

BIOTIČNO ZATIRANJE KOSTANJEVEGA RAKA Z UPORABO HIPOVIRULENCE

Dušan Jurc¹

IZVLEČEK

Pravi kostanj (*Castanea sativa* Mill.) je zastopan v Sloveniji na 232.000 ha gozdov, njegova lesna zaloga je 2.981.000 m³. Kostanjev rak, ki ga povzroča gliva *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr, je najnevarnejša bolezen pravega kostanja. S karantenskimi ukrepi v 50. letih bolezní niso uspeli zatreti niti preprečiti njenega širjenja. Šele nepričakovan pojav neškodljive hipovirulentne oblike bolezní omogoča biotično zatiranje kostanjevega raka.

Izolirali smo 13 značilnih hipovirulentnih sevov kostanjevega raka iz kraškega, goriškega in koprškega areala pravega kostanja. Inokulirali smo jih v lubje pravega kostanja na treh raziskovalnih ploskvah v celinskem delu Slovenije (Rožnik, Janče, Gorjanci) in na nekaj primerih preizkusili kurativni učinek hipovirulence z vnosom hipovirulentnih sevov v rob rakov virulentne oblike bolezní. Prikazani so rezultati inokulacij v lubje. Morfološke značilnosti podgobja v kulturi (obarvanost, sposobnost oblikovanja piknidijev) nakazujejo patogenost v naravnih razmerah.

Ključne besede: *Cryphonectria parasitica*, hipovirulenca, patogenost, Slovenija

ABSTRACT

BIOTICAL CONTROL OF CHESTNUT BLIGHT WITH HYPOVIRULENCE

Sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.) is present in Slovenia on 232.000 ha of forests, its standing wood volume is 2.981.000 m³. Chestnut blight, which is caused by the fungus *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr, is the most devastating disease of chestnut. With the caranthene measures in the fifties the disease was not eradicated nor was its spread prevented. Unexpected appearance of hypovirulent form of the disease enables biotic control measures against chestnut blight.

Thirteen strains of chestnut blight from typical hypovirulent infections were isolated from the mediterranean growth area of chestnut in Slovenia. They were inoculated in three research plots in the central part of Slovenia (Rožnik, Janče, Gorjanci) and in some cases the curative effect of hypovirulence with the inoculations in the margins of virulent cankers was tested. The results of inoculations in bark are presented. Morphological characteristics of strains in culture (pigment production, ability to produce pycnidia) were good indicator of a degree of pathogenicity in nature.

Key Words: *Cryphonectria parasitica*, hypovirulence, pathogenicity, Slovenia

1 UVOD

Koevolucija glive *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr in njenega gostitelja kitajskega kostanja (*Castanea mollissima* Blume) je privedla do neškodljivega odnosa patogena do gostitelja, ki je na Kitajskem omogočal preživetje obema. Prenos glive na novega gostitelja (*Castanea dentata* Borkh.) v Severno Ameriko leta 1905, je

¹ Gozdarski inštitut Slovenije, Ljubljana

povzročil množično propadanje in skoraj popolno iztrebljenje ameriškega kostanja. Konec tridesetih let je bila gliva prenesena v Evropo in tu je povzročila podobno obsežno sušenje pravega kostanja (*Castanea sativa* Mill.), le da je le-to potekalo počasneje, saj je pravi kostanj odpornejši na bolezen kot ameriški (Anagnostakis, 1987). V Sloveniji je bil kostanjev rak ugotovljen na meji z Italijo leta 1950 in kljub izjemno obsežnim zatiralnim ukrepom se je leta 1956 razširil v notranjost ter nato po vsej Jugoslaviji (Hočevar *et al.*, 1969). Na okuženih območjih se kostanj množično suši, še posebej po klimatskih anomalijah (predvsem po hudih zimah) in vremenskih ujmah (predvsem po točah), tako da se obsežnejša sušenja prostorsko in časovno neenakomerno, vendar neprenehoma pojavljajo v celotnem arealu rasti pravega kostanja pri nas. Načini zatiranja kostanjevega raka, uporabljeni doslej (takojšen posek okuženih dreves, preprečevanje odganjanja iz panja, sežig sečnih ostankov, prepoved prevoza, lupljenje ali dezinfekcija okužene hlodovine itn.), niso bili učinkoviti za zaustavitev bolezni in velikih škod. Pravi kostanj je v slovenskih gozdovih nenadomestljiva drevesna vrsta, zastopan je na 232.000 ha gozdov, njegova lesna zaloga je 2.981.000 m³ (Jurc *et al.*, 1994). Hipovirulenca kostanjevega raka je po današnjem razumevanju bolezni edini perspektivni način, ki dolgoročno zagotavlja preživetje te drevesne vrste in zmanjšanje škod zaradi kostanjevega raka.

