

Milenković I., Keča N., Zlatković M., Nowakowska J. A., Oszako T., Karadžić D. 2013. *Occurrence of Phytophthora species in the management unit „Turjak-Vršine“*. Bulletin of the Faculty of Forestry 108: 109-128.

Иван Миленковић                      УДК: 630\*443.3:630\*172.8 Phytophthora spp.(497.11-14)  
Ненад Кеча                                      Оригинални научни рад  
Милица Златковић                      DOI: 10.2298/GSF1308109M  
Justyna A. Nowakowska  
Tomasz Oszako  
Драган Караџић

## ПОЈАВА *PHYTOPHTHORA* ВРСТА НА ПОДРУЧЈУ ГАЗДИНСКЕ ЈЕДИНИЦЕ „ТУРЈАК-ВРШИНЕ“

**Извод:** Велики број студија је показао да је више врста из рода *Phytophthora* директно повезано са пропадањем стабала у различитим шумама, и да су ови организми главни изазивачи трулежи и губитка финог корења, некроза и озледа на матичном корењу. Узимајући у обзир све наведене симптоме, као и ризике по шумарство и биодиверзитет, које присуство ових патогених врста носи, спроведено је истраживање у Шумском газдинству „Шумарство“ – Рашка у газдинској јединици „Турјак-Вршине“, Шумска управа Нови Пазар, са циљем да се изолују и идентификују најважније врсте ових патогених организама, као и да се утврде главни домаћини. Сакупљани су узорци супстрата око корена, воде и некротичних ткива, а изолација је вршена према познатој методологији помоћу мамака и директним постављањем ткива на хранљиве подлоге. Тестирано је 11 различитих домаћина, од чега је пет било позитивно и након изведених тестова изолације, добијено је укупно 29 изолата. Домаћини са којих је добијено највише изолата су *Alnus glutinosa* са 12 и *Fagus sylvatica* са седам изолата. Најчешће изолована врста је била *Phytophthora plurivora* и изолована је са три различита домаћина. Такође, добијена је и *P. cactorum*, а идентификација пет изолата је још увек у току.

дипл инж. Иван Миленковић, истраживач сарадник, Институт за шумарство, Београд (ivan.milenkovic@sfb.bg.ac.rs)

др Ненад Кеча, ванредни професор, Универзитет у Београду – Шумарски факултет, Београд  
дипл инж. Милица Златковић, истраживач сарадник, Универзитет у Београду – Шумарски факултет, Београд

др Justyna A. Nowakowska, associate profesor, Forest Research Institute-IBL, Sekocin Stary, Poland

др Tomasz Oszako, associate profesor, Forest Research Institute – IBL, Sekocin Stary, Poland

др Драган Караџић, редовни професор, Универзитет у Београду – Шумарски факултет, Београд

Ово је први налаз *Phytophthora plurivora*, *P. gonapodyides* и *Phytophthora* spp. на јови у Србији.

**Кључне речи:** *Phytophthora plurivora*, паразити финог корења, земљиште ризосфере, *Phytophthora* на јови, пропадање букве

#### OCCURRENCE OF *PHYTOPHTHORA* SPECIES IN THE MANAGEMENT UNIT „TURJAK-VRŠINE“

**Abstract:** Numerous studies have shown that several *Phytophthora* species are directly connected with the tree decline in various forests, and that these organisms are the main cause of decay and loss of fine roots, necrosis as well as of the wounds of mother roots. Due to the previously recorded symptoms and high risk to forestry and biodiversity posed by the presence of these species, a study was performed in the Forest Estate „Šumarstvo“ – Raška, in the forest management unit „Turjak-Vršine“, Forest administration in Novi Pazar. The aims of the research were to isolate and identify the *Phytophthora* species and their associated hosts. The samples of rhizosphere soil, water and necrotic tissues were taken, and the isolation was performed according to a known methodology, using baits and direct setting of tissue culture on the media. Eleven hosts were tested, five hosts were positive and a total of 29 isolates were obtained. The hosts with the most isolates obtained were *Alnus glutinosa* with 12 and *Fagus sylvatica* with 7 isolates. The most frequently isolated species was *Phytophthora plurivora*, which occurred on three hosts. *P. cactorum* was also obtained, and the identification of five other isolates is currently going on. This is the first record of *P. plurivora*, *P. gonapodyides* and *Phytophthora* spp. on alder trees in Serbia.

**Key words:** *Phytophthora plurivora*, fine root pathogens, rhizosphere soil, alder *Phytophthora*, beech decline

## 1. УВОД

Врсте из рода *Phytophthora* припадају царству *Chromista-Stramenopiles* (Kirk *et al.*, 2008) и спадају у гљивама сличне организме који се од правих гљива (царство Fungi) разликују у одсуству хитина и учествовању целулозе и  $\beta$  глукана у грађи ћелијског зида, формирању посебних полних спора-ооспора, као и формирању диплоидних хифа. Према новијој литератури, ови организми су заједно са другим гљивама сличним организмима, алгама и протистама сврстани у суперцарство Chromalveolate (Beakes *et al.*, 2012).

Као што је већ наведено, врсте из рода *Phytophthora* формирају посебне, дебелозидне, трајне полне споре, зване ооспоре, као и бесполне хламидоспоре, и у овим структурама преживљавају неповољне спољашње услове, као што су на пример суша, високе и ниске температуре (Erwin, Ribeiro, 1996). Наступањем повољних услова, ове трајне структуре клијају и образују карактеристичне

спороносне органе, зване зооспорангије, који ослобађају зооспоре у земљишну влагу. Младо корење домаћина приликом раста лучи хемијске супстанце које привлаче зооспоре, и оне га инфицирају као примарни патогени. Убрзо након инфекције на површини младог корења формира се мноштво нових зооспорангија које ослобађају нове зооспоре при чему се читав циклус понавља. Трајност мирујућих спора, висока агресивност и мултициклична природа сврставају *Phytophthora* врсте међу најопасније биљне патогене.

Подаци о присуству и диверзитету ових патогена у различитим екосистемима у Србији су веома оскудни. Наиме, *Phytophthora ramorum* је забележена на *Rhododendron* spp. и *Pieris* spp. у урбаним срединама (Bulajić *et al.*, 2008). Такође, Миленковић и сар. (2011), су извештавали о различитим симптомима и изолацији више *Phytophthora* врста са различитих шумских и парковских домаћина у Србији (Milenković *et al.*, 2011 a, b).

