

UTJECAJ HRANJIVE PODLOGE I TEMPERATURE NA RAZVOJ *SCLEROTINIA SCLEROTIORUM*

I. Mikić ⁽¹⁾, Z. Radan ⁽²⁾, Jasenka Ćosić ⁽¹⁾, Karolina Vrandečić ⁽¹⁾

Izvorni znanstveni članak
Original scientific paper

SAŽETAK

Cilj istraživanja bio je utvrditi utjecaj hranjive podloge (krumpir dekstrozni agar (PDA), podloga od mrkve) i temperature (15, 22 i 30°C) na rast i razvoj micelija i formiranje sklerocija gljive *Sclerotinia sclerotiorum*. Istraživanje je provedeno u laboratorijskim uvjetima 2013. godine. Statističkom obradom podataka utvrđeno je da podloga i temperatura značajno utječu na porast micelija i formiranje sklerocija. Utvrđen je statistički značajno bolji razvoj micelija na PDA podlozi te na temperaturama 15 i 20°C, nego na drugom ispitivanom supstratu i temperaturi 30°C. Sklerociji su se, također, formirali samo na PDA podlozi i na dvije niže temperature. Sklerociji formirani na 15°C bili su veći od sklerocija formiranih na 20°C.

Ključne riječi: *Sclerotinia sclerotiorum*, PDA, podloga od mrkve, temperatura

UVOD

Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) de Bary zemljišni je parazit koji napada biljke u svim stadijima rasta i razvoja te njihove plodove nakon žetve, odnosno berbe. Polifagni je uzročnik bolesti koji parazitira na preko 400 biljnih vrsta iz 75 porodica (Boland i Hall, 1994.). Čini štete na brojnim kultiviranim vrstama, kao što su suncokret, soja, uljana repica, lucerna, duhan, grah, rajčica, krastavac, mrkva, ali ima domaćine i među korovnim vrstama kao što su, primjerice, mračnjak (*Abutilon theophrasti* Medick.), limundžik (*Ambrosia artemisiifolia* L.), čičak (*Xanthium strumarium* L.) te oštrodlakavi šćir (*Amaranthus retroflexus* L.) (Jurković i Ćosić, 2004., Ćosić i sur., 2008.).

Uzročnik bijele truleži široko je rasprostranjen, ali prevladava u područjima s relativno hladnijim i vlažnijim vremenom. Optimalne su temperature za razvoj *S. sclerotiorum* između 15-21°C, uz visoku vlažnost zraka. Na površini napadnutih organa gljiva stvara bijeli micelij, unutar kojeg se razvijaju crne sklerocije, koje predstavljaju osnovni izvor zaraze (Hoes and Huang, 1975.).

Na razvoj kulture *S. sclerotiorum* u laboratoriju utječu različiti čimbenici. Gljiva na hranjivim podlogama stvara bijeli micelij te crne sklerocije. Porast i izgled micelija, kao i razvoj, razmještaj, boja i veličinu sklerocija uvelike mogu ovisiti o podlozi, temperaturi, pH vrijednosti te samom izolatu *S. sclerotiorum*. Kim i Cho (2003.) navode da je micelij *S. sclerotiorum* izoliran iz rajčice, patlidžana,

paprike i krumpira na PDA podlozi bijele do sive boje. Minimalna temperatura za razvoj micelija iznosi 1°C, a maksimalna 30°C, dok se optimalna temperatura kreće 22-24°C. Sklerociji su crni, okruglastoga do nepravilnoga oblika, njihov broj po Petrijevoj zdjelici kreće se 18-40, a veličina 0,6-10 x 0,6-6,5 mm. Huang (1985.) navodi da oblik sklerocija često ovisi o domaćinu pa su sklerociji formirani na šafranu (*Crocus sativus* L.) konusnog oblika, a na zlatnome grahu (*Vigna radiata* var. *radiata* (L.)R.Wilczek) cilindrični. Razvoj micelija i sklerocija na podlogama ovisi i o pH vrijednosti. U neutralnoj ili alkalnoj sredini razvoj je sklerocija inhibiran. Prema Coung i Dohroo (2006.), najveća količina suhe mase micelija te broj i masa sklerocija dobiveni su na pH 5, dok na pH 7,5-8 uopće nije došlo do njihovoga formiranja.

Cilj rada bio je u laboratorijskim uvjetima utvrditi ovisi li porast micelija i formiranje sklerocija gljive *S. sclerotiorum* o hranjivome supstratu i temperaturi.

