

Exobasidium japonicum – rododendrų pūslialigės sukėlėjas

Vaidotas Lygis, Banga Grigaliūnaitė, Antanas Matelis

¹*Gamtos tyrimų centro Botanikos institutas, Žaliųjų Ežerų g. 49, LT-08406 Vilnius; el. paštas: vaidotas.lygis@botanika.lt*

Vitalija Pribušauskaitė

Vilniaus universiteto Botanikos sodas, Kairėnų g. 43, LT-10239 Vilnius; el. paštas: vitalija.pribusauskaite@gmf.vu.lt

Anotacija

2009–2010 m. Vilniaus universiteto Botanikos sode buvo tiriami rododendrus pažeidžiantys *Exobasidium* genties grybai. Polimerazės grandininės reakcijos (PGR) metodu pagal genomines DNR ITS regiono sekas buvo identifikuoti specializuoti dviejų rūšių *Exobasidium* genties grybai – *E. vaccinii*, pažeidžiantis bruknę (*Vaccinium vitis-idaea* L.) ir *Exobasidium japonicum* – rododendrą (*Rhododendron* L.).

Exobasidium japonicum Shirai ant rododendrų (*Rhododendron* ‘Bielici’, ‘Hatsu Giri’, ‘Jelinkovy’ ir *R. kiusianum* ‘Album’ ir ‘Alpinum’) Lietuvoje identifikuotas pirmą kartą.

Reikšminiai žodžiai: *Exobasidium japonicum*, pūslialigė, rododendras (*Rhododendron*), Lietuva.

ĮVADAS

Exobasidiaceae šeimos, *Exobasidium* genties grybai plačiai paplitę visame pasaulyje, ypač šiaurės ir vidutinio klimato regionuose. Šiuo metu priskaičiuojama per šimtą *Exobasidium* genties grybų rūšių (de Beer et al., 2006). Šios genties grybai labiausiai pažeidžia *Ericaceae* šeimos augalų (bruknių, spanguolių, mėlynių, rododendrų) lapus, žiedkočius ir stiebus (Ezuka, 1991a, 1991b; Graafland, 1960). Pažeistose vietose audiniai sustorėja: iš pradžių viena lapų pusė būna žalsvai balkšvos spalvos, o antra – parausvėja. Grybai sukelia specifiskus

vegetatyvinių ar reprodukcinų organų pažeidimus – pūslialiges, kurios susidaro dėl augalo ląstelių hipertrofijos. Pažeistos ląstelės padidėja 2–4 kartus, pakeisdamos formą. Kai pažeidžiamas stiebas ar žiedkočiai su žiedais, tokie augalai visai nedera. Jei grybas pažeidžia lapus, nukenčia augalo dekoratyvinę vertę, derlius būna labai mažas ir prastos kokybės (Farr et al., 1996; Graafland, 1960; Nagao et al., 2000). Skirtingos *Exobasidium* genties grybų rūšys gali būti vienmetės arba daugiametės. Palankiausios sąlygos plisti šių grybų sporoms – kai oras yra vėsus ir drėgnas. *Exobasidium* genties grybai dažniau užkrečia rododendrus, kurie auga prastai aeruojamame dirvožemyje (Penkonen et al., 2008).

Lietuvoje iki šiol aprašytas tik vienas *Exobasidium* genčiai priklausantis grybas – plačiai visame pasaulyje paplitęs paprastasis bruknėgrybis (*E. vaccinii* (Fuckel) Woronin), pažeidžiantis bruknes, augančias natūraliuose bruknynuose (Bandzaitienė ir kt., 2002) bei spanguoles (Daubaras, 2006). 2008 m. rugpjūčio mėn. Vilniaus universiteto Botanikos sode (Kairėnai) buvo aptikti rododendro (*Rhododendron* spp.) lapų pažeidimai su pūslialigės požymiais, panašiais į sukeliamus *E. vaccinii*. 2009 m. atlikti preliminarūs tyrimai parodė, kad ligą sukėlė *Exobasidium japonicum* Shirai – naujas grybas Lietuvoje. Pirmą kartą šis grybas identifikuotas Japonijoje – 1896 m. ant *Rhododendron* genties augalų; Europoje šio grybo sukelti rododendrų pažeidimai pastebėti XX a. pradžioje (Ing, 1999, 2005).