На значај и улогу *Phytophthora* врста у пропадању различитих шумских екосистема широм Европе је указана у више националних и интернационалних студија, а нарочито у пропадању букве и храстова и одумирању јове (Balci, Halm-schlager, 2003 a, b, Brasier *et al.*, 2004, Brasier С.М., 2008, Ioos *et al.*, 2007, Jung *et al.*, 1996, 1999, 2000, 2002, 2005, Jung, Blaschke, 2004, Jung T., 2009, Vettraino *et al.*, 2002, Orlikowski *et al.*, 2011).

Газдинска јединица „Турјак - Вршине” је лоцирана у југозападном делу Србије, југозападно и јужно од Новог Пазара у склопу Горњеибарског шумског подручја. Површина газдинске јединице износи 3.391,57 ha, а најзаступљеније су изданацке шуме са 52,9%. Укупна запремина газдинске јединице износи 251.349,5 m<sup>3</sup> од чега је учешће лишћарских врста 99,5%, а вештачки подигнутих састојина смрче 0,5% запремине. Најзаступљенија врста је буква са учешћем од 62,2% запремине газдинске јединице. Од лишћарских врста даље се јављају храстови китњак и цер, а у мањем обиму остале лишћарске врсте.

У овој газдинској јединици су примећени симптоми који су указивали на могућност инфекцијама патогенима из рода *Phytophthora*. Наиме, на стаблима букве у одељењима 70 и 71, која припадају ценоеколошкој групи планинске шуме букве (*Fagenion moesiacaе montanum*), старости 40 година на различитим смеђим земљиштима, је евидентирана јака разређеност круне, хлороза листова и извале стабала на којима је уочен знатан губитак финог корења и некрозе на већем корењу. Такође, примећени су и процеси сушења смрче у вештачки подигнутим културама које припадају наведеној ценоеколошкој групи, као и пропадања појединачних стабала других лишћарских врста у овим састојинама.

Узимајући у обзир појаву различитих симптома, заступљеност осетљивих домаћина, као и ризике које носи присуство ових патогена, спроведено је истраживање са циљевима: (i) утврдити присуство ових патогена на подручју газдинске јединице „Турјак-Вршине“; (ii) изоловати и идентификовати главне врсте ових патогена; (iii) одредити главне домаћине у истраживаним шумама.

## 2. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

### 2.1. Локалитети истраживања

Табела 1. Истраживани локалитети и сакупљени узорци

Table 1. Studied localities and samples taken

Број No	Газдинска јединица/ Локалитет Management unit/locality	Домашини Hosts	Датум сакупљања Sampling date	Број стабала Number of trees	Број узетих узорака Number of samples taken	Број позитивних узорака Number of positive samples	
						N	%
1	Лукаре, приватно имање, private estate	<i>Alnus glutinosa</i>	Март 2012 March 2012	3	7	5	71
2	Турјак-Вршине, 71. одељење, одсек б 71. compartment, section b	<i>Betula pendula</i>	Март 2012 March 2012	2	2	0	0
3	Турјак-Вршине, 70. одељење, одсек а 70. compartment, section a	<i>Fagus sylvatica</i>	Март 2012 March 2012	5	7	5	71
4	Мужевац-Купусине, приватна шума Private forest	<i>Fagus sylvatica</i>	Март 2012 March 2012	2	2	1	50
5	Турјак-Вршине/ 71. одељење, одсек б 71. compartment, section b	<i>Salix caprea</i>	Март 2012 March 2012	1	1	0	0
6	Мужевац-Купусине, приватна шума Private forest	<i>Pyrus piraster</i>	Март 2012 March 2012	1	2	2	100
7	Мужевац-Купусине, Private forest	<i>Populus tremula</i>	Март 2012 March 2012	1	1	0	0
8	Турјак-Вршине, 71. одељење, одсек б 71. compartment, section b	<i>Picea abies</i>	Март 2012 March 2012	2	2	0	0
9	Турјак-Вршине, 70. одељење, одсек ц 70. compartment, section c	<i>Picea abies</i>	Март 2012 March 2012	3	3	0	0
10	Турјак-Вршине, 71. одељење, одсек д 71. compartment, section d	<i>Picea abies</i>	Март 2012 March 2012	1	1	0	0
11	Мужевац-Купусине, приватна шума Private forest	<i>Quercus cerris</i>	Март 2012 March 2012	2	2	0	0
12	Мужевац-Купусине, приватна шума Private forest	<i>Quercus frainetto</i>	Март 2012 March 2012	1	1	1	100

Број No	Газдинска јединица/ Локалитет Management unit/locality	Домаћини Hosts	Датум сакупљања Sampling date	Број стабала Number of trees	Број узетих узорака Number of samples taken	Број позитивних узорака Number of positive samples	
						N	%
13	Мужевац-Купусине, приватна шума Private forest	<i>Quercus petraea</i>	Март 2012 March 2012	3	3	2	67
14	Мужевац-Купусине, приватна шума Private forest	<i>Ulmus glabra</i>	Март 2012 March 2012	2	2	0	0
Укупно / Total		11	-	28	36	16	44

Сакупљање узорака је вршено на подручју шумске управе Нови Пазар, у газдинској јединици „Турјак - Вршине“. Укупно је сакупљено 36 узорака са 11 различитих врста домаћина (Табела 1) од чега је 16 било позитивно у тестовима изолације (Табела 1). Узорци су паралелно сакупљани у састојинама којима газдује Ј.П. „Србијашуме“ и у околним шумама у приватном власништву.

## 2.2. Методе сакупљања узорака и изолације

Сакупљање узорака је вршено према предходно описаној методологији (Jung T., 2009, Jung *et al.*, 1996, 2000). Узорци некротираних ткива су узимани са прелаза здравих у некротираних зоне, испирани у дестилованој води и постављани директно на селективну агар подлогу (V8A-PARPNH). Супстрат заједно са кореновим системом је узиман у виду земљишних блокова, димензија око 25×25×25 cm, са сваког стабла по два, затим је пакован у пластичне вреће запремине 10 l и донет у лабораторију ради даљих анализа. Узоркована су како симптоматична, тако и наизглед здрава стабла.

