

UDC 582.281.144'632.531:582.635.38(497.1)=362

PHYTOPHTHORA CITRICOLA SAWADA NOVI
PARAZIT HMELJA U JUGOSLAVIJI

(With Summary in English)

BOGDAN CVJETKOVIĆ, *MILJEVA KAČ i *MARTA DOLINAR

(Institut za zaštitu bilja FPZ-a Zagreb i *Institut za hmeljarstvo, Žalec)

Primljeno 31. 10. 1986.

Opisani su simptomi u nas dosad nepoznate bolesti hmelja. Iz korjenjaka sa simptomima izolirana je gljiva. Na bazi morfoloških i kulturalnih osobina izolat je determiniran kao *Phytophthora citricola* Sawada. To je prvi nalaz te vrste u Jugoslaviji.

Uvod

O bolestima hmelja u našoj stručnoj literaturi ima vrlo malo podataka (Škorić 1926, Blattny 1927), a oni su starijeg datuma. U posljednjih desetak godina zapaženo je da dolazi do venuća hmelja. Analizom pojedinih uzoraka ustanovljeno je da venuće nekih biljaka uzrokuju gljive *Verticillium albo-atrum* i *Verticillium dahliae* (Dolinar 1974).

Međutim, kod nekih biljaka je dolazilo do venuća, ali su se simptomima razlikovali od onih koje izazivaju vrste *Verticillium*. Poznato je (Burgess A. H. 1964) da i druge gljive mogu izazvati venuće hmelja. Stoga smo poduzeli istraživanja za točniju identifikaciju uzroka sušenja hmelja. U radu ćemo iznijeti karakteristike izolirane gljive.

Materijal i metode

Porijeklo istraživanog materijala

U hmeljarniku kooperanata Instituta za hmeljarstvo in pivovarstvo u Grižah kod Žaleca primijećeno je sušenje hmelja sorte Atlas.

Te godine propalo je 10 % biljaka u tom nasadu. Iduće godine simptomi su se očitovali na 20 % biljaka iste sorte, od kojih se oko 15 % osušilo. Idućih godina simptomi su bili prisutni na 50 % biljaka. U

okolnim hmeljarnicima opazili smo da gotovo u svakom dolazi do venuća većeg ili manjeg broja biljaka.

Na napadnutim biljkama simptomi su se očitovali u gubitku turgora listova koji su zatim postojali klorotični i sušili se. Simptomi su se osobito ispoljavali u doba ljetnih mjeseci. Tada je dolazilo do otpadanja pojedinih listova. Krošnja je ostajala rahlija s manjim brojem listova. Šiškarice su prisilno sazrijevale dobivajući smeđu boju. Neke su biljke odmah propadale, dok su neke pokazivale simptome više godina, a tek onda su se potpuno osušile. Tok bolesti je ovisio o tome koliki je dio korijena zahvaćen parazitom i kako se brzo širio u napadnutom korijenu. Na korijenu ili korijenovom vratu dolazilo je do promjena. Napadnute zone imale su tamnosmeđu boju (Sl. 1a). Korijen je ostajao bez sekundarnog korijenja. Isti simptomi su se javljali i na ožiljenim reznicama (Sl. 1b). I na njima je odumiralo sekundarno korijenje, a napadnuti dio mijenjao je boju i postao tamniji od zdravog dijela.

Uzorke zaraženih korjenjaka sorte Atlas posadili smo u lonce sa sterilnom zemljom u kojoj su oni životarili neko vrijeme. Na taj način imali smo dulje vrijeme na raspolaganju materijal za promatranje i ispitivanje.

Metode izolacije

Pri izolaciji vrsta roda *Phytophthora* iz biljnog tkiva ili tla uobičajene laboratorijske metode ne daju uvijek zadovoljavajuće rezultate. U ovom slučaju koristili smo metodu selektivnog medija (Cvjetković 1982) koji se sastojao od:

Malt agara	0,3 ‰
ampicilina	450 ppm
benomila	20 ppm
kvintozena	100 ppm

Dobiveni izolat označen je oznakom H-Žalec i održavan je na nekoliko hranjivih supstrata (agar od krumpira, malt agar, agar od kukuruznog brašna, agar od graha, V-8 agar), na kojima se pratilo njegovo ponašanje.

