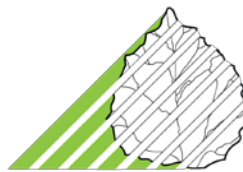


РЕПУБЛИКА СРБИЈА

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 2022

Руководилац пројекта: Проф. др Саша Орловић

Садржај:

1. “Бактериозни црни рак”: прва бактериоза у засадима топола у Србији и Југоисточној Европи.....	3
2. Циљеви пројекта.....	5
3. Оснивање пољског огледа на подручју ШГ Београд.....	6
4. Припрема инокулума бактерија <i>Lonsdalea populi</i> и <i>Brenneria</i> spp. методом <i>in vitro</i>	7
5. Инокулација једногодишњих клонова топола методом вештачке инокулације биљака у пољским условима.....	11
6. Оцена осетљивости клонова топола према фитопатогеној бактерији <i>Lonsdalea populi</i> и бактеријама из рода <i>Brenneria</i>	14
6а. Оцена осетљивости клонова топола према фитопатогеној бактерији <i>Lonsdalea populi</i>	19
6б. Оцена осетљивости клонова топола према бактеријама из рода <i>Brenneria</i>	30
7. Закључна разматрања и предлози.....	40
8. Захвалница.....	42

1. “Бактериозни црни рак”: прва бактериоза у засадима топола у Србији и Југоисточној Европи

У другом делу вегетационе сезоне 2018. године дошло је до појаве нове болести у засадима хибридних топола у Србији. Симптоми болести били су необични и до сада невиђени у шумарству ове земље. Болесна стабла су “цурила” и “пенила”, а њихова кора је била угљасто црне боје, те су се могла лако уочити и са велике дистанце. Детаљне микробиолошке, биохемијске, молекуларно-филогенетске и патолошке анализе показале су да је узрочник овог феномена фитопатогена бактерија *Lonsdalea populi* (Bacteria: Proteobacteria: Enterobacteriales: Pectobacteriaceae).

Најдраматичније је у засадима делтоидних топола (*Populus deltoides* Bartr.) где је истицање биљних сокова нарочито изражено а последица је ферментних активности бактерије које доводе до повећања притиска унутар стабла и последично истицања сокова спроводних судова кроз пукотине и лентицеле. Врсте овог рода имају шире лумене спроводних судова, те већу ефикасност транспорта воде и минералних материја, већи интензитет фотосинтезе и прираст. Али су у условима суше, дуготрајног плављења и других фактора стреса абиотичке природе подложније кавитацији и емболизму (стварању ваздушних џепова унутар ксилема), што може довести до застоја у протоку биљних сокова, веће осетљивости на штетне факторе биотичке природе (патогене и инсекте) и сушења стабала. Кавитацију и емболизам могу својим присуством изазвати и васкуларни патогени (нпр. патогени из фамилије *Botryosphaeriaceae* који својим присуством физички запушавају спроводне судове али и иритирају паренхиматичне ћелије да производе гумозне материјетиле), али је функционална анатомија стабала тополе заражених патогеном бактеријом *L. populi* још увек непознаница.

Биљни сокови на ваздуху оксидишу, попримају тамну црвенкасто-црну нијансу, те кора стабла постаје црна и делује као да је “спаљена”. “Црна” стабла најлакше се уочавају у засадима *Populus x euramericana* јер клонови ове врсте у младости већином имају природно глатку кору. Инфицирано дрво испод коре често је тамно смеђе, некротирано и влажно, али и жућкасто беличасто, мекано, влажно, а у последњим фазама разградње са вретенастим шупљинама испуњеним кремасто белом, лепљивом, кашастом масом и изразито непријатног мириса. Оваква конзистенција дрвета типична је за бактеријску тзв. “влажну” трулеж где бактерија пектолитичким ензимима (тзв. пектиназама) разлаже пектине који су основни састојак средње ламеле која повезује суседне ћелије. Овакво дрво неупотребљиво је у преради дрвета јер долази до његовог исушивања и пуцања.

Кора заражених стабала често уздужно пуца, а на попречном пресеку дрво је мокро те делује дисколорисано. Бактерија се кроз стабло креће спроводним судовима (трахеобактериоза), и екипа истраживача из Кине детектовала је методом ланчане реакције полимеразом у реалном времену бактерију у флоемском проводном ткиву биљака. Ипак, не треба искључити ни могућност да бактерија користи ксилем као средину за раст и развој јер су наша истраживања показала да бактерија доводи до појаве физички неповезаних вишеструких туморастих задебљања и рак рана који се јављају увек изнад места инфекције (када су у питању вештачке инфекције; ксилем транспортује воду и минералне материје у правцу од корена ка листу биљке), и ову појаву “шетања бактерије спроводним судовима” неопходно је додатно и дубље истражити пре свега увидом у анатомију инфицираних делова стабла.

Обзиром да је реч о термофилном патогену симптоми болести могу се уочити већ са првим порастом температура у пролеће, али су увек у питању појединачне инфекције, док бактериоза са порастом дневних и ноћних температура епидемијске размере достиже у касно лето или јесен у зависности од количине и расподеле падавина током ових месеци.

Инфекције на ослабљеним биљкама често бивају удружене са инфекцијама гљивичних патогена, какви су *Botryosphaeria dothidea* (ред Botryosphaerales, фам. Botryosphaeriaceae), *Cytospora* spp., офиостоматоидне гљиве (редови Ophiostomatales и Microascales), *Fusarium* spp. и други. Међутим, наша истраживања су показала да оболела ткива садрже и читав арсенал додатних бактерија које припадају различитим родовима фитопатогених бактерија, а чију је улогу у процесу сушења стабала потребно тек истражити.

Бактеријска разградња дрвета привлачи различите инсекте (стенице, бубамаре, гусенице кукурузне совице, муве, чак и лептире) који преносе болест на нова стабла и површине. Патоген презимљава у рак ранама оболелих стабала, и нове инфекције се могу јавити наредне године уколико су услови за раст и развој бактерије повољни. У одређеним случајевима стабло може произвести довољну количину калусног ткива и изборити се са инфекцијом, али то пре свега зависи од потенцијала самог клона, повољности станишних услова за узгој тополе, и климатских прилика (релативне влаге ваздуха, температуре, количине падавина и њихове расподеле током вегетационе сезоне, топлотних таласа, олуја и других климатских екстрема који су фактор стреса). Такође, показало се да “прва помоћ” стаблу у смислу дезинфекције рана и њиховог затварања калемарским воском, као и санитарне мере у смислу уклањања коровске вегетације које подижу ниво релативне влаге у засаду, помажу стаблу да се избори са патогеном.

