

UTICAJ PH VREDNOSTI PODLOGE I SVETLOSTI NA RAST I SPORULISANJE KOLONIJA *VENTURIA INAEQUALIS*

GORAN ALEKSIC¹, SAŠA STOJANOVIĆ¹, MIRA STAROVIĆ¹, SLOBODAN KUZMANOVIĆ¹,
NENAD DOLOVAC¹, TATJANA POPOVIĆ²

¹ Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Beograd

² „EDUCONS“, Sremska Kamenica

Uticaj pH podloge i difuzne i veštačke svetlosti na porast i sporulaciju *Venturia inaequalis* ispitivan je *in vitro*. Optimalna pH vrednost za porast kolonija je pH 5,9 a na pH 8,0 utvrđena je najintenzivnija sporulacija patogena. Kiselost podloge utiče i na morfološki izgled kolonija.

Svetlost stimulatивно deluje na porast i sporulaciju patogena u odnosu na tamu, ali između veštačke i difuzne svetlosti i dužine trajanja osvetljenja nema zakonitosti.

Ključne reči: *Venturia inaequalis*, pH vrednost podloge, svetlost, razvoj kolonija, intenzitet sporulacije.

UVOD

Proučavanje pojave smanjene osetljivosti patogena prema upotrebljavanim fungicidima je proces od izuzetne važnosti u uslovima sve intenzivnije zaštite poljoprivrednih kultura. Jedan od najznačajnijih patogena jabuke kao najintenzivnije gajene voćarske kulture, koji može izazvati ogromne štete na ovoj biljnoj vrsti, je *Venturia inaequalis* (Cooke) Winter, prouzrokovatelj čađave krastavosti ploda (Ivanović, 1992). Prema ovom patogenu sprovode se veoma intenzivne mere hemijske zaštite u cilju smanjenja šteta koje može izazvati u proizvodnji plodova ove voćne vrste. Ovakav pristup suzbijanju prouzrokovatelja čađave krastavosti jabuke rezultirao je pojavom smanjenje osetljivosti patogena prema upotrebljavanim fungicidima. U cilju proučavanja ove pojave u laboratorijskom

uslovima veoma je važno pored optimalne temperature i najpovoljnije podloge (Aleksić i sar. 2005; Borić i sar., 1994) utvrditi i optimalnu pH vrednost podloge i uticaj svetlosti radi jednostavnijeg i efikasnog gajenja i proizvodnje inokuluma patogeni u uslovima *in vitro*.

MATERIJAL I METODE

Uticaj pH vrednosti podloge

Ispitivanje uticaja pH vrednosti podloge na porast i morfološke odlike kolonija gljive, vršeno je na čvrstoj hranljivoj podlozi od slada, dok je za utvrđivanje intenziteta sporulacije korišćena i ista kosa podloga u epruvetama. Vrednosti pH regulisane su metodom pH-metrijske titracije, dodavanjem hranljivoj podlozi 0,1 N HCl ili 0,1 N NaOH. Po završenoj sterilizaciji podloge, univerzalnim papir indikatorom (Advantec), vršeno je merenje novonastalih vrednosti na očvrslim podlogama, i tako izmerene vrednosti uzimane su za konačne tokom ispitivanja. One su iznosile: 3,0; 4,0; 4,5; 5,1; 5,9; 7,0; 8,0 i 9,0. Podloga sa pH 3,0 i 4,0 očvrsla je tek sa povećanim dodatkom agara i smanjenjem perioda sterilizacije sa 15 na 7 minuta, dok su podloge sa pH vrednostima 8,0; 9,0 i 10,0 posle sterilizacije uvek, ponovo imale pH vrednost 7,0. Da bi se održale pH vrednosti na nivou 7,0; 8,0 i 9,0 odustalo se od sterilisanja podloge u autoklavu, pa je sterilizacija vršena samo iskuvavanjem podloge u zatvorenim epruvetama u trajanju od 15 minuta. Podloga sa pH 10,0 je i posle sterilizacije otkuvavanjem ponovo imala pH vrednost 9,0 pa je to i ostala zadnja vrednost u skali pH vrednosti ogloda.