Exobasidium japonicum dažniausiai pažeidžia rododendrų lapus, kartais gali pažeisti ir žiedlapius. Pavasarį infekuoti jauni, neseniai susiformavę lapai pagelsta dėl geležies, cinko, azoto ir magnio trūkumo, o apatinė lapo pusė pabąla (Nagao et al., 2004). Visas lapas ar jo dalis deformuojasi, susidaro stambus galas, kurio skersmuo gali siekti iki 3 cm (Ing, 1998). Pažeistoje augalo dalyje susiformavęs himenis būna grublėtas, baltas. Himenyje esančios papėdės turi 2–4 sterigmas su papėdsporėmis. Papėdės yra vėzdiškos, cilindriškos formos, o papėdsporės elipsoidiškos, kiaušiniškos, su 1–2 pertvaromis arba be jų (Nagao, 2004).

Exobasidium genties grybų sistematika nepastovi, pvz., Naujosios Zelandijos „Landcare Research“ interneto puslapyje: <http://nzfungi.landcareresearch.co.nz/html/data.asp?TID=&ID=&NAMEPKey=3619> nurodoma, kad *E. vaccinii* ir *E. japonicum* yra viena ir ta pati rūšis,

tačiau, atlikus detalesnius genetinius tyrimus, paaiškėjo, kad tai yra dvi skirtingos grybų rūšys (Nagao et al., 2001).

Exobasidium genties grybų identifikacija pagal jų morfologinius požymius yra gana sudėtinga, kadangi sukeliama ligos požymiai panašūs – visi grybai savo augalams šeimininkams sukelia beveik vienodas audinių deformacijas. Identifikuojant *Exobasidium* genties grybus vienu pagrindinių diagnostinių požymių paprastai būna sterigmų skaičius, jų dydis, taip pat papėdsorių dydis bei daigumas (Li et al., 2009). Manoma, kad šie grybo požymiai nėra labai patikimi ir gali kisti, priklausomai nuo augalo šeimininko, geografinės padėties ir klimato zonos (Pehkonen et al., 2008). Vienu iš diagnostinių požymių galėtų būti augalo šeimininko rūšis, tačiau, susidarius palankioms sąlygoms grybui plisti, jis gali užkrėsti ir sau nebūdingos rūšies augalą (Nagao, 2003, 2006). Tiriant *Exobasidium* genties grybų genetinius skirtumus, pastaruoju metu plačiai taikomi molekuliniai metodai.

Pagal Begerow et al. (2002) atliktus genetinius *Exobasidiales* eilės grybų rūšių tyrimus įrodyta, kad *E. japonicum* genetiškai labai artimos grybų rūšys – *E. rhododendri* (Fuckel) C. E. Cramer ir *E. shiraianum* Henn.

Lietuvoje rododendrus pažeidžiantys *Exobasidium* genties grybai iki šiol nebuvo tirti. Todėl norėjome nustatyti, ar rododendrų pūslialigę sukėlė iki šiol mūsų šalyje neaprašytas patogenas, ar paprastas bruknėgrybis (*E. vaccinii*).

Šio darbo tikslas – molekuliniais metodais identifikuoti rododendrų pūslialigės sukėlėją, palyginant pastarojo genomines DNR sekas su Lietuvoje gerai žinomo paprastojo bruknėgrybio DNR sekomis.

METODIKA

2009 m. rudenį Vilniaus universiteto Botanikos sode buvo tiriami *Exobasidium* genties grybai ant *Rhododendron* 'Bielici', 'Jelinkovy', 'Hatsu Giri' bei *R. kiusianum* 'Alpinum' ir 'Album' – tyrimui buvo surinkti 22 lapai su tipingais pūslialigės požymiais (1 pav.). Kaip kontroliniai mėginiai, tą pačių metų rudenį iš Balžio ežero apylinkių (Vilniaus rajonas) nuo pūslialigės (egzobazidiozės) sergančių bruknės (*Vaccinium*

vitis-idaea L.) augalų buvo surinkti 22 lapai su aiškiais ligos požymiais. Po 11 nuo kiekvienos augalo rūšies surinktų lapų buvo atidėta grybų išskyrimui į grynąsias kultūras ir molekulinei analizei – tiesiogiai traukti grybo DNR iš pažeistų augalo organų.

