

Uséuplié dr M.:

CLADOSPORIUM HERBARUM (Link) Fr. kao parazit
bijelog jasena -- biologija, ekologija i suzbijanje

CLADOSPORIUM HERBARUM (Link) Fr. as a parasite
of ash — biology, ecology and control

Ovaj rad predstavlja **doktorsku disertaciju** u skraćenom obliku, koja je branjena 9. januara 1965. godine na Šumarskom fakultetu u Beogradu, pred komisijom:

Prof. dr M. Josifović

Prof. dr M. Krstić

Doc. dr P. Marinković

P R E D G O V O R

U našoj zemlji često se zapažaju razne štete, na mnogim vrstama šumskog drveća, koje se pripisuju uticaju gljive Cladosporium herbarum (Link) Fr. Ovoj kosmopolitskoj vrsti nije do sada pridavano mnogo pažnje, jer je ona najčešće pominjana kao običan saprofit. Među tim, posljednjih godina ova gljiva je dovođena u vezu sa mnogim sušenjima sadnog materijala u šumskim rasadnicima, a njen značaj kao prouzrokovача obojenosti drveta (naročito parene bukovine) postaje sve izrazitiji u našoj praksi, gdje je redukcija vrijednosti napadnu tog drveta znatna.

U toku 1960. i 1961. godine zapaženo je intenzivno sušenje sadnica bijelog jasena u rasadnicima i mladim plantažama u Pančevačkom ritu. Poljoprivredni kombinat "Beograd", koji je upravljao ovim objektima, predložio je da se ovaj problem detaljnije prouči i ustanove uslovi nastanka ove pojave i efikasne mjere njenog suzbijanja. Prihvatio sam se ovog zadatka, a istraživanja, čiji se rezultati iznose u ovom radu, obavljena su u periodu od 1961. do 1964. godine.

Ovom prilikom želim da se zahvalim Dr M. Krstiću, profesoru Univerziteta u Beogradu, koji je rukovodio obradom ovog zadatka; profesoru V. Matiću, ranijem dekanu Šumarskog fakulteta u Sarajevu, na omogućavanju organizovanja fitopatoloških istraživanja na ovom Fakultetu; Dr P. Marinkoviću, profesoru Univerziteta u Beogradu; Dr J. Kišpatiću i Dr A. Šariću, profesorima Sveučilišta u Zagrebu, na korisnim sugestijama koje sam dobio u toku izvođenja oglada i obrade podataka; Zavodu za šumsku fitopatologiju i zaštitu drveta Šumarskog fakulteta u Beogradu, Institutu za naučna istraživanja u šumarstvu Srbije, Zavodu za fitopatologiju Poljoprivrednog fakulteta u Zemunu, Poljoprivrednom kombinatu "Beograd", bivšem preduzeću "Bistrica" u Sarajevu i Laboratoriji "Willie Commelin Scholten" u Baarn-u, koji su mi pomogli da se ovaj rad u predviđenom obimu završi.

1. U V O D

U proljeće 1960. godine u Pančevačkom ritu došlo je iznenada do pojave sušenja izbojaka i mladog lišća bijelog jāsena (Fraxinus excelsior L.), što se do tada nije zapažalo u našoj zemlji. Analizom simptoma ove pojave i mikroskopskom kontrolom oblika i veličine reproduktivnih organa, koji su pronađeni na zaraženim izbojcima, pretpostavljali smo da je prouzročivač sušenja gljiva Fusicladium fraxini Aderh., odnosno njena savršena forma Venturia fraxini Aderh., koja se sa sličnim simptomima na jasenu najčešće opisuje. Međutim, docnije, izolacijom organizma, vještačkim infekcijama i reizolacijama, utvrdili smo da je prouzročivač ove pojave gljiva Cladosporium herbarum (Link) Fr. U ovom periodu vršili smo samo zapažanja u pogledu razvoja bolesti, njene štetnosti i posljedica, dok neke konkretne mjere suzbijanja ili minucioznije praćenje njenog razvoja nismo vršili.

Godine 1961. došlo je ponovo do iste pojave. Ovaj put intenzitet bolesti bio je znatno veći. Zahvaćene su bile kako mlade, tada trogodišnje biljke u rasadnicima, tako i neke iz sedmogodišnjih plantacija. Štete na sadnicama u rasadnicima bile su znatno veće. Kontrolisanim zdravstvenog stanja sadnica u jednoj manjoj plantaciji "Tovilšte" sa oko 450 stabala, konstatovali smo da je u junu 1961. godine bilo oko 50% stabala sa zaraženim izbojcima ili sa pojedinačnim sušenjem mladog lišća. Međutim, obzirom da je starost ovih sadnica bila relativno velika (7 godina), zaraza nije bila tako intenzivna, tako da ni posljedice nisu bile velike. S druge strane na sadnicama u ra

sadniku "Kovilovo" u kojem je bijelog jasena bilo na površini od oko 7 hektara, štete su bile znatno veće. Mlade sadnice jasena, naročito na nekim površinama, bile su gotovo 100% napadnute, tako da su i posljedice napada bile teže.

Prvi ogledi suzbijanja ove bolesti postavljeni su u proljeće godine 1961. Tada je prvi put izolovana gljiva, prouzročivač ove pojave, koja je docnije, poslije provjeravanja njene patogenosti i proučavanja uslova za njen razvoj, determinisana kao C. herbarum.

Iako je ova vrsta jedna od najčešćih u prirodi, ipak u novijoj literaturi nema dovoljno podataka da bi se problemi koje izaziva mogli potpunije sagledati. Brojni radovi o ovoj gljivi uglavnom su pisani u prošlom vijeku. Najveći broj njih obradjuje pitanja polimorfnosti vrste, zatim njene taksonomske i morfološke karakteristike, dok jedan manji dio obradjuje i detalje iz biologije gljive. Nedostatak detaljnijih studija o ovoj vrsti treba tražiti u mišljenjima raznih istraživača o parazitnosti ove gljive, koja su često bila suprotna. O tome će nešto kasnije biti više riječi.

Ovo su bili razlozi zbog kojih smo naš zadatak postavili tako da on obuhvata ne samo izučavanja taksonomskih i morfoloških karakteristika, nego i neke detalje iz biologije gljive i mogućnosti njenog suzbijanja.

1.1. Istoriijat dosadašnjih istraživanja

Gljiva Cladosporium herbarum (Link) Fr. opisana je 1816. godine od Link-a. Kao njene sinonime Link je naveo ranije opisane vrste Dematium herbarum Person i Acladium herbarum Link. Medjutim, sam Person, koji je D. herbarum opisao 1801. godine, svrstao je pod istu formu gljivu Byssus caespitosa Roth., koja je bila opisana, i uvedena u literaturu još 1797. godine. Docnije, 1850. godine Fresenius opisuje novu vrstu Penicillium cladosporioides ističući njenu veliku sličnost sa C. herbarum. Godine 1880. Saccardo

ovu vrstu svrstava u nov rod Homodendron.

Neujednačen kriterijum, koji je u to vrijeme bazirao samo na morfološkim karakteristikama, doveo je do toga da su mnoge slične vrste opisivane kao nove. Tek se u drugoj polovini 19. vijeka, razvojem laboratorijske tehnike uzgoja čistih kultura gljiva, pojavila mogućnost isticanja i nekih fizioloških karakteristika, što je doprinjelo da se teškoće oko determinisanja ove vrste, čija je morfološka varijabilnost više puta isticana (R a b e n h o r s t's, 52; F e r r a r i s, 22; D e m m l e r, 17), uveliko smanje. Ovo je pomoglo da su donjniji istraživači (S a c c a r d o, J a n c z e w s k i, S c h o s t a k o w i t s c h i dr.) uspjeli da ustanove sličnost mnogih ranije opisanih vrsta i da ih svrstaju pod jednu formu gljive C. herbarum. Na taj način pojavili su se u literaturi slijedeći sinonimi ove vrste: Byssus caespitosa Roth. (1797.), Dematium brassicae Person (1801.), Dematium herbarum Person (1801.), Dematium conicum Schum. (1803.), Acladium herbarum Link (1809.), Cladosporium herbarum (Link) Fr. (1816.), Penicillium cladosporioides Fresen. (1850.), Dematium pullulans De Bary et Low (1867.).

C. herbarum do sada je konstatovan na velikom broju poljoprivre dnog i šumskog bilja, ponašajući se kao parazit slabosti, prouzrokujući štete uglavnom u vlažnim sezonama. Osim toga ova gljiva je poznata i kao prouzrokovač obojenosti drveta (K r s t i ć, 38).

Za razliku od nekih drugih Cladosporium vrsta koje pokazuju izrazitu patogenost, kao što su na primjer C. fulvum na paradajzu, C. cucumerinum na krastavcima i dr., C. herbarum se mnogo češće sreće kao saprofit. Međutim, u posljednje vrijeme mnoge Cladosporium vrste, među kojima i C. herbarum, za koje se do nedavno smatralo da su obični saprofiti, sve se češće javljaju kao prouzrokovači raznih oboljenja.

Tako je L e p p i k (40) našao da C. herbarum i C. cladosporioides prouzrokuju ozbiljne štete na sjemenu i klijavcima Trigonella foenugraenum u SAD. A n s e l m e i saradnici (2) konstatovali su masovnu pojavu C. herbarum na lanenom sjemenu u Francuskoj. M a t h

u r i saradnici (44) navode štete koje je prouzrokovao C. variable na spanaću. S m o l e k (56) je uspio da vještačkim infekcijama sa C. herbarum ostvari zarazu na plodovima jabuka na kojima ova gljiva prouzrokuje čadjavu pjegavost. B u t i n (9) je, kao fakultativne parazite na lišću topola, našao C. epiphyllum i C. herbarum. Štete od ove posljednje, prema ovom autoru, podsjećaju na štete koje prouzrokuje gljiva Pollaccia elegans. H a r v e y (28) navodi da je C. herbarum glavni prouzročivač šteta u magacinima Kalifornije. R u e h l e, D u f r e n o y - G e n o v o i s, K. i e n h o l z i F i s c h e r (prema D e V r i e s - u, 18) konstatovali su da je C. herbarum vrlo čest prouzročivač truleži raznih plodova u magacinima.

I u našoj zemlji u nekoliko navrata konstatovana je pojava Cladosporium vrsta u patogenoj formi, naročito na poljoprivrednim kulturama. Tako je M i j u š k o v i ć (45,46) konstatovao mjestimičan napad C. herbarum na pšenici i neke nedeterminisane Cladosporium vrste na Agrumu u Crnogorskom primorju. H a d ž i s t e v i ć (27) pominje jak napad C. macrocarpum na spanaću, kao i neke druge vrste iz ovog roda na krompiru u blizini Novog Sada. V u k č e v i ć (62) je konstatovao C. macrocarpum i C. herbarum u nekim rasadnicima spanaća u blizini Prištine, gdje su prouzrokovali ozbiljne štete. A ć i m o v i ć (1) je također našao C. macrocarpum na spanaću i nekim drugim povrtlarskim kulturama u Vojvodini. N u m i ć (49) je našao C. herbarum na žitaricama: Avena sativa, Hordeum sativum, Secale cereale i Triticum vulgare, u blizini Brčkog.

