

Phytophthora врсте у шумским екосистемима у Србији

Phytophthora sp. in forest ecosystems in Serbia

др Иван Миленковић, научни сарадник
Институт за шумарство, Београд

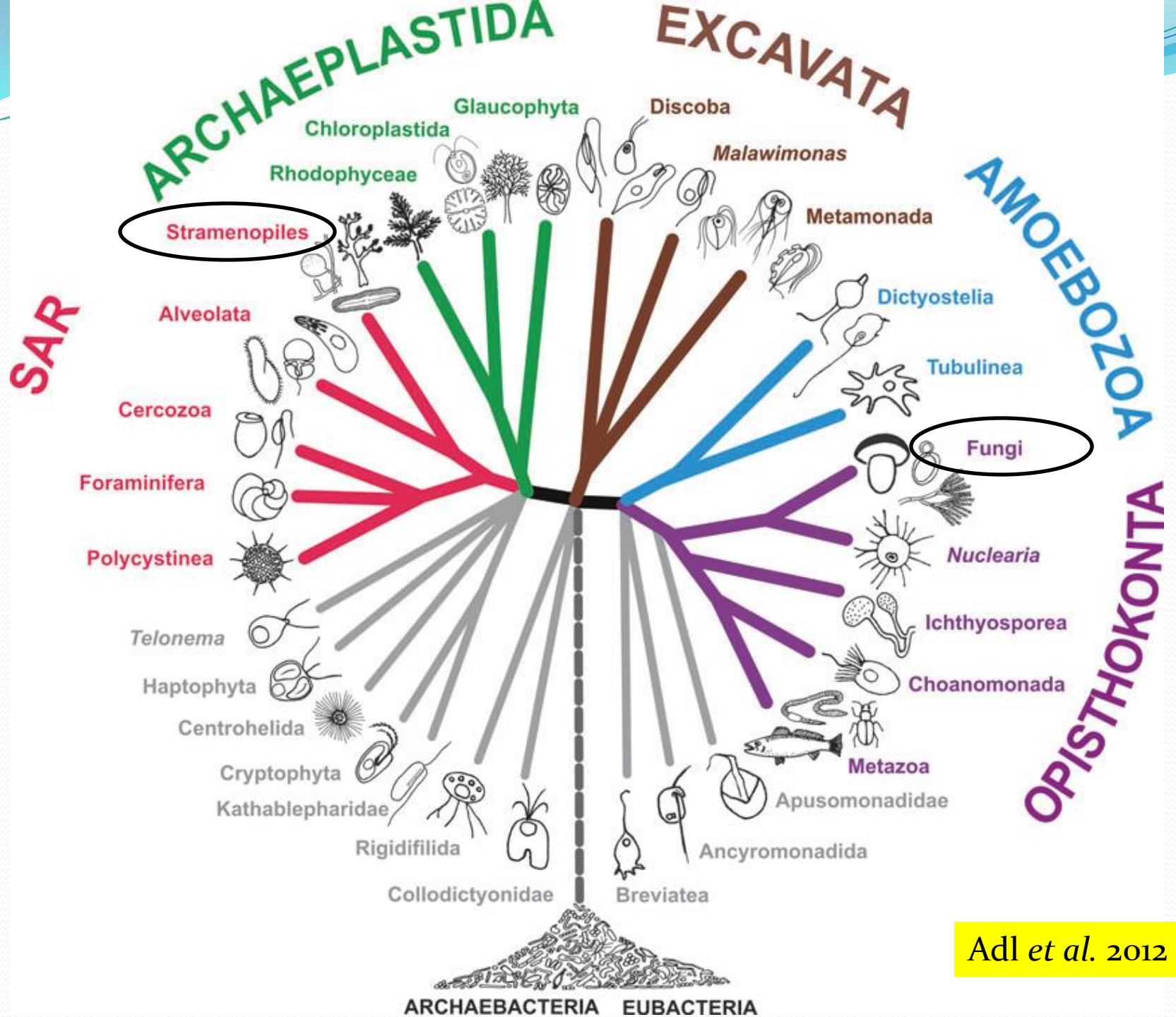
„POnTE project Workshop and MB Meeting“, Београд, 28.09.2016. године

1. Увод

Phytophthora врсте су гљивама слични организми у оквиру царства Chromista/Stramenopiles и “SAR” супер групе (Beakes *et al.* 2015);

Ови организми су способни да инфицирају различита биљна ткива и одговорни су за више девастирајућих епифитоција;

Један од главних разлога за њихову раширеност у свету је пораст међународне трговине и глобалне размене, као и уношење ових организама из расадника у природне екосистме, плантажае и паркове и то преко инфицирани живих биљака (корен, земља и ткива (Brasier and Jung 2006; Scott *et al.* 2013).



Adl et al. 2012

Карактеристике *Phytophthora* врста

- Мултициклична природа;
- Поседовање структура за преживљавање (полне и бесполне);
- Полно и бесполно размножавање;
- Хомоталусне, хетероталусне и стерилне;
- Код хомоталусних врста оогоније и ооспоре се формирају на истом талусу-мицелији;
- Хетероталусне врсте могу бити A1 или A2 компатибилног типа спаривања;
- Стерилне врсте опстају константним самообнављањем или у бесполним преживљавајућим структурама.

Животни циклус *Phytophthora* врста

6

Ribeiro O.K. 2013

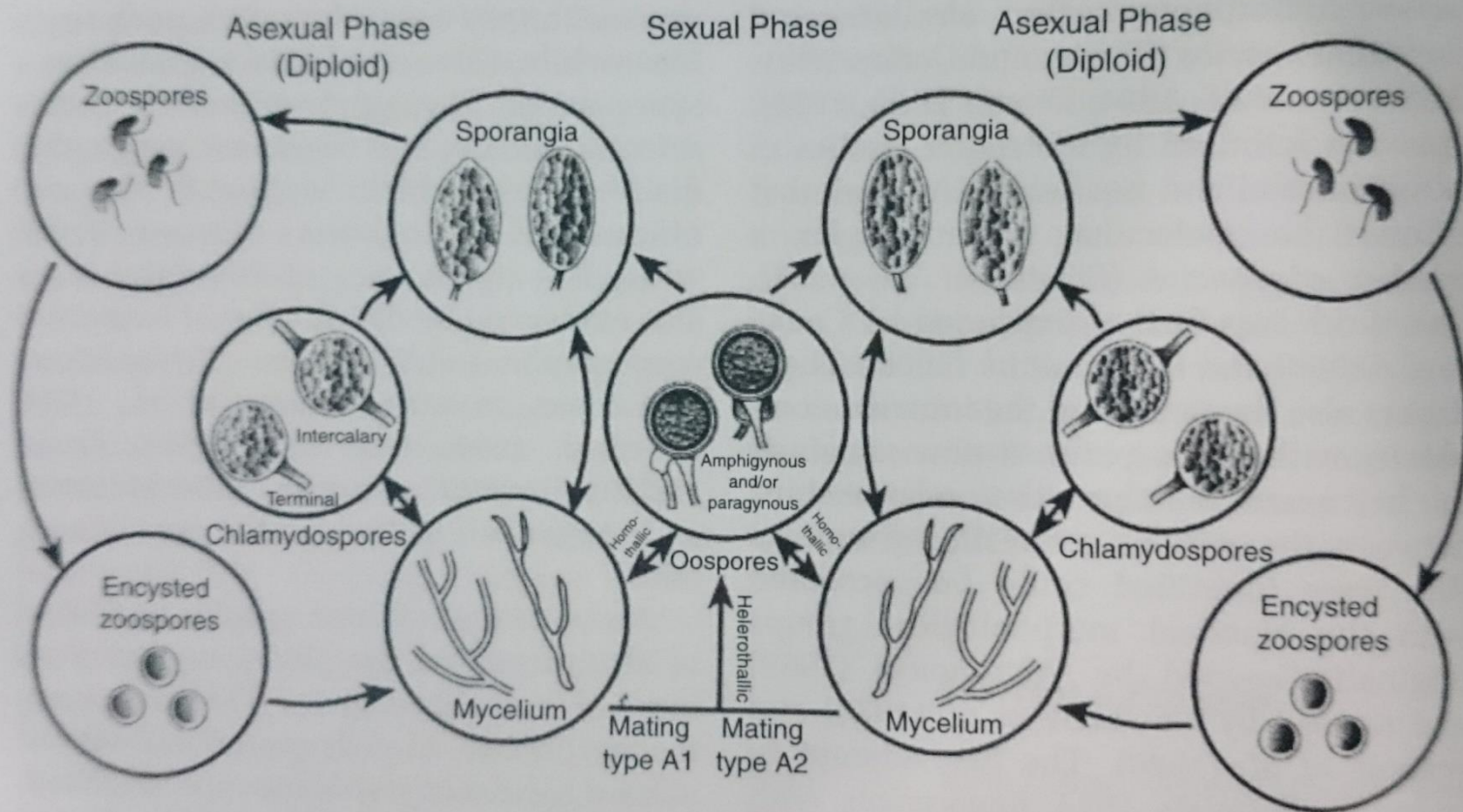


Fig. 1.1. Representative life cycle for *Phytophthora*.

- Шест морфолошких група (Waterhouse 1963; Stamps *et al.* 1990; Erwin and Ribeiro)
- Прелазак на “кладистички” систем таксономије;
- Десет индивидуалних група-“clade”-ова у оквиру овог рода (Cooke *et al.* 2000; Kroon *et al.* 2004; Blair *et al.* 2008);
- 11 индивидуалних група, потврђених секвенцирањем седам нуклеарних и четири митохондријална гена-једно од најобухватнијих мутилокус истраживања у биологији уопште (Martin *et al.* 2014)

Тренутна систематска позиција рода *Phytophthora*

- supergroup „SAR“
- kingdom *Chromista* (*Stramenopiles*)
- phylum *Oomycota*
- class *Peronosporomycetes* (предходно *Oomycetes*)
- subclass *Peronosporidae*
- ordo *Peronosporales*, *Albuginales*
- **familija *Peronosporaceae***

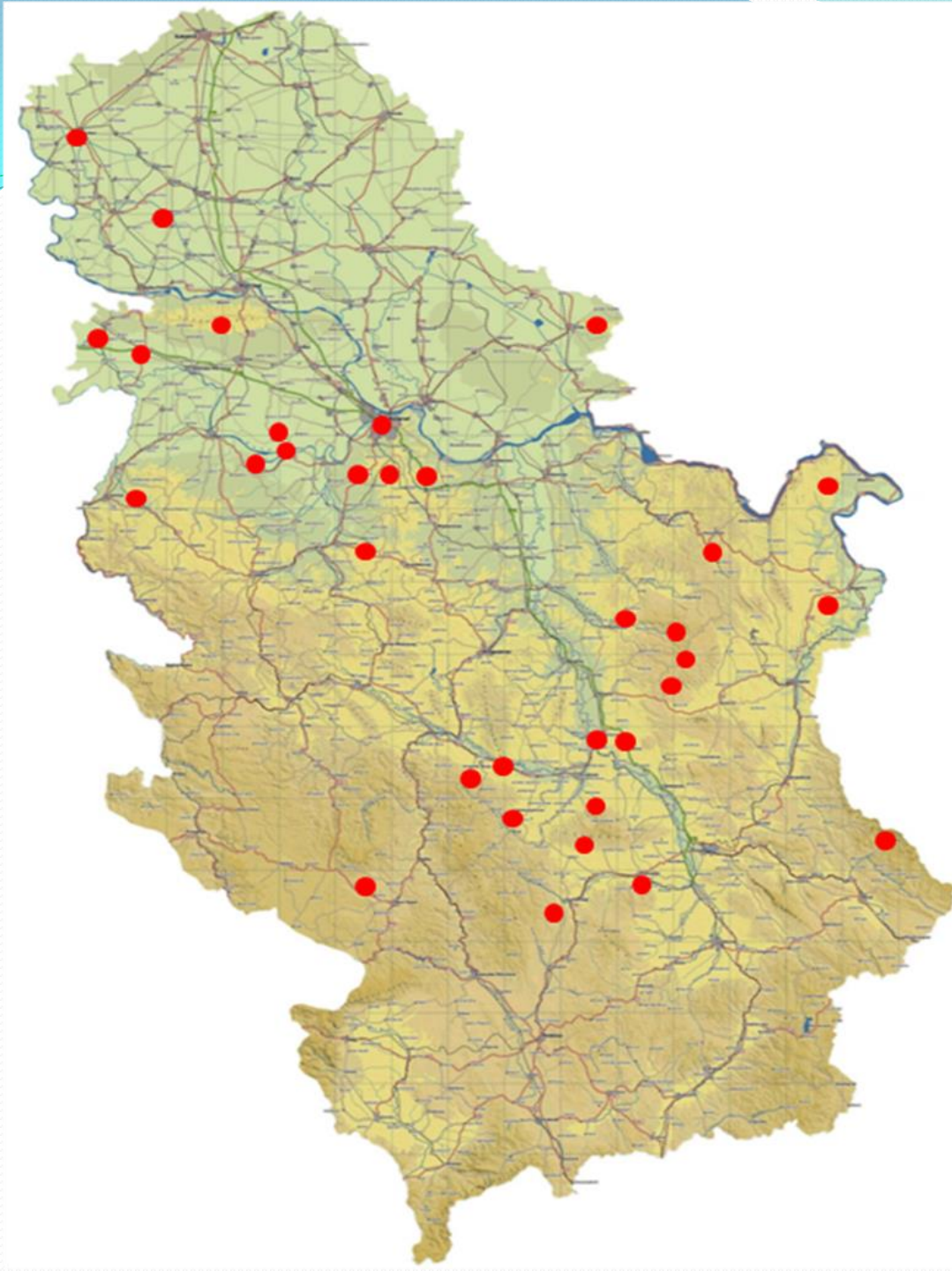
> пламењаче, *Phytophthora*, *Halophytophthora*, *Phytopythium*

11 примарних група- „clades“

- familija *Pythiaceae* са родом *Pythium*
- familija *Salisapiliaceae* са родом *Salisapilia*

Улога ових организама у пропадању различитих домаћина у Европи

- Пропадање храстова- oak decline;
- Пропадање букве- beech decline;
- Пропадање јасена- ash dieback;
- Пропадање јавора, јове, ораха, липе и других (diebacks of maple, alder, walnut, linden and other);
- Мало података о присуству и распрострањењу врста из рода *Phytophthora* у Србији.



Истраживани локалитети

33 случајно изабрана локалитета
са забележеним симптомима

Сакупљање узорака и изолација

- Сакупљање узорака и изолација су спроведени помоћу методологије Jung *et al.* (1996), Jung (2009);
- Узорци некротичних ткива су узимани са прелаза здравих у некротичне делове и директно постављани на PARPNH агар подлогу;
- Изолација из земље је спроведена помоћу методе мамака;
- Некротичне пеге на мамцима су такође постављане директно на селективну PARPNH подлогу;
- Узоркована су и симптоматична и здрава стабла.







Поплављена земља

Прећишћена површина воде

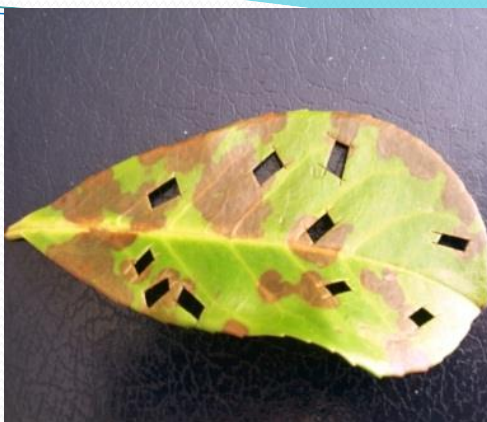




Мамци







Постављање некротичних
делова на селективну
подлогу-PARPNH



P. plurivora- чиста
култура на MEA

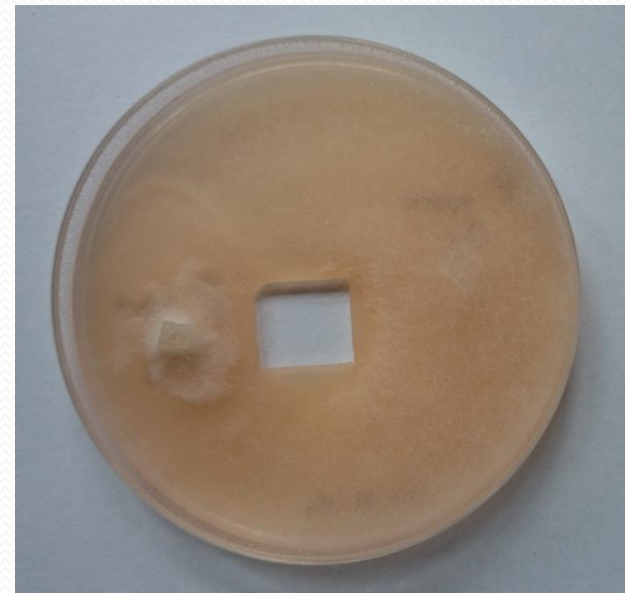
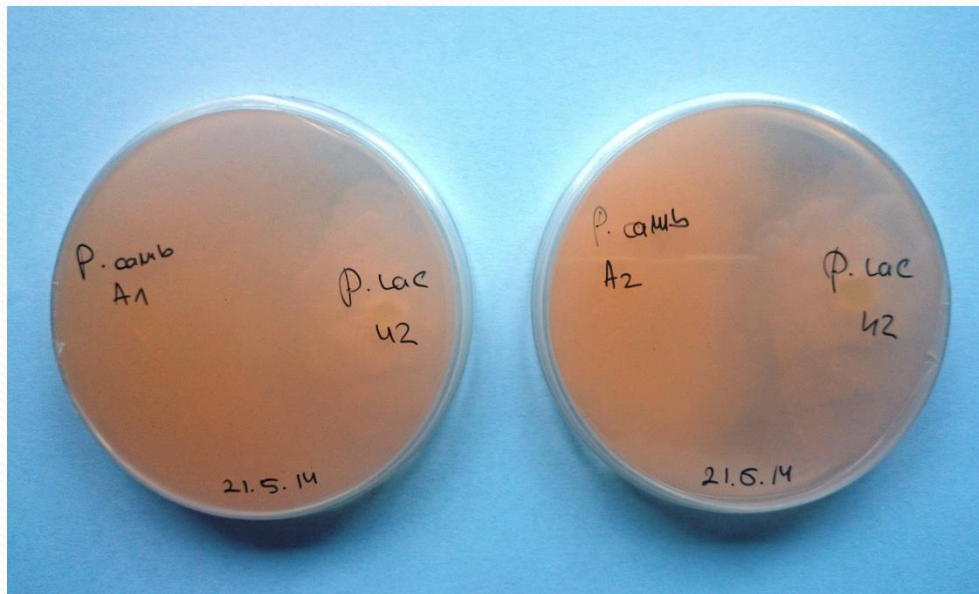
Морфолошка идентификација

- Анализе изгледа колонија на различитим подлогама
 - Пет различитих подлога (MEA, CA, PDA, V8, PJA);
 - Инкубација на 20°C у мраку;
 - Одређивање изгледа колонија после 7, 10 и 20 дана.