Hranljive podloge su zasejavane fragmentom vazdušnog dela kolonije *V. inaequalis* koja potiče od monosporne kulture sa podloge od slada (Korhonen and Hintikka, 1980) i ostavljene su 6 nedelja u tami pri temperaturi od 20°C. Razvoj kolonija meren je svakih 7 dana (merjenjem njihovog prečnika – najvećeg i najmanjeg), dok je za konačan porast uzet prečnik izmeren 42. dana od zasejavanja podloga (Borić, 1985 a, b, c). U tom vremenskom periodu utvrđivan je početak razvoja kolonije, praćeno je i obrazovanje reproduktivnih organa putem svakodnevnih pregleda kolonija i utvrđen intenzitet sporulacije odnosno gustina spora u 1 ml suspenzije (Aleksić i sar., 2005). Ogled je postavljen u 5 ponavljanja. Za ispitivanje je korišćen izolat iz Leskovca.

Uticaj svetlosti

Ispitivanje uticaja svetlosti vršeno je na čvrstoj hranljivoj podlozi od slada (u Petri kutijama prečnika 6 cm) pri temperaturi od 20°C. Kolonije su izlagane

uticaju veštačke i difuzne svetlosti u tarjanju od 8, 16, 24, 48 i 72 sata, a ukupan razvoj kolonija je trajao šest nedelja. Kontrolne kulture su držane u tami. Vrednosti intenziteta veštačke i difuzne svetlosti utvrđivane su luks-metrom.

Intenzitet svetlosti meren je luks-metrom u intervalima od 15 minuta, a po završenom ogledu izračunat je prosečan intenzitet osvetljenosti tokom izlaganja kolonija. Kulture koje su izlagane svetlosti, kao i one u marku, bile su pod približno istim uslovima temperature.

Intenzitet sporulacije, odnosno gustina spora u 1 ml suspenzije utvrđivana je posle 30 dana od zasejavanja podloga pomoću hemocitometra (Aleksić i sar., 2005).

Hranljive podloge su pojedinačno zasejavane fragmentom vazdušnog dela kolonije *V. inaequalis*, koji potiču od monosporne kulture sa podloge od slada. Oglad je postavljen u 5 ponavljanja.

REZULTATI

Dejstvo pH podloge na porast kolonija i sporulaciju *V. inaequalis*

Najveći porast kolonija je na slabo kiseloj podlozi (pH 5,9) (tabela 1). Međutim, i na umereno kiseloj (pH 5,1), kao i na neutralnoj (pH 7,0) podlozi, a takođe i na slabo baznoj (pH 8,0) i umereno baznoj (pH 9,0), patogen se dobro razvija, mada je na ovim podlogama ukupan porast kolonija vidno manji nego na slabo kiseloj podlozi (pH 5,9). Najmanji porast kolonija je na podlozi sa pH 9,0.

Kiselost podloge ima uticaja i na morfološke odlike kolonija *V. inaequalis*. Na nižim (pH 5,1 i 5,9), kao i na višim pH vrednostima podloge (pH 8,0 i 9,0), kolonije su tamno maslinaste boje bez vidljivo izraženog prstena po obodu. Na neutralnoj pH vrednosti, središnji deo kolonija ima svetlomaslinastu boju i rub tamnije nijanse. Kolonije na svim pH vrednostima su skoro pravilno kružnog oblika sa difuznom ivicom.

