Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, 2019, 22 (1), 259-269
Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan
ISSN 1311-0489 (Print)
ISSN 2367-8364 (Online)

Разпространение и разнообразие на видове *Phytophthora* в планинския район на река Вит

Петя Христова*, Калоян Костов, Анета Любенова, Славчо Славов

Агробиоинститут, 1164 София, България

Occurrence and Diversity of *Phytophthora* Species in Mountain Area of Vit River

Petya Christova*, Kaloyan Kostov, Aneta Lyubenova, Slavtcho Slavov

AgroBioInstitute, 1164 Sofia, Bulgaria
**E-mail: petyachristova@abi.bg*

Original scientific paper

Received: 02.05.2019 *Accepted:* 20.05.2019 *Published:* 28.06.2019

РЕЗЮМЕ

Целта на това изследване е изолиране и идентифициране на видове от род *Phytophthora* в планинската част на р. Вит. Получени са 15 изолата принадлежащи към *Phytophthora* spp. от шест различни локации на реката (р. Бели Вит, р. Черни Вит и малко след сливането им в района на гр. Тетевен) по метода на уловките. Филогенетичният анализ на ITS секвенциите на събраните изолати показва наличието на четири вида *Phytophthora* – *P. gonapodyides*, *P. lacustris*, *P. chlamydospora* и *P. syringae*. Три от тези видове (*P. lacustris*, *P. gonapodyides* и *P. chlamydospora*) принадлежат към клад 6 на род *Phytophthora*, докато *P. syringae* е представител на клад 8. *P. gonapodyides* и *P. syringae* са определени като най-често срещани видове *Phytophthora* в изследвания планински район на река Вит и представляват съответно 40% и 33% от събраните изолати. Анализирана е патогенността на избрани изолати от четирите вида *Phytophthora* към

SUMMARY

The aim of this study is isolation and identification of *Phytophthora* species in the mountain area of Vit River. Fifteen *Phytophthora* isolates were recovered from six different locations in the river (Beli Vit River, Cherni Vit River and shortly after their interflow in the region of Teteven town) using a baiting method. The phylogenetic analysis of ITS sequences of collected isolates determined occurrence of four *Phytophthora* species – *P. gonapodyides, P. lacustris*, *P. chlamydospora* and *P. syringae*. Three of these species (*P. lacustris*, *P. gonapodyides* and *P. chlamydospora*) belong to clade 6 of the genus *Phytophthora*, whereas *P. syringae* is a member of clade 8. *P. gonapodyides* and *P. syringae* were defined as the most common *Phytophthora* species in the investigated mountain region of Vit River and represent respectively 40% and 33% of the collected isolates. The pathogenicity of selected isolates from each of collected *Phytophthora* species to blackcurrant and

касис и арония и е доказана способността на *P. lacustris*, *P. chlamydospora* и *P. gonapodyides* да заразяват листа от двата растителни вида.

Ключови думи: *Phytophthora*, разпространение, водна среда, патогенност

chokeberry was evaluated and the ability of *P. lacustris*, *P. chlamydospora* and *P. gonapodyides* to infect leaves of both plant species was proved.

Key words: *Phytophthora*, distribution, water environment, pathogenicity

УВОД

Phytophthora са група подобни на гъбите оомицетни организми, които филогенетично са по-близки до водораслите (Beakes and Sekimoto, 2009). Някои представители на вида са важни растителни патогени, причиняващи болести по широк кръг култури. Описани са и голям брой видове *Phytophthora*, които са сапрофитни организми във водни местообитания (Thines, 2014). Реките са не само среда за живот на тези оомицетни видове, но са също така средство за тяхното разпространение и начин за достигане до нови гостоприемници (Nechwatal et al., 2008). Освен в естествените екосистеми, видовете *Phytophthora* могат да намерят подходящ хабитат и нови гостоприемници чрез подпочвените води и системите за напояване. Ето защо тяхното познаване е важно както за екологията, така и за земеделската наука и стопанската дейност.

Вит е река в Северна България, образуваща се от сливането на реките Черни Вит и Бели Вит при град Тетевен. Тя извира в Стара планина на 1595 m н. в. и е част от водосборния басейн на река Дунав. В района се отглеждат редица традиционни за нашата страна култури, както и някои не толкова популярни видове като касис и арония. Касисът (*Ribes nigrum*) е храстовидно растение от сем. Grossulariaceae. Той се отглежда както с търговски цели, така и в личните стопанства на хората, поради ценните си хранителни вещества и високото съдържание на витамини. Подходящи условия за отглеждане на касис в България има в планински и полупланински райони,

INTRODUCTION

Phytophthora is a group of fungus–like oomycetes (water molds), phylogenetically more closely related to algae (Beakes and Sekimoto, 2009). Some members of the genus are significant plant pathogens causing disease on a large variety of crops, however, numerous *Phytophthora* species appear to be saprophytes in aquatic environments (Thines, 2014). Rivers are not only a habitat for these oomycetes, but also a means of spreading and a way to find new hosts (Nechwatal et al., 2008).

In addition to natural ecosystems, *Phytophthora* species can attain to suitable habitat and new hosts through groundwater and irrigation systems. Whereat the knowledge of *Phytophthora* is important not only for the ecology, but also for the crop science and the agriculture.

Vit is a river in northern Bulgaria, formed by the merging of the Cherni Vit and Beli Vit rivers in the region of Teteven town. The spring of the river is in Balkan mountain at 1595 m. and is a part of the catchment area of the river Danube. A number of traditional for Bulgaria agricultural crops are cultivated in the region, as well as some not so popular species such as blackcurrant and chokeberry. The blackcurrant (*Ribes nigrum*) is a woody shrub from the Grossulariaceae family. It is widely cultivated both commercially and domestically because of its valuable nutrients and its high content of vitamins. The appropriate conditions for the cultivation of blackcurrant in Bulgaria are

тъй като видът е много толерантен към ниски температури. Аронията *(Aronia melanocarpa*) е храстовидно растение от сем. Rosaceae. Отглежда се както с декоративни цели, така и заради хранителните си качества. Растенията се развиват добре в предпланински и планински райони, където валежите са по-чести и влажността е по-висока.

Целта на настоящото изследване е изолиране и характеризиране на видове *Phytophthora* от планинския район на река Вит. Видовата принадлежност на събраните изолати е определена чрез класически морфологични методи и молекулярни анализи. Направен е филогенетичен анализ на събраните изолати и е конструирано филогенетично дърво. Изследвана е патогенността на изолираните видове *Phytophthora* към касис и арония.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Изследването на разнообразието на видовете *Phytophthora* в планинския район на р. Вит е част от мащабно проучване на водните екосистеми в България, проведено през периода 2016-2018 г. В настоящото изследване са представени изолатите, събрани от шест различни местоположения на река Вит, реките Бели и Черни Вит (Фигура 1). Приложен е метода на уловките, при който три листа от рододендрон са поставени в плаваща мрежа за период от пет дни през м. октомври 2017 г. Обработването на пробите и изолирането на *Phytophthora* на селективна PARNHB среда (морковен агар с добавени: 10 mg Pimaricin, 250 mg Ampicillin, 10 mg Rifampicin, 50 mg Nystatin, 1.3 ml Tachigaren и 15 mg Benomyl/1l) е проведено по методиката описана в предишно проучване (Christova et al., 2018). Събраните изолати *Phytophthora* са култивирани на среда V8A (vegetable agar: 16 g agar, 3 g $CaCO_3$, 100 ml V8 juice/1l) за мицелен растеж и морфологично характеризиране.

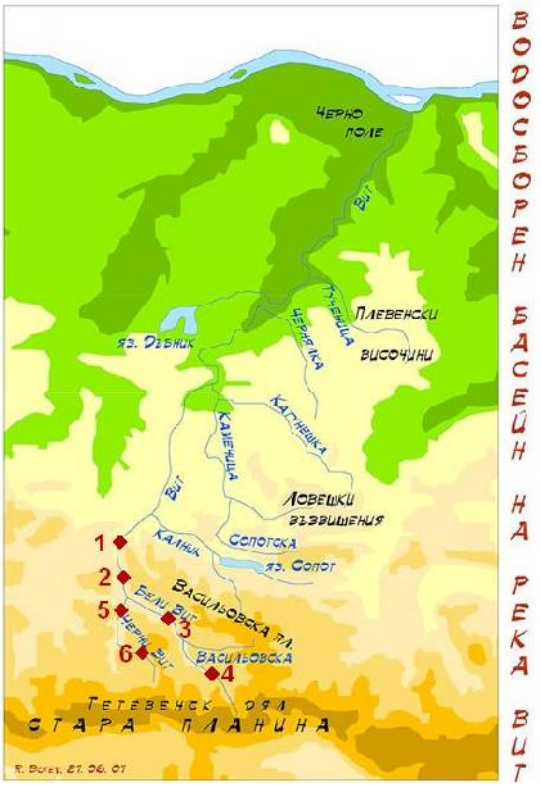
mountainous and semi-mountainous regions, as the species is very tolerant to low temperatures. The chokeberry *(Aronia melanocarpa*) is a deciduous shrub from the Rosaceae family. It is cultivated as ornamental plants and as food products. Plants grow well in the hilly and mountainous areas, where rainfall is more frequent and humidity is higher

The aim of this study is isolation and characterization of *Phytophthora* species from the mountain area of the Vit River. Species identification was performed using classical morphological methods and molecular analyses. A phylogenetic analysis of the collected isolates was performed and a phylogenetic tree was constructed. The pathogenicity of the isolated *Phytophthora* species to blackcurrant and chokeberry was evaluated.

MATERIAL AND METHODS

The assessment of *Phytophthora* biodiversity in the mountain area of the Vit River is a part of large scale survey of water ecosystems in Bulgaria in the period 2016-2018. In this study are presented samples that were collected from six different locations in the Vit River, the rivers Beli and Cherni Vit (Figure 1) using a baiting method.

Three *Rhododendron* leaves enveloped in mesh bags that were floated in the river for 5 days in October 2017. The preparation of samples and isolation of putative *Phytophthora* species on a selective PARNHB media (carrot agar supplemented with 10 mg Pimaricin, 250 mg Ampicillin, 10 mg Rifampicin, 50 mg Nystatin, 1.3 ml Tachigaren and 15 mg Benomyl/1l) were performed as described previously (Christova et al., 2018). The collected *Phytophthora* isolates were cultivated on V8A (vegetable agar: 16 g agar, 3 g $CaCO_3$, 100 ml V8 juice/1l) for a mycelia growth and a morphological characterization.



Фиг. 1. Места на залагане на уловки в планинския район на река Вит, реките Бели и Черни Вит: 1 – махала Асен; 2 – с. Гложене; 3 – гр. Тетевен, кв. Скрибътна; 4 – с. Рибарица; 5 – гр. Тетевен, кв. Полатен; 6 – с. Черни Вит
Fig. 1. Locations of floating mesh bags placed in mountain area of the Vit River, the rivers Beli and Cherni Vit: 1 – Asen neighbourhood; 2 – Glojene village; 3 – Teteven town, Skributna district; 4 – Ricaritca village; 5 – Teteven town, Polaten district; 6 – Cherni Vit village

Изолирането на ДНК, PCR анализа и секвенирането на пробите са проведени също по вече описана методика (Christova et al., 2018). Накратко: ДНК пробите са изолирани с помощта на кит DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN GmbH), а PCR амплификацията на ITS региона е проведена с праймери ITS5 и ITS4 PCR реакцията е проведена с помощта на кит PuReTaq™ Ready-To-Go™ PCR beads (GE Healthcare Life Sciences), съгласно инструкциите на фирмата производител. Пречистените PCR продукти са секвенирани в GATC Biotech AG, Германия. Видовото опре-

DNA extraction, PCR and sequence analyses of *Phytophthora* isolates were conducted as described previously (Christova et al., 2018). Briefly: DNA samples were prepared using DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN GmbH) and PCR amplification of the ITS (internal transcribed spacer) region was performed with primers ITS5 and ITS4. PCR amplification was conducted by using PuReTaq™ Ready-To-Go™ PCR beads (GE Healthcare Life Sciences), according to the manufacturer's instructions. Purified PCR products were sequenced in GATC Biotech AG (Germany). The

деляне на получените изолати е направено чрез сравняване на секвенции с висока хомология в базата данни на NCBI (National Center for Biotechnology Information) с помощта на BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

Хистограмите на получените секвенции са изготвени с помощта на програма Ridom TraceEdit. Обработката на секвенциите и филогенетичният анализ са направени чрез CLC Workbench и TreeGraph2.

Изследвана е патогенността на изолираните видове *Phytophthora* е спрямо касис (*Ribes nigrum*) и арония (*Aronia melanocarpa*), като от всеки вид е избран по един изолат за изпитване: *P. lacustris* – RBVitTet2017/100b, *P. chlamydospora* – RChVitTet2017/102b, *P. gonapodyides* – RChVitVit2017/103a и *P. syringae* - RVitAs2017/98a. Анализът е проведен чрез заразяване на откъснати листа от двата вида растения в контейнери, съдържащи стерилна дестилирана и изворна вода (1:1) с добавени в нея мицелни блокчета от 7-дневна култура на всеки от избраните изолати. Симптомите на заразяване са наблюдавани 7 дни след инокулиране. За контрола са използвани листа от касис и арония, поставени в контейнери само със стерилна дестилирана и изворна вода (1:1).

species identification of collected isolates was made using BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) of a high sequence homology into the database of NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Histograms of the resulted sequences were prepared by Ridom TraceEdit software. Sequence alignments and phylogenetic trees were made in CLC Workbench software and edited with TreeGraph2 software.

The pathogenicity of isolated *Phytophthora* species to blackcurrant (*Ribes nigrum*) and chokeberry (*Aronia melanocarpa*) was analyzed. One isolate of each *Phytophthora* species was selected for the experiment: *P. lacustris* – RBVitTet2017/100b, *P. chlamydospora* – RChVitTet2017/102b, *P. gonapodyides* – RChVitVit2017/103a and *P. syringae* – RVitAs2017/98a. The analysis was performed by inoculation of detached leaves of both plants into a plastic trays containing of sterile and spring water (1:1), supplemented with a mycelia plugs of 7-days old culture of each isolate. Disease symptoms were observed 7 days post inoculation (dpi). Control leaves of blackcurrant and chokeberry were placed into a plastic tray containing of sterile and spring water (1:1) without *Phytophthora*.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Общо 15 изолата *Phytophthora* са получени от шестте изследвани локации в планинския район на р. Вит (Таблица 1). Те се отнасят към 4 вида, според резултатите от направеното секвениране – *P. gonapodyides*, *P. lacustris*, *P. chlamydospora* и *P. syringae*. Същото видово разнообразие е установено и в предходно проучване на планинска част на близко течащата р. Осъм (Christova et al., 2018). Това показва разпространението на едни и същи видовете в два планински района в Северна България със сходен релеф и климат.

RESULTS AND DISCUSSION

Fifteen *Phytophthora* isolates were collected from all six locations that were choose for investigation in the mountain area of Vit River (Table 1). They belong to four species of the genus, according to the results of the sequence analyses – *P. gonapodyides, P. lacustris*, *P. chlamydospora* and *P. syringae*. The same *Phytophthora* species were isolated from a mountainous and foothill region of the nearby Osam River that was reported recently (Christova et al., 2018). These results showed a distribution of the same species in two mountain areas with similar topography and climate in Northern Bulgaria.