Sl. 1. a) Simptomi na stabljici hmelja; b) Simptomi na korijenu hmelja

Fig. 1. a) Symptoms on stem of hop; b) Symptoms on root of hop

Sl. 2. do 6. Izgled kolonija *P. citricola* na raznim supstratima

Fig. 2—6. Appearance of colonies of *P. citricola* on different media

Sl. 2. Krumpir dekstrozni agar

Fig. 2. Potato dextrose agar

Sl. 3. Malt agar

Fig. 3. Malt agar

Sl. 4. Agar od kukuruznog brašna

Fig. 4. Corn meal agar

Sl. 5. V-8 agar

Fig. 5. V-8 agar

Sl. 6. Agar od graha

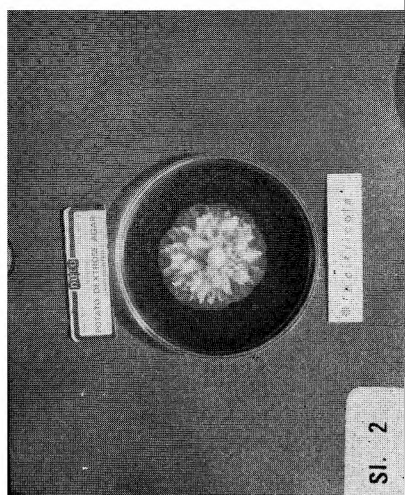
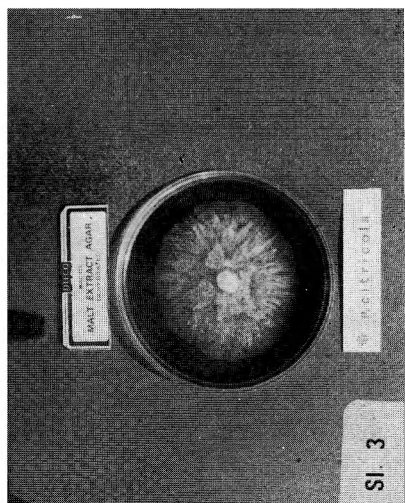
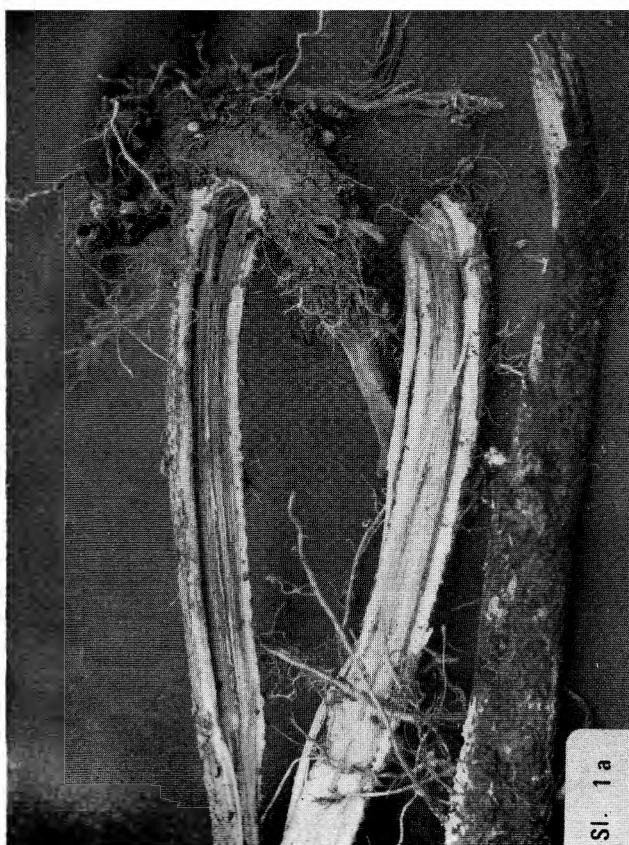
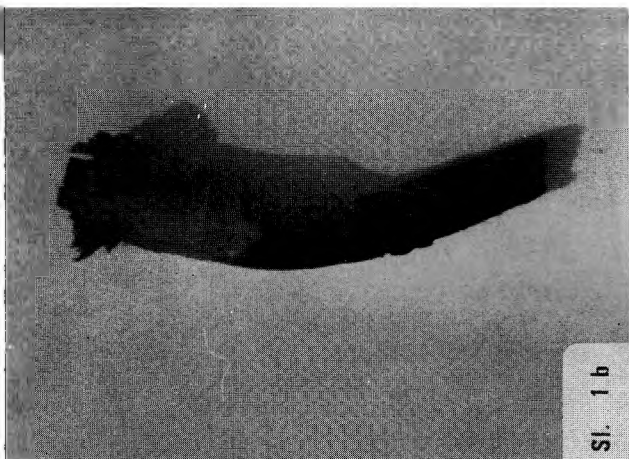
Fig. 6. Lima bean agar

