

RAZŠIRJENOST GLIVE *Dothistroma pini* V SLOVENIJI IN VPOGLED V PRISOTNOST NJENIH PARITVENIH TIPOV

Matija KADUNC¹, Zina DEVETAK², Barbara PIŠKUR³, Tine HAUPTMAN⁴

¹⁻⁴ Gozdarski inštitut Slovenije, Oddelek za varstvo gozdov, Ljubljana

² Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana

IZVLEČEK

Rdeča pegavost borovih iglic je bolezen borov (*Pinus* spp.), ki jo povzročata glivi *Dothistroma septosporum* in *D. pini*. V zadnjih dveh desetletjih se je pojavnost bolezni v Sloveniji znatno povečala, tako da jo je danes moč zaznati po vsej državi, še posebej v sestojih črnega bora (*P. nigra*) na Krasu. V primerjavi z *D. septosporum* naj bi bila gliva *D. pini* redkejša. Gre za heterotalično vrsto, kar pomeni, da se pojavlja v dveh paritvenih tipih, MAT1-1 in MAT1-2. V Sloveniji smo do nedavnega poročali večinoma le o prisotnosti paritvenega tipa MAT1-2, paritveni tip MAT1-1 pa je bil potrjen le na eni lokaciji. V 2023 smo opravili pregled dosedanjih najdb glive *D. pini* v Sloveniji, vključno z določanjem paritvenih tipov shranjenih vzorcev v zbirkah laboratorija. Dodatno smo na treh lokacijah, kjer je bila gliva *D. pini* že potrjena v preteklosti, izvedli popis poškodovanosti borov ter dodatno vzorčenje simptomatičnih iglic. Rezultati kažejo, da je gliva *D. pini* pri nas bolj razširjena kot so kazale dosedanje raziskave, bolj pogost pa je tudi paritveni tip MAT1-1.

Ključne besede: bolezen iglic, bori, *Dothistroma*, paritveni tip, Slovenija

ABSTRACT

DISTRIBUTION OF THE FUNGUS *Dothistroma pini* AND ITS MATING TYPES IN SLOVENIA

Dothistroma needle blight is a disease affecting pines (*Pinus* spp.) caused by two fungal species *Dothistroma septosporum* and *D. pini*. In the last two decades, the prevalence of the disease in Slovenia has significantly increased, and can now be observed throughout the country, particularly in the black pine (*P. nigra*) stands in the Karst region. Compared to *D. septosporum*, *D. pini* is believed to be rarer. It is a heterothallic species, meaning it occurs in two mating types, MAT1-1 and MAT1-2. Until recently, reports in Slovenia mainly indicated the presence of the MAT1-2 mating type, with the MAT1-1 mating type confirmed at only one location. In 2023, we conducted a review of previous findings of the fungus *D. pini* in Slovenia, including the determination of the mating types of samples deposited in the laboratory collections.

¹ univ. dipl. inž. gozd., Večna pot 2, SI-1000 Ljubljana, e-pošta: matija.kadunc@gozdis.si

² univ. dipl. bioteh., Jamnikarjeva ulica 101, SI-1000 Ljubljana, prav tam

³ dr., prav tam

⁴ doc. dr., prav tam

Additionally, at three locations where the fungus *D. pini* had been previously confirmed, we assessed the damage on pines and conducted additional sampling of symptomatic needles. The results indicate that the fungus *D. pini* is more widespread in Slovenia than previous research suggested, and the MAT1-1 mating type is more common as it was initially assumed.

