

NENAVADNE VREMENSKE RAZMERE KOT SPROŽILCI PATOGENIH AKTIVNOSTI ENDOFITNIH GLIV NA PRIMERU VRSTE *Botryosphaeria dothidea*

Barbara PIŠKUR¹, Dušan JURČ²

^{1,2}Gozdarski inštitut Slovenije, Odd. za varstvo gozdov, Ljubljana

IZVLEČEK

Nenavadne vremenske razmere postajajo čedalje pogostejše. Ekstremne suše in visoke temperature so leta 2003 prizadele Evropo. V Sloveniji je bilo v letu 1997 na Krasu opaženo nenavadno odmiranje črnega gabra (*Ostrya carpinifolia*), ki je bilo najbolj izrazito leta 2003. Nenavadna podrobnost tega pojava je v tem, da je bila prizadeta drevesna vrsta, ki je veljala za odporno proti boleznim in sušnem stresu. Kot povzročiteljica odmiranja je bila določena gliva *Botryosphaeria dothidea*, do tedaj neznana kot patogen omenjene drevesne vrste. Izolirali smo jo tudi iz črnih gabrov brez simptomov in drugih drevesnih vrst, vendar je najobsežnejše poškodbe pri nas povzročila na črnem gabru. *B. dothidea* je pogosta tudi kot saprofitna gliva na številnih odmrlih lesnatih rastlinah. Vpogled v populacijsko raznolikost in patogenost izolatov omenjene glive je razkril heterogeno strukturo, ki nakazuje, da je pojav bolezni črnih gabrov povezan s samoniklo populacijo glive *B. dothidea* in ne z vnosom patogene oblike glive na prizadeto območje. Omenjena vrsta navadno živi kot endofit v tkivih različnih drevesnih vrst v Evropi (npr. *Fraxinus excelsior*, *Ostrya carpinifolia*, *Platanus* spp., *Populus nigra*, *P. tremula*, *Prunus* sp., *Vitis vinifera*, *Quercus rubra*, *Q. robur*, *Q. suber*, *Q. ilex*). Glivo *B. dothidea* uvrščamo v družino Botryosphaeriaceae, katere pripadniki so navadno endofiti, vendar so zabeleženi tudi kot patogeni, še posebej v povezavi s sušnim stresom, mehanskimi poškodbami, zmrzaljo, sadnjo dreves na neprimernih lokacijah ter biotskimi poškodbami. V primeru bolezni črnih gabrov so najverjetneje dolgotrajne nenavadne vremenske razmere (suša, visoke temperature) sprožile patogene aktivnosti sicer endofitne populacije *B. dothidea*. Ostaja pa nepojasnjeno, zakaj se je bolezen pojavila v tako velikem obsegu predvsem na tej, sicer izredno odporni drevesni vrsti.

Ključne besede: Botryosphaeriaceae, endofiti, gozd, klimatske spremembe, latentni patogeni

ABSTRACT

UNUSUAL WEATHER CONDITIONS AS TRIGGERS OF PATHOGENIC ACTIVITIES OF ENDOPHYTIC FUNGI – *Botryosphaeria dothidea* AS AN EXAMPLE

Unusual weather conditions are lately becoming a usual phenomenon. In Europe, the most recent extreme conditions occurred in 2003, when severe drought and higher temperatures were recorded. An unusual dieback of *Ostrya carpinifolia* had been reported in Slovenia from 1997, but the severity of damages and mortality was the most alarming in 2003. Curious detail about this disease occurrence is that the affected tree species is known to be resistant to various diseases and drought. The fungus *Botryosphaeria dothidea*, which to that time was not known as a pathogen of *O. carpinifolia*, was identified as a causative agent of the dieback. This species was isolated also from symptomless *O. carpinifolia* trees and from other tree species, but nevertheless, disease symptoms were widely distributed only on *O. carpinifolia*. Species *B. dothidea* is recognized also as a saprophyte on numerous dead

