

Agrovoc descriptors: rubus, raspberries, plant diseases, phomopsis, pathogenesis, inoculation, culture media, temperature

Agris category code: H20

COBISS koda 1.01

Karakteristike sojeva *Phomopsis* sp. izolovanih iz izdanaka obolele maline

Momčilo ARSENIJEVIĆ¹

Delo je prispelo 15. marca 2005; sprejeto 15. aprila 2005.

Received: March 15, 2005; accepted April 15, 2005.

IZVOD

Ukazano je na pojavu *Phomopsis* sp. izolovanog iz izdanaka obolele maline. Date su karakteristike razvoja dva soja ove gljive pri gajenju na hranljivoj podlozi. Istaknuto je i njihovo ponašanje pri veštačkoj inokulaciji plodova jabuke i višnje kao i izdanaka kupine u odsustvu maline. Podloge od graška, crnog luka i krompir-glukozna (PDA) pogodan su hranljivi supstrat za razvoj kolonija, stvaranje piknidskih stroma i α i β -piknospora. Temperaturni optimum za porast kolonija i fruktifikaciju parazita je 15°-25° C.

Ključne reči: malina, *Phomopsis* sp., sojevi, gljiva, veštačka inokulacija, hranljiva podloga, temperatura.

IZVLEČEK

KARAKTERISTIKE SOJEV *Phomopsis* sp. IZOLIRANIH IZ POGANJKOV OBOLELE MALINE

Phomopsis sp. je bil izoliran iz poganjkov obolele maline. Ugotovljene so lastnosti dveh sojev gljive, članek poroča o morfoloških lastnostih gljive in kultur. Lastnosti sojev so bile raziskane z umetno okužbo jabolk in češenj, kot tudi poganjkov robide namesto maline. Gojišča z graham, čebulo in krompir-glukozno gojišče (PDA) so primerna za razvoj kolonij, piknidijev ter α in β -piknospor. Temperaturni optimum za rast kolonij in fruktifikaciju parazita je med 15° in 25° C.

Ključne besede: malina, *Phomopsis* sp., soji, umetna inokulacija, gojišče, temperatura.

¹ dipl. ing. agr. dr sci. agr., redovni profesor Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu, 21000 Novi Sad, Trg D. Obradovića 8, Srbija i Crna Gora, e-mail: marsa@neobee.net

Delo je objavljeno v sklopu proslav 75 letnice akademika prof. ddr. Jožeta Mačka. Rad je pripravljen povodom obeležavanja 75 godišnjice života akademika red. prof. ddr. Jože Mačka.

ABSTRACT

CHARACTERISTICS OF THE *Phomopsis* sp. STRAINS ISOLATED FROM RASPBERRY CANES DISEASED

The fungus *Phomopsis* sp. originating from raspberry canes diseased was isolated and its two strains (Ph-18 and Ph-19) were studied. Their morphological and cultural properties are given in this paper. The pathogenicity of the strains investigated were proved by the artificial inoculation of apple and cherry fruits, as well as using blackberry instead raspberry canes (Figs. 1-10). Pea grain agar, onion and PDA were suitable nutrient source for colony development and the pycnidial stromata and α and β -pycnidiospores production. The temperature optimum for colony growth and pathogen fructification ranged between 15°-25°C.

Key words: raspberry, *Phomopsis* sp., strains, artificial inoculation, nutrient media, temperature.

1 UVOD

Tokom devedesetih godina minulog veka, u vreme sve češće i intezivnije pojave sušenja izdanaka maline u zapadnoj Srbiji, uzrokovanog, do tada, prvenstveno gljivom *Didymella applanata*, pojavile su se i indicije o mogućem prisustvu i drugih parazita, koji bi mogli učestvovati u genezi izumiranja maline, kao što su: *Verticillium dahliae*, *V. albo-atrum*, *Coniothyrium fuckelii*, *Fusarium* sp., *Pythium* sp., *Rhizoctonia* sp. i druge gljive (Ranković i Garić, 1996; Ranković et al., 1999; Ivanović et al., 1999 i dr.), pa i one iz roda *Phytophthora* (Koprivica, M. et al., 2002).

