

***Phytophthora* genties grybai – pavojingi sumedėjusių augalų ligų sukėlėjai Europoje ir jų paieška Lietuvoje**

Antanina Stankevičienė*¹, Vilija Snieskienė¹, Kęstutis Žeimavičius¹, Zita Jovaišienė², Rūtilė Pukienė³, Adomas Vitas³, Jonas Karpavičius³

¹*Vytauto Didžiojo universiteto Kauno botanikos sodas*

Ž. E. Žilibero g. 6, LT-46324 Kaunas. El. paštas: a.stankeviciene@bs.vdu.lt, v.snieskiene@bs.vdu.lt

²*Vilniaus kolegijos Sveikatos priežiūros fakultetas*

Didlaukio g. 45, LT-08303 Vilnius. El. paštas info@spf.viko.lt

³*Vytauto Didžiojo universiteto Gamtos fakulteto Aplinkos tyrimų centras*

Vileikos g. 8, LT-44404 Kaunas. El. paštas: r.pukiene@gf.atc.vdu.lt, a.vitas@gf.atc.vdu.lt

(Gauta 2011 m. sausio mėn.; atiduota spaudai 2011 m. kovo mėn.; prieiga internete nuo 2011 m. balandžio 18 d.)

Anotacija

Pastaraisiais metais globalinių klimato pokyčių poveikyje suintensyvėjo grybinių ligų, migracija. Nustatyta, kad daugelį dekoratyvinių augalų rūšių pažeidžia invazinis grybas – *Phytophthora* spp. Jau XX a. pabaigoje Europoje buvo aprašytos 54 rūšys. Lietuvoje šie tyrimai pradėti Z. Jovaišienės 2004 metais, o 2010 m., pradėtas kompleksinis *Phytophthora* spp. tyrimas: išskyrimas, identifikavimo galimybės, paplitimas, daroma žala. Šiuo metu aptikta 16 rūšių medžiai su pažeidimais, būdingais *Phytophthora* spp. Daugumoje vyrauja pavieniai pažeisti medžiai, tačiau dviejuose parkuose aptikta net 20–30 % pažeisto juodalksnio (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.).

Reikšminiai žodžiai: *Phytophthora* spp., dekoratyviniai medžiai, Europa, Lietuva.

Abstract

Global climatic changes, during the recent years, have influenced the migration of fungous diseases. Invasive fungus *Phytophthora* spp. was ascertained to injure most of ornamental plant species. Already in 20th century there were described 54 species in Europe. The pioneer of these researches in Lithuania was Z. Jovaišienė (2004). In 2010 the complex researches of *Phytophthora* spp. have been proceeded: opportunities of isolation and identification, spread, the done harm. There are yet found 16 tree species, which had injuries typical for *Phytophthora* spp. Mostly are injured separate trees, however in two parks there were detected 20–30 % of injured black alder (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.).

Key words: *Phytophthora* spp., ornamental trees, Europe, Lithuania.

Įvadas

Pastaraisiais dešimtmečiais globaliniai klimato pokyčiai lėmė ir regioninius klimato pasikeitimus – pašiltėjo žiemos ir pavasario sezonai, sausringesnės tapo vasaros ir padidėjo kritulių kiekis žiemos metu bei pasireiškė kiti ekstremumai, kurie ėmė įtakoti ekosistemos elementų, ypač jautriausių, būklę. Urbanizuotose ekosistemose susiduriame su kenkėjų ir grybinių ligų suintensyvėjimu, migracija, invazija (Snieskienė, Stankevičienė, 2008; Stankevičienė et al., 2010).

