

## PORAST I SPORULISANJE KOLONIJA *VENTURIA INAEQUALIS* NA RAZLIČITIM TEMPERATURAMA I PODLOGAMA

GORAN ALEKSIĆ, SAŠA STOJANOVIĆ, MIRA STAROVIĆ,  
SLOBODAN KUZMANOVIĆ, NENAD TRKULJA  
Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Beograd

Najveći broj tretmana u zaštiti jabuke izvodi se protiv prouzrokovača čađave pegavosti lista i krastavost plodova. Međutim, mali broj raspoloživih fungicida, često primenjenih u povećanim količinama, uzrokuje pojavu smanjene osetljivosti patogena prema upotrebljanim fungicidima. Zato se javila potreba ispitivanja ove pojave i u laboratorijskim uslovima. Da bi se ova istraživanja sprovedla potrebno je ispitati uslove pod kojima patogen ima optimalni porast i fruktifikaciju, u cilju iznalaženja najboljih podloga i uslova za gajenje patogena koji bi poslužili u ispitivanjima njegove osetljivosti prema fungicidima u laboratorijskim uslovima. Prema dobijenim rezultatima, temperaturni optimum za porast kolonija je između 15° i 20°C, minimum je oko 1°C, a maksimum je 27°C. Najpogodnija podloga za sporulaciju patogena je podloga od slada, a neznatno slabija sporulacija je na podlozi od krompira. Utvrđeno je da je intenzitet sporulacije najveći pri temperaturi od 15°C, na podlozi od slada (1, 6 x 10<sup>5</sup> spora/ml).

*Ključne reči:* jabuka, čađava krastavost ploda, *Venturia inaequalis*, porast, fruktifikacija, temperatura, podloge

### UVOD

Jabuka je najintenzivnije gajena voćarska kultura na našim prostorima sa veoma značajnom godišnjom proizvodnjom plodova. Međutim, ovu proizvodnju ugrožava pojava raznih, veoma destruktivnih patogena. Jedan od najznačajnijih je prouzrokovač čađave krastavosti ploda – *Venturia inaequalis* (Cooke) Winter. Ovaj patogen može potpuno da ugrozi proizvodnju jabuke u odsustvu hemijske zaštite. O značaju *V. inaequalis* govori i podatak, da od ukupne potrošnje pesti-

cida koji se primenjuju pri proizvodnji jabuke, 75% otpada na suzbijanje bolesti mikozne prirode (fungicidi), od čega 70% za čađavu krastavost. Veliki problem u zaštiti jabuke od ovog patogena predstavlja činjenica da se veoma često i u povećanim količinama primenjuje mali broj fungicida. To je uzrokovalo pojavu smanjene osetljivosti patogena prema upotrebljavanim fungicidima zahvaljujući velikoj sposobnosti patogena za variranje i prevladavanje prepreka koje pred njega postavlja priroda ili čovek. Zato se javila potreba ispitivanja smanjene osetljivosti patogena u laboratorijskim uslovima, pa je zbog toga gajenje patogena u uslovima in vitro ponovo aktuelizovano. Rezultati ispitivanja saopšteni u ovom radu predstavljaju doprinos jednostavnijem i efikasnom gajenju patogena na veštačkim podlogama u cilju iznalaženja najboljih podloga i uslova za gajenje patogena koji bi poslužili u ispitivanjima njegove osetljivosti prema fungicidima u laboratorijskim uslovima.

## MATERIJAL I METODE

Fragmenti vazdušne micelije kolonije *V.inaequalis* sa monosporne kulture uzgajane na podlozi od slada (izolat poreklom iz Leskovca) zasejani su na hranljive podloge slad-agar (SA), odvarak lista jabuke (OLJ) i krompir glukozni agar – specijal (KGA), koje su podešene na pH 6,0. Zasejane podloge izlagane su temperaturama od 1°, 5°, 10°, 15°, 20°, 25°, 30°, 33° i 35°C u politermostatu u mraku (Borić, 1985; Arsenijević i Guberinić, 1989). Kulture su pregledane svakodnevno u cilju utvrđivanja početka razvoja kolonija na pojedinim temperaturama. Porast kolonija meren je u intervalima od sedam dana tokom šest nedelja razvoja, dok je za konačan porast kolonija uzet prečnik izmeren 42-og dana od zasejavanja (Borić, 1985). Prikazani podaci predstavljaju proseke od pet ponavljanja.

