

РЕПУБЛИКА СРБИЈА

Министарство пољопривреде, шумарства и водопривреде

Управа за шуме

Коначни извештај за пројекат “Тестирање клонова топола на осетљивост на патогене узрочнике сушења топола”



УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ

ИНСТИТУТ ЗА НИЗИЈСКО ШУМАРСТВО И ЖИВОТНУ СРЕДИНУ

Новембар 2021

Руководилац пројекта: Проф. др Саша Орловић

Коначни извештај за пројекат “Тестирање клонова топола на осетљивост на патогене узрочнике сушења топола”

Информације о подносиоцу пријаве пројекта	
Назив институције:	Институт за низијско шумарство и животну средину
Адреса:	Антон Чехова 13, Нови Сад
ПИБ:	104706702
Матични број:	08865248
Број рачуна:	840-159743-79

Назив пројекта:	Тестирање клонова топола на осетљивост на патогене узрочнике сушења топола
-----------------	--

Тип пројекта:	☐ Едукација и промоција ☒ Развојно истраживачки ☐ Остали пројекти
---------------	---

РУКОВОДИЛАЦ ПРОЈЕКТА	
Презиме и име:	Проф.др Саша Орловић
Телефон:	021540384
Мобилни телефон:	0641276158
e-mail:	sasao@uns.ac.rs
Функција у организацији:	директор
Напомена:	Руководилац пројекта је од 2000. године vice chair Радне групе за Оплећење и селекцију топола (Working Party on Domestication and Conservation of Genetic Resources - Formerly the Working Party on Breeding and Selection) - Организација Уједињених Нација - ФАО – Међународна комисија за тополу
ПРОЈЕКАТ ОДОБРИО (ОДГОВОРНО ЛИЦЕ)	
Презиме и име:	Др Саша Орловић
Функција у организацији:	директор

ПРОЈЕКТНИ ТИМ:			
Р.б р.	Име и презиме, звање	Потпис	Ангажовање (истраживач/месеци)
1.	Др Саша Орловић, научни саветник		1
2.	Др Милица Златковић, научни сарадник		1
3.	Др Предраг Пап, научни сарадник		0.5
4.	Др Мирослав Марковић, научни сарадник		0.5
5.	Др Владилава Галовић, научни саветник		0.5
6.	Дипл.маст. Сретен Васић, стручни сарадник		2
7.	Дипл. маст. Зоран Новчић, стручни сарадник		2
8.	Дипл. маст. Велисав Караклић, истраживач приправник		1

Предлог динамике спровођења пројекта од момента потписивања уговора	
Временски период потребан за почетак реализације пројекта:	15 дана
Временски период потребан за завршетак пројекта:	2 године
Најкаснији рок за почетак активности у пројекту (уписати датум):	01.05.2021.
Време трајања пројекта:	2 године
Да ли је пројекат наставак прошлогодишњег? (уписати да или не)	Не

Предлог износа средстава за финансирање пројекта (буџет пројекта)	
Износ укупног буџета пројекта (у ДИН):	2.921.000
Износ дела средстава за 1. годину пројекта (у ДИН):	1.461.500
Износ дела буџета пројекта који се финансира из средстава за заштиту и унапређење шума (уколико је обезбеђено суфинансирање) (у ДИН):	

Информације о јавним набавкама које су потребне за спровођење пројекта	
Износ јавних набавки у пројекту (у ДИН):	70.000,00

Садржај:

1. Увод.....	5
1а. Досадашња сазнања о етиологији болести “Бактериозни црни рак хибридних топола” у Србији.....	5
1б. Оплеменењавање на отпорност према проузроковачима болести као најбитнија мера интегралне заштите хибридних топола.....	7
2. Циљеви пројекта.....	8
3. Оснивање пољског огледа на подручју ШГ Београд.....	9
4. Производња инокулума патогених микроорганизама методом <i>in vitro</i>	10
4а. Инокулум патогене бактерије <i>Lonsdalea populi</i>	10
4б. Инокулум патогене гљиве <i>Neocosmospora solani</i> (<i>Fusarium solani</i>) sensu lato.....	12
5. Инокулација клонова топола на подручју ШГ Београд.....	14
6. Оцена осетљивости клонова топола према патогеним микроорганизмима.....	16
7. Оцена осетљивости клонова топола према фитопатогеној бактерији <i>Lonsdalea populi</i>	17
8. Оцена осетљивости клонова топола према фитопатогеној гљиви <i>Neocosmospora solani</i> sensu lato.....	26
9. Закључна разматрања и предлози.....	29

1. Увод

1а. Досадашња сазнања о етиологији болести “Бактериозни црни рак хибридних топола” у Србији

Током 2018. године дошло је до појаве симптома нове болести у засадима хибридних топола у Србији. Симптоми су најпре констатовани на подручју ШГ „Банат“ – Панчево и карактерише их појава рак рана са једном или више уздужних пукотина које подсећају на огреботине, тзв. “мачје канџе”. Долази до одбрамбеног одговора биљке на напад патогена те формирања веће количине калусног ткива и последично као резултат борбе биљке и патогена пукотине прерастају у праве отворене рак ране које се могу јавити на стаблу, или на гранама, при чему су најчешће у основи грана и круне. Ове на изглед “суве” рак ране (ткиво испод коре рака је суво и некротирано) јављају се претежно у пролеће и њихова појава праћена је незнатним истицањем биљних сокова који су последица реакције биљке на напад патогена и интензивнији су код клонова делтоидних топола (Eucaryota: Spermatophyta: Salicaceae: Aigeiros). Наша досадашња истраживања показала су да рак узрокује комплекс патогених гљива из родова *Neocosmosora* и *Fusarium* (Fungi: Ascomycota: Hypocreales: Nectriaceae). Гљиве могу прстеновати стабло и довести брзо до његовог сушења (пример сушења великог броја стабала на почетку епидемије на подручју ШГ “Банат-Панчево”), али најчешће биљке успевају да одоле нападу патогена.

