

***Phomopsis perniciosa* Grove - uzročnik truleži uskladištenih plodova jabuke**

Momčilo Arsenijević¹ i Veljko Gavrilović²

¹*Poljoprivredni fakultet, Novi Sad*

²*Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Beograd*

REZIME

Tokom 1994-1996. godine iz natrulih plodova jabuke izolovano je mnoštvo gljiva predstavnika rodova *Alternaria*, *Botrytis*, *Colletotrichum*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Mucor*, *Monilinia*, *Penicillium*, *Pestalotiopsis*, *Rhizopus*, *Sphaeropsis*, *Stemphylium*, *Trichothecium* i dr.

Medju njima, fomopsiozna trulež privlačila je posebnu pažnju jer predstavlja novu trulež plodova jabuke u Srbiji. Iz natrulih plodova jabuke izolovano je više sojeva gljiva roda *Phomopsis* čije su karakteristike proučene u ovom radu. Veštačka inokulacija plodova jabuke ukazuje na visok stepen patogenosti izolovanih sojeva prouzrokujući trulež korišćenih plodova. Kontrolni plodovi nisu ispoljili nikakve simptome bolesti.

Na krompir-glukoznoj podlozi (PDA) parazit formira sivobeličaste kolonije, crnkste strome i α i β -piknospore. Alfa-piknospore su jednoćelijske, bezbojne, elipsastovretenaste sa po dve uljaste kapi u svakoj. Beta piknospore su izdužene končaste, jednoćelijske, bezbojne i na jednom kraju savijene.

Na osnovu dobijenih rezultata zaključeno je da proučavani sojevi pripadaju vrsti *Phomopsis perniciosa* Grove. Koliko nam je poznato, ovo je prvi nalaz fomopsiozne truleži plodova jabuke u Srbiji.

Ključne reči: Plodovi jabuke; trulež; *Phomopsis perniciosa*; sojevi; patogenost; piknid-ske strome; α i β -piknospore

UVOD

Tokom 1994-1996. godine iz Novosadske hladnjače i sa Beogradske pijace kao i iz hladnjače u Šapcu, dostavljeno nam je nekoliko puta više uzoraka obolelih plodova jabuke (sorti Ajdared, Greni Smit i drugih) sa simptomima truleži i dezorganizacije tkiva. Mikroskopskim pregledom i izolovanjem na

hranljivoj podlozi utvrđeno je prisustvo raznih vrsta gljiva medju kojima i predstavnici rodova: *Alternaria*, *Botrytis*, *Colletotrichum*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Mucor*, *Monilinia*, *Penicillium*, *Pestalotiopsis*, *Rhizopus*, *Sphaeropsis*, *Stemphylium*, *Trichothecium* i dr. (Arsenijević i sar., 1996).

Medju svim tim parazitima, posebnu pažnju privlačila je pojava sivobeličastih kolonija razvijenih

na hranljivoj podlozi sa krupnijim konidiomatama (piknidskim stromama) i α i β – piknosporama gljiva roda *Phomopsis*. Ispostavilo se, kasnije, da pripada vrsti *Phomopsis perniciosa* Grove do tada, koliko nam je poznato, nezabeleženog parazita plodova jabuke kod nas.

To je i bio osnovni razlog da joj posvetimo određenu pažnju i proučimo njene patogene, morfološke i odgajivačke odlike »*in vitro*«.

MATERIJAL I METODE

Izolovanje parazita

Izolovanje parazita vršeno je na krompir-glukoznoj podlozi (PDA). Sitniji komadići nekrotičnog tkiva naneti su na podlogu u Petri kutije a ove postavljene u termostat na $24 \pm 1^\circ\text{C}$. Prethodno je površinsko tkivo ploda odstranjeno skalpelom a ono dublje uzduž zasečeno i na sterilnom filter papiru poprečno sasečeno na manje deliće koji su sterilnom pincetom (na plamenu napaljene) prebačene na podloge, po nekoliko u krug i jedan u centar podloge. Posle nekoliko dana, kada su kolonije gljive dostigle prečnik 2-3 cm, sitnim delićima kolonija zasejana je kosa podloga u epruvetama. Tako su dobijene čiste kulture parazita, odnosno izolata šifriranih sa J-1 do J-20. Od ovako većeg broja izolata četiri su odabrana za dalji rad: J-8, J-9, J-15 i J-16.