Tabela 1 – Uticaj različitih pH vrednosti podloge na porast kolonija *V. inaequalis*

Table 1 – Effect of medium pH on colony growth of *V. inaequalis*

| pH podloge ^a | Početak razvoja kolonije (h) | Porast (mm) ^b | Dnevni porast kolonija (mm) |
|-------------------------|------------------------------|--------------------------|-----------------------------|
| Medium pH | Start of colony growth (hr) | Growth (mm) | Daily colony growth (mm) |
| 3,0 | - ^c | - | - |
| 4,0 | - | - | - |
| 4,5 | - | - | - |
| 5,1 | 48 | 33,1 b ^d | 0,79 |
| 5,9 | 48 | 36,6 a | 0,87 |
| 7,0 | 48 | 33,4 b | 0,80 |
| 8,0 | 48 | 33,1 b | 0,79 |
| 9,0 | 48 | 31,9 b | 0,76 |

a Podloga od slada je podešana dodavanjem 0,1 N HCl ili 0,1 N NaOH na pH nakon sterilizacije na 3,0, 4,0, 4,5, 5,1, 5,9, 7,0, 8,0 i 9,0. – Malt extract agar was adjusted by 0,1 N HCl or 0,1 N NaOH to pH 3,0, 4,0, 4,5, 5,1, 5,9, 7,0, 8,0 and 9,0.

b Porast kolonija držanih u mraku pri 20°C meren nakon 6 nedelja. Podaci predstavljau proseke pet ponavljanja. – Colony growth at 20°C in darknes after 6 weeks

c Nema porasta – No colony growth

d Vrednosti u koloni obeležene istim slovom nisu statistički značajne na osnovu Dankanovog testa (P005) – Data in column marked with the same letter are not different signicantly accordin Dunncan's multiple range test (P005)

Intenzitet sporulacije kolonija *V. inaequalis* takođe zavisi od kiselosti podloge. Najbolje sporulišu kulture na podlozi sa pH vrednošću 8. Na ostalim pH vrednostima intenzitet sporulacije kolonija je znatno slabiji. Kolonije na podlogama sa pH vrednošću 5,9 i 7,0 imaju u proseku skoro 3 puta slabiju sporulaciju nego one na podlozi sa pH vrednošću 8,0. Najslabiju sporulaciju imaju kolonije koje se razvijaju na podlozi sa pH vrednošću 9,0. (tabela 2)

Tabela 2 – Uticaj različitih pH vrednosti podloge na sporulaciju *V. inaequalis***Table 2** – Effect of medium pH on sporulation of *V. inaequalis*

| pH podloge ^a | Br. konidija po mm ² | Gustina konidija u 1 ml (x 10 ⁴) |
|-------------------------|----------------------------------|---|
| Medium pH | No og conidia on mm ² | Conidial density in 1 ml (x 10 ⁴) |
| 3,0 | - | - |
| 4,0 | - | - |
| 4,5 | - | - |
| 5,1 | - | - |
| 5,9 | 8,81 | 44 062,5 |
| 7,0 | 7,56 | 37 812,5 |
| 8,0 | 27,31 | 136 562,5 |
| 9,0 | 4,44 | 22 187,5 |

Uticaj svetlosti na razvoj i sporulaciju patogena

U ispitivanjima uticaja svetlosti, čiste kulture *V. inaequalis*, uzgajane na podlozi od slada, izlagane su dejstvu veštačke i difuzne svetlosti i držane u tami. Kolonije *V. inaequalis* ispitivane tokom ovog oglada, izložene su približno istim uslovima temperature. Vrednosti intenziteta difuznog osvetljenja bile su od 220 do 940 lux-a (u proseku 638 luxa), a intenzitet veštačke svetlostio iznosio je 940 luksa.

Uslovi osvetljenja ne utiču značajno na početak razvoja micelije. Utvrđeno je da je kod svih tretmana micelija počela da se razvija posle 24 časa od zasejavanja podloga. Poredeći ukupan porast kolonija gljive pri različitim uslovima osvetljenja, uočava se da su najmanji porast imale kolonije gajene u tami (39,8 mm), dok su kolonije izlagane uticaju svetlosti imale veći porast (tabela 3). I pored toga, na osnovu dobijenih rezultata ne može se sa sigurnošću tvrditi koji uslovi osvetljenja i dužina ekspozicije stimulatивно deluju na porast kolonija, jer su razlike među tretmanima minimalne, a statističko poređenje podataka ukazuje na nepostojanje funkcionalne zavisnosti među njima. Međutim, generalno se može zaključiti da svetlost stimuliše razvoj micelije u odnosu na tamu, što se može videti i iz rezultata statističkog poređenja podataka.