U vezi patogenosti gljive C. herbarum postoje različita, često s uprotna mišljenja. Svi istraživači se slažu da je ova vrsta jedna od najčešćih u prirodi, na raznim mrtvim i živim dijelovima biljaka, u vodi, vazduhu, zemljištu i drugim supstratima. J a n c z e w s k i (prema D e V r i e s - u, 18) navodi da je C. herbarum bio često konstatovan kao parazit i da štete pričinjava samo za vrijeme hladnih perioda. Prema ovom autoru zdrave biljke ne mogu biti inficirane. C o o k i W i l l s o n (prema D e V r i e s - u, 18) i B u t l e r (10)

smatraju da je C.herbarum saprofit koji samo pod izvjesnim uslovima dobija patogene odlike. S c h w a r z (prema D e V r i e s-u, 18) izvještava da je C.herbarum bio prouzrokovač antraknoze debela zapuštenih biljaka breskve u toplim ljevhama. Gljiva je navodno prodrla u biljku kroz rane. U svojoj parazitskoj formi do sada je C.herbarum konstatovan na raznim žitaricama: pšenici, ječmu, ovsu, raži (V i e n n o t - B o u r g i n, 61; R a b e n h o r s t's, 52; N u m i ć, 49), ali isto tako i na drugim poljoprivrednim i šumskim kulturama i zazivajući različite posljedice. O parazitskoj aktivnosti ove gljive na nekim žitaricama pisali su i B o c k m a n n (7) i A r y a - P a n w a r (4). K o s m h a l (prema R a b e n h o r s t's-u, 52) na primjer navodi da je ovu gljivu kao parazita našao na mladim sadnicama Pinus rigida. O štetnosti C.herbarum na sadnicama u četinarskim rasadnicama pisali su N e g e r (prema V i e n n o t - B o u r g i n-u, 61) i K r s t i ć (35). U našoj zemlji ova vrsta konstatovana je i na sadnicama Pinus strobus (K r s t i ć, 37).

Na listu jasena C.herbarum je konstatovan od raznih istraživača o čemu izvještavaju R a b e n h o r s t's (52), O u d e m a n s (50), L o b i k (41). O ovoj vrsti, koja se sve više i više sreće kao problem, S o r a u e r (prema D e m m l e r-u, 17) piše: "nekada se ova gljiva smatrala kao miroljubivi saprofit, dok obimna istraživanja nisu pokazala da je ona i kao parazit slabosti prouzrokovač crne budji na mnogim kulturnim biljkama, na primjer žitima".

Nasuprot ovim mišljenjima B a n c r o f t, B e n n e t i dr. (prema D e V r i e s-u, 18) smatrali su da je C.herbarum obični saprofit.

Najnovija mišljenja istraživača jesu da je C.herbarum saprofit koji dobija parazitske odlike u uslovima koji su povoljni za razvoj gljive a nepovoljni za biljke (B u t l e r, 10; J o s i f o v i ć, 34, i drugi). I D e V r i e s (18), koji je napisao jednu studiju o Uladsporium vrstama, slaže se sa mišljenjima sadašnjih istraživača.

Naša istraživanja su također pokazala da se C.herbarum javlja u parazitskoj formi i da su infekcije moguće pri određenim uslovima sredine.

2. SIMPTOMI BOLESTI I VRIJEME POJAVE NEKROZA NA BIJELOM JASENU

Infekcije u prirodi nastaju rano u proljeće, odmah poslije pojave mladog lišća. Zaraze se ostvaruju konidijama sa micelijem koja se saprofitski razvija na svim dijelovima biljaka, a naročito na ljuspicama pupoljaka. Prvi simptomi bolesti jesu sušenje izbojaka i mladog lišća, koje zaostaje u porastu, dobija mrku boju, kovrdža se i opada (Tabla I). Vršni izbojci prestaju sa daljim porastom, a njihovu ulogu preuzimaju bočni izbojci, zbog čega dolazi do deformisanja sadnica i nešto jačeg grananja. Po spoljnim znacima bolest podsjeća na oboljenja koja prouzrokuju Venturia vrste, a u slučaju jasena na Venturia fraxini Aderh., odnosno njenu nesavršenu formu Fusicladium fraxini Aderh. I B u t i n (9) navodi da je C.herbarum konstatovan na lišću topola sa istim simptomima kao što su oni koje izaziva Venturia populina.

Ukoliko su uslovi za razvoj bolesti povoljni, zaraza se može javiti i na bočnim, novopotjeranim, izbojcima koji se također suše i opadaju. Na ovaj način dolazi do sve veće zakržljalosti sadnica i gubitka u prirastu.

Bolest se ispoljava u relativno kratkom vremenskom periodu, od otvaranja lišnih pupoljaka i pojave mladog lišća pa do konca juna. Izuzetno, u slučaju loših klimatskih prilika, bolest se razvija i u toku ljeta, kada obično ne prouzrokuje veće štete. Docnije, zaražene sadnice se obično regenerišu, ali posljedice napada, o kojima će sada biti riječi, ostavljaju jasan trag ove bolesti.

Slični simptomi ostvareni su i vještačkim infekcijama, ali je u ovom slučaju veličina nekrotičnih pjega bila ograničena. O ovome će na kraju ovog rada biti više riječi.

3. POSLJEDICE BOLESTI

Na sadnicama bijelog jasena u Pančevačkom ritu, koje su bile inficirane sa C. herbarum, nisu zapažene teže posljedice. Potpunog sušenja biljaka nije bilo. Štete su bile ograničene samo na vršne izbojke i mlado lišće. U sezonama koje su u proljeće bogatije padavinama kao što su na primjer bile 1960. i 1961. godina, kada povoljni uslovi za razvoj bolesti duže traju, štete se mogu ispoljiti u deformaciji biljaka i njihovom zakržljavanju. Ta pojava je naročito intenzivna ako dodje do infekcija novih izbojaka. U plantacijama gdje su sadnice nešto jače, stari (prošlogodišnji) izbojci ostaju u toku ljeta goli (Tabla II). Osim toga u toku razvoja bolesti biljke se toliko iscrpljuju da je i njihov visinski prirast neznatan. Ovaj gubitak visinskog prirasta nismo mjerili jer su i drugi uzroci uticali na njegovo smanjenje (hranljivost zemljišta, režim vlažnosti i dr.). Na manjim sadnicama, koje su zbog nekih drugih uzroka zaostale u porastu, obično dolazi do potpunog ugibanja terminalnog izbojka, tako da ovakve biljke u godinama pojave bolesti ne rastu u visinu. Tek narednih godina jedan od bočnih izbojaka postepeno se razvija i preuzima ulogu vršnog izbojka. Najteže posljedice bolest izaziva na sadnicama u rasadnicima, naročito neposredno poslije školovanja biljaka.

4. USLOVI ZA RAZVOJ BOLESTI

4.1. Klimatski uslovi

Iznenadna pojava sušenja izbojaka i mladog lišća bijelog jasena u 1960. i 1961. godini, a zatim naglo povlačenje ove bolesti, navelo nas je da analiziramo klimatske prilike u periodu od 1959. do 1963. godine. Smatrali smo da su relativna vlaga vazduha, padavine i temperatura osnovni klimatski uslovi koji su imali značajnijeg uticaja na pojavu bolesti.

Analizirali smo samo proljetni period, od 1. aprila do 30. juna, koji je za razvoj bolesti jedino i značajan. To je period kada dolazi do kretanja vegetacije, pojave mladih izbojaka i lišća, odnosno period u kojem je isključivo zabilježena ova pojava. Kao kritičan period smatrali smo vrijeme od 20. aprila do 20. maja, dakle, vrijeme neposredno pred otvaranje pupoljaka i pojave prvih mladih zeljastih organa, zbog toga što je baš tada zapažen najintenzivniji razvoj bolesti. U dobnijim mjesecima, naročito u slučaju sušnog perioda, bolest se postepeno povlači.

Klimatski podatci uzeti su od Hidrometeorološkog zavoda Srbije u Beogradu, za kontrolnu stanicu Padinska Skela.

4.11. Relativna vlaga vazduha

Srednje vrijednosti relativne vlage vazduha za period od 1. aprila do 30. juna, u toku pet godina (1959. do 1963.), prikazane su grafički (Grafikon 1.).

Iz ovog grafičkog prikaza vidimo da su izlomljene linije, sa kojima su predstavljene vrijednosti relativne vlage, u početku aprila grupisane u jedan snop sa približno istim kolebanjima. Ovaj period godine bio je, u pogledu uslova vlažnosti vazduha, približno isti za sva analizirana godišta. Međutim, baš u periodu koji smo mi označili kao kritičan ove linije se razdvajaju. U gornjem dijelu grafikona, sa visokom relativnom vlagom vazduha izdvajaju se linije za 1960. i za 1961. godinu, od onih za 1962. i 1963. godinu, koje su sa znatno nižim vrijednostima. Linija koja prikazuje vlagu vazduha u 1959. godini nalazi se približno u sredini.

Razlike u uslovima relativne vlage vazduha za vrijeme kritičnog perioda 1960. i 1961. godine, u uporedjenju sa istim periodom naredne 1962. i 1963. godine vrlo su velike. U 1960. godini srednja vrijednost relativne vlage iznosi 81%, a u 1961. godini čak 86%. Međutim, 1962. godine vlažnost vazduha naglo pada i iznosi samo 59%. U 1963. godini niska relativna vlaga vazduha se ponovo bilježi i ona izno



si 66%. Naročito pada u oči razlika u visini relativne vlage u kritičnom periodu između 1961.godine, kada je zabilježen najjači intenzitet sušenja sadnica jasena, i 1962.godine, kada ove pojave više nije bilo. Ova razlika iznosi 27%. Očigledno je, dakle, da su prilike u pogledu uslova vlage u 1960. i 1961.godini bile vrlo povoljne za razvoj bolesti.

Prosječna vrijednost relativne vlage vazduha za period od tri mjeseca (1.aprila do 30.juna) bila je u pojedinim godinama slijedeća: 71% (1959.), 80% (1960.), 77% (1961.), 65% (1962.) i 70% (1963.). Ovdje su razlike nešto manje zbog poboljšanja klimatskih prilika u junu, ali se ipak može zapaziti da su 1960. i 1961.godina bile bogatije vlagom vazduha od 1962. i 1963.godine.

4.12. Padavine

Broj kišnih dana i količina padavina za isti period od 1959.do 1963.godine predstavljen je grafički (Grafikon 2.). Analizirajući ove podatke dolazi se do identičnih zaključaka kao u slučaju uslova relativne vlage vazduha.

Tabela 1. Padavine u periodu 1959. - 1963.godine

Table 1. Rainfall in the period 1959 - 1963.

Godina	Period 1.april - 30.juni		Kritičan period 20.april - 20.maj	
	Broj kišnih dana	Padavine mm	Broj kišnih dana	Padavine mm
1959	31	177,7	10	59,0
1960	32	142,7	11	31,3
1961	32	205,5	14	96,3
1962	20	147,5	2	5,0
1963	27	120,0	6	43,0

Broj kišnih dana i ukupnu količinu padavina, radi boljeg uvida, prikazali smo i tabelarno (Tabela 1.). Ovdje se lako zapažaju velike razlike u broju kišnih dana u kritičnom periodu između 1961. i 1962.godine. U ovom periodu 1961.godine bilo je ukupno 14 kišnih dana, što praktično znači da je svaki drugi dan padala kiša. Ukupna ko

ličina padavina iznosila je 96,3 mm. Ranije je napomenuto da je ta da bio najintenzivniji razvoj bolesti. U 1962.godini, u istom periodu, bila su svega 2 kišna dana, sa ukupnom količinom padavina od 5 mm. Praktično se može reći da je ovaj period bio vrlo sušan. Ni 1963.godina u pogledu padavina nije bila mnogo bogatija. U kritičnom periodu bilo je 6 kišnih dana sa ukupno 43 mm padavina.

