

VEGETATIVNA INKOMPATIBILNOST IZOLATA *PHOMOPSIS* SPP. IZOLOVANIH SA STABLA ŠLJIVE*

SVETLANA ŽIVKOVIĆ, SAŠA STOJANOVIĆ, VELJKO GAVRILOVIĆ, ŽARKO IVANOVIĆ
Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Beograd

Izolati *Phomopsis* spp. dobijeni sa grana i stabla šljive (*Prunus domestica* L.) sa simptomima sušenja i izumiranja ispoljili su značajne razlike u morfolo-fiziološkim i patogenim karakteristikama. Primenom metode vegetativne kompatibilnosti potvrđena je genetska varijabilnost 12 izolata *Phomopsis* spp. i kontrolnog izolata *Phomopsis perniciosa*. Isečci ispitivanih kultura zasejavani su u Petri kutije po parovima i u svim mogućim unakrsnim kombinacijama, na podlozi KGA. Očitavanje rezultata je vršeno petog i desetog dana i podrazumevalo je praćenje izgleda linije međusobnog kontakta uparivanih izolata. Nakon perioda inkubacije između ispitivanih kultura dolazi do formiranja crne reakcione linije – barijere, a u pojedinim slučajevima i reproduktivnih organa – piknida (reakcija vegetativne inkompatibilnosti). Delovi hifa koje sačinjavaju crnu reakcionu liniju bili su nekrotirani. Vegetativna kompatibilnost konstatovana je samo u slučajevima kada su izolati uparivani sami sa sobom.

Cljučne reči: *Phomopsis* spp., vegetativna kompatibilnost/inkompatibilnost, šljiva

UVOD

Sušenje biljaka u mladim zasadima šljive (starosti 3-5 god.) tokom poslednje decenije, uočeno je na više lokaliteta Zapadne Srbije. Prvi simptomi bolesti uočavaju se početkom vegetacije u vidu hloroze i prevremenog opadanja lišća. Na granama i stablu obrazuju se ulegnute nekrotične pege, koje se brzo šire i u okviru kojih kora uzdužno puca, formirajući rak-rane. Nekroza se širi na drvenasti deo gde bivaju zahvaćeni sprovodni sudovi, što dovodi do sušenja i izumiranja grana i stabala.

* Rezultat rada u okviru Projekta br. 20051, koji finansira Ministarstvo za nauku i tehnološki razvoj RS.

Iz obolelih uzoraka šljive, nakon obavljenih izolacija patogena na hranljivu podlogu dobijeno je mnoštvo izolata pripadnika raznih rodova gljiva: *Cytospora*, *Phomopsis*, *Sphaeropsis*, *Seimatosporium* i *Fusarium*. S obzirom da *Phomopsis* spp. predstavlja novu vrstu u mikoflori kore šljive u Srbiji i da učestvuje u genezi sušenja i propadanja ove ekonomski veoma značajne voćarske kulture, pristupilo se detaljnijem proučavanju ovog parazita. Dobijeni rezultati ukazuju na izrazite razlike u stepenu patogenosti i morfo-fizioloških karakteristika izolata *Phomopsis* spp (Živković, 2008). Varijabilnost i heterogenost patogena ovog roda, potvrđena je od strane mnogih istraživača (Brayford, 1990a, 1990b, Caley, 1923 loc.cyt. Harris, Smit et al., 1997; Uddin and Stevenson, 1998). S toga je radi potvrde genetske različitosti obavljeno je ispitivanje vegetativne kompatibilnosti izolata *Phomopsis* spp. poreklom sa stabla šljive.