Obrazovanje reproduktivnih organa (konidija) praćeno je svakog dana od početka razvoja micelije u periodu od 42 dana. Početak sporulacije patogena utvrđivan je u kulturama na kosoj podlozi u epruvetama i na čvrstoj podlozi u Petri kutijama prečnika 5 cm. Micelija je zahvatana fitopatološkom iglom, prenošena na mikroskopsku pločicu, a zatim pripreman privremeni preparat koji je posmatran pod mikroskopom, kako bi se utvrdilo eventualno prisustvo spora. Na ovaj način je pouzdano mogao biti određen početak sporulacije.

Intenzitet sporulacije, odnosno gustina konidija u 1 ml suspenzije, utvrđivana je pomoću hemocitometra po Thom-u sa 16 polja ukupne površine 1 mm<sup>2</sup> i dubine 0,2 mm. Gustina konidija određivana je posle 30 dana od zasejavanja patogena (Ross, 1974), na svakoj od ispitivanih zakošenih podloga u epruvetama i svim temperaturama na kojima je bilo porasta micelije, kako bi se utvrdile razlike u in-

tenzitetu sporulacije. Suspenzija konidija pripremana je tako što je 1 ml destilovane vode dodavan u epruvetu sa kulturom patogena uz blago grebanje metalnom spatulom da bi se konidije odvojile od micelije. Dobijena suspenzija je presipana u čistu epruvetu i proceđena kroz polietilensku mrežu da bi se odstranila micelija. Pasterovom pipetom uzimana je suspenzija spora i prenošena na hemocitometar. Prve dve kapi suspenzije su odstranjivane, a sledeća je nanošena između pokrovne ljušpice i staklene ploče hemocitometra i pod mikroskopom pri uvećanju od 100 x vršeno je prebrojavanje konidija. Brojanje je rađeno u 32 ponavljanja (32 polja). Utvrđivan je ukupan broj spora, a iz toga je zatim izračunavan prosečan broj spora po 1mm<sup>2</sup> Gustine spora u 1 cm<sup>3</sup> (1ml) suspenzije izračunavana je po sledećoj formuli:  $N = n \times 5 \times 1000$ , gde je N = broj spora u 1 ml suspenzije (gustina spora /1ml), a n = prosečan broj spora na 1 mm<sup>2</sup>.

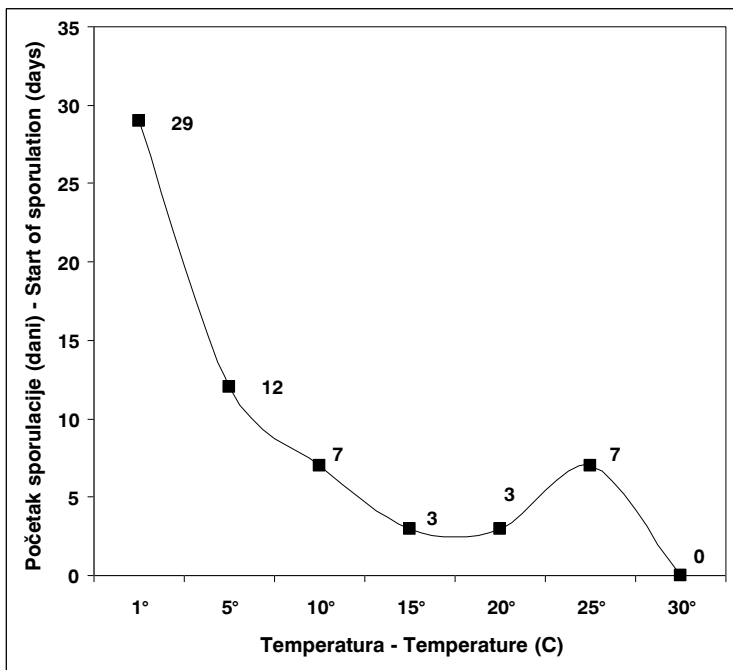
## REZULTATI I DISKUSIJA

Početak razvoja kolonija značajno zavisi od temperature gajenja (graf. 1). Ukoliko se temperatura snižava, početak rasta je sve kasniji. Tako, na 1°C početak rasta je tek posle 72 h, na 20°C i 25°C posle 22 h i 24 h, a na 30°C i višim temperaturama nema porasta kolonija. Ispitivane hranljive podloge (SA, KGA, OLJ) ne pokazuju uticaj na početak porasta kolonija *V. inaequalis* i u ovom pogledu kolonije se ponašaju isto na svim ispitivanim temperaturama.