Такође, сакупљана је и вода из водотокова који протичу кроз ову газдинску јединицу, као и влажна земља из приобалног дела. Вода је сакупљана у чисте пластичне флаше, запремине 1 l, предходно стерилисане 70% алкохолом и испране дестилованом водом. Влажна земља из приобалног дела је сакупљана у пластичне кесе запремине 10 l.

Тестови изолације су вршени помоћу такозване методе мамака (Jung T., 2009, Jung *et al.*, 1996, 2000), а младо лишће *Quercus robur* L., *Fagus sylvatica* L. и *Prunus laurocerasus* L. је коришћено за мамке. Након 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 поменуто V8-PARPNH селективну подлогу. Након појаве првих хифа, оне су пресејаване на свежу шаргарепа агар подлогу (СА), припремљену 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 CaCO<sub>3</sub>, и чуване на собној температури ради даљих анализа.

## 2.3. Методе идентификације добијених изолата

### 2.3.1. Карактеристике колонија

Карактеристике колонија су одређиване на тај начин да су изолати пресејавани на три различите хранљиве подлоге, укључујући шаргарепа агар подлогу-СА; затим малц-екстракт-агар-МЕА, припремљену са 48 g/l малц екстракт агара (MERCK, Germany); и 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), и 3 g/l CaCO<sub>3</sub>). Инкубација пресејаних изолата је вршена на око 22-25°C у мраку. Главне карактеристике колонија су одређиване након 5-7 дана раста према познатој методологији (Erwin, Ribeiro, 1996, Brasier *et al.*, 2003, Jung *et al.*, 2002, 2003).

### 2.3.2. Пораст и кардиналне температуре

За сврхе одређивања брзине пораста на различитим температурама коришћена је прилагођена методологија Hall G., (1993) пресејавањем изолата на горе описану шаргарепа агар подлогу (СА), а инкубација је вршена на око 25°C у мраку. Након 3 до 5 дана раста, са ивице младе колоније су помоћу кружног шаблона, пречника 6 mm, изолати пресејавани на нову СА подлогу, и то сваки изолат у три нове петри шоље и остављани да расту 24 часа на око 25°C у мраку. Изолати су затим постављани на унапред задате различите температуре (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 и 37°C) и остављани да се прилагоде на дате температуре у наредна 24 часа. Петри шоље су обележаване на дну са две управне линије и пораст мицелије је бележен челичном иглом након свака наредна 24 часа раста током 5 дана или до испуњавања петри шоље са мицелијом гљиве.

### 2.3.3. Морфолошка идентификација

За сврхе морфолошке класификације изолата, припремљен је нестерилни земљишни раствор (Erwin, Ribeiro, 1996). Изолати су пресејани на горе описану шаргарепа агар подлогу, а након 3-5 дана раста са ивице младе колоније су узимани делови агара приближне величине 1×1 cm, постављани у чисте петри шоље и плавлени са горе поменути нестерилним земљишним раствором. Делови агара су испирани дестилованом водом након 4-6 часова, а испирање је понављано након наредних 6 и 12 часова (Jung, Burgess, 2009). Полне и бесполне структуре, типичне за врсте из рода *Phytophthora* су посматране под светлосним микроскопом (CETI® MAGNUM-T/Trinocular Microscope, UK), на увећању × 400 и мерене са камером Si3000® (UK) и софтвером XliCap® (UK).

Забележене структуре су поређене са познатим кључевима за идентификацију *Phytophthora* врста (Waterhouse, 1963, Stamps *et al.*, 1990, Erwin, Ribeiro, 1996), као и са подацима из новијих оригиналних радова у којима су описане поједине врсте (Jung *et al.*, 1999, 2002, 2011, Jung, Nechwatal, 2008, Jung, Burgess, 2009, Hong *et al.*, 2011, Nechwatal *et al.*, 2012).

### 3. РЕЗУЛТАТИ

#### 3.1. Изолација *Phytophthora* врста из земљишта ризосфере, воде и ткива

Пет (45.5%) од укупно 11 тестираних домаћина је било позитивно на присуство различитих *Phytophthora* врста и из 16 позитивних узорака укупно је добијено 29 изолата (Табела 1 и 2). Већина изолата је добијена из земљишта ризосфере (58.6%), који су у тестовима изолације изоловани помоћу методе мамака. Такође, помоћу методе мамака из узорака воде и влажне земље је добијено 11 изолата (37.9%). Из узорака некротичних ткива је добијен свега 1 изолат и то са црне јове (Табела 2). Највише позитивних узорака добијено је са црне јове (*Alnus glutinosa* L.), са које уједно долази и највише изолата, укупно 12 (Табела 2).

Табела 2. Изолација *Phytophthora* врста из земљишта, воде и ткива са различитих домаћина  
Table 2. Isolation of *Phytophthora* species from soil, water and tissues of different hosts

Број успешних изолација Number of successful isolations	Домаћини / Hosts											Укупно изолата <i>Phytophthora</i> spp. Total <i>Phytophthora</i> spp. isolates	
	<i>Alnus glutinosa</i>	<i>Betula pendula</i>	<i>Fagus sylvatica</i>	<i>Salix caprea</i>	<i>Pyrus pyrusaster</i>	<i>Populus tremula</i>	<i>Picea abies</i>	<i>Quercus cerris</i>	<i>Quercus frainetto</i>	<i>Quercus petraea</i>	<i>Ulmus glabra</i>		
	No	%											
Земља и корење Soil and roots	3	-	4	-	4	-	-	-	2	4	-	17	58.6
Вода и влажна земља Water and mold	8	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	11	37.9
Некротична ткива Necrotic tissues	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	3.5
Укупно по домаћинима Total per hosts	12	-	7	-	4	-	-	-	2	4	-	29	100

Са овог домаћина су изоловане три врсте и ово је први налаз *Phytophthora plurivora*, *Phytophthora gonapodyides* и *Phytophthora* sp. 1 на јови у Србији (Табела 3).