У даљем току вегетационог периода, у периодима који су праћени високом релативном влагом ваздуха и температурама (најчешће током лета, али и у пролеће и јесен, у зависности од временских прилика у датој години), рак ране почињу да “цуре”. Из пукотина избија беличасти, пенасти ексудат који настаје као последица исхране фитопатогене бактерије *Lonsdalea populi* (Bacteria: Proteobacteria: Enterobacteriales: Pectobacteriaceae), тј. ферментације угљених хидрата (шећера) из биљних сокова током које долази до ослобађања угљен-диоксида (CO₂). Такође, као последица брзе репродукције бактерије и њене експлоатације спроводног ткива долази и до обилног истицања сокова биљке који су најпре безбојни, а затим на ваздуху оксидишу и попримају црвенкасту нијансу. Истицање биљних сокова је опет најизраженије код врста са широким луменима, односно код клонова делтоидних топола. Услед обилног истицања биљних сокова кора стабала поприма црну, гараву боју, па се стиче утисак као да је кора спржена ватром, тзв. “бактериозни црни рак”. На почетну гљивичну инфекцију надовезује се бактеријска. Инфицирано дрво испод коре је некротирано, и трули уз јак непријатан мирис трулежи (последица ферментних активности бактерије).

Бактеријска инфекција се може јавити и самостално, у периодима повољних временских прилика за инфекцију (топло и кишовито време). У том случају оболело ткиво уздужно пуца а појави уздужних пукотина на гранама млађих

стабала претходи појава пликова на кори а често и компактних туморастих задебљања (услед интензивне деобе биљних ћелија под утицајем бактерије која вероватно производи хормоне раста). Тумораста задебљања у периоду повољних услова за инфекцију и последично брзог размножавања бактерије “пуцају” ослобађајући милионе бактеријских ћелија у виду пенастог беличастог ексудата. Ова појава праћена је обилним истицањем биљних сокова (поготову код делтоидних топола), кора поприма загасито црну боју, а дрво испод коре је труло, меко и влажно, кашасто (бактерија највероватније производи ензиме који разлажу средњу ламелу), натопљено беличастим лепљивим ексудатом и са изразитим непријатним мирисом. Специфичност “чистог” бактеријског рака која га издваја од оног узрокованог гљивама јесте да оболело дрвно ткиво испод коре често трули и без видљивих некроза и промене боје у смеђу или тамно смеђу.

Да ова комплексна болест буде још комплекснија, инфекције хибридних топола у неким случајевима бивају удружене и са инфекцијама других гљивичних патогена, у првом реду са *Botryosphaeria dothidea* (Fungi: Ascomycota: Botryosphaeriales: Botryosphaeriaceae), *Cytospora* spp. (више врста), и офиостоматоидним гљивама, узроковачима васкуларног сушења и плаветнила дрвета (редови Ophiostomatales и Microascales, Fungi: Ascomycota).

У расадницима, на младим једногодишњим биљкама долази до појаве туморастих задебљања биљног ткива који са развојем болести пуцају ослобађајући бели лепљиви ексудат. Током наших предходних истраживања из симптоматичног биљног ткива младих биљака изоловане су бактерија *L. populi* и патогена гљива *Neoscomospora solani* (*Fusarium solani*) sensu lato. Тако да је један од циљева овог пројекта био да се утврди да ли патогена бактерија *L. populi* може сама произвести симптоме болести који су присутни у расадницима топола у Србији, или је за њихову појаву ипак неопходна и придружена инфекција гљиве *N. solani*?

Болест се на нове површине шири великом брзином, јер су узрочници болести земљишни и ваздушни патогени, чије се ћелије (бактерија), односно споре (гљиве), преносе на нове просторе на различите начине и то земљиштем, водом, ваздушним струјањима, контаминираним алатом, обућом, механизацијом, итд. Такође, ферментна активност бактерије током које долази до разлагања шећера привлачи различите инсекте (стенице, бубамаре, гусенице кукурузне совице и др.), чиме засади и расадници хибридних топола постају “менза” за инсекте који су потенцијални преносиоци болести на нова стабла и површине. Познато је да узрочници болести презимљавају унутар рак рана и/или на мртвом дрвенастом материјалу биљке домаћина на земљи, као и да су се климатске прилике у Србији измениле, да су климатски екстреми све учесталији што негативно утиче на све биљне врсте, укључујући и тополу. Све ово додатно чини проблем сложенијим и захтева комплексна, интегрална решења заштите.

