

Оригинални научни рад
Original scientific paper

doi: 10.7251/GSFBL2014005M
UDK: 582.746.51-113.31:632.4
COBISS.RS-ID: 4664344

Иван Миленковић¹, Драган Караџић², Зоран Станивуковић³, Весна Голубовић Ђургуз²

СИМПТОМИ ПОЈАВЕ И МОРФОЛОШКЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ НАЈЧЕШЋИХ *PHYTOPHTHORA* ВРСТА НА ЈАВОРОВИМА У СРБИЈИ

Извод: У раду су приказани резултати истраживања главних морфолошких и карактеристика колонија изолованих *Phytophthora* врста на стаблима јавора у Србији. На стаблима јавора у различитим шумским заједницама, парковима и приватним баштама су примећени различити симптоми који су указивали на инфекције патогенима из рода *Phytophthora*. Симптоми су укључивали жутило лишћа, проређеност крошње, одумирање издојака, грана и врхова стабала и појаву некроза на стаблима са цурењем тамног ексудата. Наведени симптоми се често могу помешати са симптомима насталим дејством других узрочника. Након изведених тестова изолације, добијено је више изолата, који су се јасно разликовали у својим колонијалним и морфолошким карактеристикама, а након детаљне идентификације потврђено је присуство четири врсте из рода *Phytophthora*, укључујући *P. cactorum*, *P. plurivora*, *P. gonapodyides* и *P. lacustris*.

Кључне речи: *Acer* spp., *Phytophthora* spp., изглед колонија, морфологија структура, симптоми

¹ Институт за шумарство, Кнеза Вишеслава 3, Београд (e-mail: ivan.milenkovic@sfb.bg.ac.rs)

² Универзитет у Београду, Шумарски факултет, Кнеза Вишеслава 1, Београд

³ Универзитет у Бањој Луци, Шумарски факултет, С. Степановића 75а, Бања Лука

SYMPTOMS OF OCCURENCE AND MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF THE MOST COMMON *PHYTOPHTHORA* SPECIES ON MAPLE TREES IN SERBIA

Abstract: This paper presents the results of the studies of the main morphological and colony growth patterns of species from the *Phytophthora* genus, isolated on maple trees in Serbia. On maple trees in different forest stands, parks and private gardens, different types of symptoms that could be indicative for the infections with pathogens from the *Phytophthora* genus, were recorded. Symptoms included yellowing of leaves, crown transparency, wilting of shoots, branches and diebacks of the crowns, and appearance of necrosis at the stems with dark exudates. These symptoms very often could be mixed with the symptoms caused by other affecting factors. After the isolation tests, several different groups of isolates were obtained that were distinguishable based on their colony shape and morphological characteristics, and after the detailed identification presence of four species from the *Phytophthora* genus was confirmed, including *P. cactorum*, *P. plurivora*, *P. gonapodyides* and *P. lacustris*.

Key words: *Acer* spp., *Phytophthora* spp., colony morphology structures morphology, symptoms

УВОД

Phytophthora врсте су гљивама слични организми и припадају царству Stramenopiles у оквиру супер групе „SAR“ (Adl *et al.* 2012). Од правих гљива (царство Fungi) разликују се по присуству специјалних полних структура-ооспора, присуству диплоидних хифа и формирању посебних спороносних органа-зооспорангије, које имају покретне споре. Ови патогени организми инфицирају различите биљне делове и ткива, укључујући фино и одрвенело корење, кору и камбијум грана и стабала, лишће и избојке великог броја домаћина (Erwin and Ribeiro 1996). Као примарни патогени, одговорне су за више девастирајућих епифитоција (Erwin and Ribeiro 1996; Ribeiro 2013; Jung *et al.* 2013). Главни разлог за њихову широку заступљеност у свету је повећање обима међународне трговине и глобалне размене живим садним материјалом (Evans and Oszako 2006; Brasier 2008; Scott *et al.* 2013), као и уношење зараженог садног материјала из инфицираних расадника у паркове, шуме и друге вештачке и природне екосистеме (Brasier and Jung 2006; Pérez-Sierra and Jung 2013).

Према Јовановић (1971), у Србији је заступљено 16 врста јаворова, међу којима су најзаступљенији горски јавор (*Acer pseudoplatanus* L.), млеч (*Acer platanoides* L.), клен (*Acer campestre* L.), жешља (*Acer tataricum* L.), планински јавор (*Acer heldreichii* Orph.), док су остале домаће и унешене врсте заступљене у мањој мери.

Стабла јавора су осетљива на различите патогене организме, а према Караџић (2010), Караџић *et al.* (2011, 2014) међу најштетније спадају увенуће избојака, грана и читавих стабала узроковани са *Verticillium albo-atrum* Reinke and Berthold (син. *V. dahliae* Kleb.), узрочници трулежи и сушења биљака из рода *Ganoderma*, некроза коре узрокована са *Nectria cinnabarinata* (Tode) Fr. и катранаста пегавост на лишћу узрокована са *Rhytisma acerinum* Schwein. Такође, штете на стаблима јавора у извесној мери причињавају и пепелнице на лишћу (Караџић and Милијашевић 2005).

Осетљивост јаворова на инфекције патогенима из рода *Phytophthora* је приказана у неколико студија (Erwin and Ribeiro 1996; Brasier and Jung 2006; Jung and Burgess 2009; Ginetti 2014). Података о присуству и диверзитету ових врста на различитим дрвенастим врстама у Србији, укључујући и јаворове је веома мало. Наиме, Milenković *et al.* (2010a, b) и Milenković and Кеџа (2012) су извештавали о симптомима и изолацији *Phytophthora* врста на више различитих домаћина, међу којима и на јаворовима, док су Milenković *et al.* (2014) забележили четири врсте *Phytophthora* на пет различитих врста јавора у Србији на основу истраживања спроведених у периоду 2009. до 2012. године.

Детаљним обиласком терена на више различитих локалитета у Србији у последње две године (2012.-2014.), забележено је присуство више различитих симптома и њихов интензиван развој, а ови симптоми су се огледали у одумирању избојака, делова грана и јакој проређености крошње, појави водених избојака и образовању секундарне крошње, некрозама на деблу уз цурење тамног ексудата, некрозама и озледама на матичном корењу и трулежи и губитку финог корења. Сви горе наведени симптоми се могу лако помешати са другим узрочницима и несумњиво је њихова појава у прошлости делимично приписивана другим патогеним организмима.