**Табела 3.** Изолације *Phytophthora* врста са различитих домаћина

**Table 3.** Isolation of *Phytophthora* species from different hosts

Изоване врсте Isolated species	Домаћини / Hosts											Укупно изолата <i>Phytophthora</i> spp. Total <i>Phytophthora</i> spp. isolates	
	<i>Alnus glutinosa</i>	<i>Betula pendula</i>	<i>Fagus sylvatica</i>	<i>Salix caprea</i>	<i>Pyrus pyraister</i>	<i>Populus tremula</i>	<i>Picea abies</i>	<i>Quercus cerris</i>	<i>Quercus frainetto</i>	<i>Quercus petraea</i>	<i>Ulmus glabra</i>	No	%
	<i>Phytophthora plurivora</i>	9		4		-	-	-	-	-	1	-	14
<i>Phytophthora cactorum</i>	-	-	-	-	1	-	-	-	2	3	-	6	20.7
<i>Phytophthora gonapodyides</i>	2		2	-	-	-	-	-	-	-	-	4	13.8
<i>Phytophthora</i> sp. 1	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	2	6.9
<i>Phytophthora</i> sp. 2	-	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-	3	10.3
Укупно по домаћинима Total per hosts	12	-	7	-	4	-	-	-	2	4	-	29	100

### 3.2. Идентификација добијених изолата

#### 3.2.1. Карактеристике колонија

На основу познатих карактеристика колонија извршена је прелиминарна класификација типова колонија добијених изолата (Табела 3).

**Табела 4.** Прелиминарна класификација изолата на основу изгледа колоније

**Table 4.** Preliminary classified types of isolates according to colony patterns

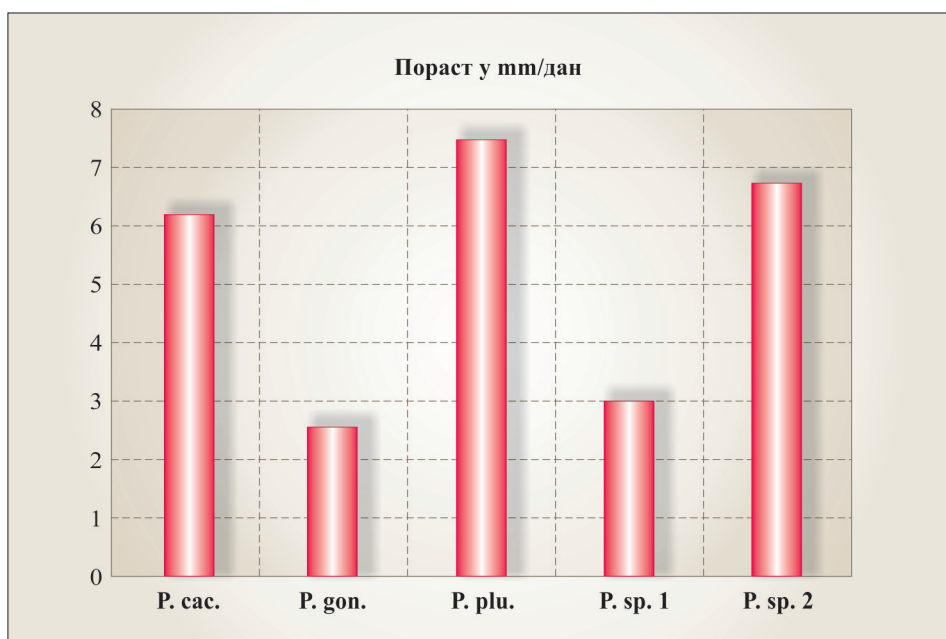
Тип колоније Colony type	Талус Thallus	Карактеристике колонија Colony patterns	Број изолата Number of isolates
Тип 1 Type 1	Хомоталична Homothallic	Памучаста до вунаста без посебног облика, делимично приљубљена, густа ваздушна мицелија, правилног обода	14
Тип 2 Type 2	Хомоталична Homothallic	Полуваздушаста у средини, благо приљубљена по крајевима, правилног обода и облика хризантеме	6



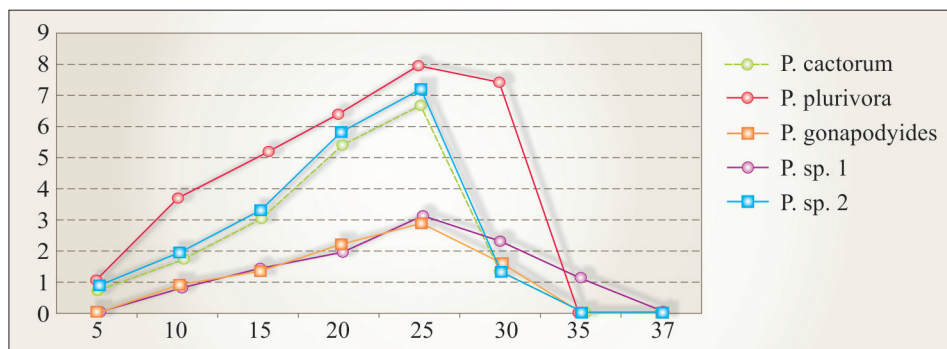
Тип колоније Colony type	Талус Thallus	Карактеристике колонија Colony patterns	Број изолата Number of isolates
Тип 3 Type 3	Стерилна Sterile	Свиленкаста, приљубљена за супстрат до резређена ваздушаста, облика је розете до неправилно зракаста и равног обода	4
Тип 4 Type 4	Стерилна или хетероталична Sterile or Homothallic	Свиленкаста до провидна, благо хризантемастог или неправилно зракастог облика и благо ваздушаста, обод правилан	2
Тип 5 Type 5	Хомоталична Homothallic	Баршунаста до вунаста мицелија, изражено густа, ваздушаста у средини и полуваздушаста по ободу који је правилан	3

### 3.2.2. Пораст и кардиналне температуре

Паралелно са морфолошком идентификацијом, извршено је и одређивање брзине пораста и кардиналних температурних тачака, а резултати су приказани на графиконима 1 и 2.



Графикон 1. Пораст колонија на СА подлози на 25°C  
Diagram 1. Growth rates on CA media at 25°C



**Графикон 2.** Кардиналне темп. тачке изолованих врста  
**Diagram 2.** Cardinal temperature points of isolated species

### 3.2.3. Морфолошка идентификација

Након извршене прелиминарне класификације изолата на основу изгледа колоније извршена је стимулација развијања полних и бесполних структура према горе описаној методологији. Посматрањем под светлосним микроскопом забележено је да је 14 изолата било хомоталично са полубрадавичастим (semiparillate) спорангијама различитог облика и димензија, које су се углавном формирале на симподијалним конидиофорима. Ови изолати су идентификовани као *P. plurivora* Jung and Burgess (табеле 4 и 5, слика 1).