Hipovirulenca je pojav zmanjšanja sposobnosti patogena, da izzove bolezen. Hipovirulentni osebki (sevi) glive *C. parasitica* vsebujejo v citoplazmi delce dsRNA (double stranded ribonucleic acid - ribonukleinsko kislino z dvema nitkama), ki je obdana z membrano in ima molekulsko težo, ki je višja kot je običajno virusna RNA gliv. Ta dsRNA se ob stiku dveh micelijev z anastomozami (cevastimi povezavami dveh celic) prenaša iz okuženega (hipovirulentnega) v zdrav (virulenten) osebek glive in ga spremeni v hipovirulentnega, neškodljivega za drevo (Day *et al.*, 1977; Anagnostakis, 1987; Heiniger in Rigling, 1994). Glive imajo razvite mehanizme, ki preprečujejo širjenje virusov, oziroma drugih škodljivih infektivnih dejavnikov v populaciji vrste. Anastomoze med dvema osebkoma (ki jih gliva običajno uporablja za koristno paraseksualno izmenjavo genetskega materiala) niso vedno funkcionalne, ampak lahko odmrejo takoj po nastanku. Pojav je genetsko determiniran. V tem primeru dva osebka označimo kot vegetativno nekompatibilna, dsRNA se med takima osebkoma večinoma ne more prenesti. Nekateri sevi so sposobni ustvarjati anastomoze s številnimi drugimi sevi, drugi le s posameznimi. Tudi med nekaterimi nekompatibilnimi sevi se dsRNA lahko prenese, taki imajo večjo konverzijsko kapaciteto, kot bi skleпали po kompatibilnosti (Anagnostakis in Day, 1979). Domnevajo, da se je v Evropi pojavila hipovirulenca kostanjevega raka približno 15 let po vdoru bolezni, vendar si pojava niso znali razlagati. Po odkritju osnovnih zakonitosti pojava hipovirulence so se pokazale tudi možnosti njegove praktične uporabe. Danes je mogoče s hipovirulentnimi sevi zdraviti posamezna obolela drevesa, v Franciji pa je v osemdesetih letih potekal širok program širjenja hipovirulentnih sevov (Heiniger in Rigling, 1994). Hipovirulentni sevi ne povzročajo odmiranja kambija, ampak se razvijajo v zunanjih plasteh lubja, povzročajo drobno razpokanost in rahlo hipertrofijo okuženega dela debla ali veje. Pri nas so te oblike kostanjevega raka zelo pogoste na Primorskem (Panovec, Stara gora, Kras, Koprsko), v notranjosti Slovenije jih pred nekaj leti še nismo zasledili, zdaj pa so v okolici Ljubljane pogosti zaraščajoči se raki, zato domnevamo, da je hipovirulentna oblika kostanjevega raka zastopana tudi že v notranjosti Slovenije (Jurc, 1988; Jurc *et al.*, 1994).