Узимајући у обзир да су изолација и идентификација ових организама додатно компликоване, као и то да је препознавање симптома, узрокованих овим организмима, такође компликовано и може се помешати са другим патогеним организмима и штеточинама, ово истраживање је имало циљеве да се (i) детаљно опишу неки од забележених симптома на стаблима

јавора испод којих су изоловани ови организми; (ii) прикажу најчешће изоловане *Phytophthora* врсте на стаблима јавора у Србији и (iii) детаљно прикажу главне морфолошке и карактеристике колонија добијених врста, као основе за карактеризацију и морфолошку идентификацију.

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД

Сакупљање узорака и изолације

Прикупљање узорака је вршено према предходно описаној методологији (Jung 2009; Jung *et al.* 1996, 2000). Узорци некротичних ткива су узорковани различитим алатом (зумба, секира, нож), стерилисаним у 70% алкохолу и то са места прелаза здравог у некротично ткиво, испирани у дестилованој води и сушени на стерилним кухињским убрусима. После сушења, узорци су лабораторијском пинцетом, стерилисаном у 70% алкохолу па на отвореном пламену, постављани на селективну агар подлогу (V8A-PARPNH), припремљену према методологији Jung *et al.* (1996). Земља са деловима кореновог система је сакупљана у облику блокова земље, приближних димензија 25×25×25 cm и то три до четири таква блока по стаблу (Jung *et al.* 1996). После мешања, делови блокова су паковани у пластичне вреће запремине 10 l и ношени у лабораторију ради даљих анализа. Узоркована су како симптоматична, тако и на изглед здрава стабла.

Изолација је вршена помоћу такозване методе мамака (Jung 2009; Jung *et al.* 1996, 2000), а за мамке је коришћено младо лишће храста, букве и ловорвишње. Постављено младо лишће је на сваких 12 часова детаљно прегледано ради утврђивања развоја некроза. После појаве првих некротичних пега на површини младог лишћа, ти делови су одвајани скалпелом, стерилисаним у 70% алкохолу и на отвореном пламену и постављани на горе поменуту V8A-PARPNH селективну подлогу. Након појаве првих хифа, оне су пресејаване на свежу шаргарепа агар подлогу (CA), припремљену према методологији Jung and Nechwatal (2008) и то са 900 ml/l дестиловане воде, 100 ml/l свежег сока од шаргарепе (Biotta®, Swiss), 18 g/l агара (Torlak, Srbija) и 3 g/l CaCO₃. Пресејане свеже културе су чуване на собној температури ради даљих анализа, а дупликати су након пречишћавања складиштени у фрижидер на око 8°C ради чувања у микотеци.

Одређивање карактеристика колонија

За потребе одређивања најважнијих карактеристика колонија изолати су пресејавани на пет различитих хранљивих подлога, укључујући шаргарепа агар подлогу-СА; затим малц-екстракт-агар-МЕА, припремљену са 48 g/l малц екстракт агара (MERCK, Germany); V8-агар подлогу припремљену са 900 ml/l дестиловане воде, 100 ml/l V8 сока (сок припремљен од минимално 8 различитих врста поврћа (Biotta®, Swiss), 18 g/l агара (Torlak, Србија) и 3 g/l CaCO₃; кромпир-декстроза-агар-PDA, припремљен са 39 g/l кромпир декстроза агара (MERCK, Germany) и шљивин (Prune Juice) агар-PJA, припремљен са 800 ml/l дестиловане воде, 200 ml/l воденог екстракта сувих, органских шљива, 18 g/l агара (Torlak, Србија) и 3 g/l CaCO₃ (Partridge-Metz and Chandra 2011). Инкубација пресејаних изолата је вршена на око 18-20°C у мраку. Најважније карактеристике колонија су одређиване након 7-10 дана раста према познатој методологији (Hall 1993; Erwin and Ribeiro 1996; Brasier *et al.*, 2003; Jung *et al.*, 2002, 2003; Nechwatal *et al.* 2012).

Одређивање морфолошких карактеристика

За ове сврхе прво је припремљен нестерилни земљишни раствор према методологији Erwin and Ribeiro (1996). Ради посматрања полних и бесполних структура, изолати су пресејани на горе описану СА подлогу и инкубација је вршена у мраку на око 22-25°C у наредних 3-5 дана или до приближног испуњавања половине Петри посуде од 90 mm. Са ивице младе колоније су узимани комади агара и мицелије, приближних димензија 1x1-1,5-1,5 cm, постављани у чисте Петри посуде и плавлени нестерилним земљишним раствором. Комади агара и мицелије су затим испирани дестилованом водом према методологији Jung and Burgess (2009). Такође, дупликати изолата, пресејани на СА подлогу су четири недеље чувани на око 22-25°C ради потпуног образовања и сазревања трајних структура ових организама. Делови агара и мицелије, приближних димензија 1x1-1,5-1,5 cm су узимани скалпелом стерилисаним у 70% алкохолу, па на отвореном пламену, након чега је приступљено микроскопији препарата.

Развијене полне и бесполне структуре су посматране под светлосним микроскопом (CETI®MAGNUM-T/Trinocular Microscope, UK), на увећању x400, опремљеног са камером Si3000® (UK) и софтвером XliCap® (UK). Све забележене структуре су упоређиване са познатим кључевима за идентификацију врста из рода *Phytophthora* (Waterhouse 1963; Stamps *et al.* 1990; Erwin and Ribeiro 1996), као и са подацима из новијих оригиналних радова у којима су описане поједине врсте (Jung *et*

al. 1999, 2002, 2011; Jung and Nechwatal 2008; Jung and Burgess 2009; Hong *et al.* 2011; Nechwatal *et al.* 2012).