Grynųjų kultūrų išskyrimas. Iš pažeistų bruknės ir rododendro deformuotų lapų grybai buvo bandomi išskirti į Hagemo agarą (HA) terpę pagal R. Vasiliausko et al. (1998) metodiką. Šviesiniu (optiniu) mikroskopu nustatyta, kad *Exobasidium* spp. iš ligotų bruknės ir rododendro lapų neišaugo.

Tiesioginis DNR išskyrimas iš augalinės kilmės pavyzdžių. Tiesioginiam DNR traukimui surinktųjų simptominių bruknės bei rododendro lapų paviršius buvo sterilizuojamas, laikant 30 s 95 % etilo alkoholyje, ir nuskalaujamas steriliu distiliuotu vandeniu. Steriliu skalpeliu susmulkintų lapų dalys buvo sudėtos į užsukamus 2,0 ml talpos plastikinius mėgintuvėlius (įdedant maždaug po 1 g augalinės medžiagos) kartu su penkiais 2,5 mm skersmens stiklo rutuliukais ir homogenizuojamos *FastPrep* biologinių pavyzdžių homogenizatoriumi (*FastPrep FP 120*, BIO 101, Savant). DNR traukimas, polimerazės grandininė reakcija (PGR), elektroforezė, PGR produktų išvalymas bei paruošimas sekoskaitai buvo atliekami GTC Botanikos instituto laboratorijoje pagal O. Kåren et al. (1997) protokolą. Vidinio transkribuoto ribosominio tarpiklio (ITS) sekoskaita buvo atliekama naudojant grybams universalius pradmenis ITS1 bei ITS4 (White et al., 1990). ITS sekoskaitai padauginti ir išvalyti DNR fragmentai buvo siunčiami kompanijos *MacroGen Inc.* (Seulas, Pietų Korėja) specialistams. Gautos DNR ITS regiono sekos buvo analizuojamos ir apdorojamos kompiuterinėmis programomis *SeqMan* (*Lasergene 5.0 software*; *DNASStar, Inc.*) ir *BioEdit* (Tom Hall, *Ibis Biosciences*, Carlsbad, JAV, versija 5.0.9.).

Rūšių identifikavimas ir genetinė palyginamoji analizė. *Exobasidium* genties grybų rūšių identifikavimas buvo atliekamas lyginant gautas sekas su sekomis elektroninėje Genų banko NCBI BLAST duomenų bazėje (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>) (Altschul et al., 1997) bei Švedijos Agrarinių mokslų universiteto Miško mikologijos ir patologijos departamento (Upsala, Švedija) elektroninėje duomenų bazėje. DNR sekų palyginamoji analizė atlikta naudojant kompiuterinę programą *MegAlign* (*Lasergene 5.0 software*; *DNASStar, Inc.*).

REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Iš vienuolikos pažeistų bruknių lapų pavyzdžių išskirta DNR sekų genetinė analizė parodė, kad sekos yra tarpusavyje identiškos ir 100 % sutampa su *E. vaccinii* (Fuckel) Woronin seka Genų banke. Iš aštuonių ligotų rododendrų lapų išskirta DNR sekų genetinė analizė parodė, kad pastarosios yra tarpusavyje identiškos ir 99 % sutampa su *Exobasidium japonicum* Shirai seka, esančia Genų banke. Tai yra geriausia atitiktis tarp visų Genų banke esančių *Exobasidium* genties grybų rūšių sekų. Šio tyrimo metu iš bruknės lapų išskirta plačiai paplitusios ir nuo seno žinomos Lietuvoje – paprastojo bruknėgrybio (*E. vaccinii*) DNR, kurio ITS regiono seka nesutapo su iš rododendro išskirto grybo DNR seka.

E. japonicum – Lietuvoje iki šiol neaprašyta grybo rūšis. Iki 2008 m. nebuvo jokių pranešimų apie pūslialgės, susidariusias ant *Rhododendron* genties augalų, tačiau galima suabejoti, kad minėta *Exobasidium* genties rūšis Lietuvoje pasirodė tik neseniai, kadangi niekas detaliau šios genties grybų mūsų šalyje netyrinėjo. Gali būti, kad mūsų šalyje *E. japonicum* atsirado jau anksčiau, pvz., 1972–1976 m., kartu su iš Japonijos introdukuotais rododendrais.