Veštačka inokulacija plodova jabuke

Za inokulaciju upotrebljeni plodovi sorte Ajdared. Na povređeno tkivo naneti su delovi

kolonija (prečnika oko 0.6 cm) kultura starosti osam dana, razvijenih na podlozi od krompira. Kontrolni plodovi samo su povređeni bez nanošenja kulture gljive. Svi su navlašeni prskanjem i postavljeni na poklopce čistih Petri kutija u vlažne limene komore pokrivene vlažnim polietilenskim platnom. Posle 24-48 sati Petri kutije sa inokulisanim plodovima iznete su na laboratorijske stolove radi posmatranja nastalih promena i eventualne pojave truleži.

Razvoj gljive na hranljivoj podlozi

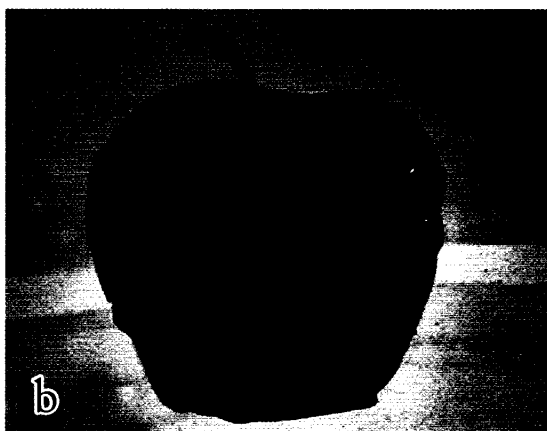
Dokazavši ovako patogenost izolovanih sojeva gljive proučen je i njen razvoj »*in vitro*«. U tu svrhu zasejane Petri kutije, sa napred četiri pomenuta izolata, postavljene su u termostat na $24 \pm 1^\circ\text{C}$ i povremeno pregledane radi uvida u razvoj proučavanih izolata, karakteristika njihovih kolonija i stvaranje konidiomata (piknidskih stroma) i piknospora parazita.

Delići zasejanih kolonija postavljani su u centar ravne krompir glukozne podloge u Petri kutije kako bi se što bolje uočavao nastanak kolonija i karakteristike njihovog razvoja i pratila pojava fruktifikacije.

REZULTATI

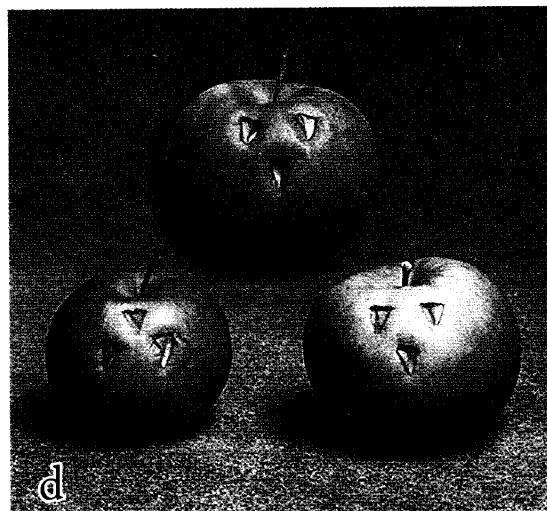
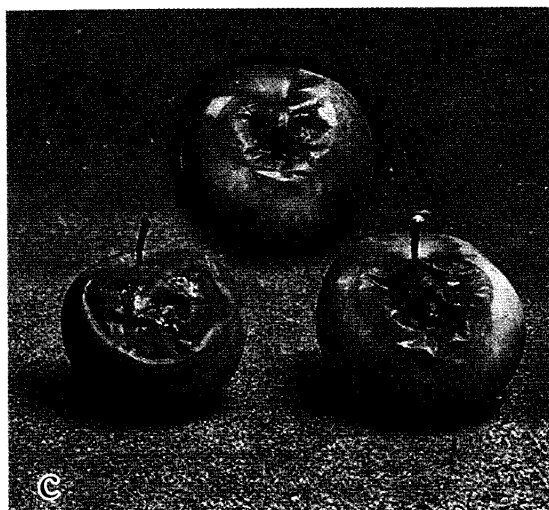
Simptomi bolesti