Морфолошка идентификација

- Тестови спаривања за стерилне и хетероталусне врсте



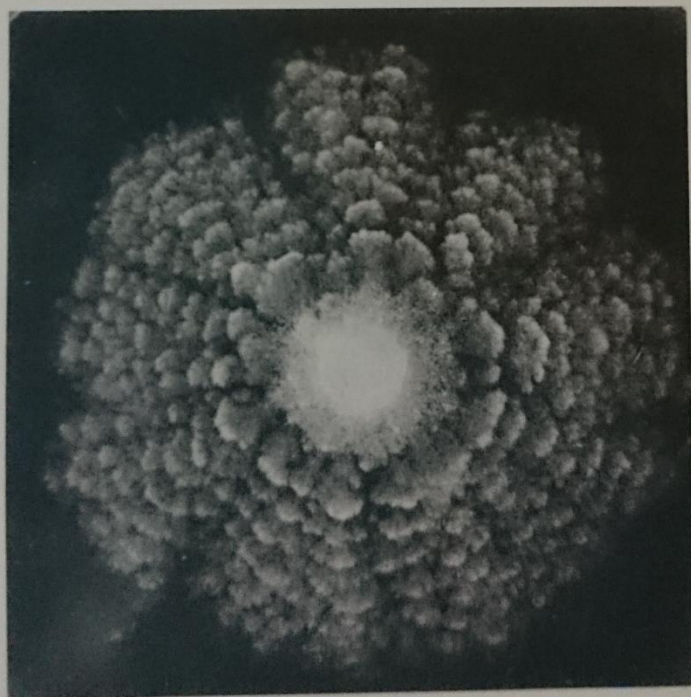


Issued 20th August 1990

Mycological Papers, No. 162

REVISED TABULAR KEY TO THE SPECIES OF PHYTOPHTHORA

D.J. STAMPS, G.M. WATERHOUSE,
F.J. NEWHOOK AND G.S. HALL



CAB INTERNATIONAL MYCOLOGICAL INSTITUTE

Phytophthora
Diseases Worldwide



Donald G. Stamps
and
Gustavo S. Hall

идентификациј

идентификова

им кључевима

and Ribeiro 1996, и

ма у којима су

Молекуларна идентификација

- Екстракција ДНК;
- PCR amplification (ITS4 и ITS6 прајмери) (White *et al.* 1990; Cooke *et al.* 2000);
- Секвенцирање ITS региона за већину изолата, као и COX I и *B-tubulin* за одабране репрезентативне изолате (Martin *et al.* 2014).

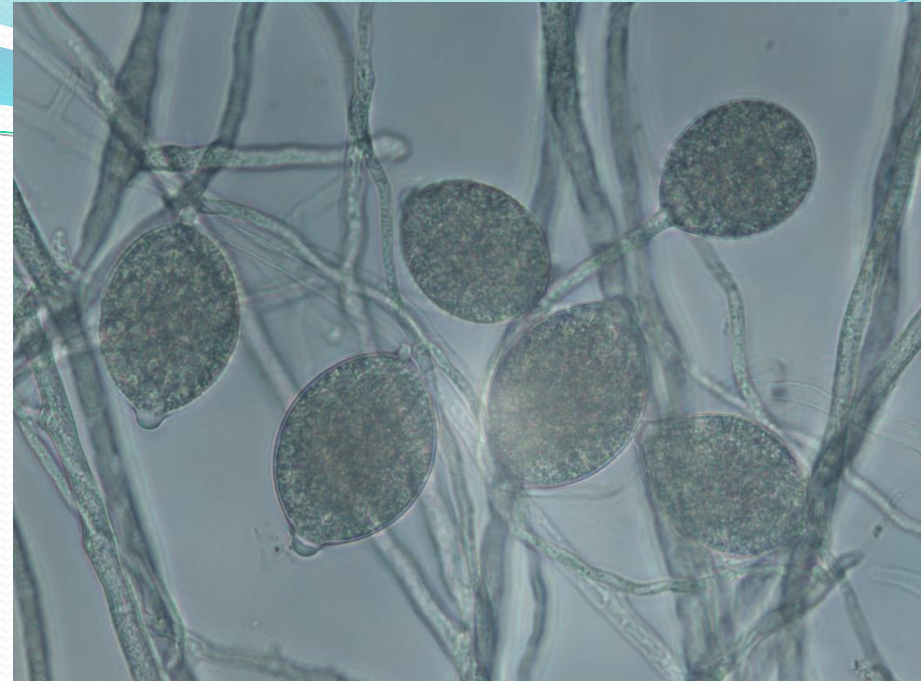
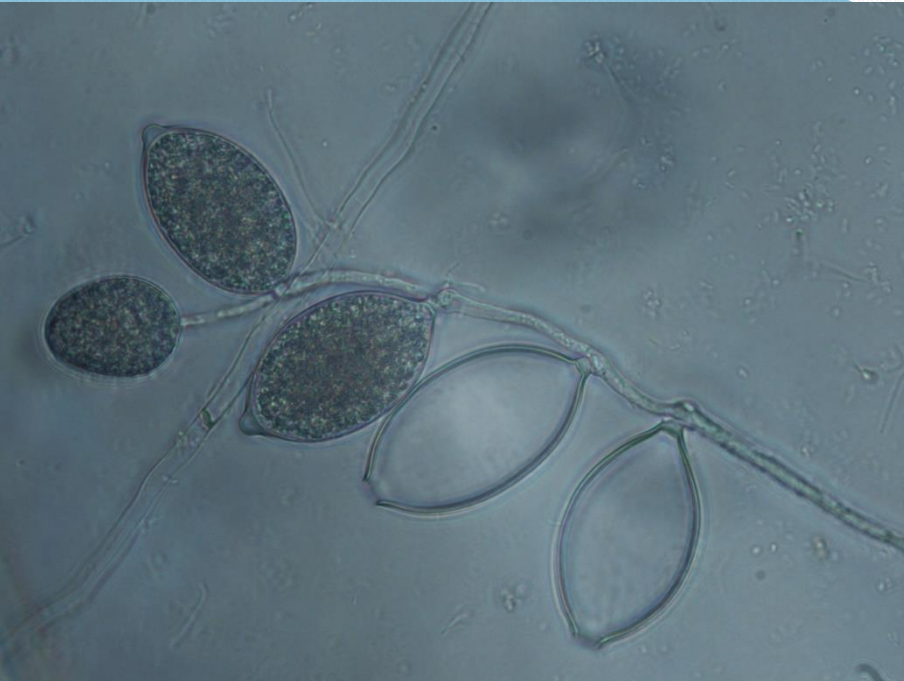
Резултати

- 30 од 33 истраживана локалитета су била позитивна на присуство *Phytophthora* врста;
- Од 109 узоркованих шумских састојина *Phytophthora* врсте су изоловане из 81, односно 65 симптоматичних и 16 асимптоматичних састојина;
- 432 узорка су сакупљена од чега је 240 било позитивно после изведених тестова изолације.

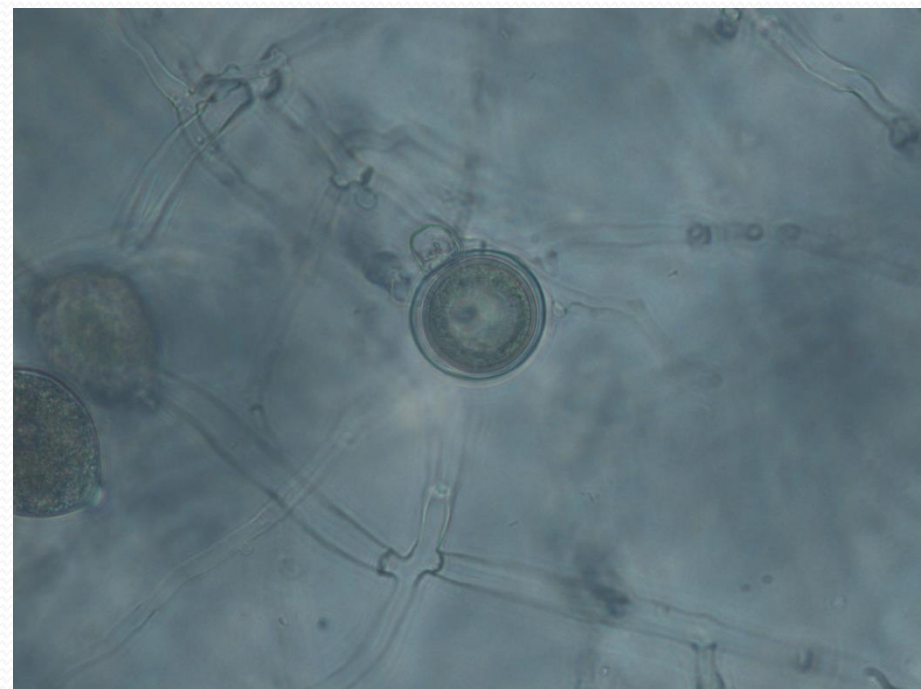
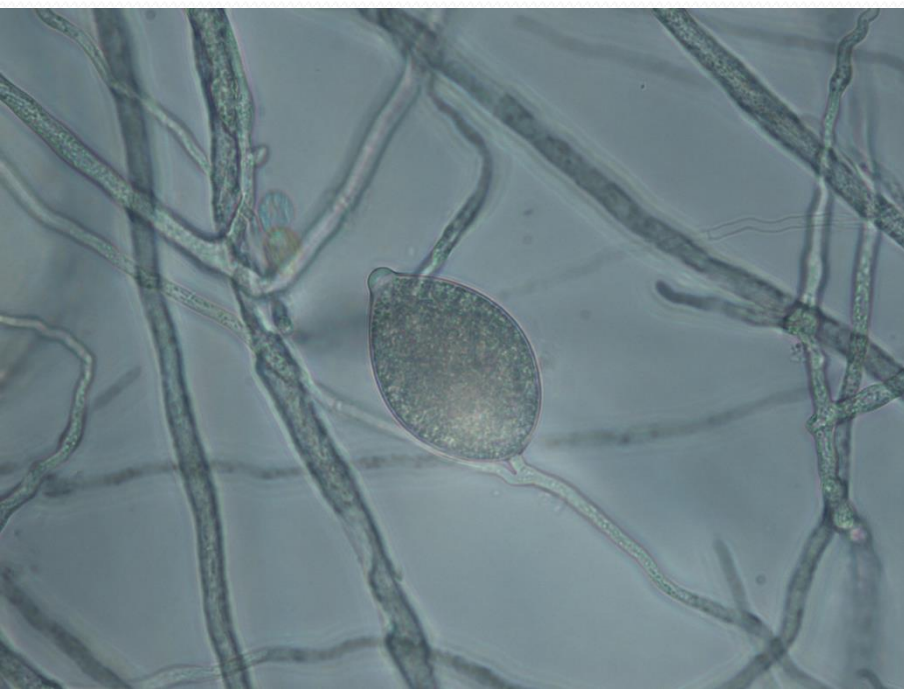
- Укупно је изоловано 14 различитих врста са различитих домаћина у Србији;
- Десет врста су први пут констатоване на територији Србије, а од раније постоје налази за *P. plurivora*, *P. cactorum*, *P. quercina* и *P. cambivora*.

Изоловане врсте у Србији према морфолошким и филогенетским групама

Бр.	Врста	Аутор, година	WH Група ¹ WH group ¹	ITS Clade ²	Број добијених изолата у Србији	Број секвенци у банци гена (GenBank)	Први налаз у Србији	Први налаз на новим домаћинима у свету
1	<i>P. cactorum</i>	(Leb.and Cohn) Schröeter, 1896	I	1	22	4	-	-
2	<i>P. cambivora</i>	(Petri) Buisman, 1927	VI	7	8	2	-	-
3	<i>P. citrophthora</i>	(R.E. Smith and E.H. Smith) Leonian, 1925	II	2	2	0	+	-
4	<i>P. cryptogea</i>	Pethybridge and Lafferty, 1919	VI	8	4	3	+	-
5	<i>P. europaea</i>	Hansen and Jung, 2002	V	7	3	2	+	-
6	<i>P. gonapodyides</i>	(H.E. Petersen) Buisman, 1927	V/VI	6	19	3	+	-
7	<i>P. lacustris</i>	Nechwatal <i>et al.</i> , 2012	V/VI	6	32	15	+	
8	<i>P. pini</i>	Leonian ³ , 1925	III	2	12	7	+	+
9	<i>P. plurivora</i>	Jung and Burgess, 2009	III	2	165	106	-	-
10	<i>P. polonica</i>	Belbahri <i>et al.</i> , 2006	V	9	16	6	+	+
11	<i>P. quercina</i>	Jung, 1999	I	11 ⁵	19	2	-	-
12	<i>P. syringae</i>	(Klebahn) Klebahn, 1905	III	8	3	0	+	-
13	<i>P. taxon</i> 'Pg Chlamydo'	Brasier <i>et al.</i> , 2003	V/VI	6	2	0	+	-
14	<i>P. × serendipita</i>	Man in't Veld ⁴ <i>et al.</i> , 2012	I	1	5	6	+	+
Σ	15				313	157		



P. castorum- Спoрангије и oогонија са oоспoром



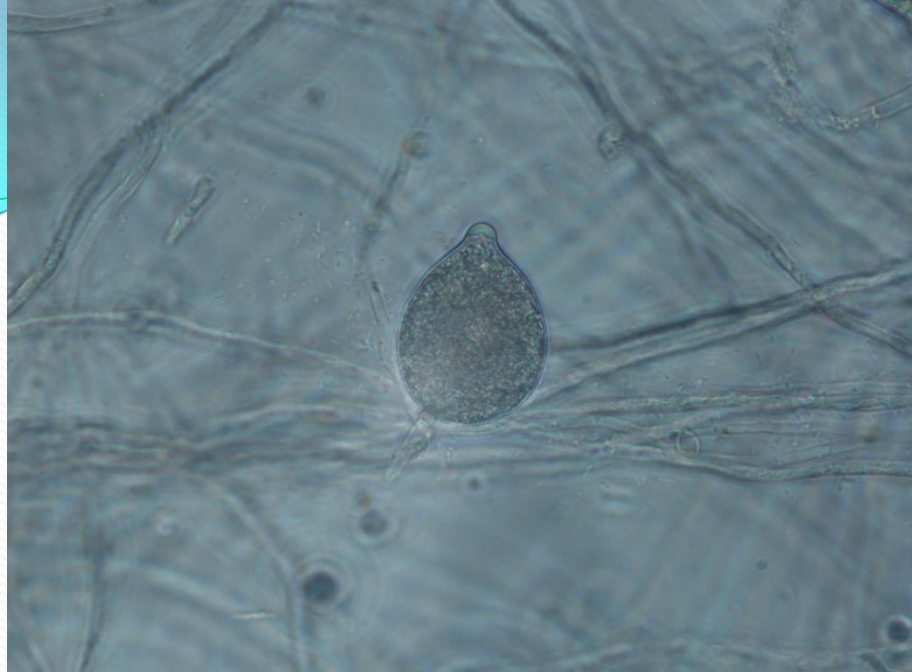
P. cactorum- оогонија и антеридија



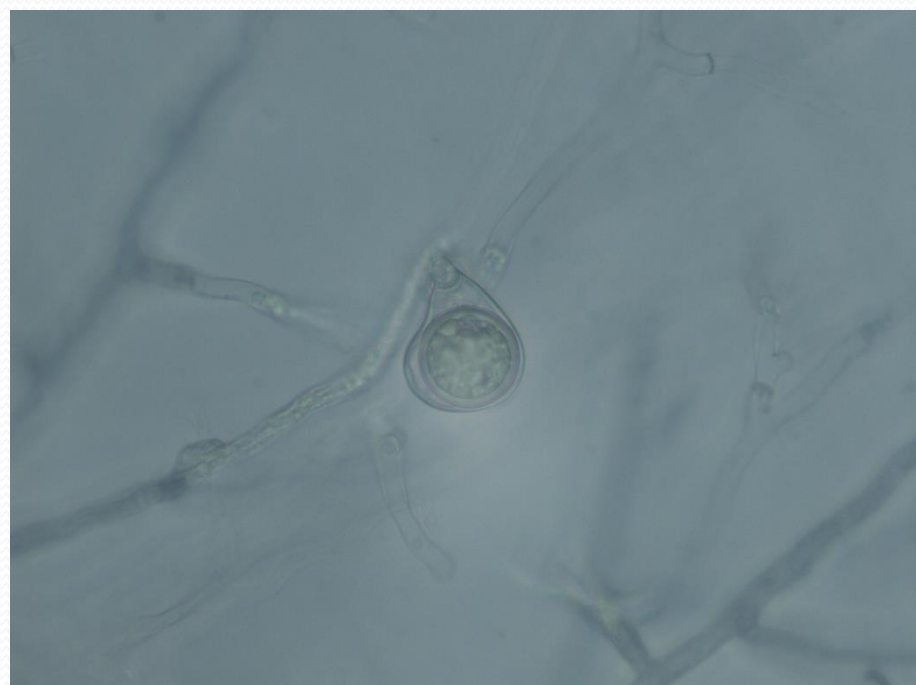
P. castorum- Спорангија са брадавичастим врхом
(papillate sporangia)