Pastaraisiais metais Europoje plinta agresyvūs *Phytophthora* genties grybai, sukeliantys sumedėjusių augalų stiebo vėžį, šakų džiūvimą, lapų pažeidimus ir dechromaciją bei šaknų puvinius. Iki 20 a. dešimtojo dešimtmečio vidurio Europoje buvo žinomos 54 fitofteros rūšys (Erwin, Ribeiro, 1996; Brasier, 1999, Jung, Burges, 2009). Per dešimtmetį Europoje aptiktos 23 naujos rūšys, o 13 naujų rūšių oficialiai užregistruota (Jung, Burges, 2009). Manoma, kad sinergetinė sąveika tarp *Phytophthora* genties dirvos patogenų sukeliama puvinų ir klimato pokyčių yra pagrindinė Europos miškų (uosio, ąžuolo, buko, alksnio) nykimo priežastis (Brasiera, Jung, 2006; Jung, Blaschke, 2004). *Phytophthora* grybai padaro didelių nuostolių medelynuose (Orlikowski et al., 2010). Kadangi *Phytophthora* genties grybai į Europą pateko iš kitų žemynų, vietiniai augalai kol kas nėra prisitaikę ir todėl labai jautrūs šių patogenų invazijai. Šiuo metu nėra sukurta efektyvių cheminių ar kitų apsaugos nuo jų priemonių, todėl dauguma pažeistų augalų žūva. Lenkijos medelynuose iki šiol aptikta 16 rūšių *Phytophthora* genties grybų, pažeidžiančių dekoratyvinius augalus (Orlikowski et al., 2010), kuriais kaimyninė šalis prekiauja, todėl susidaro palankios sąlygos šiems patogenams išplisti ir Lietuvoje.

Iki šiol Lietuvoje išskirtos, identifikuotos ir aprašytos trys *Phytophthora* rūšys: *P. cinnamomi*, *P. cactorum* ir ypatingai pavojinga *P. ramorum* (Jovaišienė, 2004; Jovaišienė, Lane, 2006). *P. ramorum* įrašyta į Europos ir Viduržemio jūros šalių regiono augalų apsaugos organizacijos signalinį sąrašą. Pradėti tyrimai visose Europos ir Viduržemio jūros regiono augalų apsaugos organizacijos šalyse (44 narės). Remiantis Komisijos sprendimu (EB Nr. 2002/757) dėl laikinų nepaprastųjų fitosanitarinių priemonių, skirtų apsaugoti Bendriją nuo *Phytophthora ramorum* Werres, De Cock & Man in' t Veld sp. nov. įvežimo ir paskleidimo joje, tyrimai turi būti atliekami visose ES šalyse (Europos Bendrijų komisija, 2002; Nečajeva ir kt., 2004).

Darbo tikslas – pateikti informaciją apie *Phytophthora* spp., pažeidžiančių sumedėjusius dekoratyviusius augalus, tyrimus Europoje ir Lietuvoje.

Tyrimų metodika (metodai)

2010 m. rugsėjo–gruodžio mėnesiais vykdant želdinių ir želdynų stebėseną Kauno, Vilniaus, Jonavos ir Ukmergės miestuose bei Kauno ir Ignalinos rajonuose buvo registruoti medžiai su būdingais *Phytophthora* spp. pažeidimais bei paimami ėminiai šio grybo rūšiai nustatyti.

2–0,5 cm skersmens medienos gabalėliai paimti iš augalų su pažeidimo požymiais (drėgnomis rusvai-juosvomis dėmėmis ant kamieno) žaizdos pakraščio, kur susisiečia sveikas ir pažeistas audinys, ties medienos-brazdo vieta. Laikantis sterilumo – gražtas po kiekvieno ėminio dezinfekuojamas 96° etilo alkoholiu, ėminys dedamas į plastikinį, sandariai uždaramą, maišelį. Ant jo užrašoma informacija: augalo vardas, vietos koordinatės ir data. Nesant galimybei tuoj pat pasėti, ėminys apie parą gali būti laikomas +4 °C temperatūroje.

Phytophthora genties grybų išskyrimas ir jų rūšies identifikavimas yra žymiai sudėtingesnis nei kitų mikroskopinių grybų (Werres et al., 2001). Paimti ėminiai nuplaunami tekančio vandens srove, po to distiliuotu vandeniu, nusausinami steriliu filtriniu popieriumi ir nudeginami. Trimis pakartojimais atpjauti trys 0,5 cm skersmens medienos gabalėliai dedama į 90 mm skersmens Petri lėkšteles su terpe.

