

ЗНАЧАЈ ТРАХЕОМИКОЗНИХ ГЉИВА У ПРОЦЕСУ СУШЕЊА СТАБАЛА ХРАСТА У СРБИЈИ

ВЕСНА ГОЛУБОВИЋ ЂУРГУЗ¹
ИВАН МИЛЕНКОВИЋ²
KATARZYNA SIKORA³

Извод: У раду су изнети резултати испитивања узрока сушења и пропадања стабала храста у Србији, пре свега у источној Србији као најугроженијем региону. Изолована је и морфолошки детерминисана трахеомикозна врста гљиве из некротираног ткива стабала храста. Молекуларним истраживањима потврђено је да се ради о патогеној врсти *Ophiostoma quercus*, главном узрочнику сушења и пропадања ових стабала храста. Лабораторијским испитивањима утврђене су неке физиолошке карактеристике ове врсте које могу бити значајна помоћ приликом утврђивања одговарајућих мера борбе против овог патогена. Ово су прва молекуларна истраживања врста из рода *Ophiostoma* у Србији.

Кључне речи: сушење храста, трахеомикоза, *Ophiostoma quercus*, PCR, секвенцирање.

IMPORTANCE OF TRACHEOMYCOTIC FUNGI IN THE PROCESS OF OAK TREES DECLINE IN SERBIA

Abstract: This paper presents the results of the studies into the causes of oak tree decline in Serbia, with the emphasis on Eastern Serbia as the most affected region. A tracheomycotic species was isolated from the necrotic tissue of oak trees and morphologically determined. Molecular studies confirmed the presence of *Ophiostoma quercus*, a pathogen that seemed to be the main cause of decline and dieback of these oak trees. The laboratory studies revealed some physiological characters that could be useful factors deciding the most suitable methods of control to be adopted. These are the first molecular studies of species belonging to *Ophiostoma* genus in Serbia.

Keywords: oak decline, tracheomycosis, *Ophiostoma quercus*, PCR, sequencing.

1. УВОД

Први подаци о интензивном сушењу храстова у различитим земљама Европе потичу с краја XIX века, а следећи период интензивног сушења започео је у првој половини XX века у Француској, одакле се проширио на остале земље Европе (Delatour, C., 1983; Ragazzi, A. *et al.*, 1989). Последњи талас сушења храста започео је осамдесетих година XX века и достигао епидемијске размере јер је регистрован на великој површини у Европи и

1 др Весна Голубовић Ђургуз, доцент, Универзитет у Београду - Шумарски факултет, Београд

2 Иван Миленковић, дипл. инж., истраживач сарадник, Институт за шумарство, Београд

3 PhD Katarzyna Sikora, assistant professor, Forest Research Institute-IBL, Sekocin Stary, Poland

Америци, а на многим локалитетима траје још увек.

На просторима бивше Југославије, прво евидентирано сушење храстових шума било је 1902. године у славонским шумама лужњака (шумска управа Моровић) (Ђорђевић, Р., 1926), а следећа епифитоција у Славонији и Срему забележена је у периоду од 1927. до 1930. године (Јосифовић, М., 1929; Ђорђевић, Р., 1930). У периоду последњег таласа сушења храста, од 1982. до 1983. године, на подручју Србије, на читавом ареалу природног распрострањења, констатовано је сушење, мада је најугроженије подручје било у источној Србији (Роповић, Р., 1987; Роповић, Ј. *et al.*, 1992; Маринковић, Р., 1987, 1992; Маринковић, Р. *et al.*, 1990). Ово је представљало велики проблем и око његовог решавања се ангажовао велики број научника јер су храстови у Србији заступљени са 10 врста, а неке од њих (*Quercus robur* L., *Q. cerris* L., *Q. frainneto* Ten., *Q. petraea* (Matt.) Liebl.), по површини коју заузимају и техничким својствима дрвета, спадају у наше најважније врсте шумског дрвећа (Гајић, М., Тешић, Ж., 1992). Према подацима Стојановић, Љ. *et al.* (2005), чисте шуме храстова у Србији и шуме храстова са осталим лишћарским врстама дрвећа без букве, заузимају површину од 836.445 ха што чини 36% укупног шумског фонда. Сушење је забележено како у високим, тако и у изданачним шумама различитог доба старости.

Проучавањем узрока који доводе до сушења храста утврђено је да постоји ланац штетних утицаја (напад гусеница, пепелница, стагнирајућа вода и подзол као геолошка подлога) који доводе до физиолошког слабљења стабала и да гљива *Armillaria mellea* доводи до потпуног сушења (Ђорђевић, Р., 1926; Manojlović, М., 1926; Škorić, V., 1926, Јосифовић, М., 1929). Међутим, Ђорђевић, Р. (1930) први је изнео своју хипотезу о трахеомикозама као главним узроцима пропадања храста, јер је открио у бељници заражених храстова мрке, уздужне зоне које продиру од површине ка унутрашњости али не продиру у срчику. Изоловане чисте културе из оболелих стабала описао је као нове врсте гљива, *Certostomella quercus* и *Ceratostomella merolinensis* Georg., по месту званом Меровино, у шуми где ју је открио. Гљива *C. quercus* је поново изолована и тако је потврђено њено постојање (Главаш, М., 1984) док *C. merolinensis* није поново констатована.