Таблица 1. Списък на изолатите *Phytophthora*, събрани от планинския район на река Вит, реките Бели и Черни Вит
Table 1. List of *Phytophthora* isolates collected from the mountain area of the Vit River, the rivers Beli and Cherni Vit

No	Река/River	Местоположение Location; GPS coordinates	Температура на водата* Water Temperature*	Изолат/Isolate	Вид *Phytophthora* species
1	р. Вит Vit River	махала Асен; Asen neighbourhood 43.014762/ 24.182594	T_1 = 9.5ºC T_2 = 10.5ºC	RVitAs2017/98a	*P. syringae*
				RVitAs2017/98b	*P. gonapodyides*
2	р. Вит Vit River	с. Гложене; Glojene village 42.962217/ 24.199103	T_1 = 9.9ºC T_2 = 10.8ºC	RVitGlo2017/99a	*P. syringae*
				RVitGlo2017/99b	*P. gonapodyides*
				RVitGlo2017/99c	*P. lacustris*
3	р. Бели Вит Beli Vit River	гр. Тетевен, кв. Скрибътна; Teteven town 42.896572/ 24.317421	T_1 = 10.5ºC T_2 = 11.5ºC	RBVitTet2017/100a	*P. gonapodyides*
				RBVitTet2017/100b	*P. lacustris*
				RBVitTet2017/100c	*P. lacustris*
				RBVitTet2017/100d	*P. gonapodyides*
4	р. Бели Вит Beli Vit River	с. Рибарица; Ricaritca village 42.826588/ 24.400745	T_1 = 8.8ºC T_2 = 10.0ºC	RBVitRib2017/101b	*P. syringae*
5	р. Черни Вит Cherni Vit River	гр. Тетевен, кв. Полатен; Teteven town 42.926689/ 24.209719	T_1 = 10.5ºC T_2 = 10.1ºC	RChVitTet2017/102a	*P. syringae*
				RChVitTet2017/102b	*P. chlamydospora*
6	р. Черни Вит Cherni Vit River	с. Черни Вит; Cherni Vit village 42.839302/ 24.193205	T_1 = 9.5ºC T_2 = 9.1ºC	RChVitVit2017/103a	*P. gonapodyides*
				RChVitVit2017/103b	*P. gonapodyides*
				RChVitVit2017/103c	*P. syringae*

*T_1/T_2– температура на водата при залагане/прибиране на уловката (09/14.11.2017)
*T_1/T_2– water temperature at the time of placing/collecting of the bites (09/14.11.2017)

От по-ниската част на изследвания район при махала Асен и с. Гложене, където тече обединената р. Вит, са изолирани видовете *P. gonapodyides, P. lacustris* и *P. syringae*. Същите три вида *Phytophthora* са открити и в р. Бели Вит от уловките заложени в гр. Тетевен (кв. Скрибътна) и с. Рибарица. От двете локации на р. Черни Вит при гр. Тетевен (кв. Полатен) и с. Черни Вит, са изолирани видовете *P. gonapodyides, P. chlamydospora* и *P. syringae*. Резултатите от проучването показват, че най-разпространени в изследвания район са *P. gonapodyides* и *P. syringae*, които формират съответно 40% и 33% от събраните изолати. Те се срещат и в трите изследвани реки и не са открити само в по една от шестте локации. По-рядко срещан е видът *P. lacustris*, чиито изолати представляват 20% от получените проби. Установено е разпространението на вида в реките Вит и Бели Вит, но същият не е открит

Three *Phytophthora* species, *P. gonapodyides*, *P. lacustris* and *P. syringae*, were isolated from the lower part of the studied area near Asen neighborhood and Glozhene village, where the united Vit River flows. The same three species were found in the Beli Vit River from the baites placed in Teteven town (Skributna district) and Ribaritsa village. *P. gonapodyides*, *P. chlamydospora* and *P. syringae* were isolated from both locations on the Cherni Vit River in Teteven town (Polaten district) and Cherni Vit village. The results of the study show that *P. gonapodyides* and *P. syringae* were the most common in the investigated area, which form respectively 40% and 33% of the collected isolates. They occur in the three studied rivers and were not found only in one of the six locations. Less distributed species was *P. lacustris*, whose isolates account for 20% of the samples obtained. This species was detected in Vit River and Beli Vit

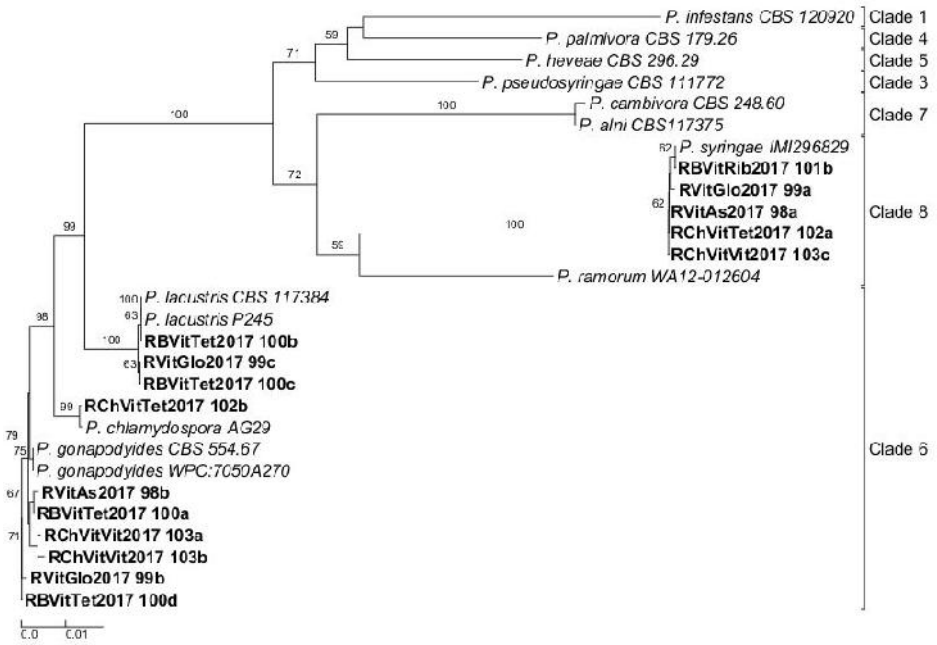
в нито една от двете локации на р. Черни Вит. За разлика от *P. lacustris*, видът *P. chlamydospora* е изолиран само от р. Черни Вит и не е открит в нито една от другите две реки. Към този вид се отнася само един изолат, което представлява едва 7% от събраните проби, което определя *P. chlamydospora* като най-рядко срещаната *Phytophthora* в изследвания планински район. За разлика от резултатите получени от проучването на р. Осъм, където преобладаващият вид е *P. lacustris* (Christova et al., 2018), в изследвания район на река Вит, доминират *P. gonapodyides* и *P. syringae*. Тези различия в доминиращите видове *Phytophthora* в двата района биха могли да се дължат на разлика в набора от растения гостоприемници, обитаващи съответните екосистеми.

Филогенетичният анализ на изолираните видове показва, че те се отнасят към Клад 6 и Клад 8 на род *Phytophthora* (Фигура 2). Към клад 6 принадлежат видовете *P. lacustris*, *P. gonapodyides* и *P. chlamydospora*, чиято генетична връзка е очевидна, тъй като попадат в близко разположени, но отделни клонове. Повечето от представителите на този клад са разпространени в горските и в крайречните екосистеми, но има и такива, които са изолирани от земеделски и овощни култури (Reeser et al., 2011; Jung et al., 2011; Dunstan et al., 2016; Stamler et al., 2016). *P. syringae* се отнася към клад 8 на род *Phytophthora* и се нарежда в близост до видът *P. ramorum*, който е представител на същия Клад (Фигура 2). Видовете от този клад са разпространени предимно в почвата и имат широк кръг от гостоприемници (Upstone, 1978; Thomidis 2001; Cline et al., 2008; Lolas et al., 2016). Представителите на род *Phytophthora*, принадлежащи към други кладове, се разполагат на отделни разклонения на филогенетичното дърво, съответстващи на генетичната дистанция помежду им (Фигура 2).

River, but was not found in either of the two locations of Cherni Vit River. Unlike *P. lacustris*, the species *P. chlamydospora* was isolated only from the Cherni Vit River and is not found in any of the other two rivers. Only one isolate was identified as *P. chlamydospora* which represents only 7% of the collected samples and determined the species as the rarest *Phytophthora* in the studied mountain area. Disparate the results obtained for Osam River, where the predominant species was *P. lacustris* (Christova et al., 2018), *P. gonapodyides* and *P. syringae* dominated in the study area of Vit River. These differences in the dominanting *Phytophthora* species in the two regions could be due to a variation in the set of host plants living in the respective ecosystems.

Phylogenetic analyses of collected species showed that they belong to clade 6 and clade 8 of the genus *Phytophthora* (Fig. 2). *P. lacustris*, *P. gonapodyides and P. chlamydospora* belong to the clade 6, which genetic relation is evident as they fall into closely situated but separate branches. Most members of this clade are distributed in forests and riparian environments, but some species have been isolated from agriculture and horticulture host species (Reeser et al., 2011; Jung et al., 2011; Dunstan et al., 2016; Stamler et al., 2016). *P. syringae* belongs to the clade 8 and line up in proximity with *P. ramorum*, which is another member of the same clade (Figure 2).

Species of this clade are mainly soil-borne and have wide range of host plants (Upstone, 1978; Thomidis 2001; Cline et al., 2008; Lolas et al., 2016). The representatives of the genus *Phytophthora* belonging to other clades are located in separate branches of the phylogenetic tree, corresponding to the genetic distance between them (Figure 2).



Фиг. 2. Филогенетичен анализ на изолатите *Phytophthora*, събрани от планинския район на река Вит, реките Бели и Черни Вит
Fig. 2. Phylogenetic analysis of *Phytophthora* isolates collected from the mountain area of the Vit River, the rivers Beli and Cherni Vit

Резултатите от проведените тестове за патогенност показват, че видове от клад 6 – *P. lacustris*, *P. chlamydospora* и *P. gonapodyides* заразяват листата и на двете изследвани растения, касис и арония, за период от 7 дни (Фигура 3). Образуване на интензивни некротични петна е отчетено за видовете *P. chlamydospora* и *P. lacustris*, докато *P. gonapodyides* индуцира по-слаби симптоми на заразяване. Видът *P. chlamydospora* е оценен като потенциално най-опасен за диви и култивирани ягодоплодни култури (ягода, къпина, червена боровинка) в предходно изследване (Christova et al., 2018). Настоящото проучване разширява кръга на неговите гостоприемници и потвърждава силната агресивност на този вид към различни растителни видове. Оомицетният вид *P. lacustris* е известен като слаб патоген по елша, слива и върба (*Alnus*, *Prunus*, *Salix*), а потенциалната му способност да жи-

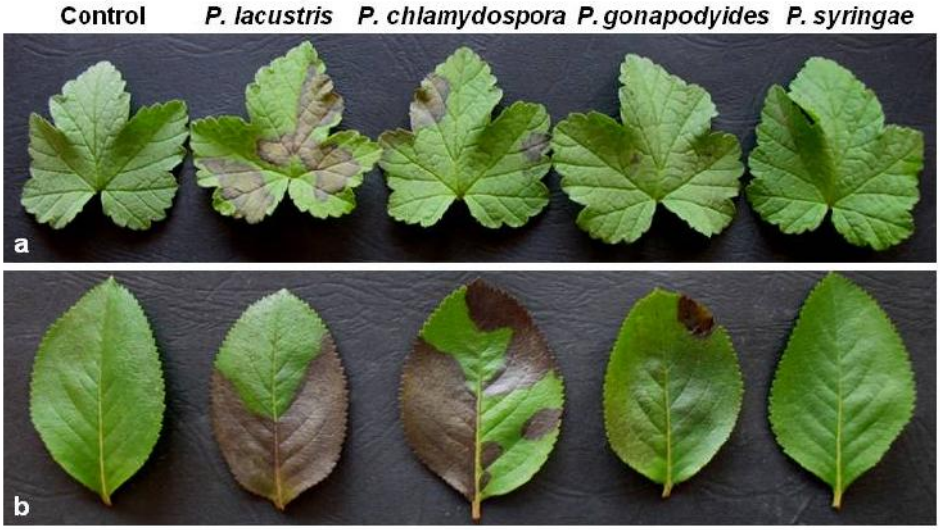
The results of the pathogenicity tests showed that the species of clade 6 – *P. lacustris*, *P. chlamydospora* and *P. gonapodyides* infected the leaves of both tested plants, blackcurrant and chokeberry, for the period of 7 days (Figure 3). The formation of intensive necrotic spots was observed for *P. chlamydospora* and *P. lacustris*, whereas *P. gonapodyides* induced weaker symptoms of infection. The species *P. chlamydospora* is considered to be potentially most dangerous for wild and cultivated berry plants (strawberry, blackberry, cranberry) in our previous study (Christova et al., 2018). This study expands the range of its hosts and confirms the strong aggressiveness of this species. *P. lacustris* is known to be a weak pathogen on alder, plum and willow (*Alnus*, *Prunus*, *Salix*), and the potential ability to live as saprophyte and its pathogenic properties in aquatic environments require further investigations

вее като сапрофит, както и патогенните му свойства във водна среда се нуждаят от допълнителни проучвания (Nechwatal et al., 2012). Резултатите от скорошно изследване показват, че видът не заразява редица замеделски култури като краставица (*Cucurbita* spp.), лук (*Allium cepa*), люта чушка (*Capsicum annuum*), люцерна (*Medicago sativa*), царевица (*Zea mays*), овес (*Avena sativa*) и ечемик (*Hordeum vulgare*) (Stamler et al., 2016). Нашите изследвания обаче доказват, че *P. lacustris* е потенциално опасна както за храстовидни плодни растения като арония и касис, така и за ягодоплодни видове (Christova et al., 2018). За разлика от изолираните видовете от клад 6, представителят на клад 8 – *P. syringae* не индуцира симптоми на заразяване по листата на нито едно от анализираните растения за изследвания период от 7 дни (Фигура 3). Заразяването на листа от арония и касис с изолираните видове *Phytophthora* има за цел да определи потенциалната заплаха от нападение на тези патогени върху насаждения от съответните растителни видове.

(Nechwatal et al., 2012).

The results of a recent study show that the species was not able to infect a number of crop plants as pumpkin (*Cucurbita* spp.), onion (*Allium cepa*), chile pepper (*Capsicum annuum*), alfalfa (*Medicago sativa*), corn (*Zea mays*), oats (*Avena sativa*) and barley (*Hordeum vulgare*) (Stamler et al., 2016). However, our studies proved that *P. lacustris* is potentially dangerous for bushy fruit plants such as chokeberry and blackcurrant, as well as for the berry species (Christova et al., 2018).

In contrast to isolated species of clad 6, the member of clad 8 – *P. syringae* was not able to induce symptoms of leaf infection of any of the analyzed plants for the period of 7 days (Figure 3). The inoculation of chokeberry and blackcurrant leaves with the isolated *Phytophthora* species aims to assess the potential threat of these pathogens for the plantations of blackcurrant and chokeberry.



Фиг. 3. Патогенност на *P. lacustris*, *P. chlamydospora*, *P. gonapodyides* and *P. syringae* спрямо касис (a) и арония (b) 7 дни след инокулиране
Fig. 3. Pathogenicity of *P. lacustris*, *P. chlamydospora*, *P. gonapodyides* and *P. syringae* to blackcurrant (a) and chokeberry (b) at 7dpi

ИЗВОДИ

От планинския район на река Вит, включително реките Бели и Черни Вит, са изолирани четири вида *Phytophthora* – *P. lacustris*, *P. gonapodyides*, *P. chlamydospora* и *P. syringae*. Доказана е способността на *P. lacustris*, *P. chlamydospora* и *P. gonapodyides* да заразяват листа от касис и арония. Резултатите от проведеното проучване определят тези видове *Phytophthora* като потенциална заплаха за насажденията от двата изпитани растителни вида.

CONCLUSIONS

Four *Phytophthora* species were isolated from the mountain area of the Vit River, including rivers Beli and Cherni Vit – *P. lacustris*, *P. gonapodyides*, *P. chlamydospora* and *P. syringae*. The ability of *P. lacustris*, *P. chlamydospora* and *P. gonapodyides* to infect leaves of blackcurrant and chokeberry was proved. The results of the conducted study identified these *Phytophthora* species as a potential threat for the plantations of both tested plant species.

БЛАГОДАРНОСТИ

Настоящото изследване е финансирано от проект „Responses of European Forests and Society to Invasive Pathogens (RESIPATH)" по програма BiodivERsA 2012-2013 Joint call.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was funded by the project „Responses of European Forests and Society to Invasive Pathogens (RESIPATH)" of a programme BiodivERsA 2012-2013 Joint call.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. **Beakes, G. W. and S. Sekimoto**, 2009. The Evolutionary Phylogeny of Oomycetes-insights Gained from Studies of *Holocarpic Parasites* of Algae and Invertebrates. In: Oomycete Genetics and Genomics. Diversity, Interactions, and Research Tools. Lamour K, Kamoun S, Eds., Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons Inc., pp. 1-24.
2. **Cline, E. T., D. F. Farr and A. Y. Rossman**, 2008. A Synopsis of *Phytophthora* with Accurate Scientific Names, Host Range, and Geographic Distribution. *Plant Health Progress*, doi:10.1094/PHP-2008-0318-01-RS.
3. **Christova, P., A. Lyubenova, K. Kostov and S. Slavov**, 2018. Diversity and Pathogenicity of *Phytophthora* Species Isolated From Osam River. *Journal of Mountain Agriculture On The Balkans*, 21 (1), 179-191.
4. **Dunstan, W. A., K. Howard, G. E. St. J. Hardy and T. I. Burgess**, 2016. An Overview of Australia's *Phytophthora* Species Assemblage in Natural Ecosystems Recovered from a Survey in Victoria. *Ima Fungus*, 7 (1), 47-58.
5. **Jung, T., M. J. C. Stukely, G. E. St. J. Hardy, D. White, T. Paap, W. A. Dunstan and T. I. Burgess**, 2011. Multiple New *Phytophthora* Species from Its Clade 6 Associated with Natural Ecosystems. *Persoonia*, 26, 13-39.
6. **Lolas, M.**, **J. M. Contreras**, **R. Méndez**, **M. Cáceres and G. A. Díaz**, 2016. First Report of Phytophthora Fruit Rot in Apple Caused by *Phytophthora Syringae* during Cold Storage in Maule Region, Chile. *Plant Disease*, 100 (7), 1507.
7. **Nechwatal, J., A. Wielgoss and K. Mendgen**, 2008. Diversity, Host, and Habitat Specificity of Oomycete Communities in Declining Reed Stands (*Phragmites Australis*) of a Large Freshwater Lake. *Mycological Research*, 112, 689-96.
8. **Nechwatal, J., J. Bakonyi, S. O. Cacciola, D. E. L. Cooke, T. Jung, Z.A. Nagy, A. Vannini, A. M. Vettraino and C. M. Brasier**, 2012. The Morphology, Behavior and Molecular Phylogeny of *Phytophthora* Taxon *Salixsoil* and Its Redesignation as *Phytophthora Lacustris* Sp. Nov. *Plant Pathology,* 62, 355-369.