Phytophthora grybų išskyrimui naudojamos šios terpės:

I. **Bulvių dekstrozės agaro** (*potato dextrose agar* PDA) terpėje po 1–3 dienų inkubacijos tamsoje, 24 °C temperatūroje, neatidarius lėkštelės, apatinėje Petri lėkštelės pusėje matomi fitoftoros hifai be pertvarėlių. Mikroskopuojama atsižvelgiant į grybo morfologinius požymius vadovaujantis apibūdintojais (Bush et al., 2006). Siekiant išvengti iš aplinkos patekusių bakterijų vystymosi į terpę dedami antibiotikai, tačiau jie neigiamai veikia ir fitoftoros vystymąsi.

II. **V8 daržovių terpę** rekomenduoja W. Gams ir kt. (1998). Joje *Phytophthora* grybai gerai auga ir sporuliuoja. Norint išvengti sudėtingo terpės ruošimo (centrifugavimo, skaidrinimo) galima panaudoti Lenkijoje gaminamas daržovių sultis „Fortuna“ (PL), kurių sudėtyje yra špinatai, salierai, burokėliai, porai, brokoliai, morkos, obuoliai ir pomidorai (Orlikowski et al., 2010). Terpės paruošimas pateiktas 1 lentelėje.

1 lentelė. V8 terpės ruošimui naudojamos sudedamosios dalys

Table 1. Ingredients for preparation of V8 medium

Terpės sudėtinės dalys <i>Medium components</i>	Bendras terpės kiekis/ <i>Total amount of media</i>			
	0,25 l	0,5 l	0,6 l	1 l
8 rūšių daržovių sultys	50 ml	100 ml	120 ml	200 ml
CaCO ₃	0,75 g	1,5 g	1,8 g	3 g
Agaras	5 g	10 g	12 g	20 g
Dist. vanduo	200 ml	400 ml	480 ml	800 ml
pH 5,2; autoklavuojama 20 min, 1 atm, 120°C				

III. **Morkų gabalėlių agaro** (*carrot potato agar* – CPA) terpė gaminama pagal S. Werres ir kt. (2001), Z. Jovaišienės (2006) rekomendacijas: 50 g morkų supjaustytų gabaliukais, 22 g agaro

bei 1000 ml vandens. Ši terpė kaip ir V8 terpė plačiai naudojama *Phytophthora* spp. auginimui. Mėginiai inkubuojami 1–2 dienas kambario temperatūroje (20–22 °C). Trečią ar ketvirtą dieną, neatidarius Petri lėkštelės, apatinėje Petri lėkštelės pusėje matomi fitoftoros hifai be pertvarėlių. CPA terpėje chlamidosporos plonos.

Tuomet atidarius lėkštelę paimamas terpės gabaliukas su hifais ir perkeliamas ant vandens agaro terpės (*water agar* – **WA**), su ankštinio pipiro arba kanapės sėklomis, kurių išskiriamos medžiagos skatina sporangių vystymąsi. Zoosporos stebimos sterilių kanapių sėklų dirvos ištraukoje. Užpilama nedideliu kiekiu sterilaus vandens ir dar auginama keletą dienų, kol išaugs sporangės. Sporangių dydis priklauso nuo kolonijų aprūpinimo vandeniu CPA terpėje (Werries et al., 2001). Hifų stadijoje svarbu *Phytophthora* genties grybų nesupainioti su jiems giminingais *Pythium* spp. Tačiau, jeigu mėginys imtas ne nuo šaknų ar šaknies kaklelio, beveik visuomet esama fitoftoros.

IV. Taip pat naudojama **žemės ištrauka**, kurioje augalo gabalėliai su ligos požymiais, ar micelio gabalėliai su terpe labai greitai formuoja konidijas (Orlikowski et al., 2010). Ji ruošama iš 0,5 l durpės ir 1,5 l vandens. Paruošta terpė po 24 val. nukošiama ir nufiltruojama. Į Petri lėkštelės įpilama 10 ml ištraukos ir į ją įdedami keletas 1 mm dydžio augalo gabaliukų su pažeidimo požymiais arba micelio gabalėliai su terpe.

V. Norint užauginti micelio masę tolimesniems DNR tyrimams naudojama organinė **C terpė** (2 lentelė). Be agaro ši terpė būna skysta.