E. japonicum sumažina rododendrų dekoratyviąją vertę. Ligos apnikti augalai žiemą tampa neatsparūs šalčiams. Pavasarį susiformavę galai vasaros antroje pusėje paruduoja ir susiraukšlėja, negrįžtamai deformuodami užkrėstus augalo-šeimininko audinius, todėl dažnai po grybo invazijos pažeista augalo dalis žūsta. Išimtiniais atvejais gali sunykti visas rododendro krūmas, tačiau taip gali atsitikti ir dėl kitų abiotinių veiksnių poveikio (Farr et al., 1996; Graafland, 1960; Nagao, 2000).

2010 m. gegužę *Exobasidium japonicum* susiformavo tik ant *Rhododendron* 'Jelinkovy', 'Bielici' ir 'Hatsu Giri' lapų. Jautriausi rododendrų veislių – 'Bielici' ir 'Jelinkovy' augalai, kurie pažeidžiami 100 proc. (1 pav. A, B). Birželio pradžioje liga labai smarkiai plito toliau ir pažeidė visai naujų veislių augalus: *Rhododendron* 'April Rose', 'April Snow', 'Geischa', 'Kermesina rosea', 'P.S. Meritt', 'P.S.M. Elitte'. Birželio viduryje pūslialgės sukėlėjas aptiktas ir ant *R. kiusianum* 'Album' ir 'Alpinum'.



1 pav. *Exobasidium japonicum* pažeisti rododendro (*Rhododendron* ‘Bielici’) lapai (A) bei ant lapų dėl ligos susiformavę galai (B) (2009 m. rugpjūčio mėn.)

Fig. 1. Damages on *Rhododendron* ‘Bielici’ caused by *Exobasidium japonicum*: deformed leaves (A) and galls (B) on the diseased leaves (August, 2009)

Exobasidium japonicum gali padaryti nemažai žalos Lietuvoje auginamiems dekoratyviniams *Rhododendron* genties augalams, todėl reiktų stebėti šio grybo pasireiškimo atvejus ir laiku panaudoti apsaugos priemones nuo šios ligos.

IŠVADOS

1. Polimerazės grandininės reakcijos (PGR) metodu pagal genominės DNR ITS regiono sekas identifikuotos dvi specializuotos *Exobasidium* genties grybų rūšys – *E. vaccinii* (pažeidžia bruknę – *Vaccinium vitis-idaea*) ir *Exobasidium japonicum* (pažeidžia rododendrą – *Rhododendron*).

2. *Exobasidium japonicum* ant rododendrų (*Rhododendron* ‘Bielici’, ‘Hatsu Giri’, ‘Jelinkovy’ ir *R. kiusianum* ‘Album’ ir ‘Alpinum’) Lietuvoje identifikuotas pirmą kartą.

3. Kaip rodo DNR sekų palyginamoji analizė, genetiškai šios dvi grybų rūšys – *E. xobasidium vaccinii* ir *E. japonicum* – viena nuo kitos yra gana smarkiai nutolusios.