Key words: *Dothistroma*, mating type, needle disease, pines, Slovenia

1 UVOD

Rdeča pegavost borovih iglic je vsesplošno prisotna bolezen borovih iglic, katere pomen in jakost se v zadnjih nekaj desetletjih povečujeta. Bolezen prizadene tako naravne gozdne sestoje borov kot tudi mesta, kjer so bili ti vneseni. Pri mestih vnosa gre večinoma za monokulturne nasade in drevesnice, v katerih je v sredini prejšnjega stoletja, predvsem na Južni polobli, bolezen povzročila največjo gospodarsko škodo (Gibson 1974; Drenkhan in sod. 2016). Po okužbi se na iglicah razvijejo rumeno-oranžne klorotične pege ali proge, ki s časom porjavijo, na mestu njih pa kasneje črna trosišča, strome. Od mesta okužbe proti vrhu iglice se ta posledično posuši. Sušenje iglic povzroči njihov prezgodnji osip, ta pa posledično izgubo prirastka drevesa. V primeru hujših in ponavljajočih se okužb lahko drevo tudi v celoti odmre (Gibson, 1974). Glavni gostitelji bolezní so številne vrste borov (*Pinus* spp.), okužbe pa se lahko vršijo tudi na drugih iglavcih iz rodov jelk (*Abies* spp.), cedre (*Cedrus* spp.), macesna (*Larix* spp.), smreke (*Picea* spp.), in duglazije (*Pseudotsuga* spp.) (Drenkhan in sod., 2016). Poškodbe teh vrst so prav tako manj intenzivne (Barnes in sod., 2022). Bolezen povzročata dve kriptični askomicetni glivi *Dothistroma pini* Hulbary (teleomorf ni znan) ter *Dothistroma septosporum* (Dorog.) Morelet (teleomorf *Mycosphaerella pini* Rostr.), ki sta si morfološko zelo podobni in ju zanesljivo razlikujemo le s pomočjo molekularnih podatkov (Barnes in sod., 2004). Vse do leta 2004 sta bili povzročiteljici obravnavani kot ena vrsta in šele s primerjavo različnih genskih regij so Barnes in sod. (2004) prišli do ugotovitve, da gre pravzaprav za kompleks dveh vrst: *D. pini* ter *D. septosporum*.

Najdbe glive *D. pini* so v primerjavi z *D. septosporum* redkejše. Do sedaj je bila *D. pini* potrjena le na 19 gostiteljih iz rodu *Pinus* spp. (Nest in sod., 2023) ter izjemoma na navadni smreki (*Picea abies* (L.) H. Karst) (Jánošíková in sod., 2018). Domnevno je razsežnost glive *D. pini* v Evropi sicer precej večja kot je sprva kazalo, kljub njeni omejeni porazdelitvi in ožjem izboru gostiteljev.

Glive iz rodu *Dothistroma* so heterotalične vrste, kar pomeni, da se pojavljajo v dveh različnih paritvenih tipih, MAT1-1 ter MAT1-2. Sočasna prisotnost obeh paritvenih tipov omogoča spolno razmnoževanje vrste, zaradi katere lahko z rekombinacijo genoma nastajajo novi haplotipi glive. Ti so lahko okolju bolj prilagojeni, odporni na mehanizme odpornosti gostiteljev ali pa imajo višjo virulenco (McDonald in Linde, 2002; McDonald in sod., 1999). V primeru odsotnosti enega izmed paritvenih tipov v populaciji, je ta bolj homogena in prepuščena nespolnemu razmnoževanju (Groenewald in sod., 2007; Barnes in sod., 2014).

V Sloveniji je bila bolezen prvič uradno poročana leta 1971 (Maček, 1975) na črnem boru v okolici Škofje Loke in Ljubljane. Dolgo časa ni povzročala večje škode in je veljala kot manj pomembna bolezen. Zadnji dve desetletji pa se je jakost in širjenje bolezni močno povečalo, tudi na Krasu v sestojih črnega bora, kjer v preteklosti ni bila prisotna (Jurc, 2007; Piškur, 2018). Na podlagi molekularnih analiz je v Sloveniji potrjena prisotnost obeh vrst gliv *Dothistroma* spp. (Piškur in sod., 2013). Prav tako so bili pri obeh vrstah v Sloveniji potrjeni vsi paritveni tipi, pri čemer je bil paritveni tip glive *D. pini* MAT1-1, uradno poročan le enkrat in pri nas velja za redkejšega (Piškur in sod., 2013; Drenkhan in sod., 2016).

Glavno vodilo naše raziskave so bili trije cilji: 1) pregled vseh dosedanjih najdb glive *D. pini* pri nas, 2) popis ter določanje paritvenih tipov vzorcev *D. pini* v zbirkah Laboratorija za varstvo gozdov ter 3) ponovno vzorčenje in popis izbranih lokacij, kjer je bila *D. pini* v preteklosti že potrjena. V prispevku bomo predstavili preliminarne rezultate dosedanjih najdb in porazdelitve glive *D. pini* ter strukturo njenih paritvenih tipov v Sloveniji in preliminarne rezultate popisa ter ponovnega vzorčenja izbranih lokacij.