¹ dr., Večna pot 2, SI-1000 Ljubljana

² prof. dr., prav tam

woody plants. An insight into population diversity and pathogenicity of isolated *B. dothidea* revealed a heterogeneous structure, which suggests that *O. carpinifolia* dieback was associated with a native population of *B. dothidea* and not with a recently introduced pathogenic form of the fungus. This fungal species usually lives in tissues of woody plants as an endophyte and is common on various trees in Europe (eg. *Fraxinus excelsior*, *Ostrya* spp., *Platanus* spp., *Populus nigra*, *P. tremula*, *Prunus* spp., *Vitis vinifera*, *Quercus rubra*, *Q. robur*, *Q. suber*, *Q. ilex*). The fungus *B. dothidea* belongs to Botryosphaeriaceae family, whose members are usually endophytes but with known pathogenic effect connected to drought stress, physical damage, frost, planting species on inappropriate areas and damages by biotic factors. In the case of *O. carpinifolia*, the endophytic population of *B. dothidea* was most likely triggered by extreme weather conditions (drought, high temperatures) into pathogenic activity. But it remains controversial, why just this highly resistant tree species was affected in such extent.

Keywords: Botryosphaeriaceae, climate changes, endophytes, forest, latent pathogens

1 DEFINICIJA ENDOFITNIH GLIV

Anton de Bary je leta 1866 uporabil besedo endofit, ki jo je sestavil iz grških besed »endon« in »phyton«, kar pomeni »znotrajrastlinski«. Z besedo endofit je označil vso mikrofloro, ki se nahaja v rastlinskih tkivih (de Bary, 1866). Danes definicija endofitov zajema tiste organizme, ki se naselijo v tkivih živih rastlin in predstavljajo nevidne ali asimptomatske okužbe izključno znotraj rastlinskega tkiva ter med celotnim ali delnim življenjskim ciklom ne povzročijo nastanka bolezenskih simptomov na okuženi rastlini. Najpogosteje pri iskanju endofitov naletimo na glive pa tudi na bakterije (Wilson, 1995; Oses *et al.*, 2006; Staniek *et al.*, 2008). Izolacije gliv iz različnih rastlinskih vrst so pokazale, da se endofitne glive pojavljajo pri vseh preučevanih rastlinah in celo lišajih (povzeto po Hyde in Soyong, 2008). Med najbolj preučevanimi so endofitne glive trav, za katere je bilo ugotovljeno, da izločajo alkaloidne, ki odvrčajo škodljive žuželke, in metabolite, ki stimulirajo rast gostiteljev (Jurc, 1994; Sieber, 2007).

Izolacija in gojenje endofitnih gliv v laboratorijskih razmerah večinoma pospešuje hitrorastoče vrste, poleg tega pa le okoli 17 % od trenutno znanih glivnih vrst enostavno gojimo v kulturi (Vainio in Hantula, 2000). Izolati endofitnih gliv na hranilnih gojiščih velikokrat ostanejo sterilni in ne oblikujejo razmnoževalnih struktur oziroma jih pogosto kljub izraženim razmnoževalnim strukturam ne moremo določiti do ravni vrste. Molekularne tehnike sicer olajšajo identifikacijo, vendar v bazah podatkov pogosto ni referenčnih nukleotidnih zaporedij, ki bi omogočali identifikacijo do ravni vrste. Vse to nakazuje, da raznolikost endofitnih gliv v veliki meri ni proučena, in Sieber (2007) predvideva, da je okoli 465.000 endofitnih glivnih vrst še vedno neopisanih. Koliko endofitnih gliv bomo uspeli izolirati iz rastlinskih tkiv, je odvisno od uporabljene metodologije in časa raziskave. V raziskavi, ki so jo izvedli Baum in sodelavci (2003), so iz podrttega drevesa na začetku izolirali le nekaj vrst gliv, s časom inkubacije lesa v sterilnih razmerah pa se je število izoliranih gliv povečevalo. Ugotovili so tudi, da imajo zaprtotrosnice daljši inkubacijski čas, da prodrejo iz vzorcev lesa v primerjavi z prostotrosnicami. Sieber (2007) povzema izsledke različnih raziskav, ki so pokazale, da znotraj iste gostiteljske družine prevladujejo sorodne endofitne glivne vrste. Večina dominantnih endofitnih gliv izoliranih iz listavcev se uvršča v red Diaporthales (vrtačarji), iz iglavcev pa v red Helotiales (pecljarji). Evolucijsko razhajanje med obema skupinama gliv se ujema z ločitvijo golosemenk in kritosemenk, kar pomeni, da so se dominantni endofiti evolucijsko razvijali skupaj s svojimi gostitelji več kot 300 milijonov let.