MATERIJAL I METODE

Ispitivanje srodnosti izolata *Phomopsis* spp. poreklom sa stabla šljive, obavljeno je utvrđivanjem stepena kompatibilnosti njihovih kolonija, odnosno korišćenjem fenomena hifalne interferencije (Anagnostakis, 1982). Kulture gljiva odgajane su na krompir glukoznoj podlozi (KGA), a kao kontrolni izolat korišćen je *Phomopsis perniciososa* (Jp-3) poreklom sa ploda jabuke (kolekcija Instituta za zaštitu bilja i životnu sredinu). Isečci ispitivanih kultura, prečnika 2 i 5 mm zasejavani su u Petri kutije, (Ø 9 i 15 cm) na podlozi KGA. Prvi način uparivanja uključio je sve ispitivane izolate. Isečak jednog izolata je postavljen u centar, a oko njega je na međusobnom rastojanju od 2 cm zasejano po šest izolata, tako da predstavljaju temena pravilnog šestougla. Pri tome je svaki izolat zauzimao poziciju centralnog u dva ponavljanja. Izolati su kombinovani svaki sa svakim i svaki sa samim sobom, u dva ponavljanja. Drugim načinom uparivanja u jednu Petri kutiju zasejano je po tri isečka (jedan kontrolni i dva ispitivana izolata) na međusobnom rastojanju od 2 cm, a raspored isečaka je imao oblik jednakostraničnog trougla. Sve kombinacije zasejanih izolata su potom inkubirane na temperaturi od 25°C. Očitavanje rezultata je vršeno petog i desetog dana i podrazumevalo je praćenje izgleda linije kontakta, kao i prisustva piknida na mestu međusobnog spajanja dva ispitivana izolata. Ukršteni par je smatran vegetativno kompatibilnim ukoliko su se njihove kolonije spajale jedna sa drugom uniformno duž linije kontakta. Ukoliko je na liniji dodira dve kolonije došlo do pojave tamne linije, slične barijeri, izolati su smatrani vegetativno inkompatibilnim (Anagnostakis, 1982; Brayford, 1990b; Proffer and Hart, 1988; Smit et al., 1997).

REZULTATI I DISKUSIJA

Do kontakta ispitivanih izolata (uparivanih međusobno i sa kontrolnim Jp-3), došlo je pet dana nakon zasejavanja na podlozi KGA, dok je razvoj reakcionih linija nastupio nakon deset dana. Uočeno je nekoliko tipova reakcije prilikom susreta kolonija gljiva (tab. 1):

- prorastanje ispitivanih kultura
- pojava uske providne zone na mestu međusobnog kontakta dva izolata
- formiranje tamnomrkih demarkacionih linija – "barijera" duž mesta spajanja kolonija
- obrazovanje piknida na liniji kontakta dva izolata

Prorastanje kolonija bilo je samo u slučajevima kada su izolati uparivani sami sa sobom (sl. 1). U većini slučajeva sparivanjem izolata formirale su se tamnomrke do crne "barijere", duž linije međusobnog kontakta (sl. 2 i 3). Do obrazovanja reproduktivnih organa na površini tamnih demarkacionih linija došlo je u sledećim kombinacijama uparivanja izolata: SI-M sa SI-K-7 i SI-K-8; SI-T-1 sa SI-K-3, SI-K-4, SI-K-5, SI-K-8 i SI-U-4, kao i u kombinacijama SI-B-2 sa kulturama SI-Br-2, SI-K-1, SI-K-3, SI-K-4, SI-K-7, SI-K-8 i SI-U-4. Piknidi su bili prisutni i na mestu kontakta izolata SI-K-1 sa izolatima SI-K-7 i SI-K-8, zatim u kombinacijama kultura SI-K-3 i SI-K-8 i izolata SI-K-7 sa SI-K-8. Na mestu susreta izolata SI-K-8 i SI-U-4, takođe je konstatovano obrazovanje reproduktivnih organa. Pojava demarkacionih linija, sa ili bez prisustva formiranih piknida, ukazuje na inkompatibilan odgovor, odnosno na genetičku različitost ispitivanih izolata (Proffer and Hart, 1988).

Postojanje uske providne zone, bez prisustva micelije i međusobnog kontakta dva izolata, ispoljili su: SI-1 u kombinaciji SI-M, SI-K-3, SI-K-4 i SI-K-5; zatim SI-M sa izolatom SI-B-2, kao i izolat SI-Br-2 prilikom uparivanja sa kulturama SI-K-3 i SI-K-4. Providna zona je bila prisutna i na mestu susreta izolata SI-K-1 sa SI-K-3, SI-K-4 i SI-K-5, kao i izolata SI-K-3 prilikom kombinovanja sa kulturama SI-K-4 i SI-K-5. Izolat SI-K-4 je u eksperimentu ispoljio najveći stepen antagonizma prema ostalim ispitivanim izolatima (osim prilikom uparivanja sa SI-M, SI-T-1 i SI-B-2), obrazujući providnu zonu, širine 1mm. Do međusobnog kontakta nije došlo ni prilikom kombinovanja izolata SI-K-5 sa izolatima SI-1, SI-K-1, SI-K-3, SI-K-4, SI-K-7 i SI-K-8.