Različiti uslovi osvetljenja nisu značajnije uticali na izgled, boju i strukturu kolonija *V. inaequalis*. Sve kolonije pa i one koje su se razvijale u tami približno

su iste boje, kružnog oblika sa difuznom ivicom. Takođe je utvrđeno da različiti uslovi osvetljenja nisu značajno uticali ni na početak i intenzitet sporulacije u kulturi. Početak sporulacije u svim varijantama utvrđen je posle 72 sata od početka razvoja micelije.

Tabela 3 – Uticaj svetlosti na razvoj kolonija *V. inaequalis*

Table 3 – Effect of artificial and diffuse light on colony growth of *V. inaequalis*

| Period izlaganja (h) | Poč. razvoja | Porast kolonija – Colony growth (mm) | |
|----------------------|--------------|---------------------------------------|-----------------------------------|
| Exposition (hr) | micel. (h) | Veštačka svetlost Artificial light | Difuzna svetlost Diffuse light |
| 0 | | 39,8 c | 39,0 bc |
| 8 | 24 | 40,7 bc | 42,2 a |
| 16 | 24 | 42,2 a | 39,9 bc |
| 24 | 24 | 40,0 c | 39,5 c |
| 48 | 24 | 41,7 ab | 41,1 ab |
| 72 | 24 | 41,2 ab | 41,5 ab |

Gustina spora utvrđena pomoću hemocitometra po Thom-u, kretala se od 312,5 spora/ml u kontroli i nekim varijantama ogleđa izlaganim uticaju svetlosti pa do 937,5 u drugim varijantama izlaganim veštačkoj (48^h) i difuznoj (72^h) svetlosti (tabela 4). Međutim, nema pravilnosti u intenzitetu sporulacije patogena među varijantama, pa se ne može sa sigurnošću tvrditi koji uslovi osvetljenja i u kom trajanju stimulatивно deluju na sporulaciju, ali je u globalu gustina spora veća u varijantama izlaganim uticaju svetlosti nego u kontroli u tami.

Tabela 4 – Uticaj svetlosti na intenzitet sporulacije (broj konidija u 1 ml) kultura *V. inaequalis***Table 4** – Effect of light on sporulation (no of conidia in 1 ml) of *V. inaequalis*

| Izlaganje svetlosti (h) Exposition to light (hr) | Difuzna svetlost Diffuse light | Veštačka svetlost Artificial light |
|---|-----------------------------------|---------------------------------------|
| 0 | 312 | 312 |
| 8 | 312 | 625 |
| 16 | 469 | 625 |
| 24 | 312 | 312 |
| 48 | 937 | 625 |
| 72 | 625 | 937 |

DISKUSIJA

Proučavajući porast na podlogama sa različitim pH vrednošću, ustanovljeno je da je najbolji porast kultura *V. inaequalis* na slabo kiseloj podlozi (pH = 5,9). Porasta nema na pH vrednostima podloge 3,0; 4,0 i 4,5, dok su ostale pH vrednosti, na kojima je bilo porasta kolonije (5,1; 7,0; 8,0; 9,0), slično uticale na porast kolonija i među njima nisu utvrđene statistički značajne razlike. Identične rezultate saopštili su Raa i Overeem (1968), prema kojima je optimalna za porast kolonija *V. inaequalis in vitro* pH vrednost oko 6,0 (loc.cyt. Mac Hardy, 1996). Iako je ispitivao različite izolate *V. inaequalis* na drugim vrstama hranljivih podloga, Wiesmann (1931) je takođe utvrdio da se u kiselijoj sredini, kulture bolje razvijaju nego na neutralnoj ili baznoj.

Kiselost podloge utiče i na morfološki izgled kolonija, a takođe i na intenzitet sporulacije *V. inaequalis*. Najbolje sporulišu kulture na podlozi sa pH vrednošću 8,0. Na ostalim ispitivanim pH vrednostima, intenzitet sporulacije patogena je znatno manji.