2. Циљеви пројекта

Циљеви овог пројекта били су:

1. Да се методом вештачке инокулације клонова топола у пољским условима провери њихова осетљивост према фитопатогеној бактерији *Lonsdalea populi*, проузроковачу црног бактеријског рака топола да би се отпорни клонови регистровали и како би се од њих оснивали засади топола. Клонови топола коришћени у овом огледу потичу из колекције генотипова Института за низијско шумарство и животну средину Универзитета у Новом Саду, док је један клон обезбедило и ШГ "Рит" Београд.
2. Да се утврди да ли бактерије из рода *Brenneria* могу произвести симптоме туморастих задебљања и рак рана на тополама сличних онима које изазива *L. populi*?
3. Да се утврди да ли бактерије из рода *Brenneria* могу произвести симптоме дисколорације васкуларног ткива која је у условима природних инфекција уочена на попречним и уздужним пресецима хибридних топола?

За реализацију ових циљева биле су планиране следеће активности:

1. Оснивање пољског огледа на подручју ШГ Београд
2. Припрема бактеријског инокулума методом *in vitro* у лабораторији за микробиологију Института за низијско шумарство и животну средину Универзитета у Новом Саду
3. Инокулација једногодишњих клонова топола методом вештачке инокулације стабала у пољским условима на подручју ШГ "Рит" Београд
4. Оцена осетљивости клонова топола према фитопатогеној бактерији *Lonsdalea populi* и бактеријама из рода *Brenneria*



3. Оснивање пољског огледа на подручју ШГ Београд

На подручју ЈП „Србијашуме“, ШГ Београд, ШУ Рит основан је пољски оглед од десет клонова топола са циљем тестирања њихове осетљивости према патогеној бактерији *Lonsdalea populi* и бактеријама из рода *Brenneria*.

Пољски оглед је основан у пролеће 2022. године тако што је засађено по 20 резница клонова еурамеричке (*Populus x euramericana* (Dode) Guinier) и америчке црне тополе (*Populus deltoides* Bartram ex Marshall). На огледној површини су спровођене редовне мере неге и заштите.



Слика 1. Огледна површина на подручју ШГ Београд

4. Припрема инокулума бактерија *Lonsdalea populi* и *Brenneria* spp. методом *in vitro*

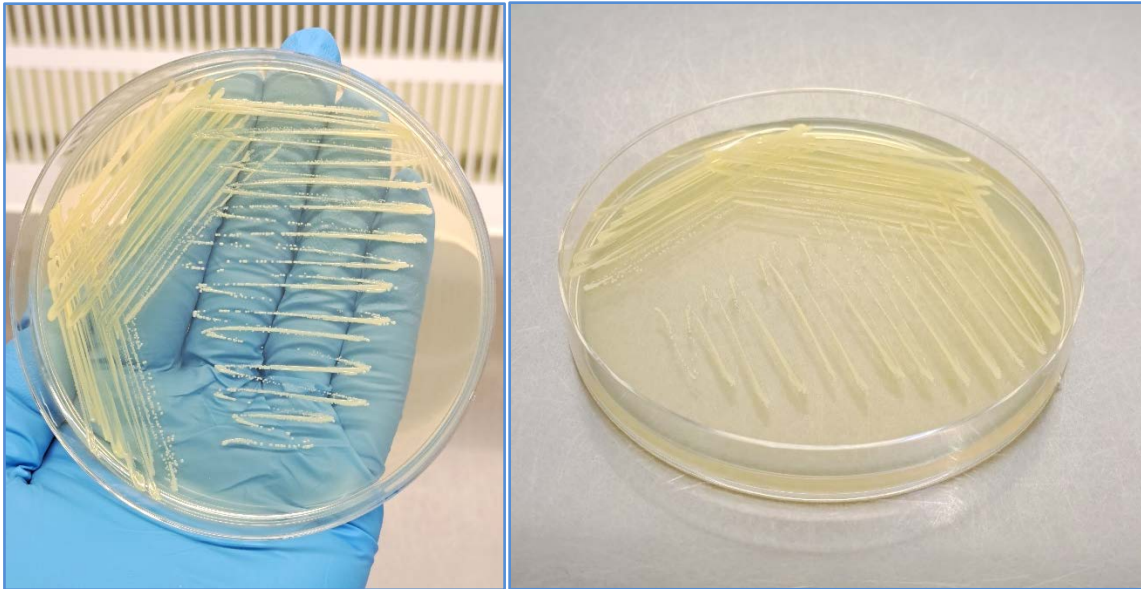
Бактеријски инокулум за потребе овог пројекта произведен је у лабораторији за микробиолошка истраживања Института за низијско шумарство и животну средину Универзитета у Новом Саду. У Институту се ћелије патогене бактерије *L. populi* и бактерија из рода *Brenneria* чувају дубоко замрзнуте на температури од -80°C (у виду суспензије ћелија у течной хранљивој подлози са додатком криопротектанта) у склопу колекције микроорганизама “ILFE” Института за низијско шумарство и животну средину (слика 2). На овај начин, на екстремно ниским температурама ћелијски метаболизам бактерија је сведен на минимум, те се спречавају нежељене мутације и губитак патогених и других својстава.



Слика 2. Бактерије у замрзивачу за дубоко замрзавање

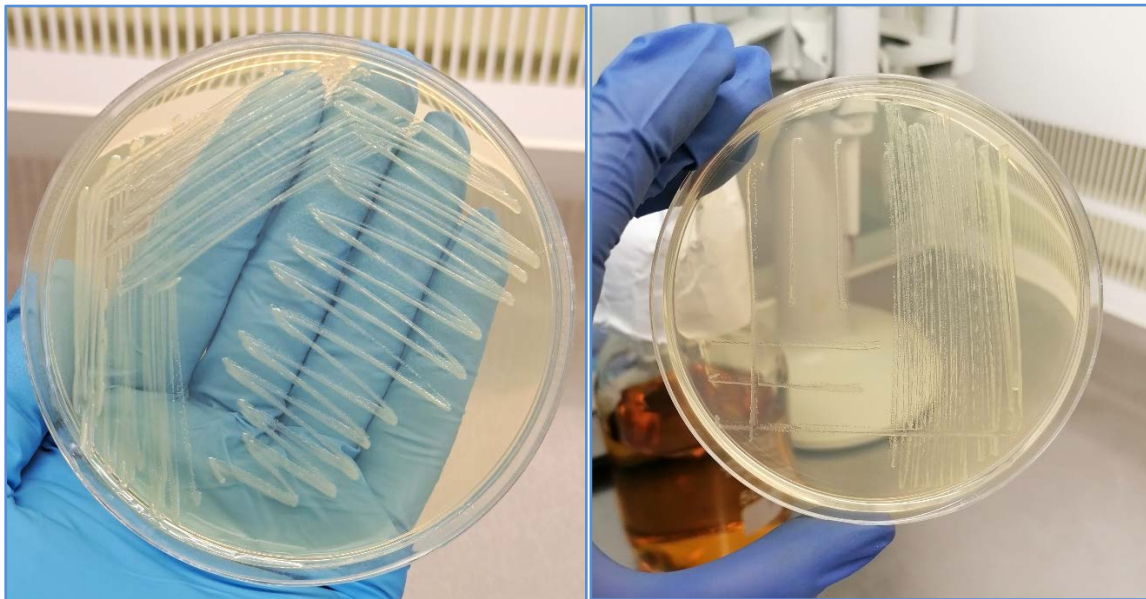
Бактерије *L. populi*, *Brenneria* sp. 22 и *Brenneria* sp. T4 “пробуђене” су засејавањем на триптон соја агар микробиолошку подлогу (ТСА), састава:

