

Plasmopara obducens – nova pretnja proizvodnji *Impatiens walleriana* u Srbiji

Danijela Ristić¹, Ana Vučurović¹, Ivana Stanković¹, Jelena Jović²,
Katarina Milojević¹, Aleksandra Bulajić¹ i Branka Krstić¹

¹ Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, 11080 Beograd, Nemanjina 6, Srbija
(branka.krstic@agrif.bg.ac.rs)

² Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Odsek za štetočine bilja, 11080 Beograd,
Banatska 33, Srbija

Primljen: 28. marta 2011.

Prihvaćen: 4 aprila 2011.

REZIME

Tokom 2010. godine biljke *Impatiens walleriana* sa simptomima plamenjače sakupljene su u stakleniku u okolini Mionice, Kolubarski okrug. Učestalost oboljenja bila je izuzetno visoka, blizu 100%, a sušenje i propadanje zaraženih biljaka veoma brzo, što je dovelo do šteta većih od 90%. Bela prevlaka patogena koja se razvijala na naličju listova sastojala se od hijalinskih monopodijalno razgranatih sporangiofora sa tankim zidovima i brojnih, ovoidnih i hijalinskih sporangija. Vrhovi grana sporangiofora granali su se pod pravim uglom u odnosu na glavnu osu, bez vršnog zadebljanja. Testovi patogenosti uključili su inokulacije mladih biljaka *I. walleriana* prskanjem suspenzijom sporangija, a simptomi plamenjače razvili su se nakon 13-15 dana. Odsustvo definisanih pega na zaraženim listovima *impatiens*a i prisustvo pravih sporangiofora ukazalo je da je prouzrokovatelj *P. obducens*, što je dalje potvrđeno molekularnom identifikacijom. Primenom lančane reakcije polimeraze (polymerase chain reaction, PCR), pomoću prajmera NL1 i NL4, umnožen je kodirajući 5'-kraj DNA velike ribozomalne podjedinice (LSU rDNA). Amplifikovani produkt odabranog izolata 28-10 je sekvencioniran, a filogenetske analize pokazale su njegovo grupisanje sa ostalim izolatima *P. obducens* različitog porekla. Uzimajući u obzir da je ovim istraživanjima dokazano da je prouzrokovatelj plamenjače na *Impatiens walleriana* u Srbiji *P. obducens*, neophodno je preduzimanje odgovarajućih fitosanitarnih mera u cilju sprečavanja daljeg širenja patogena u našoj zemlji.

Cljučne reči: *Impatiens walleriana*; plamenjača; morfološke karakteristike; molekularna identifikacija; filogenetske analize

UVOD

Rod *Impatiens* obuhvata oko 900 vrsta koje rastu u tropskom i subtropskom regionu Afrike i jugoistočne Azije i spada među najpoznatije i ekonomski najznačajnije ukrasne biljke (Yuan i sar., 2004). U našoj zemlji gaje se samo tri hortikulturne vrste ovog roda, i to: *I. walleriana*, *I. balsamina* i *I. hawkerii* (Vukićević, 1973). Poslednjih godina, zbog svojih dekorativnih osobina, ove vrste se sve više koriste za oplemenjivanje javnih zelenih površina, bašti i balkona (Vujošević i sar., 2008). U većini područja gde se *Impatiens* spp. gaje, javljaju se različita oboljenja, među kojima i plamenjača koju mogu da prouzrokuju tri različite vrste, *Plasmopara obducens*, *Bremiella sphaerosperma* (Constantinescu, 1991) i *Pseudoperonospora cubensis* (Voglmayr i sar., 2009).

P. obducens prvi put je opisana u Nemačkoj 1877. godine na divljoj vrsti *Impatiens noli-tangere*, koja raste u zemljama umerene klime, na severnoj hemisferi, uključujući Veliku Britaniju. Od tada, patogen je identifikovan na brojnim gajenim i divljim vrstama iz roda *Impatiens*, uključujući *I. walleriana*, *I. capensis*, *I. fulva*, *I. pallida* i *I. balsamina* (Jones i O'Neill, 2004). U Holandiji, bolest je otkrivena na ukrasnom hibridu New Guinea (*I. hawkerii*), mada prouzrokovac nije dokazan (Jones, 2004). Do sada je prisustvo *P. obducens* zabeleženo u Bugarskoj, Republici Češkoj, Danskoj, Finskoj, Litvaniji, Rumuniji, Rusiji i UK (Lane i sar., 2005) i nedavno u Norveškoj (Toppe i sar., 2010). Izvan Evrope, prisustvo *P. obducens* ustanovljeno je u Kaliforniji (Wegulo i sar., 2004) i više drugih država u SAD (Palm, 2004), Australiji (Cunnington i sar., 2008) i Koreji (Choi i sar., 2009). Rasprostranjenost *B. sphaerosperma* uglavnom se vezuje za delove Kanade, SAD i dalekog istoka bivšeg SSSR (Constantinescu, 1991), dok o *P. cubensis* kao patogenu vrsta *Impatiens* postoji samo jedan nalaz iz Kamerona (Voglmayr i sar., 2009).

Nedavna pojava *P. obducens* u Velikoj Britaniji tokom 2003. godine nanela je ogromne štete u rasadničkoj proizvodnji *I. walleriana* i proizvela gubitke 80-90% (Lane, 2005; Anonymous, 2006). Takođe, 2006. godine u jugoistočnoj Australiji, u Melburnu, zabeležena je pojava *P. obducens* u komercijalnom usevu *I. walleriana* cv. Fiesta, a učestalost pojave oboljenja bila je veoma visoka, približno 90% (Cunnington i sar., 2008). Visok nivo zaraze od 100% zabeležen je i prilikom prve pojave *P. obducens* u Kaliforniji, na *I. walleriana* cv. Sparkler Hot pink. Tokom 2008. i 2009. godine,

u Norveškoj, pojava i štete od *P. obducens* zabeležene su na *I. walleriana* cv. Xtreme Red i to na biljkama kako gajenim u zaštićenom prostoru, tako i u javnim parkovima (Toppe i sar., 2010).

Efikasno rasejavanje *P. obducens* pomoću brojnih sporangija nošenih vazдушnim strujama i kapima vode nošenih vetrom (EPPO, 2005; Sansford, 2007) doprinosi da se patogen lako i brzo širi u objektu proizvodnje, a visoka vlažnost i pro hladni uslovi doprinose relativno kratkoj inkubaciji i brzom nagomilavanju inokuluma. Specifična epidemiologija, efikasan način širenja i velika osetljivost pojedinih vrsta i hibrida *Impatiens* spp., čine kontrolu komplikovanom i skupom (Sansford, 2007; Beales, 2008). Velika pažnja mora se posvetiti načinu proizvodnje semena i rasada *Impatiens* spp. u rasadnicima, načinu pakovanja i izolaciji uz redovne nedeljne hemijske tretmane odgovarajućim fungicidima (McPherson i Brough, 2009; Anonymous, 2010). Prilikom prometa semena i reznica *Impatiens* spp. naročitu opasnost predstavlja maskiranje simptoma usled tretmana fungicidima, tako da vizuelni pregled ne onemogućava sprečavanje unošenja patogena (Sansford, 2007). Moguće zaraze koje potiču od zaraženih samoniklih biljaka domaćina iz prirode koje služe kao rezervoari inokuluma, kao što je *I. noli-tangere*, smatraju se malo verovatnim (Jones i O'Neill, 2004).