9. **Reeser, P. W., W. Sutton, E. M. Hansen, P. Remigi and G. C. Adams**, 2011. *Phytophthora* Species in Forest Streams in Oregon and Alaska. *Mycologia*, 103, 22-35.
10. **Stamler, R. A., S. Sanogo, N. P. Goldberg and J. J. Randall**, 2016. *Phytophthora* Species in Rivers and Streams of the Southwestern United States. *Appl Environ Microbiol*., 82 (15), 4696-4704.
11. **Thines, M.**, 2014. Phylogeny and Evolution of Plant Pathogenic Oomycetes - A Global Overview. *European Journal of Plant Pathology*, 138, 431-47.
12. **Thomidis, T.**, 2001. Testing Variability in Pathogenicity of *Phytophthora Cactorum, P. Citrophthora* and *P. Syringae* to Apple, Pear, Peach, Cherry and Plum Rootstocks. *Phytoparasitica*, 29, 47.
13. **Upstone, M. E.**, 1978, Phytophthora Syringae Fruit Rot of Apples. *Plant Pathology*, 27 (1), 24-30.

Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, 2019, 22 (1), 270-281
Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan
ISSN 1311-0489 (Print)
ISSN 2367-8364 (Online)

Видове *Phytophthora* обитаващи средното и долно течение на река Тунджа в България

Славчо Славов*, Петя Христова, Калоян Костов, Анета Любенова

Агробиоинститут, София 1164, България

Phytophthora Species Inhabiting Middle and Lower Watercourse of Tundzha River in Bulgaria

Slavtcho Slavov*, Petya Christova, Kaloyan Kostov, Aneta Lyubenova

AgroBioInstitute, 1164 Sofia, Bulgaria
**E-mail: sbslavov@abi.bg*

Original scientific paper

Received: 17.04.2019 *Accepted:* 24.04.2019 *Published:* 28.06.2019

РЕЗЮМЕ

Проучването на видове *Phytophthora* по течението на река Тунджа на територията на България е част от обстойно изследване на разпространението на тези организми в реките на страната. Изолирането на оомицетните видове от този род е извършено по метода на уловките с листа от рододендрон, заложени в средното и долното течение на реката. Точната видова принадлежност на получените изолати е определена на базата на морфологични признаци и анализ на секвенциите на ITS участъка на ДНК. Установено е различие във видовия състав на организмите от род *Phytophthora,* обитаващи средното и долно течение на реката. В средното течение на реката са регистрирани основно видовете *P. citricola* и *P. plurivora*, които са известни като патогени с широк кръг гостоприемници включващ малина, хмел, овощни дървесни видове (орех, бадем, кайсия, праскова, череша), често отглеждани в планински и полупланински райони,

SUMMARY

Identification of *Phytophthora* species along the Tundzha River in Bulgaria was conducted as a part of thorough research on the distribution of those organisms in the rivers of the country. The isolation of oomycete species of the genus *Phytophthora* was performed by baiting method with Rhododendron leaves, placed in areas of middle and lower watercourse of the river. The exact species of obtained isolates were determined on the base of colony and spore morphology and sequence analyses of the ITS region of the nuclear DNA. A difference in the composition of *Phytophthora* species inhabiting the middle and lower course of the river was found. In the middle stream of the river predominantly the species *P. citricola* and *P. plurivora* were registered which are known as pathogens with wide host range including raspberry, hop, orchards (walnut, almond, apricot, peach, cherry) often grown in mountain and semi mountain areas, as well as forest trees

също и горски дървесни видове като бук, дъб, кестен и топола. В долното течение на реката е изолиран главно слабопатогенния вид *P. lacustris*. *P. hydropathica* също е установена в двата изследвани участъка на река Тунджа.

Ключови думи: *Phytophthora* spp., видов състав, река Тунджа

(beech, oak, chestnut, poplar). In the lower flow of the river mainly the weak pathogenic species *P. lacustris* was isolated*. P. hydropathica* was also found in both middle and down streams of the Tundzha River.

Key words: *Phytophthora* spp., species composition, Tundzha River

УВОД

Растителните патогени от род *Phytophthora* в последното десетилетие се свързват с някои от най-разрушителните болести по дървесните видове в естествените екосистеми и са познати като патогени и по редица многогодишни и едногодишни земеделски култури. В Европа инвазивните видове *Phytophthora* са установени като причинители на загиване на клена (*Acer* spp.), брезата (*Betula* spp.), бука (*Fagus sylvatica*) и дъба (*Quercus* spp.) и др. Сравнително нов вид описан като *Phytophthora alni* sp. nov. е причинител на болест по елшата (*Alnus* spp.), разпространена в Холандия, Белгия, Швеция, Франция, Германия, Австрия и Унгария и представляваща заплаха за стабилността на крайречните екосистеми в Европа (Brasier et al., 2004; Solla et al., 2010).

Като типични представители на *Oomycotes* и патогените от род *Phytophthora* образуват спорангии и освобождават множество плуващи движещи се зооспори, които се разпространяват чрез водата, привличат се от ексудати отделяни от корените и покълващите семена и инфектират здрави растения-гостоприемници (Dick, 2001). Тези микроорганизми се срещат във водни екосистеми и са изолирани много често от сладководни езера, потоци и реки (Sutton et al., 2009; Hwang et al., 2010; Reeser et al., 2011) и напоителни системи (Hong and Moorman, 2005) и могат да се разпространяват чрез реките и водата използвана за напояване. Видове *Phytophthora* са изолирани постоянно и в голямо количество

INTRODUCTION

During the last decade plant pathogens of genus *Phytophthora* are associated with some of the most destructive diseases on trees in natural ecosystems and are known as pathogens on many perennial and annual crops. In Europe, invasive *Phytophthora* species are registered as causal agents of destructions of maple (*Acer* spp.), birch (*Betula* spp.), beech (*Fagus sylvatica*), oak (*Quercus* spp.) etc.

Relatively new species described as *Phytophthora alni* sp. nov. causes a disease on alder (*Alnus* spp.), and is spread in the Netherlands, Belgium, Sweden, France, Germany, Austria and Hungary, and is a threat for riparian ecosystems in Europe (Brasier et al., 2004; Solla et al., 2010).

As typical representatives of *Oomycotes,* the pathogens of genus *Phytophthora* develop sporangia and release numerous swimming motile zoospores, which spread by water and are attracted by the root exudates and germinating seeds and infect healthy host plants (Dick, 2001).

These microorganisms are spread in water ecosystems and are often isolated from lakes, streams, rivers (Sutton et al., 2009; Hwang et al., 2010; Reeser et al., 2011) and irrigation systems (Hong and Moorman, 2005) and could be spread trough rivers and water used for irrigation. *Phytophthora* species are recovered with regularity and abundance from streams and rivers, in many cases in the absence

от потоци и реки, в много случаи при липса на видима инфекция по околните сухоземни растения (Sutton et al., 2009; Hwang et al., 2010; Reeser et al., 2011).

В рамките на научноизследователски проект „Responses of European Forests and Society to Invasive Pathogens" (RESIPATH) финансиран по програма BiodivERsA2013 чрез национален фонд „Научни изследвания" е проучвано биоразнообразието на растителните патогени от род *Phytophthora* в основни реки на територията на страната, имайки предвид решаващото значение на водата във фазите на заразяване от техния жизнен цикъл и при разпространението им.

Река Тунджа е една от големите реки на България, извираща от планински район, преминаваща през полупланински, хълмисти райони и котловини в средното си течение и през обширен равнинен район в долното течение на българския участък на реката. Освен това тя е една от трансграничните реки на България, пресича южната ѝ граница и е гранична река за южните две съседни страни Гърция и Турция.

Установяването на видовия състав на растителни патогени от род *Phytophthora*, намиращи се във водите и разпространяващи се с течението на реката е от значение както за земеделието и горския фонд на страната, така и за отглежданите селскостопански култури в споменатите две съседни страни.

of apparent terrestrial infestations (Sutton et al., 2009; Hwang et al., 2010; Reeser et al., 2011).

In the frame of research project „Responses of European Forests and Society to Invasive Pathogens" (RESIPATH) funded by the program BiodivERsA2013 through the National Science Fund of Bulgaria, biodiversity of e *Phytophthora* plant pathogens in the rivers on the territory of the country is studied having in mind the critical importance of water in the infection phase of the life cycle and for pathogen spread.

Tundzha River is one of the biggest rivers in Bulgaria starting from a mountain area, passing through semi mountain and hilly regions and hollows in the middle streams and through wide plain region in the lower watercourse in Bulgarian part of the river. It is also one of the transbordering rivers of Bulgaria, which is crossing the south country border and further downstream becomes a border river between two neighboring countries Greece and Turkey.

The knowledge for the species composition of *Phytophthora* plant pathogens inhabiting the river's water and spread by the river could be useful for the agriculture and the forestry of Bulgaria, and also for crop production of the both mentioned neighboring countries.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Местоположение на уловките.

Вземането на проби от водите на река Тунджа е извършено с уловки от листа на *Rhododendron* поставени в мрежа и плаващи върху речната вода за период от 4-5 дни. Всяка уловка съдържа по три листа от *Rhododendron*. Уловките бяха ситуирани в средното течение на река Тунджа в района на с. Юлиево (1 уловка) и с. Ягода (1 уловка), както и по долното течение на

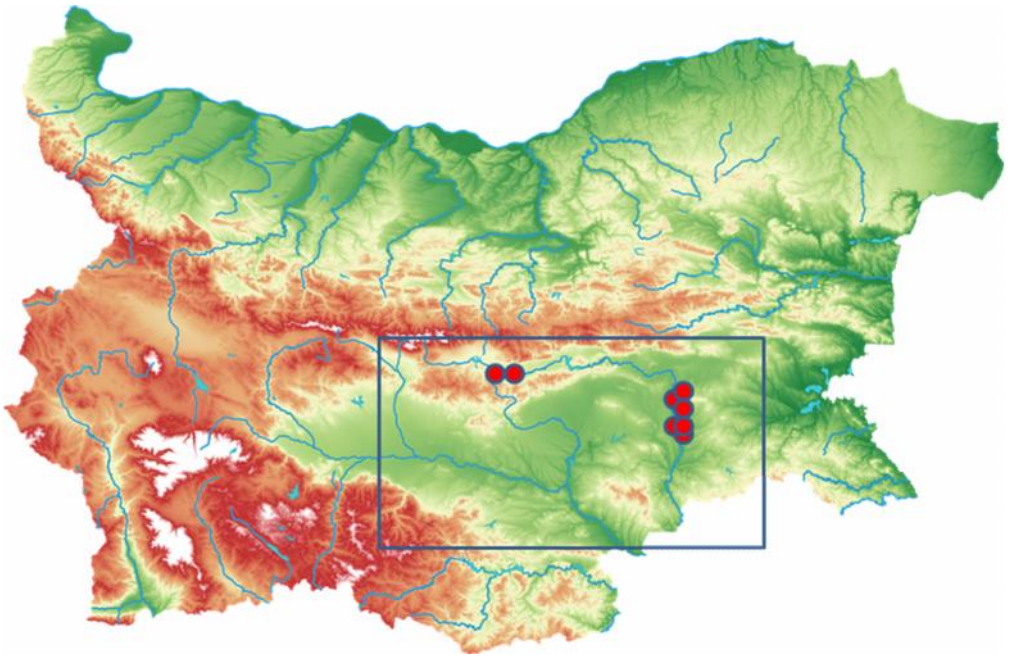
MATERIAL AND METHODS

Locations of the baits.

Sampling from the Tundzha River is done by baiting with *Rhododendron* leaves, placed into a mosquito nets and floating on the water surface for 4 to 5 days. Each baiting net contains three *Rhododendron* leaves. The baiting nets were placed in the middle watercourse of Tundzha River near Yulievo village (1 bait) and near Yagoda village (1 bait). In the area of lower watercourse baiting nets

реката в района на гр. Ямбол (3 уловки) и на юг от града в района на село Хановo (3 уловки) (Фигура 1).

were situated in the region of Yambol city (3 baits) and southern of the city, next to Hanovo village (3 baits) (Figure 1).



Фиг. 1. Разположение на уловките, заложени по поречието на река Тунджа
Fig. 1. Locations of baits along the Tundzha River

Изолиране на патогени от род *Phytophthora* от растителна тъкан на листа от *Rhododendron*.

Изолирането на *Phytophthora* spp. от листните петна е направено директно върху селективна агарова среда. Растителните проби с проявените петна по листата от *Rhododendron* се обеззаразяват повърхностно чрез промиване под течаща вода, третиране със 70 % етанол (30 сек.), последвано от трикратно измиване в стерилна дестилирана вода, след което се подсушават върху стерилна филтърна хартия. Листни сегменти с големина 3-5 mm от границата между здравата и некротиралата растителна тъкан се инкубират на селективната среда PARNHB (1 L зеленчуков агар V8, 10 mg Pimaricin, 250 mg Ampicilin, 10 mg Rifampicin, 50 mg Nistatin, 1.3 ml Tahigaren и 15 mg Benomyl) при 25 °C на тъмно. След появата на мицел

Isolation of the *Phytophthora* pathogens from the *Rhododendron* leaf tissue.

Isolation of *Phytophthora* spp. from leaf tissue is done directly on selective agar media.

Plant samples with developed lesions on the *Rhododendron* leaves were surface sterilized with tap water, 70 % ethanol for 30 s, followed by three times washing with sterile distilled water and drying on sterile filter paper.

Leaf segments of 3-5 mm in size taken from the edge between healthy and diseased tissue were incubated on a selective PARNHB medium (1 L vegetable juice V8, 10 mg Pimaricin, 250 mg Ampicilin, 10 mg Rifampicin, 50 mg Nistatin, 1.3 ml Tahigaren and 15 mg Benomyl) on 25 °C in dark.

около растителните сегменти, част от него се прехвърля на воден агар за изолиране на връхче и получаване на чиста култура.

Определяне на културалните и морфологични характеристики на изолатите.

Получените изолати са култивирани на зеленчуков (V8A - 16 g агар, 3 g $CaCO_3$, 100 ml V8 сок/1L), морковен (CA - 16 g агар, 3 g $CaCO_3$, 100 ml морковен сок/1L) или картофенодекстрозен агар (PDA, Difco). Културалните и морфологичните им характеристики са определени визуално съгласно Erwin and Ribeiro (1996) и със стереомикроскоп с микроскопска камера *Nikon SMZ745*. Вегетативните и полови структури на изолатите са описани съгласно Jung and Burgess (2009). Парченца агар съдържащи мицел с приблизителни размери 20 x 15 mm взети от нарастващата периферия на 5-7 дневна култура са покрити с нестерилна изворна вода в 90-mm петриеви блюда и инкубирани на естествена дневна непряка светлина и стайна температура. След период от 24 до 36 часа, характеристиките на спорангиите са определени под микроскоп при увеличение x 400 (ZEISS Axio Imager A2 Microscope с микроскопски софтуер AxioVision LE).

Определяне вида на изолатите чрез молекулярни методи.

Видовете *Phytophthora* са идентифицирани на база специфични ДНК последователности на ITS (internal transcribed spacer) региона. За целта е изолирана ДНК от свежи 10 дневни мицелни култури чрез използването на DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN GmbH). За амплификацията на ITS региона е използвана двойка праймери ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') и ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') и следната PCR програма: 96 ºC - 2 min., следвано от 35 цикъла на 96 ºC - 1

After appearing the mycelium around the leaf segments, small part of it is transferred on water agar for isolation of hyphae tip and obtaining of pure culture.

Determination of cultural and morphological characteristics of the isolates.

Obtained isolates are cultivated on vegetable (V8A - 16 g agar, 3 g $CaCO_3$, 100 ml V8 juice/1L), carrot (CA - 16 g agar, 3 g $CaCO_3$, 100 ml carrot juice/1L) or potato dextrose agar (PDA, Difco). Cultural and morphological charakteristics are determines vissualy according Erwin and Ribeiro (1996) and under stereomicroscope supplemented with microscope camera Nikon SMZ745. Nonsexual and sexual structures of the isolates are described according Jung and Burgess (2009). Agar pieces containing mycelium with size approximately 20 x 15 mm taken from the periphery of growing 5-7 days culture were covered with nonsterile spring water in 90-mm in diameter Petri dishes and incubated under natural daily no direct light and room temperature. After a period of 24 to 36 hours sporangia characteristics were verified under the microscope with magnification x 400 (ZEISS Axio Imager A2 Microscope supplemented with microscope software AxioVision LE).

Species identification of isolates by molecular methods.

Identification of *Phytophthora* species was based on specific DNA sequences of ITS (internal transcribed spacer) region. For the purpose DNA was isolated from fresh 10-days mycelium cultures using DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN GmbH). Amplification of the ITS region was performed with primers ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') and following PCR program: 96 °C - 2 min., followed by 35 cycles of 96 °C - 1 min., 55 °C - 1 min., 72 °C - 2 min. and

min., 55 ºC - 1 min., 72 ºC - 2 min. и финална елонгация при 72 °C - 10 min. PCR продуктите са пречистени от остатъчните реагенти в микротитърна 96-ямкова плака, напълнена с приблизително 34 mg на ямка Sephadex (Sephadex G-50 Fine, Little Chalfont, UK). Секвенирането на пречистените ДНК продукти е извършено в GATC Biotech AG (Германия).

Получените ДНК последователности са сравнени с депозираните в базата данни на NCBI (National Center for Biotechnology Information) чрез използването на BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

final elongation at 72 °C - 10 min. PCR products were purified from residue reagents in Microtite 96-well plates, fille with approximately 34 mg in a well Sephadex (Sephadex G-50 Fine, Little Chalfont, UK). Purified PCR products were sequenced in GATC Biotech AG (Germany).