Kao što je i poznato, ispostavilo se da je *Phytophthora fragariae* var. *rubi*, za sada, najčešći i ekonomski najznačajniji parazit maline u Srbiji (Koprivica, M. et al., 2004).

Ne ulazeći u detalje i trenutnu situaciju u vezi pojave fitofloroznog izumiranja maline, na terenu u Srbiji, zadržali bismo se na jednom interesantnom i neobičnom slučaju pojave i izolovanja *Phomopsis* sp. iz obolelih izdanaka maline. Tim pre jer, koliko nam je poznato, ova gljiva nije privlačila veću pažnju istraživača kod nas, niti je eksperimentalno proučavana kao parazit maline, pa bi svaka informacija o tome od koristi bila. Ovo pogotovu i stoga što su *Phomopsis* spp. česti i značajni paraziti izdanaka kupine u Republici Srbiji (Muntanola-Cvetković, M. i Borić, 1985; Arsenijević, 2005).

2 MATERIJAL I METODE

2.1 Izolovanje parazita

Postavljanjem sitnijih čestica nekrotičnog tkiva u Petri kutije na podlogu od krompira s lakoćom su dobijene čiste kulture, skoro 100% uspeha. Potrebno je bilo samo odstraniti površinski deo obolelog izdanka, sterilnim skalpelom odseći nekrotično tkivo 10-ak mm dužine a onda ga poprečno sitnije iseći na sterilnom filter papiru u sterilnom pipetom (na plamenu napaljenom) postaviti na podlogu. Presejavanjem sitnijih čestica mlađih, još nespojenih kolonija, na kosu podlogu dobijeno je više izolata od kojih su detaljnije proučena dva: Ph-18 i Ph-19.

2.2 Provera patogenosti dobijenih izolata

Koristili smo plodove jabuke i višnje kao i izdanke kupine u odsustvu izdanaka maline. Sitniji fragmenti kolonija, zajedno s podlogom, naneti su na otvore prethodno povređenog tkiva ploda a potom su navlaženi prskanjem. Kontrolni plodovi su istim postupkom tretirani ali bez nanošenja čestica kolonija gljive. Svi su postavljeni u vlažne komore i tu održavani 2-3 dana a onda su preneti na laboratorijske stolove. Pre i posle inokulacije, korišćeni plodovi postavljeni su na izdubljeni deo poklopca Petri kutija radi lakše manipulacije.

Pri inokulaciji izdanaka kupine u laboratoriji vršen je uzdužni zarez dužine 2-3 cm ispod kog je postavljen deo kolonije gljive s podlogom. A onda je inokulisano mesto, obimom izdanaka, obavijeno vlažnom vatom a preko nje i staniol papirom radi održavanja potrebne vlažnosti. Kontrolni izdanci podvrgnuti su istom postupku ali bez nanošenja kolonija gljive.

Svi korišćeni izdanci održavani su u plastičnim sudovima (kadama) sa sterilnim navlaženim peskom, čiji je donji kraj poboden u pesak. Inokulisani izdanci s posudama održavani su u klima-komori pri 15° C i 70% relativne vlažnosti tokom 11 dana a onda pri temperaturi od 20° C (deset dana) kada su posude sa izdancima iznete iz klima-komore u okućnicu Fakulteta gde su održavani šest dana.

Ovim postupkom promene temperaturnih uslova želeli smo da umanjimo vitalnost biljnog tkiva kako bi ga gljiva što lakše naselila i u njemu se razvila a time i simptome bolesti reprodukovali.

2.3 Hranljive podloge

Da bismo sagledali dejstvo hranljivog supstrata na razvoj izolata Ph-18 i Ph-19 poreklom s maline i stimulisali eventualni razvoj teleomorfa, koristili smo podloge pripremljene od zrnevlja graška (GR), lukovica crnog luka (L) i krtola krompira – PDA (KR). U Petri kutije, na centar razlivene podloge, nanošene su čestice kolonija gljive. Tako zasejane podloge s Petri kutijama održavane su u termostatu pri 25° C s povremenim pregledom tokom 40 dana razvoja. Tada je analiziran izgled kolonija, pojava piknidskih struktura i stvaranje α i β -piknospora.