- Триптозни пептон- добијен хидролизом протеина казеина ензимима панкреаса
- Соја пептон
- Натријум хлорид
- Декстрога (д-глукоза)
- Дикалијум хидроген фосфат
- Агар
- Дестилована вода
- рН= 7.3



Слика 3. Вактерија *Brenneria* sp. 22

Педесет микролитара ћелијске суспензије распоређено је л-штапићем на ТСА подлогу у Петријеве шоље које су смештене у микробиолошки инкубатор на температуру од 30°C. Након 24h 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 (Слике 3-5).



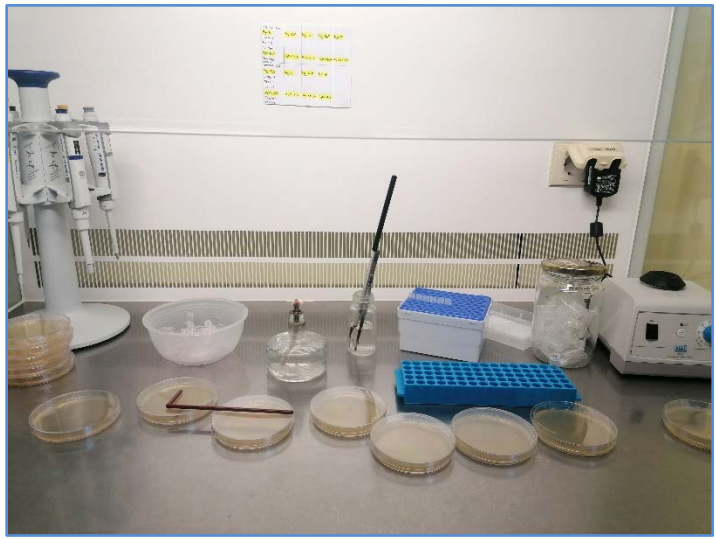
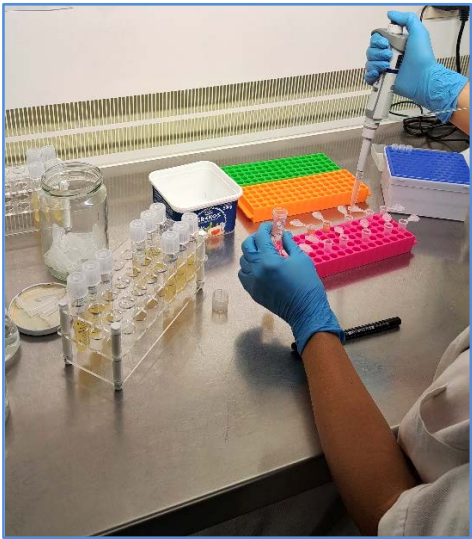
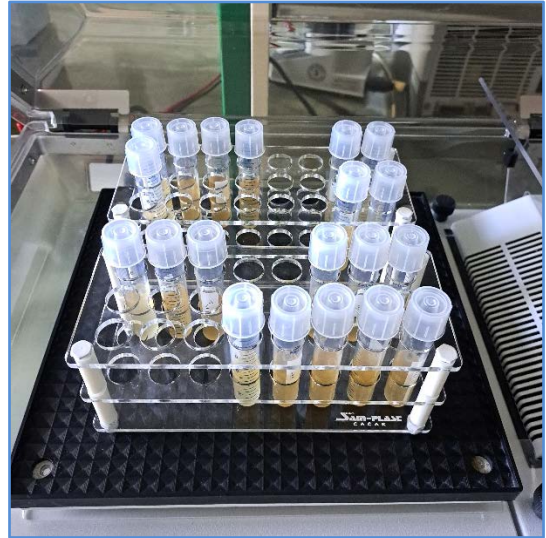
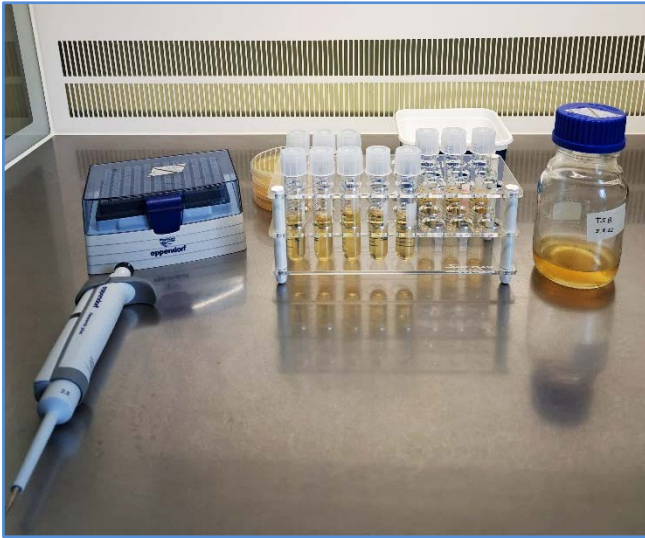
Слика 4. Вактерије *Brenneria* sp. T4 (лево) и *Lonsdalea populi* (десно)

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

- Натријум хлорид
- Калијум хлорид
- Динатријум хидроген фосфат
- Калијум дихидроген фосфат
- Дестилована вода
- рН= 7.4
- Адхезионо средство

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. Ћелијска суспензија засејана је л-штапићем на TSA подлогу, Петријеве шоље су смештене на температуру од 30°C и након 24h извршена је процена квалитета припремљеног инокулума.



Слика 5. Припрема инокулума бактерија *Lonsdalea populi* и *Brenneria* spp.