□ □ □ □ □ □ □ □ □ □ □ □ □ □
20um

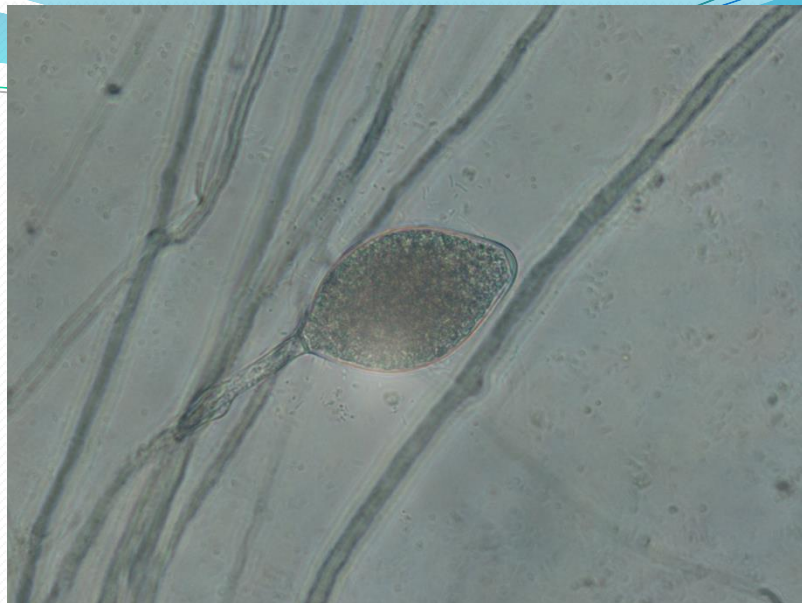


P. quercina- Спорангије са брадавичастим врхом и антеридије, оогоније са ооспорама





P. plurivora- маса спорангија



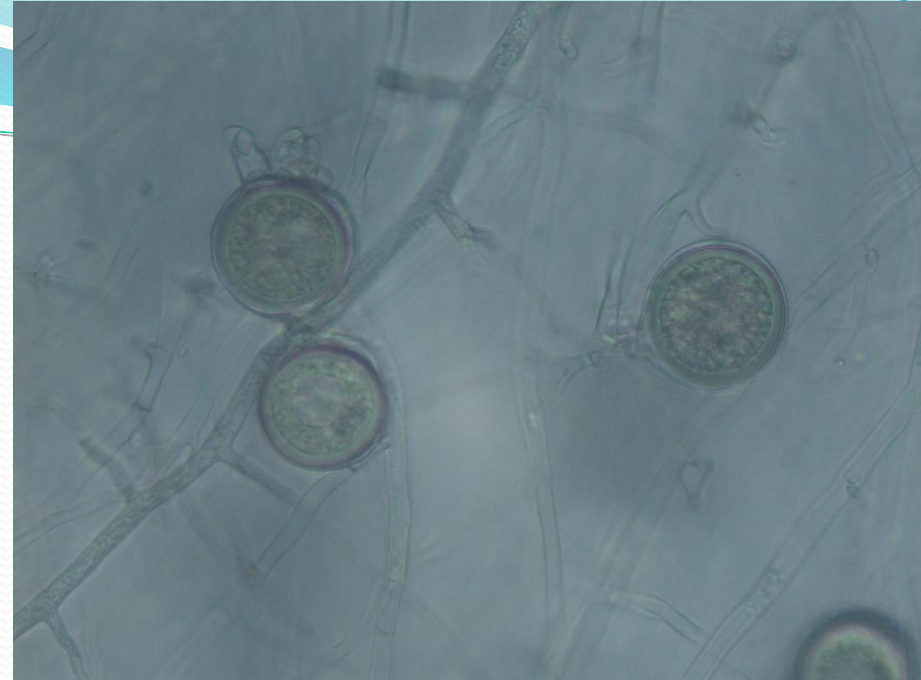
P. plurivora- полубрадавичаста спорангија



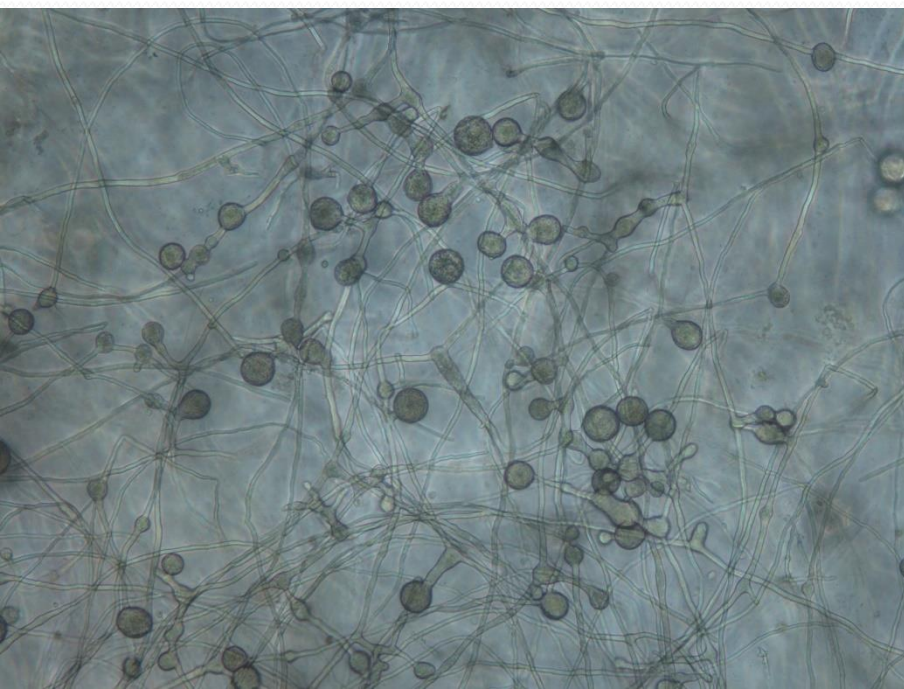
P. plurivora- спорангија са три врха

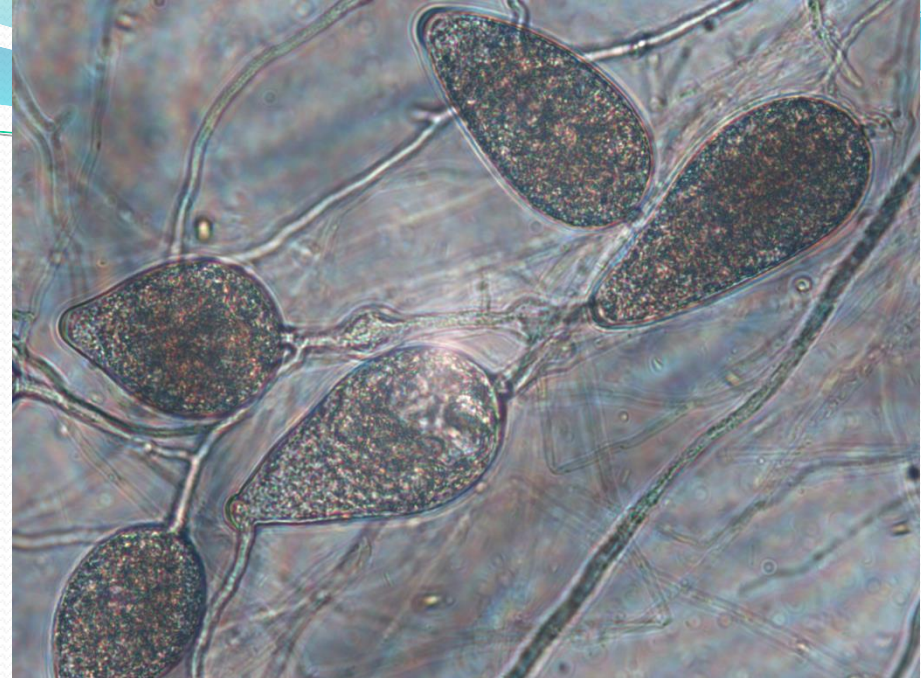
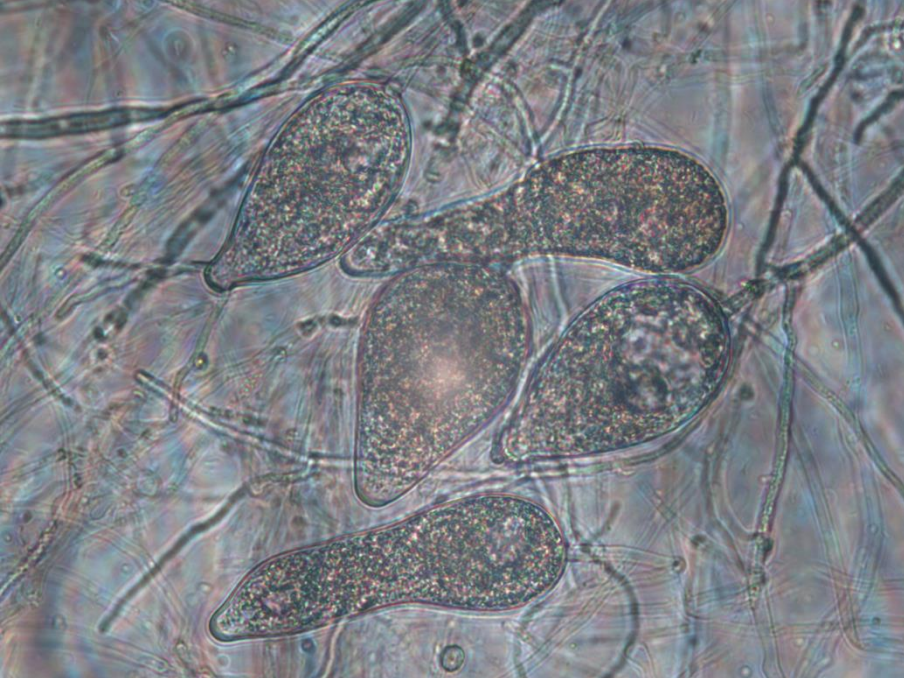