2.4 Temperatura

Uticaj temperature na razvoj *Phomopsis* sp. proučena je korišćenjem izolata Ph-18. Zasejane podloge od krompira (PDA) 7 pH vrednosti, po tri ponavljanja za svaku temperaturu, održavane su u politermostatu duže vreme. Opet u cilju praćenja karakteristika razvoja gljive, njenih kolonija i reproduktivnih struktura – izgleda kolonija, formiranje piknidskih stroma i α i β -piknospora, kao i eventualnog stvaranja teleomorfa. Sve to pri raznim vrednostima temperature (5°, 10°, 15°, 20°, 30° i 35° C) i tako odredila ona pri kojoj se parazit i u prirodi, možda, najbolje razvija. Konačna ocena o svemu tome doneta je i ovde posle 40 dana razvoja kolonija.

3 REZULTATI

3.1 Pojava, rasprostranjenost, značaj i simptomi bolesti

Oboleli izdanci maline potiču iz okoline Šapca sakupljeni tokom proleća 1990. godine pri zdravstvenom pregledu zasada kupine. Jer, sušenje izdanaka obe ove vrste privlačilo je pažnju na terenu, najviše zbog izbeljavanja njihove kore – simptomatološkog znaka karakterističnog za prisustvo parazita *Didymella applanata* (Arsenijević, 2005a).

Međutim, mikroskopiranjem nekrotične kore pri detaljnijem pregledu obolelih izdanaka maline, uočeni su piknidi i piknospore tipične za predstavnike roda *Phomopsis* (sl. 3 i 4). To nas je i pobudilo da preduzmemo izolovanje gljive i proučimo neke njene osnovne odlike.

Rasprostranjenost parazita nismo pratili jer su uzroci dopremani samo iz napred spomenutih lokaliteta okoline Šapca prema Loznici.

S obzirom na to da je naša pažnja tada prvenstveno bila usredsređena na zdravstveno stanje kupine, gajene na ovom području (Arsenijević, 2005a), ekonomski značaj *Phomopsis* sp., o kome je reč, kao parazitu maline nismo pratili. Jer, izolovanje gljive vršili smo samo u nekoliko navrata iz nekrotične kore izbeljenih izdanaka sa simptomima sušenja pokoričnog tkiva i izumiranja njegovih dubljih slojeva.

3.2 Karakteristike razvoja gljive *in vitro*

Već posle 2-3 dana od zasejavanja nekrotičnih čestica na podlogu uočava se razvoj sivkastih kolonija koje se relativno brzo povećavaju, šireći se i spajajući, kad prekrivaju celu površinu podloge u Petri kutiji (sl. 1 i 2). Kasnije, zapaža se i stvaranje sitnijih telašaca tipa stromatičnih tvorevina, odnosno piknidskih stroma a ubrzo i pojava kapi svetložućkastog eksudata sastavljenog od α i β -piknospora parazita (sl. 1 i 2).

3.3 Patogenost

Ovi su ogledi pokazali da oba korišćena izolata (Ph-18 i Ph-19) *Phomopsis* sp. prouzrokuju nekrotične promene, kako na plodovima jabuke i višnje tako i na inokulisanim izdancima kupine (sl. 5). Kontrolni tretmani, u svim slučajevima, bili su bez promena. Reizolacijom na hranljivoj podlozi razvile su se sivkaste kolonije gljive, stromatične tvorevine, odnosno piknidske strukture i α i β -piknospore. Dakle, isti razvoj kao i pri izolovanju parazita (sl. 2 i 6).

3.4 Uticaj hranljive podloge

Ispostavilo se da su hranljive podloge imale uticaja na razvoj gljive i izgled formiranih kolonija kao i na intenzitet pojave stromatičnih struktura i fruktifikaciju parazita. Tako je na podlozi od graška struktura kolonija izolata Ph-19 bila nešto drugačija od izolata Ph-18 koji se izrazito koncentrično razvijao a intenzitet stvaranja stromatičnih tvorevina izolata Ph-19 bio je nešto jači (sl. 7).