Симптоми пропадања стабала храста запажени су у сличном облику у свим земљама Источне Европе где је сушење храстова имало хроничан ток развоја, док је у Западној Европи оваква појава спорадична. Због тога се у многим земаљама Источне Европе главна улога у појави примарних симптома сушења приписивала гљивама из рода *Ophiostoma*. У Румунији је Petrescu, М. (1974) објавио да је изоловао две нове врсте гљива које насељавају спроводне судове храста: *Ophiostoma roboris* Georg. et Teodoru и *O. valachicum* Georg. et Teodoru и дао је њихов детаљан опис. У Чешкој су изоловане и описане *O. quercus*, *O. valachicum*, *O. roboris* и *O. kubanicum*, изоловане на истим локалитетима, али у различитој заступљености (Нешко, Ј., 1987). У Бугарској су истраживачи из оболелих храстова идентификовали *Ceratocystis roboris* и *C. valahicum* (Georgiev, D., 1986).

Откриће трахеомикозних гљива као узрочника сушења изазвало је забринутост научника са целог континента, посебно у Француској

на чијем простору је велика површина под храстовима (3,5 милиона ha) (Guillammin, J., 1983). Детаљно су анализирани узорци осушених стабала, али нису констатовали присуство гљива из рода *Ophiostoma*, већ се као главни узрочници наводе гљиве *Collybia fusipes* и *Armillaria mellea* (Delatour, C., 1986). До сличних резултата су дошли и у другим европским земљама, као што су Аустрија и Северна Немачка где су најчешће изоловане гљиве слаби паразити (Halmschlager, E. et al., 1993). Из грана осушених стабала су изоловане следеће врсте: *Colpoma quercinum* (Pers.) Wallr., *Amphiporthe leiphaemia* (Fr.) Butin, *Pezicula cinnamomea* (DC.) Sacc. и *Aposphaeria* spp. (Kehr, R.D., Wulf, A. 1993). Настављен је рад на детаљним анализама гљива из рода *Ophiostoma*, па су проучени изолати чистих култура добијени из сувих храстова пореклом из Француске и осталих европских земаља. Извршена су морфолошка испитивања која су показала да су *O. querci* и *O. piceae* веома блиске врсте, али нису синоними, како се раније сматрало. Такође, потврђено је да су *O. querci* и *O. roboris* синоними исте врсте. Ниједан изолат није одговарао опису врсте *O. kubanicum*. Њено постојање, које је било контроверзно и раније, није потврђено, као и *O. valahicum* (Delatour, C., 1986; Przybyl, K., 1992). *Ophiostoma quercus* (Georgevitch) Nannf је била најчешће изолована гљива из стабала храста захваћених сушењем (Kowalski, T., 1991), па су испитиване њене физиолошке карактеристике у условима *in vitro*, док су многи научници постављањем вештачких инфекција проверавали њену патогеност (Przybyl, K., 1993; Delatour, C. et al., 1994). *O. quercus* се сврстава у релативно блиске врсте са *O. ulmi* (Buism.) Nannf. и *O. novo-ulmi* Brasier (Harrington, T.C. et al., 2001) које су агресивни патогени изазивачи сушења на бресту.

Узимајући у обзир податке који се налазе у литератури, еколошки и економски значај храста за шумарство Србије, као и велику варијабилност до сада добијених изолата врста из рода *Ophiostoma* са стабала храста у нашим шумама, спроведено је истраживање са циљевима да се: 1.) изолују и идентификују најзначајније патогене, трахеомикозне врсте гљива које су проузроковале сушење стабала храста у Србији; 2.) изврши молекуларна идентификација добијених изолата и тиме окарактерише *Ophiostoma* врста присутна на храсту у Србији и да се 3.) спроведе лабораторијско испитивање неких физиолошких својстава изолата трахеомикозне гљиве изоловане из камбијалне некрозе, ради бољег упознавања одлика ове патогене врсте.

Резултати ових истраживања треба да допринесу бољем познавању особина и карактеризацији изолованих *Ophiostoma* врста у Србији, а на основу тога и планирању будућих мера борбе против овог опасног патогена.

2. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД РАДА

Узимајући у обзир појаву масовног сушења стабала на подручју источне Србије, које је било праћено различитим симптомима, детаљно истраживање је спроведено на подручју Дебелог Луга - Мајданпечка домена, где је извршен обилазак терена и сакупљање узорака ради изолација патогених организама, проузроковача сушења стабала храста.

Са пања посеченог, осушеног стабла, као и из дрвета млађих стабала, узети су делови зараженог ткива и у стерилним условима донети у лабораторију на даља истраживања. Најпре је урађена изолација и детерминација констатованих гљива, а затим су на Шумарском факултету у Београду у лабораторијама истраживане неке физиолошке карактеристике. Након изолације гљиве, присутне у спроводним судовима и њене детерминације, урађена су испитивања утицаја различитих температура и различитих хранљивих подлога на пораст мицелије ове гљиве и ферментна активност гљиве, пре свега производња оксидаза и редуктаза. Изолати добијени раније са других локалитета и са других домаћина су такође укључени у ова истраживања. Молекуларна истраживања ове гљиве урађена су у лабораторији Института за шумарство (*Forest Research Institute-IBL*) у *Sekocinu Starom* у Пољској.