1. Увод

1б. Оплећењивање на отпорност према проузроковачима болести као најбитнија мера интегралне заштите хибридних топола

Обим штета услед појаве сушења стабала хибридних топола захтева континуирани рад на проналажењу адекватних мера заштите, које морају бити ефикасне, одрживе, и прихватљиве од стране узгајивача топола. Садња клонова отпорних* на патогене микроорганизме најбоља је мера заштите топола од болести, и представља један од најважнијих циљева у програмима селекције и оплећењивања топола. Да би уопште дошло до инфекције, патоген мора препознати домаћина, тј. дати генотип биљке мора бити осетљив на дати генотип патогена (биљка и патоген морају одговарати једно другоме као кључ и брава), а услови спољашње средине морају бити такви да су погодни за настанак инфекције (тзв. троугао болести).

Осетљивост/отпорност једног клона утврђује фитопатолог/селекционер према сојевима патогена (генотиповима) који су у том подручју заступљени. Стога је тестирање осетљивости клонова методом инокулације познатим и на савремени начин идентификованим сојевима патогена (методама молекуларне генетике), први и непосредни корак селекције потенцијално отпорних генотипова топола. Тестирање клонова значајно је и због тога што ће оплећењивање бити успешно једино у ситуацији да постоји извесна варијабилност генотипова са аспекта отпорности на патогена, што даље омогућава селекцију.

Резултати тестирања клонова на бази фенотипских карактеристика представљају “камен темељац” даљих истраживања генетичких основа отпорности која би нам указала на то у којој је мери отпорност на патогена фиксна, наследна особина која не испољава пластичност у зависности од услова спољашње средине. У случају да отпорност на патогена одређеног генотипа тополе није генетички условљена већ да у највећој мери зависи од спољашњих фактора (нпр. од температуре и влажности ваздуха у периоду када патоген покушава остварити инфекцију), наставило би се даљом потрагом и тестирањем потенцијално отпорних клонова уз комбинацију других метода за контролу болести. Уколико је пак отпорност генетичке природе даља истраживања била би усмерена ка утврђивању броја генетичких локуса задужених за отпорност биљке.

Највећи изазов у оплећењивању на отпорност према проузроковачима болести јесте њена одрживост обзиром да су популације патогених микроорганизма динамичне и склоне сталним мутацијама у тежњи да превазиђу одбрамбене механизме биљке домаћина. Такође, да би били прихваћени од стране

узгајивача топола, тзв. “супериорни” генотипови отпорни на болест морају бити и одговарајуће продуктивности, али и у могућности да се носе са све чешћим климатским екстремима, какви су нпр. глобално више температуре и промене у интензитету и дистрибуцији падавина током календарске године. Стога су резултати овог пројекта само почетак комплексних мултидисциплинарних научних истраживања која би требало да обухвате и популациону генетику патогена, епидемиологију саме болести, анализе станишта, али и имплементацију осталих мера заштите, укључујући и еколошки прихватљиве биолошке и узгојне мере борбе, као и савремене биотехнолошке методе заштите биља. Наиме, селекција генотипова на бази фенотипских карактеристикама основа је и даљег убрзаног генетичког оплемењивања на отпорност према проузроковачима болести.

*Под појмом “отпорност” у овом тексту подразумева се мала осетљивост биљке на датог патогена, укључујући и толеранцију као и све механизме “избегавања” патогена од стране биљке, што чини саставни део еволуције на релацији патоген-биљка домаћин.

2. Циљеви пројекта

Циљеви овог пројекта били су:

1. Да се методом вештачке инокулације различитих клонова топола из колекције генотипова Института за низијско шумарство и животну средину Универзитета у Новом Саду провери њихова осетљивост према патогеним микроорганизмима проузроковачима болести топола, и то према патогеној бактерији *Lonsdalea populi* и патогеној гљиви *Neocosmospora solani* sensu lato да би се отпорни клонови регистровали и како би се од њих оснивали засади топола.
2. Да се утврди да ли патогена бактерија *L. populi* може сама произвести симптоме болести који су присутни у расадницима топола у Србији, или је за њихову појаву ипак неопходна и придружена инфекција гљиве *N. solani*?

За реализацију ових циљева биле су планиране следеће активности:

1. Оснивање пољског огледа на подручју ШГ Београд
2. Производња инокулума патогених микроорганизма методом *in vitro*
3. Инокулација једногодишњих клонова топола методом вештачке инокулације стабала у пољским условима
4. Оцена осетљивости клонова топола према фитопатогеној бактерији *Lonsdalea populi* и фитопатогеној гљиви *Neocosmospora solani* sensu lato

3. Оснивање пољског огледа на подручју ШГ Београд

На подручју ЈП „Србијашуме“, ШГ Београд, ШУ Рит основан је пољски оглед од шест клонова топола са циљем тестирања њихове осетљивости према фитопатогеној бактерији *Lonsdalea populi* и фитопатогеној гљиви *Neocosmospora solani* sensu lato. Пољски оглед је основан у пролеће 2021. године тако што је засађено по 20 резница клонова еурамеричке (*Populus x euramericana*) и америчке црне тополе (*Populus deltoides*). У огледу су спровођене редовне мере неге и заштите након оснивања односно сузбијање корова и редовно заливање.