2 MATERIALI IN METODE

Na podlagi arhiva (2011-2022) rezultatov analiz rdeče pegavosti borovih iglic v Sloveniji smo ustvarili bazo podatkov, ki vključuje najdbe gliv *D. pini*, *D. septosporum*, koordinate, lokacijo in paritveni tip. V primeru, da paritveni tip še ni bil določen, smo le-te določili naknadno z uporabo arhiviranih ekstraktov genomske DNA iz vzorcev iglic, kjer je bila *D. pini* že potrjena. Uporabili smo metodo, ki so jo razvili Groenewald in sod. (2007) in temelji na vrstno specifičnih oligonukleotidnih začetnikih.

Drugi del raziskave je obsegal ponovno vzorčenje simptomatskih dreves na treh izbranih lokacijah, kjer je v preteklosti že bila potrjena prisotnost glive *D. pini*. Izbrane lokacije so bile v bližini krajev Pivka, Divača ter Pliskovica. Poleg odvzema vzorcev na izbranih lokacijah, smo opravili še popis osutosti dreves. Ocenjevanje osutosti krošenj je potekalo po navodilih in metodah opisanih v Priročniku za terensko snemanje podatkov (Kovač in sod., 2014). Osutost je bila ocenjena okularno, na 5 % natančno. Pri odvzemu vzorcev smo bili pozorni, da je izbrano drevo odražalo značilne simptome rdeče pegavosti borovih iglic. Vzorcili smo vejice z okuženimi iglicami, ki se še niso povsem posušile in odpadle. Na vsaki lokaciji smo odvzeli po pet vzorcev, enega na vsako izbrano drevo. Po vsakem odvzemu vzorca smo dezinficirali uporabljeno orodje, da bi zmanjšali možnost prenosa bolezni ter kontaminacije drugih vzorcev.

Molekularne analize odvzetih vzorcev smo izvedli po internem protokolu Laboratorija za varstvo gozdov, ki temelji na diagnostičnem protokolu EPPO PM 7/46 ter diagnostičnem protokolu loos in sod. (2010) in vključuje klasični PCR ter vrstno specifične oligonukleotidne začetnike za ločevanje gliv *Dothistroma* spp.

3 REZULTATI IN RAZPRAVA

Na podlagi pregleda vseh dosedanjih najdb glive *D. pini* ugotavljamo, da se njena porazdelitev na območju Slovenije znatno ne razlikuje od sorodne glive *D. septosporum*. Glivi se v vzorcih pojavljata večinoma posamično, pri nekaterih vzorcih

pa je bila potrjena prisotnost obeh vrst. Na podlagi trenutnih rezultatov nismo zaznali, da bi se katera izmed povzročiteljic pojavljala specifično le na nekem območju Slovenije. O podobnih opažanjih in porastu pojavnosti vrste *D. pini* poročajo tudi drugje po Evropi (Drenkhan in sod., 2016; Nest in sod., 2023; Adamčíková in sod., 2023). Na Slovaškem so tako na primer Adamčíková in sod. (2023) prišli do podobnih ugotovitev, kjer je porazdelitev obeh povzročiteljic dokaj podobna naši z vsesplošno prisotnostjo obeh patogenov po državi.

Sodeč po preliminarnih ocenah strukture paritvenih tipov v preteklosti potrjenih vzorcih *D. pini* pri nas, ta nakazuje na vsesplošno prisotnost paritvenega tipa MAT1-2 vrste *D. pini* v Sloveniji, kar potrjuje tudi predhodna opažanja (Piškur in sod., 2013) ter kaže na podobnost z opažanji drugje v Evropi (Drenkhan in sod., 2016; Nest in sod., 2023; Adamčíková in sod., 2023). Vendar pa smo med analiziranimi vzorci zaznali tudi paritveni tip MAT1-1, in sicer na 10 lokacijah. Zanimivo je, da smo na nekaterih lokacijah zaznali sočasno prisotnost obeh paritvenih tipov. Sodeč po trenutnih ocenah je paritveni tip MAT1-2 v Sloveniji najpogostejši paritveni tip, kar sovпада z rezultati dosedanjih študij populacijske strukture glive *D. pini* pri nas, ki so pokazale nizko genetsko pestrost, homogenost ter visoko stopnjo klonalnosti s prevladujočim paritvenim tipom MAT1-2 (Piškur in sod., 2013; Sadiković, 2020; Nest in sod., 2023).