Sl. 7. Izgled sporangija

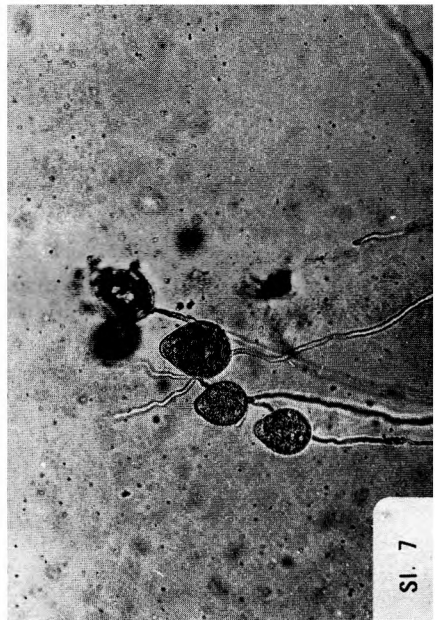
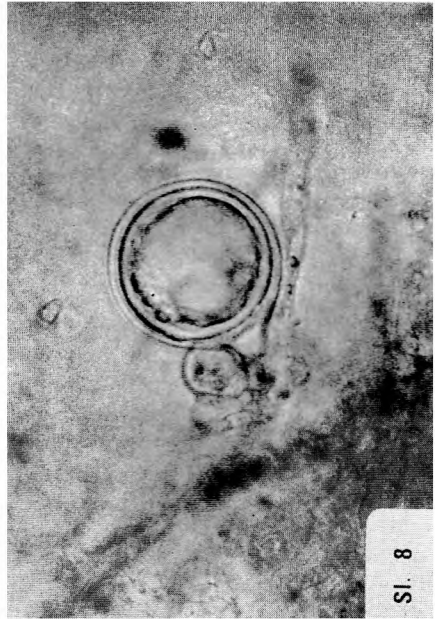
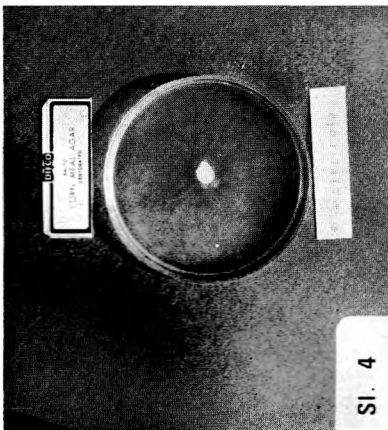
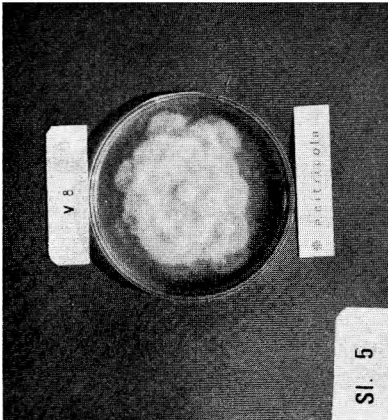
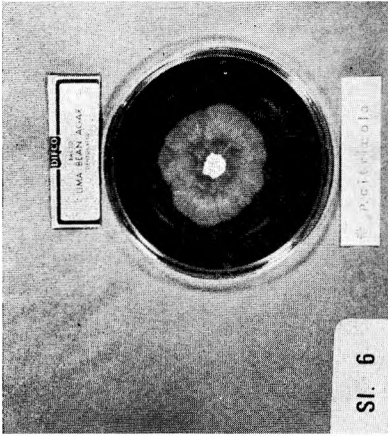
Fig. 7. Sporangia

Sl. 8. Oogonij i paragini anteridij

Fig. 8. Oogonium with paragynous anteridium



Sl. 1—3. — Figs. 1—3.



Sl. 4—8. — Figs. 4—8.

Radi razlikovanja od drugih vrsta toga roda, izolat H-Žalec uzgajan je na podlozi s malahit zelenilom (F r e z z i 1977).