Слика 1. Пољски оглед на подручју ШГ Београд

4. Производња инокулума патогених микроорганизама методом *in vitro*

4a. Инокулум патогене бактерије *Lonsdalea populi*

Бактеријски инокулум у овом експерименту чиниле су ћелије бактерије *L. populi*. Ћелије *L. populi* су “пробуђене” засејавањем на триптон соја агар микробиолошку подлогу (ТСА), састава:

триптозни пептон¹- добијен хидролизом² протеина казеина ензимима панкреаса,
соја пептон,
натријум хлорид³,
декстроза (д-глюкоза)⁴,
дикалијум хидроген фосфат⁵,
агар⁶,
дестилована вода,
рН= 7.3

Педесет микролитара ћелијске суспензије распоређено је л-штапићем на ТСА подлогу, а Петријеве шоље су смештене у микробиолошки инкубатор на температуру од 30°C. Двадесет и четири часа након инокулације појединачне колоније инокулисане су у стерилне Фалкон тубе за узгој аеробних микроорганизама у које је предходно додата течна ТСА подлога. Инокулисане тубе су мућкане 24h у микробиолошком инкубатору са шејкером на температури од 30°C до потпуног замућења подлоге (Слика 2).

Након тога, ћелије су центрифугиране, па суспендоване у фосфатном пуферу (ПБС) са додатком адхезионог средства, састава:

натријум хлорид,
калијум хлорид,
динатријум хидроген фосфат,
калијум дихидроген фосфат,
дестилована вода,
рН= 7.4
адхезионо средство

Пуфер одржава у инокулуму рН вредност константном, и чини да ћелије буду виталне током дужег временског периода, док адхезионо средство омогућава боље приањање ћелија на инокулисану биљну површину. Инокулум је серијски

разблажен до 1×10^{-8} јединица за формирање колонија (CFU)/ml уз помоћ Мек Фарландове скале за процену замућења бактеријске суспензије. Бактеријска суспензија је затим пребачена у 2ml Епендорф микро тубе и пренета у ручном фрижидеру на огледну површину. Такође, педесет микролитара ћелијске суспензије засејано је л-штапићем на ТСА подлогу (укупно 10 Петријевих шоља са подлогом) која је смештена на температуру од 30°C и након 24h извршена је процена квалитета припремљеног инокулума.

¹ Пептон означава производ настао разградњом (хидолизом) протеинског ланца и у ТСА подлози је извор хранљивих супстанци неопходних за раст микроорганизама

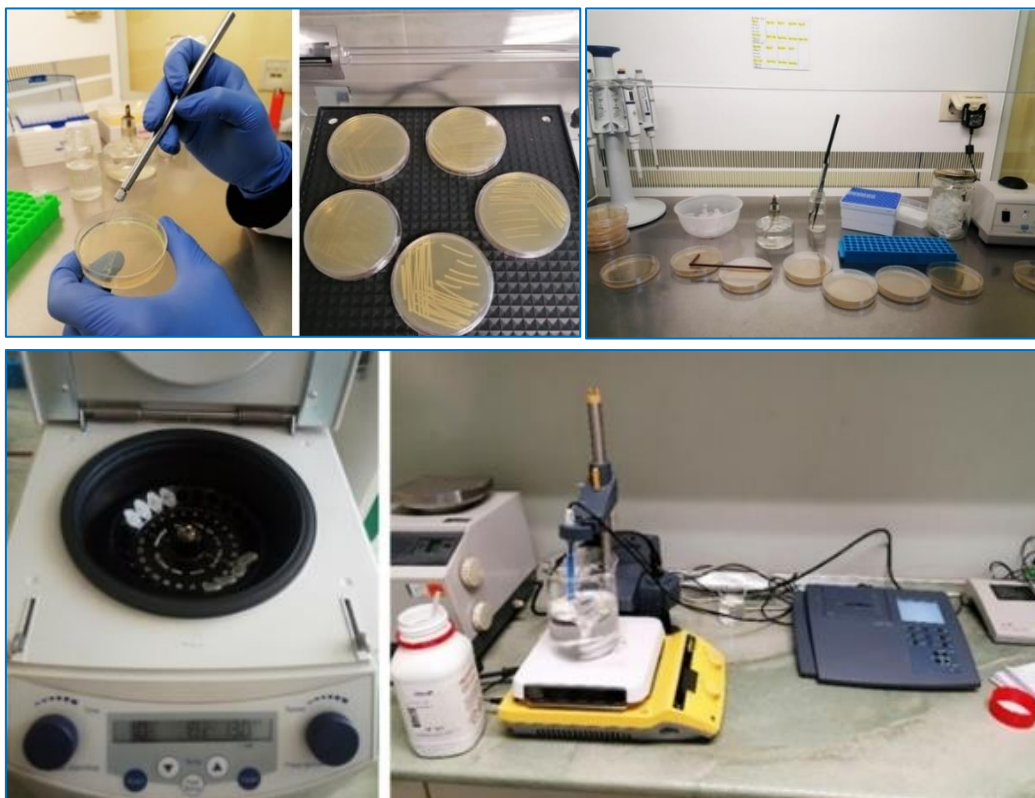
² Хидролиза протеина је процес током ког долази до раскидања пептидних веза између две аминокиселине у полипептидном ланцу те се протеински ланац разграђује тј. сецка на мање делове који су микроорганизмима приступачни за усвајање