Pri razvoju na podlozi od crnog luka uočene su takođe izvesne razlike: izolat Ph-19 imao je svetlije kolonije, slabiju fruktifikaciju i stromatične strukture većeg obima, dok je izolat Ph-18 stvarao tamnije kolonije s mnoštvom stromatičnih tvorevina (sl. 8).

I na podlozi od krompira izolati Ph-18 i Ph-19 nejednako se razvijaju: izolat Ph-18 ima skoro crne kolonije s „kožastom“ strukturom stromatičnih tvorevina a izolat Ph-19 stvara sive kolonije s drugačijim stromatičnim tvorevinama (sl. 9).

Međutim, prilikom binookularnog i mikroskopskog pregleda svih kolonija, izvršenog posle 40 dana razvoja ni u jednom slučaju stvaranja teleomorfa nije utvrđeno. Sličan

razvoj ispoljili su i drugi izolati *Phomopsis* spp. poreklom s raznih vrsta voćaka (Arsenijević et al., 1992).

Bez specijaliste, užeg taksonomiste, dobrog poznavaoa vrste roda *Phomopsis* i dodatnih istraživanja, teško je suditi o tome da li su ove ispoljene razlike izolata Ph-18 i Ph-19, uočene pri razvoju na hranljivoj podlozi „*in vitro*“, na nivou soja ili vrste parazita. To je i bio razlog što smo pručavanu gljivu označili samo kao *Phomopsis* sp. što nam je i D. Punithalingam iz Engleske (International Mycological Institute, Surrey, UK) potvrdio identifikujući naš soj Ph-19 (IMI 367152) samo do roda, odnosno vrste (sp.), ali ne i do njenog punog naziva.

3.5 Dejstvo temperature

Ispostavilo se da se *Phomopsis* sp. razvija i fruktificira u jednom širem temperaturnom intervalu od 5° – 30° C (sl. 10). Optimalna temperatura je u granicama od 15° – 25° C. Pri 35° C razvoja nema, a pri 5° C porast kolonije je slab i usporen, mada (dosta kasnije) i pri ovoj temperaturi kolonije prekrivaju celu površinu podloge u Petri kutiji prečnika 9 cm. (sl. 10). Međutim, i ovde, kao i kod razvoja na raznim podlogama, stvaranje teleomorfa ni posle 40 dana razvoja kolonija nije uočeno (sl. 10).

4 DISKUSIJA I ZAKLJUČAK

Vrste roda *Phomopsis* izolovane su u Srbiji iz raznih vrsta obolelih voćaka. Njihovo prisustvo utvrđeno je na breskvi, kajsiji, višnji, jabuci, orahu, kupini i drugim (Arsenijević, 2005a, b).

Još davnih sedamdesetih godina minulog veka dobijeni su izolati ove gljive iz nekrotičnog ksilema i rak-rana breskve (Irig u Sremu; Arsenijević, neobjavljeni podaci; ex: Arsenijević et al., 1992). A, onda su razni sojevi izolovani i iz obolelih grana kajsije (Garić i Arsenijević, 1990), sa sasušenih grana oraha (Arsenijević, 1980; ex: Muntanola-Cvetković, M. et al., 1981), obolelih plodova višnje (Petrov, M., neobjavljeni podaci; ex: Arsenijević et al., 1992) i s natrulih plodova jabuke (Arsenijević et al., 1996), iz nekrotičnog tkiva plodova u matičnjaku jabuke (Arsenijević et al., 1998), s nekrotičnih izdanaka obolele kupine (Muntanola-Cvetković, M. i Borić, 1985; Arsenijević, 2005a, b) i iz obolelog debla mladih voćaka jabuke (Balaž, J. et al., 2001).