Simptomi bolesti se ispoljavaju se u vidu krupnih, okruglastih pega veličine 2-3 cm svetlomrke do mrke boje (Slika 1a). Nekroza tkiva se postepeno širi i povećava kad prekriva sve veću površinu obolelog ploda. Tkivo u okviru pege se razmekšava



Sl. 1. *Phomopsis perniciosa*. Početni razvoj truleži ploda jabuke (a) i mumificirani plod pri kraju razvoja bolesti-desno (b). Prirodna zaraza (Original).

Fig. 1. *Phomopsis perniciosa*. Initial development of apple fruit rot (a) and mummified fruit at the end of the disease spreading, right (b). Natural infection. (Original).



Sl. 2. *Phomopsis perniciosa*. Razvoj truleži posle veštačke inokulacije plodova jabuke gljivom korišćenjem soja J-15 (c) i kontrolni plodovi (d) (Original).

Fig. 2. *Phomopsis perniciosa*. Rot development after artificial inoculation of the apple fruits by the fungus using J-15 strain (c) and control one (d) (Original).

i truli, postajući vodnjikavo. Trulež obično počinje od peteljkinog udubljenja i čašice spolja, ali može početi i iz unutrašnjosti ploda, od semene lože šireći se od središta ka periferiji ploda. Tada natrulo tkivo puca dezorganizujući se u vidu kavernoznih šupljina (Slike 1a i b).

Oboleli plod jabuke može u potpunosti da istruli (Slika 1b). Na njemu nema piknida sve dok potpuno ne istruli. Unutrašnja trulež, ili trulež srca, pojavljuje se najčešće na prezrelim plodovima krajem skladištenja.

Razvoj trulež pri sobnim uslovima

Nekoliko plodova pri početku truleži tkiva, sakupljenih na tržnici u Novom Sadu, u proleće 2002. godine, poslužili su za posmatranje razvoja truleži tkiva, pri veoma varijabilnim uslovima sobne temperature, vlažnosti i osvetljenja. Postavljeni kraj prozora, držani su duže vreme i beležene sve vidljive promene. Trulež se postepeno i sporo razvijala a zahvaćeno tkivo razmekšavalo prekrivajući sve veću površinu ploda, sve dok nije potpuno postao mekan, mrke boje i u celosti truo. Ovaj proces razvoja truleži trajao je oko 15- 20 dana, kada je nastala smežuranost i mumifikacija tkiva (Slika 1b). Tada su se pojavili i mnogobrojni piknidi ispoljeni u vidu sitnijih i svetlijih telašaca. Njihovim mikroskopiranjem utvrđeno je prisustvo piknida, α i β -piknospora parazita.