MATERIJAL I METODE

Istraživanje utjecaja supstrata (krumpir dekstrozni agar (PDA), podloga od mrkve) i temperature (15, 22

(1) Ivan Mikić, student, prof. dr. sc. Jasenka Ćosić (jasenka.cosic@pfos.hr); izv. prof. dr. sc. Karolina Vrandečić – Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Kralja Petra Svačića 1d, 31000 Osijek; (2) Zvonko Radan, dipl. ing. – Fermopromet d.d., Srednja 12, Novi Beždan, 31322 Baranjsko Petrovo Selo

i 30°C) na razvoj micelija i sklerocija gljive *S. sclerotiorum* provedeno je u Laboratoriju za fitopatologiju Poljoprivrednoga fakulteta u Osijeku. Gljiva je izolirana s presadnica duhana u travnju 2013. godine.

PDA i podloga od mrkve pripremljene su na standardni način i razlivena u Petrijeve zdjelice promjera 90 mm. Inokulacija supstrata obavljena je:

- kružnim isječcima PDA podloge promjera 5 mm s micelijem gljive koji je prethodno uzgojen također na PDA, kao standardnome supstratu,
- dezinficiranim (70% etanol, 2 min.) pojedinačnim sklerocijima podjednake veličine.

Inokulirano je po tri Petrijeve zdjelice za svaki supstrat i temperaturu.

Nakon toga Petrijeve zdjelice inkubirane su na 15, 22 i 30°C u termostatskim komorama, pri svjetlosnom režimu 24 sata tama. Razvoj micelija i sklerocija praćen je tijekom 14 dana. Statistička analiza podataka (ANOVA, LSD test) obavljena je uporabom programa Statistica for Windows.

REZULTATI I RASPRAVA

Istraživanjima je utvrđeno da hranjiva podloga i temperatura značajno utječu i na porast micelija i na razvoj sklerocija *S. sclerotiorum*. Rezultati su prikazani u Tablicama 1., 2. i 3.

Najbrži početni porast micelija (3. dan od precijepljivanja) bio je na PDA podlozi i temperaturi 22°C ($P=0,01$). Pri tomu je micelij gljive razvijen iz precijepljenoga micelija ispunio cijelu Petrijevu zdjelicu promjera 90 mm, a promjer kolonija formiranih iz sklerocija iznosio je 72 mm. Najsporiji početni porast micelija ($P=0,01$) utvrđen je na 30°C (10,0 mm promjer kolonija iz micelija). Kada je PDA supstrat inokuliran sklerocijima, razvoj micelija nakon tri dana nije zabilježen (Tablica 1.).

Na podlozi od mrkve početni razvoj micelija bio je statistički vrlo značajan (iz micelija), odnosno značajno brži (iz sklerocija) pri uzgoju na 15°C u odnosu na ostale istraživane temperature.

Tablica 1. Utjecaj podloge i temperature na razvoj micelija *S. sclerotiorum* (3. dan)

Table 1. The influence of nutrition media and temperature on *S. sclerotiorum* mycelium development (3rd day)

Temperatura Temperature	Promjer kulture gljive (mm) Diameter of fungal colony (mm)			
	PDA		Mrkva - Carrot	
	Micelij Mycelium	Sklerocij Sclerotia	Micelij Mycelium	Sklerocij Sclerotia
15°C	65,0	28,5	14,0	3,5
22°C	90,0	72,0	1,5	0
30°C	10,0	0	0	0
LSD 0,05 0,01	4,76	5,33	1,49	2,90
	7,21	8,07	2,56	4,40

Micelij sedam dana starih kultura gljive uzgajanih na PDA i inkubiranih na 15 i 22°C bio je dobro razvijen, bijele boje i potpuno je pokrio površinu Petrijeve zdjelice (Tablica 2.) te je rast gljive na tim temperaturama bio statistički vrlo značajno brži u odnosu na razvoj gljive na 30°C. Na podlozi od mrkve najbrži razvoj gljive utvrđen je na 15°C (69 mm kolonija iz micelija; 22,5 mm kolonija iz sklerocije).

Tablica 2. Utjecaj podloge i temperature na razvoj micelija *S. sclerotiorum* (7. dan)

Table 2. The influence of nutrition media and temperature on *S. sclerotiorum* mycelium development (7th day)

Temperatura Temperature	Promjer kulture gljive (mm) Diameter of fungal colony (mm)			
	PDA		Mrkva - Carrot	
	Micelij Mycelium	Sklerocij Sclerotia	Micelij Mycelium	Sklerocij Sclerotia
15°C	90,0	90,0	69,0	22,5
22°C	90,0	90,0	5,0	11,0
30°C	24,5	24,0	9,5	9,0
LSD 0,05 0,01	2,90	1,76	6,56	4,42
	4,40	2,67	9,94	6,70

I nakon 14 dana inkubacije na PDA podlozi na 30°C promjer tijela gljive bio je za gotovo 50% manji u odnosu na promjer micelija na nižim temperaturama (Tablica 3.). Na podlozi od mrkve najbolji porast utvrđen je na 15°C (razvoj gljive iz micelija), odnosno na 22°C (razvoj gljive iz sklerocije).