Kako su različite forme biljaka iz roda *Impatiens* sve popularnije i često gajene ukrasne biljke u našoj zemlji, prva detekcija *P. obducens* (Bulajić i sar., 2011) ukazala je na veliku opasnost za domaću proizvodnju. Bolest se veoma brzo širila i nanela velike gubitke uništivši gotovo 100% proizvedenih biljaka. Upravo zbog toga, osnovni cilj sprovedenih istraživanja bio je da se skrene pažnja stručne i naučne javnosti na prisustvo novog, potencijalno opasnog patogena ukrasnih biljaka u Srbiji, kao i da se razvije protokol za molekularnu detekciju *P. obducens* u prirodno zaraženim biljkama *I. walleriana* i rekonstruiše filogenetsko stablo čime bi se odredilo mesto izolata iz *I. walleriana* poreklom iz Srbije u populaciji *P. obducens* u svetu.

MATERIJAL I METODE

Sakupljanje uzoraka obolelih biljaka

Pregledom proizvodnje ukrasnih biljaka u zaštićenom prostoru, tokom maja 2010. godine, u lokalitetu Mionica (okrug Kolubara), uočeno je naglo propadanje

velikog broja biljaka nekoliko različitih hibrida *Impatiens walleriana* sa jednostrukim i dvostrukim cvetovima, gajenih za tržište u saksijama. Sakupljene biljke iz saksija, sa simptomima koji su ukazivali na pojavu plamenjače, transportovane su u laboratoriju Katedre za fitopatologiju Poljoprivrednog fakulteta. Pregled i dopremanje biljaka obavljani su u intervalu od tri nedelje. Ukupno je sakupljeno i analizirano 29 biljaka *I. walleriana* u različitim fazama razvoja simptoma, od početnih pa do faze kada su biljke bile sa skoro potpuno osušenim listovima.

Provera patogenosti

Test provere patogenosti obavljen je veštačkom inokulacijom mladih nezaraženih biljaka *I. walleriana*, obezbeđenih iz rasadnika u blizini Beograda. Veštačke inokulacije obavljene su prskanjem test-biljaka suspenzijom zoospora pripremljenom po metodi Denman i sar. (2005). Zrele sporangije, pronađene na naličju listova izvornih zaraženih biljaka, unete su u 5 ml sterilne vode direktnim struganjem sterilnim staklenim štapićem. Pripremljena suspenzija inkubirana je 1 h na 7°C i potom 75 min na 20°C da bi se oslobodile zoospore. Koncentracija zoospora merena je i podešena hemocitometrom na 1×10^4 zoospora/ml. Tako pripremljenom suspenzijom zoospora oprskano je 10 biljaka *I. walleriana*, koje su potom održavane u kontrolisanim uslovima na temperaturi od 20°C i visokoj relativnoj vlažnosti vazduha. Kao negativna kontrola korišćene su tri biljke istog uzrasta tretirane sterilnom vodom. Pojava simptoma praćena je svakodnevno do 15 dana posle inokulacije.

Morfološke karakteristike

Morfološke odlike predstavljaju važan taksonomski kriterijum u identifikaciji različitih prouzrokača plamenjače. Kako se radi o obligatnim patogenima, identifikacija je obavljena na osnovu proučavanja morfoloških mikroskopskih osobina gljive *in situ*, direktno na biljci domaćinu. Direktnim mikroskopiranjem određivani su izgled i dimenzije tvorevina polnog i bespolnog razmnožavanja. Određivano je prisustvo oospora u prirodno i veštački zaraženim biljkama *I. walleriana*, kao i prisustvo organa bespolnog razmnožavanja: mesto formiranja, izgled, tip i način grananja sporangiofora, kao i izgled, raspored i boja sporangija, a merene su dimenzije 100 slučajno odabranih sporangija za određivanje njihove prosečne dužine i širine.

Molekularna detekcija i identifikacija

Metoda lančane reakcije polimeraze (polymerase chain reaction, PCR) primenjena je u cilju molekularne detekcije i identifikacije *P. obducens*. Za ova ispitivanja odabran je uzorak 28-10 poreklom iz ukrasne biljke *I. walleriana*, iz lokaliteta Mionica (okrug Kolubara). Ekstrakcija ukupne DNA obavljena je na dva načina, odvajanjem 100 mg biljnog tkiva neposredno iz zaraženih listova sa micelijom patogena i iz prevlake sporangiofora i sporangija sa naličja lista koje su sterilnim skalpelom direktno nanošene u mikrotubicu za ekstrakciju. Oba načina ekstrakcije ukupne DNA izvršena su primenom DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) prema uputstvu proizvođača. PCR reakcija obavljena je NL1/NL4 parom prajmera (Maier i sar., 2003) koji omogućavaju amplifikaciju i sekvencioniranje kodirajućeg 5'-kraja DNA velike ribozomalne podjedinice (LSU rDNA). PCR reakcija obavljena je u radnoj zapremini od 25 μ l, korišćenjem 12,5 μ l 2X PCR Master miksa (K071, Fermentas, Lithuania), 9 μ l Rnase-free vode, po 1,25 μ l svakog prajmera (100 pmol/ μ l) i 1 μ l ekstrahovane ukupne DNA. Kao negativne kontrole korišćene su ukupna DNA ekstrahovana iz listova zdravih *I. walleriana* i Rnase-free voda koje su dodate u pripremljenu PCR smešu umesto ciljane DNA. Reakcija je izvedena korišćenjem Thermocycler (Biometra, UK) pri sledećim uslovima: inicijalna denaturacija nukleinskih kiselina 5 min na 94°C; 30 ciklusa koji se sastoje od denaturacije 30 s na 95°C, hibridizacije 1 min na 51°C, elongacije 1 min na 72°C; finalna elongacija 72°C 7 min.

Vizuelizacija dobijenih produkata izvršena je elektroforezom u 1% agaroznom gelu, bojenjem u rastvoru etidijum-bromida finalne koncentracije 0,5 μ g/ml i posmatranjem pod UV transiluminatorom. Za određivanje veličine umnoženog amplikona korišćen je marker, MassRuler™ DNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences GmbH, Lithuania).