O posameznih okužbah kostanjevega raka, ki se celijo, je poročal že Biraghi leta 1951 (po Anagnostakis, 1987). Pojav so si napačno razlagali do leta 1965, ko je Grente v Franciji izoliral glivo iz zaraščajočih se okužb v Italiji in ugotovil, da se gliva v kulturi morfološko razlikuje od virulentne oblike in, da je sposobna spremeniti virulentno obliko v sebi enako. Te seve je imenoval hipovirulentne. Pojav hipovirulence kostanjevega raka so izredno intenzivno raziskovali v sedemdesetih letih v Severni Ameriki, kjer so ugotovili njene temeljne značilnosti. Ugotovili so, da je hipovirulenca pogojena s citoplazmatsko determinanto, ki je povezana z zastopanostjo dsRNA (Day *et al.*, 1977). Ta ima molekulsko težo mnogo višjo kot so teže glivnih virusov in je obdana z membrano (verjetno gostiteljevo), ne pa s kapsulo, kot so nekateri virusi. Jaynes in Elliston (1980) opisujeta načine terapije kostanjevega raka s hipovirulentnimi sevi v Ameriki. Poročala sta, da sta z evropskimi hipovirulentnimi sevi ozdravila (začeli so se zaraščati) 86% virulentnih okužb, vendar se hipovirulenca v ameriški populaciji *C. parasitica* ne more obdržati in širiti zaradi velike genetske različenosti evropskih sevov, ki so genetsko precej drugačni kot severnoameriški. Vse to delo je bilo opravljeno z evropskimi hipovirulentnimi sevi, našli pa so tudi ameriške, ki se izjemno počasi širijo in niso tako uspešni za biotsko zatiranje kostanjevega raka. Dodds (1980) je raziskoval dsRNA v italijanskih sevih s poliakrilamidno gelsko elektroforezo in ugotovil, da obstaja dsRNA v več oblikah, od katerih je le ena (imenuje jo tip 2 dsRNA), ki je sposobna povzročiti najmočnejši hipovirulentni učinek na virulentni sev. Tudi vegetativna inkompatibilnost, kot zaviralni dejavnik za širjenje dsRNA v populaciji patogena, je bila najintenzivneje raziskovana v ZDA: Jaynes in Elliston (1980) sta ugotovila, da v okuženem sestoju ne moremo ozdraviti vseh virulentnih okužb z enim hipovirulentnim sevom. Izhod sta našla v uporabi mešanice več hipovirulentnih sevov z različno kompatibilnostjo. Opisala sta laboratorijske postopke za definiranje kompatibilnosti. Anagnostakis (1987) ugotavlja, da je v Evropi metodo zatiranja z uporabo hipovirulentnih sevov mogoče uporabiti v operativnem gozdarstvu in kot dokaz navaja izkušnje v Franciji. Postavlja teorijo, da hipovirulenca očitno nudi glivi neko neznano prednost, ki povečuje konkurenčnost glive v njeni ekološki niši. Kljub temu, da hipovirulentni sevi oblikujejo 10-20% konidijev brez dsRNA, pa se hipovirulenca naravno širi in ohranja, kjerkoli je vzpostavljena. V Italiji je Turchetti (1982) ugotavljal možnosti gojitvenih posegov pri gospodarjenju s sestoji pravega kostanja, v katerih je zastopan kostanjev rak v hipovirulentni obliki. Meni, da mora biti osnovni namen vsakega gojitvenega posega v sestoj zavarovati in pospeševati vzpostavljene hipovirulentne okužbe. Pomembni so tudi ukrepi gozdne higijene, ki naj v kar največjem obsegu zmanjšujejo infekcijski potencial virulentne oblike glive. Bazzigher *et al.* (1981) poročajo o pojavu hipovirulence v Švici. Tedaj so našli hipovirulentne seve na približno četrtini površine, kjer je bila zastopana virulentna oblika glive. Zaradi majhnega števila vegetativno inkompatibilnih skupin predvidevajo, da se bo hipovirulenca širila hitro. Na Hrvaškem je Halambek (1987) raziskala temeljne lastnosti hipovirulence kostanjevega raka in dokazala zastopanost dsRNA v hipovirulentnih sevih iz tega območja.

Želeli smo preizkusiti virulentnost najbolj tipičnih hipovirulentnih sevov, ki smo jih izolirali iz primorskega dela areala pravega kostanja pri nas. Najmanj škodljive seve bi lahko uporabili za aktivno širjenje v predele, kjer hipovirulentne oblike kostanjevega raka še niso zastopane in za zdravljenje posameznih virulentnih okužb.