Porast kolonija vrlo značajno zavisi od temperature i podloge na kojoj se patogen gaji, kao i njihove interakcije (tab. 1). Optimalne temperature za porast kolonija patogena se razlikuju u zavisnosti od korišćene podloge i iznose 15-25°C na SA, 15-20°C na OLJ i 20°C na KGA. Minimalna temperatura je oko 1°C, a maksimalna 27°C (graf. 2). Slične rezultate je saopštio Aderhold (1926, loc.cyt. Wiesmann, 1931), navodeći da je optimalna temperatura za porast gljive *V. inaequalis* oko 20°C. Ispitujući uticaj temperature na ispoljavanje bolesti koju prouzrokuje ovaj patogen Keitt i Jones (1943, loc.cyt. Mac Hardy, 1996) su saopštili rezultate sa kojima se u osnovi slažu rezultati ovih istraživanja.

Temperatura od 15°C najbolje diferencira razlike u porastu kolonija na korišćenim podlogama. Na ovoj temperaturi porast kolonija se značajno razlikuje u zavisnosti od korišćene podloge (26,7 mm na OLJ, 30,4 mm na KGA 36,6 mm na SA). Ovakvi rezultati razvoja patogena nisu utvrđeni pri temperaturi od 20°C i ostalim ispitivanim temperaturama.

Iz dobijenih rezultata vidi se da je najveća razlika u porastu kolonija, kada se uzmu u obzir sve ispitivane temperature, utvrđena na podlozi od krompira (KGA). Ostale dve ispitivane podloge (SA i OLJ) ne ispoljavaju ovakav efekat na porast kultura *V. inaequalis*. S druge strane, podloga od slada omogućila je



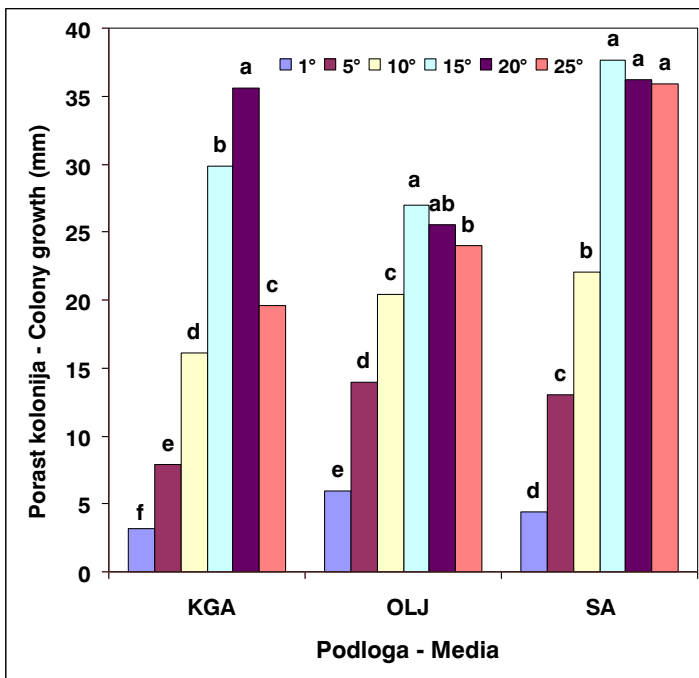
**Graf. 1.** – Početak porasta kolonija *V. inaequalis* na raznim temperaturama  
**Graph. 1.** – The start of development of *V. inaequalis* colonies at different temperature

ispoljavanje šireg spektra optimalnih temperatura za porast kolonija. To su temperature između 15° i 25°C i između njih se ne pojavljuju statistički značajne razlike u odnosu na ukupan porast kolonija. Na podlozi od odvarka lista jabuke, optimum za porast kolonija je između 15° i 20°C, dok je na podlozi od krompira, za porast gljive optimalna temperatura od 20°C. Upoređenjem konačnog porasta kolonija na pojedinim podlogama vidi se da je najbolji porast kolonija *V. inaequalis* postignut na podlozi od slada, a da je nešto slabiji porast na podlozi od krompira. Najslabije rezultate u pogledu uslova za porast kolonija pokazala je podloga od odvarka lista jabuke (OLJ). Rezultati ovih istraživanja slažu se sa rezultatima Borića i sardnika (1994) koji su ispitivali morfološke karakteristike izolata *V. inaequalis* i odgajivačke vrednosti osam hranljivih podloga, među kojima je najbolji rast kolonija postignut na krompir glukoza agaru - specijal. Slične rezultate saopštili su Putto i Chudhary (1987) koji su, ispitujući osam hranljivih podloga, ustanovili da je najbolja za razvoj gljive krompir glukoza podloga (KDA).