4.13. Temperatura

Srednje dnevne temperature za tri proljetna mjeseca (april, maj i juni) prikazane su grafički (Grafikon 2.) i tabelarno (Tabela 2.). Analizirajući ove podatke nismo utvrdili ubjedljivije razlike u temperaturnim kolebanjima između pojedinih godišta. Međutim, izgleda da su uslovi temperature u aprilu, u godinama pojave bolesti, imali uticaja na tok procesa infekcija. Zapaža se, naime, da su srednje dnevne

Tabela 2. Srednje dnevne temperature
Table 2. Mean daily temperatures

Godina	Srednja dnevna temperatura °C	
	1.april - 30.juni	20.april - 20.maj
1959	15,7	13,9
1960	15,6	13,0
1961	16,7	14,0
1962	16,1	16,1
1963	16,9	16,2

ne temperature u prve dvije dekade aprila relativno visoke, što je moglo uticati na pojačanje fizioloških procesa mladih biljaka. U trećoj dekadi, dolazi, međutim, do naglog pada temperature, što je svaka ko imalo izvjesnog negativnog uticaja na dalji razvoj biljaka, naročito na one koje su bile razvile nov list. Nasuprot ovakvim uslovima u godinama pojave bolesti, u ostalim godištim zapaža se tendencija postepenog porasta srednje dnevne temperature, počev od 1.aprila pa do konca juna, iako ima povremenih kolebanja. Razlike u srednjim dnevni temperaturama u kritičnom periodu, iako nisu velike, ukazuju na nejednake temperaturne uslove u pojedinim godinama.

Što se tiče minimalnih temperatura, koje su prikazane tabelarno (Tabela 3.), one su u kritičnom periodu iznosile: 0,5°C u 1959. godini (zabilježena 21. aprila), -1,5°C u 1960. godini (zabilježena 27. aprila), 4°C u 1961. godini (zabilježena 14. maja), 3,2°C u 1962. godini (zabilježena 2. maja) i 5°C u 1963. godini (zabilježena 29. aprila). Moglo bi se prema tome očekivati da je temperatura od -1,5°C, koja je zabilježena 27. aprila 1960. godine, izazvala štetne posljedice na biljkama ako su ove u tom trenutku imale otvorene pupoljke. U toku naših istraživanja u Pančevačkom ritu zapazili smo da listanje jasenovih sadnica počinje baš u ovo vrijeme, tako da je pojava C. herbarum

Tabela 3. Minimalne temperature po dekadama
Table 3. Minimum temperatures

Godina	april			maj			juni		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III
1959	-0,2	3,0	0,5	3,5	9,5	8,0	9,0	10,0	12,0
1960	2,0	4,5	-1,5	1,5	6,5	9,0	12,0	11,0	10,0
1961	3,5	3,5	7,5	7,5	4,0	8,0	10,5	9,0	10,5
1962	0,6	4,5	6,8	3,2	4,7	6,7	2,0	8,5	8,5
1963	-3,5	4,6	5,0	5,5	7,5	7,9	7,5	10,0	7,5

mogla biti sekundarna. Međutim, u istom ovom periodu 1961. godine temperatura nije padala ispod 4°C, tako da se eventualne sumnje, koje se odnose na štetan uticaj niske temperature, u ovom periodu mogu zanemariti.

4.14. Zaključak

Analizirajući klimatske prilike u Pančevačkom ritu za mjesec april, maj i juni u periodu od 1959. do 1963. godine, zaključili smo da su 1960. i 1961. godina obilovale padavinama i da je vlažnost vazduha bila visoka. Naprotiv, 1962. i 1963. godina bile su uglavnom suhe.

Uska veza između uslova visoke vlažnosti i intenzivnog razvoja Cladosporium vrsta bila je od raznih istraživača više puta istaknuta. Tako G ě u m a n n (25) navodi da se C. fulvum bolje razvija u zemljištima sa većim sadržajem vode. U takvim slučajevima i inkubac

ioni period je kraći, a razvoj nekrotičnih pjega brži. Isto tako Gallova y (23) i Smal l (54) konstatuju da su relativna vlaga i optimalna temperatura za razvoj Cladosporium vrsta najznačajniji faktori o kojima ovisi veličina šteta. Slična zapažanja konstatovali su i drugi istraživači. Hađžišćević (27) je analizirao klimatske prilike za proljeće 1953. godine, kada je primjećena pojava C. macrocarpum u jakom intenzitetu na spanaću, i utvrdio da je upravo taj period obilovao vlagom.

Naše analize također pokazuju da je korelacija između vlažnosti i razvoja bolesti bila pozitivna.

4.2. Ostali uslovi

Pored klimatskih uslova, koji su bez sumnje od presudnog značaja za razvoj bolesti, i neki drugi faktori su uticali na intenzitet šteta koje je prouzrokovao C. herbarum. Posmatrajući ovu pojavu u Pančevačkom ritu i u nekim rasadnicima u blizini Sarajeva ("Sedrenik" i "Slatina"), primjetili smo da je najintenzivniji razvoj bolesti za bilježen na sadnicama jasena prvih godina poslije presađivanja. Tako na primjer sadnice bijelog jasena u rasadniku "Kovilovo" u Pančevačkom ritu, na kojima je sušenje bilo najjače, zasađene su u proljeće 1960. godine pošto su prethodno bile uzgajane jednu godinu u sjemeništu. Na ostalim površinama, gdje su uzgajane starije sadnice jasena, bolest je bila manje značajna. Ovo navodi na zaključak da intenzitet razvoja bolesti ovisi i od starosti sadnica i da najviše stradaju one do treće godine. U prilog ovakvom zaključku idu i zapažanja koja su vršena u proljeće 1964. godine. U ovoj godini klimatski uslovi su bili vrlo povoljni za razvoj bolesti, ali je pojava C. herbarum imala samo sporadičan karakter.

Za nastanak infekcija i dalji razvoj bolesti uticale su, dakle, i predisponirane biljke, koje poslije presađivanja u proljeće trpe izvjesno vrijeme, tako da u slučaju povoljnih klimatskih prilika dolazi lako do razvoja bolesti. Ovo su potvrdile i vještačke infekcije

koje smo vršili u rasadniku "Sedrenik" pored Sarajeva, što će se razmatrati docnije.

Pored navedenih uslova i stagnirajuća voda u zemljištu ima vjerovatno velikog značaja za pojavu bolesti. U rasadniku "Kovilovo" u Pančevačkom ritu, na našoj ogleđnoj površini, zapažene su mikrodeprese, na kojima se u proljeće dugo zadržava visok nivo podzemne vode i na kojima su sadnice znatno slabije razvijene nego na drugim površinama. Nepovoljni uslovi režima vode u zemljištu i nepovoljna aeracija uticali su na slabljenje kondicije mladih biljaka. Osim toga i relativna vlaga vazduha bila je na ovaj način u depresijama povećana, što je, kako ćemo docnije vidjeti, neophodno za klijanje konidija C. herbarum. Zakržljale i deformisane biljke bile su najčešće zapažene baš na ovim površinama.

Prema tome, često zabarivanje zemljišta u uslovima čestih kiša u periodu visinskog prirašćivanja biljaka, kao i starost sadnica imaju značajnog uticaja na intenzivan razvoj bolesti.

I najzad, prema stranim istraživačima, a i prema našim zapažanjima, izvjesnu ulogu u procesu infekcije biljaka sa C. herbarum imaju i lisne vaši, o čemu će docnije biti još riječi.

5. EKSPERIMENTALNI RAD

5.1. Taksonomske i morfološke karakteristike gljive

C.herbarum

Za određivanje taksonomskih i morfoloških karakteristika gljive poslužili smo se čistim kulturama, koje su dobijene višestrukim i zolacijama i reizolacijama. Kulture su uzgajane na mineralnoj podlozi Czapek-agar i na podlozi krompir dekstroznog agara. Starost kultura u vrijeme njihove upotrebe bila je 3 mjeseca. Posmatrali smo veličinu i oblik konidija i konidiofora, njihovu boju i način obrazovanja. Podaci o veličinama obradjeni su varijacionom statistikom i prikazani su tabelarno (Tabele 4., 5. i 6.). Oznake u ovim tabelama su slijedeće: M = srednja vrijednost, m = greška srednje vrijednosti, s = standardna devijacija, V = varijacioni koeficijent ($\frac{s}{m}100$), n = broj mjerenja.

5.1.1. Konidije

Veličina i oblik. Konidije C.herbarum su različite veličine i oblika, tako da gotovo i ne mogu da posluže kao sigurna karakteristika za određivanje vrste. Prema našim mjerenjima (Tabele 4. i 5.) je dnoćelične konidije razvijene na Czapek-agar podlozi imaju prosječ-

Tabela 4. Veličine jednoćeličnih konidija u mikronima

Table 4. Size of one-celled konidia

	Podloga	M ± m	s	V.	n	Var.	širina
dužina	Czapek	9,07	0,49	1,78	19,62	100	6,20 - 16,43
	Krompir	9,38	0,50	1,82	19,40	100	6,20 - 15,50
širina	Czapek	4,78	0,12	0,43	8,99	100	3,72 - 8,99
	Krompir	5,37	0,27	0,97	18,06	100	3,72 - 9,30

nu veličinu 9,07 x 4,78 mikrona, a dvoćelične, koje su obično znatno krupnije, 13,54 x 5,37 mikrona. Konidije razvijene na krompir dekstroznom agaru su nešto veće.

Kao što se iz tabele 4 vidi, veličine jednoćeličnih konidija se kreću od 6,20 do 16,43 mikrona na Czapek-agar podlozi, odnosno 6,20 do 15,50 mikrona na krompir dekstroznom agaru. Variranjia veličine se ptiranih konidija još su izraženija (Tabela 5.). Na Czapek-agar podlozi konidije variraju od 9,30 do 21,39 mikrona, odnosno 8,37 do 21,70 mikrona na krompir dekstroznom agaru.

