

ARMILLARIA GLJIVE U CENTRALNOJ BOSNI *Armillaria* species in Central Bosnia

Treštić Tarik¹, Usčuplić Midhat¹, Mujezinović Osman² i Memišević Mirzeta³

¹Šumarski fakultet Sarajevo

²ŠIP "Stupčanica" Olovo

³JP "BH Šume" Sarajevo

Abstract

Armillaria is a genus of weak pathogens and saprophytes. Some of these species cause root rot diseases and sometimes severe mortality to trees exposed to stress factors, e.g. fires, insects, mistletoe, pollution etc. *Armillaria spp.* are common in Bosnia-Herzegovina, occurring both in natural forests and plantations, but there is no knowledge about the species colonising certain areas and which one is an important pathogen. Presented work does the first step in *Armillaria* study in Bosnia-Herzegovina in order to identify the common species and to have better understand of their role in our forest ecosystems.

Key words: *Armillaria mellea*, *A. cepistipes*, *A. gallica*, haploid-diploid test, mating test, Buller phenomenon, rhizomorphs.

1. Uvod

Armillaria vrste žive kao paraziti na živim biljkama ili kao saprofiti na mrtvom drvetu. Kao patogeni uzrokuju trulež korjena i pridanka stabala, sušenje dijelova krošnje, zastoje u razviću i na kraju potpuno sušenje biljaka. *Armillaria* se obično javlja kao parazit slabosti, nakon stresnog djelovanja drugih činilaca okoline (požar, suša, dugotrajna poplava, debalans u ishrani, napad imele, defolijacija od primarnih insekata, industrijsko zagađenje i td.), koji na oslabljenim biljkama kondicioniraju razvoj gljive. Nekada napadaju i potpuno zdrava stabla uzrokujući sušenje ili slabljenje odbrambenog mehanizma biljke stvarajući tako uvjete za ulančavanje drugih štetnih biotskih agenasa (insekata i drugih gljiva, na primjer).

U Bosni i Hercegovini *Armillaria* se javlja u svim prirodnim šumama i vještački podignutim zasadima u kojim su zabilježene i epifitocije. Obzirom da su ove gljive slabi patogeni, u procesu nastanka bolesti veliku ulogu imaju stresni faktori koji predisponiraju biljku. Jedan od mogućih stresnih faktora je industrijsko zagađenje. Primjeri ovakvih epifitocija zabilježeni su u blizini Banja Luke i Tuzle, gdje su stradale

kvalitetne i dobro njegovane sastojine hrasta, što se dovodi u vezu sa lokalnim industrijskim zagađenjem (Uščuplić, 1986). Osim ovih pojava lokalne epifitocije zabilježene su i u zasadima bijelog i crnog bora na Romaniji 1960. godine, podignutim na staništu požarišta. Lokalne epifitocije su kod nas zabilježene i na sječinama lišćarskih degradiranih i niskih šuma, koje su pošumljene alohtonim vrstama drveća (*Pinus strobus*, *Larix decidua*, i dr.), gdje su panjevi poslije sječe izvor zaraze (Uščuplić, 1978). Jak intenzitet bolesti se javlja 2-3 godine nakon sadnje, traje par godina, zatim prestaje ili se razvija sporadično, što se objašnjava postepenim adaptiranjem biljaka na nove uslove sredine, odnosno jačanjem odbrambenog mehanizma biljaka.

Postoji više vrsta *Armillaria* koje se razlikuju po seksualnom ciklusu, geografskoj i ekološkoj rasprostranjenosti, broju domaćina koje naseljavaju, patogenitetu i učestalosti pojave rizomorfi u tlu. Karakteristike kultura micelije kao što su boja, sposobnost plodonošenja i temperaturni optimum za rast su također kriteriji koji se koriste za raspoznavanje vrsta.

Hintikka je 1973. godine bio prvi koji je ukazao da su *Armillaria* vrste heterotalusne i bifaktorijalne (tetrapolarnе) sa jednom neuobičajenom monokariotskom ali diploidnom vegetativnom fazom (Guillaumin et al., 1993), što je otvorilo put budućim izučavanjima i korištenju "testa kompatibilnosti" (sparivanje kultura) pri identifikaciji vrsta.