Obrazovanje providnih zona na mestu spajanja kultura gljiva poreklom sa različitih lokaliteta, pripadnika različitih grupa vegetativne kompatibilnosti, konstatovano je i od strane drugih istraživača (Smit et al., 1997; Vico, 1997). Ovaj tip reakcije na liniji dodira kolonija po nekim podacima iz literature (Punja and Grogan, 1983), predstavlja oblik antagonizma dva ispitivana izolata.

Tabela 1 – Interakcije kolonija izolata *Phomopsis* spp.
Table 1 – Interaction between isolates of *Phomopsis* spp.

izolati	SI-1	SI-M	SI-T-1	SI-B-2	SI-Br-2	SI-K-1	SI-K-3	SI-K-4	SI-K-5	SI-K-7	SI-K-8	SI-U-4	JP-3
JP-3	Pz	Tb, Pk	Tb, Pk	Pz	Tb	Tb, Pk	Tb	Pz	Tb	Tb	Tb, Pk	Tb	P
SI-U-4	Tb	Tb	Tb, Pk	Tb, Pk	Tb	Tb	Tb	Pz	Tb	Tb	Tb, Pk	P	
SI-K-8	Tb	Tb, Pk	Tb, Pk	Tb, Pk	Tb	Tb, Pk	Tb, Pk	Pz	Pz	Tb, Pk	P		
SI-K-7	Tb	Tb, Pk	Tb	Tb, Pk	Tb	Tb, Pk	Tb	Pz	Pz	P			
SI-K-5	Pz	Tb	Tb, Pk	Tb	Tb	Pz	Pz	Pz	P				
SI-K-4	Pz	Tb	Tb, Pk	Tb, Pk	Pz	Pz	Pz	P					
SI-K-3	Pz	Tb	Tb, Pk	Tb, Pk	Pz	Pz	P						
SI-K-1	Tb	Tb	Tb	Tb, Pk	Tb	P							
SI-Br-2	Tb	Tb	Tb	Tb, Pk	P								
SI-B-2	Tb	Pz	Tb	P									
SI-T-1	Tb	Tb	P										
SI-M	Pz	P											
SI-1	P												

Legenda-Legend:

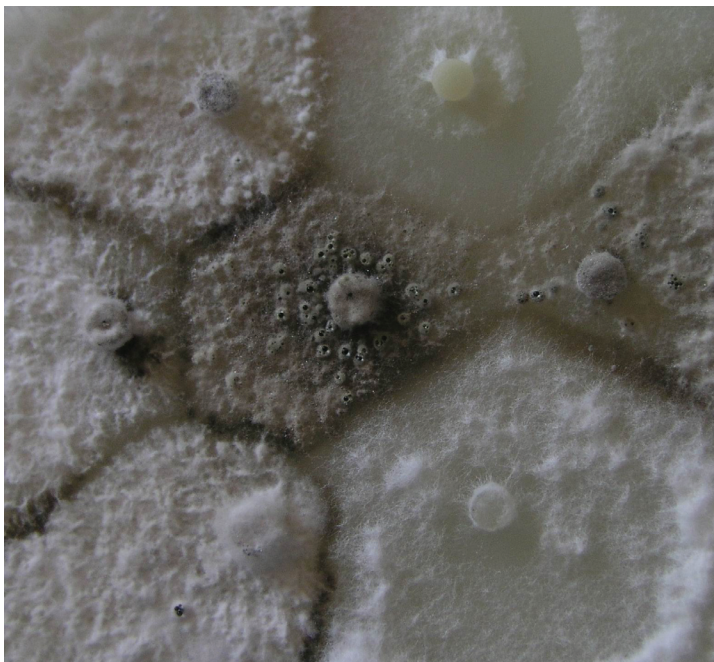
P – prorastanje micelija – overgrowth of micelium;

Pz – providna zona na mestu susreta kolonija (inhibiciona zona) – inhibition zone;