Vloga endofitov pri lesnatih rastlinah ostaja bolj ali manj nepojasnjena. Morda endofiti odvrtačajo rastlinojede živali od svojih gostiteljev, povečujejo odpornost proti sušnemu stresu in boleznim, stimulirajo rast gostiteljev oziroma je relacija gostitelj-endofit mutualistična (Jurc, 1997; Sieber, 2007). Nekatere endofitne glive izločajo ligninolitične encime in imajo pomembno vlogo pri razgradnji lesa (Baum *et al.*, 2003; Oses *et al.*, 2006). S prispevkom želimo poudariti tudi »temno« stran endofitnih gliv pri lesnatih rastlinah. Določene razmere v okolju oziroma spremembe namreč lahko sprožijo patogeno delovanje teh sicer neškodljivih gliv in pojav bolezenskih znamenj na gostiteljski rastlini, kot je bilo dokazano tudi na primeru obsežnega odmiranja črnih gabrov na slovenskem Krasu.

2 ENDOFITNE GLIVE GOZDNEGA DREVJA – SKRITI PATOGENI?

Splošno znani patogeni glivi bukova kresilka (*Fomes fomentarius*) in škrlatna bradavička (*Nectria coccinea*) sta pogosti v zdravem lesu bukve. Njuno rast v lesu zelo verjetno zavira nizka koncentracija kisika in / ali dostopnost oziroma pomanjkanje hranil. Bukova kresilka iz endofitne preide v patogeno fazo po snegolomih in vetrolomih, ki povzročijo nastanek razpok in poškodb pri drevju. Škrlatna bradavička pa začne z agresivno rastjo po napadih gostitelja z bukovim kaparjem (*Cryptococcus fagisuga*) oziroma po daljših sušnih obdobjih (Sieber, 2007). Omenjeni glivi sta primer, kako sprememba razmer v gostitelju vpliva na patogenost endofitnih in splošno zastopanih gliv v tkivih lesnatih rastlin. Ravno tako so znana različna poročila o vplivu daljših sušnih obdobjih na latentne patogene in izbruhe bolezni: *Diplodia pinea* (Stanosz *et al.*, 2001), *Biscogniauxia mediterranea* (Jurc in Ogris, 2006), *Discula quercina* (Moricca in Ragazzi, 2008) ter številne druge. Z vnosom neavtohtonih rastlin v novo okolje prenesemo tudi širok spekter endofitnih gliv, ki lahko kužijo in povzročajo razvoj bolezenskih simptomov na sosednjih rastlinah, ki nimajo razvite odpornosti proti tem novim vrstam. Občutljivo razmerje med endofitom in gostiteljsko rastlino se lahko poruši že ob prenosu gostitelja v novo, eksotično okolje, in se izrazi v razvoju bolezni na tem gostitelju (Jurc, 1997; Sieber, 2007).