Следећих шест изолата је такође било хомоталично, али са нешто већим бројем оогонија на шаргарепа агар подлози и изражено брадавичастим спорангијама (parillate) које су често опадале са кратких петељки на спорангиофорима. Ови изолати су идентификовани као *P. cactorum* (Lebert and Cohn) Schröeter (табеле 4 и 5; слика 1).

Четири изолата су имала спорангије са равним врхом (nonparillate). Пораст на оптималних 25°C износи 2,8 mm на дан. Ови изолати су идентификовани као *Phytophthora gonapodyides* (Petersen) Buisman (табела 5; слика 1).

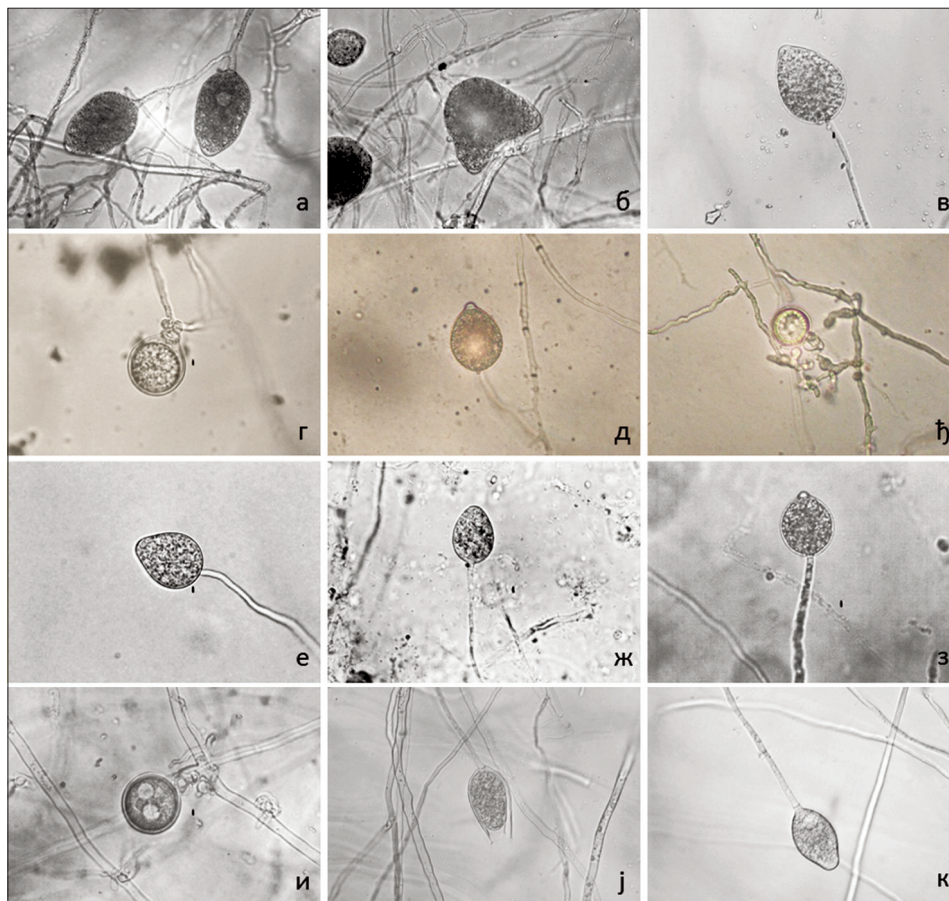
Идентификација преосталих пет изолата је још увек у току, а према прелиминарној класификацији два изолата су имала сличне карактеристике као *P. gonapodyides*, међутим, варијабилност у изгледу спорангија је била нешто већа, често се образују једна унутар друге (табела 5; слика 3), а максимална температура за пораст је била изнад 35°C (графикон 2) и ови изолати највероватније спадају у стабло 6 (ITS clade 6), према Сооке *et al.*, (2000). Последња три изолата су имала изражено брадавичасте спорангије, хетероталична је врста и по изгледу подсећа на *P. cactorum*, међутим уочене су одређене разлике у односу на ову врсту, најпре у изгледу колоније и у неким морфолошким карактеристикама као што су величина спорангија и оогонија и дебљина зида ооспоре (табеле 4 и 5; слика 1).

У табели 5 су приказане димензије карактеристичних структура добијених током морфолошке идентификације изолата, а на слици 1 су приказане забележене структуре на увећању  $\times 400$ .

Табела 5. Морфолошка идентификација изолата  
Table 5. Morphological identification of isolates

Врста Species	Спорулија Sporangia <sup>4</sup>		I/b однос I/b ratio	Ширина отвора празне спорулије Empty sporangia exit pore	Оогонија Oogonia		Антеридија Antheridia		Ооспора Oospore		Дебљина зида ооспоре Oospore wall thickness	Хламидоспоре Chlamydospores		Украси хифа Hyphal swellings
	I	b			I	b	I	b	I	b				
<i>P. sacorum</i> <sup>1</sup>	21,6- 46,5 (33,93)	17,6- 34,1 (27,26)	1,22- 1,36 (1,24)	4,3-7,1 (5,66)	22,3- 35,8 (30,7)	26,0- 34,7 (30,44)	8,0- 19,3 (13,45)	6,0- 19,0 (9,8)	16,8- 28,3 (21,94)	19,3- 25,4 (22,00)	0,6-1,7	18,4- 29,1 (23,2)	17,3- 29,1 (22,76)	-
<i>P. plurivora</i> <sup>1</sup>	22,2- 81,47 (56,45)	18,4- 47,99 (37,17)	1,21- 1,7 (1,52)	5,5-12,1 (8,6)	23,42- 37,32 (28,21)	23,42- 37,32 (28,21)	5,3- 16,6 (12,4)	4,1- 13,5 (8,6)	16,7- 33,21 (22,55)	16,71- 33,21 (22,55)	1,1-2,8	-	-	-
<i>P. gonarodiyides</i> <sup>2</sup>	23,91- 54,47 (39,28)	17,63- 33,85 (26,8)	1,35- 1,61 (1,47)	11,4-15,14 (12,39)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Phytophthora</i> sp. 1 <sup>3</sup>	19,21- 58,1 (39,59)	14,7- 31,2 (24,15)	1,31- 1,86 (1,64)	6,3-13,3 (9,79)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Phytophthora</i> sp. 2 <sup>1</sup>	28,5- 54,1 (41,76)	21,6- 38,2 (30,17)	1,31- 1,41 (1,38)	4,1-6,8 (5,35)	22,6- 39,1 (32,01)	19,8- 37,5 (31,5)	7,5- 17,4 (12,38)	5,1- 12,1 (9,16)	16,5- 29,8 (25,30)	16,0- 29,2 (25,30)	0,8-2,9	12,5- 33,1 (22,64)	12,5- 32,7 (22,23)	-