Sequencing data analyses was performed by comparing with the database in the NCBI (National Center for Biotechnology Information) using BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) search.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

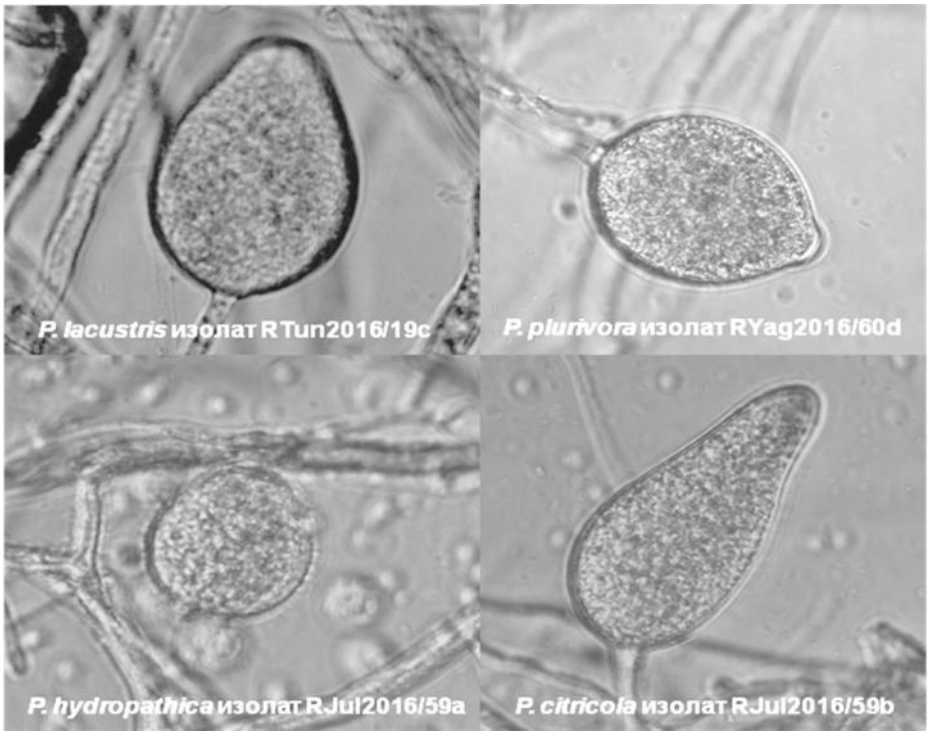
От поставените в река Тунджа общо 8 уловки са получени 25 изолата. От тях успешно секвениране на ITS региона е получено при 21 изолата и на тази база точно е определен вида им, всички принадлежащи към 4 вида на род *Phytophthora*, от които 11 изолата *P. lacustris*, 5 изолата *P. citricola*, 3 изолата *P. plurivora* и 2 изолата *P. hydropathica*.

Морфологията на спорангиите на изолатите, наблюдавана под микроскоп доказва установената видова принадлежност. *И*золат *P. lacustris* RTun 2016/19c образува обилно неопадващи без папила яйцевидни спорангии и е стерилен – не образува ооспори в единична култура. *P. plurivora* RYag2016/ 60d също формира неопадващи без папила предимно яйцевидни спорангии, но за разлика от *P. lacustris* RTun 2016/19c образува ооспори в хранителната среда. *P. hydropatica* R Jul 2015/59a образува множество хифни подутини в изворна вода. *Phytophthora citricola* Jul 2015/59b обрзува спорангии с разнообразни форми - яйцевидни, обратно крушовидна и др. (Фигура 2).

RESULTS AND DISCUSSION

Totally 25 isolates were obtained from 8 baiting nets placed in the Tundzha River. The ITS region of 21 isolates were successfully sequenced and based on sequencing data analyses the exact species was determined. All isolates could be referred to 4 species of genus *Phytophthora*, including 11 isolated of *P. lacustris*, 5 isolates of *P. citricola*, 3 isolates of *P. plurivora* and 2 isolates of *P. hydropathica*.

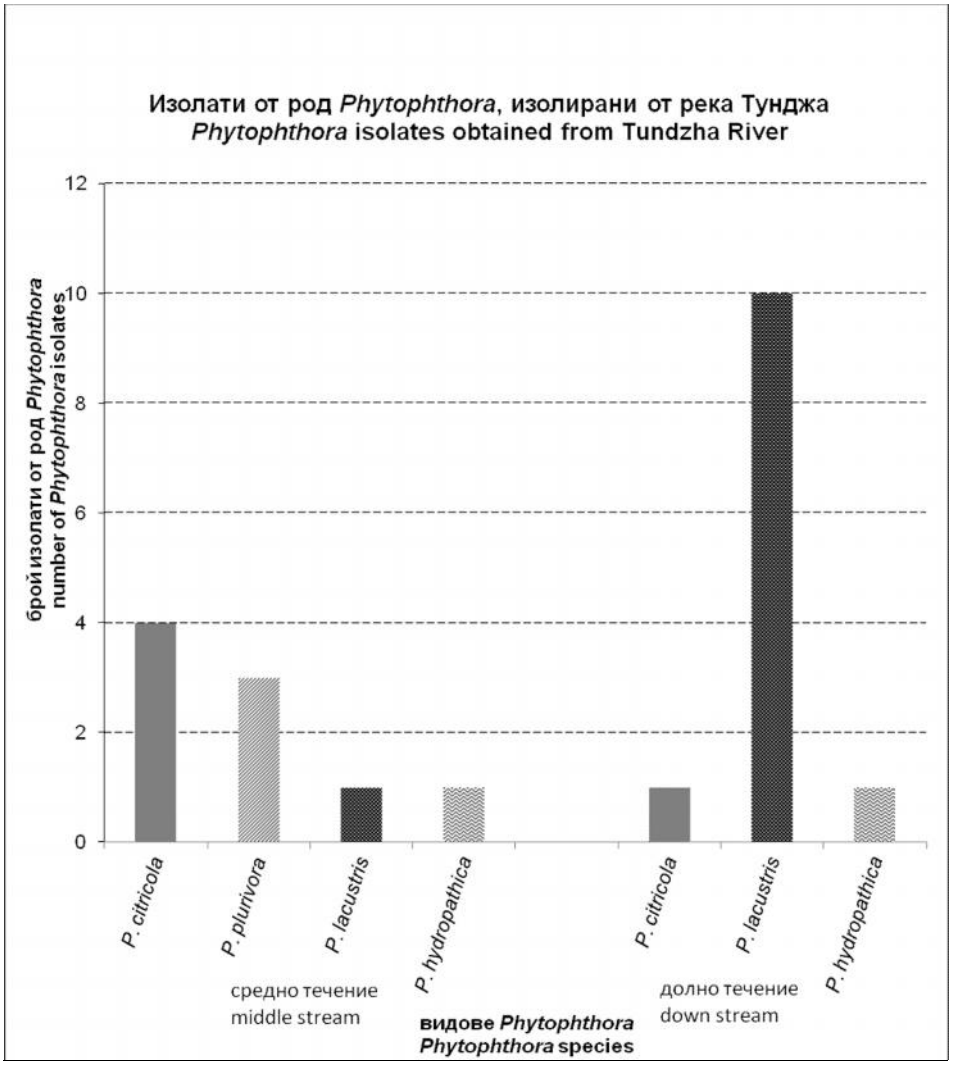
Sporangia morphology of the isolates observed under the microscope proved the stated species identification. Isolate *P. lacustris* RTun 2016/19c formed abundantly persistent, non-papillate, ovoid sporangia and was sterile – it did not formed oospores in single culture. *P. plurivora* RYag2016/ 60d also formed persistent, non-papillate, mostly ovoid sporangia, but as opposed to *P. lacustris* RTun 2016/19c oospores in the agar media were formed. *P. hydropatica* R Jul 2015/59a formed abundantly hyphal swelling in spring water. *P. citricola* Jul 2015/59b formed sporangia with various shapes – ovoid, pyriform and etc. (Figure 2).



Фиг. 2. Спорангии на видовете от род *Phytophthora*, формирани от изолати получени от уловките поставени във водите на река Тунджа
Fig. 2. Sporangia produced of isolates of *Phytophthora* species, obtained from baits placed in the water of Tundzha River

Установено е различие във видовия състав на изолираните организми от род *Phytophthora,* обитаващи средното и долно течение на реката. В средното течение на реката са регистрирани видовете *P. citricola* (4 изолата) и *P. plurivora* (3 изолата) и по 1 изолат от *P. lacustris* и *P. hydropathica*. В долното течение на реката основният установен вид е *P. lacustris* (10 от общо всички 11 изолата на *P. lacustris*) и по 1 изолат от *P. citricola* и *P. hydropathica* (Фигура 3). Видът *P. plurivora* е установен само в средното течение на реката, а в долното речно течение този вид не е открит.

A difference in the composition of *Phytophthora* species inhabiting the middle and lower course of the river was found. In the middle stream of the river the species *P. citricola* (4 isolates) and *P. plurivora* (3 isolates) and 1 isolate of each *P. lacustris* and *P. hydropathica* were registered. In the lower flow of the river mainly *P. lacustris* was obtained (10 isolates from totally 11 isolates of *P. lacustris*), and 1 isolate of each *P. citricola* and *P. Hydropathica* (Figure 3). *P. plurivora* was registered only in the middle watercourse of the river, but not in the low river stream.



Фиг. 3. Брой изолати по видове от рода *Phytophthora*, установени в средното и долно течение на река Тунджа
Fig. 3. Number of *Phytophthora* isolates, obtained in the middle and down streams of the Tundzha River

Забелязва се ясна тенденция на увеличаване на плътността на вида *P. lacustris* в по-долното течение на реката, което вероятно е свързано и с по-високата оптимална температура за растеж (28-33 °C) на този вид оомицетен организъм, познат като много разпространен в реките и с широк диапазон на температурата при която може да се развива – от 2-4 °C до 36-

A tendency of increasing the population density of *P. lacustris* in the lower watercourse of the river could be noticed which is probably related with higher optimal temperature of growth (28-33 °C) of this oomycetie organism, known as highly spread in rivers and having a wide temperature range of development – from 2-4 °C to 36-37 °C (Nechwatal et al., 2013). Most *P. lacustris*

37 °C. (Nechwatal et al., 2013). Повечето изолати на *P. lacustris* изолирани и изследвани в Полша също имат висока оптимална температура на растеж – 30 °C на среда V8A и CA (Nowak et al., 2015).

P. lacustris е отбелязан като причинител на загиване на ясена и елша в Турция (Akilli et al., 2013). Този вид е известен като слабопатогенен, но е намерен и по редица костилкови овощни видове (Nechwatal et al., 2013).

В средното течение на реката са регистрирани основно видовете *P. citricola* и *P. plurivora*, които са известни като патогени с широк кръг гостоприемници включващ малина, хмел, овощни дървесни видове (орех, бадем, кайсия, праскова, череша), често отглеждани в планински и полупланински райони, също и горски дървесни видове като бук, дъб, кестен, топола. (http://hpc.ilri.cgiar.org/beca/training/IMBB_2016/Phytophtora.htm)

P. citricola показва много широк температурен оптимум на растеж между 22.5 °C (5.7 mm/ден) и 30 °C (5.5 mm/ден) (Scott et al., 2009). Изолати и на двата вида *Phytophthora plurivora* и *P. citricola* s.str. са показали температурен оптимум на растеж върху среда V8A при 25 °C (Jung and Burgess, 2009).

Phytophthora plurivora е доказано агресивен вид патоген с широк кръг гостоприемници от няколко растителни семейства, включващи *Abies alba*, *Alnus glutinosa*, *Alnus incana*, *Acer platanoides*, *Acer pseudoplatanus*, *Acer saccharum, Aesculus hippocastanum*, *Carpinus betulus*, *Fagus sylvatica*, *Fraxinus excelsior*, *Quercus robur*, *Quercus petraea*, *Quercus rubra*, *Rhododendron* spp., *Syringa vulgaris*, *Tilia* spp., *Tsuga canadensis.* Този патоген и *P. citricola* са приемани като основни причинители на загиването на бука (*Fagus sylvatica*) в европейските гори (Werres, 1995; Jung et al., 2000; Weiland et al., 2010).

Разликата в оптималната температура на мицелен растеж на видовете *P. citricola* и *P. plurivora* isolates obtained and investigated in Poland also poses high optimal growth temperature – 30 °C on V8A and CA media (Nowak et al., 2015).

P. lacustris is pointed out as causal agent of death of ash and alder in Turkey (Akilli et al., 2013). This species is known as low pathogenic, but it is also found in some stone fruit trees (Nechwatal et al., 2013).

In the middle stream of the river mainly *P. citricola* and *P. plurivora* are registered, which are known as pathogens with wide range hosts including raspberry, hop, orchards (walnut, almond, apricot, peach, cherry) often grown in mountain and semi mountain areas, as well as forest trees (beech, oak, chestnut, poplar). (http://hpc.ilri.cgiar.org/beca/training/IMBB_2016/Phytophtora.htm)

P. citricola shows very wide temperature optimum of growth between 22.5 °C (5.7 mm/day) and 30 °C (5.5 mm/day) (Scott et al., 2009). Isolates of both species *P. plurivora* and *P. citricola* s.str. had temperature optimum of growth on medium V8A on 25 °C (Jung and Burgess, 2009).

Phytophthora plurivora is proved as agressive pathogen with wide host range from several plant families incl. *Abies alba*, *Alnus glutinosa*, *Alnus incana*, *Acer platanoides*, *Acer pseudoplatanus*, *Acer saccharum, Aesculus hippocastanum*, *Carpinus betulus*, *Fagus sylvatica*, *Fraxinus excelsior*, *Quercus robur*, *Quercus petraea*, *Quercus rubra*, *Rhododendron* spp., *Syringa vulgaris*, *Tilia* spp., *Tsuga canadensis.*

This pathogen and *P. citricola* are found as main causal agents of beech (*Fagus sylvatica*) death in European forests (Werres, 1995; Jung et al., 2000; Weiland et al., 2010).

Difference in the optimal temperature of mycelium growth of *P. citricola* and *P. plurivora* (around 25 °C),

(около 25 °C) и тази на *P. lacustris* (около 30 °C) може да бъде едно от обясненията за откриването на първите два вида в средното течение на реката, а повечето от изолатите на *P. lacustris* в долното течение на реката и по-топли води.

Два изолата на *P. hydropathica* са получени при това изследване – по един в средното и долното течение на реката. Установената оптимална температура за растежа на мицела на този вид върху V8A е 30 °C, с максимална температура на мицелен растеж при 40 °C (Gallegly et al., 2010). Не е наблюдаван растеж при 5 °C, което говори за един топлолюбив вид. Вероятно поради това при нашето изследване той е установен в Южна България и по Черноморието, но не и в Северна България (непубликувани данни).

Няколко изследвания върху патогенитета на *P. hydropathica* са показали, че видът може да инфектира гостоприемници като елша, декоративни растения (карамфил, азалея), краставици, домати и пипер (Hong et al., 2008; Pintos et al., 2016; Ãlvarez-Rodriguez et al., 2017).

and this of *P. lacustris* (around 30 °C), could be one of the explanation of finding the first two species in the middle stream, and most of the *P. lacustris* isolates in the low stream of the river in warmer water.

Two isolates of *P. hydropathica* are obtained during this study – one in the middle and one in the low stream of the river. Determined optimal mycelium growth temperature of this species on V8A medium is 30 °C, and maximum temperature of mycelium growth on 40 °C (Gallegly et al., 2010).

No mycelium growth is observed at 5 °C, which defines this as thermophilic species. Probably this is the reason why during our investigation this species was found in Southern Bulgaria and on Black Sea Coast, but not in Northern Bulgaria (unpublished data).

Studies have shown that the pathogen *P. hydropathica* has the ability to infect hosts such as alder, ornamental plants (carnations, azaleas), cucumber, tomato and pepper (Hong, et al., 2008; Pintos et al., 2016; Ãlvarez-Rodriguez et al., 2017).

ИЗВОДИ

Четири вида оомицетни организми от род *Phytophthora* са установени във водите на река Тунджа. Доказано е изменение във видовия състав на *Phytophthora* spp. разпространени по течението на реката. В средното течение на реката са регистрирани потенциално опасните за горски дървесни видове и за разсадниците *P. plurivora* и *P. citricola.* В долното течение на реката като преобладаващ вид е регистриран *P. lacustris*. Допълнителен подетайлен мониторинг на течението на реката е необходим за изясняване на цялостната картина на разпространението и изменението в състава на видовете *Phytophthora*, което се случва по течението на реката.

CONCLUSIONS

Four Oomycete species of genus *Phytophthora* are obtained from the water in Tundzha River in Bulgaria. A change in the species composition of the *Phytophthora* spp. is proved along the river's stream. In the middle watercourse of the river potentially hazardous for forest trees and nurseries *P. plurivora* and *P. citricola* are found. In the low watercourse as prevailing species *P. lacustris* is registered.

Additional more detailed monitoring is needed to elucidate the entire picture of the distribution and alteration of the species composition of *Phytophthora* spp. which happened along the river watercourse.

БЛАГОДАРНОСТИ

Настоящото изследване е осъществено в рамките на проект „Responses of European Forests and Society to Invasive Pathogens (RESIPATH)" на европейската програма за научни изследвания BiodivERsA 2012-2013 Joint call, финансирано през Национален фонд „Научни изследвания".