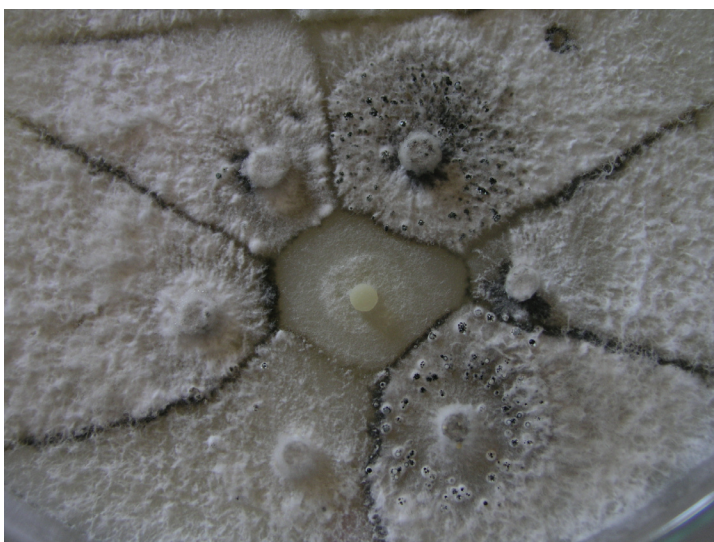
Tb – tamna barijera na liniji kontakta izolata – black barrage at the line of the contact between isolates;

Pk – formiranje pknida duž linije kontakta izolata – pycnidia formation along of contact line of isolates

U kontaktu sa kontrolnim izolatom Jp-3, većina ispitivanih kultura su formirale tamne demarkacione linije. Na mestu spajanja izolata SI-M, SI-T-1, SI-K-1 i SI-K-8 i kontrolnog Jp-3, došlo je do formiranja sitnih reproduktivnih organa (sl. 4). Ostale ispitivane kulture *Phomopsis* spp. na prisustvo kontrolnog izolata nisu reagovale obrazovanjem pknida. Izolati SI-1 i SI-K-3 su u međusobnom susretu



Sl. 1 – Prorastanje kolonija (izolat SI-T-1)
Fig. 1 – Overgrowth of colonies (isolat SI-T-1)



Sl. 2 – Formiranje demarkacionih linija
Fig. 2 – Formation of demarcation line



Sl. 3 – Tamne barijere između inkompatibilnih izolata (naličje)
Fig. 3 – Black barrage between incompatible isolates (back side)



Sl. 4 – Piknidi na demarkacionim linijama (izolati SI-K-8+JP-3+SI-U-4)
Fig. 4 – Pycnidia at demarcation line (isolates SI-K-8+JP-3+SI-U-4)

sa kontrolnim izolatom formirali usku providnu zonu, (bez međusobnog kontakta) širine oko 1 mm (sl. 5).

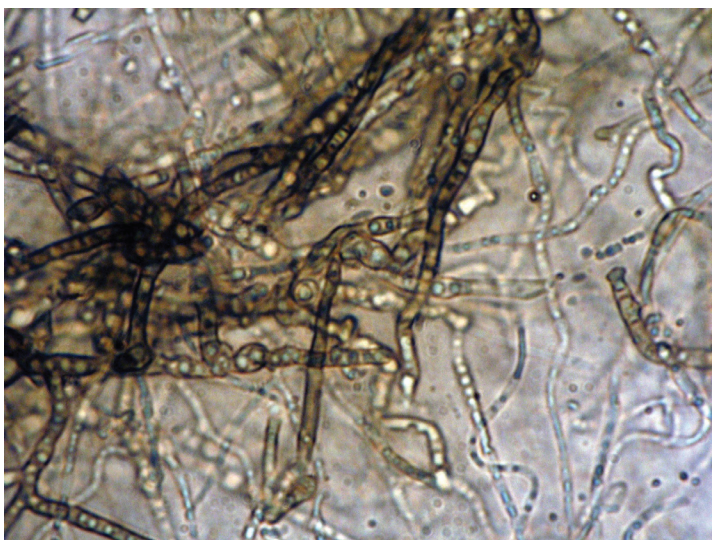
Mikroskopskim pregledom hifa ispitivanih izolata koje su sačinjavale reakcionu liniju, ustanovljeno je da su one zadebljele, ispunjene zrnastim sadržajem i melanizirane, odnosno tamne boje (sl. 6). Centralni region barijera, nastao fusijom hifa, sastoji se od nekrotiranih ili umirućih ćelija, sa slojem tamnog pigmenta (Newhouse and MacDonald, 1991). Hife izolata koje na mestu kontakta nisu formirale tamne demarkacione linije, bile su uobičajenog izgleda, isprepletane i bez vidljivih promena u širini, boji i sadržaju. Do sličnih rezultata u svojim ogledima su došli i drugi istraživači (Babović i sar., 1997; Punja and Grogan, 1983, Proffer and Hart, 1988). Formiranje tamnih demarkacionih linija u literaturi, objašnjava se antagonizmom ispoljenim međusobnim prorastanjem micelija dveju inkompatibilnih vrsta. Obrazovanje reproduktivnih organa gljiva na samoj demarkacionoj liniji, kao i u njenoj neposrednoj blizini, takođe je česta pojava prilikom uparivanja izolata genetski različitih vrsta gljiva (Leslie, 1993).