Легенда/Legend: 1=Хомоталична – Homothallic, 2=Стерилна – Sterile, 3=Стерилна или хетероталична – Sterile or heterothallic, 4=Све јединице су  $\mu\text{m}$ , осим односа I/b – all the values are in  $\mu\text{m}$ , except I/b ratio



**Слика 1.** Забележене *Phytophthora* spp. структуре: а) *P. plurivora* – полубрадавичасте спорангије на симподијално гранатим спорангиофорима; б) *P. plurivora* – спорангија са два врха; в) *P. plurivora* – спорангија; г) *P. plurivora* – оогонија са ооспором; д) *P. cactorum* – брадавичаста спорангија; њ) *P. cactorum* – оогонија са ооспором; е) *P. gonapodyides* – спорангија са равним врхом; ж) *P. gonapodyides* – спорангија; з) *Phytophthora* sp. 2 – брадавичаста спорангија; и) *Phytophthora* sp. 2 – оогонија са ооспором; ј) *Phytophthora* sp. 1 – спорангија са равним врхом формирана унутар друге; к) *Phytophthora* sp. 1 – спорангија са равним врхом

**Figure 1.** Recorded *Phytophthora* spp. structures: а) *P. plurivora* – semipapillate sporangia with simpodially branched sporangiophores; б) *P. plurivora* – two-picks sporangia; в) *P. plurivora* – sporangia; г) *P. plurivora* – oogonia and oospore; д) *P. cactorum* – papillate sporangia; њ) *P. cactorum* – oogonia and oospore; е) *P. gonapodyides* – nonpapillate sporangia; ж) *P. gonapodyides* – sporangia; з) *Phytophthora* sp. 2 – papillate sporangia; и) *Phytophthora* sp. 2 – oogonia and oospore; ј) *Phytophthora* sp. 1 – nonpapillate internally formed sporangia; к) *Phytophthora* sp. 1 – nonpapillate sporangia (Фото: Миленковић И.; Photo: Milenković I.)

#### 4. ДИСКУСИЈА

Током сакупљања узорака у наведеној газдинској јединици примећени су и процеси пропадања стабала у околним приватним шумама, као и дуж појединих водотокова где је забележено пропадање стабала јове. Симптоми су били јасни и укључивали су некрозе у приданку и на стаблу уз спорадично цурење тамног ексудата, одумирање грана и сушење стабала од врха на доле ("dieback" тип пропадања). *Phytophthora alni* Brasier and S.A. Kirk, опасни патоген на јови и проузроковач одумирања јове у Европи (Brasier *et al.*, 2004, Jung, Blaschke, 2004, Ioos *et al.*, 2007), није забележен у овим истраживањима, иако су уочени симптоми указивали на његово могуће присуство. Овај патоген према Brasier *et al.*, (2004) има три подврсте *P. alni* subsp. *alni*, *P. alni* subsp. *multiformis*, и *P. alni* subsp. *uniformis* (Brasier *et al.*, 2004). Ioos *et al.*, (2007) истиче да су друга и трећа наведена подврста хибридизацијом постале родитељи прве подврсте (*P. alni* subsp. *alni*), која је уједно најагресивнија подврста, посебно према стаблима јове. Исто тако, као један од родитеља овог патогена се спомиње и *P. cambivora* (Brasier *et al.*, 2004), проузроковач мастиљаве болести питомог кестена и агресивни патоген на више различитих домаћина. Узимајући у обзир да ова врста такође није изолована испод ових стабала, можда је недостатак родитељског пара разлог за одсуство *P. alni* на истраживаним стаблима јове. Такође, овај патоген са све своје три подврсте је чест на хумиднијим и хладнијим стаништима северне хемисфере, па је виша просечна годишња температура у нашој земљи у односу на северније крајеве Европе, где је овај патоген често изолован, могући разлог за његово одсуство, или је ниво инокулума превише низак за детекцију горе описаним методама.

Међутим, један други агресивни патоген, *Phytophthora plurivora* је често изолован из сакупљених узорака земље и воде, као и из једног узорка ткива (Табела 2 и 3), што нам указује на његову потенцијалну улогу у пропадању узоркованих стабала јове. Присуство и улога ове врсте у пропадајућим састојинама јове су раније описивани (Jung, Blaschke, 2004, Jung, Burgess, 2009). Такође, из узорака земљишта и воде узетих испод ових стабала још су изоловане *P. gonapodyides* и *Phytophthora* sp. 1. Свакако, неопходно је наставити истраживања везана за присуство ових патогена и здравствено стање јове у различитим екосистемима, а нарочито у влажним, приобалним деловима река где су забележени различити симптоми на овим домаћинима широм Србије.

Следећи узорковани домаћин са кога је добијено укупно седам изолата је буква (*Fagus sylvatica*), на коме су забележене три врсте (Табела 3). Улога *Phytophthora* врста у пропадању стабала букве је предходно веома добро описана у више студија (Jung *et al.*, 2005, Jung, Burgess, 2009, Jung T., 2009, Hartmann *et al.*, 2006, Fleischmann *et al.*, 2002, 2004, Portz *et al.*, 2011).

Када говоримо о добијеним *Phytophthora* врстама, најчешће изолована врста је била *P. plurivora*, предходно позната као *P. citricola* Sawada, са укупно 14 добијених изолата, што се поклапа са мишљењима појединих аутора да је ова



врста један од најчешћих паразита финог корења на многим лишћарским врстама укључујући букву, храстове, јасен и јову (Jung, Burgess, 2009, Orlikowski *et al.*, 2011).

Наредна изолована врста је била *P. cactorum*, са укупно шест добијених изолата, са три различита домаћина (Табела 2). Занимљиво је то да ова врста није изолована са букових стабала, иако је у литератури владало мишљење да је она распрострањена врста како у расадницима, тако и у младим и зрелим састојинама букве. Ово донекле може бити објашњено чињеницом да је ова врста у прошлости мешана са морфолошки сличном *P. citricola*, сада *P. plurivora*, на шта су указали Jung and Burgess (2009).