2 lentelė. C terpės ruošimui naudojamos sudedamosios dalys

Table 2. Ingredients for preparation of C medium

Terpės sudėtinės dalys <i>Medium components</i>	Bendras terpės kiekis/ <i>Total amount of media</i>			
	0,25 l	0,6 l	0,8 l	1 l
Gliukozė	2,5 g	6 g	8 g	10 g
Peptonas	150 mg	600 mg	800 mg	1 g
Mielių ekstraktas	15 mg	60 mg	80 mg	0,1 g
KH ₂ PO ₄	150 mg	600 mg	800 mg	1 g
Agaras	5 g	12 g	16 g	20 g
pH 5,2; autoklavuojama 17 min, 1 atm, 120 °C				

Rezultatai

2010 m. Lietuvos miestų želdiniuose registruoti įvairių rūšių medžiai su kamienų pažeidimais, kurių požymiai būdingi *Phytophthora* genties grybams (3 lentelė).

3 lentelė. Medžiai su *Phytophthora* genties grybams būdingais pažeidimų požymiais Lietuvos miestų želdynuose bei Aukštaitijos Nacionaliniame parke 2010 m.

Table 3. Trees with characteristic disturbances to Phytophthora genus fungi in greeneries of Lithuanian cities and Aukštaitija National Park in 2010

Nr.	Augalas šeimininkas <i>Host plants</i>	Miestas, rajonas <i>City, district</i>	Augavietė <i>Growth location</i>	Pastabos <i>Note</i>
1	2	3	4	5
1.	<i>Acer platanoides</i> L.	Alytus, Kaunas	Gatvės želdiniai, parkas	Naujai pasodinti
2.	<i>A. platanoides</i> ‘Globosum’	Alytus	Gatvės želdiniai	
3.	<i>Acer platanoides</i> ‘Eurostar’	Alytus	Gatvės želdiniai	Naujai pasodinti
4.	<i>Aesculus hippocastanum</i> L.	Alytus, Kaunas, Vilnius	Gatvės želdiniai	Naujai pasodinti
5.	<i>Alnus glutinosa</i> (L.) Gaertn.	Alytus	Parkas	
6.	<i>A. incana</i> (L.) Moench	Kauno raj.	Parkas	
7.	<i>Betula pendula</i> Roth	Alytus, Kaunas, Kauno raj.	Parkas	
8.	<i>Crataegus</i> sp.	Jonava	Gatvės želdiniai	Naujai pasodinti
9.	<i>Frangula alnus</i> Mill.	Ignalinos raj.	Nacionalinis parkas	
10.	<i>Picea abies</i> (L.) Karsten	Kauno raj.	Medelynas	
11.	<i>P. pungens</i> Engelm.	Kauno raj.	Medelynas	

3 lentelės tęsinys

1	2	3	4	5
12.	<i>Populus canadensis</i> Moench	Kaunas	Gatvės želdiniai	
13.	<i>P. canescens</i> (Aiton) Sm.	Kaunas	Parkas	
14.	<i>Quercus robur</i> L.	Kaunas	Parkas	
15.	<i>Q. rubra</i> L.	Kaunas	Parkas	
16.	<i>Rhododendron</i> sp.	Kaunas	Medelynas	
17.	<i>Salix caprea</i> L.	Kaunas	Parkas	
18.	<i>Sorbus aucuparia</i> L.	Kauno raj.	Poilsiavietė	
19.	<i>Tilia platyphyllos</i> Scop.	Kaunas	Parkas	

Gatvių želdiniuose ir parkuose aptinkami ąžuolo, beržo, gluosnio, klevo, kaštono, liepos ir tuopos genčių pavieniai pažeisti medžiai. Dviejuose parkuose (Kauno botanikos sode ir Alytaus Jaunimo sode) juodalksnio (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.) su pažeistais kamienais ir išretėjusiomis lajomis buvo 20–30 %. Medelyne (Kauno raj.) pažeistų dygiosios eglės (*Picea pungens* Engelm.) medelių buvo apie 5 %.

Iš įvairių rūšių medžių su šiais, būdingais *Phytophthora* spp. pažeidimais, paimti 105 medienos ir brazdo ėminiai. Po medienos ėminių paruošimo jie buvo auginami PDA terpėje. *Phytophthora* genties grybai šioje terpės išaugo tik iš 1,9 % ėminių.