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

Вештачком инокулацијом проверена је реакција десет клонова топола према патогеној бактерији *L. populi* и бактеријама *Brenneria* sp. 22 и *Brenneria* sp. T4. Клонови тополе коришћени у овом огледу потичу из колекције генотипова Института за низијско шумарство и животну средину, као и ШГ “Рит”, Београд. За инокулацију је коришћен сој *L. populi* изолован из *Populus x euramericana* cl. I-214 чија је патогеност доказана у претходним истраживањима, и изолати бактерија из рода *Brenneria* чија патогеност није позната. Изолати *Brenneria* spp. пореклом су из дисколорисаног васкуларног ткива *P. euramericana* и претходно су биохемијским тестовима, методом бојења по Граму и секвенцирањем фрагмента *atpD* гена идентификовани као *Brenneria* spp. Додатне мултилокусне филогенетске анализе су у току како би се бактерије идентификовале до нивоа врсте, и потврдила сумња о томе да су у питању нове врсте. Биљке су инокулисане у доњем делу стабла тако што је кора површински стерилисана 70% етанолом, а затим је претходно стерилисаном зумбом направљена рана у коју је аутоматском пипетом убризган инокулум. Одмах након инокулације места инокулације су затворена парафилмом како би се спречила контаминација и исушивање озледе. Контролне биљке (негативна контрола) су озлеђене на исти начин као и инокулисане биљке, али без убризгавања инокулума (Слике 4-6). Инокулација клонова топола извршена је 8. августа 2022. године. Оцена осетљивости извршена је месец дана након инокулације.



Слика 4. Припрема за инокулације на огледној површини



Слика 5. Инокулације



Слика 6. Инокулације

6. Оцена осетљивости клонова топола према фитопатогеној бактерији *Lonsdalea populi* и бактеријама из рода *Brenneria*

Патогеност бактерије (способност бактерије да изазове болест) испитана је доказивањем испуњености Кохових постулата који у ширем смислу подразумевају да је:

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

Оцена осетљивости клонова на инфекцију извршена је месец дана након инокулације (слика 7), на основу визуалне процене присутности симптома болести и реизолације у лабораторијским условима, како је претходно наведено (слике 8-10). Стерилним скалпелом уклоњен је део коре, измерена је дужина симптоматичног ткива и узети су узорци за лабораторијску анализу.

Симптоматично ткиво је претходно стерилисаним тучком и аваном уситњено у фосфатном пуферу (ПБС), а потом су екстракти дрвета разблаживани у стерилним бактериолошким епруветама и/или Епендорф тест тубама и Л-штапићем засејани на ТСА подлогу.

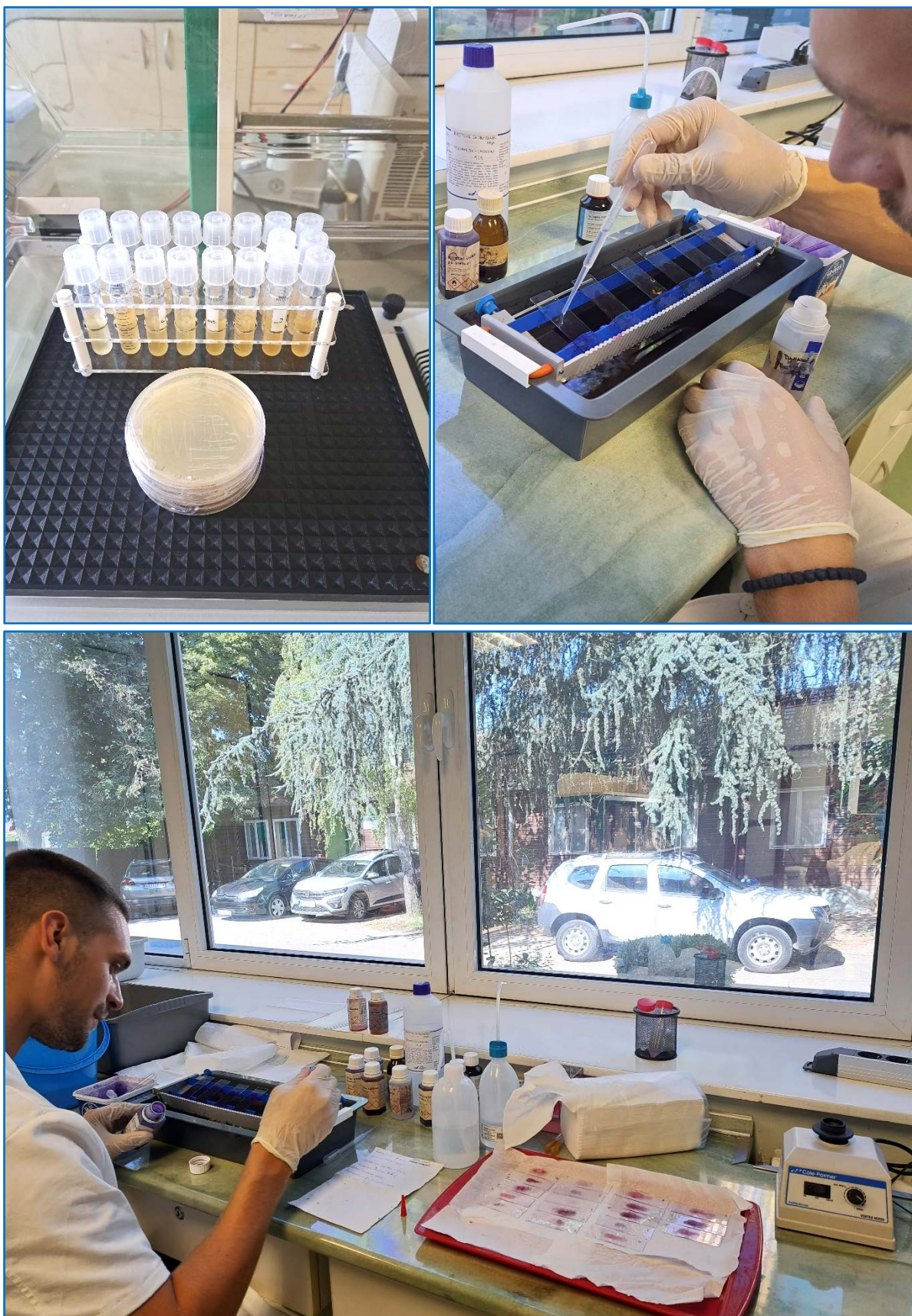
Петријеве шоље чуване су у микробиолошком инкубатору 24 сата до појаве колонија. Бојењем по Граму и микроскопирањем је одмах затим потврђено да су дате бактерије успешно реизоловане из симптоматичног ткива (слике 8-10).