³ У подлози одржава осмотску равнотежу

⁴ Моносахарид који је лако усвојив и у ТСА подлози представља извор енергије

⁵ У подлози има улогу пуфера (спречава драстичне промене рН вредности подлоге у току ферментације угљених хидрата или коришћења пептона од стране микроорганизама)

⁶ Омогућава очвршћавање подлоге



Слика 2. Припрема инокулума бактерије *Lonsdalea populi*

4. Производња инокулума патогених микроорганизама методом *in vitro*

46. Инокулум патогене гљиве *Neocosmospora solani sensu lato*

Инокулум гљиве у овом експерименту представљале су споре патогене гљиве *Neocosmospora solani* (претходни назив *Fusarium solani*) *sensu lato*. Мицелија гљиве “пробуђена” је засејавањем на 2% малт екстракт агар подлогу састава:

малт екстракт,
миколошки пептон,
агар,
дестилована вода,
pH= 5.2

при чему малт екстракт пре свега садржи угљене хидрате и то највише дисахарид малтозу а затим и моносахариде (глукоза, фруктоза) који су извор енергије, док су миколошки пептони извор азота, витамина, минерала, аминокиселина и других фактора раста микроорганизама. Ниска Рh вредност обезбеђује киселу средину која је погодује развоју гљива које су ацидотолерантне (толеришу широки распон Рh вредности: 5-9), али је неповољна за развој бактерија које преферирају алкалну средину.

Након две недеље пораста у микробиолошком инкубатору на температури од 22 °C у мраку исечци мицелије пребачени су у стерилне Ерленмајер боце са течном кромпир декстроза агар подлогом (ПДА) састава:

екстракт кромпира,
декстроза,
агар,
дестилована вода,
pH= 5.1

Ерленмајер боце затворене су парафилмом и алуминијумском фолијом и пребачене у микробиолошки шејкер са инкубатором где су на температури од 25 °C мућкане 72h до потпуног замућења подлоге. Додатно, исечци мицелије стављани су у Фалкон тубе за култивацију аеробних микроорганизама и мућкани на исти начин (Слика 3).

Подлога је затим процеђена кроз троструку стерилну газу како би се у што већој мери уклониле споре које клијају. Инокулум је разређен до концентрације од

1×10^{-8} спора/ml дестилованом водом са додатком адхезионог средства, уз помоћ хемоцитометра и формуле разблаживања:

$$C1 * V1 = C2 * V2$$

при чему је: C1= концентрација почетног, концентрованог раствора; V1= почетна запремина; C2= концентрација финалног, разблаженог раствора; V2= коначна запремина.

Проверен је и квалитет спора и поступак је понављан до добијања суспензије са спорама које не клијају. Инокулум је одмах пребачен у ручни фрижидер и однет на огледну површину. Такође, 50µl инокулума засејано је на MEA подлогу ради провере квалитета инокулума и клијавости спора. Квалитет је потврђен посматрањем иницијалних хифа под стерео микроскопом три дана након инокулације.



Слика 3. Припрема инокулума гљиве *Neocosmospora solani* sensu lato

5. Инокулација једногодишњих клонова топола методом вештачке инокулације биљака у пољским условима

Вештачком инокулацијом проверена је реакција пет клонова топола према патогеној бактерији *L. populi* и патогеној гљивици *N. solani sensu lato*. За инокулацију су коришћени сојеви *L. populi* и *N. solani sensu lato* изоловани из *Populus × euramericana* cl. I-214 који су у претходним истраживањима испољили изразиту патогеност према *P. euramericana*. Биљке су инокулисане у доњем делу стабла тако што је кора најпре површински стерилисана 70% етанолом, а затим је претходно стерилисаном зумбом направљена рана у коју је пипетом убризгано 30µl инокулума. Ране су затворене парафилмом како би се спречила њихова контаминација и исушивање. Контролне биљке су озлеђене на исти начин као и инокулисане биљке, али у њих није убризгаван инокулум (Слике 4-6). Инокулација клонова топола бактеријом *L. populi* извршена је 24. августа 2021. године, док је инокулација гљивом *N. solani sensu lato* извршена 22. септембра 2021. године. Оцена осетљивости извршена је месец дана након инокулације.



Слика 4. Припрема за инокулације



Слика 5. Инокулације



Слика 6. Инокулације

6. Оцена осетљивости клонова топола према патогеним микроорганизмима

Идентификација фитопатогених бактерија/гљива као изазивача обољења на биљкама прилично је дуготрајан и компликован посао. Слика симптома болести на терену само је једна од смерница у дијагностици. У основи свега је примарни изазивач болести праћен бројним сапрофитним врстама које насељавају изумрло ткиво и убрзавају његово пропадање, на тај начин маскирајући главног узрочника болести.