ACKNOWLEDGEMENTS

This study is maintained in the frame of the project „Responses of European Forests and Society to Invasive Pathogens (RESIPATH)" in European research program BiodivERsA 2012-2013 Joint call, funded trough National Science Fund.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. **Akilli, S., Ç. Ulubaş Serçe, Y. Z. Katırcıoğlu and S. Maden**, 2013. Phytophthora Dieback on Narrow Leaved Ash in the Black Sea Region of Turkey. *Forest Pathology*, 43 (3), 252-256.

2. **Ãlvarez-Rodriguez, B.; R. S. Garcia-Estrada, J. B. Valdez-Torres, J. Leon-Felix, R. Allende-Molar and S. P. Fernandez-Pavia**, 2017. *Phytophthora hydropathica* and *Phytophthora drechsleri* Isolated from Irrigation Channels in the Culiacan Valley. *Mexican Journal of Phytopathology*, 35 (1), 20-39.

3. **Brasier, C. M., S. A. Kirk, J. Delcan, D. E. Cooke, T. Jung and W. A. in 't Veld**, 2004. *Phytophthora alni* sp. nov. and Its Variants: Designation of Emerging Heteroploid Hybrid Pathogens Spreading on *Alnus* trees. *Mycological Research*, 108 (1), 1172-1184.

4. **Dick, M. W.**, 2001. Straminipilous Fungi: Systematics of the Peronosporomycetes Including Accounts of the Marine Straminipilous Protists, the Plasmodiophorids and Similar Organisms. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston.

5. **Erwin, D. C. and O. K. Ribeiro**, 1996. *Phytophthora* Worldwide. APS PRESS. The American Phytopathological Society St. Paul, Minnesota.

6. **Gallegly, M. E., P. A. Richardson, P. Kong, G. W. Moorman, J. D. Lea- Cox and D. S. Ross**, 2010. *Phytophthora hydropathica*, a New Pathogen Identified from Irrigation Water, Rhododendron Catawbiense and Kalmia Latifolia. *Plant Pathology*, 59, 913-921.

7. **Hong, C. X. and G. W. Moorman**, 2005. Plant Pathogens in Irrigation Water: Challenges and Opportunities. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 24(3), 189-208.

8. **Hong, C., P. A. Richardson and P. Kong**, 2008. Pathogenicity to Ornamental Plants of Some Existing Species and New Taxa of *Phytophthora* from Irrigation Water. *Plant Disease*, 92 (8), 1201-1207.

9. **Hwang, J., S. N. Jeffers and S. W. Oak**, 2010. Aquatic Habitats – a Reservoir for Population Diversity in the Genus *Phytophthora*. *Phytopathology*, 100 (6), 150-151.

10. **Jung, T. and T. I. Burgess**, 2009. Re-evaluation of *Phytophthora citricola* Isolates from Multiple Woody Hosts in Europe and North America Reveals a New Species, *Phytophthora plurivora* sp. nov. *Persoonia*, 22, 95-110.

11. **Jung, T., H. Blaschke and W. Osswald**, 2000. Involvement of Soilborne *Phytophthora* Species in Central European Oak Decline and the Effect of Site Factors on the Disease. *Plant Pathology*, 49, 706-718.

12. **Nechwatal, J., J. Bakonyi, S. O. Cacciola, D. E. L. Cooke, T. Jung, Z. A. Nagy, A. Vannini, A. M. Vettraino and C. M. Brasier**, 2013. The Morphology, Behavior and Molecular Phylogeny of Phytophthora Taxon Salixsoil and Its Redestination as *Phytophthora lacustris* sp. nov. *Plant Pathology*, 62, 355-369.

13. **Nowak, K. J., A. Trzewik, D. Tułacz, T. Orlikowska and L. B. Orlikowski**, 2015. Characterization of Polish *Phytophthora lacustris* Isolates Obtained from Water Environments. *Pol. J. Environ. Stud.*, 24 (2), 619-630.
14. **Pintos, C., C. Rial, O. Aguín, V. Ferreiroa and J. P. Mansilla**, 2016. First Report of *Phytophthora hydropathica* in river Water Associated with Riparian Alder in Spain. *New Disease Reports*, 33, 25.
15. **Reeser, P. W., W. Sutton, E. M. Hansen, P. Remigi and G. C. Adams**, 2011. *Phytophthora* Species in Forest Streams in Oregon and Alaska. *Mycologia*, 103 (1), 22-35.
16. **Scott, P. M., T. I. Burgess, P. A. Barber, B. L. Shearer, M .J. C. Stukely, G. E. St. J. Hardy and T. Jung**, 2009. *Phytophthora multivora* sp. nov., a New Species Recovered from Declining *Eucalyptus*, *Banksia*, *Agonis* and Other Plant Species in Western Australia. *Persoonia*, 22, 1-13.
17. **Solla, A., A. Pérez-Sierra, T. Corcobado, M. M. Haque, J. J. Diez and T. Jung**, 2010. First Report of *Phytophthora alni* on *Alnus glutinosa* in Spain. *Plant Pathology*, 59, 798.
18. **Sutton, W., E. M. Hansen, P. W. Reeser and A. Kanaskie**, 2009. Stream Monitoring for Detection of *Phytophthora ramorum* in Oregon Tanoak Forests. *Plant Disease*, 93 (11), 1182-1186.
19. **Weiland, J. E., A. H. Nelson and G. W. Hudler**, 2010. Aggressiveness of *Phytophthora cactorum*, *P. citricola* I, and *P. plurivora* from European Beech. *Plant Diseases*, 94, 1009-1014.
20. **Werres, S.**, 1995. Influence of the *Phytophthora* Isolate and the Seed Source on the Development of Beech (*Fagus sylvatica*) Seedling Blight. *European Journal of Forest Pathology*, 25, 381-390.

Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, 2019, 22 (1), 282-293
Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan
ISSN 1311-0489 (Print)
ISSN 2367-8364 (Online)

Разпространение на *Phytophthora gonapodyides* в планински речни системи на България

Калоян Костов*, Петя Христова, Анета Любенова, Славчо Славов

Агробиоинститут, 1164 София, България

Distribution of *Phytophthora gonapodyides* in Mountain River Systems of Bulgaria

Kaloyan Kostov*, Petya Christova, Aneta Lyubenova, Slavtcho Slavov

AgroBioInstitute, 1164 Sofia, Bulgaria
**E-mail: kkostov@abi.bg*

Original scientific paper

Received: 17.04.2018 *Accepted:* 23.04.2019 *Published:* 28.06.2019

РЕЗЮМЕ

С цел изследване на разпространението и видовото разнообразие на *Phytophthora* spp. в планински речни системи (от 700 до 2000 m надморска височина) в България са заложени "уловки" с листа от рододендрон по протежението на реки на територията на планините Витоша, Плана, Руй, Рила, Родопи и Стара планина. Видовата принадлежност на получените изолати е определена на база генетични сходства с известни видове. От общо 37 изолати 67% принадлежат към *Phytophthora gonapodyides*, вид често изолиран от реки и крайречни екосистеми. По литературни данни той е с умерен до слаб патогенитет спрямо някои основни за България горски дървесни видове като дъб и бук, като е установено, че е способен да причинява гниене на кореновата система. Наличието му трябва да се има предвид при създаване на нови горски насаждения с участието на чувствителни видове, на места с повишена почвена влажност и при използването на повърхностни води за напояване.

Ключови думи: *Phytophthora gonapodyides*, планински речни системи, разпространение

SUMMARY

In order to study the distribution and diversity of *Phytophthora* species in mountain river systems (from 700 to 2000 m. above sea level) of Bulgaria rhododendron "baits" were placed along the rivers in Vitosha, Plana, Ruy, Rila, Rhodopes and Balkan Mountains.

The identity of the obtained isolates was determined on the basis of genetic similarities with known species. From overall 37 isolates 67% belong to *Phytophthora gonapodyides*, a species often isolated from rivers and riparian ecosystems. According to the literature, it demonstrates weak to moderate pathogenicity to some important for Bulgaria forest tree species, such as oak and beech by causing root rot.

Its distribution must be taken into account when creating new forest stands involving sensitive species, in places with increased soil moisture and using surface water for irrigation.

Key words: *Phytophthora gonapodyides*, mountain river systems, distribution

УВОД

Разпространението на фитопатогенни видове от род *Phytophthora* в естествени и агро екосистеми е обект на интензивно проучване в последните години. В резултат броят на новоописаните видове нараства, както и данните относно екологичното поведение, начините на разпространение и характеристиките на естествените хабитати на тези организми (Nechwatal et al., 2008; Jung et al., 2011; Brazee et al., 2016; Burgess et al., 2017). Значимостта на изследванията се състои, от една страна в разширяване на знанията относно разпространението и екологичните особености, а от друга с установяването на агресивни видове, застрашаващи растителните съобщества и проникването на нови инвазивни видове.

Като основна среда за развитие и разпространение на видовете *Phytophthora* служат повърхностните води, ето защо специално внимание се обръща на проучването на присъствието и видовия състав в речни и крайречни екосистеми (Oh et al., 2013; Brazee et al., 2016). Във вода видовете *Phytophthora* образуват подвижни зооспори, което спомага за ефективното им разпространение и достигане до подходящи гостоприемници за развитие. По този начин реките служат като основен източник на инокулум и същевременно са подходяща среда за изследване на видово разнообразие. Резултатите от проучванията на този етап показват изобилно присъствие на тези организми в реки, езера и напоителни канали в различни части на света предполагайки тяхната естествена коеволюция с местните растителни съобщества. Някои специфики на видовете *Phytophthora*, като появата на силно агресивни видове чрез хибридизация и фактори като нови пътища за разпространение в резултат на глобалната търговия и срещата с нови гостоприемници, създават реална опасност от възникване на застрашаващи горите епи-

INTRODUCTION

The distribution of phytopathogenic species of genus *Phytophthora* in natural and agro ecosystems has been studied intensively in the recent years. As a result, the number of newly described species increases, as well as the data on ecological behaviour, distribution patterns and characteristics of the natural habitats of these organisms (Nechwatal et al., 2008; Jung et al., 2011; Brazee et al., 2016; Burgess et al. al., 2017). The importance of this development is on the one hand, in expanding the knowledge of the diversity and ecological characteristics and, on the other, in establishing the presence of aggressive species threatening plant communities or the introduction of new invasive species.

Surface waters serve as an environment for the development and distribution of *Phytophthora* species, thus special attention is paid of the presence and diversity in rivers and riparian ecosystems (Oh et al., 2013, Brazee et al., 2016). In water, the *Phytophthora* species produce motile zoospores, which facilitates their effective distribution and the reaching of suitable hosts for development.

Therefore the rivers serve as main source of inoculum and, at the same time, are suitable environment for exploring the composition of the *Phytophthora* communities. At present many studies indicate the abundant presence of these organisms in rivers, lakes and irrigation canals in different parts of the world suggesting their natural coevolution with the local plant communities. Some characteristics of the *Phytophthora* species such as the emergence of aggressive species through hybridization and factors such as new opportunities of dispersal and the introduction to new hosts as a result of global trade create a real danger for the emergence of dramatic epidemics in forest around the world

демии (Hansen, 2008). Поради тази причина системното събиране на проби и извършването на мониторинг на видовете *Phytophthora* в естествените екосистеми е от изключително значение.

Таксономично близките видове *Phytophthora gonapodyides* и *Phytophthora lacustris* принадлежат към Клад 6 и са едни от най-често изолираните представители на рода от реки и водоеми на територията на Европа. За тях се смята, че са специализирани към развитие във водна среда и се характеризират със слаба до средна патогенност спрямо някои дървесни видове растения (Yamak et al., 2002; Hwang et al., 2009; Reeser et al., 2011; Stamler et al., 2016). Те са самостерилни и при тях липсва образуването на ооспори, както и на характерните за други видове дебелостенни едноклетъчни хламидоспори (Nechwatal et al., 2013).

Видовото разнообразие на *Phytophthora* в планинските и полупланински части е значително по-слабо проучено в сравнение с по-ниско разположени терени, което е свързано до голяма степен с обратната корелация между интензитета на стопанска активност и увеличаването на надморската височина. Характеристиката на релефа в България, поставя 47.54 % от територията на страната в категорията на планинските райони (Kroumova, 2016). Поради големият си дял и наличието на богати природни ресурси тези региони са от особено значение за горското и селското стопанство.

Целта на настоящото изследване е да се установят видовете *Phytophthora* с най-широко разпространение в речни системи с надморска височина от 700 до 2000 m на територията на България.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Разпространението на видове *Phytophthora* в реки на територията на планините Витоша (р. Боянска и Боянско езеро), Плана (р. Ведена), Руй (р. Ерма), Рила (р. Марица), Родопи (р.

(Hansen, 2008). Thus systematic sampling and monitoring of the *Phytophthora* species in natural ecosystems is necessary.

The taxonomically closely related species *Phytophthora gonapodyides* and *Phytophthora lacustris* belong to Clade 6 and are one of the most frequently isolated species from rivers and riparian ecosystems in Europe. They are considered as specialized to the aquatic environment and are characterized by low to medium pathogenicity to some tree species (Yamak et al., 2002; Hwang et al., 2009; Reeser et al., 2011; Stamler et al. al., 2016). They are self-sterile and do not produce oospores as well as the characteristic for other species thick-walled chlamydo-spores (Nechwatal et al., 2013).

The diversity of *Phytophthora* species in mountain and semi-mountain areas is considerably less studied compared to lower terrains, largely related to the inverse correlation between the intensity of agricultural activity and the altitude.

The relief features of Bulgaria set 47.54% of the territory of the country in the category of mountainous regions (Kroumova, 2016). Due to their large share and the availability of rich, natural resources, these regions are of particular importance for forestry and agriculture.

The purpose of this study is to identify the most widely distributed *Phytophthora* species in river systems at altitudes from 700 to 2000 m in the territory of Bulgaria.

MATERIAL AND METHODS

The distribution of *Phytophthora* species in rivers passing through the mountains Vitosha (Boyana and Boyana Lake), Plana (River Vedena), Rui (Herma River), Rila (Maritsa River), Rhodopes

Чепинска) и Стара планина (р. Бели Осъм) е изследвано в периода 2016-2017 година по метода на "уловките". "Уловките" се състоят от три листа рододендрон поставени в мрежа с размери 20 x 20 cm, които престояват на повърхността на водата в реката в продължение на 5 до 7 дни. Листата с развити некротични петна са обработени в лабораторни условия като са стерилизирани повърхностно със 70% етанол и промити двукратно със стерилна вода. Части от листата на границата между некротиралата и здрава тъкан са изрязани и поставени в петриеви блюда със селективна среда PARNHB (морковен агар с добавени: 10 mg Pimaricin, 250 mg Ampicillin, 10 mg Rifampicin, 50 mg Nystatin, 50 mg Hymexazol и 15 mg Benomyl/1l). Блюдата са инкубирани при 20-23ºC до появата на растящ мицел. Агарови блокчета (1 x 1 cm) с мицел са прехвърлени върху воден агар и инкубирани в продължение на 3-4 дни. Върхчетата на новообразуваните хифи са прехвърлени на свежа среда V8 (зеленчуков агар: 16 g агар, 3 g $CaCO_3$, 100 ml сок V8/1l) или PDA (картофен агар, Difco).

Изолатите са идентифицирани на база специфични ДНК последователности на ITS (internal transcribed spacer) региона. За целта е изолирана ДНК от свежи култури (10 дневни) чрез използването на DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN GmbH). Амплификацията на ITS региона е проведена чрез PCR с използването на двойка праймери ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') и ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') и следната температурна програма: 96ºC – 2 мин., следвано от 35 цикъла на 96ºC – 1 мин., 55ºC – 1 мин., 72ºC – 2 мин. и финална елонгация на 72ºC – 10 мин. PCR продуктите са пречистени от остатъчните реагенти по следната процедура: В микротитърна плака с 96 гнезда напълнена с приблизително 34 mg на гнездо Sephadex (Sephadex G-50 Fine, Little Chalfont, UK) са добавени

(Chepinska River) and Balkan mountain (Beli Osam River) was investigated between 2016 and 2017 using the "baiting" method. The "baits" consist of three leaves of rhododendron placed in a mosquito net (20 x 20 cm) that were left to float on the water surface of the river for 5 to 7 days. The leaves with developed necrotic spots were processed in laboratory conditions by surface sterilization with 70% ethanol and rinsed twice with sterile water. Leave pieces on the border between the necrotic and healthy tissue were excised and placed in petri dishes with selective PARNHB medium (carrot agar supplemented with: 10 mg Pimaricin, 250 mg Ampicillin, 10 mg Rifampicin, 50 mg Nistatin, 1.3 ml Tahigaren and 15 mg Benomyl/1l). The plates are incubated at 20-23 °C until the appearance of a growing mycelium. Agar pieces (1 x 1 cm) with mycelia were transferred to water agar and incubated for 3-4 days. The tips of the newly formed hyphae were transferred to fresh V8 medium (vegetable agar: 16 g agar, 3 g CaCO3, 100 ml V8 juice/1l) or PDA (potato agar, Difco).

The isolates were identified on the basis of a specific DNA sequence of the ITS (internal transcribed spacer) region. For this purpose, DNA from fresh mycelium culture (10 days) was isolated using DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN GmbH). Amplification of the ITS region was performed by PCR using a pair of primers - ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') and the following temperature program: 96 ° C - 2 min followed by 35 cycles of 96ºC – 1 min, 55ºC – 1 min, 72ºC – 2 min and final elongation of 72ºC – 10 min.

