*. San Diego, Academic Press, 1990: 315-322.
- Zhao, H., Han, Q., Wang, J., Gao, X., Xiao, C.-L., Liu, J., Huang L. 2013. Cytology of infection of apple leaves by *Diplocarpon mali*. *Eur. J. Plant Pathol.*, 136: 41-49.