Спаривање са предходно идентификованим тестер изолатима

Изолати који нису образовали полне структуре (антеридије, оогоније и ооспоре) након четири недеље инкубације на 22-25°C су спаривани са предходно идентификованим тестер изолатима (Erwin and Ribeiro 1996) у циљу детерминисања хетеротализма или стерилности мицелије. За ове сврхе смо користили изолате *Phytophthora cambivora* (Pet.) Buisman са одређеним типовима спаривања (A1 и A2), уступљене од Dr Sabine Werres (Julius Kühn-Institute, JKI, Messeweg 11/12, D-38104 Braunschweig, Germany). Коришћени су изолати: „ВВА 21/95-КII“ са А1 типом спаривања и „ВВА 20/95-2bIII“ са А2 типом спаривања. Сви изолати који нису образовали полне структуре су заједно са тестер изолатима пресејани на свежу СА подлогу и инкубација је вршена на 22-25°C у мраку до испуњавања приближно половине Петри посуде. Спаривање је вршено на начин да је на један крај Петри шоље од 90 mm постављан комад агара и мицелије, узет са ивице младе колоније одабраног изолата, а на други крај комад агара и мицелије одабраног тестер изолата са познатим типом спаривања. Инкубација је вршена на дневном светлу на око 22-25°C у наредне четири недеље. Са места укрштања две мицелије су скалпелом, стерилисаним на горе описан начин, узимани комади агара и мицелије, приближних димензија 1x1-1,5x1,5 cm и посматрани под светлосним микроскопом. У случајевима образовања полних структура, одређиван је тип спаривања у односу на тип укрштене мицелије, а у случајевима када полне структуре нису образоване, изолати су вођени као стерилни.

РЕЗУЛТАТИ

Регистровани симптоми

Током сакупљања узорака и разговора са људима из праксе на више врста јавора су забележени различити симптоми. Први симптоми се јављају у пролеће и укључују жутило и благу атрофију лишћа, заостајање у порасту избојака, одумирање грана и врхова крошњи, проређеност крошње, некрозе са цурењем тамног ексудата на деблима и гранама, некрозе на матичном корењу и трулеж и губитак финог корења. Током лета долази до благе стагнације напретка развоја ових симптома, да би се њихов интензитет појачао у јесен. Као карактеристични симптоми могу се навести некрозе коре и камбијума стабла које су се јављале на различитим позицијама и из којих су ови патогени организми изоловани пратећи горе наведену методологију. Овај тип симптома на стаблима горског јавора је приказан на слици 1. Нападнуте делове брзо освајају и друге гљиве паразити слабости, као на пример *Nectria cinnabarina*, трулежнице из рода *Ganoderma* и друге врсте. Уколико је присутна и гљива проузроковач увенућа биљака (*Verticillium albo-atrum*), шанса за опстанак стабала је знатно умањена.



Слика 1. Некроза коре и камбијума са цурењем тамног ексудата на стаблима горског јавора

Figure 1. Necrosis of bark and cambium with dark exudates on the sycamore maple trees

(Фото / photo by: Ivan Milenković)

Позитивни домаћини

Укупно је узорковано шест различитих домаћина, од којих пет аутохтоних и негундовац као алохтона врста. После изведених тестова изолације, пет домаћина је било позитивно на присуство различитих врста из рода *Phytophthora*, као што је приказано у табели 1.

Табела 1. Позитивни домаћини и изоловане врсте

Table 1. Positive hosts and isolated species

Домаћини Hosts	Phytophthora врсте Phytophthora species				Укупно Total	pb
	<i>P. cactorum</i>	<i>P. plurivora</i>	<i>P. gonapodyides</i>	<i>P. lacustris</i>		
<i>Acer campestre</i>	0	4	3	0	7	0.023
<i>Acer heldreichii</i>	0	2	0	1	3	0.691
<i>Acer negundo</i>	0	0	0	0	0	-
<i>Acer pseudoplatanus</i>	2	15	0	1	18	0.322
<i>Acer platanoides</i>	0	1	0	1	2	0.461
<i>Acer tataricum</i>	0	0	0	1	1	0.080
Укупно Total	2	22	3	4	31	
pa	0.919	0.841	0.036	0.031		

p^a- вероватноћа да нема разлике међу домаћинима у односу на добијене врсте на основу X² теста

p^b- вероватноћа да нема разлике међу добијеним врстама у односу на поједине домаћине на основу X² теста

Иоловане врсте

Током истраживања *Phytophthora* врста у различитим заједницама јавора у Србији, изоловано је и идентификовано четири врсте (табела 1), док је неколико изолата у процесу идентификације. Такође, изоловано је и више *Rythium* spp. изолата који нису били предмет ових истраживања. Највише изолата је добијено из узорак земље и корења одакле су изоловане све добијене врсте. Из узорак ткива је изолована само *P. plurivora*, док су из узорак воде изоловане *P. plurivora* и *P. lacustris*. Листа изолованих врста и порекло изолата су приказани у табели 2.

Табела 2. Изоловане *Phytophthora* врсте и порекло изолата

Table 2. Isolated *Phytophthora* species and origin of isolates

Врста Species	Порекло изолата Origin of isolates		
	Земља и корење Soil and roots	Некротично ткиво Necrotic tissue	Вода и влажна земља Water and mold
<i>Phytophthora cactorum</i>	+	-	-
<i>Phytophthora plurivora</i>	+	+	+
<i>Phytophthora gonapodyides</i>	+	-	-
<i>Phytophthora lacustris</i>	+	-	+