The amplification products were purified from the residual reagents by the following procedure: In a 96-well microtiter plate filled with approximately 34 mg per well Sephadex (Sephadex G-50 Fine, Little Chalfont, UK) were added 300 µl of

300 µl дестилирана вода на гнездо. След инкубиране за 4 часа при стайна температура микротитърната плака е поставена върху плака с 96 гнезда и центрофугирана при 750xg за 90 секунди. След центрофугирането, отпадъчната плака е заменена с чиста PCR плака с 96 гнезда и 25 µl от PCR реакцията е заредена в гнездата на микротитърната плака и отново центрофугирана със същата скорост и продължителност. По 5 µl от пречистения PCR продукт са смесени с 5 µl праймер (5 pmol от ITS4) и изпратени за секвениране в GATC Biotech AG (Германия).

Получените ДНК последователности са сравнени с депозираните в базата данни на NCBI (National Center for Biotechnology Information) чрез използването на BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Обработката на ДНК последователностите и филогенетичният анализ е проведен с програмата CLC Workbench.

distilled water per well. After 4 hours at room temperature the plate was placed over 96-well plate and centrifuged at 750 x g for 90 seconds.

After centrifugation, the waste plate was replaced with a clean 96-well PCR plate and 25 µl of the PCR reaction was loaded into the wells and again centrifuged at the same speed and duration. 5 µl of the purified PCR product was mixed with 5 µl of primer (5 pmol of ITS4) and sent for sequencing to GATC Biotech AG (Germany).

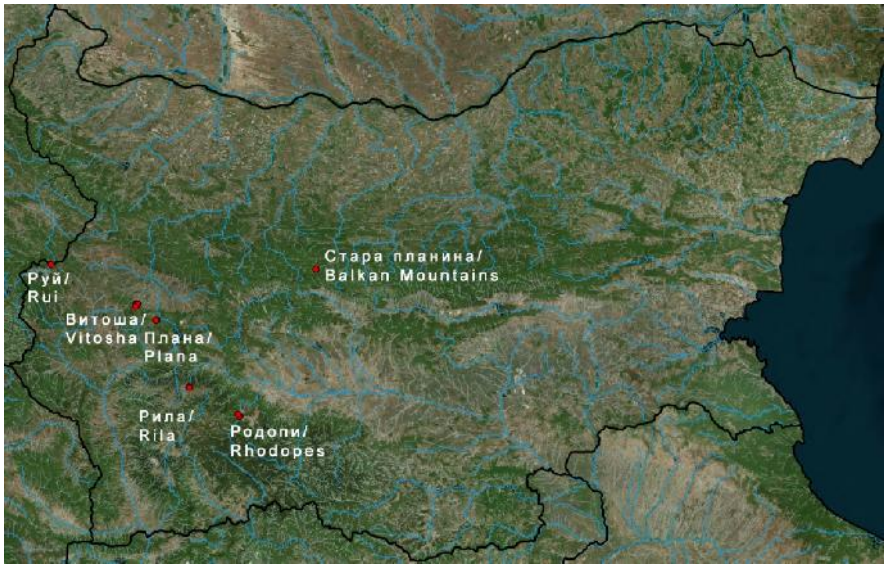
The resulting DNA sequences were compared to those deposited in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). The processing of DNA sequences and phylogenetic analysis was performed with the program CLC Workbench.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

От поставените в планинските реки над 700 m н. в. общо 16 уловки (от които във Витоша - 5, в Плана - 2, в Руй - 1, в Рила - 5, в Родопи - 2 и в Стара планина - 1) са получени 37 изолата *Phytophthora* (Фигура 1).

RESULTS AND DISCUSSION

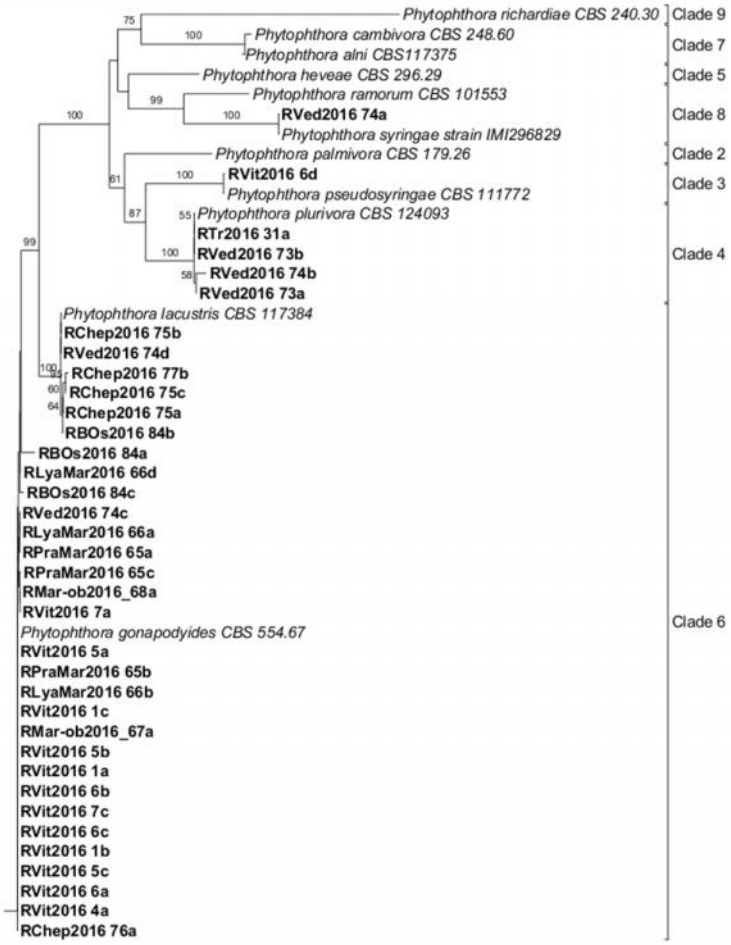
Out of totally 16 baits (in Vitosha - 5, Plana - 2, Ruy - 1, Rila - 5, Rhodopes - 2 and Balkan mountains - 1), placed in mountain rivers over 700 m, 37 *Phytophthora* isolates were obtained (Figure 1).



Фиг. 1. Места на залагане на уловки в планински речни системи на България
Fig. 1. Locations of baits in mountain river systems of Bulgaria

Според прилики в ДНК последователностите на ITS региона и проведения филогенетичен анализ изолатите принадлежат към 5 вида както следва: 25 изолата към *P. gonapodyides*; 6 към *P. lacustris*; 4 към *Phytophthora plurivora* и по един към видовете *Phytophthora syringae* и *Phytophthora pseudosyringae* (Фигура 2).

According to the similarities in the DNA sequences of the ITS region and the performed phylogenic analysis they belong to five species as follows: 25 isolates belong to *P. gonapodyides*; 6 to *P. lacustris*; 4 to *Phytophthora plurivora* and by one isolate to the species *Phytophthora syringae* and *Phytophthora pseudosyringae* (Figure 2).



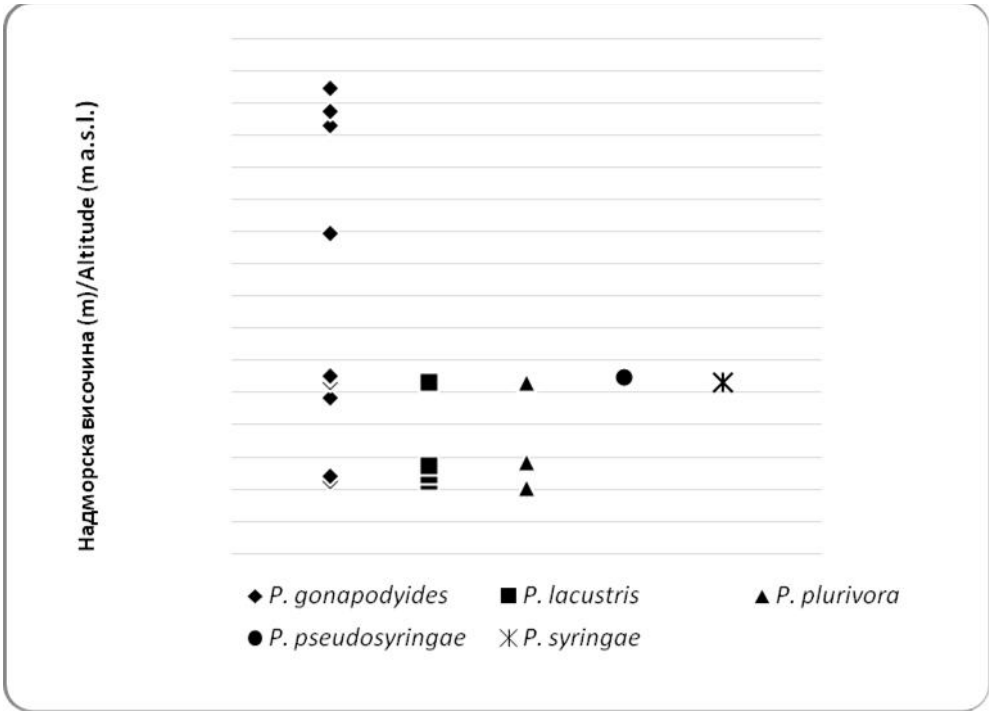
Фиг. 2. Филогенетично дърво на видове *Phytophthora* в планински речни системи на България
Fig. 2. Phylogenetic tree of *Phytophthora* spp. in the mountain river systems of Bulgaria

В зоната от 700 до 800 m са установени видовете *P. gonapodyides*, *P. lacustris* и *P. plurivora*. Най-голямо видово разнообразие се наблюдава в

In the zone between 700 to 800 m were found three species - *P. gonapodyides*, *P. lacustris* and *P. plurivora*. The largest species diversity

зоната от 1000 до 1100 m където е установено наличието на всички пет вида - *P. gonapodyides*, *P. lacustris*, *P. plurivora, P. syringae* и *P. pseudosyringae*. Над 1100 до 1945 m е установен само видът *P. gonapodyides* (Фигура 3).

was observed in the zone between 1000 to 1100 m, where all the five species were present - *P. gonapodyides*, *P. lacustris*, *P. plurivora*, *P. syringae* and *P. pseudosyringae*. Over 1100 up to 1950 m only one species - *P. gonapodyides* was isolated (Figure 3).



Фиг. 3. Вертикално разпределение на видове *Phytophthora* в планински речни системи на България
Fig. 3. Vertical distribution of *Phytophthora* spp. in mountain river systems of Bulgaria

В повечето случаи от една уловка са получени от един до четири изолата принадлежащи към един вид *Phytophthora*. При 3 от уловките са изолирани повече от един вид, като най-голямо видово разнообразие е установено в р. Ведена на територията на Плана планина, където са изолирани четири (*P. gonapodyides*, *P. lacustris*, *P. plurivora* и *P. syringae*) от общо петте вида *Phytophthora*, срещащи се над 700 m н. в. в планинските речни екосистеми на територията на България (Таблица 1).

In most of the cases, from one bait ware obtained one to four isolates which belonged to a single *Phytophthora* species. In 3 of the baits, more than one species were recovered, with the grates diversity being found in the River Vedena on the territory of the Plana Mountain, where four (*P. gonapodyides*, P*. lacustris*, *P. plurivora* and *P. syringae*) out of five species of *Phytophthora*, occurring over 700 m, were isolated (Table 1).

Таблица 1. Списък с на изолати *Phytophthora*, събрани в планински речни системи на България (Ш - широколистни видове; И - иглолистни видове)
Table 1. List of *Phytophthora* isolates collected in mountain river systems of Bulgaria (B - broadleaved species, N - needle-leaf species)

N	Координати/ Coordinates	m н.в./ a.s.l	Изолат/ Isolate	Планина, Река/ Mountain, River	Вид/ Species	Растителност, преобладаващ вид/ Vegetation, dominant species
1	22°38'51.832"E 42°50'55.865"N	703	RTr2016/31a	Руй, Ерма/ Ruy, Erma	*P. plurivora*	Ш/В, *Fagus sylvatica*
2	24°32'56.137"E 42°49'35.904"N	723	RBOs2016/84a RBOs2016/84b RBOs2016/84c	Стара планина, Бели Осъм/ Balkan mountains, Beli Osam	*P. gonapodyides* *P. lacustris* *P. gonapodyides*	Ш+*И*/В+N, *Fagus sylvatica*; *Pinus sylvestris*
3	23°59'58.748"E 42°1'45.485"N	741	RChep2016/76a	Родопи; Чепинска/ Rhodopes, Chepinska	*P. gonapodyides*	Урбанизирана/ Urban
4	23°59'45.919"E 42°1'43.511"N	745	RChep2016/75a RChep2016/75b RChep2016/75c	Родопи, Чепинска Rhodopes, Chepinska	*P. lacustris* *P. lacustris* *P. lacustris*	Урбанизирана/ Urban
5	23°59'20.262"E 42°2'21.997"N	774	RChep2016/77b	Родопи, Чепинска Rhodopes, Chepinska	*P. lacustris*	Урбанизирана/ Urban
6	23°24'4.082"E 42°33'4.529"N	784	RVed2016/73a RVed2016/73b	Плана, Ведена/ Plana, Vedena	*P. plurivora* *P. plurivora*	Ш/В, *Fagus sylvatica*; *Quercus petraea*
7	23°15'32.082"E 42°38'10.371"N	981	RVit2016/5a RVit2016/5b RVit2016/5c	Витоша, Боянска/ Vitosha, Boyanska	*P. gonapodyides* *P. gonapodyides* *P. gonapodyides*	Ш/В, *Fagus sylvatica*; *Quercus petraea*
8	23°15'30.931"E 42°38'11.194"N	985	RVit2016/4a	Витоша, Боянска/ Vitosha, Boyanska	*P. gonapodyides*	Ш/В, *Fagus sylvatica; Quercus petraea*
9	23°24'2.109"E 42°32'48.082"N	1030	RVed2016/74a RVed2016/74b RVed2016/74b RVed2016/74d	Плана, Ведена/ Plana, Vedena	*P. syringae* *P. plurivora* *P. gonapodyides* *P. lacustris*	Ш/В, *Fagus sylvatica*; Quercus petraea
10	23°16'8.1"E 42°38'8.562"N	1049	RVit2016/6a RVit2016/6b RVit2016/6c RVit2016/6d	Витоша, Боянско езеро/ Vitosha, Boyana lake	*P. gonapodyides* *P. gonapodyides* *P. gonapodyides* *P. gonapodyides*	Ш+*И*/В+N, *Fagus sylvatica*; *Picea abies*
11	23°16'9.416"E 42°38'8.233"N	1051	RVit2016/7a RVit2016/7b	Витоша, Боянско езеро/ Vitosha, Boyana lake	*P. gonapodyides* *P. gonapodyides*	Ш+*И*/В+N, *Fagus sylvatica*; *Picea abies*
12	23°15'5.931"E 42°37'22.346"N	1495	RVit2016/1a RVit2016/1b RVit2016/1c	Витоша, Боянско езеро/ Vitosha, Boyana lake	*P. gonapodyides* *P. gonapodyides* *P. gonapodyides*	Ш+*И*/В+N, *Fagus sylvatica*; *Picea abies*
13	23°38'30.633"E 42°11'24.87"N	1809	RMar-ob2016/68a	Рила, Марица/ Rila, Maritsa	*P. gonapodyides*	*И*/N, *Picea abies*; *Pinus peuce*
14	23°38'23.232"E 42°11'19.278"N	1829	RMar-ob2016/67a	Рила, Марица/ Rila, Maritsa	*P. gonapodyides*	*И*/N, *Picea abies*; *Pinus peuce*
15	23°38'13.857"E 42°11'10.726"N	1873	RLyaMar2016/66a RLyaMar2016/66b RLyaMar2016/66c RLyaMar2016/66d	Рила, Марица/ Rila, Maritsa	*P. gonapodyides* *P. gonapodyides* *P. gonapodyides* *P. gonapodyides*	*И*/N, *Picea abies*; *Pinus peuce*
16	23°38'26.028"E 42°10'58.72"N	1945	RPraMar2016/65a RPraMar2016/65b RPraMar2016/65c	Рила, Марица/ Rila, Maritsa	*P. gonapodyides* *P. gonapodyides* *P. gonapodyides*	*И*/N, *Picea abies*; *Pinus mugo*

Надморското равнище оказва силно влияние върху разнообразието и композицията на популациите *Phytophthora* в горските почви и реките, като обикновено намаляват във височина (Jung et al., 2019). Нашите наблюдения потвърждават тази тенденция, въпреки, че в зоната около 1000 m се

The diversity and species composition of *Phytophthora* in forest soils and rivers, usually decrease with altitude (Jung et al., 2019).

We have observed a similar trend, despite the fact that there was a larger number of species from the lower area

наблюдава по-голям брой видове от по-ниско разположената зона между 700 и 800 m. Но в по-високите части на релефа, над 1100 m е установено присъствието само на един от видовете *Phytophthora*.

С най-широко разпространение в нашето изследване е видът *P. gonapodyides*, представлявайки 67% от всички получени изолати и е единственият вид, установен в по-високите планински части, достигащи до границата с алпийската зона (1945 m надморска височина). Той е изолиран при 12 от общо 16 местоположения на територията на планините Витоша, Плана, Рила, Родопи и Стара планина (Таблица 1). Разпространението му в планинските райони може да се обясни със сравнително ниските терминални температури на растеж и способността да заразява някои широко разпространени горски дървесни видове (Nechwatal et al., 2013). *P. gonapodyides* заедно с втория най-често срещан вид, *P. lacustris*, са членове на една група *Phytophthora* често изолирани от реки и крайречни екосистеми. И двата вида са стерилни, характеристика която се смята за свързана с адаптацията им към водна среда (Brasier et al., 2003). *P. lacustris* е разпространен в Европа, Нова Зеландия, Австралия и САЩ, като се характеризира с умерена до слаба патогенност към елша, върба и някои овощни костилкови видове (Nechwatal et al., 2013).