P. plurivora- оогонија и ооспора

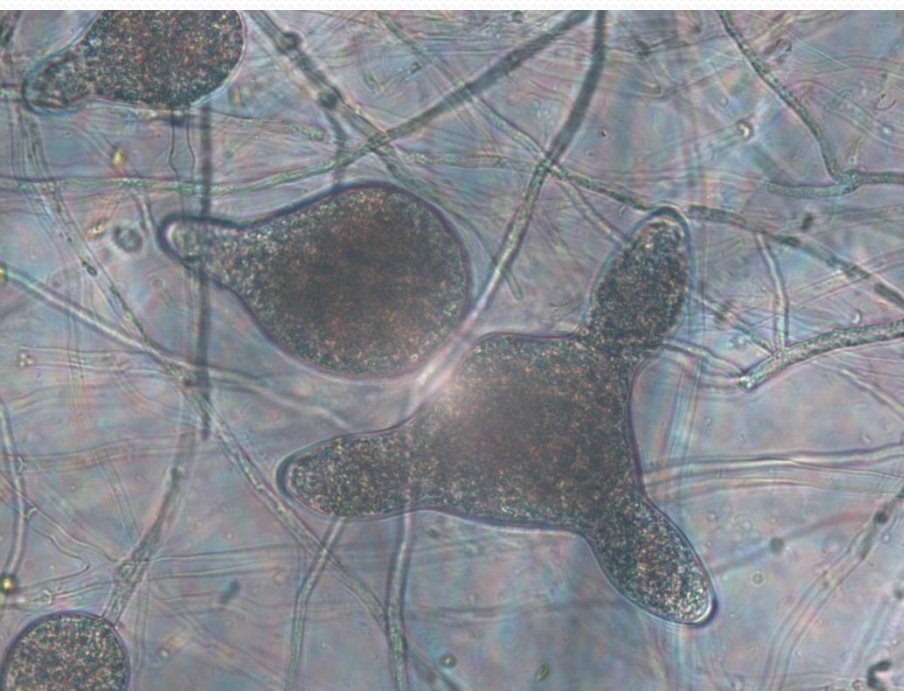


P. polonica- спорангије, оогоније, украси хифа и хламидоспоре





P. pin- спорангије и оогонија са антеријом и ооспором



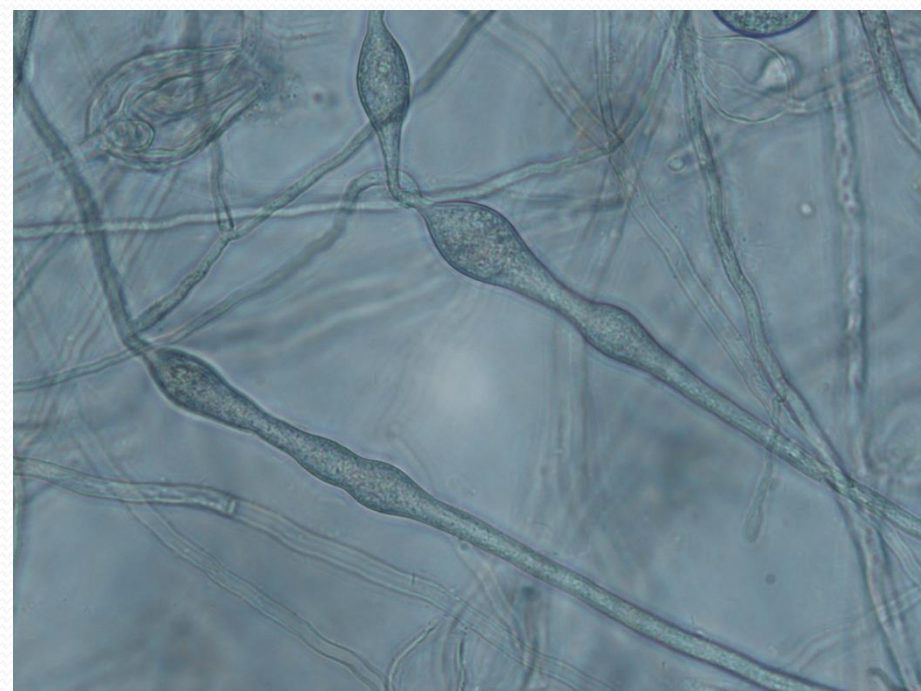


P. citrophthora- Спорангије са брадавичастим врхом





P. lacustris- спорангије и преображаји хифа и спорангија





P. gonapodyides- Спорангије
са различитим варијантама развоја



P. europaе- спорангија



P. europaе- спорангија



P. europaе- спорангија



P. europaе- празне спорангије



P. europaе- угњеждење спорангија



P. europaе- унутрашње клијање



P. europaе- хифе



P. europaе- антеридија,
оогонија и ооспора



P. europaе- оогоније и зреле ооспоре



P. taxon 'pg chlamydo'- спорангија



P. taxon 'pg chlamydo'- спорангија



P. taxon 'pg chlamydo'- спорангија



P. taxon 'pg chlamydo'-
младе спорангије и изглед празне

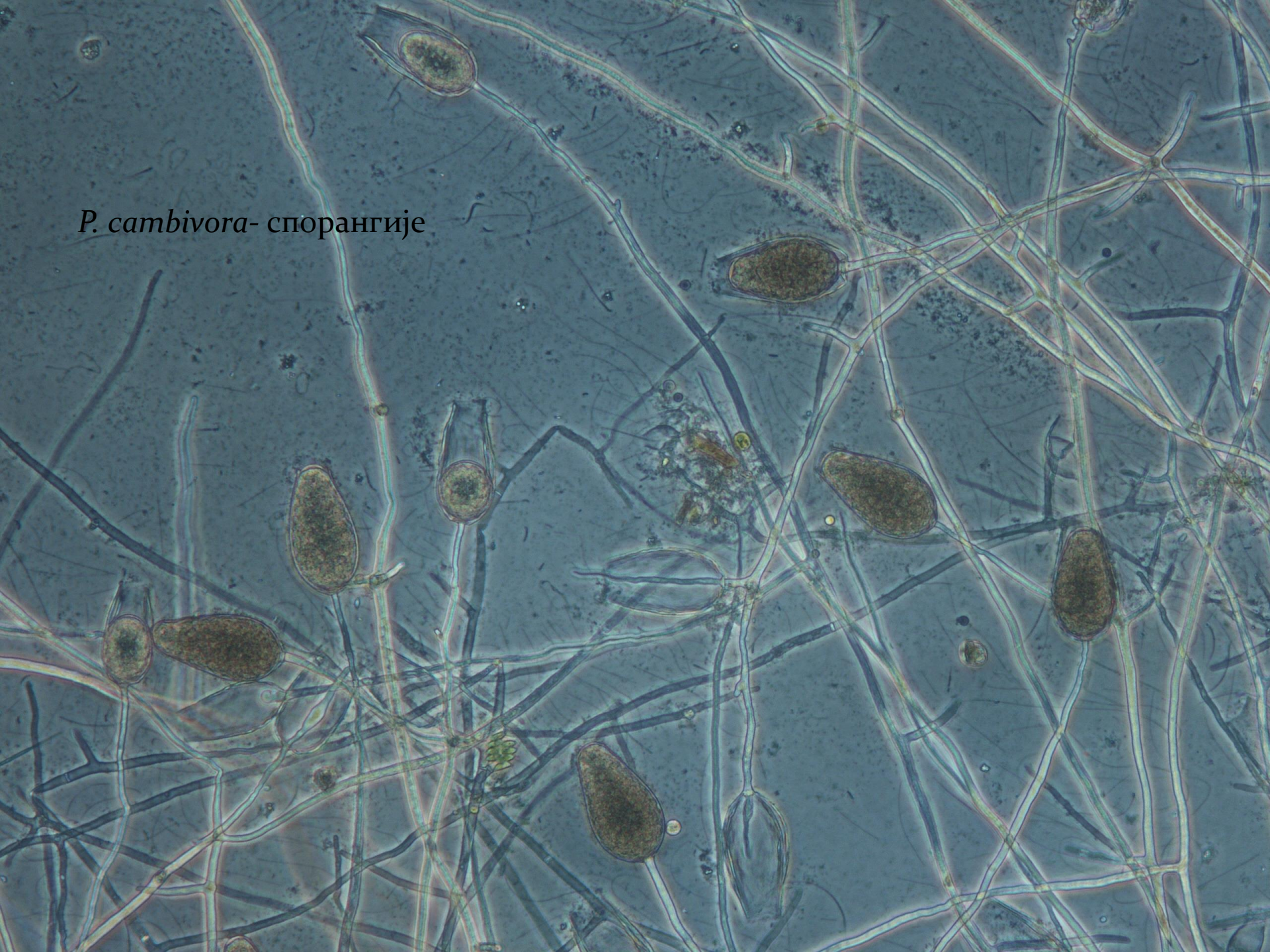


P. taxon 'pg chlamydo'- празна спорангија



P. taxon 'pg chlamydo'-
украси хифа и хламидоспоре*

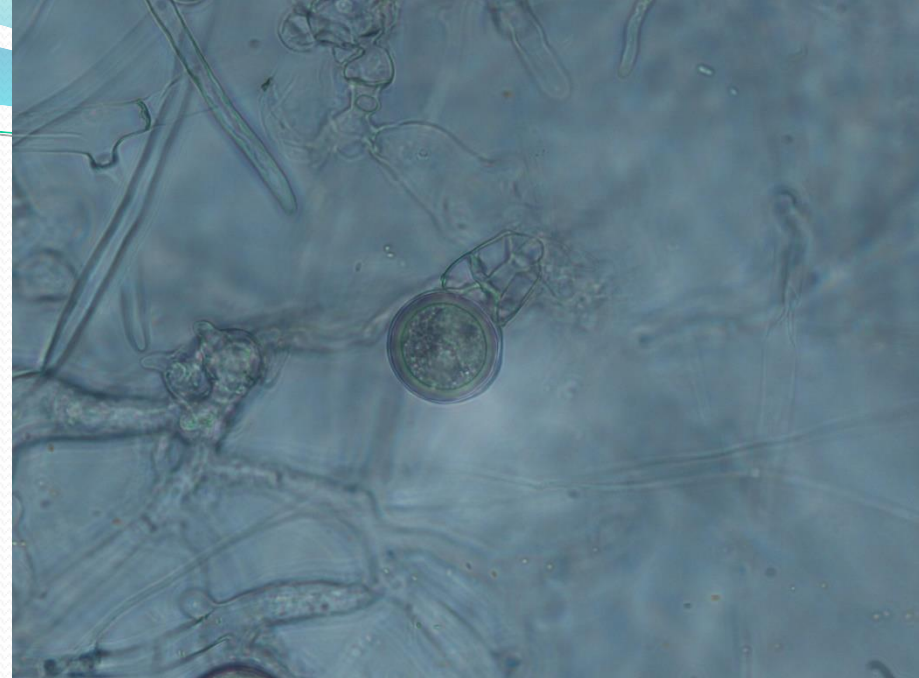
P. cambivora- спорангије



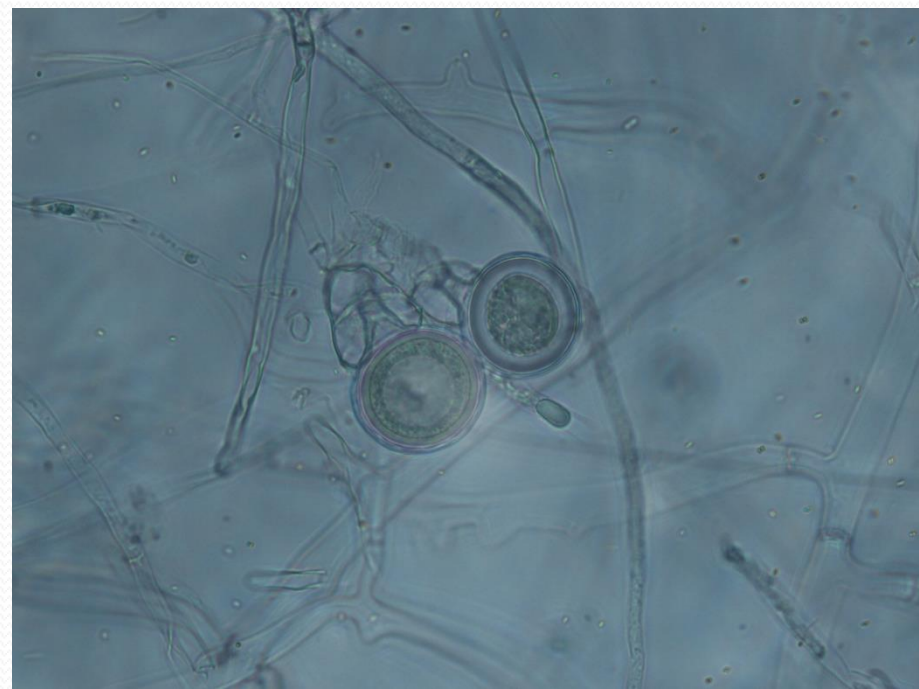


P. cambivora- спорангије



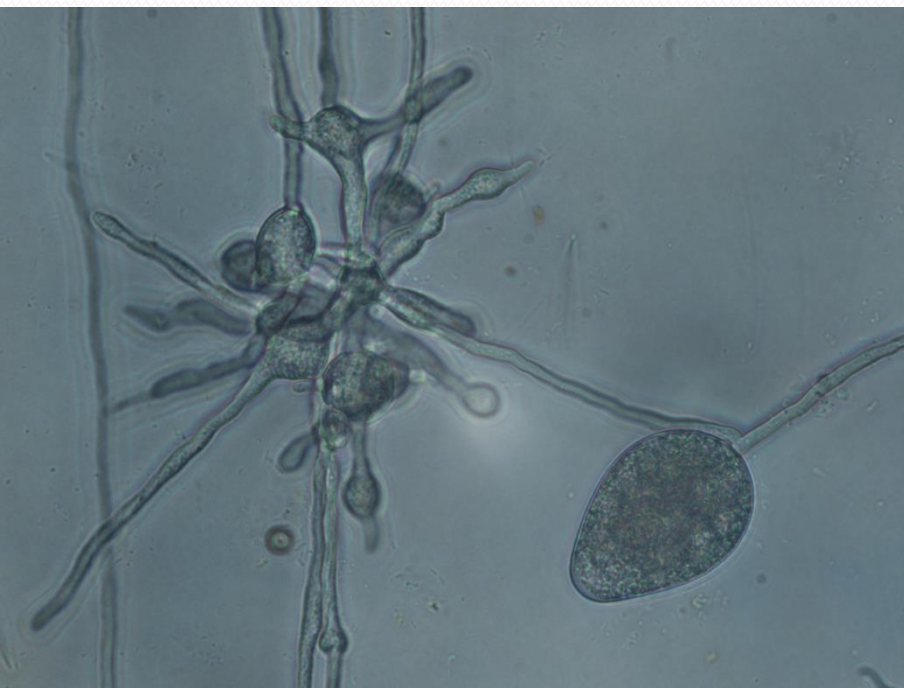


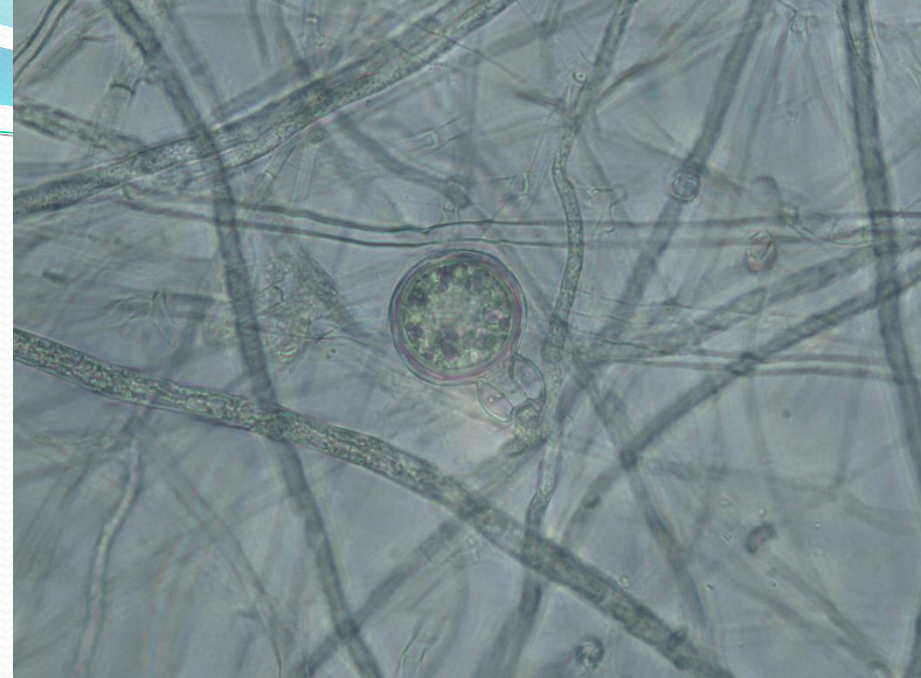
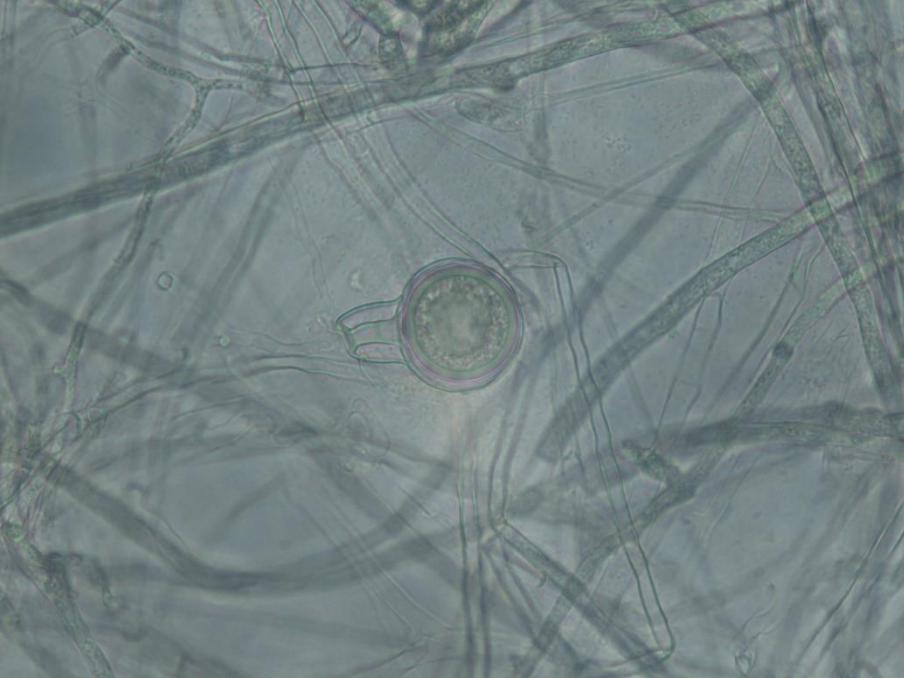
P. cambivora- оогоније са украсима на зидовима и двоћелијске антеридије



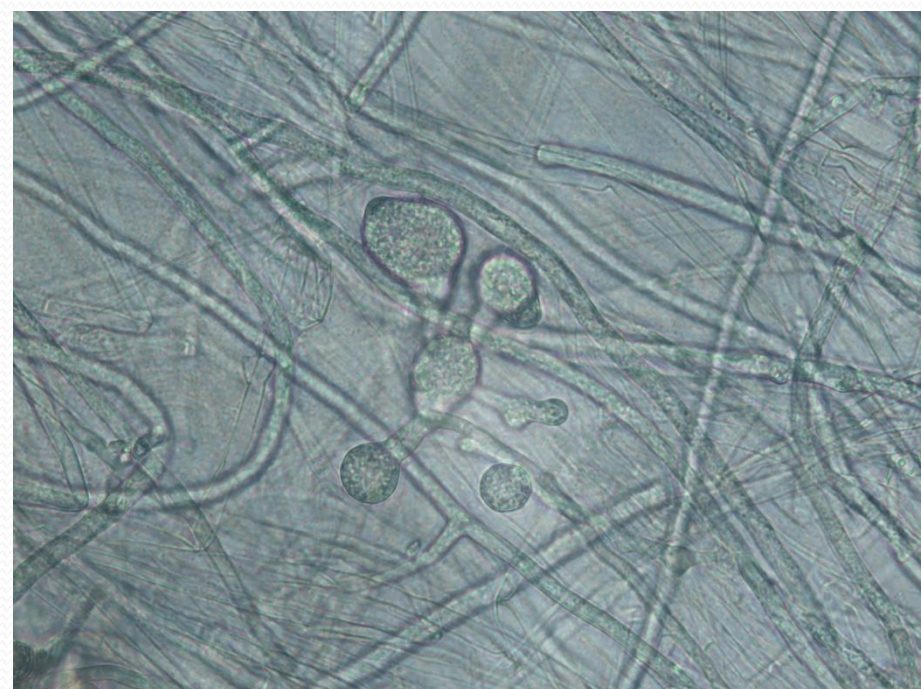
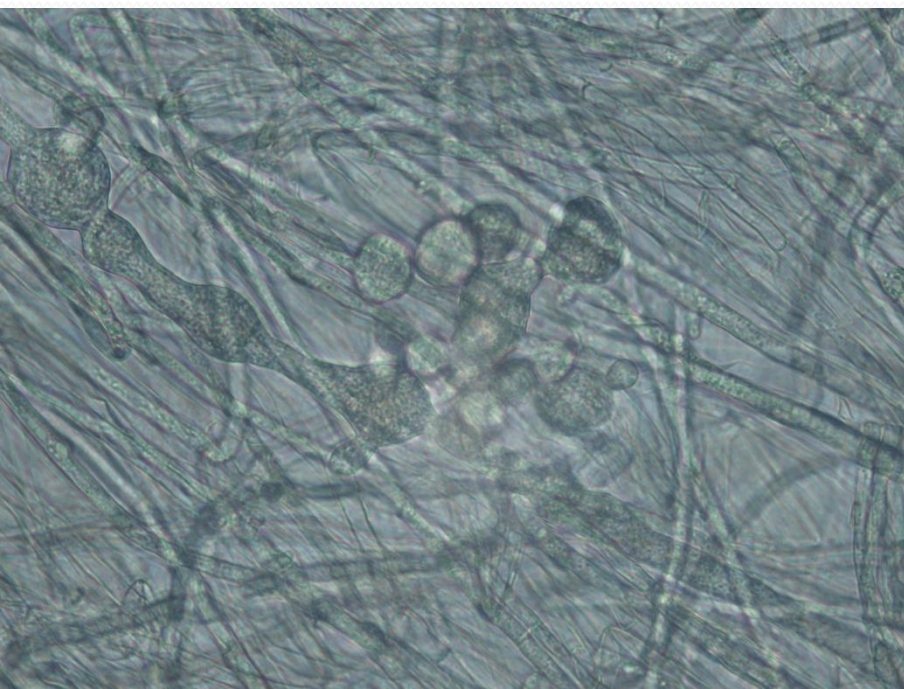