Слика 7. Евалуација теста осетљивости



Слика 8. Реизолација бактерија *in vitro*



Слика 9. Реизолација бактерија *in vitro* и метода бојења по Граму



Слика 10. Реизолација бактерија *in vitro* и метода бојења по Граму

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

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

Клон К1

На основу резултата теста патогености можемо видети да **клон К1** показује извесни ниво толеранције на инфекције *L. populi*. Активност бактерије је видљива, са некротираним делом који је статистички значајно већи у односу на реакцију биљака на озледу код контролних биљака, али су биљке успевале да производњом веће количине калусног ткива затворе рак ране. Ткиво око рак ране је било суво и тврдо, што указује на то да је биљка успела да заустави инфекцију и да бактерија тренутно није активна (код активних рак рана дрво је мекано и влажно, што је типично за бактеријску разградњу).

Занимљиво, дошло је до буђења успаваних пупољака у пазуху листова и формирања младих избојака, а обзиром да ова појава није уочена код контролних биљака можемо је довести у везу са одговором биљке на инфекцију, и покушајем генотипа да се са истом избори, што указује на потенцијал клона да у одређеним околностима толерише инфекцију. Слично смо у току теренских истраживања у условима природних инфекција бактерије али и гљива на екстремним стаништима за узгој тополе запазили активацију примордија примарне коре код одређених генотипова, а активација је запажена код истих клонова и када су ожиљенице вештачки инокулисане у контролисаним условима спољашње средине. Наиме, примордије примарне коре су тотипотентне и могу да формирају корен (ожиљавање) или изданак у зависности од услова спољашње средине. Пошто су у овом случају код биљке пробужени успавани пупољци они су највероватније спречили активацију примордија, али свакако се активација примордија и успаваних пупољака може довести у везу са делимичним или потпуним губитком контакта са делом биљке изнад рак ране и настојањима биљке да преживи и превазиђе напад патогена.

Код контролних биљака (негативне контроле) озледне ране су успешно затворене калусним ткивом, а око места инфекције видљива је тек незнатна, уобичајена реакција биљке на трауму изазвану озледом (Слика 11).



Слика 11. Клон К1. Са лева на десно: Калусирана и затворена рак рана инокулисане биљке са избојцима из пробуђених пупољака (црвени кругови); уздужни пресек инокулисане биљке; калусирана и затворена озледна рана контролне биљке; уздужни пресек контролне биљке

Клон K2

Слично клону K1 клон K2 је показао извесну дозу толеранције на инфекцију фитопатогеном бактеријом *L. rospili*. Активност бактерије је била видљива, али је рак рана била сува и тврда, обрасла калусним ткивом којим је биљка настојала да заустави ширење и развој бактерије. Међутим код овог клона се нису активирали пупољци што може указивати на његов нешто нижи ниво толерантности према овом патогену у поређењу са клоном K1. Озледне ране контролних биљака биле су затворене калусом и са незнатним променама на месту инокулације слично као код клона K1 (слика 12).



Слика 12. Клон K2 (са лева на десно): Рак рана биљке инокулисане суспензијом ћелија *L. rospili*; уздужни пресек инокулисане биљке која је калусом зауставила ширење инфекције; уздужни пресек негативне контроле

Клон КЗ

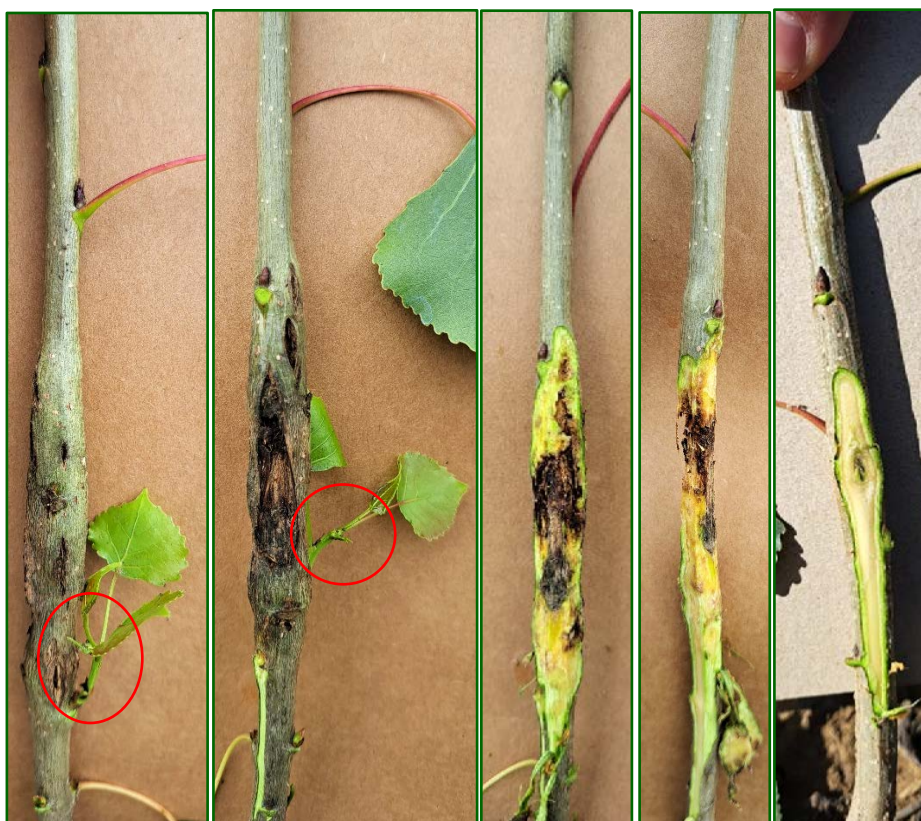
Резултати теста патогености показали су да је **клон КЗ** толерантан на инфекције *L. rofuli* у условима спољашње средине у којима је оглед изведен (земљишни супстрат, климатске прилике након оснивања огледа, поготово за време и након вештачких инфекција). На инокулисаним биљкама није било рак рана, а на уздужном пресеку биљака се могло видети да је бактерија заустављена калусним ткивом које је као вид одбране формирала биљка. Контролне биљке су показале само благу уобичајену реакцију на озледу (слика 13).



Слика 13. Клон КЗ (са лева на десно): Место инфекције затворено калусом; уздужни пресек инокулисане биљке са новим калусним ткивом (стрелице) ; негативна контрола

Клон К4

Клон К4 је био осетљив на инфекцију *L. populi*. Месец дана након инокулације на биљкама су биле видљиве рак ране, тумораста задебљања, и црна кора биљака типична за бактеријски црни рак. Дрво испод коре је било непријатног мириса, труло, некротирано и претежно мекано. Међутим, на биљкама овог клона уочени су избојци из пробужених пупољака што указује да би биљке можда могле да се у одређеним околностима обнове и на тај начин изборе са инфекцијом. Контролне биљке су биле без симптома болести. Негативне контроле имале су једино незнатну дисколорацију дрвета на месту инокулације што је резултат озледе. На инокулисаним биљкама запажени су симптоми болести идентични онима виђеним на биљкама у расадницима у условима природних инфекција. *Lonsdalea populi* је успешно реизолована из симптоматичног ткива инокулисаних биљака, и није изолована из негативних контрола чиме су испуњени Кохови постулати (Слика 14).