Слика 1. Симптоми *Ophiostoma quercus* на стаблима храста китњака у Србији:
 А - стабло храста захваћено сушењем са симптомима одумирања крошње и грана;
 Б - некротично ткиво младог стабла из кога је изолована гљива

Figure 1. Symptoms of *Ophiostoma quercus* on sessile oak trees in Serbia: A - a declining oak tree with dieback symptoms on the crown and branches; Б - necrotic tissue of the young tree from which the fungus was isolated

2.1. Утицај подлоге на раст мицелије

Утицај подлоге на раст мицелије гљива детерминисан је употребом две врсте хранљиве подлоге: МЕА (малц-екстракт агар, хранљива подлога која садржи 20 gr малц екстракта (Sigma-Aldrich, USA) и 20 gr агара (Торлак, Београд)) и селективне МЕА (у 1 литар МЕА подлоге додато је 0,2 gr *Actidiona* раствореног у стерилној води и 1gr *Streptomycin*) (Brasier, С.М., 1986). Припремљене стерилне подлоге су разливане у Петри посуде (20 ml у свакој) и у њихов центар су стављени фрагменти гљиве старости недељу дана. Петри посуде су постављане у термостат, а инкубација је била на

23 ± 1°C у мраку. Измерена рН вредност је била у границама између 5 и 6. Раст мицелије је контролисан месец дана, мерењем два унакрсна пречника сваког другог дана. Резултати су израчунати као просечна вредност десет понављања.

2.2. Утицај температуре на пораст мицелије гљиве

Ово испитивање је вршено на хранљивој МЕА подлози. Пораст мицелије је испитиван на температурама: 6°C, 10°C, 11°C, 17°C, 18°C, 20°C, 23°C, 24°C, 26°C, 27°C и 31°C. Фрагменти мицелије коришћени за инокулацију подлоге били су величине 3 × 3 mm. Прво мерење урађено је четири дана после инокулације, тј. када се формирала видљива колонија око инокулума. За одређивање дневног пораста мерена су два унакрсна пречника колоније у трајању од месец дана.

2.3. Ферментна активност

Ферментна активност је анализирана испитивањем лучења оксидаза (реакција и раст) на МЕА подлози којој је додато 0,5% галне или танинске киселине. На основу интензитета дифузионе зоне и брзине раста колонија на овим подлогама (после 8 и 14 дана), одређена је група којој гљива *Ophiostoma quercus* припада (Davidson, R.W. et al., 1938).

2.4. Екстракција DNA

Из репрезентативног изолата изолована је DNA помоћу Syngen® (Poland) комплета за изолацију, према препорукама произвођача. Добијена DNA је растворена у 50 µl „elution solution“, обезбеденог од стране произвођача и претходно загрејаног на 65°C. Део DNA је мешан са 6×Orange DNA Loading Dye, постављен на 1% агарозни гел на Tris-EDTA buffer-у и посматран под UV светлом.

2.5. Извођење PCR реакција и секвенцирање ITS региона

PCR реакције су изведене помоћу ITS1 и ITS4 пара прајмера (White, T. et al. 1990). Реакције су биле запремине 25 µl и садржале су 1 µl генске DNA, 1×PCR buffer [75mM Tris-HCl (pH 9.0), 50mM KCl, 20 mM (NH₄)₂ SO₄]; 1×Q solution, 0.2 mM dNTPs, 0.25 mM оба прајмера; 1 mM MgCl₂; 1U *Taq* Polymerase (Qiagen Ltd., Valencia, CA, USA); и воду (mQ) до допуне коначне запремине. Реакције су изведене у “BioRad ICycler” thermal cycler (Bio-Rad, USA) машини, а PCR протокол је био као у табели 1.

Део PCR продуката је мешан са 6×Orange DNA Loading Dye и постављан на 1% агарозни гел на Tris-EDTA buffer-у и посматран под UV светлом. PCR продукти су пречишћавани помоћу A&A Biotechnology (Gdynia, Poland) комплета за пречишћавање, према препорукама произвођача. Након чишћења, продукт је послат на секвенцирање у референтну компанију Genomed S.A. (Warsaw, Poland).

Tabela 1. PCR протокол, време и број циклуса
Table 1. PCR protocol, time and number of cycles

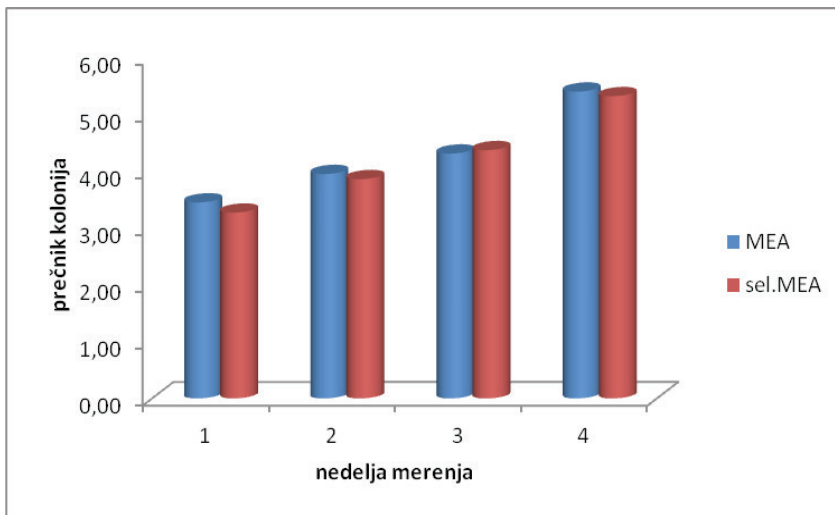
Фазе PCR-а	Температура (°C)	Време	Број циклуса
Initial denaturation	94	3 min	×1
Denaturation	94	25 s	×40
Annealing	56	25 s	
Extension	72	50 s	
Final extension	72	10 min	×1