2. Materijal i metod rada

2.1 Objekti istraživanja

Sistematsko prikupljanje uzoraka izvršeno je na lokalitetima bliže okoline Sarajeva, ali su korišteni i podaci prikupljeni za potrebe drugih projekata (izrada šumsko-privrednih osnova, magistarskih radova, i sl.). Materijal za ovaj rad potiče sa sljedećih lokaliteta:

Šumsko-gospodarsko područje (ŠGP) "Olovsko":

Gospodarska jedinica (GJ) "Donja Stupčanica", odjel 10;

Gospodarska jedinica (GJ) "Krivaja", odjeli 125 i 126;

Gospodarska jedinica (GJ) "Tribija-Duboštica", odjeli 26 i 27.

Šumsko-gospodarsko područje (ŠGP) "Zavidovičko":

Gospodarska jedinica (GJ) "Gornja Krivaja", odjel 425.

Šumsko-gospodarsko područje (ŠGP) "Bistričko":

Gospodarska jedinica (GJ) "Vučija Luka", odjel 9.

Šumsko-gospodarsko područje "Igmansko":

Gospodarska jedinica (GJ) "Igman", odjel 106.

2.2 Prikupljanje uzoraka

Uzorci za laboratorijsku analizu su sakupljeni na pomenutim lokalitetima u toku 2001. godine sa pet vrsta drveća: *Abies alba*, *Pinus austriaca*, *Picea abies*, *Quercus petraea* i *Fagus silvatica*.

Pri odabiru jedinki za prikupljanje uzoraka korišteni su vanjski simptomi čime su reducirane moguće pogreške i skratilo vrijeme rada na terenu. Kao uzorci za laboratorijsku analizu korišteni su:

- Karpofore (pečurke). Iz buketa oko panjeva ili napadnutih stabala odabrane su po dvije-mlade i zdrave karpofore.

- Micelija gljive iz zaraženih biljaka. U sastojinama hrasta kitnjaka loših stanišnih prilika, gdje se pojava *Armillaria* gljiva očekivala, analizirana su stabla hrasta razne starosti sa znacima suhovrhosti i fiziološke slabosti, kao i prirodni jelov podmladak. Prisustvo micelija utvrđivano je zarezivanjem kore nožem u pridanku biljaka. Uzorak za analizu sastojao se od micelije gljive, dijela drveta i kore pridanka debla, čime se spriječilo njeno brzo isušivanje.

- Rizomorfe. Skidanjem kore zaraženih stabala prikupljane su potkorne, a kopanjem zemlje u zoni korjenovog sistema (10-30 cm dubine) podzemne rizomorfe.

Prikupljeni uzorci su pakovani u papirne vrećice, sa podacima o lokalitetu, datumu prikupljanja, vrsti biljke domaćina i njenom organu i drugim podacima značajnim za analizu. Uzorci su preneseni su u laboratorije Katedre za zaštitu šuma Šumarskog fakulteta u Sarajevu gdje su čuvani u frižideru pri 4°C do izolacije i dobijanja čistih kultura gljive.

2.3 Laboratorijska istraživanja

2.3.1 Izolacija patogena

Izolacija patogena je vršena na hranjivu podlogu "malt agar" (Biokar Diagnostics - Beauvais France). Postupak izolacije prilagođen je vrsti i stanju sakupljenih uzoraka.

Kod uzoraka sa micelijem gljive analiziran je unutrašnji dio između kore i drveta koji je bio najvitalniji i najmanje kontaminiran bakterijama ili drugim mikroorganizmima. Za izolaciju je isijecan komadić micelije sa okolnim biljnim tkivom veličine oko 2 mm³, kratkotrajno sterilisan u alkoholu i na plamenu, a potom stavljen na hranjivu podlogu.

U slučaju rizomorfi prvo je vršeno njihovo ispiranje u tekućoj vodi (radi odstranjivanja zemlje, čestica humusa i drugih nečistoća) a zatim u destilovanoj vodi, poslije čega su stavljane na čist papir da se prosuše. Komadići rizomorfi dužine 3-4 mm (sterilisani u alkoholu umakanjem 5-10 sekundi i brzim provlačenjem kroz plamen) su stavljeni na hranjivu podlogu pripremljenu u petri posudama.