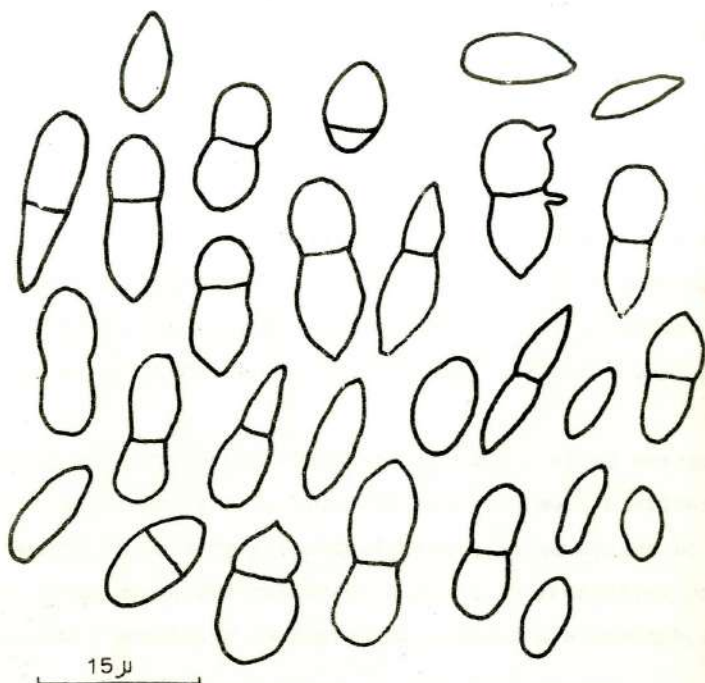
Tabela 5. Veličine dvoćeličnih konidija u mikronima
Table 5. Size of two-celled conidia

Podloga	M	±	m	s	V	n	Var. širina
C z a p e k							
dužina manje ćelije	6,31	0,31	1,12	17,75	100	4,03	- 9,30
" veće "	7,24	0,37	1,33	18,37	100	4,65	- 12,09
ukupna dužina	13,54	0,63	2,30	16,99	100	9,30	- 21,39
najveća širina	5,37	0,21	0,75	13,97	100	3,72	- 6,82
K r o m p i r							
dužina manje ćelije	6,53	0,45	1,65	25,27	100	3,72	- 10,85
" veće "	7,62	0,29	1,05	13,78	100	4,65	- 10,85
Ukupna dužina	14,15	0,68	2,49	17,60	100	8,37	- 21,70
najveća širina	5,95	0,26	0,96	16,13	100	3,72	- 10,85

Veličina konidija C. herbarum, prema podacima iz literature nema iste vrijednosti kod pojedinih istraživača. Tako, na primjer, prema S o r a u e r-u (57) iznose 6-12 x 4-6 mikrona; prema V i e n n o t - B o u r g i n-u (61) 18-24 x 7-10 mikrona; prema F e r r a r i s-u (22) 12-28 x 6-7 mikrona; a prema A r y a - P a n w a r-u (4) 6 x 5 mikrona. Najnovija istraživanja D e V r i e s-a (18) daju vrijednosti koje približno odgovaraju onim prema S o r a u e r-u. Za razliku od drugih istraživača D e V r i e s je mjerio posebno veličine jednoćeličnih, a posebno dvoćeličnih konidija. Prema ovom autoru, jednoćelične konidije imaju veličinu 4,5-11,0 x 4-5 mikrona, a dvoćelične, koje su u ove vrste zastupljene oko 1%, su nešto krupnije i iz

nose 9-15 x 4-7 mikrona. Naši rezultati mjerenja približno odgovaraju rezultatima De Vries-a.

Neki autori (Saccardo, Rabenhorst's) uopšte ne daju određene vrijednosti za veličinu konidija C. herbarum, ističući jedino njihovu veliku varijabilnost.



Slika 1. Konidije C. herbarum.
Photo 1. Conidia of C. herbarum

I u pogledu oblika konidija (Slika 1) postoje velike varijabilnosti. Konidije su najčešće jajolike, ali isto tako mogu biti i, više ili manje, izdužene, cilindrične, okruglaste ili zašiljene. Kod nekih se na jednom kraju nalaze bradavičasta ispupčenja, mjesta gdje su bile pričvršćene za vrh konidiofora. Obično su jednoćelične, u manjem broju su dvoćelične, ali se, mada rijetko, sreću i tro- i četveroćelične. Neke konidije imaju blago suženje na mjestu pregrade.

Boja konidija. U početku, u vrijeme obrazovanja, konidije su bez bojne. Kasnije one dobijaju zelenkast ton, zatim maslinasto zelen i na koncu postaju smeđe.

Obrazovanje konidija. Konidije se stvaraju najčešće na vrhovi ma konidiofora, a samo nekada obrazuju se i bočno. Obično su u kratkim lancima, ali se (naročito pri nižim i višim temperaturama) razvijaju i pojedinačno.

5.12. Konidiofore

Veličina i oblik. Dužina konidiofora jako varira, od 15 do oko 300 mikrona. One su jednostavne i prave, ili, češće, savijene i grbičaste. Na vrhu imaju glavičasto proširenje sa bradavičastim ispupčenjima na kojima se formiraju konidije. Obično su septirane, ali ih ima i jednočeličnih. Konidiofore, poslije obrazovanja konidija, dalje rastu, zbog čega i dostižu tako velike dužine. Debljina je 3,5-6,0 mikrona.

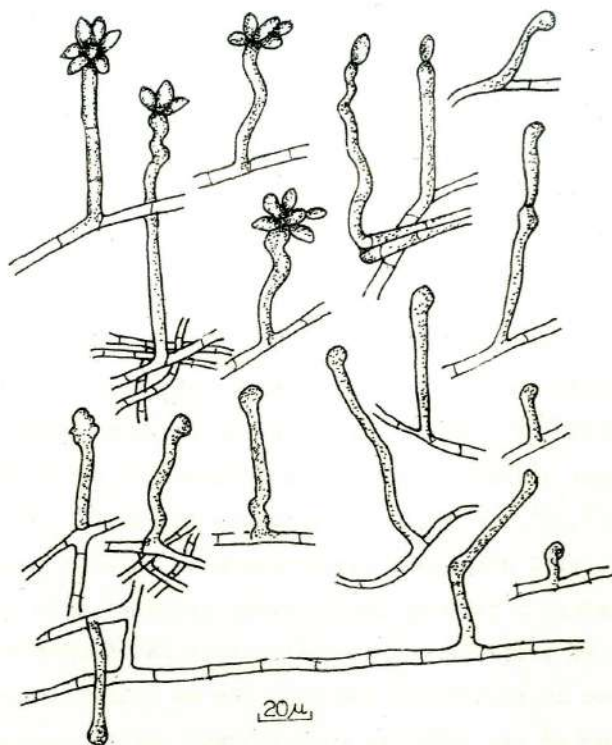
Obzirom da je ukupna dužina konidiofora vrlo varijabilna veličina, naročito u promjenljivim uslovima, mi smo dužinu prvog članka, tj. dužinu od osnove pa do prvog glavičastog proširenja, uzimali kao taksonomsku vrijednost i izvršili mjerenja. Ovi podaci, koji su obradjeni u varijacionom statistikom, prikazani su tabelarno (Tabela 6.).

Tabela 6. Veličina konidiofora u mikronima
Table 6. Size of the conidiophores

	Podloga	M	\pm m	s	V	n	Var. širina
dužina	Czapek	65,00	11,30	29,02	44,95	50	16,00 - 167,40
	Krompir	98,70	15,00	38,50	39,01	50	15,50 - 291,40
širina	Czapek	3,41	0,15	0,38	11,14	50	2,80 - 4,00
	Krompir	3,64	0,12	0,32	8,79	50	3,41 - 4,65

Iz ove tabele se vidi da je prosječna dužina prvog članka konidiofora, na podlozi Czapek-agar, 65,0 mikrona, a na krompir dekstroznom agaru 98,7 mikrona. Iako su i ovdje velika variranja ipak ovako

dobijene vrijednosti predstavljaju sigurnije mjerilo u taksonomiji gljive, nego mjere koje bismo dobili da smo analizirali cijelu dužinu konidiofora.



Slika 2. Konidiofore C. herbarum
 Photo 2. Conidiophores of C. herbarum

Boja konidiofora. Kao i konidije i konidiofore su u početku zelenkaste, ali ubrzo dobijaju maslinasto zelenu boju i najzad postaju smeđe. Na podlogama od krompir dekstroznog agara, malc-agara i na ekstraktu lista jasena, nešto su tamnije od onih na podlogama Czapek-agar, ovas-agar ili na vodenom agaru. Vrh konidiofora koji raste svijetlije je boje. Za razliku od osnovnih hifa konidiofore su znatno tamnije.

Grananje i način obrazovanja. Konidiofore C. herbarum obično su nerazgranate, ali se javljaju i takve koje se jedan ili dva puta boč

no granaju. Razvijaju se pojedinačno na osnovnim hifama i na različitim odstojanjima (50 - 200 mikrona). Na slici 2 prikazani su osnovni tipovi konidiofora gljive *C. herbarum* izolovane iz lista bijelog jasena.

6. UTICAJ NEKIH FAKTORA SREDINE NA RAZVOJ C. HERBARUM

6.1. T e m p e r a t u r a

6.1.1. Uticao temperature na klijanje konidija i porast inicijalne hife

Materijal i metod

Za ova ispitivanja korištene su konidije iz čiste kulture gljive koja je uzgajana na krompir dekstroznom agaru. Kulture su na dan upotrebe bile stare 3 mjeseca. Klijavost je praćena u visećim kapi ma u pijaćoj vodi u Van-Tieghemovim komoricama pri slijedećim temperaturama: 1°, 4°, 9°, 12°C u politermostatu i pri 16°, 19°, 21°, 23°, 25°, 27°, 29° i 31°C u običnim termostatima sa vodenim omotaćem. Vairanja temperatura u toku trajanja oglada iznosila su ± 0,5°C. Viseće kapi imale su približno 4 mm u prećniku, a sadržavale su oko 1000 konidija. Ogladu su ponovljeni dva puta ako su bili izvodjeni u politermostatu, odnosno pet puta ako su korišćeni obićni termostati. Pri svakom ponavljanju uzimali smo po šest proba.

Rezultati oglada

Podaci o klijanju konidija prikazani su tabelarno (Tabela 7.). Klijavost konidija mjereno poslije 24 i 48 sati prikazali smo, radi boljeg uvida, i grafićki (Grafikon 3.) s tim što su podaci izravnati parabolom trećeg stepena po metodu najmanjih kvadrata. Podaci o uticaju temperature na porast inicijalne hife prikazani su u tabeli 8. odnosno u grafikonu 4.

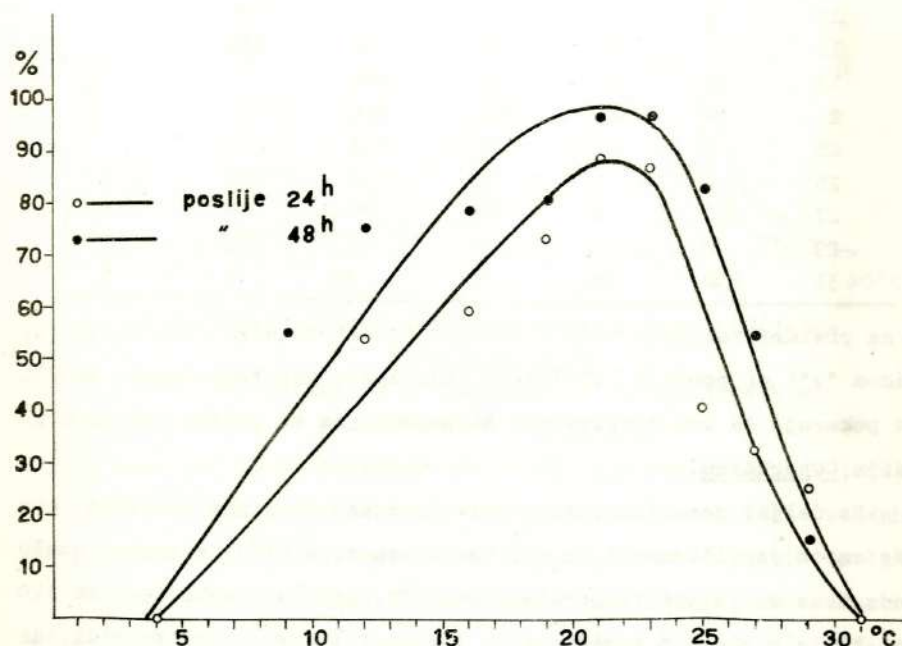
Diskusija

Iz tabele 7. vidimo da je najveći procenat klijanja konidija za bilježen pri temperaturama 21°C i 23°C, koje se prema tome mogu sma

Tabela 7. Uticaj temperature na klijanje konidija

Table 7. Influence of temperature on the germination of conidia

T°C	% klijanja konidija poslije					
	6 ^h	12 ^h	24 ^h	48 ^h	72 ^h	96 ^h
1	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	+	+	+
9	0	0	+	55	85	87
12	+	12	54	75	75	76
16	+	48	59	78	85	
19	+	36	73	80		
21	+	54	88	96		
23	+	54	86	96		
25	0	+	40	82	82	
27	0	0	32	54	67	71
29	0	0	25	20	57	43
31	0	0	0	0	0	0



Grafikon 3. Uticaj temperature na klijanje konidija C. herbarum

Fig. 3. Influence of temperature on the germination of conidia of C. herbarum

trati optimalnim. Kardinalne tačke na kojima klijanje prestaje jesu 1°C (minimum) i 31°C (maksimum). Pri temperaturi od 4°C zapaženo je samo pojedinačno klijanje (označeno u tabeli znakom "+") i to tek po slije 48 sati inkubacije.