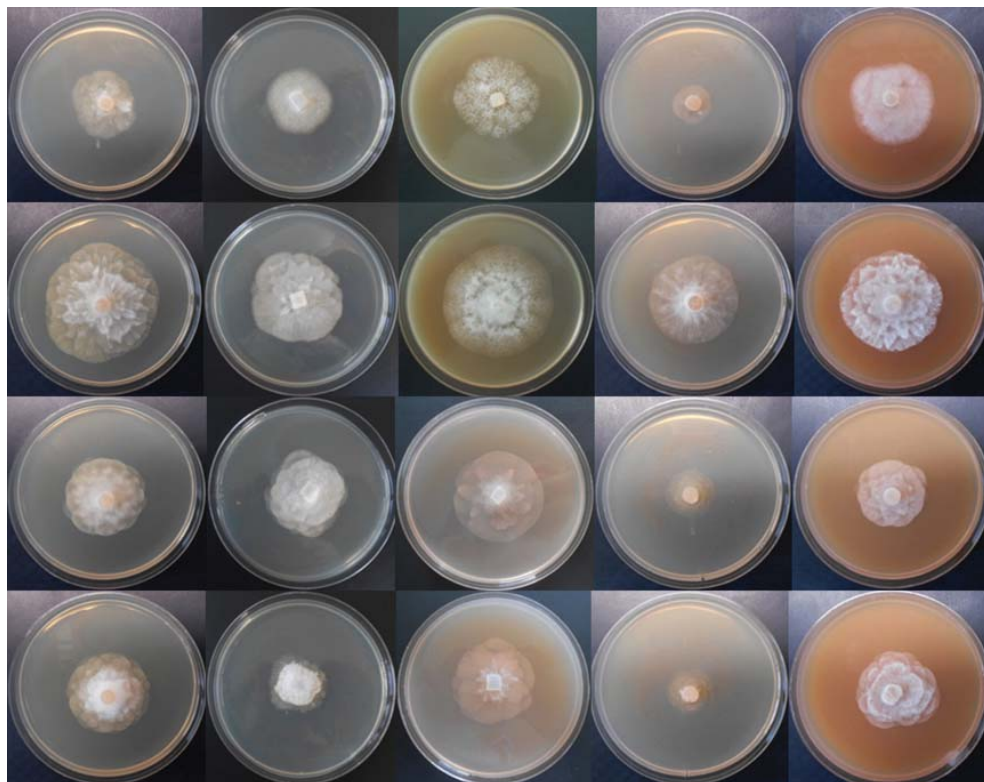
Карактеристике колонија

На основу познатих карактеристика колонија извршена је прелиминарна класификација типова колонија добијених изолата чији је опис приказан у табели 3, а изглед колонија на различитим подлогама је приказан на слици 2.

Табела 3. Прелиминарна класификација изолата на основу изгледа колоније

Table 3. Preliminary classified types of isolates according to colony patterns

Тип колоније Colony type	Карактеристике колонија Colony patterns	Врста Species
Тип 1	Колонија без специјалног облика на PDA, V8 и PJA, до благо хризантемаста на MEA и CA. На MEA и CA благо ваздушаста у средини, приљубљена по крајевима, средње густа, вунаста. На V8 и PDA приљубљена за подлогу, јако густа, вунаста до памучаста на V8, паперјаста на PDA. Ретка до паперјаста на PJA. Обод правилан и оштар на PDA и V8, благо неправилан на MEA и PJA, разређен на CA	<i>Phytophthora cactorum</i>
Тип 2	Колонија облика хризантеме или неправилно зракаста на PDA. Мицелија благо ваздушаста у средини, густа, приљубљена по крајевима, сомотаста до памучаста. Обод колоније правилан и оштар, ређе неправилан	<i>Phytophthora plurivora</i>
Тип 3	Колонија облика розете, или без посебног облика. Свиленакаста на CA, приљубљена за супстрат до разређена ваздушаста, облика је розете до неправилно зракаста и равного обода до неправилног на шљивином агару и PDA	<i>Phytophthora gonapodyides</i>
Тип 4	Колонија израженог облика розете, ређе без посебног облика. Мицелија проређена ваздушаста, на MEA и PDA благо одстојећа у средини, на осталим подлогама полегла сомотаста до памучаста. Обод колоније правилан и оштар	<i>Phytophthora lacustris</i>



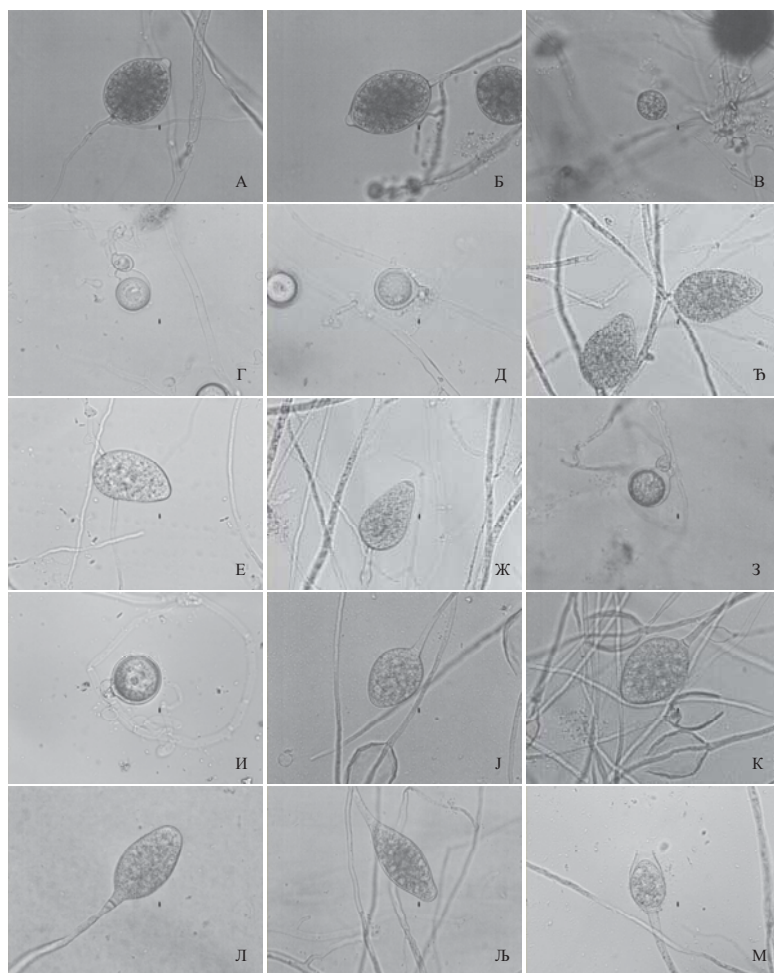
Слика 2. Карактеристике колонија добијених *Phytophthora* врста на различитим подлогама - Одозго на доле: *Phytophthora cactorum*, *P. plurivora*, *P. gonapodyides* и *Phytophthora lacustris*; Врсте подлоге слева на десно: МЕА, PDA, СА, PJA и V8A; После седам дана инкубације на 20°C