Izolacija patogena iz karpofora vršena je po postupku primjenjenom u slučaju rizomorfi (uzimani su dijelovi stručka ili šešira veličine oko 2 mm³).

Petrijeve posude sa hranjivom podlogom i dijelovima uzoraka gljive su držani u tami pri temperaturi 23-24 °C, s tim što je povremeno vršena kontrola razvoja kultura i eventualne kontaminacije.

2.3.2 "Mating" test (sparivanje kultura)

Nakon što su dobijene čiste kulture gljive izvršen je "mating" test (sparivan-

je parova). Ovaj test podrazumijeva korištenje testera *Armillaria* vrsta, koji zapravo predstavljaju haploide dobivene iz bazidiospora koje je obezbjedio Prof. Dr. Ottmar Holdenrieder (Eidgenössische Technische Hochschule - ETH, Cirihi). Korišteni su slijedeći testeri:

<i>Armillaria</i> vrsta	Oznaka testera
<i>A. ostoyae</i>	C-2; C-4; C-5;
<i>A. gallica</i>	E-4; E-5
<i>A. borealis</i>	A-1; A-5
<i>A. cepistipes</i>	B-2; B-3
<i>A. mellea</i>	D-1; D-4

Ovaj test je zasnovan na Buller-ovom fenomenu po kojem se haploidni izolati testera koji je bijele boje, pri kontaktu sa nekim nepoznatim ali kompatibilnim diploidnim izolatom diploidizira, i tako transformiše (morfološki mijenja) u kulturu koja ima krastast, tamnocrven izgled, što je znak da se radi o istoj vrsti. Suprotno, ako je riječ o inkompatibilnom izolatu tada se na dodiru haploidnog testera i diploidnog izolata, čiji se identitet utvrđuje, javlja jasna zona razdvajanja, bez promjene morfološkog izgleda testera.

Na hranjivu podlogu u Petrijevim posudama fragmenti diploidnih kultura nepoznatih *Armillaria vrsta* postavljani su u parovima sa fragmentima haploidnih kultura testera na rastojanju 1-2 mm. Kulture su zatim držane u tami pri temperaturi 23-24°C i analizirane su nakon dva i četiri mjeseca. Identifikacija naših izolata je vršena na osnovu morfoloških promjena kultura.

3. Rezultati istraživanja

Na terenu je ukupno prikupljeno 48 uzoraka od kojih su 33 korišteni u laboratorijskoj proceduru. Preostali uzorci, najvećim dijelom karpofore, nisu bili pogodni za izolaciju gljive zbog lošeg stanja (oštećeni larvama insektima ili zahvaćeni procesom truleži)

Od ukupno 33 obrađena uzorka iz 24 su dobivene čiste kulture.

Nakon provedenog testa parova utvrđeno je da su analizirane kulture kompatibilne sa testerima kako je prikazano u tabeli 1:

Tabela 1.: Rezultati "mating" testa
Table 1.: Results of the mating test

<i>Armillaria</i> spp.	Oznaka testera	Kultura Ukupno
<i>A. ostoyae</i>	C-2	-
	C-4	-
	C-5	-
<i>A. gallica</i>	E-4	2
	E-5	1
<i>A. borealis</i>	A-1	-
	A-5	-
<i>A. cepistipes</i>	B-2	1
	B-3	-
<i>A. mellea</i>	D-1	-
	D-4	20
Ukupno		24

Utvrđeno je da od ukupno 24 analizirane kulture 20 pokazuje kompatibilnost sa vrstom *A. mellea*, tri sa *A. gallica*, a jedna sa *A. cepistipes*.

4. Diskusija i zaključci

Ovaj rad predstavlja prvi korak u istraživanju *Armillaria* vrsta u Bosni i Hercegovini i pomoći će boljem upoznavanju ovih patogena šumskog drveća u nas, a prije svega:

- koje vrste *Armillaria* su prisutne u BiH,
- kakav pristup ubuduće primjenjivati pri istraživanju *Armillaria* vrsta,
- koje mjere borbe koristiti.