Tablica 3. Utjecaj podloge i temperature na razvoj micelija *S. sclerotiorum* (14. dan)

Table 3. The influence of nutrition media and temperature on *S. sclerotiorum* mycelium development (14th day)

Temperatura Temperature	Promjer kulture gljive (mm) Diameter of fungal colony (mm)			
	PDA		Mrkva - Carrot	
	Micelij Mycelium	Sklerocij Sclerotia	Micelij Mycelium	Sklerocij Sclerotia
15°C	90,0	90,0	90,0	63,0
22°C	90,0	90,0	22,5	90,0
30°C	47,5	50,0	19,5	7,0
LSD 0,05 0,01	2,90	5,77	6,98	5,73
	5,77	8,74	10,58	8,68

Dobiveni rezultati u skladu su s rezultatima drugih istraživača, prema kojima je porast micelija najbrži, a micelij najbujniji na PDA podlozi, dok je na nekim drugim podlogama, kao što su podloga od kukuruznoga brašna i lista salate (Cuong i Dohroo, 2006.) ili malt agaru (Jeon i sur., 2006.) značajno slabiji. Slabiji porast micelija na nekim podlogama moguć je zbog prisutnosti inhibitornih tvari ili za gljivu nepovoljnoga nutritivnoga sastava. Nedostatak fosfora, kalija, magnezija i sumpora može inhibirati i usporiti rast micelija i formiranje sklerocija *S. sclerotiorum* (Purdy i Grogan, 1954.).

Prema brojnim autorima (Spotts i Cervantes, 1996., Cuong i Dohroo, 2006., Jeon i sur., 2006.), optimalna temperatura za razvoj micelija *S. sclerotiorum* na PDA podlozi kreće se između 20 i 25°C, dok se na višim temperaturama (30°C) micelij ili ne formira ili je porast vrlo slab. Kim i Cho (2003.) navode da je minimalna temperatura za formiranje micelija 1°C.

Na dinamiku formiranja sklerocija, kao i na njihov broj i veličinu, također su značajno utjecali vrsta hranjive podloge i temperatura. Do formiranja sklerocija na PDA podlozi došlo je nakon što se micelij proširio do ruba Petrijeve zdjelice.

Na 15°C početak njihovoga formiranja utvrđen je nakon 5 dana i to jednako kod kultura razvijenih iz micelija i kod onih razvijenih iz sklerocija. Na 20°C u kulturama razvijenim iz sklerocija početak formiranja novih utvrđen je nakon 5 dana, a u kulturama razvijenim iz micelija nakon 7 dana. Sklerociji su se oblikovali na rubnome dijelu kolonije, što je u skladu s istraživanjima Kohna (1979.), koji navodi da se sklerociji u kulturi razvijaju najčešće na marginama kolonije. Humpherson-Jones i Cooke (1977.) navode da se, uz taj najčešći raspored, u kulturi sklerociji mogu stvarati i tako da formiraju nizove koncentričnih krugova ili neki drugi nepravilan raspored.

Formiranje sklerocija utvrđeno je samo na PDA. Dvanaestoga dana od postavljanja pokusa na temperaturi 15°C prosječan broj sklerocija u jednoj Petrijevoj zdjelici bio je 17 u kulturama razvijenim iz sklerocija, odnosno 13 u kulturama razvijenim iz micelija. Na 30°C nije bilo njihovoga razvoja. Prema dostupnoj literaturi, optimalna je temperatura za formiranje sklerocija između 15 i 25°C, iako se ono odvija u širokome temperaturnome rasponu 0-30°C (Adams i Tate, 1976.).

Sklerocije formirane na nižoj temperaturi bile su krupnije od sklerocija razvijenih na višoj temperaturi. Kohn (1979.) navodi da kulture *S. sclerotiorum* uzgajane na PDA podlozi ili diskovima mrkve pri temperaturi 15-20°C kontinuirano proizvode krupnije sklerocije. Abawi i Grogan (1975.), Murakawa i sur. (1975.) te Adams i Tate (1976.) utvrdili su manji broj krupnijih sklerocija na nižim temperaturama. S druge strane, Purdy (1956.) navodi da se najveće sklerocije formiraju pri temperaturi 25°C.