Gatvių želdiniuose ir parkuose augančių medžių pažeidimai nepriklausė nuo jų amžiaus (tirtų medžių amžius svyravo nuo 10 iki 80 m.). Bendri požymiai (nepriklausomai nuo augalo rūšies) buvo šie: ant kamieno įvairiame aukštyje rudžių spalvos dėmės. Nedidelės, neseniai atsiradusios dėmės (iki 8–10 cm pločio ir 10–14 cm ilgio) būna sausos, vėliau jos didėja, jų viduje atsiveria šlapiuojančios žaizdos (angl. klb. *bleeding bark canker*) (sp. foto, 19 pav.). Dažniau ant kamieno buvo ne viena, bet kelios mažesnės žaizdos. Tokie pažeidimai būdingi juodalksniams ir kaštonams. Rudens pabaigoje (spalio-lapkričio mėn.) iš žaizdų gausiai sunkiasi eksudatas (sp. foto, 20 pav.). Visų rūšių medžių, kurių kamienai buvo pažeisti, lajos buvo retos, prieaugis mažesnis negu šalia augančių nepažeistų medžių. Pažeidimo vietoje padarius pjūvį, matomas pažeistas (tamsiai rudos ar juodos spalvos) brazdas, jei pažeidimas gilesnis buvo parudavusi ir mediena. Didelės žaizdos buvo iki 100 cm ilgio ir apie 20 cm pločio.

Rezultatų aptarimas

Siekiant ištirti vertingų želdinių jautrumą patogeninių grybų invazijoms, toliau reikalinga tobulinti naujų *Phytophthora* genties ir kitų grybų, sukeliančių pažeidimus medžių kamienuose, aptikimo metodiką panaudojant erdvinę vidinių pažeidimų struktūros diagnostiką. Šiuos tyrimus numatoma atlikti vykdant 2010–2011 m. projektą „Invazinės grybų rūšys vertingų medžių patogenezėje, pavojingų būklių diagnostika ir patogenezė“. Bus įvertinta *Phytophthora* genties patogenų, pažeidžiančių sumedėjusius dekoratyvius augalus Lietuvoje, paplitimas bei jų daroma žala.

Išvados

1. 2010 m. aptikti 16 rūšių medžiai su kamienų pažeidimais (šlapiomis rūdžių spalvos dėmėmis), būdingais *Phytophthora* genties grybams. Daugumoje vyrauja pavieniai pažeisti medžiai, tačiau dviejuose parkuose aptikta net 20–30 % pažeisto juodalksnio.
2. Iš įvairių rūšių medžių su būdingais *Phytophthora* spp. pažeidimais paimti 105 medienos ir brazdo ėminiai. Bulvių dekstrozės terpėje *Phytophthora* genties grybai išaugo iš 1,9 % . Iš kitų ėminių išaugo *Phytophthora* lydintys grybai.

Padėka. Tyrimą rėmė Lietuvos mokslo taryba (Projekto Nr. LEK-21/2010).

Acknowledgement. The research was supported by the Research Council of Lithuania (Project No LEK-21/2010).