Sposobnost formiranja heterokariona, prilikom kontakta dva gljivična organizma, jedan je od najvažnijih komponenti njihovog životnog ciklusa i predstavlja prvi korak u ostvarivanju rekombinacija naslednih osobina i transmisije faktora virulencije. Gljive koje poseduju sposobnost obrazovanja stabilnih i genetski različitih jedara, smatraju se vegetativno kompatibilnim (Leslie, 1993). Vegetativna kompatibilnost upućuje na karakterističnu sposobnost dve gljive da se sliju, spoje i na tom mestu izmene citoplazmatski ili jedarni sadržaj (Kulman, 1982, loc.cit. Proffer, 1988). Kompatibilni izolati formiraju grupe vegetativne kompatibilnosti (VCG) (Proffer, 1988). Manji broj VCG grupa obično imaju aseksualne gljive. Gljive koje se polno razmnožavaju moraju imati visoki nivo genetske homogenosti da bi bile vegetativno kompatibilne (Jacobson and Gordon, 1988). Ovu osobinu ispoljavaju samo ako imaju iste alele u datom lokusu gena (Anagnostakis, 1982). Vrste koje su identične u istom setu lokusa, imaju sposobnost formiranja stabilnog heterokariona. Ovaj tip interakcije poznat je kao alelna kompatibilnost.

Fenomen vegetativne kompatibilnosti ili inkompatibilnosti koja se ocenjuje na osnovu interakcije kolonija dala je mnogo pozitivnih rezultata u taksonomiji različitih vrsta gljiva. Hifalna interakcija koja rezultuje formiranjem tamnih linija ili "barijera" navodi se kod različitih grupa gljiva. Pojava demarkacionih linija uočena je između izolata *Diaporthae/Phomopsis* vrsta, morfološki vrlo sličnih i izolovanih sa iste biljke (Franić-Mihajlović et al., 1996, loc. cit. Glamočlija et al., 2007). Njihovo formiranje može se tumačiti kao ispoljavanje inter ili intraspecifičnog, odnosno unutar i međuvrskog antagonizma (Brayford, 1990b). Vegetativna inkompatibilnost je opisana kao pogodan karakter za razlikovanje vrsta iz roda *Monilinia* (Babović i sar., 1997; Sonoda, 1982), zatim za utvrđivanje različitih taksonomskih kategorija (na nivou sojeva, podvrsta ili patotipova) u



Sl. 5 – Infibiciona zona (izolati SI-K-3+Jp-3)
Fig. 5 – Inhibition zone (isolates SI-K-3+Jp-3)



Sl. 6 – Zadebljale i melanizirane hife koje formiraju crnu demarkacionu zonu na mestu kontakta incompatibilnih izolata SI-K-8 i SI-U-4 (uvećanje 1000x)
Fig. 6 – Thickened and melanised hyphae which form the black barrage zone at the contact of incompatible isolates SI-K-8 and SI-U-4 (magnification 1000x)

okviru *Endothia parasitica* (Anagnostakis, 1977, loc cit. Anagnostakis, 1982), *Leucocytopora kunzei* (Proffer and Hart, 1988) i drugih.

Rezultati dobijeni u ovom radu pokazuju da postoji izražena genetska različitost izolata *Phomopsis* spp., poreklom sa stabla šljive. Ona se odražava kroz postojanje većeg broja grupa vegetativne kompatibilnosti. Između ispitivanih kultura se na mestu spajanja formira crna reakciona linija – "barijera", što ukazuje na različite vrste ili sojeve gljiva, koje mada pripadaju istom rodu, pokazuju visok nivo genetske heterogenosti.