Видът *P. gonapodyides* традиционно е смятан за умерен до слаб патоген спрямо дъб и бук (Jung et al., 1996; Jung, 2009; Corcobado et al., 2010; Orlikowski et al., 2011). Известно е също така, че в изкуствени условия е способен да заразява корени и да предизвиква некроза на млади растения от елша (*Alnus glutinosa*) и праскова (*Prunus persica*) (Nechwatal et al., 2013). Изследване на симптоматични растения обикновен бук (*Fagus sylvatica*) в Южна Швеция посочва този

between 700 and 800 m compared to the area of about 1000 m. However, in the higher parts of the relief, more than 1100 m, the presence of only one species of *Phytophthora* was found.

The most widespread species in our study is *P. gonapodyides*, representing 67% of all isolates, and is the only species found in higher altitudes, reaching the alpine zone (1945 m a.s.l.).

It is isolated in 12 out of 16 locations on the territory of the mountains Vitosha, Plana, Rila, Rhodopes and Balkan mountains (Table 1). Its distribution in mountain areas can be explained by the relatively low terminal temperatures of growth and the wide presence of host tree species (Nechwatal et al., 2013).

P. gonapodyides, together with the second most common species, *P. lacustris*, are members of a group of *Phytophthora* often isolated from rivers and riparian ecosystems. Both are sterile, a characteristic associated with adaptation to the aquatic environment (Brasier et al., 2003).

P. lacustris is found in Europe, New Zealand, Australia and the United States and characterizes with low to moderate pathogenicity of alder, willow and some orchard tree species (Nechwatal et al., 2013).

P. gonapodyides is traditionally considered as weak to moderate pathogen to oak and beech (Corcobado et al., 2010; Jung, 2009; Jung et al., 1996; Orlikowski et al., 2011). It is also known that under greenhouse conditions it is capable to infect roots and cause necrosis of young alder (*Alnus glutinosa)* and peach (*Prunus persica*) trees (Nechwatal et al., 2013). Investigation of symptomatic plants of European beech (*Fagus sylvatica*) in Southern Sweden define *P. gonapodyides* as the main

вид като основен причинител на наблюдаваното стъблено гниене, а авторите отбелязват, че способността на този патоген да причинява щети вероятно се подценява от изследователите (Cleary et al., 2016). Скорошни проучвания допълват списъка с гостоприемници на *P. gonapodyides*, като е установено, че той причинява съхнене на обикновения орех в Италия (Belisario et al., 2016) и че при изкуствени условия е способен да заразява растения топола (Milenković et al., 2018).

Наличието на *P. gonapodyides* в реки с надморска височина над 1700 m преминаващи през територии с преобладаваща иглолистна растителност е интересно наблюдение от гледна точка на известните до този момент гостоприемници на този вид, спадащи изключително към широколистните дървесни видове (Таблица 1). Допълнително проучване на способността на този вид да заразява видове от семейство *Pinaceae* или други представители на алпийската флора биха спомогнали за обяснението на този факт. Наши скоро публикувани данни показват, че *P. gonapodyides* заразява листа от ягодоплодни видове, в това число и срещаната във високите планинските зони червена боровинка, което е знак за потенциалната опасност от заразя-ване на високопланински треви и храс-ти (Christova et al., 2018).

В предишни проучвания, обхващащи зони с умерен и средиземноморски климат на територията на Европа, вертикалната граница на разпространение на *P. gonapodyides* достига 800 m в Бавария, Германия (Jung, 2009) и 1700 m в Сицилия, Италия (Jung et al., 2019). В нашето изследване *P. gonapodyides* е открит на 1945 m и до колкото ни е известно на днешен етап е най-високата точка на разпространение съобщавана за този вид на континента.

Широко разпространение на *P. gonapodyides* и преобладаващото му наличие в планинските райони над 700 m надморска височина подчертава

cause of the observed stem canker and the authors concluded that the potential of this pathogen to cause damage might be underestimated (Cleary et al., 2016).

Recent studies expand the hosts list of *P. gonapodyides* as it has been found to cause decline of walnut (*Juglans regia*) in Italy (Belisario et al., 2016) and that artificial inoculation leads to an infection of poplar trees (Milenković et al., 2018).

The presence of *P. gonapodyides* in rivers at altitudes above 1700 m passing through areas with predominant needle-leaf trees is interesting observation from the viewpoint of the known host species, which exclusively belong to the broadleaved tree species (Table 1).

An additional study of the ability of this species to infect representatives of the family of *Pinaceae* or other alpine flora species would help to explain this fact.

Recently published data show that *P. gonapodyides* infects berry plants, including high altitude species such as the black berries, which indicates the potential threat to mountain grasses and bushes (Christova et al., 2018).

In previous studies including areas with humid continental and Mediterranean climates across Europe, the vertical distribution limit of *P. gonapodyides* is found to be 800 m in Bavaria, Germany (Jung, 2009) and 1700 m in Sicily, Italy (Jung et al., 2019).

In our study *P. gonapodyides* was discovered at 1945 m and to the best of our knowledge this is the highest point of distribution reported so far for this species on our continent.

The presence of *P. gonapodyides* and its prevalence in the mountainous areas over 700 m above sea level is an indicator of the high ecological plasticity

адаптивния потенциал на този вид. Нееднозначната информация относно неговата патогенност налагат предпазлив подход и извършването на наблюдения на чувствителната растителност в горски и крайречни екосистеми, особено в години с по-голямо количество валежи и продължителни прохладни периоди.

of this species.

Inconclusive information on its pathogenicity requires a cautious approach and monitoring of the sensitive vegetation in forest and riparian ecosystems, especially in years with higher rainfall and long cool weather periods.

ИЗВОДИ

При проучване на разпространението на видове от род *Phytophthora* в реки, преминаващи през планински територии на България е установено преобладаващо наличие на вида *P. gonapodyides*. Присъствието му трябва да се има предвид при създаване на нови горски насаждения с участието на чувствителни видове, като дъб и бук например, на места с повишена почвена влажност и при използването на повърхностни води за напояване в земеделието.

CONCLUSIONS

During the study of the distribution of *Phytophthora* species in rivers passing through mountainous territories of Bulgaria the prevalence of one species - *P. gonapodyides* was found.

Its presence should be taken into account when creating new forest stands involving sensitive species such as oak and beech, especially at locations with increased soil moisture, as well as when using surface waters for irrigation in agriculture.

БЛАГОДАРНОСТИ

Настоящото изследване е финансирано в рамките на проект „Responses of European Forests and Society to Invasive Pathogens (RESIPATH)" на програма BiodivERsA 2012-2013 Joint call.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study is funded under the BiodivERsA 2012-2013 Joint Call program "Responses of European Forests and Society to Invasive Pathogens (RESIPATH)".

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. **Belisario, A., L. Luongo, S. Vitale, M. Galli and A. Haegi**, 2016. Phytophthora Gonapodyides Causes Decline and Death of English (Persian) Walnut (Juglans regia) in Italy. *Plant Disease*, 100, 2537-2537.
2. **Brasier, C. M., D. E. Cooke, J. M. Duncan and E. M. Hansen**, 2003. Multiple New Phenotypic Taxa from Trees and Riparian ecosystems in Phytophthora Gonapodyides–*P. megasperma* ITS Clade 6, Which Tend to be High-Temperature Tolerant and Either Inbreeding or Sterile. *Mycological Research*, 107, 277-290.
3. **Brazee, N. J., R. L. Wick and J. P. Hulvey**, 2016. Phytophthora Species Recovered from the Connecticut River Valley in Massachusetts, USA. *Mycologia*, 108, 6-19.
4. **Burgess, T. I., D. White, K. M. McDougall, J. Garnas, W. A. Dunstan, S. Català, A. J. Carnegie, S. Worboys, D. Cahill and A.-M. Vettraino**, 2017. Distribution and Diversity of Phytophthora across Australia. *Pacific Conservation Biology*, 23, 150-162.
5. **Christova P., A. Lyubenova, K. Kostov, S. Slavov,** 2018 Diversity and Pathogenicity of *Phytophthora* species, Isolated from Osam River. *Journal of Mountain Agriculture on the Balkans*, 21 (1), 179-191.
6. **Cleary, M., M. Ghasemkhani, M. Blomquist and J. Witzell**, 2016. First Report

of Phytophthora Gonapodyides Causing Stem Canker on European Beech (Fagus sylvatica) in Southern Sweden. *Plant Disease*, 100, 2174.
7. **Corcobado, T., E. Cubera, A. Pérez-Sierra, T. Jung and A. Solla**, 2010. First Report of Phytophthora gonapodyides Involved in the Decline of Quercus Ilex in Xeric Conditions in Spain. *New Disease Reports*, 22, 2044-0588.
8. **Hansen, E. M.**, 2008. Alien Forest Pathogens: Phytophthora Species are Changing World Forests.
9. **Hwang, J., S. W. Oak and S. N. Jeffers**, 2009. Monitoring Occurrence and Distribution of Phytophthora Species in Forest Streams in North Carolina Using Bait and Filtration Methods. Gen. Tech. Rep. PSW-GTR-221. Albany, CA: US Department of Agriculture, Forest Service, Pacific Southwest Research Station, 221, 91-95.
10. **Jung, T.**, 2009. Beech Decline in Central Europe Driven by the Interaction between Phytophthora Infections and Climatic Extremes. *Forest pathology*, 39, 73-94.
11. J**ung, T., H. Blaschke and P. Neumann**, 1996. Isolation, Identification and Pathogenicity of Phytophthora Species from Declining Oak Stands. *European Journal of Forest Pathology*, 26, 253-272.
12. **Jung, T., F. La Spada, A. Pane, F. Aloi, M. Evoli, M. Horta Jung, B. Scanu, R. Faedda, C. Rizza and I. Puglisi**, 2019. Diversity and Distribution of Phytophthora Species in Protected Natural Areas in Sicily. *Forests*, 10, 259.
13. **Jung, T., M. Stukely, G. S. J. Hardy, D. White, T. Paap, W. Dunstan and T. Burgess**, 2011. Multiple New Phytophthora Species from ITS Clade 6 Associated with Natural Ecosystems in Australia: Evolutionary and Ecological Implications. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 26, 13.
14. **Kroumova, Y.**, 2016. Mountains and Mountain Regions in Bulgaria. In: G. Zhelezov ed. *Sustainable Development in Mountain Regions: Southeastern Europe.* pp. 35-41. Springer International Publishing, Cham.
15. **Milenković, I., N. Keča, D. Karadžić, Z. Radulović, J. Nowakowska, T. Oszako, K. Sikora, T. Corcobado and T. Jung**, 2018. Isolation and Pathogenicity of Phytophthora Species from Poplar Plantations in Serbia. *Forests*, 9, 330.
16. **Nechwatal, J., J. Bakonyi, S. Cacciola, D. Cooke, T. Jung, Z. Nagy, A. Vannini, A. Vettraino and C. Brasier**, 2013. The Morphology, Behaviour and Molecular Phylogeny of Phytophthora taxon Salixsoil and its Redesignation as Phytophthora lacustris sp. nov. *Plant Pathology*, 62, 355-369.
17. **Nechwatal, J., A. Wielgoss and K. Mendgen**, 2008. Diversity, Host, and Habitat Specificity of Oomycete Communities in Declining Reed Stands (Phragmites australis) of a Large Freshwater Lake. *Mycological research*, 112, 689-696.
18. **Oh, E., M. Gryzenhout, B. D. Wingfield, M. J. Wingfield and T. I. Burgess**, 2013. Surveys of Soil and Water Reveal a Goldmine of Phytophthora Diversity in South African Natural Ecosystems. *IMA fungus*, 4, 123-131.
19. **Orlikowski, L., M. Ptaszek, A. Rodziewicz, J. Nechwatal, K. Thinggaard and T. Jung**, 2011. Phytophthora Root and Collar Rot of Mature Fraxinus Excelsior in Forest Stands in Poland and Denmark. *Forest Pathology*, 41, 510-519.
20. **Reeser, P. W., W. Sutton, E. M. Hansen, P. Remigi and G. C. Adams**, 2011. Phytophthora Species in Forest Streams in Oregon and Alaska. *Mycologia*, 103, 22-35.
21. **Stamler, R. A., S. Sanogo, N. P. Goldberg and J. J. Randall,** 2016. Phytophthora Species in Rivers and Streams of the Southwestern United States. *Appl. Environ. Microbiol.*, 82, 4696-4704.
22. **Yamak, F., T. Peever, G. Grove and R. Boal**, 2002. Occurrence and Identification of Phytophthora spp. Pathogenic to Pear Fruit in Irrigation Water in the Wenatchee River Valley of Washington State. *Phytopathology*, 92, 1210-1217.

Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, 2019, 22 (1), 294-301
Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan
ISSN 1311-0489 (Print)
ISSN 2367-8364 (Online)

Устойчивостта към пестициди и интегрираната растителна защита

Милена Димова[1*], Недялка Палагачева[1], Василий Джувинов[2]

[1]Аграрен университет, 4000 Пловдив, България
[2]Институт по овощарство, 4004 Пловдив, България

Pesticide Resistance and Integrated Pest Management

Milena Dimova[1]*, Nedyalka Palagacheva[1], Vassiliy Dzhuvinov[2]

[1]Agricultural university, 4000 Plovdiv, Bulgaria
[2]Fruit Growing Institute, 4004 Plovdiv, Bulgaria
**E-mail: milenad@abv.bg*

Review paper

Received: 06.06.2019 *Accepted:* 13.06.2019 *Published:* 28.06.2019

РЕЗЮМЕ

Масовата употреба на пестициди през последните години доведе до увеличаване на устойчивостта на болестите, неприятелите и плевелите. Първата публикация за устойчивост е преди повече от 100 години. За периода 1914-1946 г. са съобщени още 11 случая за установена устойчивост. Всичко това е резултат от масовото въвеждане на пестицидите в земеделското производство и другите човешки дейности.

Основен подход при управлението на устойчивостта е да се приложи Интегрираната растителна защита, защото тогава е налице мониторинг на вредителите, спазва се икономическия праг на вредност, използват се не пестицидни методи като биологични, агротехнически, санитарни и най-вече растения гостоприемници устойчиви на основни болести и неприятели.

Ключови думи: болести, неприятели, интегрирано производство, фунгициди, инсектициди

SUMMARY

The massive use of pesticides in recent years has led to an increase in the resistance of diseases, pests and weeds.

The first sustainability publication was more than 100 years ago. For the period 1914-1946, an additional 11 cases of sustained resistance were reported. All this is a result of the massive introduction of pesticides into agricultural production and other human activities.

The main approach in sustainability management is to implement Integrated Plant Protection, because then there is pest monitoring, economic harm is observed, no pesticide methods are used, such as organic, agrotechnical, sanitary and, most importantly, host plants resistant to major diseases and pests.

Key words: diseases, pests, integrated production, fungicides, insecticides

През последните две-три десетилетия се наблюдава увеличаване на устойчивостта на болестите, неприятелите и плевелите към използваните срещу тях пестициди. Първата публикация за устойчивост е преди повече от 100 години – Melander (1914). Той е регистрирал устойчивост на калифорнийската щитоносна въшка (*Quadraspidiotus perniciosus* Comstock) към неорганичен инсектицид в щата Вашингтон, САЩ. За периода 1914-1946 г. са съобщени още 11 случая за установена устойчивост.

През 40-те години на миналия век фермерите в САЩ са загубили 7% от реколтата си, а през 80-те и 90-те години тези загуби от проявена устойчивост към пестициди достигат 13 % независимо, че са използвани по-големи количества от тях. Развитието на органичните инсектициди като ДДТ е дало надежда, че тази устойчивост ще бъде преодоляна, но още след 6-7 години употреба през 1947 г. е установена устойчивост при домашната муха, а покъсно ДДТ се е оказал без ефект и при борбата с векторите на маларията в много страни. В средата на 80-те години на 20 век са регистрирани над 500 устойчиви вредителя, докато други автори споменават за около 1000 за периода 1945-2000 г. Всичко това е резултат от масовото въвеждане на пестицидите в земеделското производство и другите човешки дейности (Miller, 2004).

Определение за устойчивостта и причини за появата му

Според IRAC (Insecticide Resistance Action Committee) тази устойчивост е наследствена промяна на чувствителността на популацията на неприятеля, след многократна употреба на даден пестицид като период от години и брой третирания през даден сезон. Устойчивостта към пестицидите се основава на генетически природен феномен, тъй като под натиска на пестицида не всички вредители загиват, защото оживяват индивиди генетически предразположе-

Through the latter two-three decades is observed increasing resilience of diseases, pests and weeds to use against pesticides. The first publication for resistance was more than 100 years ago – Melander (1914). He has registered resistance to San Jose Scale (*Quadraspidiotus perniciosus* Coms.) to an inorganic insecticide in the state of Washington, USA. For the period 1914-1946 have been reported another 11 cases for pesticide resistance.

In the 40s of the last century farmers in the USA have lost 7% of their crop, but in the 80s and 90s these losses of resistance to pesticides reach 13% however, that they are used larger quantities of them.

The development of organic insecticides as DDT has given hope that this resilience will be overcome, but even after 6-7 years of use in 1947 stability was found in house fly, and later DDT has been without effect in the fight against vectors of malaria in many countries.