Da bi se bolje ocjenio uticaj različitih temperaturnih uslova na razvoj gljive prikazali smo u tabeli 8 i uticaj temperature na po rast inicijalne hife. Iz ove tabele se vidi da dužina inicijalne hi

Tabela 8. Uticaj temperature na porast inicijalne hife
Table 8. Influence of temperature on the growth of germ tubes

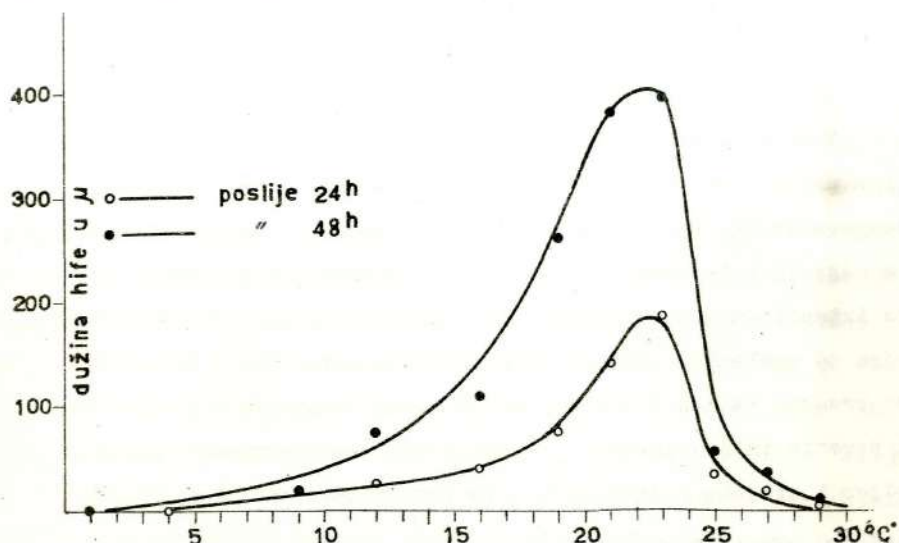
T°C	dužina hife u mikronima poslije					
	6 ^h	12 ^h	24 ^h	48 ^h	72 ^h	96 ^h
1	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	+	+	+
9	0	0	+	21	80	215
12	+	+	23	75	166	
16	+	15	38	108	236	
19	+	10	75	260		
21	+	21	141	380		
23	+	25	185	395		
25	0	+	33	55	101	117
27	0	0	17	34	63	70
29	0	0	8	12	21	23
31	0	0	0	0	0	0

fe ne prelazi dužinu konidija (ovakav porast označen je u tabeli sa znakom "+") ni poslije 120 časova inkubacije pri temperaturi od 4°C. Ovo pokazuje da ova temperatura nije dovoljna za početak klijanja ko nidija C.herbarum.

Sa daljim porastom temperature procenat klijanja konidija sve više raste, dostiže maksimum pri temperaturi od 21°C, a zatim naglo opada, tako da je pri temperaturi od 29°C, poslije inkubacije od 120 sati, kljalo oko 50% konidija. Iz tabela 7 i 8 se takodjer vidi da je intenzitet klijanja konidija dosta slab. Pri temperaturama izmed ju 12° i 23°C početak klijanja (pupljenje) zapaženo je tek poslije 6 sati inkubacije, dok je pri nižim i višim temperaturama pupljenje

zabilježeno još kasnije. Pri optimalnim temperaturama ($21^{\circ} - 23^{\circ}\text{C}$), poslije 12 sati inkubacije, klija prosječno 54% konidija, dok je maksimalna klijavost zabilježena tek poslije 48 sati inkubacije (96%).

Analizirajući podatke iz literature zaključili smo da se slično ponašaju i druge Cladosporium vrste. Tako je na primjer Gardner (24) za gljivu C. fulvum ustanovio da je najveći procenat klijanja (50-80%) pri optimalnoj temperaturi zapažen tek poslije 20 sati inkubacije. Nasuprot ovim rezultatima Inoue (33) je za istu



Grafikon 4. Uticaj temperature na porast inicijalne hife C. herbarum

Fig. 4. Influence of temperature on the growth of germ tubes of C. herbarum

gljivu našao da njene konidije obilno klijavu već poslije 8-10 sati u uslovima optimalne temperature i visoke relativne vlage vazduha. Ovo pokazuje da je klijavost konidija različita kod raznih izolata.

Što se tiče optimalne temperature i kardinalnih temperaturnih tačaka za klijanje konidija nekih Cladosporium vrsta, one, približno, odgovaraju našim istraživanjima. Prema rezultatima Viennot-Bourgina (61) optimalna temperatura za klijanje konidija C. carpophyllum je 20°C , minimalna 2°C , a maksimalna 32°C . Za C. fulvum

optimalna temperatura, prema istom autoru, je između 22°C - 24°C , minimalna 3°C - 4°C , a maksimalna 31°C . H a s p e r (29) navodi za istu vrstu gljive rezultate koji nešto odstupaju od ovih. Prema njemu optimum je nešto širi, od 20°C - 26°C , minimum 0°C - 1°C , a maksimum 31°C - 33°C . C o n v e r s e (13) nalazi da je optimalna temperatura za klijanje konidija C. effusum 24°C , minimalna ispod 0°C , a maksimalna 40°C . Prema istom autoru i energija klijavosti je znatno veća. Već poslije 4 sata inkubacije pri optimalnoj temperaturi klija oko 34% konidija, a poslije 6 sati 77%.

6.12. Utica j temperature na brzinu obrazovanja konidija

Paralelno sa ispitivanjem uticaja temperature na klijanje konidija pratili smo brzinu i način njihovog obrazovanja pri različitim temperaturama. Na taj način zapazili smo da je brzina obrazovanja bila najveća pri optimalnim temperaturama, što je od posebnog značaja za intenzivan razvoj bolesti, i da se ona sve više smanjuje udaljavanjem od optimalnih uslova. Ovi podaci izneseni su u tabeli 9. Ogladi su praćeni na taj način što smo prilikom kontrole klijanja konidija i porasta inicijalne hife pri pojedinim temperaturama bilježili takodjer i vrijeme pojave prvih konidiofora sa novim konidijama.

Tabela 9. Uticaj temperature na obrazovanje konidija
Table 9. Influence of temperature on the development of conidia

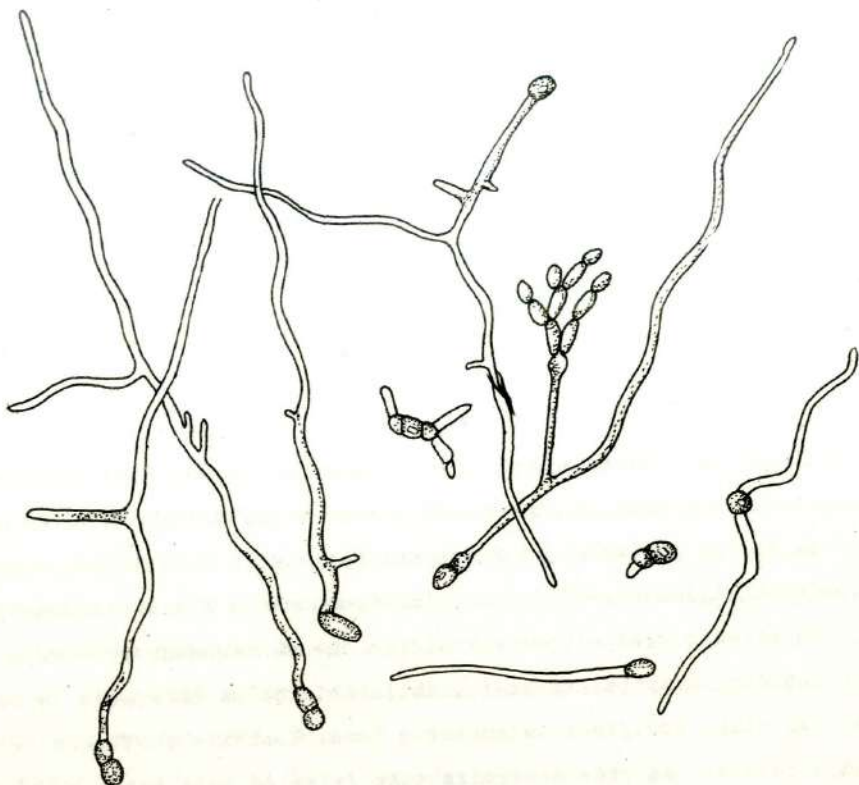
$T^{\circ}\text{C}$	Obrazovanje konidija poćinje poslije
4	nije zapaženo do 10 dana
9	120 ^h
12	96 ^h
16	72 ^h
19	48 ^h
21	48 ^h
23	48 ^h
25	96 ^h
27	96 ^h
29	nije zapaženo do 10 dana

Iz tabele 9 se vidi da obrazovanje konidija pri temperaturama 19° , 21° i 23°C počinje već poslije 48 sati inkubacije. U nekim slučajevima primjetili smo da konidije kličaju direktno u konidioforu na čijem se vrhu obrazuju nove konidije. Najsporije obrazovanje konidija odvija se pri temperaturama do 9°C , kada je potrebno najmanje 5 dana. Pri temperaturama 4° i 29°C nije zapaženo formiranje reproduktivnih organa u toku desetodnevne inkubacije.

6.13. Način klijanja konidija

Vrijeme početka klijanja konidija zavisi od njihove starosti. Najbolje kličaju konidije iz kulture stare 1-5 mjeseci. Suviše mlade konidije, iz kulture starosti do 20 dana, kao i konidije iz kulture stare preko 1 godine, imaju slabiji procenat klijavosti. Mora se ipak reći da je pri optimalnoj temperaturi, bez obzira na starost konidija, početak klijanja zabilježen približno poslije 6 sati inkubacije.

Neposredno pred klijanje konidija one se neznatno uvećavaju, a zatim, obično na apikalnom kraju, izbija inicijalna hifa, koja je bezbojna ili slabo uočljivog zelenkastog tona. Konidije postepeno gube smeđu boju, sve se više deformišu, tako da se 48 sati poslije klijanja više i ne raspoznaje mjesto začetka inicijalne hife. Neke konidije poslije izvjesnog vremena obrazuju na drugom kraju novu inicijalnu hifu. U pijućoj vodi i u kišnici normalno se obrazuje samo jedna ili dvije inicijalne hife. Medjutim, ako se klijanje konidija prati u hranljivim rastvorima, one vrlo često proizvode i treću inicijalnu hifu. U normalnim uslovima treću inicijalnu hifu obrazuju samo višecelične konidije. Isključivo inicijalne hife u pijućoj vodi i u kišnici obično se ne granaju za prvih 48 sati, nego tek docnije. Ali u uslovima hranljive sredine inicijalne hife sporije rastu, obilato se granaju i obrazuju konidije znatno brže. Zapažene su razlike i u debljini inicijalnih hifa pri različitim temperaturama. Na višim i nižim temperaturama hife su znatno deblje, oko 5 mikrona.