3 PRIMER VRSTE *Botryosphaeria dothidea*

Ekstremne suše in visoke temperature so leta 2003 prizadele Evropo in tudi Slovenijo. Na Krasu je količina padavin v juniju, juliju in avgustu 2003 znašala 27 %, 12 % oziroma 66 % od 30-letnega povprečja, povprečne mesečne temperature pa so bile za 5,8 °C, 3,6 °C oziroma 5,6 °C višje kot je bilo 30-letno povprečje (Jurc in Ogris, 2006). V Sloveniji je bilo v letu 1997 na Krasu opaženo nenavadno odmiranje črnega gabra (*Ostrya carpinifolia*), ki je bilo najbolj izrazito leta 2003 (Jurc *et al.*, 2006). Omenjena drevesna vrsta je svetloljubna pionirska vrsta sušnih rastišč, ki uspeva na toplih in južnih pobočjih ter velja za odporno, tako proti boleznim kot proti sušnemu stresu (Kotar in Brus, 1999). Kot povzročiteljica odmiranja je bila leta 2006 določena gliva *Botryosphaeria dothidea*, do tedaj neznana kot patogen omenjene drevesne vrste (Jurc *et al.*, 2006). *B. dothidea* je pogosta saprofitna gliva na številnih odmrlih lesnatih rastlinah ter je splošno razširjen endofit različnih drevesnih vrst v Evropi (npr. *Fraxinus excelsior*, *Ostrya* spp., *Platanus* spp., *Populus nigra*, *P. tremula*, *Prunus* spp., *Vitis vinifera*, *Quercus rubra*, *Q. robur*, *Q. suber*, *Q. ilex*).

Inter- in intravrstna variabilnost (določena z ITS-rDNA; nukleotidnimi zaporedji regij ITS-rDNA ter EF- α ; molekularnimi markerji AFLP ter morfološka znamenja) izolatov pridobljenih v letih 2005 in 2006 iz obolelih dreves in dreves brez simptomov na prizadetem območju v Sloveniji in Italiji je pokazala, da pričakovano večji delež izolatov predstavlja vrsto *B. dothidea*, manjši delež pa vrste iz rodu *Dothiorella*. V laboratorijskih razmerah je bilo ugotovljeno, da je vrsta *B. dothidea* v primerjavi z izolati *Dothiorella* spp. bolj patogena,

hkratni pojav obeh vrst gliv pa ne vpliva na izražanje patogenosti glive *B. dothidea* (Piškur *et al.*, 2011).

Vpogled v populacijsko raznolikost in patogenost izolatov omenjene glive je razkril heterogeno strukturo, ki nakazuje, da je pojav boleznih črnih gabrov povezan s samoniklo populacijo glive *B. dothidea* in ne z vnosom patogene oblike glive na prizadeto območje. Glivo *B. dothidea* uvrščamo v družino Botryosphaeriaceae, katere pripadniki so navadno endofiti, vendar so zabeleženi tudi kot patogeni, še posebej v povezavi s sušnim stresom, mehanskimi poškodbami, zmrzaljo, rastjo dreves na neprimernih lokacijah ter biotskimi poškodbami. V primeru boleznih črnih gabrov so najverjetneje dolgotrajne nenavadne vremenske razmere (suša, visoke temperature) sprožile patogene aktivnosti sicer endofitne populacije *B. dothidea* (povzeto po Slippers in Wingfield, 2007; Piškur *et al.*, 2011).

4 SKLEPI

Raziskave o populacijskih strukturah ter raziskave o ekologiji in biologiji endofitov so pokazale na pomemben dejavnik v pojavu in razvoju boleznih gozdnega drevja ter rastlin na splošno. Endofitne glive so v posebnih primerih namreč »speči zmaji«, ki se ob spremenjenih razmerah v okolju »zbudijo« in začnejo z aktivno kolonizacijo svojega gostitelja, kar lahko vodi do obsežnih poškodb in celo do odmiranja prizadetih rastlin. Če na spremenjene razmere v okolju nimamo vpliva, pa z nenehnim prenosom rastlin med različnimi okolji vplivamo na razširjanje sicer neškodljivih endofitov, ki se v novih okoljih lahko izrazijo kot nezaželeni patogeni. Z nenehnim prenašanjem endofitov z živimi rastlinami pospešujemo tudi nastanek novih kombinacij genotipov gliv in s tem večamo verjetnost nastanka agresivnih in neustavljivih novih patogenov.