Patogenost

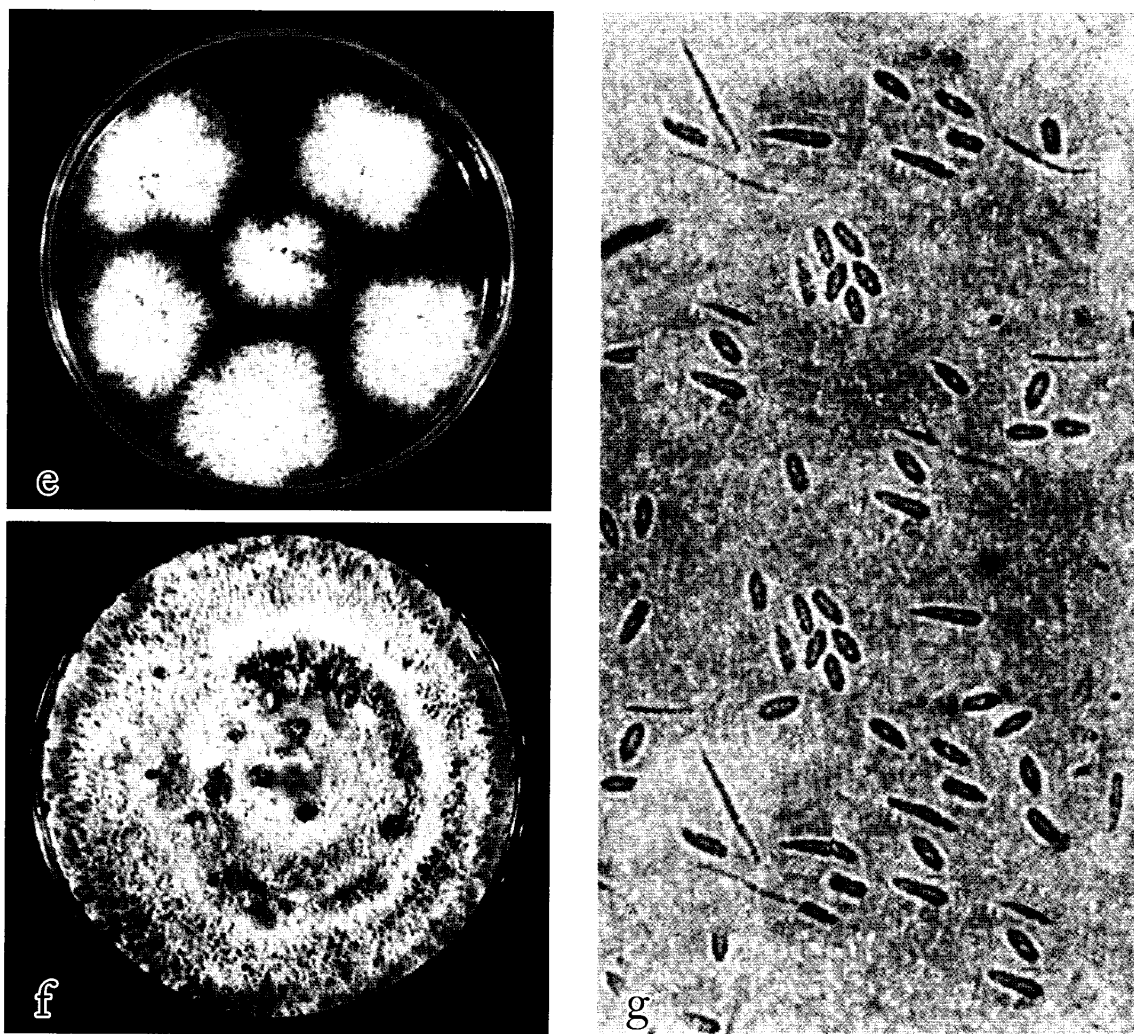
Na inokulisanim plodovima jabuke pojavljuju se mrke pege koje se šire oko nanetog fragmenta kolonije gljive. Pege se postepeno povećavaju a tkivo u okviru njih razmekšava i truli (Slika 2c). Mrka nekroza brzo prekriva celu površinu ploda koji se smežurava i truli mumificirajući se. Na kontrolnim plodovima nema promena (Slika 2d).

Postavljanjem sitnijih komadića na podlogu nekrotičnog tkiva uspešno se mogu dobiti reizolati gljiva karakteristika kao i kod izolata. Pri tome i na kolonijama reizolata sa konidiomatama i α i β -piknosporama razvile su se strukture iste kao i na kolonijama razvijenim pri izolovanju parazita. Dakle, Kohovi postulati su u potpunosti dokazani.