Figure 2. Colony patterns of obtained *Phytophthora* species on different media: from top to bottom-*Phytophthora cactorum*, *P. plurivora*, *P. gonapodyides* and *Phytophthora lacustris*; Types of media from left to right: MEA, PDA, CA, PJA and V8A; After seven days of incubation at 20°C (Фото / photo by: Ivan Milenković)

Морфолошке карактеристике полних и бесполних структура

После развијања полних и бесполних структура на горе описан начин, извршено је њихово упоређивање са кључевима из литературе, као и са радовима у којима су описане поједине врсте. Два изолата су била са брадавичастим (papillate) спорангијама, правилног овоидног, обовоидног до лимунастог облика. Велики број спорангија је опадао са спорангиофора након сазревања. Забележени су и прости и симподијално гранати конидиофори. Врста је била хомоталична и образовала је мноштво оогонија након недељу дана инкубације. Оогоније су биле округле, правилне са углавном округлим ооспорама. Антеридије су биле округле,

овоидне и благо издужене или батинасте, углавном образоване око основе оогоније. Око једна трећина изолата је образовала округласте до благо спљоштене хламидоспоре са танким зидовима. На основу свих наведених карактеристика и карактеристика колоније, врста је идентификована као *P. cactorum* (Lebert and Cohn) Schröeter. Највише изолата је било са полубрадавичастим спорангијама (semipapillate) различитог облика, који се кретао од правилних овоидних, обовоидних или елипсастих облика, па до различитих неправилних облика са спорангијама са два или три врха и са сужењима на различитим позицијама. Спорангиофори су углавном били симподијално гранати, мада је забележена и појава простих. Спорангије су се врло ретко образовале директно на хифама, а забележени су и случајеви интеркаларног образовања. Врста је била хомоталична, оогоније су биле правилне, округле или благо спљоштене са округлим и углавном правилним ооспорама. Антеридије су биле различитог облика, идући од округлих, издужених до батинастих, а ређе и неправилних облика и образовале су се на различитим позицијама на оогонији. Врста је на основу свих наведених карактеристика и на основу изгледа колоније идентификована као *P. plurivora* Jung and Burgess. Следећа група добијених изолата је имала спорангије са равним врхом (nonpapillate), овоидног, обовоидног, ређе и обкрушкастог облика. Забележено је и унутрашње клијање спорангија (internal proliferation), али је појава угњеждења (nested internal proliferation) била веома ретка, док је појава спољашњег формирања у ланцима (extended internal proliferation) била чешћа. Колонија је била свиленаста, приљубљена, средње брзог пораста (табела 3, слика 2), а полни елементи (антеридије и оогоније) нису забележени након четири недеље инкубације на СА подлози. Такође, у тестовима укрштања са познатим типом спаривања (табела 4), врста није образовала полне структуре, што нам је указало на њен стерилитет и ова врста је идентификована као *Phytophthora gonapodyides* (Petersen) Buisman. Последња група изолата је имала спорангије са равним врхом различитог облика, који се кретао од обовоидних, елипсастих, до неправилних облика са сужењима у средину (облици ампуле). Код већине спорангија је примећено проширење основе спорангије и врха спорангиофора на месту контакта. Спорангиофори су били углавном прости, а спорангије су биле симетричне у односу на спорангиофоре. Колонија је била полегла, сомотаста до вунаста, а на MEA и PDA благо ваздушаста око места инокулума. Врста није образовала полне елементе, како у чистим културама, тако и у тестовима спаривања (табела 4) па је стога вођена као стерилна, а на основу свих карактеристика је идентификована као *Phytophthora lacustris* Brasier *et al.*



Слика 3. Забележене структуре различитих *Phytophthora* врста: *P. cactorum*-А-Б- брадавичасте спорангије и симподијално гранање спорангиофора, В- хламидоспора, Г-Д- антеридије, оогоније и ооспоре; *P. plurivora*-Ђ-Д- полубрадавичасте спорангије и симподијално гранање, Е- интеркаларно образована спорангија, З-И- антеридије, оогоније и ооспоре; *P. gonapodyides*-Ј-К- изглед спорангија и празне спорангије са унутрашњим клијањем; *P. lacustris*-Л-Љ- изглед спорангија, М- унутрашње клијање нова спорангија образована унутар празне

Figure 3. Recorded structures of different *Phytophthora* species: *P. cactorum*-А-Б- papillate sporangia and sympodial branching of sporangiophores, В- chlamydospore, Г-Д- antheridia, oogonia and oospores; *P. plurivora*-Ђ-Д- semipapillate sporangia and sympodial branching, Е- intercalary formed sporangia, З-И- antheridia, oogonia and oospores; *P. gonapodyides*-Ј-К- shape of sporangia and empty sporangia with internal proliferation; *P. lacustris*-Л-Љ- shape of sporangia, М- nested internal proliferation

(Фото / photo by: Ivan Milenković)

Резултати спаривања са познатим тестер изолатима

Четири недеље након укрштања и инкубације према горе наведеној методологији, културе су прегледане под светлосним микроскопом ради утврђивања присуства или одсуства полних елемената. Свих седам тестираних изолата од две различите врсте није образовало полне елементе у тестовима спаривања и ови изолати су у комбинацији са осталим морфолошким елементима евидентирани као стерилни.

Табела 4. Резултати тестова спаривања

Table 4. Results of the mating type tests

<i>Phytophthora</i> врста Phytophthora species	Изолат Isolate	Тестер изолат Tester isolate	Присуство антеридија, оогонија и ооспора Presence of ant- heridia, oogonia and oospores	Талус, тип
<i>P. gonapodyides</i>	2012/A.C.01	BBA 21/95-KII	-	Стерилна
		BBA 20/95-2bIII	-	
	2012/A.C.01/02	BBA 21/95-KII	-	Стерилна
		BBA 20/95-2bIII	-	
	2012/A.C.03	BBA 21/95-KII	-	Стерилна
		BBA 20/95-2bIII	-	
<i>P. lacustris</i>	2011/A.HE.02	BBA 21/95-KII	-	Стерилна
		BBA 20/95-2bIII	-	
	2011/MIX.03	BBA 21/95-KII	-	Стерилна
		BBA 20/95-2bIII	-	
	2012/A.PL.01	BBA 21/95-KII	-	Стерилна
		BBA 20/95-2bIII	-	
2012/A.T.01	BBA 21/95-KII	-	Стерилна	
	BBA 20/95-2bIII	-		

Јаворови су економски и еколошки битне врсте у Србији и заступљене су како у природним састојинама лишћара и четинара, тако и у различитим парковима, баштама и дрворедима као украсне врсте. Посебно треба истаћи састојине племенитих лишћара које јавор гради са белим јасеном, буквом, врстама из рода *Sorbus* и различитим воћкарицама.