**Tabela 1.** Analiza varijanse uticaja temperature i podloge na porast kolonija *V.inaequalis*<sup>a</sup>**Table 1.** Analysis of variance for effect of temperature and media on colony growth of *V.inaequalis*<sup>a</sup>

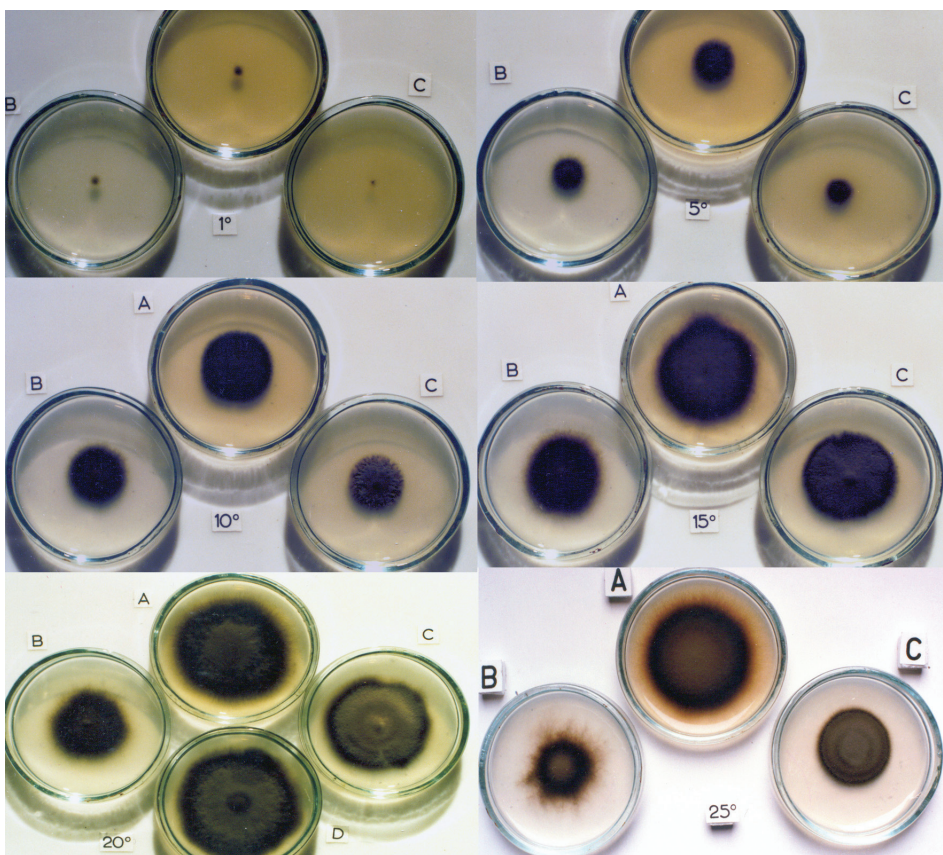
Izvori varijacije Source of variation	Stepeni slobode Degree of freedom	Suma kvadrata Sum of squares	Sredina kvadrata Mean square	F
Blokovi -Blocks	4	24.47	6.12	1.14
Tretmani -Treatments	20	16221.27	811.06	
Temp.-Temps. (A)	6	14574.20	2429.03	451.15 **
Podloge- Media (B)	2	595.03	297.52	55.26 **
A X B	12	1052.04	87.67	16.28 **
Greška -Error	80	430.73	5.38	
Ukupno - Total	104	16676.46		

<sup>a</sup> Kolonije *V.inaequalis* na podlogama KGA, SA i OLJ su inkubirane na temperaturama 1, 5, 10, 15, 20, 25, i 30C u mraku tokom 42 dana – Colonies of *V.inaequalis* PDA, maltz agar and apple leaf decantion agar were incubated at 1, 5, 10, 15, 20, 25, and 30C in darkness for 42 days.