Literatūra

1. Brasier C. M. The role of *Phytophthora* pathogens in forests and semi-natural communities in Europe and Africa. *Phytophthora Diseases of Forest Trees* (ed. Hansen E.M., Sutton W.). Oregon, 1999. P. 6–13.
2. Brasiera C., Jung T. Recent developments in *Phytophthora* diseases of trees and natural ecosystems in Europe. *Progress in research on Phytophthora diseases of forest trees. Proceedings of the Third International IUFRO Working Party S07.02.09* (Ed. C. Brasier, T. Jung and W. Oßwald). Farnham, 2006. P. 5–16.
3. Bush E. A., Stromberg E. L., Hong C., Richardson P. A., and Kong P. Illustration of key morphological characteristics of *Phytophthora* species identified in Virginia nursery irrigation water. *Plant Health Progress*, 2006.
4. Erwin D.C., Ribeiro O.K. *Phytophthora diseases worldwide*. APS Press, St. Paul, Minnesota, 1996.
5. Europos Bendrijų komisija. 2002. 2002/757/EB dėl laikinų nepaprastųjų fitosanitarinių priemonių, skirtų apsaugoti Bendriją nuo *Phytophthora ramorum* Werres, De Cock & Man in't Veld sp. nov. įvežimo ir paplitimo joje. P. 6.
6. Gams W., Hoekstra E.S., Aptroot A. *CBS Course of mycology. Centraalbureau voor Schimmelcultures*. Baam, 1998.
7. Jovaišienė Z. Naujos spygliuočių ligos sukėlėja – cinamoninė fitoftora (*Phytophthora cinnamomi* Rands). *Mūsų girios*, 5. 2004. P. 12.
8. Jovaišienė Z., Lane C. First report of *Phytophthora cactorum* in Lithuania. *Botanica Lithuanica*, 12(3). Vilnius, 2006. P. 197–199.
9. Jung T., Blaschke M. 2004. *Phytophthora* root and collar rot of alders in Bavaria: distribution, modes of spread and possible management strategies. *Plant Pathology*, 53. P. 197–208.
10. Jung T., Burgess T.I. Re-evaluation of *Phytophthora citricola* isolates from multiple woody hosts in Europe and North America reveals a new species, *Phytophthora plurivora* sp. Persoonia, 22, 2009. P. 95–110.
11. Orlikowski B., Ptaszek M., Orlikowska T., Trzewik A. *Phytophthora* species, new pathogens in landscape and gardens. *Vytauto Didžiojo universiteto botanikos sodo raštai*, XIV, 2010. P. 133–139.
12. Snieskienė V., Stankevičienė A. Paprastojo kaštono ligos Lietuvoje 2008 m. *Žmogaus ir gamtos sauga 2009*, LŽŪU. Kaunas, 2009. P. 97–100.
13. Stankevičienė A., Snieskienė V., Lugauskas A. *Erysiphe flexuosa* – the new pathogen of *Aesculus hippocastanum* in Lithuania. *Phytopathologia*, 56, 2010. P. 67–71.
14. Werres S., Marwitz R., Poerschke U., Themann K. A long-term study of *Phytophthora* species in Germany. 1 *Phytophthora* species which could be definitely identified. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, 108 (2), 2001. P. 113–120.

***Phytophthora* Genus Fungi – Dangerous Pathogens of Woody Plants in Europe and Their Search in Lithuania**

(Received in January, 2011; Accepted in March, 2011; Available Online from 18th of April, 2011)

Summary

Environmental changes during the last decades have created favourable conditions for spreading of new invasive tree-damaging fungi species in Lithuania. *Guignardia aesculi* and *Erysiphe flexuosa* damaging *Aesculus hippocastanum* L. and aggressive *Phytophthora* fungi species are hazardous to various tree species.

During the research work conducted in 2010 in Alytus, Jonava, Kaunas, and Vilnius city greeneries and in Kaunas and Ignalina districts trees of 16 species (from *Acer* L., *Aesculus* L., *Betula* L., *Crataegus* L., *Frangula* Mill., *Picea* A. Dietr., *Populus* L., *Salix* L., *Sorbus* L., *Tilia* L. and *Quercus* L. genus) with stem damages (wet rust-colour spots) characteristic of *Phytophthora* fungi genus were found. The damaged trees usually are sporadically distributed. However, in two parks ca 20–30 % of damaged black alders (*Alnus glutinosa*) were found and in the arboretum in Kaunas district the number of damaged blue spruces (*Picea pungens*) comprised of ca 5 %. According to our observation damages of stem do not depend on tree age. 106 wood and cambium samples were taken from trees of various species with damages characteristic of *Phytophthora* spp. In the PDA (Potato Dextrose Agar) medium *Phytophthora* genus fungi were isolated from 1.9 % samples. From other samples *Phytophthora* spp. accompanying fungi were isolated.

A PDA medium is suitable only for growing of sterile mycelium; colony morphological features allow to identify fungi genus only. Aiming to identify a species of *Phytophthora* genus, the Carrot potato agar or V8 mediums are necessary because they allow to grow the sporifying organs.