Више различитих патогених организама угрожава опстанак различитих врста јавора (Караџић 2010; Караџић *et al.* 2011, 2014). Међу ове угрожавајуће факторе спадају и инфекције патогенима из рода *Phytophthora* (Erwin and Ribeiro 1996; Brasier and Jung 2006; Jung and Burgess 2009), а недавно је описана и нова врста проузроковач пропадања јавора у Италији,

Phytophthora acerina sp. nov. (Ginetti 2014). У Србији су Milenković *et al.* (2014) указали на присуство врста из рода *Phytophthora* на домаћинима из рода јавора.

Детаљним обиласком терена и сакупљањем узорака на више различитих локалитета, примећени су различити симптоми који су указивали на присуство и инфекције патогеним организмима из рода *Phytophthora*. Први симптоми су се јављали у пролеће и огледали су се у појави некротичних флека на различитим позицијама на стаблу, жутилом и благом атрофијом лишћа и заостајањем у порасту избојака. У пролеће, одмах по појави раније наведених некротичних зона долази до цурења тамног ексудата који је у јесен обично сасушен и добија облик гарежи на површини коре. Када се уклони кора испод ових зона, лако је уочљиво некротично ткиво различите, обично тамније и најчешће маслинасто-зелене боје (слика 1). На прелазу здравих у некротичне зоне патоген је најактивнији и одатле се лако изолује пратећи горе наведену методологију. У Србији су до сада из некротичних ткива *Phytophthora* врсте изоловане са стабала *Acer heldreichii* и *A. pseudoplatanus*. Битно је истаћи да су оваква места идеалан улаз за друге патогене организме, који касније ступају у сукцесију и убрзавају пропадање стабала. Њиховим јављањем, инфекције са патогенима из рода *Phytophthora* су често маскиране, па им се зато у прошлости није придавао већи значај. Ово је потребно детаљније испитати у будућим истраживањима са већим бројем узорака и ширим спектром домаћина из овог рода. Присуство некроза са цурењем тамног ексудата у протеклим годинама је било ређе регистровано и та појава се може објаснити вишом просечном годишњом температуром и нижом релативном влагом ваздуха у Србији, у односу на земље централне и северне Европе где су ове појаве чешће бележене (Кеча, лична комуникација). Међутим, у последње две године је забележено повећање броја некроза са цурењем тамног ексудата на различитим домаћинима у Србији, укључујући и јаворове (Миленковић, необјављени подаци), што представља додатни ризик и потребно је детаљно истражити главне узрочнике ове појаве.

Остали наведени симптоми нису уско специфични за ове патогене организме и лако долази до мешања са симптомима узрокованим другим узрочницима, а најчешће са *Verticillium albo-atrum*. Они су, после једног краћег периода стагнације током лета, најизраженији у јесен и огледају се у јакој разређености крошње, одумирању избојака, грана и врхова крошњи- „dieback“ тип пропадања. За раздвајање узрочника увек је потребно извршити изолације, чиме долази до потврђивања присуства

ових патогених организама. Уколико је присутна патогена гљива *V. albo-atrum*, шансе за опстанак стабала су јако умањене и потребно је размишљати о узгојним мерама замене врста и уношења отпорнијих домаћина. Неке симптоме, укључујући и оне на стаблима јавора су у Србији раније описивали и Milenković *et al.* (2011 a,b).

Као што је раније наведено, за тачну детерминацију узрочника потребно је извршити изолације и идентификацију изолованих врста, где кључну улогу играју карактеристике колонија и морфологија образованих структура. Најзаступљенија врста у овим истраживањима је била *P. plurivora* (табела 1), предходно позната као *P. citricola* Sawada и изолована је из некротичних ткива, воде и земљишта ризосфере узоркованих стабала јавора (табела 2). Према Jung and Burgess (2009), ова врста је изолована из некротичних ткива и из земљишта и корења сакупљених испод стабала јавора и наши резултати се уклапају у ова истраживања. Присуство ове врсте носи веома велике ризике, јер се ради о отпорној, јако агресивној и врсти која се јавља на великом броју домаћина (Jung and Burgess 2009). Такође, у истраживањима на осталим домаћинима у Србији, ова врста је била најзаступљенија и проузроковала је штете на великом броју домаћина (Миленковић, необјављени подаци). Остале изоловане врсте су биле *P. cactorum*, *P. lacustris* и *P. gonapodyides* и њихове морфолошке и колонијалне карактеристике су раније наведене.

Домаћин са највећим бројем изолата је био горски јавор са 18 изолата и три добијене врсте, а иза њега долази клен са седам изолата и две добијене врсте, док је са осталих домаћина из овог рода добијено знатно мање изолата (табела 1). Овде је битно идвојити планински јавор (*Acer heldreichii*), за који скоро да нема података везаних за осетљивост на инфекције патогенима из рода *Phytophthora* и ово представља један од ретких налаза ових патогених организама на овом домаћину.

Присуство наведених *Phytophthora* врста представља велики ризик по опстанак стабала јавора, али и других домаћина у различитим заједницама са јавором. Међутим, за одређивање њихове јасне улоге у пропадању стабала ових домаћина потребно је извести серије тестова патогености. Такође, после добијених прелиминарних резултата, потребно је наставити са даљим узорковањем различитих врста у оквиру рода јавора у циљу добијања јасне слике о диверзитету и распрострањености ових патогених организама на наведеним домаћинима. На све напред наведено се надовезује и праћење појаве и развоја различитих симптома и проналажење везе између њихове појаве, врсте домаћина, присуства ових патогена, присуства других патогених организама и услова средине.