Nakon amplifikacije, zbog pojave dvostrukih traka u gelu, PCR produkti su isecani iz agaroznog gela i prečišćeni pomoću QIAquick Gel Extraction Kit-a (Qiagen, Hilden, Germany), a potom poslani na uslužno sekvencioniranje u BMR Genomics (Padova, Italy) sa oba prajmera. Dobijena sekvencija je obrađena u programu FinchTV Version 1.4.0., određena je konsenzus sekvencija i podneta u National Center for Biotechnology Information (NCBI) banku podataka, posle čega joj je dodeljen pristupni broj (GenBank Accession number).

Tabela 1. Sekvence (LSU rDNA) regiona korišćene za filogenetsku analizu u okviru roda *Plasmopara*

Vrsta	Izolot	Geografsko poreklo	Domaćin	Pristupni broj	Referenca
<i>Plasmopara angelicae</i>	AR198	Austrija	<i>Angelica sylvestris</i>	AY250153	Voglmayr i sar., 2004.
<i>Plasmopara baudysii</i>	HV557	Austrija	<i>Berula erecta</i>	AY035517	Riethmueller i sar., 2002.
<i>Bremiella sphaerosperma</i>	HV-PA4	Austrija	<i>Impatiens capensis</i>	EF196868	Voglmayr i sar., 2007.
<i>Bremiella sphaerosperma</i>	HV-PA16	Austrija	<i>Impatiens capensis</i>	EF196867	Voglmayr i sar., 2007.
<i>Plasmopara densa</i>	MG6-1	Nemačka	<i>Rhinanthus alectorolophus</i>	AY035525	Riethmueller i sar., 2002.
<i>Plasmopara balstedii</i>	Ph19-01	Mađarska	<i>Helianthus annuus</i>	AY178533	Spring i sar., 2003.
<i>Plasmopara obducens</i>	HV5.4.P.O.	USA	<i>Impatiens capensis</i>	AY035522	Riethmueller i sar., 2002.
<i>Plasmopara obducens</i>	HV207	Austrija	<i>Impatiens noli-tangere</i>	EF196869	Voglmayr i sar., 2007.
<i>Plasmopara obducens</i>	/*	UK	<i>Impatiens walleriana</i>	AY587558	Lane i sar., 2005.
<i>Plasmopara obducens</i>	/	Italija	<i>Impatiens walleriana</i>	FJ787308	neobjavljeno
<i>Plasmopara viticola</i>	AR160	Nemačka	<i>Vitis vinifera</i>	AY035524	Riethmueller i sar., 2002.
<i>Plasmopara pygmaea</i>	AR86	Nemačka	<i>Anemone ranunculoides</i>	AF119605	Riethmueller i sar., 2002.
<i>Plasmopara sii</i>	HV550	Nemačka	<i>Sium latifolium</i>	AY035518	Riethmueller i sar., 2002.
<i>Pseudoperonospora cubensis</i>	HV221h	Austrija	<i>Cucumis sativus</i>	AY035496	Riethmueller i sar., 2002.
<i>Plasmopara obducens</i>	28-10	Srbija	<i>Impatiens walleriana</i>	HQ246451	Bulajić i sar., 2010.

*/-nema podataka

Višestruko poređenje dobijene sekvence sa dostupnim sekvencama odgovarajućeg regiona genoma gljiva u GenBank bazi podataka (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) urađeno je pomoću BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) analize i softverskog paketa MEGA verzija 4.0. (Tamura i sar., 2007). Proračun genetičke udaljenosti i najviši stepen nukleotidne sličnosti dobijene sekvence odabranog izolata sa odgovarajućim sekvencama izolata iz drugih delova sveta, kao i filogenetska analiza obavljene su takođe korišćenjem MEGA programa. Filogenetsko stablo rekonstruisano je na osnovu 15 sekvenci (large subunit ribosomal DNA, LSU rDNA) dela regiona vrsta koje su identifikovane kao pripadnici roda *Plasmopara* ili rodovima koji imaju značaj za proučavanje taksonomije roda *Plasmopara* (Tabela 1), korišćenjem Neighbour-Joining metode i bootstrap analize sa 1000 ponavljanja.

REZULTATI

Simptomi bolesti

Pregledima stakleničke proizvodnje ukrasnih biljaka, sprovedenim tokom maja 2010. godine, na biljkama *I. walleriana* gajenim u uslovima staklenika u lokalitetu Mionica, zabeležena je pojava intenzivnih simptoma plamenjače. Procenjena zaraženost pregledanih biljaka *I. walleriana* bila je veoma visoka, a sušenje i brzo propadanje zaraženih biljaka rezultiralo je procenjenim gubicima od preko 90%. Zaražene biljke ispoljavale su simptome prvenstveno na listovima u vidu blagog šarenila i žutila (Slika 1), a na naličju listova formirala se bela micelijska prevlaka sa mnoštvom sporangiofora i sporangija (Slika 2). Prisustvo karakterističnih sporangiofora i sporangija ustanovljeno je na svih 29 uzorkovanih

biljaka, dok prisustvo oospora, kao tvorevina za preživljavanje, nije ustanovljeno u listovima, lisnim peteljka, kao ni u stablu nijednog od ispitivanih uzoraka. Listovi sa belom prevlakom na naličju veoma brzo su nekrotirali, prvo sa ivica (Slika 3), a potom je nekroza

zahvatala čitave listove, širila se i na najmlađe delove, što se manifestovalo kao nekroza vrha grana i vodilo je ka sušenju čitavih biljaka (Slika 4). Veoma čest i uobičajen simptom bio je i prevremeno opadanje listova na zaraženim biljkama.



Slika 1. *Plasmopara obducens*: biljka *I. walleriana* sa blagim šarenilom i žutilom lišća



Slika 2. *Plasmopara obducens*: bela micelijska prevlaka na naličju lista *I. walleriana*



Slika 3. *Plasmopara obducens*: početna nekroza na listu *I. walleriana*



Slika 4. *Plasmopara obducens*: nekroza i sušenje zaraženih biljaka *I. walleriana*

Provera patogenosti

U odgovarajućim uslovima postavljenog eksperimenta reprodukovani su simptomi prirodne infekcije. Prve promene tkiva na lišću *I. walleriana*, koje je veštački zaražavano prskanjem inokulumom patogena, uočene su 13-15 dana od inokulacije. U početku razvoja simptoma, uočena je promena boje lišća u vidu blagog šarenila i žutila, a na naličju listova formirala se gusta bela prevlaka u vidu skrame. Već 3-5 dana nakon pojave bele prevlake na naličju listova uočena je pojava prvih nekroza na zaraženim listovima, što je bilo praćeno nekrozom i sušenjem celih listova i bočnih grana. Simptomi su po izgledu u potpunosti odgovarali simptomima na prirodno zaraženim biljkama. Na biljkama koje su kao negativna kontrola tretirane sterilnom