Слика 14. Клон К4 (са лева на десно): туморасто задебљање и рак са избојцима из пробужених пупољака (црвени кругови); уздужни пресек рак ране; бактерија је готово прстенувала биљку; негативна контрола

Клон К5

Резултати теста показали су да је клон К5 толерантан на инфекције фитопатогене бактерије *L. rostrupii* у условима спољашње средине у којима је оглед изведен. Инокулисане биљке су биле без рака рана и производњом веће количине калусног ткива су затвориле места инокулације. На уздужном пресеку контролних биљака се могао уочити само незнатни дисколорисани део васкуларног ткива који је уобичајена реакција биљке на озледу (Слика 15).



Слика 15. Клон К5 (са лева на десно): калусирана и затворена рана биљке инокулисане са *L. rostrupii*; уздужни пресек инокулисане биљке са видљивим калусним задебљањима лево и десно од места инокулације (плаве стрелице); затворена озледа контролне биљке; уздужни пресек контролне биљке

Клон К6

Резултати теста осетљивости клонова топола показали су да је **клон К6** толерантан на инфекције фитопатогеном бактеријом *L. rospili* у условима спољашње средине у којима је оглед изведен. Инокулисане биљке су биле без рак рана, и калусом су затвориле места инокулације, а на уздужном пресеку се могао запазити дебели слој новоформираног калусног ткива које није било у толикој мери присутно на контролним биљкама. Код биљака овог клона дошло је и до буђења успаваних пупољака и формирања избојака што додатно указује на потенцијал клона да се у одређеним условима спољашње средине избори са инфекцијом. На уздужном пресеку контролних биљака се могао уочити само незнатни дисколорисани део дрвенастог ткива који је уобичајена реакција биљке на озледу (Слика 16).



Слика 16. Клон К6 (са лева на десно): Калусирана и затворена рана биљке инокулисане са *L. rospili* и избојак из пробуђеног пупољка (црвени круг); затворена и калусирана озледа инокулисане биљке; уздужни пресек инокулисане биљке са јасно видљивим ново формираним калусним ткивом (плаве стрелице); затворена озледа контролне биљке; уздужни пресек контролне биљке

Клон К7

Резултати теста осетљивости клонова топола показали су да је **клон К7** осетљив према фитопатогеној бактерији *L. populi*. Инокулисане биљке биле су са рак ранама, туморастим задебљањима, и црном кором услед сливања и оксидације биљних сокова. Дрво испод коре је било труло, некротирано и делимично кашасто, са непријатним мирисом типичним за бактеријску трулеж. Међутим, на биљкама су уочени избојци настали из пробуђених пупољака што указује да би биљке можда могле да се у одређеним околностима изборе са инфекцијом. Контролне биљке су биле без симптома болести. На контролним биљкама била је присутна дисколорација дрвета на месту инокулације што је резултат озледе. Инокулисане биљке биле су са симптомима болести идентичним онима виђеним на младим биљкама топола у расадницима у условима природних инфекција. *Lonsdalea populi* успешно је реизолована из симптоматичног ткива инокулисаних биљака, и није изолована из негативних контрола чиме су испуњени Кохови постулати (Слика 17).



Слика 17. Клон К7 (са лева на десно): Рак рана биљке инокулисане са *L. populi* и избојци из пробуђених пупољака (црвени кругови); уздужни пресек инокулисаних биљака са некротираним и кашастим дрвенастим ткивом; затворена озледа негативне контроле; уздужни пресек контролне биљке

Клон К8

Резултати теста осетљивости клонова топола показали су да је **клон К8** осетљив према фитопатогеној бактерији *L. populi*. Инокулисане биљке биле су са рак ранама, вишеструким туморастим задебљањима, пенастим ексудатом насталим услед ферментних активности бактерије и црном кором због сливања биљних сокова и њихове оксидације на ваздуху. Инокулисана стабла су служила за исхрану великог броја стеница. Дрво испод коре је било труло, некротирано, меко, са белом кашастом масом и непријатним мирисом типичним за бактеријску трулеж. Међутим, на биљкама су уочени избојци настали из пробуђених пупољака што указује да би биљке можда могле да се у одређеним околностима изборе са инфекцијом. Контролне биљке су биле без симптома болести и са дисколорацијом ткива на месту инокулације што је уобичајена реакција биљке на озледу. Инокулисане биљке показивале су симптоме болести идентичне онима виђеним на младим биљкама тополе у расадницима у условима природних инфекција. *Lonsdalea populi* је успешно реизолована из симптоматичног ткива инокулисаних биљака, и није изолована из негативних контролних биљака чиме су испуњени Кохови постулати (Слика 18).



Слика 18. Клон К8 (са лева на десно): Биљка инокулисана суспензијом ћелија *L. populi* са рак раном и пробуђеним пупољком (црвени круг); стенице “на ручку” на инокулисаној биљци; уздужни пресек инокулисане биљке са некротираним и кашастим дрвенастим ткивом; затворена озледа негативне контроле; уздужни пресек контролне биљке

Клон К9

Резултати теста осетљивости клонова топола показали су да је **клон К9** толерантан на инфекције фитопатогеном бактеријом *L. populi* у условима спољашње средине у којима је оглед изведен. Инокулисане биљке су биле без рак рана и калусом су затвориле места инокулације, а на уздужном пресеку се могао запазити дебели слој новоформираног калусног ткива које није било у толикој мери присутно на контролним биљкама. Формирали су се и избојци из успаваних пупољака што додатно указује на потенцијал овог клона да се у одређеним условима спољашње средине избори са инфекцијом. На уздужном пресеку контролних биљака био је присутан само мали дисколорисани део дрвенастог ткива који је уобичајена реакција биљке на озледу коју смо у овом огледу направили зумбом (Слика 19).



Слика 19. Клон К9 (са лева на десно): Калусирана и затворена рана биљке инокулисане са *L. populi* и избојци из пробуђених пупољака (црвени кругови); уздужни пресек инокулисане биљке са дебелим слојем ново формираног калусног ткива (плавe стрелице); затворена озледа контролне биљке; уздужни пресек контролне биљке

Клон K10

Резултати теста осетљивости клонова топола показали су да је **клон K10** толерантан на инфекције фитопатогеном бактеријом *L. rospili* у условима спољашње средине у којима је оглед изведен. Инокулисане биљке су биле без рак рана и калусом су затвориле места инокулације. На уздужном пресеку контролних биљака био је присутан само мали дисколорисани део дрвенастог ткива који је уобичајена реакција биљке на озледу (Слика 20).