Добијени хроматограми су анализирани у програму FinchTV (ver. 1.4.0, Geospiza®, Inc), и „consensus“ секвенце су склапане од „forward“ и „reverse“ продуката, помоћу програма Bioedit (v 7.1.3). Резултати су упоређени у бази гена (GenBank) са NCBI колекцијом нуклеотида (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) помоћу опција Basic BLAST и Nucleotide BLAST (Zhang, Z. et al., 2000).

3. РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА И ДИСКУСИЈА

3.1. Утицај подлоге на раст мицелије

Раст мицелије на различитим хранљивим подлогама је представљен на графикану 1. На обе хранљиве подлоге је констатован пораст мицелије испитиване гљиве. Измерене вредности недељног раста мицелије су уједначене, с тим што је у свакој недељи на МЕА подлози измерен незнатно држи развој мицелије.

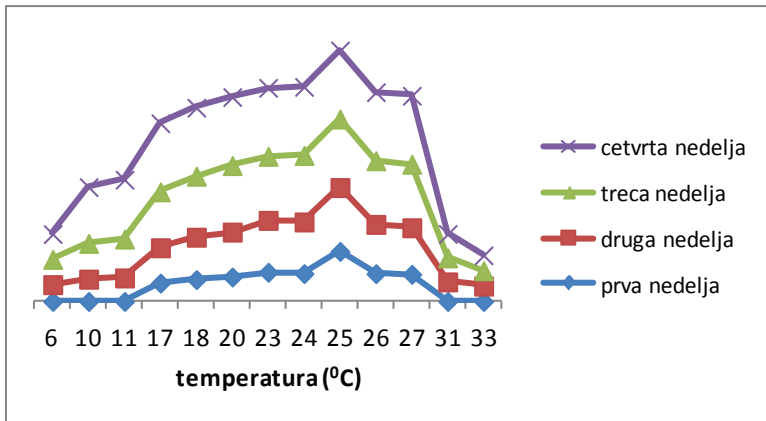


Графикон 1. Просечан недељни пораст мицелије /mm/ *Ophiostoma quercus* на различитим подлогама

Graph 1. Average weekly growth of *Ophiostoma quercus* mycelia /mm/ on different media

3.2. Утицај температуре на пораст мицелије гљиве

Према подацима из графикона 2 може се закључити да су изолати испољили физиолошку активност у температурном интервалу од 6 до 31°C. На најнижим (6°C, 10°C и 11°C) и највишим задатим температурама раст мицелије је отпочињао тек у другој недељи истраживања. Највећа брзина пораста мицелије *Ophiostoma quercus* је измерена на температури од 25°C, а на тој температури формирале су се и конидије у чистим културама.



Графикон 2. Просечан недељни пораст мицелије /mm/ *Ophiostoma quercus* на различитим температурама

Graph 2. Average weekly growth of *Ophiostoma quercus* mycelia /mm/ at different temperatures

3.3. Ферментна активност

У табели 2 су приказани подаци о степену оксидације подлоге са галном и танинском киселином забележени у овим истраживањима. Испитивање степена оксидације галне и танинске киселине је урађено након 8 и 14 дана инкубације. Изолати су показали спор и приближно једнак раст на галној и танинској киселини, што значи да гљива припада 7. групи по Davidsonu. Интензитет оксидације танинске киселине је нешто јаче изражен. Најинтензивније обојавање подлоге је испод инокулума, а затим се постепено смањује према ободу дифузне зоне.

Табела 2. Степен оксидације галне и танинске киселине

Table 2. Degree of oxidation of gallic and tannic acid

Подлога		Реакција	Пречник дифузионе зоне (mm)	Пречник мицелије (mm)	Група по Davidsonu
Гална	8. дан	+++	3,6-4,07	3,07-3,47	7.
	14. дан	++++	7,94-8,2	5,9-6,54	
Танинска	8. дан	+++	4,62-4,77	4,13-4,25	7.
	14. дан	++++	8,11-8,5	6,5-7,24	

3.4. Резултати ITS секвенцирања

Након секвенцирања и поређења нашег изолата са секвенцама у GenBank колекцији нуклеотида, наш изолат је био најсличнији врсти *Ophiostoma quercus*. Сличност са прве три секвенце у банци гена (AF493246, AF493251, AF493252) је била 99%, док су „Ехрест” и „Gaps” вредности износиле 0%. Секвенца је обрађена и послата у банку гена и за њу је добијен приступни код KM100571. **Ово су прва молекуларна истраживања врста из рода *Ophiostoma* у Србији.**

3.5. Секвенцирање других региона

У циљу потврде добијених података, као и у циљу израде „multilocus” филогенетских односа изоловане *Ophiostoma quercus* у Србији, секвенцирана су и три додатна региона, укључујући LSU, Actin и Tef1, помоћу прајмера и услова реакција приказаних у Quaedvlieg, W. *et al.* (2012). PCR реакције су изведене у „BioRad ICycler” thermal cycler (Bio-Rad, USA) машини, а провера квалитета и пречишћавање продуката вршени су на горе описан начин. Секвенцирање је такође изведено у Genomed S.A. компанији (Warsaw, Poland), а обрада резултата је у току.