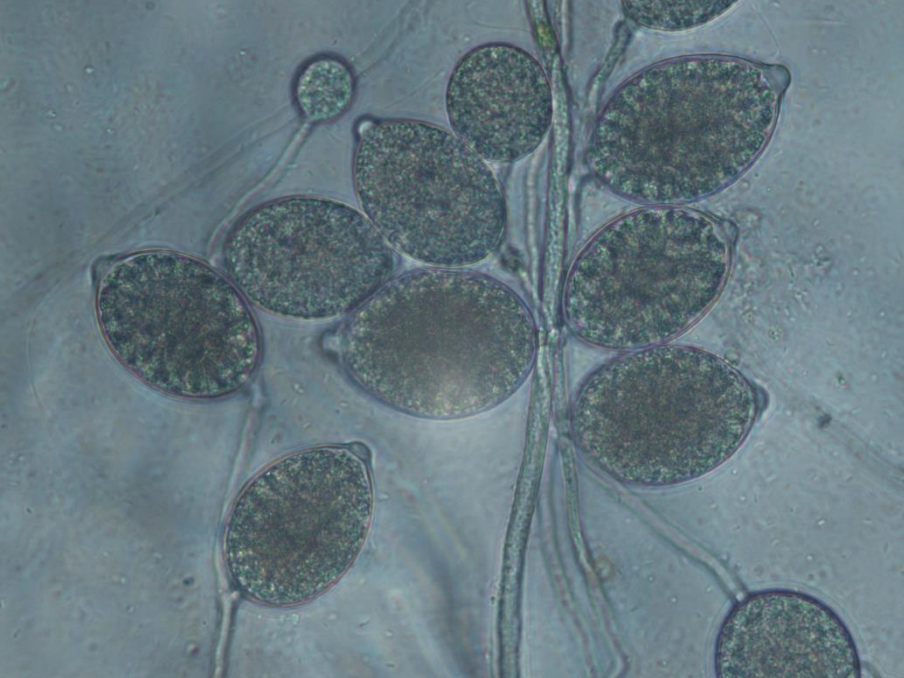
P. cryptogea- спорангије и груписани украси хифа



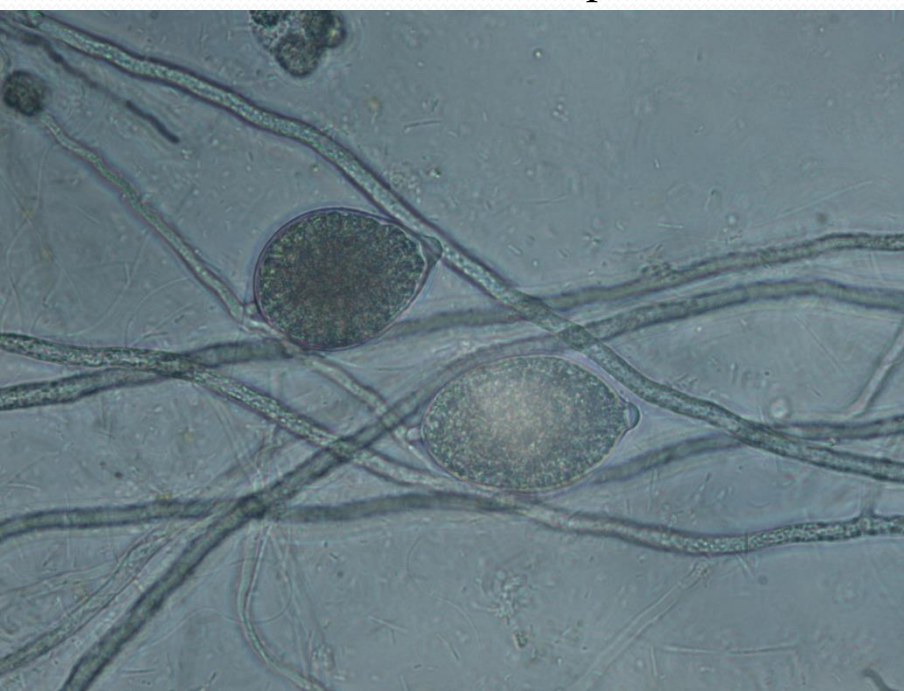


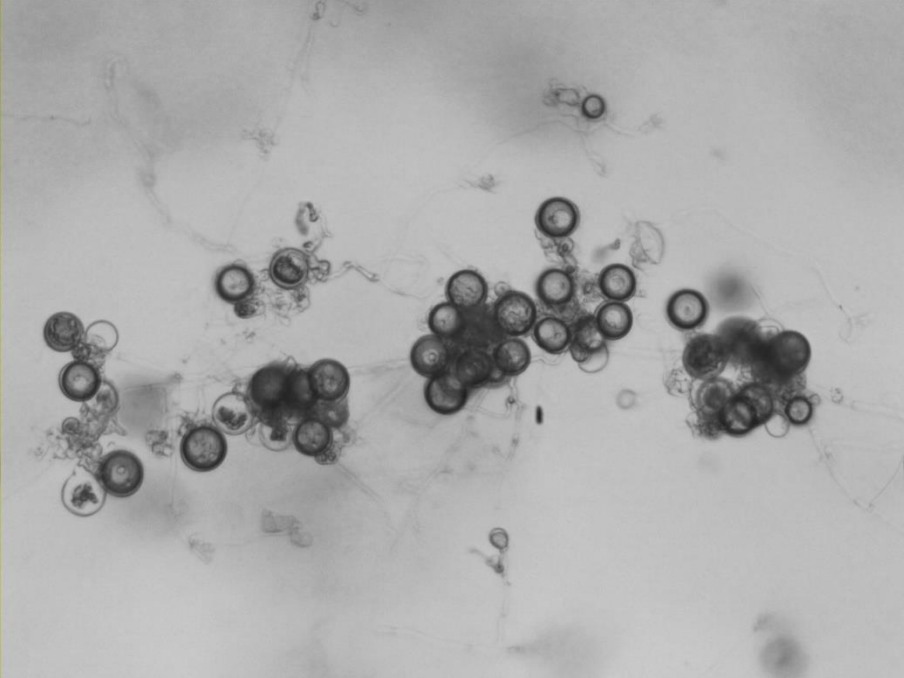
P. cryptogea- антеридије, оогоније са ооспорама и украси хифа





P. xserendipita (*P. hedraiandra* x *sacorum*)- спорангије





P. xserendipita (*P. hedraiandra* x *sactorum*)- виталне и стерилне оогоније





P. cactorum

P. cambivora

P. citricola

P. citrophthora

P. cryptogea

P. europaea

P. gonapodyides

MEA

PDA

CA

PJA

V8A



MEA

PDA

CA

PJA

V8A

P. lacustris

P. pini

P. plurivora

P. polonica

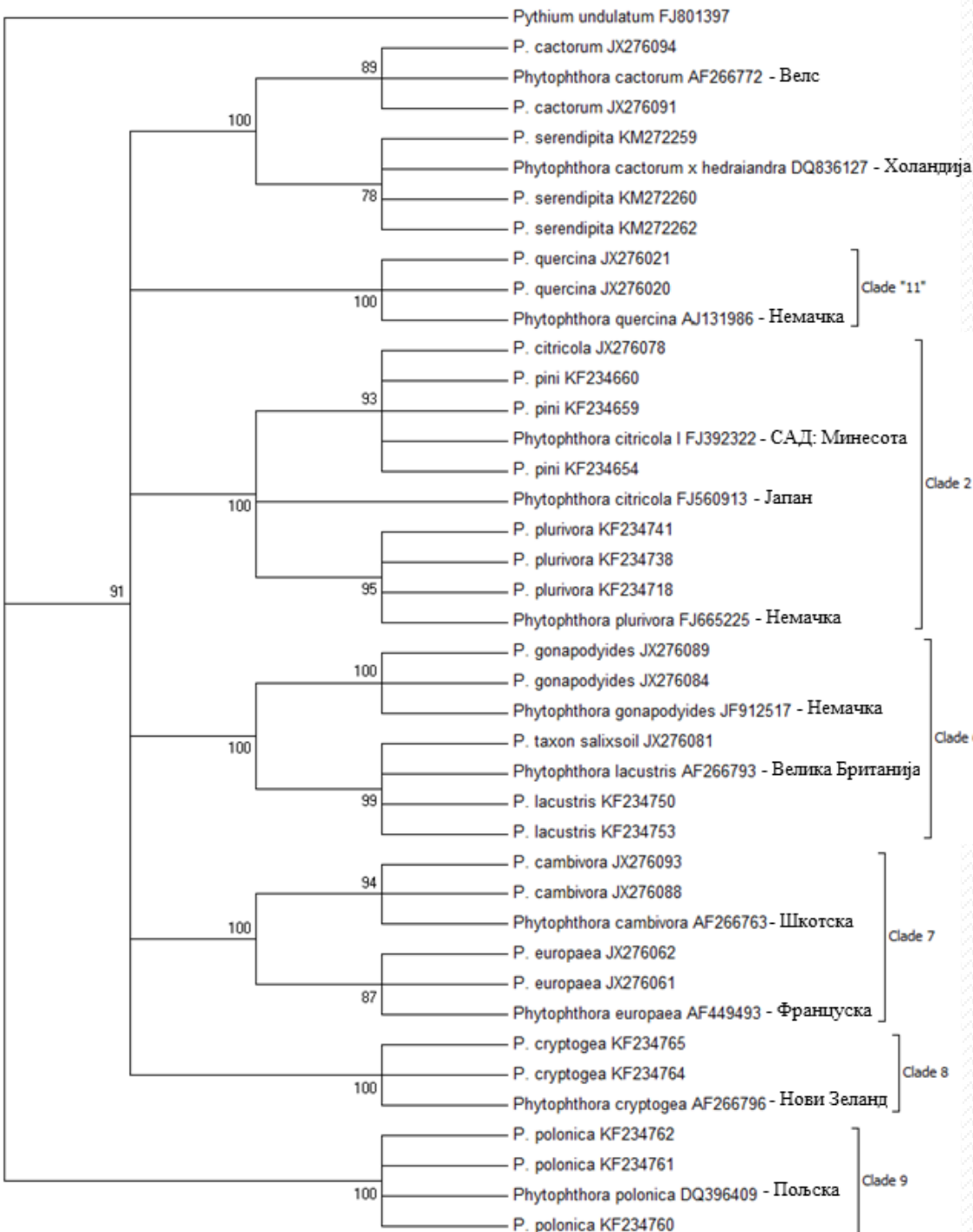
P. quercina

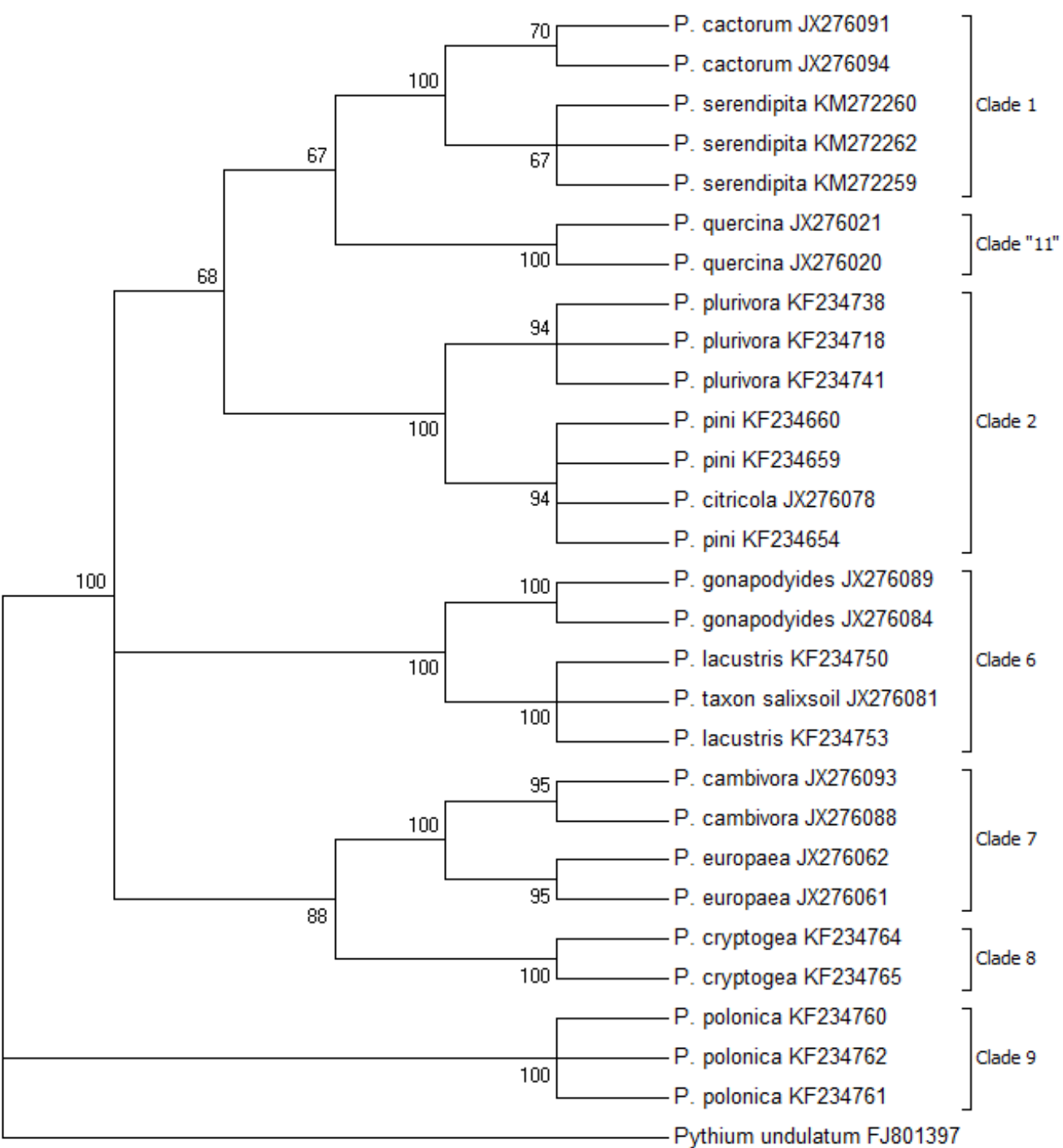
P. taxon PG 'Chlamydo'