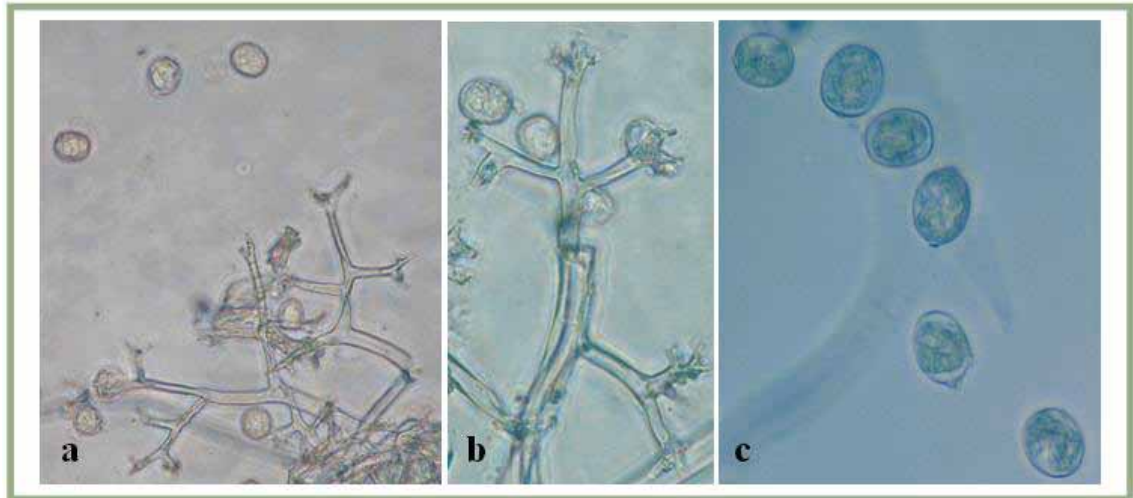
vodom umesto inokulumom patogena, nije došlo do pojave simptoma niti bilo kakvih promena.

Morfološke karakteristike

Tokom ispitivanja morfoloških osobina, koje je obavljeno *in situ* direktno na izvornim i veštački zaraženim biljkama *I. walleriana*, nije ustanovljeno prisustvo tvorevina polnog razmnožavanja patogena, oogonija ili oospora. Međutim, tvorevine bespolnog razmnožavanja, sporangiofore i sporangije koje su se obilno formirale na naličju lista u vidu beličaste skrame, bile su istih morfoloških osobina, kako na prirodno tako i na veštački zaraženim biljkama. Gusta bela prevlaka na naličju lista sastoji se od brojnih hijalinskih sporangiofora sa

tankim zidovima. Pojedinačne grane sporangiofora formirale su se bez specifičnog rasporeda, zahvatajući čitavu površinu naličja zaraženih listova, i bile su relativno duge, čvrste, slabo savitljive i monopodijalno razgranate. Na sporangioforama uočljive su bočne

grane koje se formiraju pod skoro pravim uglom u odnosu na glavnu granu i bez vršnog zadebljanja. Bočne grane završavaju se sa 2-3 sterigme na kojima su se formirale brojne, ovalne i bezbojne sporangije, dimenzija 15-20 x 11-16 μm , u proseku 18 x 15 μm (Slika 5).

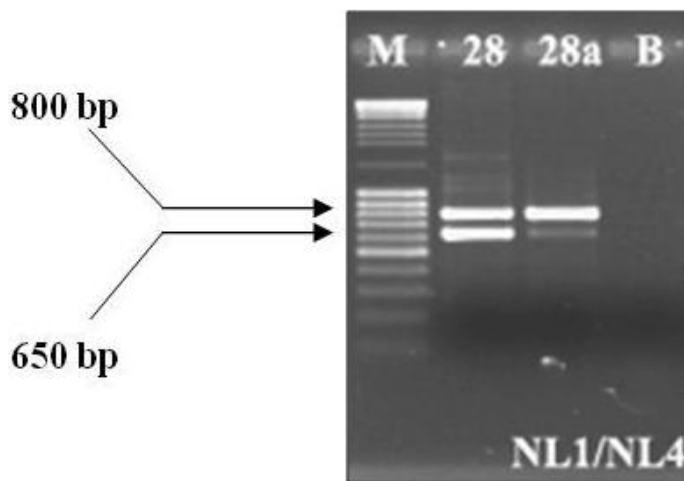


Slika 5. *Plasmopara obducens*: izgled sporangiofora (a i b) i sporangija (c)

Molekularna detekcija i identifikacija *Plasmopara obducens*

Molekularna metoda PCR uspešno je primenjena za detekciju *P. obducens* uz korišćenje prajmera NL1/NL4. Kod odabranog reprezentativnog uzorka, korišćenjem oba načina ekstrakcije, direktno iz zaraženog lišća (uzorak 28-10), kao i iz sporangiofora i sporangija (uzorak 28a-10), us-

pešno je došlo do amplifikacije 5'-kraja (LSU rDNA) regiona genoma. Međutim, primenom oba načina ekstrakcije, nakon amplifikacije u gelu su se mogle uočiti dve trake, ukazujući na pojavu nespecifične reakcije. Kod oba ispitivana uzorka, u svim ponavljanjima, rezultati dobijeni PCR reakcijom potvrđuju prisustvo dve trake procenjene veličine oko 800 bp i 650 bp (Slika 6). Do amplifikacije nije došlo kod uzoraka koji su predstavljali negativne kontrole.



Slika 6. Elektroforetska analiza PCR proizvoda dobijenih korišćenjem seta prajmera NL1/NL4

Kolone: M – MassRuler™ DNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences GmgH, Lithuania), 2 – izolat 28-10 iz zaraženog lišća *I. walleriana*, 3 – izolat 28a-10 iz sporangiofora i sporangija, 4 – negativna kontrola – PCR mix sa vodom