Слика 20. Клон K10 (са лева на десно): Калусирана и затворена рана биљке инокулисане са *L. rospili*; уздужни пресек инокулисане биљке; уздужни пресек контролне биљке

66. Оцена осетљивости клонова топола према бактеријама из рода *Brenneria*

Клон К1

На биљкама овог клона инокулисаним са *Brenneria* sp. 22 била је видљива незнатна дисколорација, док су се на биљкама инокулисаним са *Brenneria* sp. Т4 појавиле значајније унутрашње дисколорације васкуларног ткива сличне онима виђеним у условима природних инфекција. Негативне контроле су имале само мању некрозу на месту озледе (слика 21).



Слика 21. Клон К1 (са лева на десно): Калусирана и затворена рана биљке инокулисане са *Brenneria* sp. 22; уздужни пресек биљке инокулисане са *Brenneria* sp. 22; уздужни пресек и дисколорација васкуларног ткива биљке инокулисане са *Brenneria* sp. Т4; затворена и калусирана рана негативне контроле; уздужни пресек негативне контроле

Клон K2

На биљкама овог клона инокулисаним бактеријом *Brenneria* sp. 22 била је видљива мања дисколорација ткива око места инокулације и она није статистички била значајно већа од оне формиране на контролним биљкама клона K2, док је бактерија *Brenneria* sp. T4 довела до појаве дисколорације васкуларног ткива сличне оној виђеној у условима природних инфекција и ова дисколорација је била статистички значајно већа од дисколорације присутне на контролним биљкама (Слика 22).



Слика 22. Клон K2 (са лева на десно): Калусирана и затворена рана биљке инокулисане са *Brenneria* sp. 22; уздужни пресек биљке инокулисане са *Brenneria* sp. 22; уздужни пресек и дисколорација васкуларног ткива биљке инокулисане са *Brenneria* sp. T4; уздужни пресек негативне контроле

Клон К3

На биљкама овог клона инокулисаним бактеријом *Brenneria* sp. 22 дошло је до појаве мање дисколорације ткива око места инокулације и ова дисколорација није била статистички значајно већа од оне формиране на контролним биљкама. Због недостатка потребног броја биљака за инокулације свим предвиђеним бактеријама, биљке овог клона инокулисане су само са *Brenneria* sp. 22 (Слика 23).



Слика 23. Клон К3 (са лева на десно): Калусирана и затворена рана биљке инокулисане са *Brenneria* sp. 22; уздужни пресек биљке инокулисане са *Brenneria* sp. 22; уздужни пресек негативне контроле

Клон К4

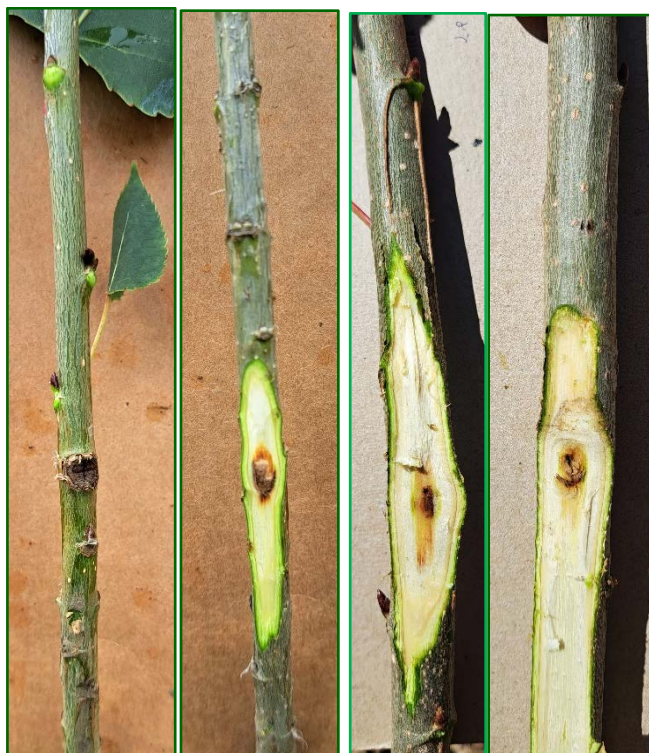
На биљкама овог клона инокулисаним бактеријом *Brenneria* sp. 22 могла се запазити мања дисколорација ткива непосредно око места инокулације и ова дисколорација није била статистички значајно већа од оне формиране на контролним биљкама. На биљкама инокулусаним са *Brenneria* sp. Т4 могла се уочити статистички значајно већа дисколорација васкуларног ткива од оне која се формирала око озледе на контролним биљкама (Слика 24).



Слика 24. Клон К4 (са лева на десно): Калусирана и затворена рана биљке инокулисане са *Brenneria* sp. 22; уздужни пресек биљке инокулисане са *Brenneria* sp. 22; уздужни пресек и дисколорација васкуларног ткива биљке инокулисане са *Brenneria* sp. Т4; уздужни пресек негативне контроле

Клон К5

На биљкама овог клона инокулисаним бактеријом *Brenneria* sp. 22 дошло је до појаве мање дисколорације ткива око места инокулације и ова дисколорација није била статистички значајно већа од оне формиране на контролним биљкама. На биљкама инокулусаним са *Brenneria* sp. T4 могла се уочити статистички значајно већа дисколорација васкуларног ткива од оне која се формирала око озледе на контролним биљкама (Слика 25).



Слика 25. Клон К5 (са лева на десно): Калусирана и затворена рана биљке инокулисане са *Brenneria* sp. 22; уздужни пресек биљке инокулисане са *Brenneria* sp. 22; уздужни пресек и васкуларна дисколорација ткива биљке инокулисане са *Brenneria* sp. T4; уздужни пресек негативне контроле

Клон К6

На биљкама овог клона инокулисаним бактеријама *Brenneria* sp. 22 и *Brenneria* sp. T4 дошло је до појаве дисколорације васкуларног ткива која је била статистички значајно већа од оне присутне у пределу озледе на контролним биљкама (Слика 26).



Слика 26. Клон К6 (са лева на десно): Калусирана и затворена рана биљке инокулисане са *Brenneria* sp. 22; уздужни пресек и васкуларна дисколорација биљке инокулисане са *Brenneria* sp. 22; уздужни пресек и васкуларна дисколорација биљке инокулисане са *Brenneria* sp. T4; уздужни пресек негативне контроле

Клон К7

На биљкама овог клона инокулисаним бактеријама *Brenneria* sp. 22 и *Brenneria* sp. T4 дошло је до дисколорације васкуларног ткива која је била статистички значајно већа од оне која се формирала непосредно у пределу озледе на контролним биљкама (Слика 27).