Sudeći prema ovim rezultatima proizilazi da su populacije *Phomopsis* spp. rasprostranjene u Srbiji i da postoje na raznim vrstama voćaka. Zbog toga bi im u daljim istraživanjima trebalo posvetiti veću pažnju. I to iz više razloga: nedovoljno su proučene u nas, ne poznajemo im ni stvarnu agresivnost i virulentnost u odnosu na njihove domaćine, pitanje prisutnih vrsta i njihove identifikacije kao parazita pojedinih domaćina među voćkama ostalo je i dalje otvoreno, a svi su izgledi da su razne vrste prisutne (Arsenijević, 2005a, b), spektar njihovih domaćina takođe je kod nas nepoznat i dr.

Otuda ovaj nalaz *Phomopsis* sp., kao parazita maline, samo potvrđuje gore navedene činjenice i ukazuje na potrebu daljeg, što iscrpnijeg proučavanja i poznavanja ove grupe parazita i utvrđivanja njihovog ekonomskog značaja za pojedine domaćine radi preduzimanja odgovarajućih mera suzbijanja, kad se i ako se za to ukaže potreba.

Svi su izgledi da je populacija *Phomopsis* spp. poreklom s obolele maline heterogena i da se ne sastoji samo od jedne vrste. To je slučaj u Srbiji i kad su u pitanju *Phomopsis* spp. kao paraziti i drugih voćaka: gajene i divlje kupine, oraha i dr. (Arsenijević, 2005a, b; Filipović, M. i Arsenijević, 2005). Identifikaciju naših sojeva kao *Phomopsis* sp. (IMI 367152 – Ph-19.) i kao *Apioporthes vepris* (Delacr.) Wehm. (*Phomopsis*) IMI 368214 (Ma-23) poreklom s maline, kako smo to unapred i istakli izvršio je Dr E. Punithalingam (D 149/95YY1, H360/95/YY1, Bakeham Lane, Egham, Surrey TW20 9TY, UK, Biosystematic Services), na čemu mu i ovom prilikom srdačno zahvaljujemo.

5 LITERATURA

- Arsenijević, M. (2005a): Vrste gljiva – uzročnici nekroze izdanaka gajene i divlje kupine – proučavane na Poljoprivrednom fakultetu u Novom Sadu. I *Septocytia ruborum*, *Gnomonia rostellata*, *Phomopsis* spp., *Didymella applanata*. Biljni lekar, Novi Sad (u štampi).
- Arsenijević, M. (2005b): O vrstama rodova *Diaporthe* i *Phomopsis* parazitima voćaka i vinove loze. Mycologia Montenegrina, Podgorica (predato redakciji časopisa marta 2005).
- Arsenijević, M., Jančurić, J., Trkulja, V., Gavrilović, V. (1996): Mikoflora uskladištenih plodova jabuke. X kongres voćara Jugoslavije, Čačak, 28. oktobar – 1. novembar 1996. Jugoslovensko naučno voćarsko društvo, Čačak. Uvodni referat i abstrakti: 217.
- Arsenijević, M., Špica Gorica, Petrov Marija, Stojšin Vera (1992): Karakteristike nekih sojeva *Phomopsis* spp. poreklom sa voćaka. Jugoslovenski simpozijum o zaštiti bilja. Zbornik rezimea:39/32, Vrnjačka Banja, 1-5. decembar 1992 g. Društvo za zaštitu bilja Srbije.
- Arsenijević, M., Veselić, M., Purar Božana (1998): Uvelost i izumiranje podloge u matičnjaku jabuke, Biljni lekar 2:163-166, Novi Sad.
- Balaž Jelica (2001): Pojava sušenja prizemnog dela stabla jabuke. XXII seminar iz zaštite bilja Vojvodine. Poljoprivredni fakultet, Novi Sad, 7-8. februar 2001. godine (iz programa Seminara).
- Filipović Milanka, Arsenijević, M. (2005): Karakteristike sojeva *Phomopsis juglandina* (Sacc.) Höhn, izolovanih iz obolelih grana oraha (*Juglans regia* L.). Mycologia Montenegrina Vol. VIII, Podgorica (predato redakciji časopisa februara 2005).
- Garić, R., Arsenijević, M. (1990): *Phomopsis* – uzročnik nove bolesti kajsije. Zaštita bilja 193:269-274, Beograd.
- Ivanović, M., Petanović Radmila, Milenković, S. (1999): Aktuelni problemi zaštite maline i kupine. IV jugoslovensko savetovanje o zaštiti bilja, Zlatibor, 6-10. decembar 1999. godine (12):32-33.
- Koprivica Mirjana, Milenković, S., Milijašević Svetlana, Gavrilović, V. (2002): Nove bolesti maline i manje poznate interakcije štetočina i patogena maline. XII seminar o zaštiti