Главни симптоми пропадања стабала храста, укључујући пропадање или увенуће листа, пропадање грана у крошњи, формирање водених избојака, закрчење трахеја и обојавање белике, појавили су се у сличном облику у свим земљама Источне Европе где је сушење имало хроничан ток развоја, док је у Западној Европи оваква појава спорадична. Ово је разлог што се у многим земаљама Источне Европе (бивши делови Југославије, Бугарска, Румунија, Словачка, Пољска, Мађарска, Украјина) главна улога у појави примарних симптома сушења приписивала трахеомикозним гљивама из рода *Ophiostoma* (*Ascomycotina*, *Sordariomycetes*, *Ophiostomatales*). Ови резултати изазвали су забринутост научника са целог европског континента, посебно из Француске на чијој територији се хрстови налазе на великој површини (Guillammin, J., 1983).

Род *Ophiostoma* је веома велики и има веома различите анаморфне варијетете, а колонизира бројне биљне врсте у којима се развијају као паразити у спроводним судовима познати као изазивачи „васкуларних инфекција”. Васкуларне инфекције изазивају затварање спроводних елемената, а колонизацијом паренхимског ткива домаћина његово потпуно сушење и пропадање. Иако могу бити присутни на различитим биљним врстама (Hutchison, L.J., Reid, J., 1988; Sieber, T.N., 1989; Brasier, C.M., 1993; Kile, G.A., 1993) изазивајући њихово сушење и пропадање, највеће штете изазивају на стаблима бреста и храста (Brasier, C.M., Kirk, S.A., 1989). Већ дуги низ година научници проучавају врсте из овог рода, па се често откривају нове врсте које су веома сличне иако су констатоване на потпуно различитим и удаљеним локалитетима (Aghayeva, D.N. *et al.*, 2004).

Варијабилност појединих врста из овог рода често је била узрок контроверзних резултата добијених након појединих истраживања. Истраживање више различитих физиолошких и морфолошких карактеристика је веома

корисно приликом идентификације врста. Поједине од ових карактеристика помогле су за утврђивање разлика између врста *O. picea* и *O. quercus* (Brasier, C.M., Kirk, S.A., 1989, 1993; Brasier, C.M., Stephens, T.N., 1991, 1993; Hamschlager, E. *et al.*, 1993; Webber, J.F., Brasier, C.M., 1991). Иако неке морфолошке карактеристике (као максимална температура раста) могу бити значајне за уочавање разлика између две врсте, једини објективан и брз начин идентификације је PCR амплификација и секвенцирање ITS и других региона (Grobbelaar, J.W. *et al.*, 2009).

Резултати наших молекуларних истраживања потврдили су да је гљива која је изолована из некротираног ткива стабла захваћеног процесом сушења врста *O. quercus*. Карактеризација ове врсте и њених синонима који су се раније јављали у литератури је раније приказана на основу „multilocus” филогенетских односа је од стране Grobbelaar, J.W. *et al.* (2009), а наши резултати се у потпуности уклапају у налазе ових истраживања.

У различитим експериментима са овом гљивом констатовали смо да је врло толерантна према различитим утицајима спољашње средине, јер је евидентиран раст мицелије на различитим врстама хранљивих подлога и на веома различитим температурама. Наиме, на обе тестиране подлоге је забележен раст мицелија испитиване гљиве, а измерене вредности недељног раста мицелије су уједначене, с тим што је у свакој недељи на МЕА подлози измерен нешто бржи развој мицелије. Такође, до краја испитиваног периода колоније нису потпуно испуниле петри посуде, иако гљиве које припадају роду *Ophiostoma* најбоље расту на умерено киселом медијуму богатом карбохидратима (Seifert, K.A., *et al.*, 1993). Наши резултати пораста мицелије на различитим температурама су потпуно у складу са резултатима до којих су дошли други истраживачи. Наиме, на ниским температурама (до 11°C) раст мицелије смо констатовали у другој недељи, а Grobbelaar, J.W. *et al.* (2009) су констатовали десети дан као дан почетка раста мицелије на температури од 10°C. Оптимални температурни интервал за раст ове гљиве у нашим истраживањима је био на 25°C уз вредности рН у границама између 5 и 6. Према Kile, G.A. (1993) оптимални температурни интервал у лабораторијским условима за ове гљиве износи 23-27°C уз рН вредност између 5-7.

Такође, *O. quercus* је вршила оксидацију галне и танинске киселине, те стога припада гљивама које интензивно луче ферменте из групе оксидаза што омогућава њихову способност за оксидацију лигнина и разградњу дрвета (Караџић, Д., 2010), а на тај начин се олакшава продирање гљиве директно кроз ћелијске зидове (Lagerberg, T. *et al.*, 1927; Gibbs, J.N., 1993). Захваљујући способности синтезе различитих екстрацелуларних ензима, гљиве могу да користе различите изворе енергије из биљног ткива и на тај начин да се обезбеђују са азотом и фосфором (Cairney, J.W.G., Burke, R.M., 1998).