Odgajivačke odlike

Već posle 2-3 dana razvoja na podlozi od krompir glukoznog agara (PDA), razvijaju se beličaste kolonije parazita koje se šire oko zasejanih fragmenata nekrotičnog tkiva nanetog na podlogu (Slika 3e). Pri daljem razvoju kolonije se povećavaju dostižući sve veće dimenzije kada postaju beličasto sive (Slika 3f). Ubrzo prekrivaju celu površinu podloge kad im supstratni deo postaje smeđ. Posle 10-ak dana uočavaju se i prve piknidske strome.

Strome su crne i krupne, razvijene po celoj površini kolonije. Iz njih, nešto kasnije (posle 15-ak dana),



Sl. 3. *Phomopsis perniciosa*. (e) Izolovanje gljive na krompir glukoznoj (PDA) podlozi (f) izgled kolonija sa piknidskim stromama, (g) α i β – piknospori (Original).

Fig. 3. *Phomopsis perniciosa*. (e) Isolation of the fungus on PDA, (f) colony view with pycnidial stromata, (g) α and β – pycnidiospores (Original).

cure kapi žućkastog eksudata. Mikroskopiranjem eksudata uočavaju se α i β –piknospori.

Starije kulture sadrže samo α –piknospori a one mlađe i α i β –piknospori, a utvrđeni su i prelazni oblici.

Alfa-piknospori su vretenasto elipsaste, jednoćelijske, bezbojne i imaju dve uljaste kapi; beta-piknospori su končasto izdužene, jednoćelijske, bezbojne, na jednom kraju savijene (Slika 3 g). Prisustvo teleomorfa na podlozi nije utvrđeno.

DISKUSIJA

Fomopsiozna trulež plodova jabuke predstavlja novu pojavu na obolelim plodovima jabuke kod

nas. Iz obolelog tkiva uspešno je izvršeno izolovanje i reizolovanje parazita pri čemu se razvijaju kolonije sa stromatičnim strukturama i α i β –piknosporama karakterističnim za rod *Phomopsis*. Na osnovu morfoloških karakteristika gljive, njenih stromatičnih struktura i piknospora svi proučavani izolati (J-8, J-9, J-15 i J-16) poreklom s obolelih plodova jabuke, determinisani su kao *Phomopsis perniciosa* Grove.

Identifikaciju je izvršio dr E. Punithaligam/H360/95/yy1 avgusta 1995. godine. Svi sojevi nose oznake IMI (International Mycological Institute, Surrey, UK) i to: IMI 368207 (J-8), IMI 368208 (J-9), IMI 368209 (J-15) i IMI 368210 (J-16).

U ovoj ustanovi, izvanredne međunarodne reputacije, determinisani su kao *Phomopsis perniciosa* Grove i novosadski izolati dobijeni i sa drugih domaćina ovog parazita. IMI 367165 (MS-66), IMI 367166 (MS-67), poreklom s obolelih stabala mušmule; IMI 367153 (C-1) i IMI 367154 (K-14), izolovanih s obolelih grana kajsije; IMI 367155 (Ph-7) i IMI 367156 (Ph-13) iz obolelih plodova višnje.

Kao paraziti oraha, maline i kupine kod nas postoje i druge vrste: *Phomopsis juglandina* (Sacc.) Höhn., *Phomopsis* sp., *Ph. corticis* (Fuckel) Grove, *Ph. vepris* Höhn., *Phomopsis* spp. i dr. (Punithalingam, 1995; ex: Arsenijević, 2005).

Kako se iz navedenog i vidi, *Phomopsis perniciosa* je rasprostranjena vrsta gljiva na jabučastim i koštičavim voćkama kod nas. Osim navedenih voćaka, ova gljiva imenovana kao *Ph. mali* Roberts, utvrđena je i kao uzročnik uvelosti i izumiranja podloge u matičanjacima podloge (Arsenijević i sar., 1998).