Različiti uslovi osvetljenja ne utiču značajnije na porast, morfološke osobine kolonija i sporulaciju *V. inaequalis*. Međutim generalno se može zaključiti da svetlost stimuliše porast kolonija u odnosu na uslove kontinuirane tame. Isti efekat svetlost ispoljava i na sporulaciju kolonija, koja je u ovom slučaju veća u varijantama izlaganim uticaju svetlosti nego u kontroli, u tami. Ovi rezultati se u potpunosti slažu sa rezultatima koje navodi Mac Hardy (1996), da različita dužina dana (osvetljenja) ne utiče na obrazovanje konidija, ali je u uslovima kontinuirane tame sporulacija redukovana za 32%.

LITERATURA

- Aleksić, G., Stojanović, S., Starović Mira, Kuzmanović, S., Trkulja, N. (2005): Porast i sporulisanje kolonija *Venturia inaequalis* na različitim temperaturama i podlogama. *Zaštita bilja*, Vol. 56 (1-4), N° 251-254, 77-86.
- Borić, B. (1985a): Uticaj visokih temperatura na klijavost konidija *Venturia inaequalis* (Cooke) Winter. *Zaštita bilja*, Vol. 36 (2), Br.172: 143-148.
- Borić, B. (1985b): Uticaj temperature na klijavost spora *Venutira inaequalis* (Cooke) Winter i uticaj starosti na njihovu vitalnost. *Zaštita bilja*, Vol. 36 (3), Br. 173: 295-302.
- Borić, B. (1985c): Rast kultura i obrazovanje reproduktivnih organa *Plesospora herbarum* (Pers. ex Fr.) Rabenh. na različitim temperaturama i pH vrednostima. *Zaštita bilja*, Vol. 36 (4), Br.174: 371-377.
- Borić, B., Draganić, M., Aleksić, G. (1994): Morfološke karakteristike izolata *Venturia inaequalis* sa teritorije Jugoslavije i odgajivačke vrednosti nekih hranljivih podloga. Treći jugoslovenski kongres o zaštiti bilja (Zbornik rezimea (38),48, Vrnjačka Banja).
- Ivanović, M. (1992): Mikoze biljaka. Nauka, Beograd, 1-521.
- Korhonen, K., Hintikka, V. (1980): Simple isolation and inokulation methods for fungal cultures. *Karstenia* 20: 19-22.
- MacHardy, E. W. (1996): Apple scab – biology, epidemiology and management. American Phytopathological Society, ST. Paul, Minnesota, 1-545.
- Wiesmann, R. (1931): Untersuchungen über Apfel und Birnenschofpilz *Fusicladium dendriticum* (Wallr.) Fckl. Und *Fusicladium pirinum* (Lib.) Fckl. sowie die Schorfanfälligkeit einzelner Apfel und Birnensorfen. *Landw. Jahrb. Schweiz.* 45: 109-156.

(Primljeno: 15.10.2009.)

(Prihvaćeno: 15.01.2009.)

**THE EFFECT OF PH AND LIGHT ON COLONY GROWTH AND
SPORULATION OF *VENTURIA INAEQUALIS***

GORAN ALEKSIĆ¹, SAŠA STOJANOVIĆ¹, MIRA STAROVIĆ¹, SLOBODAN KUZMANOVIĆ¹,
NENAD DOLOVAC¹, TATJANA POPOVIĆ²

¹Institute for Plant Protection and Environment, Belgrade, Serbia

²“EDUCONS”, Sremska Kamenica, Serbia

SUMMARY

The effect of medium pH and artificial and diffuse light on growth and sporulation of *Venturia inaequalis* was studied *in vitro*. Optimal pH for colony growth was 5,9 and at pH 8,0 the best sporulation of pathogen was detected. Morphology of colonies depends on pH of medium. Both diffuse and artificial light stimulated colony growth and sporulation compared to the darkness, but there are no regularities between source of light and exposure period.

Key words: *Venturia inaequalis*, colony growth, sporulation, pH, light

(Received: 15.10.2009.)

(Accepted: 15.01.2009.)