Према Караџић, Д. (2010) и Караџић, Д. (лична комуникација), главна улога у пропадању стабала храста се не може искључиво приписати ни једном појединачном фактору, већ се ради о комплексу фактора који доприносе овом феномену, а да врсте рода *Ophiostoma* имају несумњиво

велику улогу у комплексу фактора сушења храстових стабала и састојина.

Присуство трахеомикозне гљиве *O. quercus*, проузроковача опасног обољења на храстовима, носи велике ризике по стаблност састојина храста и уопште шумских екосистема. Узимајући у обзир евидентне промене климе, потребно је детерминисати све главне факторе који имају утицај на раст нивоа инокулума и ширење ове гљиве. Нашим истраживањима је приказана способност ове гљиве да оствари развој у широком температурном интервалу, што јој представља јако велику предност у преживљавању неповољних услова. Такође, приказани резултати везани за способност оксидације лигнина и разградње дрвета нам указују да се ради о врло опасном патогеном организму, способном да изазове сушење и пропадање стабала у састојинама. Међутим, у будућим *in vivo* и *in vitro* истраживањима, потребно је извести тестове патогености са различитим домаћинима и изолатима различитог порекла, како би се утврдили најосетљивији домаћини и најагресивнији сојеви ове врсте у Србији.

4. ЗАКЉУЧЦИ

На основу спроведених истраживања, могу се извести следећи закључци:

- резултати вишегодишњих истраживања узрока сушења стабала храста на подручју Србије указују да значајну улогу у овом процесу имају паразитске гљиве које проузрокују трахеомикозе;
- молекуларна истраживања су потврдила да је изолована гљива *Ophiostoma quercus* и секвенца прослеђена у NCBI базу података доступна је јавности под приступним кодом **KM100571**;
- ова гљива је најчешће констатована у спроводним елементима стабала храста захваћеним процесом сушења у Србији;
- различитим експериментима са овом гљивом констатовали смо да испољава толерантност према условима спољне средине;
- њена мицелија се развија на стандардној (МЕА) и селективној хранљивој подлози (МЕА подлога са додатим антибиотицима);
- физиолошку активност ова гљива испољава у широком температурном распону (од 6 до 31°C), а испољава и способност оксидације подлоге којој је додата гална и танинска киселина;
- пошто је овај опасни патоген присутан у нашим шумама неопходно је наставити са детаљнијим истраживањима свих фактора који имају позитиван утицај на раст и даље ширење ове гљиве како би предузели одговарајуће мере борбе на подручјима која су захваћена процесом сушења, а и спречити њено напредовање ка подручјима која још увек нису захваћена сушењем.

Напомена: Овај рад је реализован у оквиру пројеката: „Развој технолошких иновација у шумарству у циљу реализације оптималне шумовијосити“ (ТР 31070) и „Одрживо издржавање укупним иновацијалима шума у Републици Србији“ (ТР 37008), које финансира Министарство за просвету, науку и технолошки развој Републике Србије.

ЛИТЕРАТУРА

- Aghayeva, D.N., Wingfield, M.J., de Beer, Z.W., Kirisits, T. (2004): Two new *Ophiostoma* species with *Sporothrix* anamorphs from Austria and Azerbaijan. *Mycologia* 96: 866–878.
- Brasier, C.M. (1993): The genetic system as a fungal taxonomic tool: gene flow, molecular variation and sibling species in the *Ophiostoma piceae*-*Ophiostoma ulmi* complex and its taxonomic and ecological significance, pp. 77-92, in: *Ceratocystis* and *Ophiostoma* – Taxonomy, Ecology and Pathogenicity, Ed. Wingfield, M.J., Seifert, K.A., Webber, J.F., APS Press, St.Paul, Minnesota, pp. 293.
- Brasier, C.M., Kirk, S.A. (1989): European oak decline, Status of *O. piceae* on hardwoods and conifers. Rep. For. Res. HMSO, London, pp. 47-48.
- Brasier, C.M., Stephens, T.M. (1991): Diagnostic test to distinguish species in '*Ophiostoma piceae*'. In: Report on Forest Re-search, London: HMSO. p 38-39.
- Brasier, C.M., Stephens, T.M. (1993): Temperature-growth responses distinguish the OPC and OPH sibling species within '*Ophiostoma piceae*'. *Mycol Res* 97: 1416-1418.
- Гајић, М., Тешић, Ж. (1992): Врсте рода *Quercus* Л. у Србији. Институт за шумарство, Београд III. 75.
- Georgiev, D. (1986): Species composition, morphology and certain cultural properties of the agents of the tracheomycosis on the sessile and pedunculate oak in south Bulgaria. *Gorskostopanska Nauka* 23 (6): 62-69.
- Gibbs, J. N. (1993): The biology of Ophiostomatoid Fungi causing sapstain in trees and freshly cut logs. *Ceratocystis* and *Ophiostoma*, Taxonomy, Ecology and Pathogenicity, The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota: p. 153-161.
- Glavaš, M. (1984): *Ceratocystis (Ophiostoma)* гљиве на храстовима. Шумарски лист, Загреб, 11-12: 505-512.
- Gogola, E., Chovanec, D. (1987): Podkornik dubovy a tracheomykoza dubov, Bratislava, pp.1-79.
- Golubović Ćurguz, V., Karadžić, D. (2000): Health state of oaks in Serbia. Лесотехнически Универзитет юбилеен сборник научни доклади. 75 години Висше лесотехническо образование в България: Горско стопанство, София pp. 245-253.
- Grobbelaar, J.W., Aghayeva, D.N., de Beer, Z.W., Bloomer, P., Wingfield, M.J., Wingfield, B.D. (2009) Delimitation of *Ophiostoma quercus* and its synonyms using multiple gene phylogenies, *Mycol Progress* 8: 221–236.
- Guillammin, J. (1983): Le deperissement du chene a francais: pathologie racinaire. *Biologie et foret* XXXV 6: 415-424.
- Davidson, R.W., Campbell, W.A., Blaisdel, D.J. (1938): Differentiation of Wood-decaying Fungi by the reaction ob gallic and tannic acid medium. *Jor. of Agr. Res.* Vol.57, 7: 683-695
- Delatour, C. (1986): Le probleme des *Ceratocystis* europeens des chenes. *Bulletin OEPP / EPPO Bulletin* 16: 521-625.
- Delatour, C., Morelet, M., Menard, J.E. (1994): Ophiostomas et deperissement des chenes: analyse d`une hypothese. *Revue forest. Franc.* XLVI-5: 446-452.
- Ђорђевић, П. (1926): Сушење храстових шума у Славонији. Издање Министарства шума и рудника, Београд.
- Ђорђевић, П. (1930): Bolest slavonskih hrastova *Ceratostomella merolinensis*. Издање Института за научна шумарска истраживања, Београд.
- Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L., Miller, W. (2000): A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology*, 7 (1/2): 203-214.
- Josifović, M. (1929): *Microsphaera quercina* и сушење храста у посавским шумама.
- Карадић, Д. (2010): Шумска фитопатологија. Универзитет у Београду-Шумарски факултет, 1-774.