LITERATURA

- Anagnostakis, S. L. (1982): Biological control of chestnut blight. *Science* 215: 465-471.
- Babović, M., Bulajić, A., Krnjaja, V. i Ivanović, M. (1997): Mogućnost razlikovanja *Monilinia* spp. na voću metodom vegetativne kompatibilnosti. *Jugoslovensko voćarstvo* 119-120: 245-251.
- Brayford, D. (1990a): Variation in *Phomopsis* isolates from *Ulmus* species in the British Isles and Italy. *Mycological Research* 94 (5): 691-697.
- Brayford, D. (1990b): Vegetative incompatibility in *Phomopsis* from elm. *Mycological Research* 94 (6): 745-752.
- Glamočlija, J., Soković, M., Grbić, M., Vukojević, J., Milenković, I. and Griensven, L.D. (2007): Morpho-physiological characteristics and interactions of *Mycogone perniciosa* (Magnus) Delacr. *Zbornik Matice Srpske za prirodne nauke*, N° 113: 235-241.
- Harris, D.C. (1988): *Diaporthe perniciosa* associated with plum dieback. *Plant Pathology* 37: 604-606.
- Jacobson, D.J. and Gordon, T.R. (1988): Vegetative compatibility and self-incompatibility within *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. *Phytopathology* 78: 668-672.
- Leslie, J.F. (1993): Fungal vegetative compatibility. *Annu. Rev. Phytopathol.* 31: 127-150.
- Newhouse, J.R. and MacDonald, W.L. (1991): The ultrastructure of hyphal anastomoses between vegetatively compatible and incompatible virulent and hypovirulent strains of *Cyphonectria parasitica*. *Can. J. Bot.* 69: 602-614.
- Punja, Z. K. and Grogan, R.G. (1983): Basidiocarp induction, nuclear condition, variability and heterokaryon incompatibility in *Althelia* (*Sclerotium*) *rolfsii*. *Phytopathology* 78: 256-260.
- Proffer, T. J. and Hart, J.H. (1988): Vegetative compatibility groups in *Leucocytopora kunzei*. *Phytopathology* 73: 256-260.
- Smit, W.A., Wingfield, B.D. and Wingfield, M.J. (1997): Vegetative incompatibility in *Diaporthe amiqua*. *Plant Pathology* 46:366-372.

- Sonoda, R.M. (1982): Use of interactions of cultures to distinguish *Monilinia laxa* from *M. fructicola*. Plant Disease 66: 325-326.
- Uddin, W. and Stevenson, K.L. (1998): Pathogenic and Molecular Characterization of Three *Phomopsis* Isolates from Peach, Plum and Pear. Plant Disease 82: 732-737.
- Vico, I. (1997): Prilog taksonomiji fitopatogenih gljiva roda *Rhizoctonia* DC.ex Fr. Doktorska disertacija. Poljoprivredni fakultet, Beograd.
- Živković S. (2008): Etiološka proučavanja sušenja stabala šljive. Magistarska teza. Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.

(Primljeno: 06.03.2009.)

(Prihvaćeno: 31.03.2009.)

VEGETATIVE INCOMPATIBILITY OF ISOLATES OF *PHOMOPSIS* SPP. FROM PLUM TREES

SVETLANA ŽIVKOVIĆ, SAŠA STOJANOVIĆ, VELJKO GAVRILOVIĆ, ŽARKO IVANOVIĆ
Institute for Plant Protection and Environment, Belgrade

SUMMARY

Isolates of *Phomopsis* spp. obtained from plum trees (*Prunus domestica* L.) with symptoms of die-back. There were significant morpho-physiological and pathogenic differences between the isolates. The genetic variability (12 isolates of *Phomopsis* spp. and isolate of *Phomopsis perniciosa*, which was used as control) was proved by study of vegetative compatibility. These isolates were inoculated in Petri dishes in pairs in all possible cross combinations, on potato dextrose agar. After 5 and 10 days the interaction between colonies were scored according to appearance of contact lines of paired cultures. On the contact line on two different isolates distinct barrage zones of inhibition – vegetative incompatibility reaction. The barrage zones generally became black and sometimes showed formation of pycnidia. Necrotic parts of hyphae that formed line of reaction were observed. A compatible reaction was observed only when cultures of the same isolate were paired.

Key words: *Phomopsis* spp., vegetative compatibility/incompatibility, plum

(Received: 06.03.2009.)

(Accepted: 31.03.2009.)