Ocene osutosti dreves na izbranih popisanih lokacijah so pokazale, da so vsi sestoji poškodovani, pri čemer je bil sestoj Pivka najhuje poškodovan, na lokaciji Divača pa so bila drevesa v povprečju nekoliko manj osuta, a še vedno večinoma poškodovana. Potrebno je poudariti, da sama osutost oziroma poškodovanost dreves ni nujno posledica delovanja le izključno gliv *Dothistroma* spp., saj osutost povzročajo tudi drugi biotski in abiotski dejavniki, ki jih v raziskavi nismo preučevali. Preliminarni rezultati molekularnih testov ponovnih vzorčenj izbranih lokacij so potrdili, da je gliva *D. pini* še vedno prisotna na teh območjih. Ta je bila zaznana v večini analiziranih vzorcev. Analize paritvenih tipov pri ponovnih vzorčenjih nakazujejo, da je na izbranih lokacijah prevladujoč paritveni tip MAT1-2. Tega smo zaznali v vseh vzorcih, kjer je bila potrjena gliva *D. pini*. Najbolj zanimiv je vzorec iz lokacije Pivka, v katerem smo potrdili sočasno prisotnost obeh vrst gliv ter sočasno prisotnost obeh paritvenih tipov glive *D. pini*, MAT1-2 ter redkejši MAT1-1. *D. septosporum* smo zaznali skupno v le treh vzorcih na lokacijah Pliskovica in Pivka.

4 SKLEPI

Pregled arhiva analiz med leti 2011 in 2022 je pokazal, da je bolezen rdeče pegavosti borovih iglic splošno prisotna na celotnem območju Slovenije, kjer uspevajo njeni gostitelji. S tem smo potrdili tudi splošno razširjenost glive *D. pini* v Sloveniji, pri čemer ni večjih razlik v porazdelitvi s sorodno *D. septosporum*. Na osnovi molekularnih informacij smo potrdili, da je MAT1-2 pri nas pogostejši tip glive *D. pini*, paritveni tip MAT1-1 pa je v Sloveniji redek in se pojavlja le na posameznih območjih, ponekod tudi sočasno z nasprotnim paritvenim tipom. Na teh lokacijah bi bilo v prihodnje smiselno spremljanje nadaljnjega razvoja bolezni in stanja borov.

5 ZAHVALA

Raziskava je bila opravljena v okviru programske skupine P4-0107, ki jo financira Javna agencija za raziskovalno dejavnost RS ter v okviru Strokovnih nalog s področja zdravstvenega varstva rastlin v gozdarstvu (UVHVVR).