LITERATŪRA

- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research*, 25, p. 3389–3402.
- BANDZAITIENĖ, Z.; LABOKAS, J.; RADAITIENĖ, D. 2002. Bruknės. Vilnius, 29 p. ISBN 9986-847-59-1.
- BEGEROW, D.; BAUER, R.; OBERWINKLER, F. 2002. The *Exobasidiales*: an evolutionary hypothesis. *Mycological progress*, 1(2), p. 187–199.
- DE BEER, Z. W.; BEGEROW, D.; BAUER, R.; PEGG, G. S.; CROUS, P. W.; WINGFIELD, J. 2006. Phylogeny of the *Quambalariaceae* fam. Nov., including important *Eucalyptus* pathogens in South Africa and Australia. *Studies in mycology*, 55, p. 289–298.
- DAUBARAS, R. 2006. Spanguolynų tręšimas ir apsauga nuo grybinių ligų. *Mano ūkis*, nr. 4, p. 44–45.
- EZUKA, A. 1991a. Notes on some species of *Exobasidium* in Japan (III). *Transactions of the mycological society of Japan*, 32, p. 71–86.
- EZUKA, A. 1991b. Notes on some species of *Exobasidium* in Japan (IV). *Transactions of the mycological society of Japan*, 32, p. 169–185.
- FARR, D.; ESTEBAN, H. B.; PALM, M. E. 1996. *Fungi on Rhododendron: A world reference*. Parkway, Boone, 192 p.
- GRAAFLAND, W. 1960. The parasitism of *Exobasidium japonicum* Shir. on *Azalea*. *Acta botanica Nederlandica*, 9, p. 347–379.
- ING, B. 1999. *Exobasidium* in Scotland. *Botanical journal of Scotland*, 51(2), p. 221–225.
- ING, B. 2005. Fungi and Climate Change. *NWFG Newsletter*. ISSN 1465-8054.
- KÅREN, O.; HÖGBERG, N.; DAHLBERG, A.; JONSSON, L.; NYLUND, J. E. 1997. Inter- and intraspecific variation in the ITS region of rDNA of ectomycorrhizal fungi in Fennoscandia as detected by endonuclease analysis. *New phytologist*, 136, p. 313–325.
- LI, Z.; GUO, L. 2009. Three new species of *Exobasidium* (*Exobasidiales*) from China. *Mycotaxon*, 107, p. 215–220.
- NAGAO, H.; SATO, T.; KAKISHIMA, M. 2004. Three species of *Exobasidium* causing *Exobasidium* leaf blight on subgenus *Hymenanthes*, *Rhododendron* spp. in Japan. *Mycoscience*, 45(2), p. 85–95.
- NAGAO, H.; KISHI, K.; EZUKA, A.; KAKISHIMA, M. 2000. The occur-

ce of *Exobasidium* leaf blister on *Rhododendron dauricum* L. *Japanese journal of phytopathology*, 66, p. 307.

NAGAO, H.; EZUKA, A.; OHKUBO, H.; KAKISHIMA, M.; 2001. A new species of *Exobasidium* causing 'witches broom' on *Rhododendron wadanum*. *Mycoscience*, 42, p. 549–554.

NAGAO, H.; AKIMOTO, M.; KISHI, K.; EZUKA, A.; KAKISHIMA, M. 2003. *Exobasidium dubium* and *E. miyabei* sp. nov. causing *Exobasidium* leaf blisters on *Rhododendron* spp. in Japan. *Mycoscience*, 44, p. 1–9.

NANNFELDT, J. A. 1981. *Exobasidium*, a taxonomic reassessment applied to the European species. *Symbolae Botanicae Upsaliensis*, 23, p. 1–72.

PEHKONEN, T.; KOSKIMÄKI, J.; RIIHNEN, K.; PIRTILÄ, A. M.; HOHTOLA, A.; JAAKOLA, L.; TOLVANEN, A. 2008. Artificial infection of *Vaccinium vitis-idaea* L. and defence responses to *Exobasidium* species. *Physiological and molecular plant pathology*, 72, p. 146–150.

VASILIAUSKAS, R.; STENLID, J. 1998. Fungi inhabiting stems of *Picea abies* in a managed stand in Lithuania. *Forest ecology and management*, 109, p. 119–126.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M. A.; Gelfand, D. H.; Sninsky, J. J.; White, T. J. (Eds.). *PCR Protocols: A guide to methods and applications*. Academic Press Inc., San Diego, CA, p. 315–322. ISBN 0-12-372180-6.

EXOBASIDIUM JAPONICUM – A CAUSAL AGENT OF RHODODENDRON LEAF BLISTERS

Vaidotas Lygis, Banga Grigaliūnaitė, Vitalija Pribušauskaitė, Antanas Matelis

S u m m a r y

In 2009–2010, the fungi of genus *Exobasidium* damaging *Rhododendron* spp. plants in the Botanical garden of Vilnius University (Kairenai, Vilnius) were investigated. *Exobasidium japonicum*, previously in Lithuania undescribed species, has been identified by the aid of modern molecular techniques (DNA sequencing) causing leaf blisters and deformations on *Rhododendron* 'Bielici', 'Hatsu Giri', 'Jelinkovy' and *R. kiusianum* 'Album' and 'Alpinum'.

Keywords: *Exobasidiosis*, *Exobasidium japonicum*, leaf blisters, *Rhododendron*, Lithuania