In the mid-1980s, over 500 persistent pests were recorded, while other authors reported about 1,000 for the period 1945-2000. All this was the result of the massive introduction of pesticides into agricultural production and other human activities (Miller, 2004).

Definition for sustainability reasons for its appearance

According to IRAC (Insecticide Resistance Action Committee) this resistance is hereditary change the sensitivity of the pest population, after multiple use of a pesticide as a period of years and number of treatments during season. Resistance to pesticides is based on a genetically natural phenomenon, because under the pressure of the pesticide not all pests die, because they live on individuals genetically predisposed to develop resistance to the pesticide

ни да развият устойчивост към използвания пестицид.

Много неприятели развиват голям брой поколения за един сезон, което е предпоставка за увеличаване появата на мутации, от които започва бърза експанзия на появилите се устойчиви поколения. При такава ситуация фермерите увеличават дозите и броя на третиранията през сезона и като краен резултат разходите нарастват, а загубите им се увеличават.

Известно е, че много вредители в природата години наред са били подложени на естествени токсини преди да се развие земеделието като индустрия, тъй като не са малко растенията, които произвеждат фитотоксини за да се защитят от вредителите.

Други примери за предизвикана устойчивост

Колорадският бръмбър при картофите е показал устойчивост към 52 различни активни вещества от основните групи инсектициди (Janmaat et al., 2003; Alyokhin et al., 2008.) съобщават, че в оранжериите на Канада е наблюдавана увеличаваща се устойчивост на *Trichoplucia ni* към *Bacillus thuringiensis.*

През 1993-1994 г. във Франция се появяват проблеми в борбата с ябълковия плодов червей (*Cydia pomonella* L.) в основните райони производители на тези плодове, поради установената кръстосана устойчивост при този опасен неприятел към използваните пиретроиди (Note National Spv-INRA 2003).

Широко разпространена е била устойчивостта на ябълковия плодов червей към органофосфати, затова през 2005 и 2006 г са били проведени изследвания в Североизточна Испания в ябълкови градини които са третирали с Азинфос-метил и Карбарил. Резултатът е бил незадоволителен поради ниската смъртност причинена от използваните инсектициди, съответно под 39% и 53% (Rodriguez et al., 2012).

През 2005 г. е проведено

used.

Many pests develop a large number of generations for one season, which is a prerequisite for increasing the occurrence of mutations, from which rapid expansion of emerging sustainable generations begins. In such a situation the farmers increase doses and number of treatments during the season and season. As a result, and their losses are increasing.

It is known, that many pests in nature for years have been subjected to natural toxins before developing agriculture as an industry, because there are not enough plants, which produce phytotoxins to protect them from pests.

Other examples for triggered sustainability

Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say.) in potatoes has shown resistance to 52 different active substances of the main groups of insecticides (Alyokhin et al., 2008; Janmaat et al., 2003) that in the greenhouses of Canada it is observed increasing resistance to cabbage loopers (*Trichoplusia ni* Hübner) to the *Bacillus thuringiensis*.

In 1993-1994 in France problems appear in the fight with apple fruit worm (*Cydia pomonella* L.) in the main areas producing these fruits, due to the established cross-resistance with this dangerous enemy to the used pyrethroids (Note National Spv-INRA, 2003).

Widespread was the resistance of apple fruit worm to organophosphates therefore, in 2005 and 2006 studies have been carried out in Northeast Spain in apple gardens that have been treated with Ainfos-methyl and Carbariil.

The result was unsatisfactory due to the low mortality caused of the insecticides used, respectively, below 39% and 53% (Rodriguez et al., 2012).

In 2005 a study was conducted

проучване за борба с основната болест при ябълката – *Venturia inaequalis* (Cooke) с участието на 4 типа фунгициди – стробилурини, анилинопирамидини, инхибитори на биосинтеза на ергостеролите и комбинация от тях (с участието на 11 активни субстанции). Установена е прогресивно нарастваща устойчивост в различни региони на Франция като Средните Пиринеи, Прованс, Алпите, Лазурен бряг, Лангедок-Русион, Алзас и други, поради появата на генни мутации след многократната употреба на стробилурините (Micoud and Remuson, 2006).

*З*асилената употреба на инсектициди за борба срещу *Mysus persicae* Sulz. в прасковените насаждения в продължение на много години е довела до възникване на популации, които сега са устойчиви към няколко класа инсектициди (Bass et al., 2014). Първите съобщения свързани с този проблем са от 1955 г. Установена е устойчивост към карбамати, органофосфати, пиретроиди и неокотиноиди (IRAC, 2014).

В южните щати на САЩ *Amarantus palmeri* е проявил устойчивост към хербицида глифозат в памуковите плантации, а по-късно устойчивост към този хербицид е установена в полета със соя, царевица, тютюн и ориз. От 2005 г. до 2010 г. са регистрирали устойчивост при 13 различни плевели, а през следващите 4 години са открити още два плевела устойчиви към глифозата (Robert, 2013).

Някои неприятели успешно се адаптират и срещу не химически третирания, каквито са сеитбооборотите. Такъв пример е западния царевичен коренов червей (*Diabrotica virgifera),* който преминава в диапауза, когато след царевицата е засята соя.

Видове придобита устойчивост

От регистрираните устойчивости на неприятелите около половината са проявили устойчивост към две или 5 различни активни вещества, поради

about the primary disease *Venturia inaequalis* (Cooke) with 4 types of fungicides – strobilurins, anilinopyramidines, ergosterol biosynthesis inhibitors and a combination of them (with 11 active substances).

In various regions of France, as Provence, Alps, Lazuren Bryag, Languedoc-Roussillon, Alzas and others have been found to have progressively increasing resistance such as the occurrence of gene mutations following repeated use of strobilurins (Micoud and Remuson, 2006).

Enhanced use of insecticides to combat against *Mysus persicae Sulz*. in peach trees for many years resulting in the emergence of populations that are now resistant to several classes of insecticides (Bass et al., 2014). The first messages related to this problem were from 1955. Resistance to carbamates, organophosphates, pyrethroids and neocotinoids has been established (IRAC, 2014).

In the southern states of the United States, *Amaranthus palme*ri has been resistant to the herbicide glyphosate in cotton plantations, and later resistance to this herbicide is established in fields with soybean, corn, tobacco and rice. From 2005 to 2010 they have registered resistance to 13 different weeds, and for the next 4 years they were discovered two more glyphose-resistant weeds (Robert, 2013).

Some pests successfully adapted and against non-chemical treatments, such as crop rotation. An example is the western corn rootworm (*Diabrotica virgifera*), which goes into diapazon when after maize is sown soy.

Types of sustainability

From registered enemies' resilience about half have been resistant to two or five different active substances, which is why this resistance is cross-linked or

което тази устойчивост бива кръстосана или множествена.

Кръстосана устойчивост – когато един фактор предизвиква устойчивост към повече от един пестицид. Например даден неприятел е показал устойчивост към паратиона, но той същевременно драматично е намалил чувствителността си и към няколко други органофосфати. В случая паратиона се е оказал не ефективен към даден неприятел поради развита устойчивост, тогава и други органофосфати са станали по-малко ефективни при борбата с даден вид. Ключовият момент при тази кръстосана устойчивост е, че единичен генен механизъм е отговорен за тази устойчивост към повече от един пестицид, но тя може да се прояви и към пестицид, който вие никога не сте използвали, т. е. налице е кръстосана устойчивост към отделни групи пестициди като органофосфати и карбамати едновременно.

Множествената устойчивост – тук два устойчиви генни механизма независими един от друг са развили устойчивост към два различни пестицида. Например – даден акар е показал устойчивост към Пликтрана и Келтана, защото за тази устойчивост са отговорни две отделни генетични модификации и устойчивостта на този неприятел към един пестицид не го прави чувствителен към друг.

Придобитата устойчивост може да бъде стабилна и нестабилна при полски условия, в зависимост от многото фактори на околната среда, използваните химикали, агротехническите мероприятия и други.

Управление на устойчивостта към пестициди

Тук трябва да се прояви умереност като не се превишава дозата и не се намалява интервала на третиранията. Трябва да се използват пестициди с по-малка остатъчна активност и да се третира точно определената

multiple.

Cross resistance – when one factor causes resistance to more than one pesticide. For example, an enemy is showing resistance to the parathion, but he dramatically reduced his sensitivity to several other organophosphates.

In this case, the parathion has proved ineffective against an enemy due to its robust stability, and then other organophosphates have become less effective in combating a pest.

The key point in this cross-resistance is that a single gene mechanism is responsible for this resistance to more than one pesticide, but it may also occur to a pesticide, which you have never used, i.e. there is cross-resistance to individual groups of pesticides such as organophosphates and carbamates at the same time.

Multiple resistances – here two persistent gene mechanisms independent of each other have developed resistance to two different pesticides.

For example, a mite has shown resistance to Plctrana and Celtana because they are responsible for this resistance two distinct genetic modifications and the resistance of this pest to a pesticide does not make it sensitive to another.

Acquired resistance may be stable and unstable under field conditions, according to many environmental factors, the chemicals used, agro-technical events and others.

Management Pesticide Resistance

Here must be showed moderation by not exceeding the dose and the treatment interval is not reduced. Pesticides should be used with less residual activity, and to treat the specified area of the orchard where the pest is

площ от овощната градина, където е установен вредителят.

Необходимо е да поддържаме нетретирани площи, за да позволим на полезните насекоми да се размножават и да третираме само при определени периоди от развитието на неприятеля, т. е. когато фирмата производител е посочила кой момент от развитието на неприятеля е най-ефективен дадения пестицид.

Полезна е и множествената атака, когато се прилага ротация на пестицидите и се правят смеси от два или повече пестицида с различни активни вещества. Може да се прилага и насищане чрез използване на химикали синергисти за да се неутрализират метаболитните процеси водещи до поява на устойчивост.

Основен подход при управлението на устойчивостта е да се приложи Интегрираната растителна защита, защото тогава е налице мониторинг на неприятелите, спазва се икономическия праг на вредност, използват се не пестицидни методи като биологични, агротехнически, санитарни и най-вече растения гостоприемници устойчиви на основни болести и неприятели.

Според IOBC – Международната Организация за Биологична Растителна защита – **Интегрираното производство** е икономически рентабилно производство с високо качество, при което се дава приоритет на екологосъобразни методи, за да се намали до минимум страничният негативен ефект от използваните пестициди и се опази околната среда и здравето на хората (Cross and Dickler, 1994; Pelov et al., 1996; Cross et al., 1997).

Кои са основните принципи, норми и правила за приложение на Интегрираната Растителна Защита. За всеки растителен вид и сорт трябва да се избира подходящото месторастене в зависимост от биологичните им изисквания към почва и климат. Семената или посадъчният материал трябва да

established.

We need to keep up untreated areas, to allow for useful insects to multiply and to treat only certain from the development of pests, when the manufacturer is indicating in what the pest develops is the most effective pesticide

Also useful is the multiple attacks, when rotation of pesticides is applied mixtures of two or more pesticides with different active substances are made.

Saturation can also be applied by using chemical synergists to neutralize the metabolic processes leading to resistance.

Basic Approach in sustainability management is to implement Integrated Pest Management, because then it is pest monitoring, the economic threshold of harm, pesticide methods such as biological, agrotechnical, sanitary and sanitary mostly host plants resistant to basic diseases and enemies

According to IOBC – International Organization for Biological Plant Protection – Integrated production is economic profitable high quality production, giving priority to environmentally friendly methods, to minimize the side effect negative effect of the pesticides used; protect the environment and (Cross and Dickler, 1994; Pelov et al., 1996; Cross et al., 1997).

What are the basic principles, norms and application rules for integrated pest management. For each plant species and variety should be chosen the appropriate habitat depending on their biological soil and climate requirements.

Seed or propagation material should be

бъдат чисти, здрави и качествени. Що се отнася до овощния посадъчен материал, той трябва да бъде автентичен и сертифициран, т. е. свободен от вирусни и фитоплазмени болести. Желателно е около градината да се създават условия за насекомоядни птици, паразити и хищни насекоми.

Формировките и резитбите трябва да осигурят добър светлинен и въздушен режим в короната, добро опръскване с растително-защитните препарати, както и добър баланс между растеж и плододаване, за да се осигури редовна и качествена плодова продукция. Междуредията да се затревяват естествено или изкуствено като покосената трева остава за мулчиране и органичен тор, а тревните смески трябва да привличат пчелите за опрашване на овощните дървета и храсти.

Капковото напояване да се комбинира с торенето, т. е. да се прилага фертигация като нуждата от хранителни вещества се определя след периодичен почвен анализ и регулярна листна диагностика. Самото торене се извършва според фенологичните фази от развитието на растенията през сезона. Затревените междуредия помагат да се подобри микроклимата в градината, да не се разрушава почвената структура и да не се образуват коловози след падналите дъждове.

За правилното извеждане на растителната защита помагат малките метеостанции, когато те са оборудвани с програми от типа РИМПРО и други, кога да започне борбата с основните болести при ябълките и крушите или плодовите червеи при семковите и костилковите овощни видове. Те може да се оборудват и със сензори за определяне на почвената влага на определена дълбочина. Феромоновите уловки са подходящи за мониторинг на неприятелите в насаждението, а феромоновите диспенсери ще помогнат в борбата с плодовите червеи, за което ще допринесат и мрежите против градушка.

clean, healthy and quality. As regards the orchard propagation material, it must be authentic and certified, that is, free from viruses and mycoplasmas diseases.

It is desirable to create conditions around the garden for insectivorous birds, parasites and predatory insects.

Formations and pruning have to provide good light and air mode in the crown, good spraying with plant protection products, as well as a good balance between growth and fruiting, to ensure regular and quality fruit production.

Distractions naturally occur or as gravely grass as the mulch and organic fertilizer, and grass mixtures should attract bees for pollination of orchards and shrubs.

Drop irrigation to be combined with fertilization, to apply fertilization as the need for nutrients is determined after periodic soil analysis and regular follicular diagnosis.

The fertilization itself is done according to the phonological phases of plant development during the season. The grass roots help to improve the microclimate in the garden, not to destroy the soil structure not to form tracks after falling rains.

For the correct removal of plant protection, small meteor stations help when they are equipped with RIMPRO programs and others, when to start fighting with major diseases in apples and pears or fruit worms at plow and stone fruit species.

They can also be equipped with sensors to determine soil moisture of a certain depth. Pheromone traps are suitable for monitoring the pests in the plantation, and pheromone dispensers will help fight fruit worms that they will contribute to nets against hail.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. **Alyokhin, A., M. Baker, D. Mota-Sanchez, G. Dively and E. Grafius**, 2008. Colorado Potato Beetle Resistance to Insecticides. *American Journal of Potato Research*, 85: 395-413.
2. **Bass, C., A. M. Puinean, C. T. Zimmer, I. Denholm, L. M. Field, S. P. Foster, O. Gutbrod, R. Nauen, R. Slater and M. S. Williamson**, 2014.The evolution of insecticide resistance in the peach potato aphid, Myzus persicae. *Insect Biochem Mol Biol.*, 2014 Aug, 51: 41-51.
3. **Cross, J. V. and E. Dickler**, 1994. Guidlinesfor Integrated Production of Pome Fruits in Europe, Technical Guidline III, 2-nd Edition, IOBC wprs Bulletin, 17(9), 1-8.
4. **Cross, J. V., C. Malavolta and E. Jorg**, 1997. Guidelines for Integrated Production of Stone Fruits in Europe. Thechnical Guideline, First Edition, IOBC wprs Bulletin, 20 (3),1-9..
5. IRAC, 2018. Major Mechanisms of Insecticide Resistance in Green Peach Aphid *Myzus persicae* Sulzer
6. **Janmaat, Alida F., Myers, Judith**, 2003. Rapid Evolution and the Cost of Resistance to Bacillus Thuringiensis in Greenhouse Populations of Cabbage Loopers, Trichoplusia. In: Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences. 270 (1530), 2263-2270.
7. **Kain, Wendy C., Zhao, Jian-Zhou, Janmaat, Alida F., Myers, Judith, Shelton, Anthony M., Wang, Ping**, 2004. Inheritance of Resistance to Bacillus thuringiensis Cry1Ac Toxin in a Greenhouse-Derived Strain of Cabbage Looper (*Lepidoptera: Noctuidae*). *Journal of Economic Entomology*. 97 (6), 2073-2078.
8. **Micoud, A. and F. Remuson**, 2006. La tavelure de pommier comment gerer les resistances. *Phytoma*, No 590, Fevrier, 2006:20-23.
9. **Miller, G. T.**, 2004, Sustaining the Earth, 6th edition. Thompson Learning, Inc. Pacific Grove, California. Chapter 9, pp. 211-216.
10. Note Nationale Spv – INRA 2003.Carposcapse des pommes et poires-point sur la resistance et preconisations le pommier, Phytoma, No 559, Avril, 2003:36-39.
11. **Pelov, V., R. Angelova, S. Karov, G. Nikolova, M. Borovinova and A. Balinova**, 1996. General Principles, Rules and Standards for the Production of Integrated Apple and Pear Production, Sofia.
12. **Robert, S.**, 2013. What Happens When Weed Killers Stop Killing? *Science*, Vol. 341, 6152: 1329.
13. **Rodrigez, M. A., D. Basch and J. Avilla**, 2012. Azinphos-metil and Carbaril Resistance in Adults of the Codling Moth (*Cidia pomonella* L., *Lepidoptera:Tortricide*) from Northeastern Spain. *Pesticide Biochemistry and Phisiology*, 103: 43-48.