*Phytophthora gonapodyides* је често повезивана са влажним и плавним стаништима (Hansen, Delatour, 1999, Balci, Halmschlager, 2003 a), и њена изолација из воде и влажне земље у састојинама букве и испод стабала јове се поклапа са овим налазима. Међутим, ова врста је недавно повезана са пропадањем *Quercus ilex* L. у сувим условима у Шпанији (Corgobado *et al.*, 2010), а предходно је у више студија показано да је узрочник трулежи корена и некроза са рак ранама на деблу храста лужњака (Jung *et al.*, 1996, Balci, Halmschlager, 2003 a). Имајући у виду да се ради о патогеној врсти, потребно је проверити њену улогу у пропадњу стабала у истраживаним шумама кроз различите тестове патогености.

Четврта изолована врста са по једним изолатом добијеним из земљишта и воде испод стабала јове и букве је прелиминарно окарактерисана као *Phytophthora* sp. 1 и у току је рад на њеној идентификацији. Врста је веома морфолошки слична са *P. gonapodyides*, међутим забележене су извесне разлике у односу на ову врсту, пре свега у максималној температури пораста и варијабилности у изгледу и димензијама спорангија и високом l/b односу (length to breadth ratio), који је износио 1,64 (табела 5; слика 1). Узимајући у обзир да се ради о стерилној или хетероталичној врсти, потребне су даље анализе до коначне идентификације без непотврђених доказа о којој се врсти ради.

Последња, можда и најзанимљивија врста је изолована из земљишта испод стабла дивље крушке (*Pyrus pyraster* L.). Ова врста је прелиминарно окарактерисана као *Phytophthora* sp. 2, и такође се ради на њеној коначној идентификацији. Врста је хомоталична и образује оогоније и спорангије сличне са *P. cactorum*. Међутим, уочене разлике су довеле до тога да се одложи изједначавње ових изолата са поменутом *P. cactorum* из неколико разлога. Као прво, пораст ових изолата на оптималних 25°C је био нешто већи него код *P. cactorum* и износио је 6,97 mm/дан на шаргарепа агар подлози. Уочено је да су се карактеристичне брадавичасте спорангије образовале понекад и интеркаларно или биле прикачене са стране, а оогоније и ооспоре су биле нешто већих димензија у односу на *P. cactorum*. Оспоре су биле округле, крупне и забележено је неколико случајева када су испуњавале оогонију. Дебљина зида ооспоре је такође била већа у односу на *P. cactorum* и кретала се у распону од 0,8-2,9  $\mu\text{m}$ , док је код *P. cactorum* износила 0,6-1,7  $\mu\text{m}$ . Врста би се по

већини морфолошких и физиолошких карактеристика могла идентификовати као *Phytophthora hedraiaandra* de Cock and Levesque, али су ооспоре биле јасно округле и правилне (табела 5; слика 1), за разлику од ове врсте која има благо спљоштене до елиптичне ооспоре, па је неопходно наставити и можда укључити и молекуларна истраживања до њене коначне идентификације.

Честа изолација *Phytophthora* врста из узорака воде и влажне земље такође није изненађујућа, узимајући у обзир велику улогу воде у разношењу ових организама и остваривању инфекција, што је веома добро познато и описано раније (Reeser *et al.*, 2011, Hulvey *et al.*, 2010, Orlikowski *et al.*, 2007).

Узимајући у обзир присуство неколико врста из рода *Phytophthora* збележених на више различитих домаћина од којих се неки сматрају веома осетљивим, потребно је разјаснити улогу ових патогена у пропадњу стабала кроз различите тестове патогености. Такође, неопходно је спровести даља истраживања везана за детаљно регистровање симптома, изолацију и идентификацију ових врста како у овим, тако и у другим различитим екосистемима у Србији у којима су забележени различити процеси пропадња стабала, а могу бити узроковани инфекцијама патогенима из рода *Phytophthora*.

## 5. ЗАКЉУЧЦИ

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

- Укупно је узорковано 11 различитих домаћина, од чега је пет било позитивно у тестовима изолације;
- Највише изолата је добијено са јове, укупно 12, затим следе буква са седам и дивља крушка и китњак са по четири;
- Идентификоване су три различите врсте, укључујући *P. plurivora*, *P. cactorum* и *P. gonapodyides*, а још пет изолата чека на коначну идентификацију;
- Најчешће изолована врста је била *P. plurivora*, јављајући се на укупно три различита домаћина;
- Ово је први налаз *Phytophthora plurivora*, *P. gonapodyides* и *Phytophthora* spp. на јови у Србији.

**Напомена:** 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. Такође, захваљујемо и дипл. инж. Милану Милентијевићу за велику помоћ у теренском делу истраживања и прикупљању узорака.

## ЛИТЕРАТУРА

- Balci Y., Halmschlager E. (2003a): *Incidence of Phytophthora species in oak forests in Austria and their possible involvement in oak decline*, Forest Pathology 33 (157–174)
- Balci Y., Halmschlager E. (2003b): *Phytophthora species in oak ecosystems in Turkey and their association with declining oak trees*, Plant Pathology 52 (694–702)
- Beakes GW, Glockling SL, Sekimoto S. (2012): *The evolutionary phylogeny of the oomycete „fungi”*, Protoplasma 249 (3–19)
- 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)
- Brasier C.M., Kirk S.A., Delcan J., Cooke D.E.L., Jung T., Man In't Veld W.A. (2004): *Phytophthora alni sp. nov. and its variants: designation of emerging hetero-ploid hybrid pathogens spreading on Alnus trees*, Mycological Research 108 (10) (1172–1184)
- Bulajić A., Djekić I., Jović J., Krnjajić S., Vučurović A., Krstić B. (2010): *Phytophthora ramorum occurrence in ornamentals in Serbia*, Plant Disease 94 (703–708)
- Cooke D.E.L., Drenth A., Duncan J.M., Wagels G., Brasier C.M. (2000): *A molecular phylogeny of Phytophthora and related oomycetes*, Fungal Genetics and Biology 30 (17–32)
- Corcobado T., Cubera E., Pérez-Sierra A., Jung T., Solla A. (2010): *First report of Phytophthora gonapodyides involved in the decline of Quercus ilex in xeric conditions in Spain*, New Disease Reports 22 (33)
- Erwin D.C., Ribeiro O.K. (1996): *Phytophthora diseases worldwide*, APS Press, American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota
- Fleischmann F., Göttlein A., Rodenkirchen H., Lütz C., Osswald W.F. (2004): *Bio-mass, nutrient and pigment content of beech (Fagus sylvatica) saplings infected with Phytophthora citricola, P. cambivora, P. pseudosyringae and P. Undulate*, Forest Pathology 34 (79–92)
- Fleischmann F., Schneider D., Matyssek R., Osswald W.F. (2002) *Investigations on Net CO<sub>2</sub> assimilation, transpiration and root growth of Fagus sylvatica infested with four different Phytophthora species*, Plant Biology 4 (144–152)
- Hall G. (1993): *An integrated approach to the analysis of variation in Phytophthora nicotianae and redescription of the species*, Mycological Research 97 (559 – 574)
- Hartmann G., Blank R., Kunca A. (2006): *Collar rot of Fagus sylvatica caused by Phytophthora cambivora: damage, site relations and susceptibility of broadleaf hosts*. 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 (135–138)
- Hong C., Gallegly M.E., Richardson P.A., Kong P. 2011. *Phytophthora pini Leonian resurrected to distinct species status*, Mycologia 103 (351–360)