**Graf. 2.** – Porasta kolonija *V.inaequalis* na raznim temperaturama i tri podloge

**Graph. 2.** – Colony growth of *V.inaequalis* colonies at different temperature and three media

Temperatura utiče na izgled i strukturu kolonija *V. inaequalis* (sl. 1), što je najuočljivije na KGA. Na temperaturi od 1°C vazdušni deo kolonija je maslinastozelen, kružnog oblika sa jasno ograničenim ivicama, bez uočljivog ruba. Supstratni deo kolonija je za nijansu tamniji, kružnog je oblika i sa jasnom ivicom. Centralni deo kolonije nije izdignut. Na temperaturi od 5°C kolonije su kružnog oblika, ali za razliku od prethodne temperature imaju tamniji rub, širine oko 1 mm. Vazdušni deo kolonija je siv i somotaste građe sa neznatno izdignutim centralnim delom. Supstratni deo kolonija je tamno maslinast do mrk. Na teme-



**Sl. 1.** *V. inaequalis*. - Porast kolonija na podlozi od slada (A), odvarka lista jabuke (B) i krompira (C) pri raznim temperaturama nakon 42 dana<sup>z</sup>.

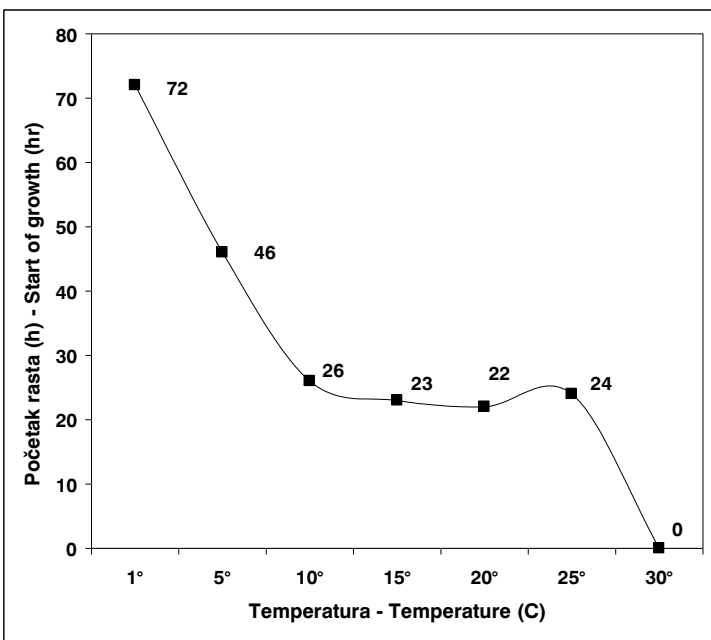
**Fig. 1.** *V. inaequalis*. – Colony growth on malt agar (A), apple leaf decantion agar (B) and potatoe dextrose agar (C) at different temperatures after 42 days<sup>z</sup>.

<sup>z</sup> Na 20°C u ogled je uključena i podloga od ekstrakta slada (D). - Malt extract agar (D) was included in experiment at 20°C.



raturi od 10°C je vrlo uočljiva razlika u izgledu kolonija, koje su kružnog oblika sa nešto svetlijim rubom, širine oko 2 mm. Vazdušni deo kolonija je svetlo sive boje, somotaste strukture sa gušćom micelijom, a kolonije su reljefne po svojoj površini. Centralni deo kolonija je izdignut, a ivica je takođe reljefna (micelija po ivici grudvičastog izgleda). Supstratni deo kolonija u svom centralnom delu je mrk, a na periferiji svetliji, širine oko 3 mm. Na temperaturi od 15°C, za razliku od prethodne, vazdušni deo kolonija nije reljefan po površini, što je i najuočljivija razlika u odnosu na kolonije sa prethodne temperature. Centralni deo kolonija je blago izdignut, prečnika oko 2 mm. Supstratni deo kolonija je mrk bez naglašenog ruba. Na temperaturi od 20°C kolonije su nepravilno kružnog oblika sa talasastom ivicom i jasno izraženim tamnijim rubom, širine oko 3 mm. Vazdušni deo kolonija blago ispupčen u središnjem delu, a od kolonija sa prethodnih temperatura razlikuje je blago nijansiran tamniji prsten (u središnjem delu kolonije), prečnika oko 10 mm. Supstratni deo kolonija je tamno mrke boje sa svetlijim središnjim delom i tamnijim rubom širine oko 3 mm. Na temperaturi od 25°C, za razliku od prethodnih, uočljiva su 2 uska koncentrična prstena, za nijansu tamnije boje od ostalog dela kolonije, kao i uzak rub iste nijanse.