Најважнија карактеристика неке патогене бактерије/гљиве којој биљка служи као храна и простор за развој и размножавање јесте њена патогеност, односно способност да изазове болест. За доказивање патогености фитопатогене бактерије/гљиве, а последично и оцену осетљивости различитих клонова топола на осетљивост према датој бактерији/гљиви у овим истраживањима коришћена су правила позната као **Кохови постулати** који у ширем смислу подразумевају да је:

1. фитопатогена бактерија/гљива константно присутна у зараженом ткиву
2. да се фитопатогена бактерија/гљива микробиолошким техникама *in vitro* издвоји из оболелог ткива и одгаји у чистој култури на вештачкој хранљивој подлози (**изолација**)
3. да се добијеном чистом културом вештачки зарази здрава биљка исте врсте као што је била она са које је бактерија изолована, са циљем понављања идентичних симптома (**инокулација**)
4. да се из вештачки заражене (инокулисане) биљке поново изолује бактерија/гљива и одгаји у чистој култури методом *in vitro* (**реизолација**)
5. да се све особине изолата и реизолата подударају

Тек по завршетку свих ових операција може се поставити дијагноза, односно утврдити да је баш та бактерија/гљива изазвала болест. Такође, могу се утврдити и разлике у осетљивости различитих генотипова исте врсте према датом микроорганизму, а реципрочним инокулацијама могуће је и установити и да ли дата фитопатогена бактерија/гљива може узроковати болест и на другим филогенетски блиским или даљим врстама, као и разлике у осетљивости различитих генотипова филогенетски блиске или даље биљне врсте. Ова информација од кључног је значаја за утврђивање степена опасности од појаве одређеног штетног микроорганизма, прогнозу штета које се од датог организма

могу очекивати, и што је најважније неопходна је за израду одговарајућег плана заштите биљака од напада патогена.

7. Оцена осетљивости клонова топола према фитопатогеној бактерији *Lonsdalea populi*

Тест патогености различитих клонова топола са циљем утврђивања степена њихове осетљивости према фитопатогеној бактерији *Lonsdalea populi* показао је да постоје значајне разлике у њиховој осетљивости према *L. populi*.

Тест патогености показао је да је **клон K1** није осетљив на инфекције *L. populi*. Инокулисане биљке нису показивале симптоме бактеријске инфекције; озледне ране су биле суве и затворене калусним ткивом. Уздужни пресек инокулисаних биљака је показао мале некрозе само у оквиру места инокулације и које статистички нису биле значајно веће од оних присутних на контролним биљкама. Из ових некроза фитопатогена бактерија *L. populi* није изолована, а није изолована ни из контролних биљака. Мале некрозе око места инокулације уобичајени су одговор биљке на трауму изазвану озлеђивањем (Слика 7).

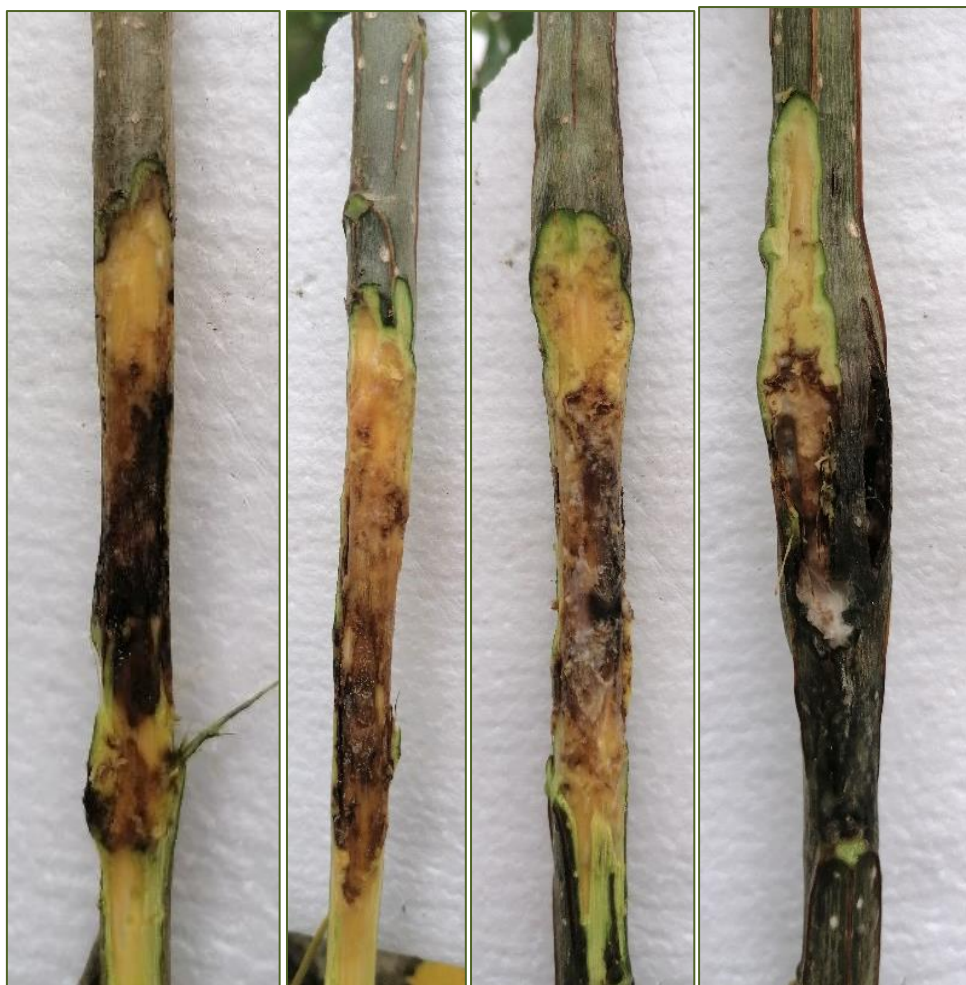


Слика 7. Клон K1. Са лева на десно: Калусирана и затворена озледна рана инокулисане биљке; уздужни пресек инокулисане биљке; негативна контрола