2 MATERIAL IN METODE

Iz roba neškodljivih, površinskih okužb na skorji pravega kostanja smo v aprilu 1989 odvzeli približno dva cm široke in pet cm dolge dele lubja tako, da smo z nožem lubje odrezali do kambialne plasti. V laboratoriju smo s skalpelom odrezali nekaj mm velike koščke na prehodu med živim in mrtvim delom lubja in jih sterilizirali 10 sek. v 50% raztopini varenkine (3,1% aktivnega klora). Koščke lubja smo osušili s filtrirnim papirjem in jih namestili na gojišče iz krompirjevo glukoznega agarja (PDA, Bio-Merieux, 3,9%). Za nadaljnje delo smo uporabili 13 sevov, ki so v kulturi oblikovali najmanj piknidijev in niso bili obarvani oranžno, ampak rahlo rumeno ali so bili beli. Lokacije nabiranja izbranih sevov so naslednje: Panovec (številka seva v nadaljevanju: 1, 2, 3), Stara Gora (4), Pedrovo (5, 6, 7; seva 5 in 6 sta bila izolirana iz iste okužbe, prvi je bil bel, drugi rumen), Lipa (8), Tomaj (9), Koštabona (10, 11) in Ocizla (12, 13). V lubje panjevskih odganjkov pravega kostanja, ki so imeli premer 11 do 35 cm, smo seve vnesli 14. 8. 1989 (Rožnik, vrt Gozdarskega inštituta Slovenije), 24. 8. 1989 (Janče, GGE Polje, KO Volavljje, odd. 19a) in 25. 8. 1989 (Gorjanci, GGE Gorjanci, KO Črneča vas, odd. 124d). Vseh 13 sevov smo inokulirali v lubje odganjkov iz enega panja, na vsaki poskusni ploskvi v petih ponovitvah, opravili smo tudi kontrolo tako, da v rano nismo vnesli glive. Lubje smo pred inokulacijo razkužili s 96% etanolom (p.a. Fluka). Z razkuženim luknjačem za usnje s premerom 8mm smo odstranili lubje do lesa in v nastalo odprtino s pinceto vnesli podgobje glive iz roba 20 dni stare kulture glive. Odprtino na lubju in podgobje smo prekrili z lepilnim trakom Millipore. V vsak panjevski odganjek smo cepili šest sevov v 20 cm razdaljah po višini (najnižji je bil 60 cm od tal) in na poganjku vsakega na različni strani neba (S, J, V, Z). V nekajmesečnih presledkih smo izmerili višino in širino nekroz na lubju (2, 4, 7, 9 mesecev po inokulaciji). Končno meritev in reizolacijo inokuliranih sevov smo opravili 18 mesecev po inokulaciji. Po enačbi za površino elipse smo izračunali površino nekroz lubja, ki je mera patogenosti posameznega seva.

V bližini poskusnih ploskev smo v zunanji rob virulentnih okužb s kostanjevim rakom (zastopana so bila trosišča glive) cepili naslednje hipovirulentne seve: 5 (na Rožniku), 7 (na Jančah), 6, 7, 10 (na Gorjancih). Tehnika cepljenja je bila enaka kot zgoraj, cepljena mesta pa so bila na razdalji 5 - 8 cm in so obdajala celotni obod nekroze lubja.

3 REZULTATI IN DISKUSIJA

V kulturi se sevi razlikujejo v barvi in v številu piknidijev. Za inokulacije na poskusne ploskve smo izbrali bele seve, ki ne oblikujejo piknidijev, nato bele, ki piknidije oblikujejo in rahlo rumene, ki tudi oblikujejo piknidije. Po literarnih podatkih naj bi ta morfološka znamenja nakazovala hipovirulentno lastnost sevov (Conedera, 1993). Kontrolne rane, v katere nismo vnesli glive, so se zarasle brez oblikovanja kakršnekoli nekroze lubja.

Rezultate inokulacij prikazuje tabela 1 in slika 1. Površine nekroz kažejo veliko variabilnost v okviru enega seva, še večjo pa med različnimi sevi. Zmanjšana patogenost je izrazita pri sevih št. 5, 6, 10 in 12, ki izvirajo iz velikega dela areala nabiranja vzorcev (Pedrovo, Ocizla, Koštabona). Zanimiv je pojav, da tudi rumeno obarvani izolat kaže izrazito hipovirulenco (št. 6). Najbolj virulentni izolati (št. 3, 8, 9 in 11) se po površini nekroz približujejo normalno patogenim izolatom, v nekaterih primerih so pod inokuliranim mestom začeli izraščati drugotni poganjki.

Tabela 1: Površine nekroz lubja pravega kostanja, ki jih je povzročilo 13 sevov *C. parasitica* v času poskusa

 Table 1: The area of bark necroses of sweet chestnut produced by 13 strains of *C. parasitica* in the time of the experiment