Početak sporulacije konstatovan je posle 29 dana od početka razvoja micelije na temperaturi od 1°C, na 5°C posle 12 dana, a na 10° i 25°C posle 7 dana. Temperature od 15° i 20°C su najpovoljnije za početak sporulacije, na kojima obrazovanje konidija počinje posle tri dana od početka razvoja micelije (graf. 3).



**Graf. 3.**

– Početak sporulacije kolonija *V. inaequalis* na raznim temperaturama

**Graph. 3.**

– The start of sporulation of *V. inaequalis* colonies at different temperature

Različite temperature utiču i na intenzitet sporulacije kolonija, odnosno na gustinu spora (u 1 ml suspenzije). Utvrđeno je da je intenzitet sporulacije najveći pri temperaturi od 15 °C, na podlozi od slada (166500 spora/ml). Sa snižavanjem temperature, rapidno opada i intenzitet sporulacije. Vrlo nizak intenzitet sporulacije utvrđen je i na temperaturi od 25 °C (tab. 2). Na temperaturi od 20 °C nema sporulacije ili je ona slaba, tako da na podlozi od malca iznosi svega 5625 spora/ml, dok na ostalim podlogama izostaje. Najmanje razlike u intenzitetu sporulacije pri pojedinim temperaturama razvoja patogena su na podlozi od krompira (KGA). Rezultati ovih istraživanja slažu se sa rezultatima koje je saopštio Ross (1974), prema kome je obrazovanje konidija optimalno pri temperaturi od 16 °C.

**Tabela 2.** Uticaj temperature i podloge na intenzitet sporulacije *V.inaequalis* u kulturi

**Table 2.** Effect of temperatures and media on sporulation of *V.inaequalis*

Temperatura Temperature °C	Broj konidija/ml (x 10 <sup>3</sup> ) na tri podloge <sup>z</sup> Number of conidia/ml (x 10 <sup>3</sup> ) on thre media		
	SA	OLJ	KGA
1°	0,312	0,625	7,187
5°	7,500	0,781	50,625
10°	10,312	1,250	96,400
15°	166,500	1,562	157,500
20°	5,625	0,000	0,000
25°	0,625	0,000	0,000

<sup>z</sup> SA = podloga od slada (maltz agar), OLJ = podloga od odvarka lista jabuke (apple leaf decantion agar), KGA=krompir glukozna podloga (potato dextrosa agar)

Najpogodnija podloga za sporulaciju je SA, a neznatno slabija sporulacija je na KGA. Ovi rezultati slažu se sa rezultatima Ross-a (1974) koji je ispitivao sporulaciju (produkciju konidija) *V. inaequalis* na veštačkim hranljivim podlogama i utvrdio da je gljiva na podlozi od slada davala stalno visok prinos konidija, a slične rezultate saopštili su Putto i Chudhary (1987).