Poznato je da vrste *Phytophthora* različito rastu pri raznim temperaturama pa smo istražili utjecaj temperature na rast micelija, a što nam je služilo u dijagnostičke svrhe.

Rezultati

Koristeći se selektivnom podlogom uspjeli smo iz korjenjaka hmeija izolirati nekoliko izolata. Jedan od izolata označili smo s H-Žalec i njega smo podrobnije obradili.

a) Rast na hranjivim supstratima

Izolat *Phytophthora* sp. koji smo označili kao H-Žalec prenijeli smo na nekoliko podloga i pratili njezino ponašanje na supstratima.

Krumpirov agar (Potato dextrose agar DIFCO). Sl. 2.

Micelij je snježno bijel, sjajan u početku raste u nivou supstrata. Nakon 6 dana pri temp. 20—22° novi micelij prerasta stari i sva kolo nija podsjeća na cvijet koji ima šiljaste latice. Dnevni prirast micelija je 5—7 mm pri temperaturi 20—22°C.

Malt agar (Malt extract agar DIFCO). Sl. 3.

Bijeli sjajni micelij razvija se na nivou supstrata. Postupno micelij izrasta iz supstrata, što je osobito izraženo u zoni oko inokulama. Kolonija je dosta pravilno okrugla s izraženim radijalnim rastom.

Agar od kukuruznog brašna (Corn meal agar DIFCO). Sl. 4.

Bijeli micelij raste radijalno na supstratu tvoreći dosta pravilnu koloniju u obliku kruga. U odnosu na sve ostale ispitane supstrate na ovoj hranjivoj podlozi izolat je imao najveći prirast. Već nekoliko dana nakon inokulacije formiraju se oogoniji i anteridiji u supstratu.

V—8 agar (V—8 agar). Sl. 5.

Na ovom supstratu formira se pahuljasti bijeli izrazito zračni micelij. Novoformirani micelij prerasta stari tako da kolonija ima oblik rozete neravnog ruba. Dnevni prirast kolonije je 9—12 mm pri temperaturi 20—22°C. Kao i prethodno spomenuti, ovaj se supstrat pokazao pogodnim za opažanja vezana na seksualne organe.

Agar od graha (Lima bean agar DIFCO). Sl. 6.

Micelij je bijel raste na supstratu. Na pojedinim mjestima micelij raste intenzivnije pa kolonija ima nepravilno ovalan oblik. Dnevni prirast micelija je 5—8 mm pri temperaturi 20—22°C. Na ovom supstratu formiraju se anteridiji već drugi ili treći dan nakon inokulacije.

b) Rast micelija na supstratu s malahit zelenilom

Iz rezultata prikazanih na tablici 1 može se zaključiti da ovaj izolat podnosi prisutnost zelenila malahit u koncentraciji od 8 ppm kao i nižim koncentracijama.

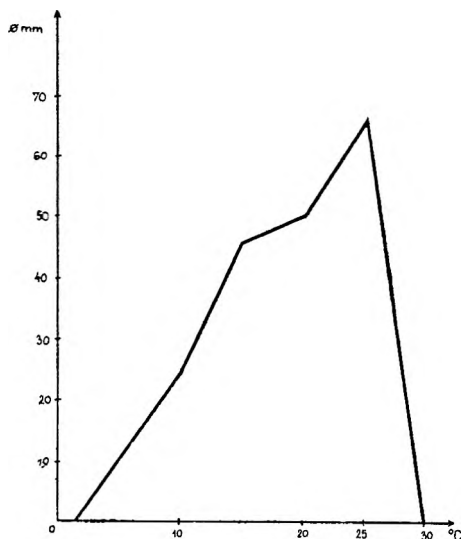
Tablica 1. Utjecaj zelenila malahit na rast micelija
 Table 1. Growth of the mycelum under the action of malachite green

Koncentracija zelenila malahit u supstratu Diferent concentration of malachite green	Rast kolonije Colony growth
1 : 2.000.000	Ne raste No growth
1 : 3.000.000	Rast jedva primjetljiv Narrowly remarkable growth
1 : 4.000.000	Rast vrlo oskudan Very poor growth
1 : 8.000.000	Rast usporen Slacken growth
1 : 12.000.000	Rast normalan Normal growth

c) Utjecaj temperatura na rast micelija

Rast micelija izolata H-Žalec pratili smo agaru od kukuruznog brašna. Vrijednosti unesene u grafikonu (sl. 9.) pokazuju milimetre rasta micelija peti da nakon postavljanja pokusa.