- Караџић, Д., Михајловић, Љ., Милијашевић, Т., Кеча, Н. (2007): Заштита шума храста китњака, pp. 151-208, монографија: Храст китњак у Србији, главни уредник Љубивоје Стојановић. УШИТС Београд. pp. 498.
- Kehr, R.D., Wulf, A. (1993): Fungi associated with above-ground portion of declining oaks (*Q. robur*) in Germany. *Eur. J. For. Path.* 23: 18-27.
- Kile, G.A. (1993): Plant diseases caused by species of *Ceratocystis sensu stricto* and *Chalara* pp. 173-185.in: *Ceratocystis and Ophiostoma*, Taxonomy, Ecology and Pathogenicity, APS Press, St. Paul, Minnesota, pp.293.
- Kowalski, T. (1991): Oak decline: I. fungi associated with various disease symptoms on over-ground portions of middle aged and old oak (*Quercus robur* L.) *Eur. J. For. Path.* 21: 136-151.
- Lagerberg, T., Lundberg, G., Melin, E. (1927): Biological and practical researches into blueing in pine and spruce. *Svenska. Skogsfor. Tidskr.* 25: 145-272
- Манојловић, П. (1926): Сушење посавских храстових шума. Издање Министарства шума и рудника, Београд.
- Маринковић, П. (1992): Сушење храста китњака у североисточној Србији, узроци и последице. Округли сто "Епидемијско сушење храста китњака у североисточној Србији", Д. Милановац: pp. 7-25.
- Маринковић, П. (1987): Васкуларна микоза опасно обољење храста у Србији. Заштита природе 40: 7-22.
- Маринковић, П., Поповић, Ј., Караџић, Д. (1990): Узроци епидемијског сушења храста, значај и могућности санирања жаришта заразе. Шумарство 2-3: 7-16.
- Petrescu, M. (1974): Le deperissement du chene en Roumanie, *Eur. J. For. Path.* 4: 222-227.
- Поповић, Ј. (1987): Резултати испитивања појаве и сушења. Шумарство 5: 31-50.
- Поповић, Ј. (1992): Динамика сушења шума у Србији. Округли сто "Епидемијско сушење храста китњака у североисточној Србији", Д. Милановац: п. 65-67.
- Przybyl, K. (1992): Some aspect on *Ophiostoma roboris* (syn. *O. quercus*) studies. *Arbor. Kornickie, rocznik XXXVII*: 61-73.
- Przybyl, K., Morelet, M. (1993): Morphological differences between *Ophiostoma piceae* and *O. quercus*, and among *O. quercus* isolates. *Cryptogamie, Micol.* 14(3): 219-228.
- Quaedvlieg W., Groenewald J.Z., de Jesús Yáñez-Morales M., Crous P.W. (2012): DNA barcoding of *Mycosphaerella* species of quarantine importance to Europe. *Persoonia* 29: 101-115.
- Ragazzi, A. (1989): The oak decline: a new problem in Italy, *Eur. J. For. Path.* 19: 105-110.
- Seifert, K.A., Webber, J.F., Wingfield, M.J. (1993): Methods for studying species of *Ophiostoma* and *Ceratocystis*, pp. 255-259, in: *Ceratocystis and Ophiostoma –Taxonomy, Ecology and Pathogenicity*, Ed. Wingfield, M.J., Seifert, K.A., Webber, J.F., APS Press, St.Paul, Minnesota, pp. 293.
- Sieber, T.N. (1989): Endophytic fungi in twigs of healthy and diseased Norway spruce and white fir. *Mycol. Res.* 92: 322-326.
- Стојановић, Љ., Крстић, М., Бјелановић, И. (2005): Проредне сече у шумама храста китњака на подручју североисточне Србије. Шумарство 3. УШИТС Београд. 1-24.
- Halmschlager, E., Butin, H., Donaubauber, E. (1993): Endophytische Pilze in Blattern und Zweigen von *Q. petraea*. *Eur. Jr. For. Path.* 23: 51-63.
- Harrington, T.C., McNew D., Steimel J., Hofstra D., Farrell, R. (2001) Phylogeny and taxonomy of the *Ophiostoma piceae* complex and the Dutch elm disease fungi. *Mycologia* 93: 111-136.
- Heško, J. (1987): Priznaky a priebeh hromadneho hynutia dubov so zretelom na patogeny a vektory. *Vedecké Pracé Vyskumného Ustavu Lesného Hospodárstva vo Zvolene, Zvolen*, pp. 35-56.
- Hutchison, L.J., Reid, J. (1988): Taxonomy of some potential wood-staining fungi from New Zealand I. *Ophiostomataceae*, *N.Z. J.Bot.* 26: 63-81