6 LITERATURA

- Adamčíková, K., Pastirčáková, K., Jánošíková, Z., Ostrovský, R., Pastirčák, M., Pažitný, J., Kobza, M., Adamčík, S., Kádasi-Horáková, M., Ondrušková, E. 2023. New regional records of *Dothistroma* needle blight pathogens from Slovakia: distribution, hosts and pathogens characterization. *Annals of Forest Research*, 66, 1: 99–111.
- 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., van der Nest, A., Granados, G.M., Wingfield, M.J. 2022. Chapter 11–*Dothistroma* needle blight. V: Asiegbu, F.O., Kovalchuk, A. (ur.), *Forest Microbiology, Volume 2: Forest Tree Health*. Academic Press: 179–199.
- Barnes, I., Wingfield, M.J., Carbone, I., Kirisits, T., and Wingfield, B.D. 2014. Population structure and diversity of an invasive pine needle pathogen reflects anthropogenic activity. *Ecology and Evolution*, 4: 3642–3661.
- Drenkhan, R., Tomešová-Haataja, V., Fraser, S., Bradshaw, R.E., Vahalík, P., Mullett, M.S., Martín-García, J., Bulman, L.S., Wingfield, M.J., Kirisits, T., Cech, T.L., Schmitz, S., Baden, R., Tubby, K., Brown, A., Georgieva, M., Woods, A., Ahumada, R., Jankovský, L., Thomsen, I.M., Adamson, K., Marçais, B., Vuorinen, M., Tsopelas, P., Koltay, A., Halasz, A., La Porta, N., Anselmi, N., Kiesnere, R., Markovskaja, S., Kačergius, A., Papazova-Anakieva, I., Risteski, M., Sotirovski, K., Lazarević, J., Solheim, H., Boroň, P., Bragança, H., Chira, D., Musolin, D.L., Selikhovkin, A. V., Bulgakov, T.S., Keča, N., Karadžić, D., Galovic, V., Pap, P., Markovic, M., Poljakovic Pajnik, L., Vasic, V., Ondrušková, E., Piškur, B., Sadiković, D., Diez, J.J., Solla, A., Millberg, H., Stenlid, J., Angst, A., Queloz, V., Lehtijärvi, A., Doğmuş-Lehtijärvi, H.T., Oskay, F., Davydenko, K., Meshkova, V., Craig, D., Woodward, S., Barnes, I. 2016. Global geographic distribution and host range of *Dothistroma* species: a comprehensive review. *Forest Pathology*, 46, 5: 408–442.
- EPPO. 2015. PM 7/46 (3) *Lecanosticta acicola* (formerly *Mycosphaerella dearnessii*), *Dothistroma septosporum* (formerly *Mycosphaerella pini*) and *Dothistroma pini*. EPPO Bulletin 45, 2: 163–182.
- Gibson, I.A.S. 1974. Impact and control of dothistroma blight of pines. *European Journal of Forest Pathology*, 4: 89–100.
- 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.
- loos, R., Fabre, B., Saurat, C., Fourier, C., Frey, P., Marçais, B. 2010. Development, comparison, and validation of real-time and conventional PCR tools for the detection of the fungal pathogens causing brown spot and red band needle blights of pine. *Phytopathology*, 100, 1: 105–114.
- Jánošíková-Hečková, Z., Ondrušková, E., Barta, M., Ostrovský, R., Kádasi-Horáková, M., Pastirčáková, K., Kobza, M., Adamčíková, K. 2018. The hosts and geographic range of *Dothistroma* needle blight in Slovakia. *Forest Pathology*, 48, 3: e12421.
- Jurc, D. 2007. Bori - *Pinus* spp.: bolezni iglic: *Lophodermium seditiosum*, *Mycosphaerella pini*, *Mycosphaerella dearnessii*, *Cyclaneusma minus* (*Pines* - *Pinus* spp.: diseases of needles). *Gozdarski Vestnik*, 65: 209–224.

- Kovač, M., Skudnik, M., Japelj, A., Planinšek, Š., Vochl, S. 2014. Gozdna inventura. V: Kovač, M., Žlogar J. (ur.), Monitoring gozdov in gozdnih ekosistemov–priročnik za terensko snemanje podatkov. Založba Silva Slovenica: 7–111.
- Maček, J. 1975. *Scirrhia pini* Funk et Park., povzročitelj nove bolezni bora v Sloveniji (*Scirrhia pini* Funk et Park., the cause of the new disease of pine in Slovenia). Gozdarski vestnik, 33: 9–11.
- McDonald, B., Mundt, C., Zhan, J. 1999. Population genetics of *Mycosphaerella graminicola* and *Phaeosphaeria nodorum*. V: Lucas, J.A., Bowyer, P., Anderson, H.M. (ur.), *Septoria* on cereals: A study of pathosystems. CAB International: 44–69.
- McDonald, B.A., Linde, C. 2002. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. Annual Review of Phytopathology, 40: 349–379.
- Piškur, B. 2018. Iščemo karantenske in druge nevarne organizme: Rdeča pegavost borovih iglic (*Dothistroma septosporum* in *Dothistroma pini*). Gozdarski Vestnik, 76: 5–6.
- Piškur, B., Hauptman, T., Jurc, D. 2013. Dothistroma needle blight in Slovenia is caused by two cryptic species: *Dothistroma pini* and *Dothistroma septosporum*. Forest Pathology, 43: 518–521.
- Sadiković, D. 2020. Population structure of causal agents of red band needle blight and brown spot needle blight of pines in selected areas of Central and Southeastern Europe. Doktorska disertacija, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta. 115 str.