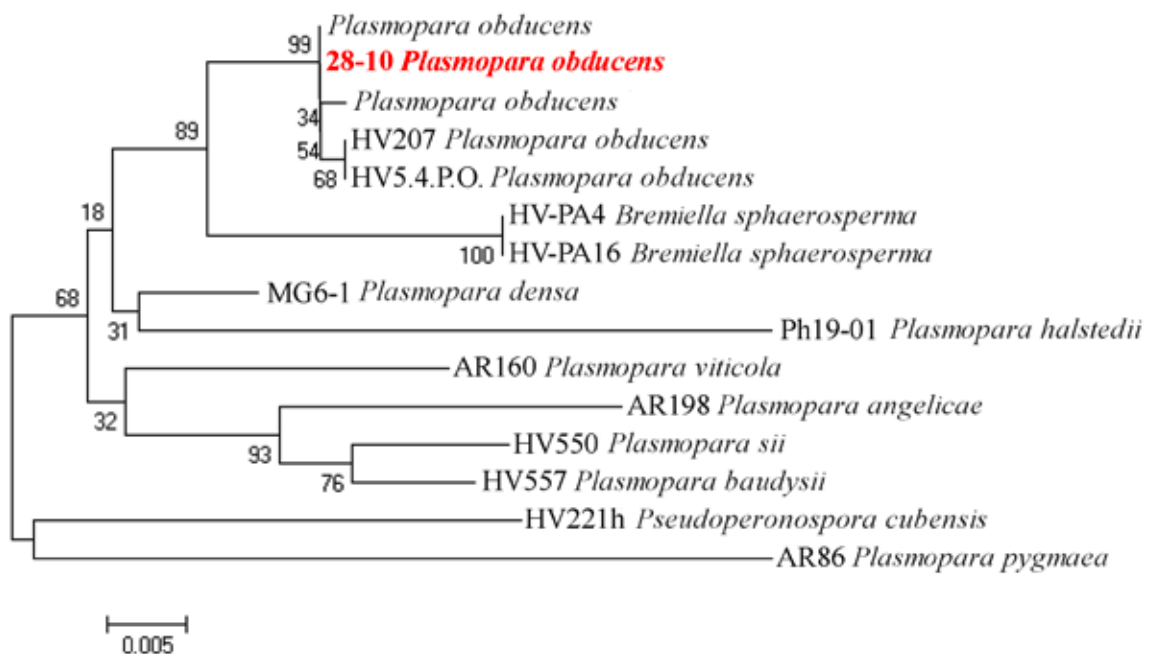
Nakon sekvencioniranja oba PCR produkta dobijenih amplifikacijom iz zaraženog lišća *I. walleriana* uzorka 28-10, korišćenjem para prajmera NL1/NL4 i njihove obrade u FinchTV programu, konsenzus nukleotidne sekvence depovane su u NCBI bazu podataka pod pristupnim brojevima HQ246451 i HQ223336. BLAST analiza sekvence dužeg produkta (727 bp) pokazala je 99 do 100% nukleotidne identičnosti sa sekvencama četiri izolata *P. obducens* deponovanih u NCBI bazi podataka. Sekvenca HQ223336 kraćeg produkta (585 bp) pokazala je nukleotidnu identičnost sa tri sekvence *Impatiens* spp. (AY727936, AF479154, AY056515).

Dalja karakterizacija obavljena je višestrukim uparivanjem sekvenci dostupnih u NCBI bazi podataka pomoću MEGA 4 softvera. Proračunom genetičke sličnosti, izolat 28-10 je pokazao najviši stepen nukleotidne identičnosti od 100% sa izolatom *P. obducens* (AY587558) poreklom iz *I. walleriana* iz Velike Britanije. Nešto niži stepen identičnosti od 99,9%, sa razlikom u jednom nukleotidu, pokazao je sa dve sekvence iz NCBI baze podataka: EF196869 (izolat HV207, iz *I. noli-tangere* iz Austrije) i AY035522 (izolat HV5.4.P.O., iz *I. capensis* iz USA), a 99,7% sličnosti, sa razlikom u dva nukleotida, ispoljio je sa

sekvencom FJ787308 poreklom iz *I. walleriana* iz Italije. Značajno niži stepen nukleotidne identičnosti od 97,4%, sa razlikom u 16 nukleotida, ispitivani izolat ispoljio je sa sekvencama *B. sphaerosperma* (EF196867, EF196868) poreklom iz *I. capensis* iz Austrije.

Filogenetska analiza

Dobijene nukleotidne sekvence 5'-kraja (LSU rDNA) regiona odabranog izolata 28-10 iz zaraženog lišća *I. walleriana* međusobno su uparene sa 14 sekvenci izolata vrsta roda *Plasmopara* i drugih srodnih rodova i vrsta, dostupnih u NCBI bazi podataka. Izvršeno je poređenje ukupno 649 baznih parova i rekonstruisano je filogenetsko stablo Neighbour-Joining metodom (Slika 7). Ispitivani izolat 28-10 grupisao se sa ostalim izolatima koji pripadaju vrsti *Plasmopara obducens*. Filogenetska analiza nukleotidnih sekvenci LSU rDNA regiona pokazuje da se izolati *P. obducens* grupišu u jednu jasno definisanu grupu, da su vrlo srodni izolatima *B. sphaerosperma* i nešto udaljeniji od *P. densa* i *P. halstedii*. Izolat prethodno identifikovan kao *Pseudoperonospora cubensis* nalazi se u udaljenoj grupi, zajedno sa *Plasmopara pygmaea*.



Slika 7. Filogenetsko stablo rekonstruisano na osnovu sekvenci 5'-kraja (LSU rDNA) regiona 15 izolata *Plasmopara* spp. korišćenjem MEGA4 softvera i Neighbour-Joining metode sa bootstrap analizom u 1000 ponavljanja. Dužina grana proporcionalna je broju promena baznih parova. Izolat iz *I. walleriana* iz Srbije istaknut je crvenom bojom.

DISKUSIJA

Ukrasne biljke u našoj zemlji, po obimu i vrednosti proizvodnje, beleže izražen trend porasta, što ilustruje vrednost spoljnotrgovinske razmene koja u 2009. godini dostiže 15,6 miliona američkih dolara. Značajno povećanje izvoza i smanjenje spoljnotrgovinskog deficita za 27,5%, ukazuju da naročito raste domaća proizvodnja (Privredna komora Srbije, 2010), a hortikultura vrsta *I. walleriana* sve češće je zastupljena. Tokom ovih istraživanja, u Mionici, jednom od brojnih lokaliteta proizvodnje *Impatiens* vrsta u saksijama, došlo je do epidemijske pojave plamenjače (prouzrokovaoč *P. obduccens*), tako da je praktično celokupna proizvodnja osetljivih sorti propala.

Zbog ekonomskih šteta u komercijalnoj proizvodnji ukrasnih biljaka, prouzrokovaoči plamenjače nedavno su postali veoma značajni (Voglmayr i Constantinescu, 2008). Među najznačajnijim prouzrokovaočima bolesti ukrasnih biljaka roda *Impatiens* ističu se *P. obduccens* i *B. sphaerosperma*, široko rasprostranjene vrste koje ograničavaju proizvodnju u severnoj hemisferi (Sansford, 2007). Kada su ustanovljene prve značajne epidemije *P. obduccens* najmanje u dve zemlje EPPO regiona i u drugim delovima sveta, EPPO sekretarijat odlučio je da se ovaj patogen uključi na EPPO Alert listu (EPPO Reporting Service, 2005). Ovakav karantinski status doveo je do značajnih epidemioloških istraživanja i kompetentne procene rizika koji pojava ovog patogena predstavlja (Jones i O'Neill, 2004; Palm, 2004; Sansford, 2007; Beales, 2008). Ocenjeno je da postoji realna opasnost od stalnih i višestrukih unošenja ovog patogena, ali i da su troškovi stalnog karantinskog nadzora pojave *P. obduccens* preveliki za državu i da je neophodno prebaciti odgovornost i praćenje pojave na same proizvođače ukrasnog bilja. Zbog toga je doneta odluka da se *P. obduccens* isključi sa Alert liste (EPPO, 2008) uz preporuku da se stalno prati i kontrolišu rizični koraci u proizvodnji osetljivih biljaka iz roda *Impatiens* kako bi se sprečile velike štete koje mogu nastati.