Slika 3. Klijanje konidija C. herbarum
 Photo 3. Germination of conidia of C. herbarum

6.14. Utica j temperature na porast micelije

Materijal i metod

Utica j temperature na porast micelije gljive ispitivali smo na hranljivim podlogama Czapek-agar i krompir dekstrozni-agar. Pripremljene podloge razliven e su u Petri sudove prećnika 10 cm, po 15 ccm u svaki sud, a zatim su zasijane fragmentima micelije velićine 2 x 2 mm. Porast micelije praćen je u toku 15 dana razvoja. Prvo mjerenje kolonija izvršeno je tri dana poslije zasijavanja, tj. tek onda kada se vidljivo formirala kolonija nove micelije. Na ovaj naćin dobili smo taćnije vrijednosti prosjećnog dnevnog porasta, jer su otklonjene greške koje nastaju uzimanjem nejednakih fragmenata micelije ili

Tabela 10. Uticaj temperature na porast micelije
 Table 10. Influence of temperature on the growth of mycelium

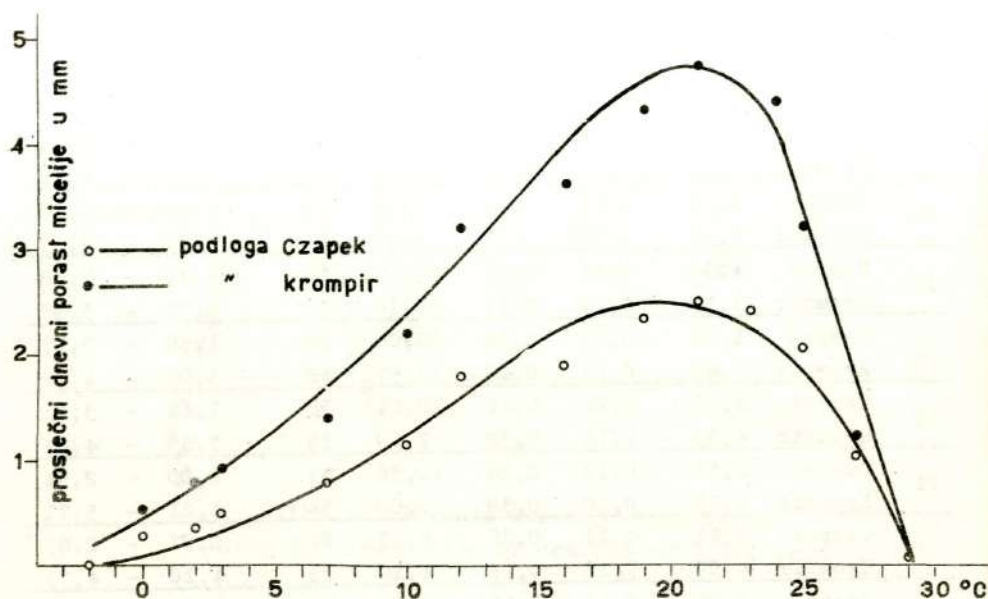
T ^o C	Podloga	M	±	m	s	V	n	Var. širina
-2	Czapek	0		0				
	Krompir	0		0				
0	Czapek	0,30		0,20	0,12	40,00	5	0,15 - 0,40
	Krompir	0,55		0,07	0,04	7,27	5	0,50 - 0,60
2	Czapek	0,34		0,10	0,05	14,71	5	0,33 - 0,40
	Krompir	0,78		0,06	0,05	6,41	10	0,68 - 0,93
3	Czapek	0,50		0,05	0,09	10,00	26	0,35 - 0,64
	Krompir	0,92		0,07	0,14	15,22	27	0,73 - 1,15
7	Czapek	0,80		0,10	0,11	13,75	12	0,66 - 1,00
	Krompir	1,42		0,15	0,18	12,68	13	1,15 - 1,72
10	Czapek	1,15		0,16	0,16	13,91	10	0,95 - 1,44
	Krompir	2,21		0,20	0,20	9,05	10	1,89 - 2,55
12	Czapek	1,80		0,44	0,43	23,89	10	1,30 - 2,28
	Krompir	3,19		0,42	0,42	13,16	10	2,77 - 3,83
16	Czapek	1,90		0,15	0,38	20,00	50	1,50 - 3,17
	Krompir	3,63		0,17	0,42	11,57	48	3,00 - 4,72
19	Czapek	2,36		0,20	0,44	18,64	38	1,44 - 3,21
	Krompir	4,33		0,14	0,32	7,39	39	3,69 - 4,86
21	Czapek	2,51		0,12	0,26	10,36	33	2,00 - 2,84
	Krompir	4,75		0,18	0,38	8,00	34	4,21 - 5,71
23	Czapek	2,41		0,13	0,22	9,13	22	1,97 - 2,65
	Krompir	4,39		0,12	0,18	4,10	19	4,10 - 4,73
25	Czapek	2,06		0,12	0,17	8,25	18	1,75 - 2,28
	Krompir	3,22		0,09	0,14	4,35	20	2,93 - 3,58
27	Czapek	1,06		0,04	0,06	5,66	21	0,96 - 1,18
	Krompir	1,23		0,03	0,02	1,63	22	1,14 - 1,36
29	Czapek	0,08		0,04	0,04	50,00	10	0,00 - 0,15
	Krompir	0,07		0,03	0,04	57,14	19	0,00 - 0,15
31	Czapek	0		0				
	Krompir	0		0				

nepravilnog porasta micelije. Praćenje razvoja micelije vršeno je u nakrsnim mjerenjem prečnika kolonija.

Porast micelije ispitivali smo pri slijedećim temperaturama: 0^o, 2^o, 3^o, 7^o, 10^o i 12^oC u politermostatu i 16^o, 19^o, 21^o, 23^o; 25^o,

27° i 29°C u običnim termostanima. Temperaturna kolebanja iznosila su $\pm 0,5^\circ\text{C}$.

Podaci o prosječnom dnevnom porastu micelije obradjeni su varijacionom statistikom i prikazani su u tabeli 10. Isti podaci, izravnanati parabolom trećeg stepena po metodu najmanjih kvadrata, prikazani su i grafički (grafikon 5.).



Grafikon 5. Uticaj temperature na porast micelije C. herbarum
Fig. 5. Influence of temperature on the growth of mycelium
of C. herbarum

Prilikom izravnivanja ovih srednjih vrijednosti nismo uzimali u obzir broj mjerenja u pojedinim slučajevima, jer smo smatrali da su srednje vrijednosti (M) približno jednako tačne, jer su i odstupanja od srednje vrijednosti (m) približno ista. Naime, još u toku trajanja ovih oglada uzimali smo toliko uzoraka koliko je bilo potrebno da se postigne određena tačnost, odnosno određeno odstupanje od srednje vrijednosti.

Rezultati ogleda

Iz tabele 10 se vidi da je optimalna temperatura za porast micelije 21°C , minimalna oko 0°C , a maksimalna oko 29°C .

Obrazovanje konidija zabilježeno je pri svim temperaturama pri kojima micelija gljive raste, s tim što se udaljavanjem od optimalnih uslova obrazovanje ovih reproduktivnih organa odvija sve sporije.

Diskusija

Kao što se iz tabele 10 vidi micelija gljive razvija se i pri temperaturi od 0°C , što svakako ima značaja za sam razvoj bolesti. U prilog ovom treba dodati da su ispitivanja koja su izveli istraživači Brooks i Hansford (prema Smith-u, 55), pokazala da se C. herbarum razvija u hladnim magacinima pri temperaturama znatno ispod 0°C , čak i pri temperaturi od -6°C . Iako naš izolat nije u laboratorijskim uslovima pokazao sposobnost razvoja pri temperaturama nižim od 0°C , ipak se može zaključiti da gljiva dobro podnosi niske temperature, što potvrđuju i naša druga ispitivanja o kojima će docnije biti govora.

Naši rezultati o uticaju temperature na porast micelije gljive ne slažu se sa rezultatima koje iznose neki drugi autori. Bocckman (7) je na primjer utvrdio da je optimalna temperatura za razvoj micelije C. herbarum 26°C . Pri ovoj temperaturi, prema našim ispitivanjima, porast je bio umanjen za skoro 50%. Prema istom autoru maksimalna temperatura iznosi čak 35°C , dok je minimalna -2°C , što se također ne podudara sa našim ispitivanjima.

Slične rezultate dobili su Delpi i saradnici (16), koji su C. herbarum izolovali iz groždja i zatim je uzgajali na krompir dekstroznom-agaru. Prema njihovim ispitivanjima optimalna temperatura iznosi 24°C , a maksimalna 33°C .

Međutim, ispitivanja koja su vršena sa nekim drugim vrstama iz roda Cladosporium, koje prouzrokuju slična oboljenja, pokazuju veću podudarnost sa našim rezultatima. Tako su Mathur i saradnici (44)

utvrdili da je za C. variable optimalna temperatura za porast micelije 23°C . Walker (63) je za gljivu C. cucumerinum ustanovio da je optimalna temperatura za porast micelije oko 21°C , dok je za istu ovu vrstu Strider (59) utvrdio da je temperatura od 30°C letalna. Za gljivu C. fulvum, prema istraživanjima Inoue (33), najbujniji porast micelije zabilježen je pri temperaturama $20-24^{\circ}\text{C}$. Maksimalna temperatura za porast micelije iznosila je 32°C . Isti autor je utvrdio da maksimalna temperatura za razvoj micelije zavisi i od kiselosti podloge, tako da je na kiselim sredinama maksimum bio uvijek niži. Ispitivanja Gardnera (24) pokazuju da je za ovu vrstu, uzgajanu na krompir dekstroznom-agaru, najpovoljnija temperatura od 20°C , s tim što je još i pri temperaturama do 24°C porast micelije bio dosta bujan, dok su minimum i maksimum bili 2°C , odnosno 35°C .

Razlike koje postoje između rezultata pojedinih istraživača, u pogledu uticaja temperature na razvoj C. herbarum, ukazuju i na ekološku varijabilnost gljive te mogućnost postojanja raznih ekotipova i drugih formi.

6.15. Uticaj ekstremnih temperatura na miceliju i konidije

S obzirom da u toku ljeta maksimalna temperatura vazduha iznosi i preko 30°C , dok u toku zime ona pada znatno ispod 0°C , bilo je interesantno ispitati uticaj ekstremnih temperatura na vitalnost organizma. Ispitali smo uticaj temperature od -10° i -15°C na vitalnost micelije i uticaj temperature od 35°C na vitalnost konidija i micelije. Ove ekstremne temperature česte su u našim prirodnim uslovima.

Niske temperature (-10° i -15°C). Za ova ispitivanja koristili smo čiste kulture gljive uzgajane na krompir dekstroznom-agaru, čija je starost varirala između 1-6 mjeseci. Epruvete sa ovim kulturama održavane su u politermostatu, pri odgovarajućim temperaturama. Vitalnost micelije provjeravana je svakih 6 mjeseci, presijavanjem micelije na svježije podloge i njenim daljim održavanjem u optimalnim uslo-

vima. Na ovaj način ustanovili smo da micelija ne gubi vitalnost ni poslije 18 mjeseci inkubacije pri ovim uslovima. Medjutim, poslije 24 mjeseca ove kulture nisu mogle biti obnovljene, jer poslije više pokušaja presijavanja nije dobijena nova micelija. Kako je registrovana ovih promjena vršeno jednovremeno za obje komore (-10° i -15°C), i pošto razlike nisu zabilježene, može se zaključiti da gljiva gubi vitalnost u toku 2 godine inkubacije pri uslovima temperature -10°C .