sev št. str. num	površina nekroze lubja v cm ² in standardna napaka (S.E., v oklepaju) area of bark necroses in cm ² and standard error (in brackets)				
	2 mes. (months)	4 mes. (months)	7 mes. (months)	9 mes. (months)	18 mes. (months)
1	1,144 (0,325)	1,968 (0,656)	3,101 (1,215)	5,988 (2,925)	34,292 (12,115)
2	1,336 (0,385)	2,173 (0,683)	5,269 (1,663)	10,807 (3,413)	42,776 (10,844)
3	1,838 (0,337)	4,012 (0,821)	7,073 (1,379)	15,189 (3,075)	58,249 (11,025)
4	1,483 (0,537)	1,907 (0,620)	3,023 (1,262)	6,283 (2,687)	23,872 (8,816)
5	1,242 (0,357)	1,898 (0,507)	2,144 (0,519)	2,707 (0,558)	4,360 (1,248)
6	1,743 (0,556)	2,156 (0,659)	2,400 (0,672)	3,385 (0,894)	8,051 (2,097)
7	2,648 (0,744)	4,327 (0,954)	6,754 (1,724)	10,143 (2,390)	19,640 (4,597)
8	2,696 (0,826)	4,968 (1,524)	8,846 (2,584)	17,827 (5,068)	56,603 (15,047)
9	5,501 (1,095)	11,539 (1,466)	18,209 (2,064)	28,139 (2,521)	53,220 (6,847)
10	2,611 (0,731)	3,924 (0,805)	4,485 (0,961)	5,559 (1,134)	8,697 (1,874)
11	3,992 (0,968)	7,782 (1,257)	13,204 (2,022)	26,533 (4,078)	75,242 (8,671)
12	1,667 (0,224)	2,132 (0,259)	2,668 (0,386)	4,848 (0,808)	11,397 (2,199)
13	3,032 (1,109)	3,903 (1,367)	7,970 (2,921)	10,825 (3,896)	33,635 (7,922)

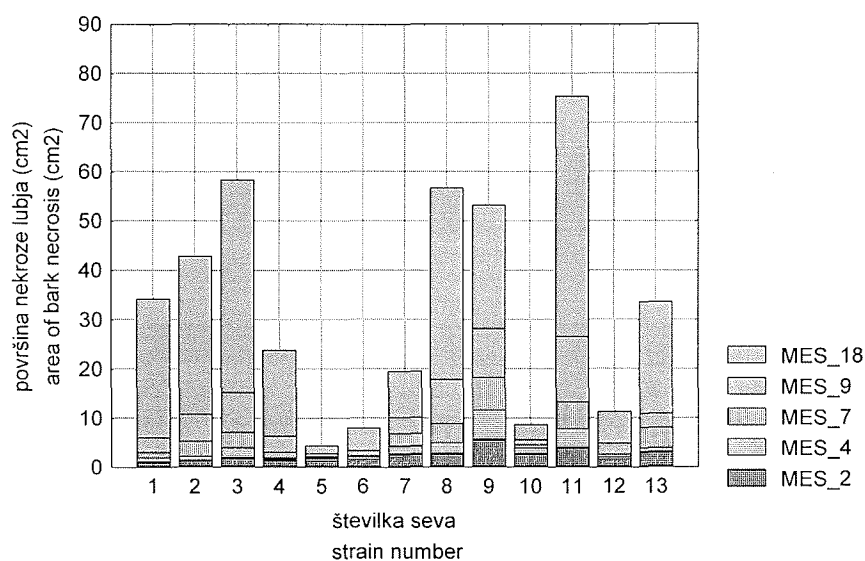

 Slika 1: Površine nekroz lubja pravega kostanja, ki jih je povzročilo 13 sevov *C. parasitica* v času poskusa

 Figure 1: The area of bark necroses of sweet chestnut produced by 13 strains of *C. parasitica* in the time of the experiment

Primerjava s podobnimi poskusi (Halambek, 1987, Anagnostakis in Waggoner, 1981) kaže, da vseh 13 preizkušanih sevov lahko označimo kot hipovirulentne. Sevi št. 5, 10 in 12 so bili v kulturi beli in so oblikovali le posamezne piknidije, povzročili so majhne nekroze lubja. Sevi 3, 8, 9 in 13 so med izbranimi oblikovali največ piknidijev v kulturi in bili so najintezivneje rumenooranžni. Zmožnost sevov za oblikovanje piknidijev in barvila je povezana z njihovo patogenostjo. Ugotovitev se na splošno sklada z navedbami iz literature (Anagnostakis, 1987, Halambek, 1987, Heiniger in Rigling, 1994), vendar je v nekaterih raziskavah ugotovljeno tudi, da ni jasnih povezav med fenotipom kulture in hipovirulenco (Halambek, 1987; Heiniger in Rigling, 1994). Te ugotovitve nakazuje tudi primerjava morfoloških značilnosti seva 7, ki je kljub rumeni obarvanosti povzročil majhne poškodbe lubja. Različno močna virulenca hipovirulentnih sevov, ki jo lahko označimo kot razpon med avirulenco in normalno virulenco patogena, je opažena v vseh raziskavah, tudi naši.

Z reizolacijami gliv iz roba površinskih okužb inokuliranih ran smo pridobili seve, ki se morfološko niso razlikovali od inokuliranih.