Način dospevanja *P. obduccens* u novo proizvodno područje još uvek nije sa sigurnošću ustanovljen. Patogen može da se raširi na relativno kratka rastojanja putem vode i čak do 20 km putem vetra (Anonymus, 2010) i, kao obligatni patogen, može da preživi samo u zelenom tkivu domaćina. Na veće udaljenosti, širenje patogena moguće je preko zaraženog biljnog materijala, a postoje i nepotvrđeni nalazi o prenošenju semenom. Setvom zaraženog semena, u vlažnim i prohladnim uslovima mogu nastati sistemski zaražene biljake. Takve biljke mogu da imaju dugi latentni period pre nego što se pojave

prvi simptomi (Anonymus, 2006). U zaštićenom prostoru irigacioni sistem zalivanja proizvodi visoku vlažnost koja pogoduje razvoju bolesti. U toku noći vlažnost vazduha pojačava površinsku vlagu listova i omogućava patogenu da sporuliše. Nekoliko zaraženih biljaka može da proizvede dovoljno spora da zarazi stotine drugih (Jones, 2004). Istraživanja u Australiji, sprovedena u rasadnicima, pokazuju da je bolest pored cv. Fiesta, pronađena i na drugim biljkama *Impatiens*-a sa duplim ili običnim cvetovima. Najčešće su zaražene biljke rasle iz semena, a neke iz reznica (Cunnington i sar., 2008).

Kako je *P. obduccens* obligatni patogen, identifikacija je obavljena na osnovu izgleda simptoma, morfoloških mikroskopskih osobina patogena posmatranog *in situ*, obavljenih testova patogenosti i molekularne identifikacije i karakterizacije. Simptomi na *Impatiens* vrstama, uočeni tokom ovih istraživanja, a koji su bili u vidu blagog šarenila i žutila lišća, bez prisustva jasno ograničenih i definisanih pega, uz prisustvo guste, bele prevlake sporangiofora i sporangija na naličju lista, u potpunosti odgovaraju literaturnim podacima za *P. obduccens* (Jones i O'Neill, 2004; EPPO, 2005; Lane i sar., 2005; Anonymus, 2006; Beales, 2008; Castalanelli i Hoffmann, 2008; Choi i sar., 2009). Za druge dve vrste koje su opisane kao prouzrokovaoči plamenjače na *Impatiens* spp., navodi se da obe, i *B. sphaerosperma* (Constantinescu, 1991) i *P. cubensis* (Voglmayr i sar., 2009) izazivaju pojavu definisanih i ograničenih pega. Izolat iz Srbije formirao je duge i uspravne sporangiofore koje se monopodijalno granaju pod pravim uglom, što je na osnovu literaturnih podataka, karakteristično za *P. obduccens* (Constantinescu, 1991; Wegulo i sar., 2004; Cunnington i sar., 2008; Toppe i sar., 2010; Bulajić i sar., 2011). Po navodima Constantinescu (1991) drugi prouzrokovaoč plamenjače, *B. sphaerosperma*, prema morfologiji sporangiofora jasno se razlikuje i karakteriše dihotomim grananjem sporangiofora sa jasno izraženim vršnim bradavičastim izraštajem.

Patogenost i infektivnost *P. obduccens* proveravana je veštačkom inokulacijom sejanaca biljaka *I. walleriana*. Dobijeni simptomi i vreme inkubacije u potpunosti odgovaraju rezultatima dobijenim istraživanjima u Kaliforniji (Wegulo i sar., 2004) i Norveškoj (Toppe i sar., 2010), kada je za pojavu simptoma bilo potrebno 12, odnosno 14 dana. Na ovaj način zadovoljeni su Kohovi postulati i potvrđena je patogenost odabranog izolata 28-10 poreklom iz Srbije.

Kako je preliminarna identifikacija konvencionalnim metodama, na osnovu simptoma na prirodnim i veštački zaraženim biljkama i morfologije sporangiospora i sporangija ukazala da se radi o *P. obduccens*, dalje se pristupilo molekularnoj detekciji i identifikaciji. Razvijen je

protokol za brzu i pouzdanu molekularnu detekciju primenom PCR metode uz upotrebu para prajmera NL1/NL4. Ovaj protokol pokazao se veoma pouzdanim, iako su amplifikovana dva produkta, kako DNA *P. obducens*, tako i DNA biljke domaćina. Pojava trake očekivane veličine od 800 bp potvrda je prisustva *P. obducens* u ispitivanom uzorku. Primenom ovog protokola, sekvenciranjem, višestrukim uparivanjem sa sekvencama drugih izolata dostupnih u NCBI bazi podataka i proračunom genetičke sličnosti, ispitivani izolat *P. obducens* poreklom iz Srbije molekularno je okarakterisan. Prema proračunu genetičke udaljenosti, najviši stepen nukleotidne identičnosti od 100%, izolat iz Srbije ispoljio je sa izolatom *P. obducens* poreklom iz *I. walleriana* iz UK (Lane i sar., 2005). Niži stepen homologije od 99,7%, sa razlikom u dva nukleotida ispoljio je sa sekvencom izolata poreklom iz *I. walleriana* iz Italije (FJ787308; neobjavljeni podaci). Kao potvrda identifikacije konvencionalnim analizama, molekularna detekcija i filogenetske analize pokazale su da je prouzrokovatelj plamenjača na *I. walleriana* u Srbiji *P. obducens*, odnosno da se ispitivani izolat 28-10 nalazi u grupi sa ostalim izolatima *P. obducens* iz *Impatiens*-a, poreklom iz različitih delova sveta (UK, Austrije, Italije i SAD). Dve dostupne sekvence *B. sphaerosperma* čine odvojenu, blisko srodnu grupu.