Temperatura od 35°C . Uticaj ove temperature na vitalnost konidija praćen je na slijedeći način: konidije gljive nanosene na sterilne mikroskopske pločice u suhom stanju i suspenzije konidija u višecim kapima, stavljali smo u termostat pri temperaturi 35°C . Poslije svaka 24 sata inkubacije uzimali smo po dvije pločice i stavljali u eksikator pri sobnoj temperaturi. Vazduh u eksikatorima bio je zasićen vodenom parom. Za kontrolu služile su konidije na pločicama koje nisu izlagane uticaju ove visoke temperature. Kontrola klijavosti

Tabela 11. Uticaj dužine inkubacije pri temperaturi od 35°C na vitalnost gljive

Table 11. Influence of different exposition to temperature of 35°C on viability of the fungus

Dužina inkubacije	Smanjenje klijavosti u %		Dužina hife u mikronima	
	nakon 24 ^h	nakon 48 ^h	nakon 24 ^h	nakon 48 ^h
Kontrola	100	100	48	70
12 ^h	36	20	40	63
24 ^h	58	27	27	43
48 ^h	54	55	45	93
72 ^h	70	58	32	45
96 ^h	64	55	27	59
120 ^h	66	50	45	65

konidija vršena je poslije 24 i 48 sati inkubacije pri uslovima sobne temperature (22° - 23°C) i visoke relativne vlage. Starost konidija bila je dva mjeseca. Procentualno smanjenje klijavosti i prosječna dužina inicijalne hife, pri uslovima temperature od 35°C , prikaza

no je tabelarno (tabela 11.). Ovi podaci pokazuju da se dužim izlaganjem konidija uticaju temperature od 35°C sve više reducira klijavost. Tako, poslije inkubacije od 72 sata pri ovoj temperaturi i 24 sata pri optimalnim uslovima, klija svega 30% konidija. Interesantno je da pri dužoj inkubaciji, od 96 ili 120 sati, ne dolazi do dalje redukcije klijavosti konidija.

Što se tiče prosječne dužine inicijalne hife nije bilo značajnih razlika. Konidije, koje i poslije inkubacije od 120 sati pri temperaturi od 35°C imaju sposobnost klijanja, obrazuju inicijalnu hifu približno iste dužine kao i one koje nisu bile izlagane uticaju ove ekstremne temperature.

Ispitivanje uticaja visoke temperature na vitalnost micelije izvedeno je na sličan način kao u primjeru uticaja niskih temperatura. Epruvete sa čistim kulturama gljive, uzgajane na krompir dekstroznom agaru, stavljali smo u termostat pri temperaturi od 35°C. Iz ovih epruveta vršeno je svakodnevno presijavanje micelije na svježije, čvrste, podloge, koje su dalje održavane pri uslovima sobne temperature. One vrijeme koje su kulture gljive provele pri uslovima visoke temperature, poslije čega presijavanje i uzgoj pri optimalnim uslovima nije uspjevao, označeno je kao letalno. Tako je utvrđeno da micelija gljive gubi vitalnost nakon 7-9 dana inkubacije pri ovim uslovima, što zavisi od starosti kultura. Mladje kulture duže podnose uslove visoke temperature, i ako su stare do 2 mjeseca zadržavaju vitalnost do 9 dana, dok one staresti 3-4 i 5-6 mjeseci gube vitalnost po slije 6, odnosno 7 dana. Pošto je na ispitivanim kulturama bilo i konidija može se smatrati da je ovaj period letalan i za reproduktivne organe gljive.

Diskusija

Izlaganje kultura gljive uticaju niskih i visokih temperatura, što je izvedeno u laboratorijskim uslovima, pokazalo je da ona dosta dobro podnosi ove nenormalne uslove. Obzirom da se u našim krajevima

ovako niske temperature održavaju samo nekoliko mjeseci, dok je period trajanja visokih temperatura još kraći, može se smatrati da ekstremni temperaturni uslovi ne mogu uništiti vitalnost gljive, nego samo dovesti do njenog usporenog razvoja. Kao što se iz tabele 11 vidi i reproduktivni organi pokazuju veliku otpornost na uticaj visokih temperatura. Poslije inkubacije od 120 sati pri visokoj temperaturi klijavost konidija smanjena je za svega 50% (mjereno poslije 48 sati provedenih u optimalnim uslovima).

Naši ogledi potvrđuju opite drugih istraživača koji su pokazali da se C. herbarum razvija za vrijeme kišnih i hladnih dana (Anselme i saradnici, 2; Harvey, 28; Delpi i saradnici, 16). Prema Brooks-u i Hansford-u (Smith, 55) gljiva C. herbarum ne samo da ne gubi vitalnost pri niskim temperaturama, nego čak, pri temperaturama do -6°C , prouzrokuje i štete. S druge strane Hasper (29) je za gljivu C. fulvum ustanovio da njene konidije mogu preživjeti i pri temperaturi $-13,2^{\circ}\text{C}$ ako je inkubacija do 7 dana, dok je temperatura $-16,7^{\circ}\text{C}$ bila letalna za isto vrijeme. Isti autor navodi i veliku otpornost ove gljive na uticaj visokih temperatura. Pri 50° - 60°C u vodi i pri 60° - 70°C u suhom nije zabilježen gu bitak klijavosti ni pri inkubaciji od 3 sata.

6.2. V l a ž n o s t

6.21. Uticaj relativne vlage vazduha na klijanje konidija i porast inicijalne hife

Materijal i metod

Za ispitivanje uticaja relativne vlage korišćene su konidije iz čiste kulture starosti 4 mjeseca, uzgojene na krompir dekstroznom agaru. Upotrebljen je metod koji je prvi opisao Walter (64), a koji je docnije prihvaćen i od drugih istraživača. Različite koncentracije kuhinjske soli (NaCl) pripremili smo u eksikatorima, 15 cm prečnika, tako da je u svakom sudu bilo po 200 ccm rastvora soli. Na ovaj

način, u 10. eksikatora, obezbjedjena je relativna vlaga od 90,4% do 100%. Zatim smo, u ovako pripremljene sudove, stavljali mikroskopske pločice na kojima je prethodno načinjen suhi premaz konidija gljive. Oglеди su ponovljeni tri puta, s tim što je pri svakom ponavljanju u zimano po tri uzorka. Klijavost konidija kontrolisana je poslije 24 i 48 sati inkubacije u uslovima različite relativne vlage, pri sobnoj temperaturi (20°-22°C). I ovdje smo, kao i pri ispitivanju uticaja temperature na klijanje konidija, smatrali isključivo samo one konidije kod kojih je dužina inicijalne hife iznosila više od polovine dužine konidije.

Rezultati oglеda

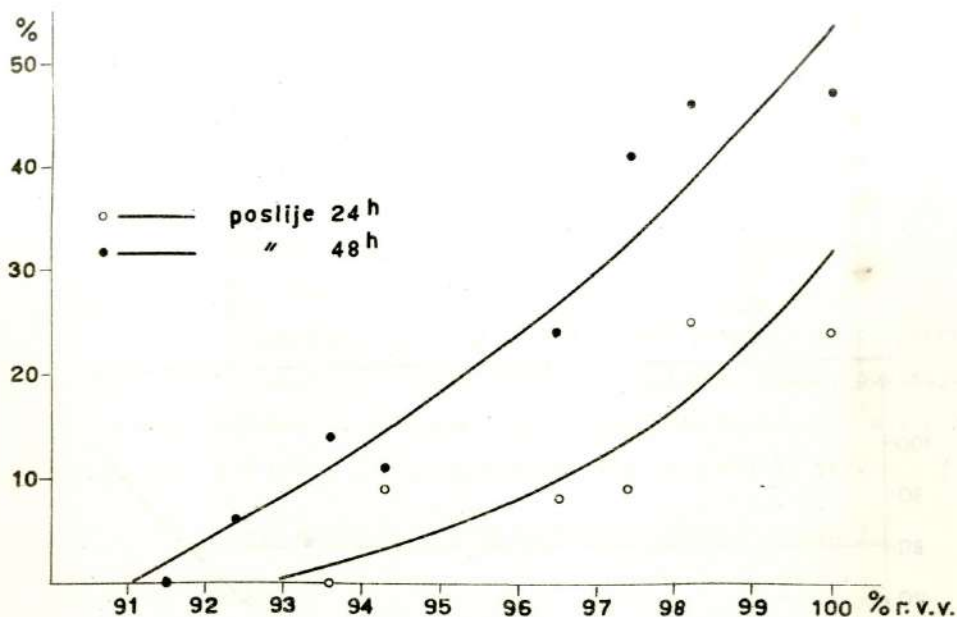
Podaci o klijavosti konidija izneseni su u tabeli 12, a o porastu inicijalne hife u tabeli 13. Ovi podaci prikazani su i grafički (grafikoni 6 i 7) gdje su izravnati parabolom trećeg stepena, po metodu najmanjih kvadrata.

Tabela 12. Uticaj relativne vlage na klijanje konidija
Table 12. Influence of relative humidity on the germination of conidia

Relativna vlaga %	% klijanja poslije	
	24 ^h	48 ^h
100	24	47
98,2	25	46
97,4	9	41
96,5	8	24
94,3	9	11
93,6	0	14
92,4	0	6
91,5	0	0

Kao što se iz tabele 12 vidi optimalna relativna vlaga za klijanje konidija C. herbarum je 100%. Konidije dobro klijaју i pri relativnoj vlažnosti od 98,2%. Međutim, daljim smanjenjem vlage klijavost naglo opada, tako da već pri 96,5% r.v. iznosi oko 50% manje od optimalnih uslova (mjereno 48. sata inkubacije), dok je pri 92,4% r.v.

zabilježeno samo pojedinačno klijanje. Relativna vlaga vazduha pri kojoj konidije ne kličaju ni poslije 5 dana inkubacije iznosi 90,4%. U pojedinačnim slučajevima bio je zapažen početak klijanja i u ovim uslovima, ali je dužina inicijalne hife bila manja od dužine konidija, pa se ova pojava može zanemariti.



Grafikon 6. Uticaj relativne vlage na klijanje konidija C. herbarum
 Fig.6. Influence of relative humidity on the germination
 of conidia of C. herbarum

Smanjenjem relativne vlage vazduha smanjuje se i porast inicijalne hife. Iz tabele 13 i grafikona 7 se vidi da prosječna dužina inicijalne hife naglo pada već pri 96,5% r.v., tako da, poslije 24 sata inkubacije, jedva dostižu veličinu konidija. Najbrži porast inicijalne hife je pri maksimalnoj relativnoj vlažnosti (100%), a potpuno prestaje pri 91,5%.