P. xserendipita

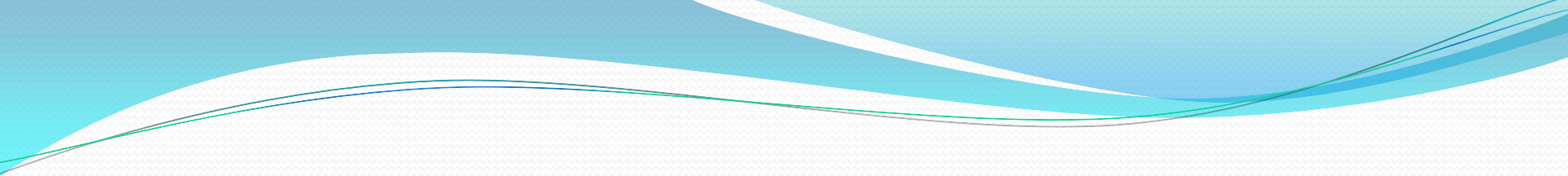
Филогенетске анализе

Maximum parsimony



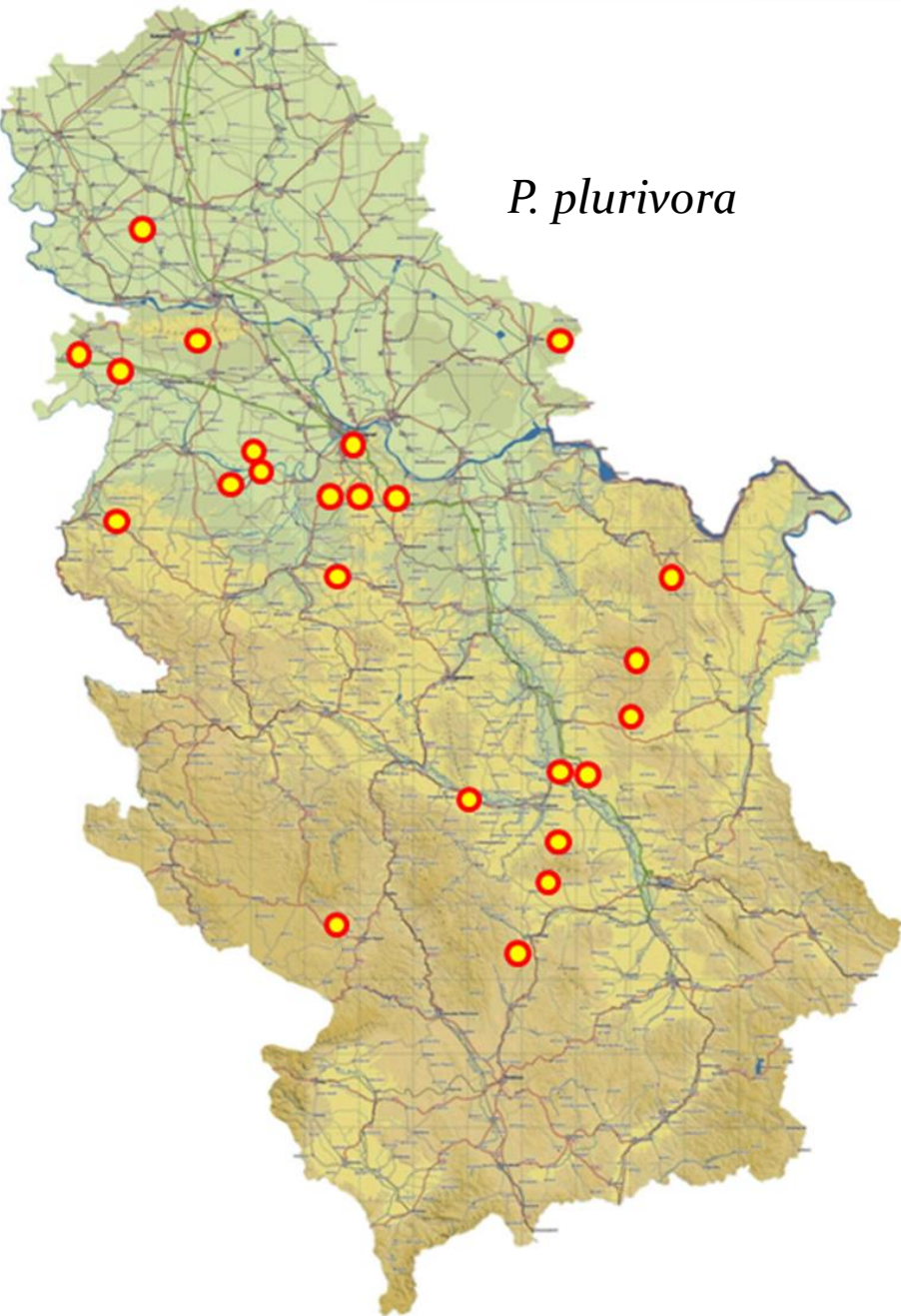


UPGMA

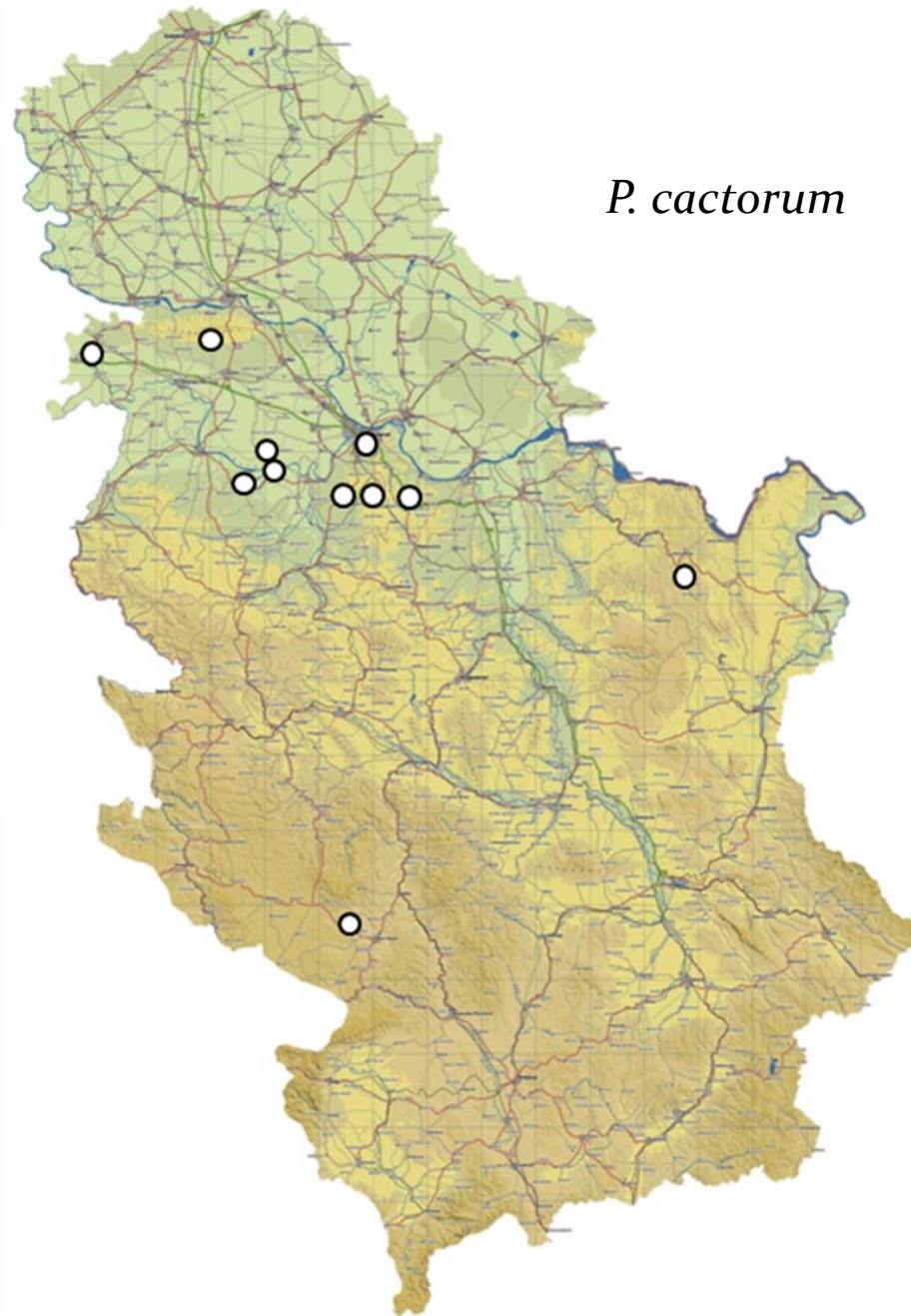


Распрострањење *Phytophthora* врста у Србији

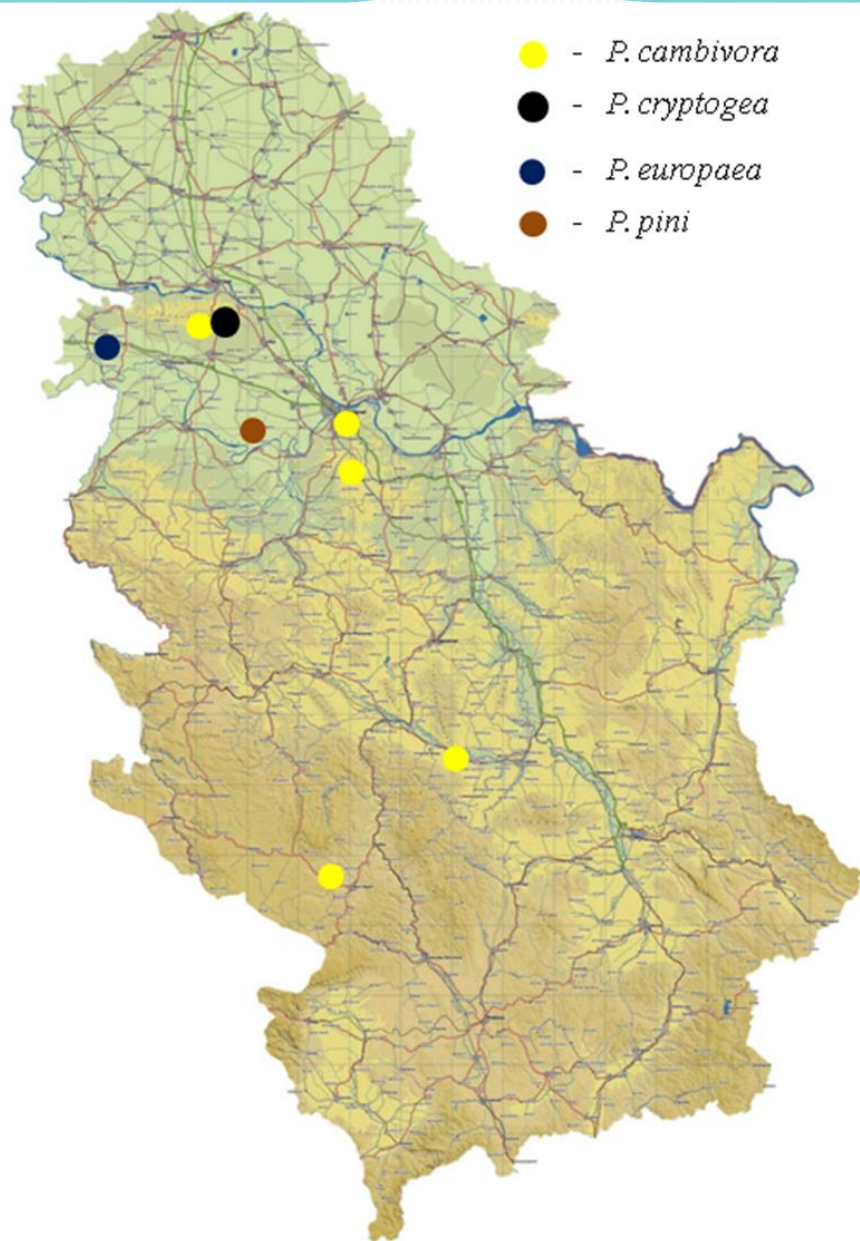
P. plurivora



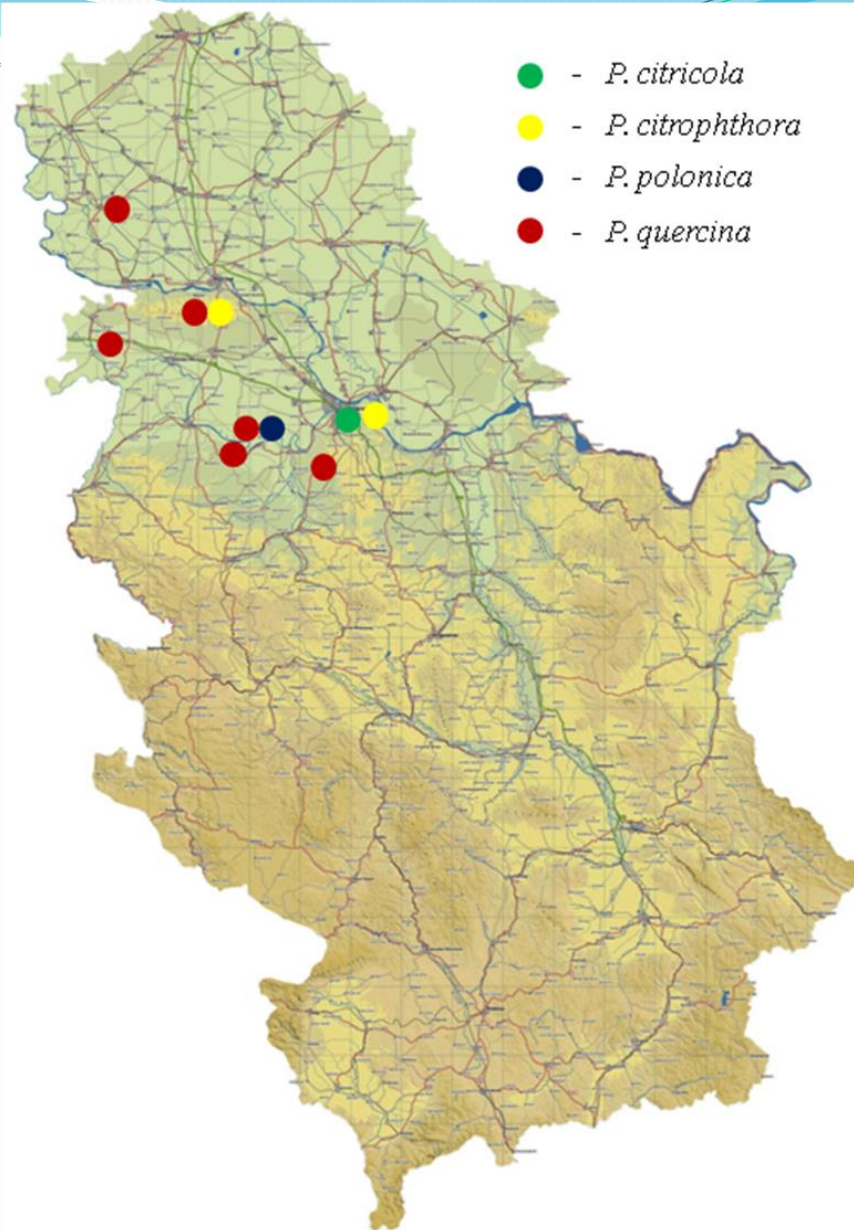
P. cactorum

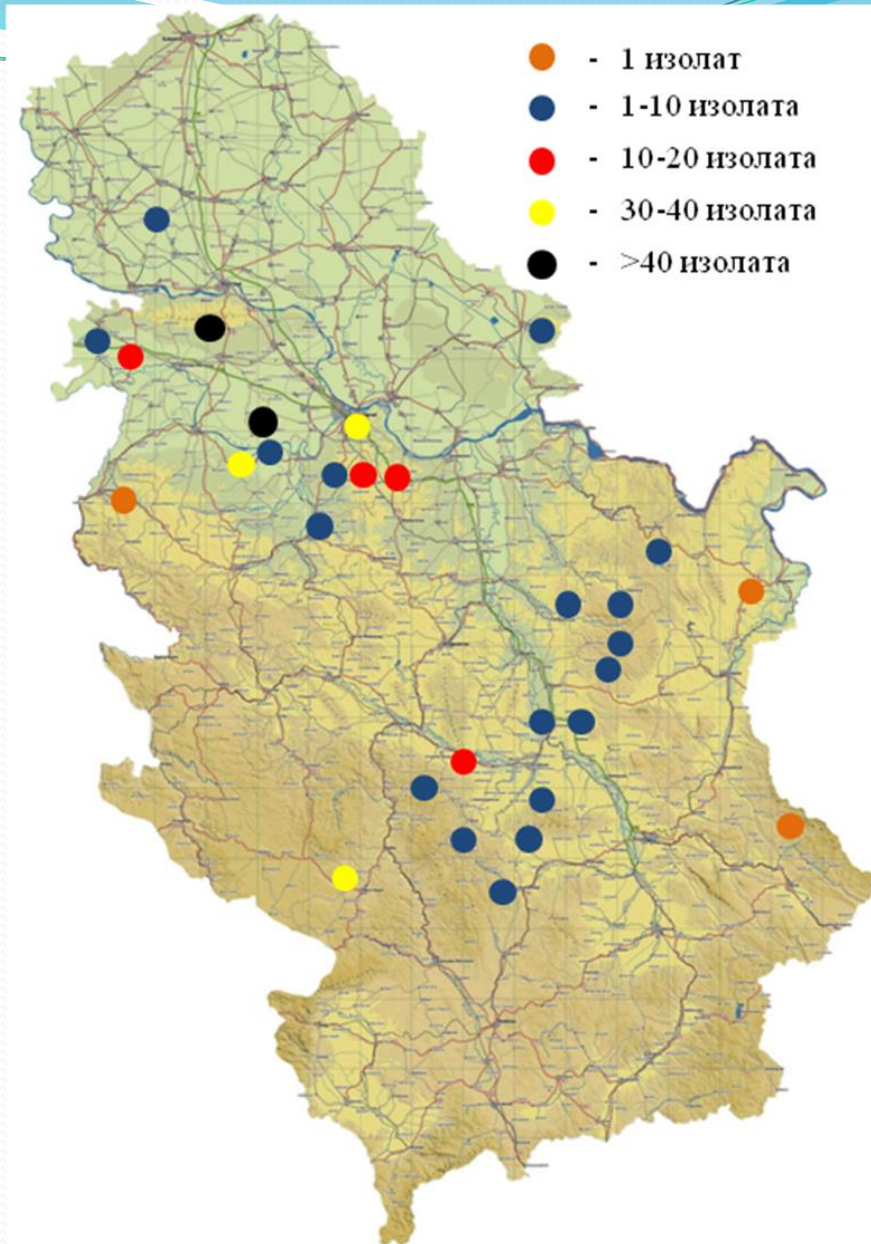
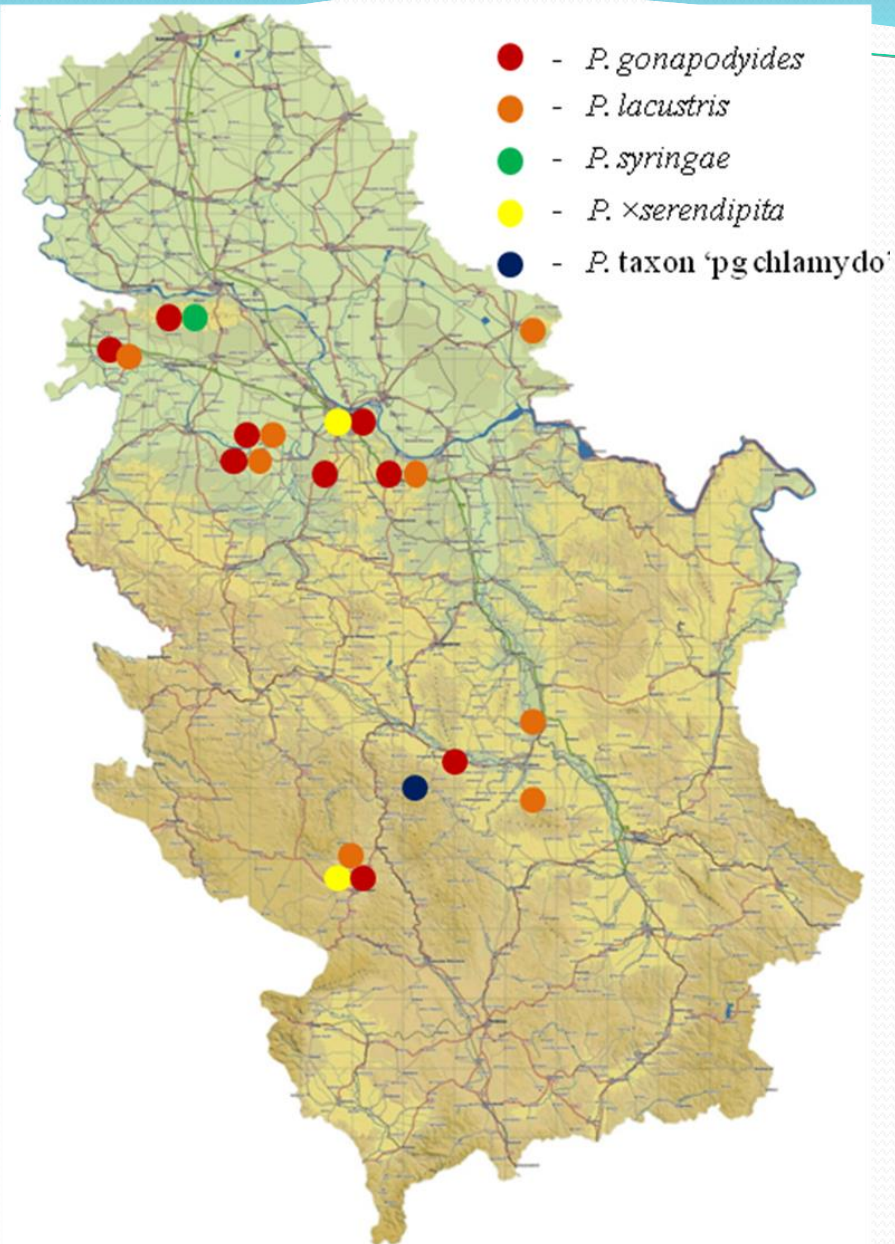