ЗАКЉУЧЦИ

На основу спроведених истраживања и добијених резултата можемо извући следеће закључке:

- Током обиласка терена и сакупљања узорака примећени су различити симптоми на стаблима различитих врста јавора у Србији који су указивали на могуће инфекције са патогенима из рода *Phytophthora*;
- укупно је узорковано шест различитих домаћина из рода јавора, укључујући пет аутохтоних и једног алохтоног домаћина;
- после изведених тестова изолације, добијено је више различитих изолата и пет домаћина је било позитивно на присуство патогена из рода *Phytophthora*;
- највише изолата је добијено из узорака земље и корења, док је из осталих узорака добијено знатно мање изолата;
- изолати су на основу изгледа колоније на различитим подлогама класификовани у групе изолата и извршен је опис добијених култура;
- извршена је детаљна анализа развијених полних и бесполних структура под светлосним микроскопом и посматране структуре су забележене уз помоћ микроскопске камере;
- изолати који нису образовали полне елементе у чистим културама су спаривани са предходно одређеним тестер изолатима, уступљеним од Dr Sabine Werres и сви тестирани изолати су се показали стерилним након ових тестова;
- комбинацијом детаљних морфолошких карактеристика и изгледа колонија извршена је идентификација врста;
- из сакупљених узорака изоловано је и идентификовано четири врсте *Phytophthora*.

Захвалница: Овај рад је реализован у оквиру пројеката: „Одрживо газдовање укупним потенцијалима шума у Републици Србији“ – ЕВБ: ТР 37008, финансираном од стране Министарства Просвете и Науке Републике Србије, и PHYSEE-ERA NET+138/1. Најсрдачније се захваљујемо Dr Sabine Werres на уступљеним тестер изолатима за потребе одређивања типа спаривања, односно стерилитета врста.

ЛИТЕРАТУРА

- Adl S. L., Simpson A. G. B., Lane C. E., Lukeš J., Bass D., Bowser S. S., Brown M. W., Burki F., Dunthorn M., Hampl V., Heiss A., Hoppenrath M., Lara E., Lee Gall L., Lynn D. H., McManus H., Mitchell E. A. D., Mozley-Stanridge S. E., Parfrey L. W., Pawlowski J., Rueckert S., Shadwick L., Schoch C. L., Smirnow A., Spiegel F. W. 2012. The revised Classification of Eukaryotes. *J. Eucaryot. Microbiol.*, 59(5): 429-493.
- Brasier C. M., Jung T. 2006. Recent developments in *Phytophthora* diseases of trees and natural ecosystems in Europe. In: *Progress in Research on Phytophthora Diseases of Forest Trees. Proc. 3rd Int. IUFRO Working Party 7.02.09 Meeting, Freising, Germany, September 11 – 17, 2004* (eds.: C. M. Brasier, T. Jung, W. Osswald). Forest Research, Farnham, UK, 5–16.
- Brasier C.M. 2008. The biosecurity threat to the UK and global environment from international plant trade. *Plant Pathology*, 57, 792–808.
- Brasier C.M., Cooke D.E.L., Duncan J.M., Hansen E.M. 2003. Multiple new phenotypic taxa from trees and riparian ecosystems in *Phytophthora gonapodyides* – *P. megasperma* ITS Clade 6, which tend to be high-temperature tolerant and either inbreeding or sterile. *Mycological Research*, 107, 277–290.
- Erwin D.C., Ribeiro O.K. 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. APS Press, American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota.
- Evans H., Oszako T. 2006. Alien Invasive Species and International Trade. Forest Research Institute-IBL, Sekocin Stary, Poland, pp. 65.
- Ginetti B., Moricca S., Squires J. N. Cooke D. E. L. Ragazzi A., Jung T. (2013): *Phytophthora acerina* sp. nov., a new species causing bleeding cankers of *Acer pseudoplatanus* trees in planted forests in northern Italy. *Plant Pathology*, 63 (4), 858-876.
- Hall G. 1993. An integrated approach to the analysis of variation in *Phytophthora horanicotianae* and redescription of the species. *Mycological Research* 97: 559–574.
- Hong C., Gallegly M.E., Richardson P.A., Kong P. 2011. *Phytophthora pini* Leonian resurrected to distinct species status. *Mycologia* 103: 351-360.
- Jung T. 2009. Beech decline in Central Europe driven by the interaction between *Phytophthora* infections and climatic extremes. *Forest Pathology*, 39, 73–94.

- Jung T., Blaschke H., Neumann P. 1996. Isolation, identification and pathogenicity of *Phytophthora* species from declining oak stands. *European Journal of Forest Pathology*, 26, 253-272.
- Jung T., Blaschke H., Osswald W. 2000. Involvement of soilborne *Phytophthora* species in Central European oak decline and the effect of site factors on the disease. *Plant Pathology*, 49, 706-718.
- Jung T., Burgess T.I. 2009. Re-evaluation of *Phytophthora citricola* isolates from multiple woody hosts in Europe and North America reveals a new species, *Phytophthora plurivora* sp. nov. *Persoonia*, 22, 95-110.
- Jung T., Cooke D.E.L, Blaschke H., Duncan J.M., Osswald W. 1999. *Phytophthora quercina* sp. nov., causing root rot of European oaks. *Mycological Research*, 103, 785-798.
- Jung T., Hansen E.M., Winton L., Osswald W., Delatour C. 2002. Three new species of *Phytophthora* from European oak forests. *Mycological Research*, 106, 397-411.
- Jung T., Nechwatal J. 2008. *Phytophthora gallica* sp. nov., a new species from rhizosphere soil of declining oak and reed stands in France and Germany. *Mycological Research* 112, 1195-1205.
- Jung T., Nechwatal J., Cooke D.E.L., Hartmann G., Blaschke M., Osswald W.F., Duncan J.M., Delatour C. 2003. *Phytophthora pseudosyringae* sp. nov., a new species causing root and collar rot of deciduous tree species in Europe. *Mycological Research* 107: 772-789.
- Jung T., Stukely M.J., Hardy G.E., White D., Paap T., Dunstan W.A., Burgess T.I. 2011. Multiple new *Phytophthora* species from ITS Clade 6 associated with natural ecosystems in Australia: evolutionary and ecological implications. *Persoonia* 26: 13-39.
- Jung T., Vettraino A. M., Cech T., Vannini A. 2013. The impact of invasive *Phytophthora* species on European forests. In: Lamour K. (eds) *Phytophthora A Global Perspective*. CABI, Plant protection series; 2, 146-158.
- Јовановић Б. 1971. Дендрологија. Научна књига, Београд, 1-576.
- Караџић Д. 2010. Шумска фитопатологија. Универзитет у Београду-шумарски факултет, Универзитет у Бања Луци Шумарски факултет, 1-774.