## LITERATURA

- Arsenijević, M., Guberinić, Đ. (1989): Razvoj *Septocyta ruborum* (Lib.) Petr. (syn. *Rhabdospora ramealis*) Rob. Ex Desm. (Sacc) in vitro. Arhiv za poljoprivredne nauke, 50, 178.
- Borić, B. (1985a): Uticaj visokih temperatura na klijavost konidija *Venturia inaequalis* (Cooke) Winter. Zaštita bilja, 172:143-148
- Borić, B. (1985b): Uticaj temperature na klijavost spora *Venturia inaequalis* (Cooke) Winter i uticaj starosti na njihovu vitalnost. Zaštita bilja, 173:295-302
- Borić, B. (1985): Rast kultura i obrazovanje reproduktivnih organa *Pleospora herbarum* (Pers. ex Fr.) Rabenh. na različitim temperaturama i pH vrednostima. Zaštita bilja, 174:371-377.
- Borić, B., Draganić, M., Aleksić, G. (1994): Morfološke karakteristike izolata *Venturia inaequalis* sa teritorije Jugoslavije i odgajivačke vrednosti nekih hranljivih p odloga. Treći jugoslovenski kongres o zaštiti bilja (Zbornik rezimea (38), 48, Vrnjačka Banja).
- Backus, E.J., Keitt, G.W. (1940): Some nuclear phenomena in *Venturia inaequalis*. Bull. Torrey Botanical Club, 67: 765-770 (loc.cyt. MacHardy, 1996)
- Dhindra, D.D., Sinclair, B.J. (1985): Basic Plant Pathology Methods . CRC Press, Inc, Boca Raton, Florida
- Ivanović, M. (1992): Mikoze biljaka. Nauka, Beograd, 1-521
- Korhonen, K., Hintikka, V. (1980): Simple isolation and inoculation 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.
- Mišić, P. (1967): Ispitivanje načina pripreme čiste kulture *Fusicladium dendriticum* (Walr.) Fck. I njegove primene u inokulaciji hibrida jabuke u fazi kotiledona. Ju. voćarstvo, 1, 40 -45.
- Mišić, P. (1994): Jabuka, Nolit, Beograd, 1-647.
- Moore, M.H. (1964): Glasshouse experiments on apple scab. I. Foliage infection in relation to wet and dry periods. Ann. Appl. Biol. 53: 423-435.
- Puttoo, B.L., Basu Chaudhary, K.C. (1987): Growth and sporulation of *Spilosea pomi* anamorph *Venturia inaequalis* on agar media. Proc. Nat. Acad. Sci., India. B., 57, N°3, 313-314.
- Ross, R.G. (1974): Conidium production of *Venturia inaequalis* in synthetic culture media. Can. J. Plant Sci. 54: 93-100.
- Sholberg, P.L., Yourston, J.M., Warnock, D. (1989): Resistance of *Venturia inaequalis* to Benomyl and Dodine in British Columbia, Canada. Plant Dis. Vol 73, No8, 667-669.

- Sholberg, P.L., Yourston, J.M. (1991): Phenotype Paterns of Benomyl-Resistant Isolates of *Venturia inaequalis* in Eight Orhards in British Columbia, Canada. *Plant Disease*, vol 75, No 6, 616-619.
- Stojanović, D. (1958): Prilog proučavanju biologije i mogućnosti suzbijanja *Venturia inaequalis* (Cke) Wint. *Zaštita bilja*, 45, 3-12.
- Studt, H.G., Wetzien, H.C. (1975): Der Einfluß der Umweltfaktoren Temperatur, relative Luftfeuchtigkeit und Licht auf die Konidienbildung beim Appfelschorf, *Venturia inaequalis* I (Cooke) Winter. *Phytopathol. Z.* 84: 115-130.
- Wallroth, F.G. (1833): *Cladosporium dendriticum* FL. *Crypt. Germ.*, 1:169 (loc.cyt. Mac Hardy, 1996).
- Wiesmann, R. (1931): Untersuchungen über Apfel und Birnenschopf-pilz *Fusicladium dendriticum* (Wallr.) Fekl. Und *Fusicladium pirinum* (Lib.) Fekl.sowie die Schorfanfälligkeit einzelner Apfel und Birnensorfen. *Landw. Jahrb. Schweiz.* 45: 109-156.

(Primljeno: 21.06.2007.)

(Prihvaćeno: 28.08.2007)

### COLONY GROWTH AND SPORULATION OF *V. INAEQUALIS* AT DIFFERENT TEMPERATURES AND MEDIA

GORAN ALEKSIĆ, SAŠA STOJANOVIĆ, MIRA STAROVIĆ,  
SLOBODAN KUZMANOVIĆ, NENAD TRKULJA  
Institute for Plant protection and Environment, Belgrade  
e-mail: algoran@sezampro.yu

The largest number of fungicide treatments in disease control of apple are realised against apple scab. However, a small number of available fungicides which were frequently used in increased doses caused the problems of less susceptibility of pathogen to applied fungicides.

The effect of different temperatures and media on pathogen colony growth and sporulation were investigated to find out the optimal conditions for pathogen development. The optimal temperature for colony growth was 15 °C - 20 °C, minimal around 1 °C, a maximal 27 °C. The most suitable medium for pathogen sporulation was malt agar, and insignificantly less suitable was PDA. Sporulation was the more abundant at 15 °C (1, 6 x 10<sup>5</sup> spora/ml).

*Key words:* apple, apple scab, *Venturia inaequalis*, growth, sporulation, temperature, media

(Received: 21.06.2007.)

(Accepted: 28.08.2007.)