- Hulvey J, Gobena D, Finley L, Lamour K. (2010): *Co-occurrence and genotypic distribution of Phytophthora species recovered from watersheds and plant nurseries of eastern Tennessee*, Mycologia 102 (1127 – 1133)
- Ioos R., Panabieres F., Industri B., Andrieux A., Frey P. (2007): *Distribution and expression of elicitor genes in the interspecific hybrid Oomycete Phytophthora alni*, Applied and Environmental Microbiology 73 (17), (5587-5597)
- 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 (197–208)
- 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., Hudler G.W., Jensen-Tracy S.L., Griffiths H.M., Fleischmann F., Oßwald W. (2005): *Involvement of Phytophthora spp. in the decline of European beech in Europe and the USA*, Mycologist 19 (159–166)
- 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)
- Kirk P.M., Cannon P.F., Minter D.W., Stalpers J.A. (2008): *Dictionary of the Fungi, 10<sup>th</sup> Edition*, CAB International, Oxon, UK
- Milenkovic I., Keca N., Jung T. (2011 a): *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. 21-22 November 2011, Budapest, Hungary (28)

- Milenković I., Keča N., Jung T. (2011 b): *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)
- 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).
- Orlikowski L. B., Trzewik A., Orlikowska T. (2007): *Water as potential source of Phytophthora citricola*, J. Plant Prot. Res. 47 (125–132)
- Orlikowski L.B., Ptaszek M., Rodziewicz A., Nechwatal J., Thinggaard K., Jung T. (2011): *Phytophthora root and collar rot of mature Fraxinus excelsior in forest stands in Poland and Denmark*, Forest Pathology 41 (6) (510-519)
- Portz R.L., Fleischman F., Koehl J., Fromm J., Ernst D., Pascholati S.F., Osswald W.F. (2011): *Histological, physiological and molecular investigations of Fagus sylvatica seedlings infected with Phytophthora citricola*, Forest Pathology 41 (202-211)
- Reeser P.W., Hansen E.M., Sutton W., Remigi P., Adams G.C. (2011): *Phytophthora species in forest streams in Oregon and Alaska*, Mycologia 103 (22–35)
- 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
- Vettraino A.M., Barzanti G.P., Bianco M.C., Ragazzi A., Capretti P., Paoletti E., Luisi N., Anselmi N., Vannini A. (2002): *Occurrence of Phytophthora species in oak stands in Italy and their association with declining oak trees*, Forest Pathology 32 (19–28)
- Waterhouse G.M. (1963): *Key to the species of Phytophthora de Bary*. Mycol. Papers No. 92. CAB International Mycological Institute, Kew, Surrey

Ivan Milenković  
Nenad Keča  
Milica Zlatković  
Justyna A. Nowakowska  
Tomasz Oszako  
Dragan Karadžić

#### OCCURRENCE OF *PHYTOPHTHORA* SPECIES IN THE MANAGEMENT UNIT „TURJAK-VRŠINE“

##### Summary

*Phytophthora* species are dangerous pathogens of deciduous tree species, ornamental and agricultural plants. It was shown in many studies that these pathogens can cause various damages to different woody hosts, and that there is significant threat to forestry and biodiversity posed by the presence of these organisms.

On the basis of this, a study was performed in the forest management unit „Turjak-Vršine“, in South-West Serbia, with the aim to determine the presence of these pathogens on several woody

hosts, and to determine the main species occurring in these stands. For these purposes, different material was collected in the field including rhizosphere soil and roots, necrotic tissues, and samples of water and mold, following a previously well described methodology.

In total, 11 different host species were tested, including *Alnus glutinosa*, *Fagus sylvatica*, *Pyrus pyraster*, *Quercus frainetto*, and *Q. petraea* that were positive in the isolation tests, together with *Betula pendula*, *Salix caprea*, *Populus tremula*, *Picea abies*, *Q. cerris*, and *Ulmus glabra* that were negative in the isolation tests. The hosts with the most numerous isolates obtained were *Alnus glutinosa* with 12 isolates in total, followed by *Fagus sylvatica* with seven isolates.

This is the first record of *Phytophthora plurivora*, *P. gonapodyides* and *Phytophthora* spp. on symptomatic alder trees in Serbia.

After a detailed morphological and physiological identification, three different *Phytophthora* species were confirmed including *P. cactorum*, *P. gonapodyides* and *P. plurivora*. In addition, five isolates were preliminarily confirmed as *Phytophthora* spp., out of which two are most likely belonging to ITS clade 6, *sensu* Cooke *et al.*, (2000), and they are waiting for final identification.

However, the most frequent isolated species was homothallic, semipapillate, and with very variable sporangia shape *P. plurivora*, occurring on three different hosts. These findings contribute to the assumption that this species, due to its wide host range, persistence of resting structures and high aggressiveness, has already established its population in different natural and semi-natural ecosystems in Serbia.

Also, additional field surveys are required in different ecosystems and on different hosts, as well as the determining of the role of these pathogens in tree decline using different pathogenicity tests.