Клон K2 био је осетљив на инфекцију фитопатогеном бактеријом *L. populi*. Месец дана након инокулације на биљкама су биле видљиве рак ране са компактним туморастим задебљањима (примарним-на месту инфекције али и већим бројем секундарних-која су била удаљена од места инфекције), црном кором због сливања и оксидације биљних сокова, и кремастим, пенастим (услед ферментације бактерије), лепљивим беличастим ексудатом бактеријских ћелија (Слика 8). Оболело дрвно ткиво је било меко, влажно, кашасто, и са јаким непријатним мирисом трулежи. Највећи део инфицираног ткива је био смеђе боје, мада су ивични делови туморастих творевина били трули и кашасти без промене боје дрвета (Слика 9). Ферментација шећера привукла је стрижибубе (Слика 10). *L. populi* је успешно ре-изолована из симптоматичног ткива инокулисаних биљака, и није изолована из контролних биљака чије су озледне ране биле затворене калусом и без симптома болести.



Слика 8. Клон K2. Рак ране са компактним туморастим задебљањима, црном кором и пенастим беличастим ексудатом



Слика 9. Клон К2. Оболело дрвно ткиво је кашасто, меко, влажно, натопљено беличастим лепљивим бактеријским ексудатом



Слика 10. Клон К2. Стрижибуба у “мензи”

Резултати теста показали су да је **клон К3** осетљив на инфекцију *L. rogulii*. Слично као и код клона К2, инокулација биљака ћелијама фитопатогене бактерије *L. rogulii* довела је до образовања влажних рак рана са црним кором, беличастим ексудатом и компактним туморастим задебљањима (примарним и секундарним, Слика 11). Испод коре дрво је било влажно, меко и са лепљивим беличастим ексудатом, труло са или без појаве посмеђивања дрвета, и са изразитим непријатним мирисом трулежи (Слика 12). Озледне ране на контролним биљкама су биле зацелиле калусом, и на њима нису примећени симптоми болести (Слика 13). Бактерија је успешно ре-изолована из инокулисаних биљака, и није изолована из негативних контрола.



Слика 11. Клон К3. Рак ране са црном кором, туморастим задебљањима и бактеријским ексудатом



Слика 12. Клон КЗ. Рак ране са црном кором, туморастим задебљањима и бактеријским ексудатом



Слика 13. Клон КЗ. Негативна контрола

Клон К4 такође је био осетљив на инфекцију *L. populi*. Месец дана након инокулације инокулисане биљке су биле са рак ранама, туморастим задебљањима дрвенастог ткива (примарним и секундарним), црном кором и изливом беличастог ексудата (Слика 14). Дрво испод коре је било труло, некротирано или само кашасто, меко и натопљено беличастим лепљивим ексудатом, непријатног мириса (Слика 15). Инокулисане биљке посеђивао је већи број стеница које је привукла ферментација шећера (Слика 14). Контролне биљке су биле без симптома болести (рака рана, туморатих задебљања, бактеријског ексудата, итд.). Негативне контроле имале су једино незнатну дисколорацију дрвета на месту инокулације као резултат озледе зумбом. На инокулисаним биљкама запажени су симптоми болести идентични онима виђеним на биљкама у расадницима током природних инфекција. *L. populi* успешно је изолована из симптоматичног ткива инокулисаних биљака, и није изолована из негативних контрола чиме су испуњени Кохови постулати (Слика 16).



Слика 14. Клон К4. Рак ране са стеницама, црном кором, туморастим задебљањима и беличастим бактеријским ексудатом



Слика 15. Клон К4. Дрво у процесу труљења са некрозама, и кашасто натопљено беличастим бактеријским ексудатом



Слика 16. Клон К4. Негативна контрола без симптома болести

Резултати теста инокулације показали су да је и **клон К5** осетљив на фитопатогену бактерију *L. rostrupii*. На инокулисаним биљкама формирале су се рак ране са туморастим задебљањима (примарним и секундарним), кором често црном од сливања и оксидације биљних сокова, и са белим ексудатом (Слика 17). Дрво испод коре оболелог ткива било је као и код клонова К2, К3 и К4 кашасто, меко, претежно некротирано, са беличастим ексудатом и непријатним мирисом (Слика 18). Контролне биљке биле су без симптома болести и из њих није изолована фитопатогена бактерија *L. rostrupii*. *L. rostrupii* успешно је ре-изолована из инокулисаних биљака (третмана), те су Кохови постулати били испуњени (Слика 19).



Слика 17. Клон К5. Рак ране са туморастим задебљањима, бактеријским ексудатом и црном кором



Слика 18. Клон К5. Кашасто дрво испод коре, некротирано и са бактериским ексудатом



Слика 19. Клон К5. Контролна биљка без симптома болести

Овај тест показао је и да бактерија *L. populi* може без садејства гљиве произвести симптоме болести какви су и уочени у расадницима у Србији на једногодишњим биљкама. Додуше, уз претходну озледу биљке и директни контакт инокулума са спроводним судовима. Због тога не можемо у потпуности искључити могућност претходног дејства абиотичког и/или биотичког фактора који би бактерији отворио пут ка васкуларном ткиву биљке. Неопходно је спровести додатне инокулације, детаљна хистопатолошка и молекуларна истраживања како би се добила још прецизнија слика о патогенези *L. populi* на клоновима хибридних топола у Србији.