Dakle, populacija *Phomopsis perniciosa* postoji na raznim vrstama i organima parazitiranih voćaka kod nas. Zbog toga je ovom parazitu potrebno posvetiti i više pažnje radi što iscrpnijeg uvida u njegov parazitizam i ekonomski značaj koji ima, ne samo za jabučaste i koštičave voćke, nego i za njihove plodove, među kojima se po prvi put nalazi na plodovima jabuke kod nas.

O fomopsioznom izumiranju grana kajsije u zapadnoj Srbiji izveštavaju Garić i Arsenijević (1990), a o fomopsioznoj truleži plodova jabuke i breskve u SAD Combrink i saradnici (1976), kao i Rosenberger i Burr (1982).

LITERATURA

- Arsenijević, M., Jančurić, J., Trkulja, V. i Gavrilović, V.:** Mikoflora uskladištenih plodova jabuke. 10. kongres voćara Jugoslavije, Čačak, 1996 (uvodni referati i abstrakti, str. 217).
- Arsenijević, M., Veselić, M. i Purar, B.:** Uvelost i izumiranje podloga u matičnjaku jabuke. Biljni lekar, 2: 163-168, 1998.
- Arsenijević, M.:** O vrstama rodova *Diaporthe* i *Phomopsis* parazitima voćaka i vinove loze. Mycologia Montenegrina (Podgorica), 2005 (u štampi)
- Combrink, J.C., Sommer, N.F., Tyler, R.H., and Fortlage, R.J.:** Postharvest *Phomopsis* rot of apple fruits. Plant. Dis. Rep., 60: 1060-1064, 1976.
- Garić, R. i Arsenijević, M.:** *Phomopsis* – uzročnik nove bolesti kajsija. Zaštita bilja, 193: 269-274, 1990.
- Rosenberger, D. A. and Burr, T.J.:** Fruit decays of peach and apple caused by *Phomopsis mali*. Plant. Dis., 66: 1073-1075, 1982.

ZAHVALNOST

Autori zahvaljuju dr E. Punithalingam (International Mycological Institute, Surrey, UK) za identifikaciju sojeva poreklom sa natrulih plodova jabuke iz hladnjače.

ACKNOWLEDGMENT

The authors thank Dr E. Punithalingam (International Mycological Institute, Surrey, UK) for identification of apple *Phomopsis* strains originating from storage fruits.

Phomopsis perniciosa Grove-Causal Agent of Apple Rot in Storage Fruits

SUMMARY

During 1994-1996. a lot of fungal species the members of the follow genera were isolated from apple storage rot fruits: *Alternaria*, *Botrytis*, *Colletotrichum*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Mucor*, *Monilinia*, *Penicillium*, *Pestalotiopsis*, *Rhizopus*, *Sphaeropsis*, *Stemphylium*, *Trichothecium* and others.

Among them *Phomopsis* rot accepted our especially attention because it represent new appearance as apple fruits rot in Serbia. From diseased fruits many strains of the *Phomopsis* fungus were isolated and their characteristics were studied.

Artificial inoculations of the apple fruits shown strong pathogenicity of the strains isolated causing rot of the inoculated apple fruits. The control fruits were without any symptoms of the disease.

On PDA the pathogen forms greyishwhite colonies with black pycnidial stromata and α i β -pycnidiospores. Alfa-pycnidiospores were unicellular, hyaline, fusiform, bigutellate; β -pycnidiospres were filiform, unicellular, hyaline and curved on the one end.

Based on the results obtained it was concluded that the strains investigated belong to the *Phomopsis perniciosa* Grove species.

As we know this is the first finding of *Phomopsis* storage rot of apple fruits in Serbia.

Keywords: Apple fruits; Rot; *Phomopsis perniciosa*; Strains; Pathogenicity; Pycnidial stromata; α and β -pycnidiospores.