- - *P. cambivora*
- - *P. cryptogea*
- - *P. europaea*
- - *P. pini*



- - *P. citricola*
- - *P. citrophthora*
- - *P. polonica*
- - *P. quercina*





Регистровани симптоми



Quercus robur- одумирање стабала од врха,
ШГ Сремска Митровица, ШУ Моровић, 2011 година.



Quercus robur

Quercus robur

Секундарна крошња





Quercus robur

Некрозе пропраћене
цурењем тамног ексудат

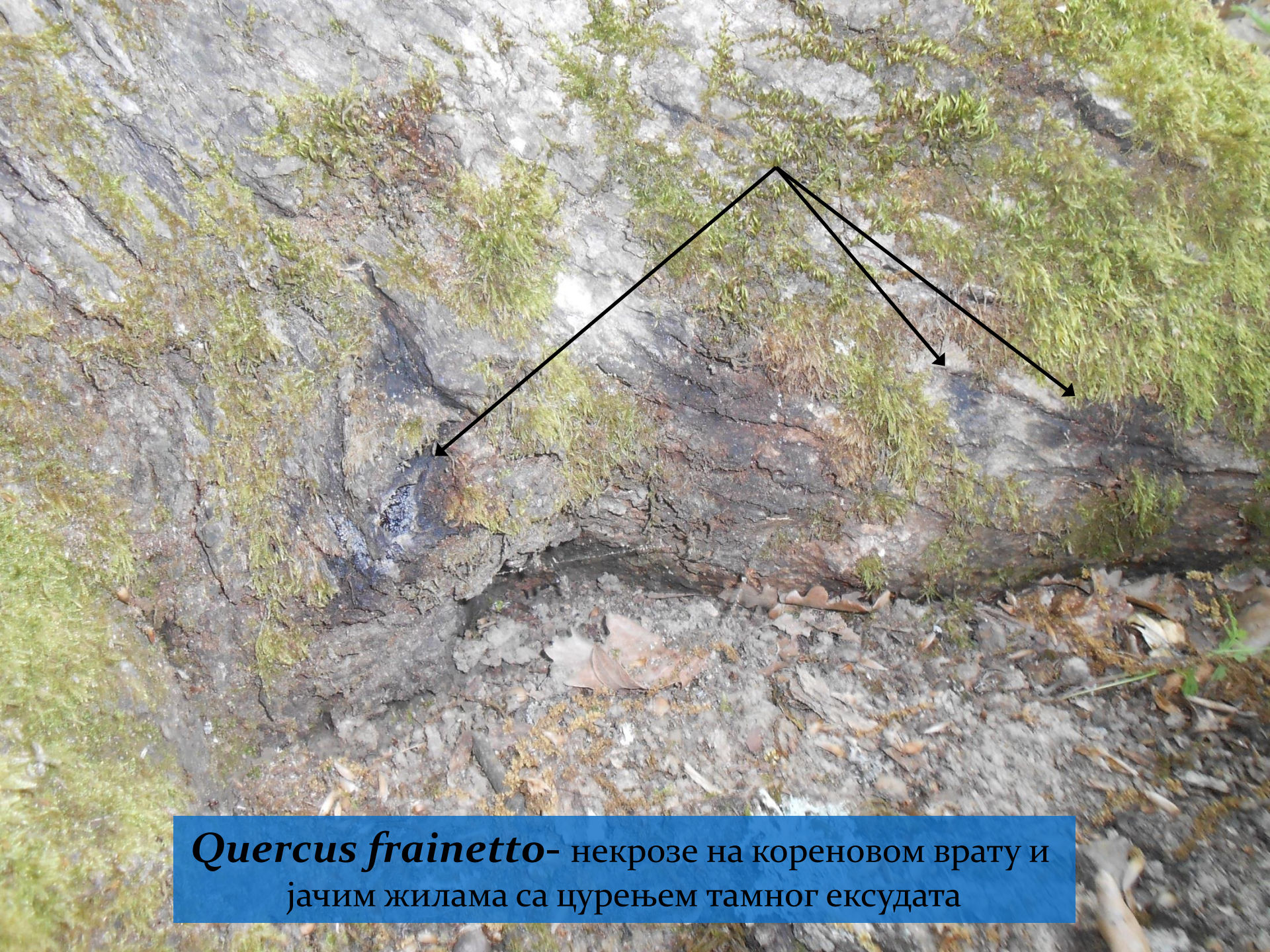


***Q. robur*-** некрозе и озледе на матичном корењу и
трулеж и губитак финог корења



Quercus frainetto

„Dieback“ тип пропадања



Quercus frainetto- некрозе на кореновом врату и
јачим жилама са цурењем тамног ексудата

**ШГ „Расина“,
ШУ Александровац, 2016. година**



ШГ „Расина“, ШУАлександровац, 2013.
година



Q. frainetto- некрозе и озледе на матичном
корењу и трулеж и губитак финог корења

ШГ „Топлица“, ШУ Куршумлија,
2014. година

Q. frainetto- велике некрозе и озледе на
матичном корењу

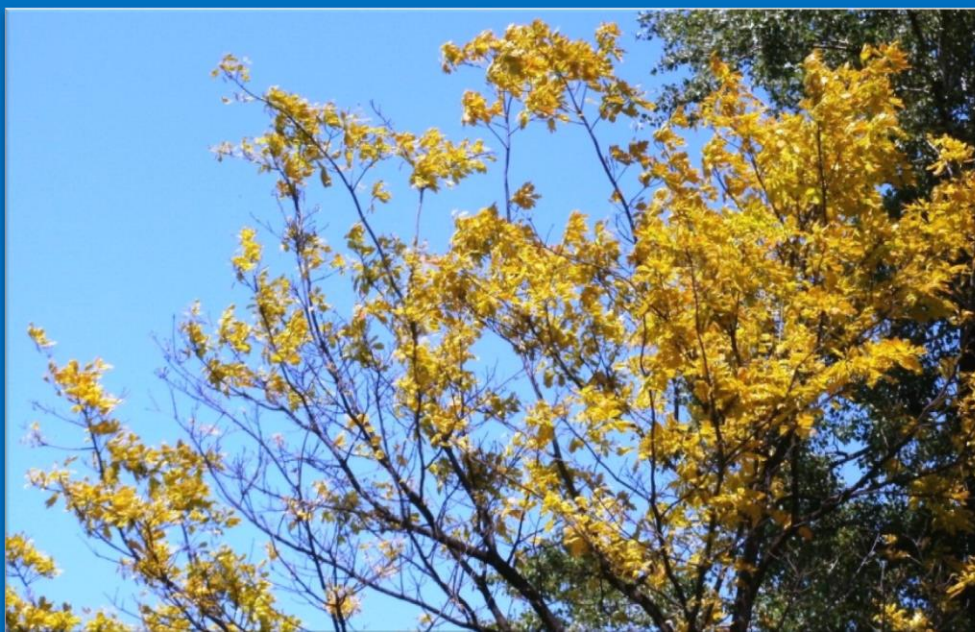


ШГ „Београд“,
ШУ Авла,
2010. година

Q. petraea- dieback

A photograph of a forest scene. In the center, a dead, leafless tree stands out against a clear blue sky. The surrounding trees are lush green, indicating a healthy forest. The text is overlaid in the bottom right corner.

Q. petraea-dieback
НП Бердап, 2015. година



Quercus rubra
Укрсана стабла,
Београд 2012. год.

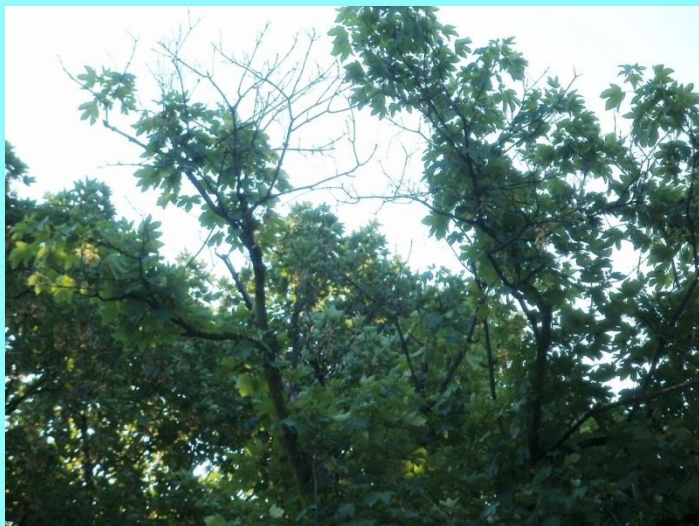
Acer pseudoplatanus L.

Парковске биљке, Београд, 2015. год.

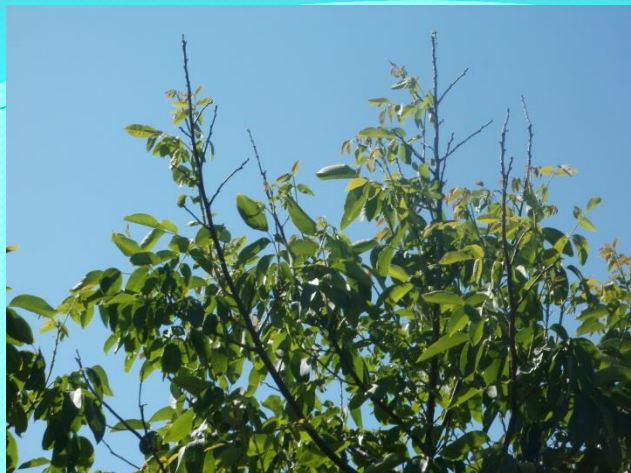
Здрава биљка



Јака проређеност крошње



Acer pseudoplatanus L.
Парковске биљке,
Београд, 2015. год.



Juglans regia L., Обедска бара, 2012. год.



Fagus sylvatica L., ШУ Врање, 2013. год.



Fagus sylvatica L., ШГ Расина, ШУ Трстеник, 2014. год.



Fagus sylvatica

Јаворак, 2012. год.

Некрозе и озледе на матичном корењу



Типови симптома и број изолата према *Phytophthora* врстама

Бр. No.	<i>Phytophthora</i> врсте* <i>Phytophthora</i> species	Некроза коре Bark necrosis	Проређеност круне Crown transparency	Жутило лишћа Yellowing of leaves	Одумирање грана Dying of branches	Одумирање стабала од врха Dieback	Нема симптома No symptoms	Укупно Total	Везаност Fidelity
1	<i>P. cactorum</i>	14 врста 14 species					9 врста 9 species	22	0,83
2	<i>P. cambivora</i>							8	0,67
3	<i>P. citricola</i>							1	0,17
4	<i>P. citrophthora</i>							2	0,33
5	<i>P. cryptogea</i>							4	0,50
6	<i>P. europaea</i>							3	0,17
7	<i>P. gonapodydes</i>							19	0,67
8	<i>P. lacustris</i>							32	1,00
9	<i>P. pini</i>							12	0,33
10	<i>P. plurivora</i>							165	1,00
11	<i>P. polonica</i>							16	0,50
12	<i>P. quercina</i>							19	0,67
13	<i>P. syringae</i>							3	0,17
14	<i>P. taxon 'Pg Chlamydo'</i>							2	0,17
15	<i>P. xserendipita</i>	234					3	5	0,50
Укупно Total		22	84	22	20	80	79	313	

Сличност и асоцираност појединих типова симптома

Типови симптома* Types of symptoms	Одумирање стабала од врха Dieback	Некрозе коре Bark necrosis	Нема симптома No symptoms	Одумирање грана Dying of branches	Проређеност круне Crown transparency	Жутило лишћа Yellowing of leaves
„Dieback“	1,00	0,53	0,60	0,40	0,70	0,74
Некрозе коре Bark necrosis	0,36	1,00	0,31	0,50	0,38	0,50
Нема симптома No symptoms	0,43	0,18	1,00	0,62	0,76	0,59
Одумирање грана Dying of branches	0,25	0,33	0,44	1,00	0,50	0,50
Проређеност круне Crown transparency	0,53	0,23	0,62	0,33	1,00	0,80
Жутило лишћа Yellowing of leaves	0,58	0,33	0,42	0,33	0,67	1,00

Патогеност

- 1) **Инокулација избојака под кору** (JUNG and NECHWATAL 2008);
- 2) **инокулација под кору** на живим биљкама у контролисаним условима (BALCI *et al.* 2008);
- 3) **инфекцијом кореновог система преко земљишта** у условима контролисаног влажења и температуре (JUNG *et al.* 1996).