- Cairney, J.W.G., Burke, R.M. (1998): Extracellular enzyme activities of the ericoid mycorrhizal endophyte *Hymenoscyphus ericae* (Read) Korf & Kernan: their likely roles in decomposition of dead plant tissue in soil, *Plant and Soil* 205: 181–192
- Škorić, V. (1926): Uzroci sušenja naših hrastovih šuma, *Glasnik za šumske pokuse* 1, Zagreb.
- Webber, J.F., Brasier, C.M. (1991): Status of *Ophiostoma piceae* on hardwoods and conifers. In: Report on Forest Research 1990. HMSO, London, UK, pp. 54-55
- Weijman, C.M., Hoog, G.S. (1975): On the subdivision of the genus *Ceratocystis*. *Antonie van Leeuwenhoek* 41: 353-360.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. (1990): Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR protocols: a guide to methods and applications (eds.: M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, T.J. White). Academic Press, San Diego, California, USA, 315–322.

IMPORTANCE OF TRACHEOMYCOTIC FUNGI IN PROCESS OF OAK TREES DECLINE IN SERBIA

*Vesna Golubović Čurguz
Ivan Milenković
Katarzyna Sikora*

Summary

Ophiostoma species are among the most important oak pathogens, which seem to be very aggressive both on young and on old trees in natural and seminatural stands, plantations or on ornamental and amenity trees in parks. Furthermore, the species belonging to this genus are widespread both in natural high forests and in uneven-aged coppice oak forests. The phenomenon of oak decline is widespread both in Europe and in Serbia, and different causes of this phenomenon have been studied. In Serbia, the areas most affected by oak decline were recorded in Eastern Serbia and *Quercus petraea* seems to be the most affected host.

The aim of this paper was to isolate and then morphologically and molecularly determine the most important tracheomycotic fungus involved in the phenomenon of oak decline in Serbia. We also aimed at determining some physiological features of the pathogenic fungi, isolated from the necrotic oak tissue in the region of Debeli Lug-Majdanpečka domena (Eastern Serbia).

For this purpose different samples of necrotic material were collected from symptomatic trees in the field and the tissue isolation was performed in the laboratory using MEA media, amended with Streptomycin and Actidion. After the classification of the obtained isolates, detailed morphological identification was performed. Besides, DNA was extracted from representative isolates and PCR and ITS sequencing were performed. In order to determine the growth rate and the optimal temperature of the obtained isolates, temperature-relation test was performed over a range of temperatures, including 6°C, 10°C, 11°C, 17°C, 18°C, 20°C, 23°C, 24°C, 26°C, 27°C and 31°C. For the purpose of determining the degree of oxidation, fragments of mycelia from pure cultures were incubated on nutrient media, amended with gallic and tannic acid, and the degree of oxidation was recorded after 8 and 14 days of incubation.

After the PCR amplification and ITS sequencing, BLAST analyses were performed in the GenBank and our sequence was identical to the first three sequences of *Ophiostoma quercus* with 99% similarity and 0% of 'Gaps' and 'Expect' values. Based on our previously obtained morphological data, sequencing results from this study, and the results of other referent studies, our isolates were identified as *O. quercus*. Furthermore, three other loci were sequenced - LSU, Actin, and Tef. The analysis of the results is still ongoing. The isolates tested in temperature-relation tests showed a wide temperature range, since they were able to grow at temperatures from 6°C to 31°C. Oxidation reaction tests showed that our isolates had a slow, but more or less equal growth on MEA media amended

with gallic and tannic acid, and based on all recorded features, the tested species belong to group 7 (seven) according to Davidson, R.W. *et al.* (1938). In these reactions, the intensity of tannic acid oxidation was slightly stronger. The most intense coloration was below the inoculum, and then it gradually decreased towards the periphery of the diffuse zone.

Based on all obtained results, we can conclude that the species isolated from the necrotic tissues of declining oak trees is *O. quercus*, and that it caused oak decline in some stands in Serbia. This species has a high tolerance to environmental conditions, and grows in a wide range of tested temperatures. Furthermore, *O. quercus* was able to oxidate in gallic and tannic acid, which means that it belongs to the group of fungi that intensively extract oxidation ferments that can lead to lignin oxidation and wood deterioration.

The presence of this pathogenic species in oak forests in Serbia poses significant risks to stability of different oak stands, and further studies into the main causes and factors of growth and spread of this fungus are required. Additional field surveys and pathogenicity tests are also required in order to determine the most suitable control measures.