Testovima kompatibilnosti utvrđeno je da je *A. mellea* najzastupljenija, dok su *A. gallica* i *A. cepistipes* znatno rjeđe, što se i očekivalo, jer je prikupljanje uzoraka izvršeno sa zaraženih biljaka sa uočljivim simptomima bolesti. Naime, *A. mellea* je najpatogenija vrsta i pretpostavljalo se da će biti predominantna.

Što se tiče *A. ostoyae*, koja nije konstatirana na četinarima gdje je "očekivana", nije moguće dati kritički osvrt obzirom na veličinu uzorka. Naredna istraživanja će pokazati koliko je ova vrsta značajna za naše područje, što vrijedi i za ostale *Armillaria* vrste koje se očekuju na područjima i supstratima koji odgovaraju njihovim ekološkim i biološkim karakteristikama. U tom pogledu istraživanjima koja su u toku više pažnje će se posvetiti prikupljanju uzoraka rizomorfi gljiva po sistematskom mrežnom modelu, što će omogućiti da se u sastojini obuhvate sve *Armillaria* vrste bez obzira na pojavne simptome njihovog prisustva. Ovim istraživanjima, međutim, akcentat je dat na parazitske vrste gljiva.

Literatura

1. Fox, R. T. V. (2000): *Armillaria* Root Rot: Biology and Control of Honey Fungus. Intercept Ltd. England.
2. Gallet, J. P.; B. Lung-Escarmant; P. Bracciano; B. Taris (1993): Biological control of *Armillaria* rootrot (*Armillaria ostoyae*) in pine forests in the south-west of France. Screening in vitro of wood decay fungi. Proceedings of the Eighth International Conference on Root and Butt Rots. IUFRO. Wik, Sweden and Haikko, Finland.
3. Guillaumin, J. J.; C. Mohammed; N. Anselmi; R. Courtecuisse; S. C. Gregory; O. Holdenrieder; M. Intini; B. Lung; H. Marxmüller; D. Morrison; J. Rishbeth; A. J. Termorshuizen; A. Tirro; B. Van Dam (1993): Geographical distribution and ecology of the *Armillaria* species in western Europe. European Journal of Forest Pathology, 23: 321-341.
4. Shaw III, C. G. and G. A. Kile (1991): *Armillaria* Root Disease. Agriculture hand book No. 691, Forest service US Department of Agriculture, Washington, D.C.
5. Usčuplić, M. (1978): Susceptibility of *Pinus strobus* to *Armillaria mellea* (Vahl.) Quel. and possible control. In Dimitri ed.: Proceedings of 5th International Conference on Problems of Root and Butt Rots in Conifers.

6. Uscuplić, M. (1986): Umiranje šuma u Bosni i Hercegovini. *Zaštita atmosfere*, 3. Sarajevo.
7. Uscuplić, M. (1996): Patologija šumskog i ukrasnog drveća. Šumarski fakultet Univerziteta u Sarajevu. Sarajevo.
8. West, J. S. (2000): Chemical Control of *Armillaria*. In: *Armillaria Root Rot: Biology and Control of Honey Fungus*. Ed. R. T. V. Fox. Intercept Ltd. England.

Summary

Armillaria spp. were studied in four regions of Central Bosnia during 2001. Samples of plant tissue with mycelium, rhizomorphs and fruit bodies as material for laboratory analysis were collected from/or near the following tree species: *Abies alba*, *Pinus austriaca*, *Picea abies*, *Quercus petraea* and *Fagus sylvatica*.

Obtained pure cultures were paired with haploid tester strains on malt-agar medium, and species identification was based on Buller phenomenon. In total, 24 isolates were analysed. The most common species was *Armillaria mellea* with 20 isolates. Other, less frequently found species were *A. galica* (three isolates) and *A. cepistipes* (one isolate).

Although *A. cepistipes* was expected in larger extent, since conifers were main species in sampling area, the results were not surprising due to rather small area studied and to small number of isolates obtained. Further investigation of *Armillaria species* focused on systematic collection of samples from larger area may bring different results.

Zahvala

Zahvaljujemo se predstojcima šumarstva BiH na čijim područjima je vršeno prikupljanje materijala, za saradnju, Prof. Dr. Ottmaru Holdenrieder (ETH Zürich) na ustupljenim testerima, te visem laborantu Senji Dedić za tehničku pomoć pri laboratorijskim istraživanjima.