Слика 27. Клон К7 (са лева на десно): Калусирана и затворена рана биљке инокулисане са *Brenneria* sp. 22; уздужни пресек биљке инокулисане са *Brenneria* sp. 22; уздужни пресек биљке инокулисане са *Brenneria* sp. T4; уздужни пресек негативне контроле

Клон К8

Биљке овог клона инокулисане бактеријом *Brenneria* sp. 22 затвориле су калусом место инокулације. Насупрот томе, на биљкама инокулусаним са *Brenneria* sp. Т4 могла се уочити статистички значајно већа дисколорација васкуларног ткива од оне која се формирала у пределу озледе на контролним биљкама (Слика 28).



Слика 28. Клон К8 (са лева на десно): Калусирана и затворена рана биљке инокулисане са *Brenneria* sp. 22; уздужни пресек биљке инокулисане са *Brenneria* sp. 22; уздужни пресек и дисколорација васкуларног ткива биљке инокулисане са *Brenneria* sp. Т4; уздужни пресек негативне контроле

Клон К9

На биљкама овог клона инокулисаним бактеријама *Brenneria* sp. 22 и *Brenneria* sp. T4 могла се уочити статистички значајно већа дисколорација васкуларног ткива од оне која се формирала у пределу озледе на контролним биљкама (Слика 29).



Слика 29. Клон К9 (са лева на десно): Калусирана и затворена рана биљке инокулисане са *Brenneria* sp. 22; уздужни пресек и дисколорација васкуларног ткива биљке инокулисане са *Brenneria* sp. 22; уздужни пресек и дисколорација васкуларног ткива биљке инокулисане са *Brenneria* sp. T4; уздужни пресек негативне контроле

Клон K10

На биљкама овог клона инокулисаним бактеријом *Brenneria* sp. 22 дошло је до појаве дисколорације ткива у пределу око озледе и ова дисколорација није била статистички значајно већа од оне на контролним биљкама. На биљкама инокулисаним бактеријом *Brenneria* sp. T4 дошло је до појаве статистички значајно веће дисколорације васкуларног ткива од оне која се формирала око озледе на контролним биљкама (Слика 30).



Слика 30. Клон K9 (са лева на десно): Уздужни пресек биљке инокулисане са *Brenneria* sp. 22; уздужни пресек и дисколорација васкуларног ткива биљке инокулисане са *Brenneria* sp. T4; уздужни пресек негативне контроле

7. Закључна разматрања и предлози

У оквиру овог пројекта истраживања су спроведена на десет генотипова топола (К1-К10) одабраних из колекције Института за низијско шумарство и животну средину Универзитета у Новом Саду и ШГ “Рит” Београд. Одабрани генотипови су у пољским условима на подручју ШГ “Рит” Београд у периоду август-септембар 2022. године испољили разлике у осетљивости према фитопатогеној бактерији *L. rospili*.

Сходно томе, одабране генотипове топола можемо рангирати на скали од 0 (високо осетљив) до 5 (високо толерантан):

- ***L. rospili*:**
- **0- високо осетљив** (клонови са активним рак ранама и без избојака)
- **1- осетљив- К4, К7, К8** (клонови са активним рак ранама и избојцима)
- **2- ниско толерантан- К2** (клонови са калусираним рак ранама и без избојака)
- **3- средње толерантан- К1** (клонови са калусираним рак ранама и избојцима)
- **4- толерантан- К3, К5, К10** (клонови без рак рана и без избојака)
- **5- високо толерантан- К6, К9** (клонови без рак рана, са избојцима)

Истраживање је показало и да бактерије *Brenneria* sp. 22 и *Brenneria* sp. Т4 могу произвести дисколорацију (смеђе до црвенкасту обојеност) васкуларног ткива, сличну оној која је виђена у условима природних инфекција, а која представља један од типичних симптома бактеријске инфекције шумског и украсног дрвећа (тзв. болест воденог жига).

У овом истраживању бактерије су успешно реизоловане из симптоматичних ткива али не и из контрола, чиме су испуњени Кохови постулати.

Током овог пројекта утврђене су и разлике у осетљивости одабраних генотипова топола према *Brenneria* sp. 22 и *Brenneria* sp. Т4, па сходно томе генотипове можемо рангирати на скали од 0 (осетљив) до 2 (толерантан):

- ***Brenneria* 22:**
- **0- осетљив- K7** (дисколорација ткива дужа од 5cm)
- **1- мање осетљив- K9** (дисколорација ткива дужине 1,5-5cm)
- **2- толерантан- K1-K6, K8, K10** (дисколорација ткива дужине <1,5cm, статистички није значајно већа од оне присутне у пределу озледе на контроли)
- ***Brenneria* T4:**
- **0- осетљив- K4, K7** (дисколорација ткива дужа од 5cm)
- **1- мање осетљив- K1, K2, K5, K6, K8, K9, K10** (дисколорација ткива дужине 1,5-5cm)
- **2- толерантан-** (дисколорација ткива дужине <1,5cm, статистички није значајно већа од оне присутне у пределу озледе на контроли)

Бактерије *Brenneria* sp. 22 и *Brenneria* sp. T4 нису довеле до симптома рак рана, туморастих задебљања, црнила коре и др. чији је проузроковач бактерија *L. populi*.

Током будућих истраживања неопходно је додатно истражити улогу бактерија из рода *Brenneria*, али и других бактерија у комплексном процесу сушења засада и младих биљака у расадницима топола.

Неопходно је наставити са тестирањем клонова топола на патогене микроорганизме и поновити тестирање клонова коришћених у овом истраживању обзиром да је њихова осетљивост/толерантност на патогене делом условљена и факторима спољашње средине.

Потребно је спровести мултидисциплинарна, детаљна хистопатолошка, биохемијска, физиолошка и молекуларна истраживања како би се добила прецизнија слика о патогенези *L. populi* и бактерија из рода *Brenneria* на клоновима хибридних топола у Србији. Такође је потребно спровести истраживања осталих аспеката интегралне заштите топола, укључујући хемијске и еколошки прихватљиве биолошке мере заштите. Надамо се да ће Управа за шуме препознати потребу за наставком финансирања наших истраживања која су од кључног значаја за решавање проблема сушења хибридних топола у Србији.

8. Захвалница

Учесници пројекта се захваљују Министарству пољопривреде, шумарства и водопривреде Републике Србије- Управи за шуме на одобреним средствима за финансирање овог истраживања; ШГ Београд, ШУ “Рит” на подршци и помоћи приликом оснивања огледа; др Предрагу Папу, научном сараднику на помоћи приликом инокулација и др Браниславу Ковачевићу, научном саветнику на помоћи приликом обраде резултата овог истраживања.

Руководилац пројекта и одговорно лице:

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