Analiza sekvenci grupa vrsta koje pripadaju parafiletikom klasteru *Plasmopara* u najužem smislu (core species) pokazala je da između ove dve vrste postoji blizak međuodnos (Vogelmayr i sar., 2004; Vogelmayr i Constantinescu, 2008; Choi i sar., 2009) bez obzira na izražene morfološke razlike zbog čega su svrstane u različite rodove (Constantinescu, 1991). Do nedavno, pretpostavke o filogenetskim međuodnosima prouzrokovaca plamenjača i njihovih srodnika (Peronosporales, Chromista) bile su uglavnom zasnovane na morfološkim kriterijumima. Uvođenje molekularne filogenetike otvorilo je nove aspekte i za kratko vreme dovelo do drugačijih i novih procena međuodnosa ove značajne grupe biljnih patogena (Riethmüller i sar., 2002; Voglmayr i sar., 2004). Ustanovljeno je da dve vrste koje su na osnovu morfologije sporangiofora svrstane u različite rodove, *Plasmopara* i *Bremiella*, a obe izazivaju plamenjaču biljaka iz roda *Impatiens*, formiraju sestrinsku grupu (Voglmayr i Thines, 2007). Ovakvi nalazi potvrdili su da su neki morfološki kriterijumi precenjeni i da nisu filogenetski informativni (Voglmayr i sar., 2004). Klaster koji formiraju ove dve vrste je monofiletički uprkos evidentnim razlikama u morfologiji sporangiofora (Rietmüller i sar., 2002), zbog čega Voglmayr i Thines (2007) uvode promenu u nomenklaturi ovih vrsta i preporučuju da

vrstu *Bremiella sphaerosperma* treba ubuduće navoditi kao *Plasmopara constantinescui*.

Proizvodnja ukrasnih biljaka se uglavnom vezuje za geografski udaljena područja u kojima su veoma često prisutni brojni patogeni koji zahtevaju karantinski nadzor, jer potencijalno mogu naneti velike ekonomske gubitke proizvodnji pojedinih biljaka (Daughtrey i Benson, 2005). Međunarodna trgovina biljnim materijalom predstavlja jedan od najznačajnijih puteva introdukcije štetnih organizama u nova područja. Naročito su značajne ukrasne biljke. Stalnim pregledima ovih biljaka se u Velikoj Britaniji otkriva 57% patogena (Jones i Baker, 2007). U Velikoj Britaniji zabeležena je prva masovna pojava *P. obducens* 2003. godine i to kako na *Impatiens* spp. gajenom iz semena tako i na biljkama gajenim iz reznica (Sansford, 2007; McPherson i Brough, 2009), pri čemu nisu sa sigurnošću ustanovljeni tačni putevi introdukcije. Odmah nakon prvih pozitivnih identifikacija, *P. obducens* postaje predmet vanrednih fitosanitarnih mera i učestalost oboljenja naglo opada, a već 2005. i 2006. godine beleži se pojava samo pojedinačnih slučajeva (Anonymous, 2009).

Pojava *P. obducens* u Srbiji predstavlja veliku potencijalnu opasnost upravo zbog intenzivne proizvodnje biljaka iz roda *Impatiens* u zaštićenom prostoru. Putevi unošenja ovog destruktivnog patogena 2010. godine ostaju za sada nepoznati, ali rasvetljena etiologija bolesti predstavlja osnovu za definisanje strategije uspešne kontrole oboljenja. Kako se radi o patogenu sa velikim inokulacionim potencijalom, koji lako i efikasno može da se proširi na veliki broj objekata proizvodnje, od izuzetnog značaja bilo bi uvođenje mera posebnog fitosanitarnog nadzora u cilju eradikacije ili ograničavanja daljeg širenja.

ZAHVALNICA

Istraživanja saopštena u ovom radu realizovana su kao deo projekta III-43001 (Agrobiodiverzitet i korišćenje zemljišta u Srbiji: integrisana procena biodiverziteta ključnih grupa artropoda i biljnih patogena), koji finansira Ministarstvo za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije.

LITERATURA

Anonymous: Downy mildew of *Impatiens*. Pest Alert, The Department of Agriculture and Food, Western Australia, Floriculture News 68: 12, http://www.agric.wa.gov.au/objtwr/imported_assets/content/hort/flor/floriculture_200612.pdf, 2006.