Optimalna temperatura rasta bila je oko 25°C, a pri temperaturi 2 i 30°C micelij je prestao rasti.



Sl. 9. Utjecaj temperatura na rast micelija
 Fig. 9. Growth of the mycelium at different temperatures

d) Morfološke karakteristike

Hife

Hife su imale tipične karakteristike za rod *Phytophthora*. Promjer hifa na agaru od kukuruznog brašna bio je 4—6 μm .

Sporangij (Sl. 7).

Na sporangioforu, koji je uvijek tanji od hifa nastaje sporangij. Malobrojni sporangiji formirali su se na agaru od kukuruznog brašna. Prenosjenjem malih komada agara (nekoliko mm^3) u Petrijevu mineralnu otopinu, uspjeli smo izazvati stvaranje dovoljnog broja sporangija da bismo mogli uočiti karakteristike neophodne za determinaciju. Najveći broj sporangija imao je obrnuto kruškolik do jajast oblik. Papila je bila slabo izražena. Sporangiji nisu otpadali sa sporangiofora, stapka na sporangijima nije primijećena. Dimenzije sporangija su iznosile 33,5 — 56,6 \times 26,6 — 43,2 μm .

Seksualni organi (Sl. 8)

Oogoniji i anteridiji formirali su se bez izuzetaka na supstratima V—8, agaru od kukuruznog brašna, agaru od graha. Oogoniji su bili ovalni, vanjska stijenka im je glatka promjera od 26,6 — 36,6 μm . Anteridiji su bili paragini dugački 9,9 — 16,6 μm . Oospore ispunjavaju oogonij i imale su dimenzije 23,3—33,3 μm .

Hlamidospore nisu primijećene na nijednom supstratu unatoč promatranja u periodu od 4 tjedna.

Izolat (H-Žalec) imao je ove karakteristike:

- Podnosio je prisutnost zelenila malahit u koncentraciji 8 ppm te niže koncentracije.
- Optimalna temperatura rasta iznosila je 25°C, a pri temperaturi +2 i +30°C izolat je prestao rasti.
- Na agaru od kukuruznog brašna, graha i V—8 formirali su se u obliku seksualni organi.
- Sporangiji su imali obrnuto kruškolik do jajast oblik sa slabo izraženom bradavicom.
- Sporangiji su bili na dugačkim sporangioforima i nisu otpadali s njega.
- Izolat je homotaličan, anteridiji su paragini i često diklini.
- Na umjetnim supstratima ne stvara hlamidospore.

Diskusija

Na hmelju prema Novoteljnevnoj (1974) parazitiraju *Phytophthora cactorum* (Leb. et Cohn.) Schroet. i *Phytophthora citricola* (Sawada). Obje su vrste vrlo bliske po morfološkim karakteristikama. Upravo zato dajemo tablicu iz koje se vidi razlika tih dvaju specijesa.

Na bazi razlika iznesenih u tablici 2. vidimo da postoje dovoljne razlike na osnovi kojih se te dvije vrste mogu razlikovati:

Na osnovi morfoloških i kulturalnih odlika izolat (H-Žalec) mogao se identificirati na bazi ključa po Frezziju (1977) kao *Phytophthora cactorum* var. *applanata* (Chester), a prema ključu Kröber (1985) kao *Phytophthora citricola* (Sawada). U oba slučaja radi se o istom specijesu.

Tablica 2. Obilježja vrsta *P. cactorum* i *P. citricola*
 Table 2. Characteristics of *P. cactorum* and *P. citricola*

Osobina	<i>Phy. citricola</i> H-Žalec	<i>Phy. cactorum</i> *
bradavica (papilla)	bradavica slabo izražena	bradavica izražena
oblik sporangija	obrnuto kruškolik — nije elipsoidan ni sferičan	sferičan ili elipsoidan
dimenzije sporangija	33,3—56,6 × 26,6—43,2 μm	33,3—49,9 × 23,0—33,3 μm
držka sporangija (pedicellus)	dugačka ili bez držka	držka kratka
hlamidospore	nikada ne nastaju	uvijek se formiraju 25—35 μm
dimenzije oogonija	26,6—36,6 μm	28—40 μm
dimenzije oospora	23,3—33,3 μm	20—30 μm
anteridij	paragin, većinom diklin	paragin, većinom monoklin
micelij	radijalan	pahuljast
brzina rasta	brži	sporiji

* Podaci za karakteristike vrste *P. cactorum* preuzete su iz originalnog opisa (Schroeter 1886) i (Newhook i sur. 1978).