Iako su sklerocije *S. sclerotiorum* najčešće okruglaste do cilindrične, mogu biti i drugih, vrlo nepravilnih oblika. Prema nekim autorima, oblik sklerocija vrlo često ovisi i o domaćinu iz kojeg je patogen izoliran (Kohn, 1979., Huang, 1985.). Naš izolat gljive formirao je na obje temperature sklerocije okruglastog oblika.

ZAKLJUČAK

Rezultati istraživanja pokazali su da hranjiva podloga i temperatura imaju značajan utjecaj na razvoj micelija te na brojnost i veličinu sklerocija gljive *S. sclerotiorum*. Neovisno o temperaturi, razvoj micelija bio je bujniji na PDA podlozi u odnosu na podlogu od mrkve. Porast micelija bio je slabiji na temperaturi 30°C.

Sklerociji su se formirali samo na PDA podlozi i to na 15 i 20°C, dok na 30°C niti na PDA podlozi nije bilo formiranja sklerocija.

LITERATURA

1. Abawi, G.S., Grogan, R.G. (1975): Source of Primary Inoculum and Effects of Temperature and Moisture on Infection of Beans by *Whetzelinia sclerotiorum*. *Phytopathology*, 65: 300-309.
2. Adams, P.B., Tate, C.J. (1976): Mycelial germination of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* on soil. *Plant Disease Report*, 60: 515-518.
3. Boland, G.J., Hall, R. (1994): Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 16: 93-108.
4. Coung, N.G., Dohroo, N.P. (2006): Morphological, cultural and physiological studies on *Sclerotinia sclerotiorum* causing stalk root of cauliflower. *Omonrice*, 14: 71-77.
5. Ćosić, J., Vrandečić, K., Jurković, D., Ereš, I., Poštić, J. (2008.): Parazitna mikopopulacija zrna soje. *Poljoprivreda*, 14(1): 5-8.
6. Hoes, J.A., Huang, H.C. (1975): *Sclerotinia sclerotiorum*: viability and separation of sclerotia from soil. *Phytopathology*, 65: 1431-1432.
7. Huang, H. C. (1985): Factors affecting myceliogenic germination of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytopathology*, 75: 433-437.
8. Humpherson-Jones, F.M., Cooke, R.C. (1977): Morphogenesis in sclerotium-forming fungi II. Rhythmic production of sclerotia by *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. *New Phytology*, 78: 181-187.
9. Jeon, Y.-J., Kwon, H.-W., Nam, J.-S., Kim, S.H. (2006): Characterization of *Sclerotinia sclerotiorum* Isolated from Paprika. *Mycobiology*, 34(3): 154-157.
10. Jurković, D., Ćosić, J. (2004.): Bolesti suncokreta. U: *Suncokret (Helianthus annuus L.)*, Vratarić i sur. (ur.). *Poljoprivredni institut Osijek*, 283-328.
11. Kim, W.G., Cho, W.D. (2003): Occurrence of *Sclerotinia* Rot in Solanaceous Crops Caused by *Sclerotinia* spp. *Mycobiology*, 31(2): 113-118.
12. Kohn, L. M. (1979): A monographic revision of the genus *Sclerotinia*. *Mycotaxon*, 9: 365-444.
13. Murakawa, S., Funakawa, S., Satomura, Y. (1975): Some physical and chemical on formation of sclerotia in *Sclerotinia libertiana* Fuckel. *Agricultural and Biological Chemistry*, 39: 463-468.
14. Purdy, L.H., Grogan, R.C. (1954): Physiological studies of *Sclerotinia sclerotiorum* in liquid and agar culture. *Phytopathology*, 44: 36-38.
15. Spotts, R.A., Cervantes, L.A. (1996): *Sclerotinia* Rot on Pears in Oregon. *Plant Disease*, 80: 1262-1264.

THE INFLUENCE OF NUTRITION MEDIA AND TEMPERATURE ON *Sclerotinia sclerotiorum* DEVELOPMENT

SUMMARY

The aim of this study was to investigate the influence of nutrition media (PDA, carrot agar) and temperature (15, 22 and 30°C) on growth and mycelium development As well as sclerotium formation of Sclerotinia sclerotiorum. The experiment was set up under laboratory conditions in year 2013. Statistical analysis showed that nutrition media and temperature had significant influence on mycelim development and formation on sclerotia. Mycelial growth was significantly higher on PDA and at 15 and 20°C. Sclerotia are formed only on PDA and the two lower temperatures. Sclerotia formed at 15°C were bigger than sclerotia formed at 20°C.

Key-words: *Sclerotinia sclerotiorum, PDA, carrot agar, temperature*

(Primljeno 21. listopada 2014.; prihvaćeno 11. studenoga 2014. – Received on 21 October 2014; accepted on 11 November 2014)