Инокулација избојака под кору

Шифра изолата Code of isolate				
	code		<i>Fagus sylvatica</i>	
			инкулисано inoculated	Контрола Control
2011/F.S.03			3 × 10	30
2010/F.Ang.01			3 × 10	
2012/Ras.Q.P.3			3 × 10	
2011/Q.R.30			3 × 10	
2011/Q.P.05			3 × 10	
2011/Fa-Ab.01			3 × 10	
	<i>P. plurivora</i> (JX276057)		3 × 10	
	<i>P. taxon</i> 'pg chlamydo'		3 × 10	

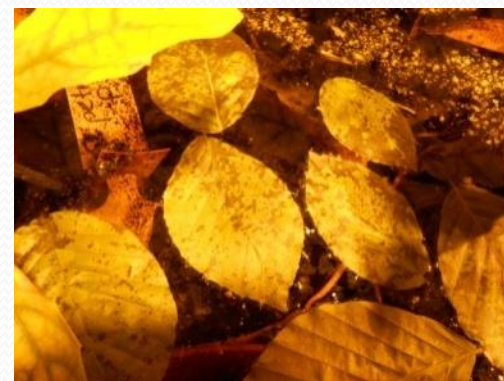
Инфекција кореновог система преко земљишта

Шифра изолата Code of isolate	<i>Phytophthora</i> врста <i>Phytophthora</i> species	Домаћин Host			
		<i>Quercus petraea</i>		<i>Quercus robur</i>	
		Инокулисано Inoculated	Контрола Control	Инокулисано Inoculated	Контрола Control
2011/F.S.03	<i>P. cambivora</i> (JX276088)	12	12	12	12
2011/Q.R.12	<i>P. plurivora</i> (JX276053)	12		12	
2011/Q.R.33	<i>P. polonica</i> (JX276064)	12		12	
2011/Q.R.32	<i>P. quercina</i> (JX276020)	12		12	
2010/MIX.01	<i>P. ×serendipita</i> (KM272259)	12		12	

Инфекција кореновог система преко земљишта

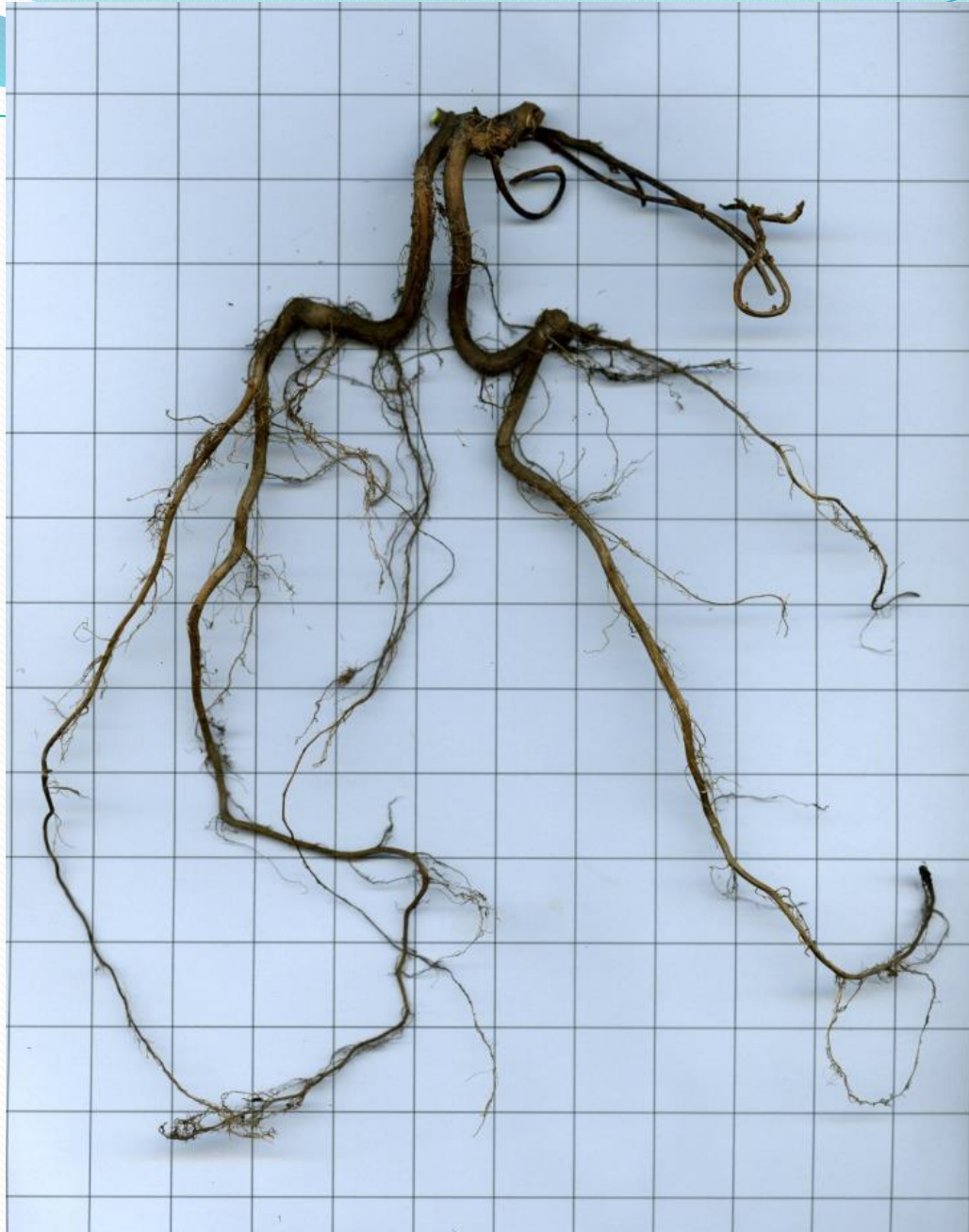


Инокулисане биљке храста у индивидуалним саксијама и поплављене у заједничким кутијама



Анализе кореновог система после 8 месеци инфекције
Root analyses 8 months after infection

Species	<i>Quercus petraea</i>				<i>Quercus robur</i>			
	Број	Убијене Number of killed	% са некрозама % of necrosis (average)	% абнормалних % of plants with abnormally developed root	Број	Убијене Number of killed	% са некрозама % of necrosis (average)	% абнормалних % of plants with abnormally developed root
<i>P. cambivora</i>	12	1	50	83	12	1	43	92
<i>P. plurivora</i>	12	0	44	75	12	0	25	58
<i>P. polonica</i>	12	0	33	50	12	0	14	33
<i>P. quercina</i>	12	2	46	75	12	1	35	67
<i>P. xserendipita</i>	12	0	39	75	12	0	20	67
Control	12	0	0	0	12	0	0	0



Одређивање процента некроза и абнормално развијеног корена



Q. robur- *P. quercina* – некрозе и трулеж матичног
корења- necrosis and rots of mother roots



Q. robur- *P. cambivora*- некрозе и трулеж
матичног корења- necrosis and rots of mother roots



Q. robur- *P. xserendipita*- некрозе и трулеж
матичног корења- necrosis and rots of mother roots



Q. robur- *P. polonica*- трулеж централног дела
корена- rot of central part of the root



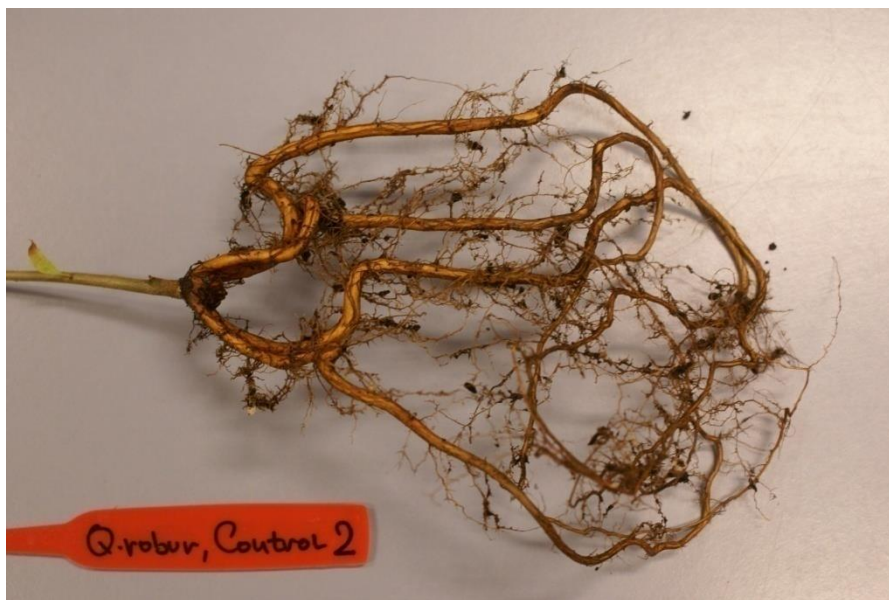
Q. robur- *P. cambivora*- некрозе и трулеж матичног корења- necrosis and rots of mother



Q. robur- *P. plurivora*- трулеж и губитак финог корења- decay and loss of fine roots



Q. robur- развијен корен контролне биљке-
Developed root from the control plant



Q. robur- развијен корен контролне биљке-
Developed root from the control plant



Q. petraea - *P. ×serendipita*- трулеж матичног
и финог-decay and rot of mother and fine roots



Q. petraea - *P. ×serendipita*- трулеж матичног
и финог- decay and rot of mother and fine roots



Q. petraea- *P. plurivora*- абнормалност и трулеж
срчанице- abnormality and rot of central part of the root



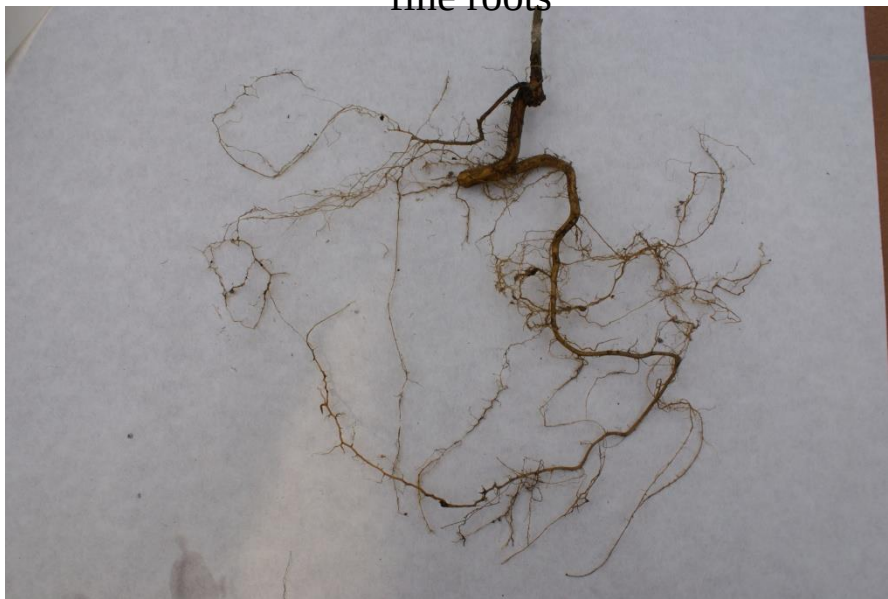
Q. petraea- *P. cambivora*- некрозе на матичном
корену- necrosis on mother roots



Q. petraea- *P. quercina*- некрозе на матичном и губитак финог -necrosis on mother root and loss of fine roots



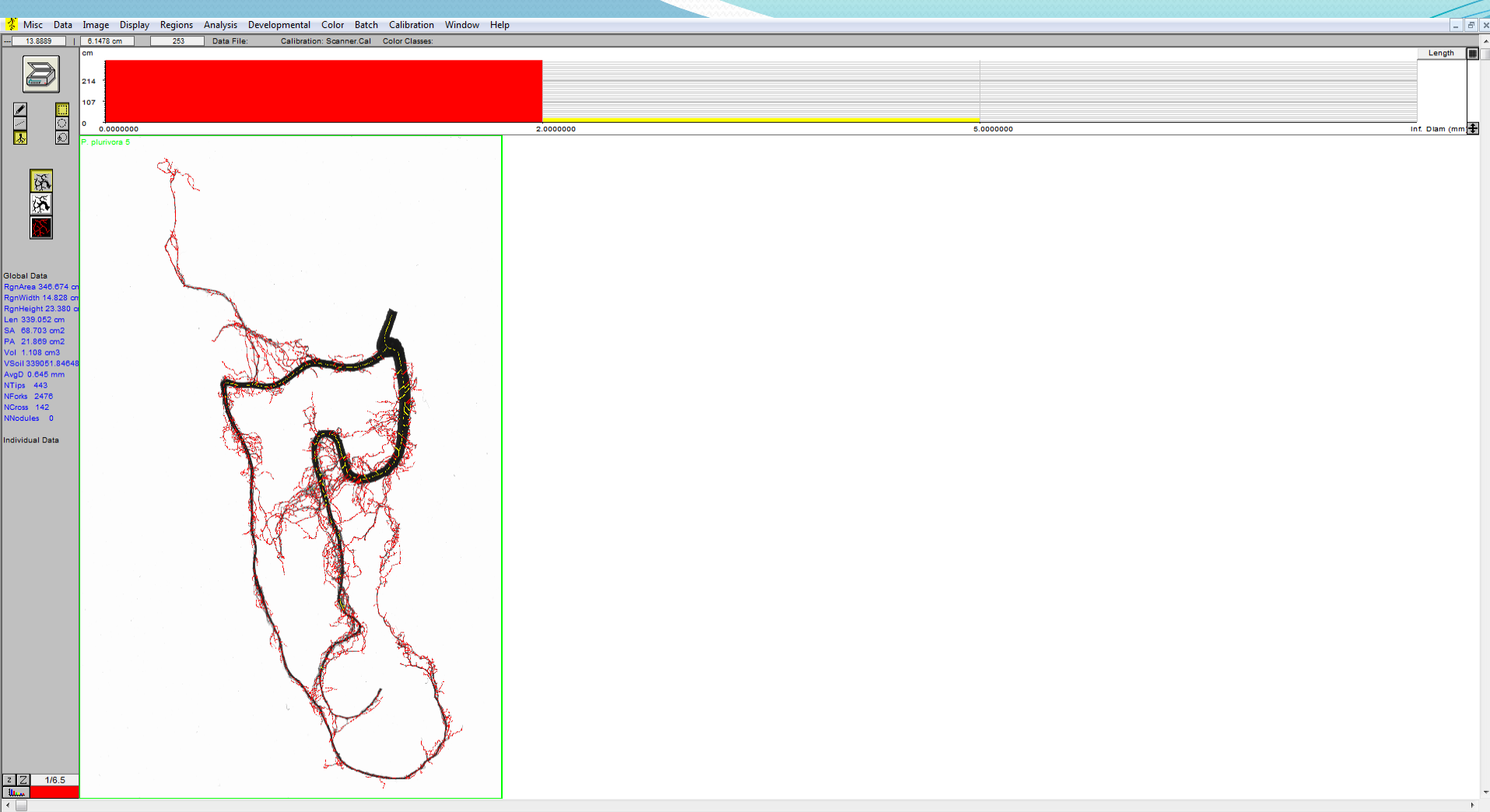
Q. petraea- *P. quercina*- корен убијене биљке- root of the killed plant



Q. petraea- корен контролне биљке- root from the control group of plants



Q. petraea- корен контролне биљке- root from the control group of plants



Анализе кореновог система у софтверу WinRhizo®

- После статистичких анализа параметара корена, у случају храста лужњака **најагресивније врсте су биле P. cambivora и P. quercina**, а иза њих *P. plurivora* и *P. xserendipita* и све оне су биле статистички значајно различите у односу на контролну групу на основу Duncan теста;
- **Дужина финог** корена храста лужњака, инфицираног са **P. cambivora** је била **3,8 пута мања**, док је **укупна дужина корена била 3,6 пута мања** и статистички значајно различита у односу на контролну групу биљака;
- **Дужина финог корена** храста лужњака, инфицираног са **P. quercina** је била **2,8 пута мања**, док је укупна дужина корена била 2,7 пута мања и статистички значајно различита у односу на контролну групу биљака.

- У случају храста китњака, најагресивније врсте су биле *P. quercina* и *P. xserendipita*, а иза њих *P. cambivora* и *P. plurivora* и све су биле статистички значајно различите у односу на контролну групу на основу Duncan теста;
- **дужина финог** корена храста китњака, инфицираног са *P. quercina* је била **3 пута мања и статистички значајно различита**, док је **укупна дужина корена била 2,9 пута мања** у односу на контролну групу биљака;
- **дужина финог корена** храста китњака, инфицираног са *P. xserendipita* је била **~3 пута мања**, док је укупна дужина корена била 2,9 пута мања у односу на контролну групу биљака.
- најмање агресивна врста у односу на оба тестирана домаћина је била *P. polonica* и у неколико тестираних параметара се није статистички значајно разликовала у односу на контролну групу биљака, на основу резултата Duncan теста ($p < 0.05$).

- Забележена је значајна учесталост изолације врста овог рода испод симптоматичних стабала **јасена, букве, јавора, дивљег кестена, храстова китњака и лужњака**, што указује на њихову улогу у комплексу фактора пропадања стабала наведених врста;
- Тестовима патогености је приказана способност ових организама да продру у здраво корење садница храста и да изазову различита оштећења;
- С тим у вези, овим организмима се могу приписати директне и индиректне штете које узрокују на различитим домаћинима;
- Један од сценарија индиректних штета је отварање кореновог система и других ткива за продор других патогених организама, а као крајњи резултат тога настају:







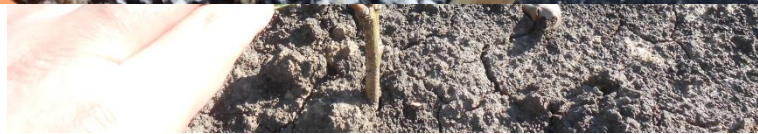








Тренуно радимо на:



- Сакупљање узорака и изолације из симптоматичних састојина букве, храста и осталих осетљивих домаћина;
- Разјашњење улоге ових организама у пропадњу појединачних стабала и састојина и довођење у везу са осталим абиотичким и биотичким факторима.

Будући правци истраживања

- Детаљнија истраживања водотокова и присуства *Phytophthora* врста у водама;
- Детаљнија проучавања у расадницима и плантажама;
- Испитивање осцилација популација ових организама у оквиру и између сезона;
- Тестови патогености ширег обима;
- Детерминација интеракција са другим факторима пропадања;
- Могућности контроле.

Хвала на пажњи
Thanks for your attention



Ослобађање зооспора из спорангије *P. plurivora*
Домаћин: *Quercus petraea*, Авала, 2010
×400, Zeiss Axioskope 2; Nikon Dsf1 Camera