5 ZAHVALA

Prispevek je nastal v okviru programske skupine Gozdna biologija, ekologija in tehnologija (P4-0107), CRP-projekta Povečanje učinkovitosti sanacij velikih poškodb v slovenskih gozdovih (V4-0106) in Javne gozdarske službe na Gozdarskem inštitutu Slovenije (Poročevalska, prognostično-diagnostična služba za gozdove).

6 LITERATURA

- Baum S., Sieber T., Schwarze F., Fink S. 2003. Latent infections of *Fomes fomentarius* in the xylem of European beech (*Fagus sylvatica*). *Mycological Progress*, 2: 141-148.
- de Bary A. 1866. *Morphologie und Physiologie der Pilze, Flechten und Myxomyceten*. Leipzig, Engelman
- Hyde K.D., Soyong K. 2008. The fungal endophyte dilemma. *Fungal Diversity*, 33: 163-173.
- Jurc D., Ogris N. 2006. First reported outbreak of charcoal disease caused by *Biscogniauxia mediterranea* on Turkey oak in Slovenia. *Plant Pathology*, 55: 299.
- Jurc D., Ogris N., Grebenc T., Kraigher H. 2006. First report of *Botryosphaeria dothidea* causing bark dieback of European hop hornbeam in Slovenia. *Plant Pathology*, 55: 299.
- Jurc M. 1994. Glivni endofiti v višjih rastlinah. *Zbornik gozdarstva in lesarstva*, 44: 5-43.
- Jurc M. 1997. Patogeni – simbionti – endofiti: sinonimi ali samostojne kategorije organizmov?. V: Maček J. (ur.). *Zbornik predavanj in referatov 3. slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin, Portorož, 4.–5. marec 1997*. Ljubljana, Društvo za varstvo rastlin Slovenije: 285-290.
- Kotar M., Brus R. 1999. *Naše drevesne vrste*. Ljubljana, Slovenia, Slovenska matica: 320 str.
- Moricca S., Ragazzi A. 2008. Fungal endophytes in Mediterranean oak forests: a lesson from *Discula quercina*. *Phytopathology*, 98: 380-386.
- Oses R., Valenzuela S., Freer J., Baeza J., Rodríguez J. 2006. Evaluation of fungal endophytes for lignocellulolytic enzyme production and wood biodegradation. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 57: 129-135.

- Piškur B., Pavlic D., Slippers B., Ogris N., Maresi G., Wingfield M., Jurc D. 2011. Diversity and pathogenicity of Botryosphaeriaceae on declining *Ostrya carpinifolia* in Slovenia and Italy following extreme weather conditions. *European Journal of Forest Research*, 130, 2: 235-249.
- Sieber T.N. 2007. Endophytic fungi in forest trees: are they mutualists? *Fungal Biology Reviews*, 21: 75-89.
- Slippers B., Wingfield M.J. 2007. Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. *Fungal Biology Reviews*, 21: 90-106.
- Staniek A., Woerdenbag H.J., Kayser O. 2008. Endophytes: exploiting biodiversity for the improvement of natural product-based drug discovery. *Journal of Plant Interactions*, 3: 75-93.
- Stanosz G.R., Blodgett J.T., Smith D.R., Kruger E.L. 2001. Water stress and *Sphaeropsis sapinea* as a latent pathogen of red pine seedlings. *New Phytologist*, 149: 531-538.
- Vainio E.J., Hantula J. 2000. Direct analysis of wood-inhabiting fungi using denaturing gradient gel electrophoresis of amplified ribosomal DNA. *Mycological Research*, 104: 927-936.
- Wilson D. 1995. Endophyte - the evolution of a term, and clarification of its use and definition. *Oikos*, 73: 274-276.