- Караџић Д., Милијашевић Т. 2005. Најчешће „пепелнице“ на шумским дрвенастим врстама и њихов значај. Гласник Шумарског факултета 91, 9-29.
- Караџић Д., Михајловић Љ., Милановић С., Станивуковић З. 2011. Приручник извештајне и дијагнозно-прогнозне службе Заштите шума. Универзитет у Бањој Луци и Агенција за шуме Републике Српске, 1-517.
- Караџић Д., Радуловић З., Миленковић И. 2014. *Ganoderma* врсте у шумама Србије и Црне Горе. Шумарство бр. 1-2, УШИТС, Београд, 1-19.
- Milenkovic I., Keca N., Jung T. 2011a. Symptoms associated with *Phytophthora* species in forest ecosystems in Serbia. COST Action FP0801 Established and Emerging Phytophthora: Increasing Threats to Woodland and Forest Ecosystems in Europe. Program and abstracts of the Management Committee and Working Groups Meeting. Budapest, Hungary, 21-22 November 2011, 28.
- Milenković I., Keča N., Jung T. 2011b. Simptomi pojave *Phytophthora* vrsta na šumskom i parkovskom drveću u Srbiji (Different type of *Phytophthora* symptoms on forest and park trees in Serbia). Društvo za zaštitu bilja Srbije, XI Savetovanje o Zaštiti Bilja. Zlatibor, Srbija, od 28. novembra do 3. decembra 2011, Zbornik rezimea, 54-56.
- Milenković I., Keča N., Jung T. 2012. Nalaz *Phytophthora plurivora* na novim domaćinima u Srbiji. Društvo za zaštitu bilja Srbije, XIV Simpozijum o Zaštiti bilja sa IX Kongresom o Korovima, Zlatibor, Srbija, od 26. do 30. novembra 2012, Zbornik rezimea, 99-100.
- Nechwatal J., Bakonyi J., Cacciola S.O., Cooke D. E. L., Jung T., Nagy Z. A., Vannini A., Vettraino A. M., Brasier, C. M. 2012. The morphology, behaviour and molecular phylogeny of *Phytophthora* taxon Salixsoil and its redesignation as *Phytophthora lacustris* sp. nov. Plant Pathology 62, 355-369.
- Partridge-Metz S., Chandra A. 2011. Culture Media Influence on vegetative growth and In vitro conidia production of *Magnaporthe oryzae*. J. Cell and Plant Sci. 2 (3), 9-11.
- Pérez-Sierra A., Jung T. 2013. *Phytophthora* in woody ornamental nurseries. In: Lamour K. (eds) *Phytophthora A Global Perspective*. CABI, Plant protection series; 2, 166-177.

- Ribeiro O. K. 2013. A historical perspective of *Phytophthora*. In: Lamour K. (eds) *Phytophthora A Global Perspective*. CABI, Plant protection series; 2, 1-10.
- Scott P., Burgess T., Hardy G. 2013. Globalization and *Phytophthora*. In: Lamour K. (eds) *Phytophthora A Global Perspective*. CABI, Plant protection series; 2, 226-232.
- Stamps D.J., Waterhouse G.M., Newhook F.J., Hall G.S. 1990. Revised tabular key to the species of *Phytophthora*. Mycological Papers 162. CAB International Mycological Institute, Kew, Surrey.
- Waterhouse G.M. 1963. Key to the species of *Phytophthora* de Bary. Mycol. Papers No. 92. CAB International Mycological Institute, Kew, Surrey.

Ivan Milenković

Dragan Karadžić

Zoran Stanivuković

Vesna Golubović Ćurguz

SYMPTOMS OF OCCURENCE AND MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF THE MOST COMMON PHYTOPHTHORA SPECIES ON MAPLE TREES IN SERBIA

Summary

Phytophthora species are among the most dangerous pathogens to high number of different hosts and their presence posed significant treats to forestry and biodiversity. Apart of several affecting factors, species from the *Acer* genus are considered to be susceptible to infections with pathogens from the *Phytophthora* genus.

During the field surveys and sampling, different symptoms that could be indicative for the infections with *Phytophthora* species were recorded on maple trees in Serbia. These symptoms included yellowing and slightly atrophy of leaves, stunting of shoots, dieback of crowns and branches, and collar rot and aerial cankers with tarry spots and dark exudates. First symptoms are visible in early spring, and in that period is visible yellowing of leaves and stunting of shoots, as well as appearance of necrotic zones with dark exudates. Symptoms developments become more intensive in the autumn, when dieback of branches and crowns is the most noticeable. Intensity of these symptoms is driven with infections with other pathogenic organisms or insect attack, and after few years whole trees start to decline. The biggest risk is posed with the presence of additional aggressive pathogen *Verticillium albo-atrum*. From under the trees with above mentioned symptoms, samples of necrotic tissue, water, soil and roots were collected and isolation tests were performed, following well-described methodology. In total, six different hosts were tested, including five autochthonous and one alochthonous host. *Phytophthora* species were isolated from five different hosts, including *Acer campestre*, *A. heldreichii*, *A. pseudoplatanus*, *A. platanoides* and *A. tataricum*. After the isolation tests, detailed morphological identification was performed. Main morphological and colony shape patterns were recorded, and pairing tests with heterothallic/sterile species were performed. In total, four different *Phytophthora* species were identified, including homothallic *P. cactorum* and *P. plurivora*, and apparently sterile *P. gonapodyides* and *P. lacustris*. The most often isolated species was *P. plurivora*, what corresponded to the data from the other host species and stands in Serbia.

Isolated species poses significant threats to sustainability of natural and semi-natural ecosystems, including these communities with maple trees. Also, additional field surveys in different forest stands and in other ecosystems are required in order to determine the role of these pathogens in trees decline and connection between their presence, symptoms appearance, presence of other pathogens and environmental conditions.