bilja i Savetovanje o primeni pesticida. Zlatibor, 25-29. novembar 2002. godine. Društvo za zaštitu bilja Srbije, Beograd. Zbornik rezimea: 56.

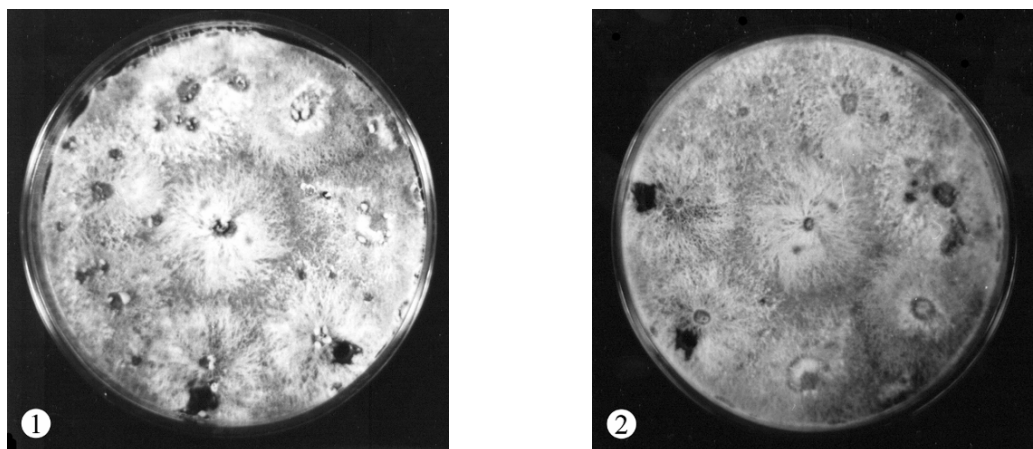
Koprivica Mirjana, Miletić, N., Sretenović, D., Milenković, S. (2004): Ispitivanja efikasnosti fungicida u suzbijanju *Phytophthora fragariae* var. *rubi*. X kongres o zaštiti bilja, Zlatibor, 22-26. novembar 2004. godine (5,23):352-355.

Muntanola-Cvetković, Maria, Borić, B. (1985): *Phomopsis*- uzročnik nove bolesti pitome kupine u Jugoslaviji. Zaštita bilja 173:325-334, Beograd.

Ranković, M., Garić, R. (1996): Bolesti maline. Biljni lekar 2:114-120, Novi Sad.

Ranković, M., Marković-Dulić Ivana, Jovanović, T. (1999): Proučavanje uzroka sušenja izdanaka maline. Četvrto jugoslovensko savetovanje o zaštiti bilja, Zlatibor. Društvo za zaštitu bilja Srbije, Beograd. Zbornik radova 41:95.