- Anonymous:** Detection and control of downy mildew on ornamentals. Growers Summary PC 230, Annual report 2008, Agriculture and Horticulture Development Board, Horticultural Development Company, <http://hdc.org.uk/assets/pdf/45230000/10593.pdf>, 2009.
- Anonymous:** Plant Quarantine Manuel of Tasmanica. Department of Primary Industries, Parks, Water and Environment, [http://www.dpiw.tas.gov.au/inter.nsf/attachements/MCAS-7FQ54M/\\$FILE/Plant Quarantine manuel print friendly version.pdf](http://www.dpiw.tas.gov.au/inter.nsf/attachements/MCAS-7FQ54M/$FILE/Plant%20Quarantine%20manuel%20print%20friendly%20version.pdf), 2010.
- Beales, P.:** Impatiens downy milde. Plant Clinic News, September 2008, Central Science Laboratory, Sand Hutton York YO41 112, <http://www.fera.defra.gov.uk/plants/plantsClinic/documents/PlantClinicNews/plantClinicNews0908.pdf>, 2008.
- Bulajić, A., Vućurović, A., Stanković, I., Ristić, D., Jović, J., Stojković, B. i Krstić, B.:** First report of *Plasmopara obducens* on *Impatiens walleriana* in Serbia. Plant Disease, 95: 491, 2011.
- Castalanelli, C. and Hoffmann, H.:** Downy mildew of Impatiens. Gardennote, Department of Agriculture and Food, Government of Western Australia, Note 321 (082257-08/08-ID9570, ISSN 0817-5969), <http://www.agric.wa.gov.au/objtwr/importedassets/content/pw/q/impatiensdownymildew.pdf>, 2008.
- Choi, Y.J., Han, J.G., Park, J.J. and Shin, H.D.:** Downy Mildew of *Impatiens balsamina* and *I. walleriana* in Korea. Plant Pathology Journal, 25: 433, 2009.
- Constantinescu, O.:** *Bremiella sphaerosperma* sp. nov. and *Plasmopara borreviae* comb. nov. Mycologia, 83: 473-479, 1991.
- Cunnington, J.H., Aldaoud, R., Lob, M., Washington, W.S. and Irvine, G.:** First record of *Plasmopara obducens* (downy mildew) on impatiens in Australia. Plant Pathology, 57: 371, 2008.
- Daughtrey, M.L., and Benson, D.M.:** Principles of plant health management in ornamental plants. Annual Review of Phytopathology, 43: 141-169, 2005.
- Denman, S., Kirk, S.A., Brasier, C.M. and Webber, J.F.:** *In vitro* leaf inoculation studies as an indication of tree foliage susceptibility to *Phytophthora ramorum* in the UK. Plant Pathology, 54: 512-521, 2005.
- EPPO:** *Plasmopara obducens* (a downy mildew of *Impatiens*). Data sheet EPPO Alert List. http://www.eppo.org/QUARANTINE/Alert_List/Plasmopara_obducens.doc, 2005.
- EPPO:** *Plasmopara obducens* – 2008. Deletions from the EPPO Alert List. http://www.eppo.org/QUARANTINE/Alert_List/deletions.htm, 2008.
- EPPO Reporting Service:** Addition of *Plasmopara obducens* to the EPPO Alert List. <http://archives.eppo.org/EPPOreporting/2005/Rse/0507.pdf>, 2005.
- Jones, D.R.:** Cost-benefit analysis of management options for the control of impatiens downy mildew caused by *Plasmopara obducens*. Central Science Laboratory, Sand Hutton York YO41 112, <http://www.fera.defra.gov.uk/plants/plantHealth/plantDisease/documents/cost.pdf>, 2004.
- Jones, D.R. and O'Neill, T.:** Impatiens downy mildew. East Malling, UK: Horticultural Development Council FactSheet 05/04 Impatiens Protected Crops. 2004, pp.8.
- Jones, D.R. and Baker, R.H.A.:** Introductions of non-native plant pathogens into Great Britain, 1970-2004. Plant Pathology, 56: 891-910, 2007.
- Lane, C.R., Beales, P.A., O'Neill, T.M., McPherson, G.M., Finlay, A.R., David, J., Constantinescu, O. and Henricot, B.:** First report of *Impatiens* downy mildew (*Plasmopara obducens*) in the UK. Plant Pathology, 54: 243, 2005.
- Maier, W., Begerow, D., Weiss, M. and Oberwinkler, F.:** Phylogeny of the rust fungi: an approach using nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. Canadian Journal of Botany, 81: 12-23, 2003.
- McPherson, M. and Brough, W.:** Good horticultural practice for the prevention and control of Impatiens downy mildew (*Plasmopara obducens*). Complement to the HDC Factsheet 05/04. http://www.bpvaonline.co.uk/Documents/IDM_Good_Horticultural_Practice_Guide.pdf, 2009.
- Palm, M.E.:** Invasive fungi: Downy mildew (*Plasmopara obducens*) of impatiens. Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS USDA., <http://nt.ars-grin.gov/sbmlweb/fungi/index.cfm>, 2004.
- Privredna komora Srbije:** Usporedni pregled spoljnotrgovinske razmene cveća i ukrasnog bilja za period 2000-2009. godine. Privredna komora Srbije u saradnji sa Upravom carine i Republičkog zavoda za statistiku, Beograd, Srbija, 1-7, 2010.
- Rietmüller, A., Voglmayr, H., Göker, M., Weiss, M. and Oberwinkler, F.:** Phylogenetic relationships of the downy mildews (Peronosporales) and related groups based on nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. Mycologia, 94: 834-849, 2002.
- Sansford, C.:** Pest Risk Analysis for *Plasmopara obducens*. Summary Pest Risk Analysis for PHSI interceptions. Central Science Laboratory (CSL) Sand Hutton, UK. <http://www.fera.defra.gov.uk/plants/plantHealth/pestDiseases/documents/pobducens.pdf>, 2007.
- Spring, O., Voglmayr, H., Rietmüller, A. and Oberwinkler, F.:** Characterization of a *Plasmopara* isolate from *Helianthus x laetiflorus* based on cross infection, morphological, fatty acid, and molecular phylogenetic data. Mycological Progress, 2: 163-170, 2003.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. and Kumar, S.:** MEGA4: Molecular Evolutionary genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution, 24: 1596-1599, 2007.

- Toppe, B., Brurberg, M.B., Stensvand, A. and Herrero, M.L.:** First report of *Plasmopara obducens* (downy mildew) on *Impatiens walleriana* in Norway. New Disease Report, 20: 33, 2010.
- Voglmayr, H. and Constantinescu, O.:** Revision and reclassification of three *Plasmopara* species based on morphological and molecular phylogenetic data. Mycological Research, 112: 487-501, 2008.
- Voglmayr, H., Piątek, M. and Mossebo, D.C.:** *Pseudoperonospora cubensis* causing downy mildew diseases on *Impatiens irvingii* in Cameroon: a new host for the pathogen. Plant Pathology, 58: 394, 2009.
- Voglmayr, H., Riethmüller, A., Göker, M., Weiss, M. and Oberwinkler, F.:** Phylogenetic relationships of *Plasmopara*, *Bremia* and other genera of downy mildew pathogens with pyriform haustoria based on Bayesian analysis of partial LSU rDNA sequence data. Mycological Research, 108: 1011-1017, 2004.
- Voglmayr, H. and Thines, M.:** Phylogenetic relationships and nomenclature of *Bremiella sphaerosperma* (*Chromista*, *Peronosporales*). Mycotaxon, 100: 11-20, 2007.
- Vujošević, A., Beatović, D., Jelačić, S., Lakić, N. i Lazarević, S.:** Uticaj spororazlagajućeg đubriva na rasad cveća. Zbornik naučnih radova PKB Agroekonomik, 2008, str. 115-124.
- Vukićević, E.:** Flora SR Srbije. (eds) Josifović, M., SANU, Beograd. V knjiga, 1973, str. 130-134.
- Wegulo, S.N., Koike, S.T., Vilchez, M. and Santos, P.:** First report of downy mildew caused by *Plasmopara obducens* on *Impatiens* in California. Plant Disease, 88: 909, 2004.
- Yuan, Y.M., Song, Y., Geuten, K., Rabelivololona, E., Wohlhauser, S., Fischer, E., Smets, E. and Küpfer, P.:** Phylogeny and biogeography of Balsaminaceae inferred from ITS sequences. Taxon, 53: 391-403, 2004.

Plasmopara obducens – a New Threat to the Production of *Impatiens walleriana* in Serbia

SUMMARY

During 2010, *Impatiens walleriana* plants with symptoms of downy mildew were collected in a greenhouse in the vicinity of Mionica, Kolubara District. Disease incidence was extremely high, approaching 100%, and wilting and collapse of affected plants was very rapid, resulting in losses of more than 90%. White downy growth produced on the lower leaf surface consisted of hyaline, thin-walled sporangiophores with monopodial branching and numerous, ovoid and hyaline sporangia. Apical branchlets of sporangiophores were at right angles to the main axis, with no apical thickening. Pathogenicity tests included inoculation of young *I. walleriana* plants by spraying with a sporangial suspension, and downy mildew symptoms were observed after 13 to 15 days. The absence of well-defined spots on the infected *impatiens* leaves and straight sporangiophores indicated that the pathogen was *P. obducens*, which was further supported by molecular identification, the 5'-end of the nuclear DNA coding for the large ribosomal subunit (LSU rDNA) was amplified by PCR, using primers NL1 and NL4. A representative isolate, 28-10, was sequenced and phylogenetic analysis showed its grouping with other *P. obducens* isolates of different origin. Considering that *impatiens* downy mildew in Serbia is proved to be caused by *P. obducens* it is necessary to employ adequate phytosanitary measures to prevent further spread of the pathogen.

Keywords: *Impatiens walleriana*; Downy mildew; Morphology; Molecular identification; Phylogenetic analysis