Pod nazivom *P. citricola* opisao je Sawada 1927. godine izolat koji je potjecao s plodova vrste *Citrus sinensis* sa Formoze. Chester je 1932. godine opisao vrstu *Phytophthora* izoliranu iz jorgovana (*Syringa vulgaris*). Kako se njegov izolat malo razlikovao od *Phytophthora cactorum*, on je smatrao da se radi o varijetetu i nazvao ga je *Phytophthora cactorum* var. *applanata*. Wetherhouse (1957) komparirajući najvjerojatnije originalne materijale Sawade i Chestera, došla je do zaključka da su oba specijesa identična. a prioritet je pripao nazivu *Phytophthora citricola* (Sawada).

*

The authors wish to thank Miss D. J. Stamps, Ph D. Commonwealth mycological Institute Kew London who confirmed our determination.

Literatura

- Blattny, C., 1927: Peronospora des Hopfens (Sbornik vyzhumn ustavu zemedel'skych RČS 27 a, 1—299, Praha.
- Burgess, A. H., 1964: Hops — Fungal and Virus Diseases and their Treatment 132—165, Interscience INC — New York.
- Cvjetković, B., 1982: Neke vrste roda *Phytophthora* s posebnim osvrtom na metode izolacije. Poljopriv. znanstvena smotra 59, 283—302.
- Dolinam, Marta, 1974: Ovelost hmelja — Verticilij, Hmeljar 8, 25—26.
- Frezzi, M. J., 1950: Las especies de *Phytophthora* en la Argentina. Revta Invest. agric. Buenos Aires IV (1), 60—69.

- Kröber, H., 1985: Erfahrungen mit *Phytophthora* de Bary und *Phythium* Pringstem. Mitts. Biol. Bundesanst. Land und Forstwirtschaft Berlin Dahlem 225, 52—55.
- Newhook, F. J., Waterhouse M. Grace and D. Jane Stamps, 1978: Tabular key to the species of *Phytophthora* de Bary. Mycological Papers 143, 1—20.
- Novoteljnova, H. S., 1974: Fitofitorovje gribli. Izdanje Nauka Lenjingrad 85—86.
- Schroeter, J. 1886: U Waterhouse, G., 1970: The genus *Phytophthora* de Bary Mycological Papers 122, 7.
- Skorić, V., 1926: Jedna pogibeljna bolest hmelja *Pseudoperonospora humuli* (Miyab e Takah) Wils. Poljoprivredni Glasnik br. 14—15.
- Waterhouse, Grace, 1957: *Phytophthora citricola* Sawada (Syn. *P. cactorum* var. *applanata* Chester) Trans. Brit. Mycol. Soc. 40, 349—357.

SUMMARY

PHYTOPHTHORA CITRICOLA SAWADA A NEW PARASITE OF HOP IN YUGOSLAVIA

Bogdan Cvjetković, *Miljeva Kač and *Marta Dolinar

(Institute for Plant Protection — Faculty of Agriculture — Zagreb and *Institute for Hop — Zalec)

Hops of the cultivar Atlas showed symptoms of wilting in the region near Žalec in Slovenia. From the roots rot we isolated a variety of *Phytophthora*. That isolate had the following characteristics: the sporangia were inverted pear-shaped or eggshaped and were scarcely papillate. The sporangia did not have a pedicel. The dimensions of the sporangia were $33.3\text{--}56.6 \times 26.6\text{--}43.2 \mu\text{m}$. All antheridia were paragynous; the dimensions of oogonia were $25.5\text{--}36.6 \mu\text{m}$. This isolate did not form chlamydospores. The optimal temperature for growth was $+25^{\circ}\text{C}$, but at $+2^{\circ}\text{C}$ and $+30^{\circ}\text{C}$ the isolate stopped growing. On the basis of cultural and morphological characteristics we concluded that this isolate belonged to the species *Phytophthora citricola* Sawada. The presence of *P. citricola* Sawada in Yugoslavia is described for the first time.

Dr. Bogdan Cvjetković
Institut za zaštitu bilja F. P. Z. Zagreb
Šimunska 25
41000 Zagreb (Jugoslavija)

Dipl. ing. Miljeva Kač i Mr. Marta Dolinar
Inštitut za hmeljarstvo
63310 Zalec (Jugoslavija)