Уочене разлике у осетљивости показују да се примењени метод вештачке инокулације једногодишњих биљака топола суспензијом ћелија бактерије може успешно користити за почетне информације о осетљивости различитих клонова топола на инфекције *L. populi*.

7. Оцена осетљивости клонова топола према фитопатогеној гљиви *Neocosmospora solani sensu lato*

Тест патогености различитих клонова топола са циљем утврђивања степена њихове осетљивости према фитопатогеној гљиви *Neocosmospora solani sensu lato* (претходни назив гљиве: *Fusarium solani sensu lato*) показао је да постоје разлике у њиховој осетљивости према *N. solani*.

Месец дана након инокулације код свих инокулисаних клонова дошло је до развоја смеђе обојености дрвета (дисколорације дрвета) која је уобичајени симптом инфекције фитопатогеним гљивама, и била је запажена на симптоматичним биљкама у условима природних инфекција на терену. Међутим, клонови К4 и К5 били су мање осетљиви јер је развој гљиве, а тиме и смеђа обојеност била заустављена образовањем сепарацијског секундарног меристема којим биљка настоји да локализује инфекцију, спречи ширење патогена и његових токсина и преставља хистолошку одбрамбену реакцију биљке. Није било статистички значајне разлике између дужине смеђе обојености дрвета клонова К4 и К5, али је смеђа обојеност код клонова К1, К2 и К3 била статистички значајно већа у односу на дужину обојености код клонова К3 и К4 (код ових клонова даљи развој инфекције био је заустављен калусним ткивом, слике 20-24).

Фитопатогена гљива *N. solani sensu lato* успешно је ре-изолована из симптоматичног ткива инокулисаних биљака, али не и из контрола, чиме су испуњени Кохови постулати.



Слика 20. Клонови К1, К2, К3 (са лева на десно). Смеђа обојеност дрвета



Слика 21. Клон К4. Смеђа обојеност дрвета са јасном сепарацијом оболелог и на изглед здравог ткива



Слика 22. Клон К5. Смеђа обојеност дрвета са јасном сепарацијом оболелог и на изглед здравог ткива



Слика 23. Клонови К1-К5 (са лева на десно). Контролне биљке без симптома болести



Слика 24. Оцена осетљивости

8. Закључна разматрања и предлози

Дрво меких лишћара а поготово хибридних топола је изузетно тражено јер на територији Србије постоје значајни капацитети за механичку прераду дрвета ових врста. Један од разлога за добро пословање делова јавних предузећа за газдовање шумама је и тај што имају засаде меких лишћара. Из тог разлога било какав поремећај процесу производње меких лишћара изазива не мале последице. Гајење меких лишћара као најинтензивнији део шумарске производње у основи има сортни (тестиран) репродуктивни материјал који је настаје оплемењивањем а повезан је са отпорношћу сортног материјала на патогене микроорганизме, проузроковаче болести. Стога је неопходно континуирано радити на стварању нових сорти како би се увек било „корак“ испред патогена и онемогућити му да превазиђе отпорност биљке. Ова константна борба патогена и биљке домаћина данас се релативно лако, спојем класичних и савремених молекуларних метода усмерава у правцу погодним за биљку а погубним по патогена. Гајењем отпорних, односно мање осетљивих генотипова постиже се одрживост производње што позитивно утиче на пословање, економске ефекте газдовања као и на предузећа за прераду дрвета меких лишћара.

Резултати овог истраживања показали су да постоје разлике у осетљивости различитих клонова топола на инфекције фитопатогеном бактеријом *L. populi* и фитопатогеном гљивом *N. soloani sensu lato*. Показали су такође да се метод вештачке инокулације клонова топола у пољским условима може успешно користити као почетна смерница у селекцији отпорних генотипова топола, а одабирање генотипова топола које су отпорне на узрочнике сушења, као и њихова регистрација у категорији тестираног шумског репроматеријала омогућиће гајење топола на површинама на којима је констатовано сушење као и на новим површинама.

Неопходно је што пре наставити са тестирањем клонова топола, тестирати што већи број различитих генотипова, али и још једном тестирати постојеће клонове како би се добили што меродавнији подаци о осетљивости обзиром да је она делом условљена и факторима спољашње средине. Такође, неопходно је спровести интердисциплинарна истраживања свих аспеката патологије клонова топола укључујући пре свега хистопатологију оболелих ткива, а затим и хемијске, физиолошке и молекуларне основе отпорности биљака према патогенима. Од изузетне је важности спровести и истраживања осталих аспеката интегралне заштите топола, укључујући и хемијске и биолошке мере заштите. Надамо се да ће Управа за шуме препознати потребу за наставком финансирања ових комплексних истраживања која су од кључног значаја за решавање проблема сушења хибридних топола у Србији.

Руководилац пројекта и одговорно лице:

Проф. др Саша Орловић, директор Института за низијско шумарство и животну средину