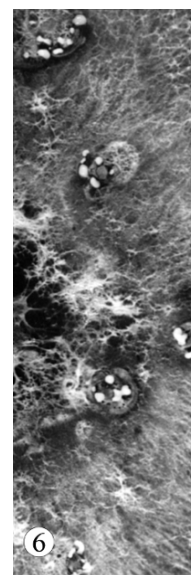
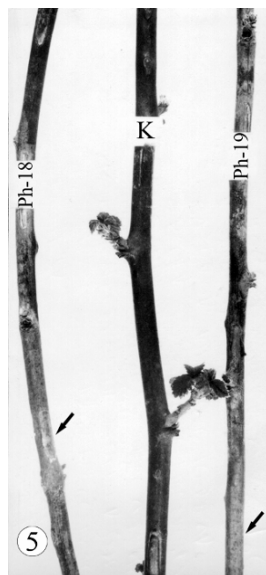
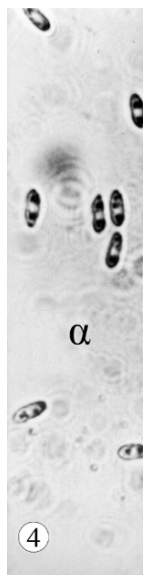
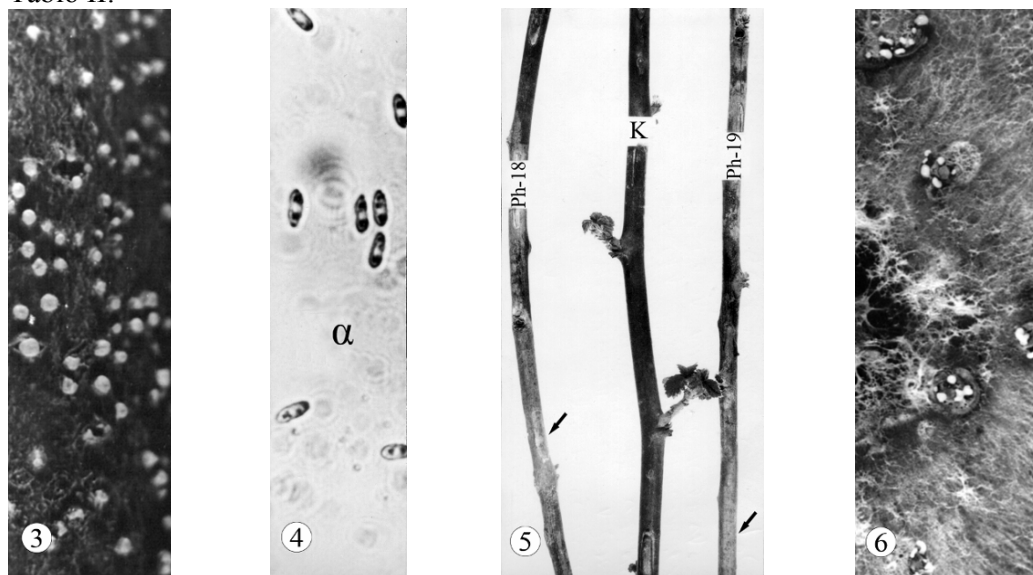
Tablo I:



TABLO I: *Phomopsis* sp.: sl. 1. – izgled nešto starijih beličastosivkastih kolonija i stvaranje crnih piknidskih struktura sa α i β -piknosporama, oslobođenih u vidu svetlijih kapi eksudata, pri izolovanju gljive; sl. 2. – razvoj mladih kolonija pri reizolovanju parazita (Orig.).

TABLEAU I: *Phomopsis* sp.: Fig. 1 – View of older whittegreyish colony and black pycnidial stromata with α and β -pycnidiospores production oozing aut occured as light drops exudate after fungus isolation; Fig. 2 – young colony development after pathogen reisolation (Orig.).

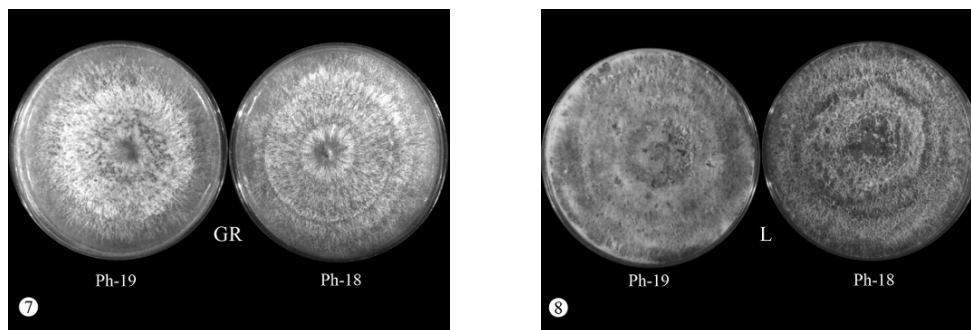
Tablo II:



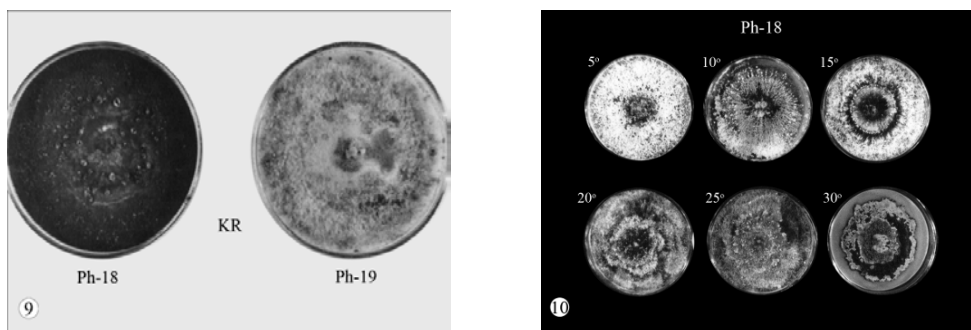
TABLO II: *Phomopsis* sp.: sl. 3. – piknidi formirani na nekrotičnom tkivu prirodno obolelog izdanka maline; sl. 4. – α -piknospori; sl. 5. – nekroza tkiva i izbeljivanje kore na mestima veštački inokulisanih izdanaka kupine izolatima Ph-18 i Ph-19 i kontrola (K) u sredini, uočiti razvoj pupoljaka; koji izostaje na inokulisanim izdancima; sl. 6. – stvaranje crnih piknidskih struktura i isticanje kapi eksudata sa α i β -piknosporama (detalj) na podlozi pri reizolovanju gljive (Orig.).

TABLEAU II: *Phomopsis* sp.: Fig. 3 – pycnidia formation on naturally infected raspberry cane; Fig. 4 – α -pycnidiospores; Fig. 5 – tissue necrosis and bark bleaching at the places of blackberry canes artificially inoculated with isolate Ph-18 and Ph-19 respectively, control is in the middle marked with K, notice the buds development; wich absence on canes inoculated< Fig. 6 – black pycnidial stromata production and exudate drops oozing out with α and β -pycnidiospores (detail) on the medium after fungus reisolation (Orig.)

Tablo III:



Tablo IV:



TABLO III: *Phomopsis* sp.: sl. 7. – izgled kolonija i sitnih piknidskih struktura izolata Ph-19 i Ph-18 na podlozi od graška (GR); sl. 8. – razvoj kolonija i piknidskih struktura na podlozi (L) od crnog luka (Orig.).

TABLEAU III: *Phomopsis* sp.: Fig. 7 – colony and small pycnidial stromata view of isolates Ph-18 and Ph-19 on pea grain agar (GR); Fig. 8 – colony development and pycnidial stromata production on onion agar (L) (Orig.)

TABLO IV: *Phomopsis* sp.: sl. 9. – razvoj kolonija i piknidskih struktura na krompir-glukoznoj podlozi (KR) (uočiti kožasti izgled piknidskih struktura izolata Ph-18 u poređenju sa Ph-19); sl. 10. – izgled kolonija i piknidskih struktura izolata Ph-18, posle 40 dana razvoja pri raznim temperaturama: gore, s leva na desno: 5°, 10°, 15°; dole, s leva na desno: 20°, 25° i 30° C (Orig.).

TABLEAN IV: *Phomopsis* sp.: Fig. 9 – colony and pycnidial structures development on PDA (KR) (notice leadery pycnidial stromate comparing with isolate of Ph-19); Fig. 10 – colony and pycnidial structures view of isolate Ph-18 after 40 day of the fungus growth at various temperatures: above, from left to right: 5°, 10°, 15°; down, from left to right: 20°, 25° i 30°C (Orig.).