Vse inokulacije v rob virulentnih okužb s kostanjevim rakom so bile uspešne, kljub temu, da je bila kompatibilnost sevov neznan. Rane so se po 18. mesecih od inokulacije celile in začele zaraščati nekrozo.

4 SKLEPI

Z inokulacijami lubja pravega kostanja je bila ugotovljena hipovirulenca kostanjevega raka v primorskem delu areala pravega kostanja.

Tipični hipovirulentni sevi kostanjevega raka so razširjeni v celotnem primorskem delu areala pravega kostanja.

Poskusi zdravljenja virulentnih oblik kostanjevega raka z inokulacijo najtipičnejših hipovirulentnih sevov so uspeli in potrdili možnost uporabe pojava hipovirulence za biotično zatiranje kostanjevega raka.

5 LITERATURA

- Anagnostakis, S. L., 1987: Chestnut blight: the classical problem of an introduced pathogen.- *Mycologia*, 1987, vol. 79, 1, s. 23-37.
- Anagnostakis, S. L., Day, P. R., 1979: Hypovirulence conversion in *Endothia parasitica*.- *Phytopathology*, 1979, vol. 69, 12, s. 1226-1229.
- Anagnostakis, S. L., Waggoner, P. E., 1981: Hypovirulence, vegetative incompatibility and growth of cankers of chestnut blight.- *Phytopathology*, 1981, vol. 71, 11, s. 1198-1202.
- Conedera, M., 1993: Cancro corticale del castagno.- *Ber. Eidgen. Forsch.anst. Wald Schnee Landsch.*, 1993, vol. 335, 40 s.
- Bazzigher, G., Kanzler, E., Kuebler, T., 1981: Irreversible Pathogenitaetsverminderung bei *Endothia parasitica* durch uebertragbare Hypovirulenz.- *Eur. J. For. Path.*, 1981, vol. 11, 5-6, s. 358-369.
- Day, P. R., Dodds, J. A., Elliston, J. E., Jaynes, R. A., Anagnostakis, S. L., 1977: Double-stranded RNA in *Endothia parasitica*.- *Phytopathology*, 1977, vol. 67, s. 1393.

- Dodds, J.A., 1980: Revised estimates of the molecular weights of ds-RNA segments in hypovirulent strains of *Endothia parasitica*.- Phytopathology, 1980, vol. 70, 12, s. 1217-1220.
- Halambek, M., 1988: Istraživanje virulentnosti gljive *Endothia parasitica* (Murr.) And. uzročnika raka kore pitomog kestena (*Castanea sativa* Mill.).- Doktorska disertacija, Zagreb, 1988, 136 s.
- Heiniger, U., Rigling, D., 1994: Biological control of chestnut blight in Europe.- Ann. Rev. Phytopathol., 1994, vol. 32, s. 581 - 599.
- Hočevar, S., Janežič, F., Hlišč, T., 1969: Ohranitev domačega kostanja.- Inštitut za gozdno in lesno gospodarstvo, Ljubljana, 1969, 89 s.
- Jaynes, R.A., Elliston, J.E., 1980: Pathogenicity and canker control by mixtures of hypovirulent strains of *Endothia parasitica* in american chestnut.- Phytopathology, 1980, vol. 70, 5, s. 453-456.
- Jurc, D., 1985: Novo o kostanjevem raku, holandski brestovi boleznih v drevesnih ranah.- V: Stabilnost gozda v Sloveniji, Gozdarski študijski dnevi - Portorož, 1984, Ljubljana, BF, VTOZD za gozdarstvo, s. 181-188.
- Jurc, D., 1988: Kaj bo s kostanjem pri nas? I. Kmečki glas, Ljubljana, 1988, vol. 45, št. 4, s.11.
- Jurc, D., 1988: Kaj bo s kostanjem pri nas? II. Kmečki glas, Ljubljana, 1988, vol. 45, št. 5.
- Jurc, D., Kralj, T., Medved, M., Mikulič, V., Žgajnar, L., 1994: Stanje in perspektive oskrbe s kostanjevim lesom iz domačih virov v tovarni "Tanin" Sevnica.- Gozdarski inštitut Slovenije, Ljubljana, 1994, elaborat, 36 s.
- Turchetti, T., 1982: Hypovirulence in chestnut blight (*Endothia parasitica* /Murr./And.) and some practical aspects in Italy.- Eur. J. For. Path., 1982, vol. 12, 6-7, s. 414-417.