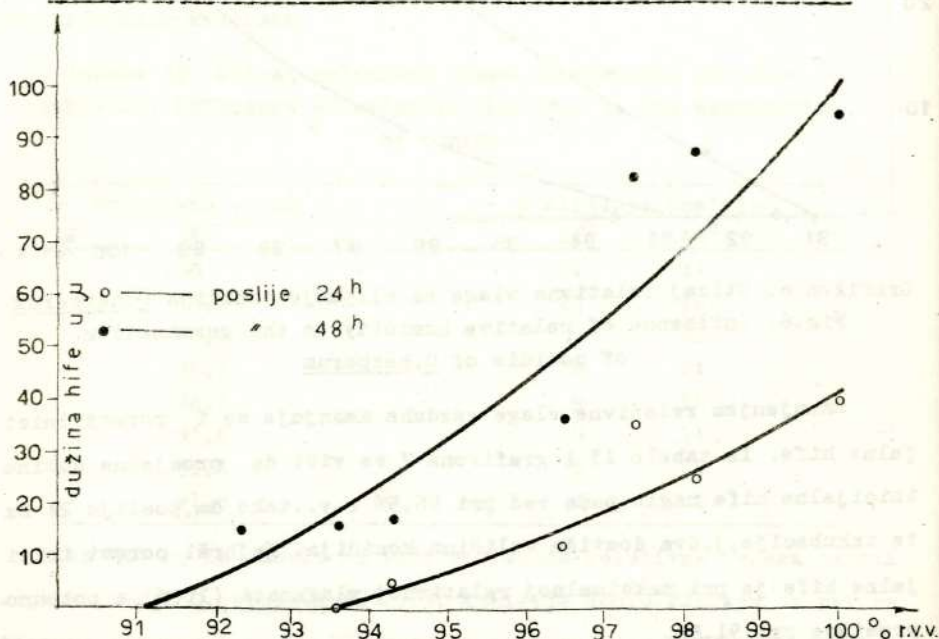
Izvedeni ogledi pokazuju da je sposobnost klijanja konidija C. herbarum ograničena samo na uslove visoke relativne vlage vazduha. Pri analizi klimatskih uslova, što je ranije diskutovano, navedeno je

da je visoka relativna vlaga vazduha karakterisala kritične periode u 1960. i 1961. godini, kada je ova bolest imala intenzivan razvoj.

Vlažnost vazduha ima, prema G ä u m a n n-u (25), poseban značaj za razvoj mnogih patogenih organizama. Ovaj faktor naročito je izra

Tabela 13. Uticaj relativne vlage na dužinu inicijalne hife
Table 13. Influence of relative humidity on the length of germ tubes

Relativna vlaga %	Prosječna dužina hife u mikronima	
	nakon 24 ^h	nakon 48 ^h
100	40	95
98,2	25	88
97,4	35	83
96,5	12	36
94,3	+	17
93,6	0	16
92,4	0	13
91,5	0	0



Grafikon 7. Uticaj relativne vlage na dužinu inicijalne hife
C. herbarum

Fig. 7. Influence of relative humidity on the length of germ tubes of C. herbarum

žen kod oboljenja koja prouzrokuju razne Cladosporium vrste, čiji je razvoj uglavnom vezan za periode poslije velikih kiša.

Prema B u t l e r-u (10) C. herbarum dobija parazitske odlike samo u vlažnim sezonama. D e l p i saradnici (16) su takodje ustanovili jaku korelaciju izmedju vlage u doba berbe groždja i doonije pojave truleži od C. herbarum. Optimalna relativna vlaga za klijanje konidija C. fulvum, prema N e w h a l l-u (47), iznosi 98-99%, dok je minimalna 96%. I n o u e (33) je, medjutim, za istu gljivu našao da je donja granica relativne vlage za klijanje konidija 92%. Za gljivu C. effusum minimalna relativna vlaga za klijanje konidija je 90,1% (C o n v e r s e, 13). Analogno našim rezultatima i C h o w d h u r y (12) je za C. herbarum konstatovao da je donja granica relativne vlage za klijanje konidija 90%.

I ostale Cladosporium vrste koje se često javljaju na poljopri vrednoj flori, a naročito u staklarama i u toplim lijevama, pokazuju parazitsku aktivnost u uslovima visoke relativne vlage (G a l l o w a y, 23; N e w h a l l i saradnici, 48; S m a l l, 54).

6.22. Uticao niske relativne vlage na vitalnost konidija

Materijal i metod

Konidije gljive iz čiste kulture starosti 2 mjeseca, uzgojene na krompir dekstroznom agaru, nanosili smo na sterilne mikroskopske pločice. Ove smo, zatim, stavljali u eksikator, gdje je prethodno, pomoću različitih koncentracija NaCl, načinjena različita relativna vlaga vazduha (W a l t e r, 64): 50%, 60%, 70% i 80%. Pri ovim uslovima i pri sobnoj temperaturi (20°-22°C) držali smo konidije određeno vrijeme (12, 24, 48, 72, 96 i 144 sata), poslije čega smo pločice prenosili u uslove 100% vlage. Kontrolisanje klijavosti vršeno je nakon 24 i 48 sati inkubacije u uslovima maksimalne relativne vlage. Ogleđi su ponovljeni tri puta, a pri svakom ponavljanju uzimali smo po 5 proba. Kao kontrola služile su pločice koje nisu bile izlagane uticaju niske relativne vlage.

Rezultati ogleda

Podaci o uticaju relativne vlage na vitalnost konidija dati su u tabeli 14, a izraženi su u procentima klijavosti konidija, mjereno poslije 48 sati inkubacije u uslovima 100% vlage.

Tabela 14. Uticaj niske relativne vlage na vitalnost konidija
Table 14. Influence of low relative humidity on the viability of conidia

Dužina inkubacije u uslovima niske vlage	% klijavosti konidija poslije uticaja vlage od				
	100%	80%	70%	60%	50%
12 ^h	-	-	-	60	59
24 ^h	-	39	57	+	+
48 ^h	-	44	51	0	0
72 ^h	-	72	58	0	0
96 ^h	-	52	46	0	0
144 ^h	-	45	35	0	0
Kontrola	55	-	-	-	-

Kao što se iz ove tabele vidi konidije potpuno gube klijavost poslije inkubacije od 24 sata u uslovima relativne vlage od 50% i 60%, dok u uslovima sa 70% i 80% r.v. nisu nastale značajne promjene klijavosti konidija ni poslije inkubacije od 6 dana.

Ovi rezultati pokazuju da konidije C. herbarum lako podnose uslove niske relativne vlage, što im omogućava da pri najvećim sušama zadrže svoju vitalnost. Ukoliko vlaga vazduna padne, za vrijeme toplih dana, na 50-60%, ipak takvi uslovi ne moraju biti nepovoljni, zahvaljujući procesima transpiracije asimilacionih organa biljaka. Na taj način konidije ne samo da su zaštićene od uticaja suše, nego čak nalaze i uslove za klijanje. Prema Newhall-u (48) transpiracija je glavni uzrok visoke relativne vlage u staklenim baštama, u kojima stvara optimalne uslove za razvoj nekih Cladosporium vrsta. Tako Newhall (47) konstatuje da konidije C. fulvum klijavaju i pri uslovima od 80% relativne vlage vazduha, jer im lišće procesima transpiracije ovo obezbjeđuje.

6.3. K i s e l o s t

6.31. Utica j kiselosti na klijanje konidija

Materijal i metod

Suspenzije konidija iz čiste kulture, uzgojene na krompir dekstroznom agaru, pripremili smo u pufernim rastvorima prema S o r e n s e n u. Suspenzije konidija u višećim kapima ovih rastvora, u Van-Tieghemovim komoricama, stavljane su u termostat pri temperaturi od 23°C. Koristeći ove puferne smjese dobili smo kiselost sa pH od 1,93 do 9,18. Za jako alkalne sredine, sa pH do 12, pripremali smo posebne rastvore NaOH u destilovanoj vodi, čija je alkalnost određena pomoću električnog pehametra. Oglledi su ponovljeni tri puta, a pri svakom ponavljanju uzimano je po 4 probe.

Rezultati oglveda

Podaci o uticaju kiselosti sredine na klijanje konidija prikazani su u tabeli 15. Ovi podaci pokazuju da je optimalna kiselost za

Tabela 15. Uticaj kiselosti na klijanje konidija

Table 15. Influence of pH concentration on the germination of conidia

Kiselost pH	Prosječna klijavost poslije 36 sati u %	Prosječna dužina hife po- slije 36 sati u mikronima
2,97	0	0
4,90	75	125
5,90	92	165
6,98	70	43
8,04	62	38
9,18	51	40
11,15	0	0

klijanje konidija pri pH 5,90: u ovom slučaju je zabilježena najveća klijavost (92%) i najveća prosječna dužina inicijalne hife (165 mikrona). Ekstremne vrijednosti bile su pri pH 2,97 i pH 11,15.

6.32. Utica j kiselnosti na porast micelije

Ovi ogledi izvedeni su odvojeno za utvrđivanje ekstremnih vrijednosti i onih za određivanje optimalne kiselnosti supstrata. Da bi smo utvrdili ove uslove u tkivima domaćina, obzirom na reakciju čeličnog soka, određena je i njegova kiselnost. Kiselnost soka lišća bije log jasena iznosila je pH 5,5-5,8.

6.321. Određivanje ekstremnih pH vrijednosti za porast micelije

Materijal i metod

Za ova ispitivanja korišćena je tečna Czapek podloga u kojoj je kao izvor ugljenika upotrebljena saharoza. Kisele reakcije sredine pripremane su dodavanjem različitih količina sirćetne kiseline, koja je docnije, zbog izvjesne toksičnosti, zamjenjena hlorovodoničnom kiselinom, dok je za alkalne sredine dodavan rastvor natrijum hidroksida. Pripremljene podloge razliveno su u Erlen-Mayerove boce, po 85 ccm u svakoj boci, u kojima je zatim regulisana kiselnost pomoću lakmus hartije. Ovako pripremljene podloge sterilisane su u autoklavu pri 120°C, poslije čega su razliveno u epruvete i to: u 5 epruveta po 5 ccm, a u 3 epruvete po 20 ccm podloge. Prve epruvete zasijane su fragmentima micelije i služile su za praćenje razvoja gljive, dok su druge (sa po 20 ccm podloge) služile za tačno određivanje kiselnosti poslije sterilizacije. Mjerenje pH izvršeno je pomoću električnog pH metra: IRV Ljubljana. Razvoj micelije praćen je u toku 25 dana u termostatu pri optimalnoj temperaturi (21°C). Ogledi su ponovljeni pet puta. Kao kontrola služile su podloge bez kiseline, odnosno alkalije.

Rezultati ogleda

Ustanovili smo da micelija gljive vrlo slabo raste na podlogama čija je kiselnost iznosila ispod pH 3, kao i na alkalnim sredinama sa pH iznad 9. Prestanak porasta micelije zabilježen je pri pH 2,4 i 9,6, što znači da micelija C. herbarum raste na sredinama sa vrlo

širokim intervalom kiselosti. Uporedo sa praćenjem razvoja micelije kontrolisali smo i obrazovanje konidija na ovim podlogama. Konstatovali smo da se one obrazuju na svim sredinama na kojima je zabilježeno da raste micelija. Obrazovanje hiamidospora nije zapaženo.

6.322. Odredjivanje optimalne kiselosti za porast micelije

Materijal i metod

U ovu svrhu pripremili smo Czapek podloge, razlivene u Erlen-Mayerove boce, u svaku po 250 ccm. U ovako pripremljene podloge dodavana je različita količina kiseline, odnosno alkalije, tako da su dobijene podloge od jako kiselih do jako alkalnih reakcija. Poslije izvršene sterilizacije, izdvojili smo po 50 ccm podloge iz svakog uzorka i ovu razlili u po 3 epruvete, što je docnije poslužilo za tačno odredjivanje kiselosti. Ostatak podloge u Erlen-Mayerovim bocama (u svakoj po 200 ccm) zasijan je fragmentima micelije. Razvoj micelije praćen je u toku 25 dana pri sobnoj temperaturi (20° - 22° C). Zatim je izvršeno filtriranje podloge, a dobijena micelija gljive sušena u sušionjku do konstantne težine. Mjerenje težine suhe tvari izvršeno je preciznom vagom. Ogledi su ponovljeni pet puta.

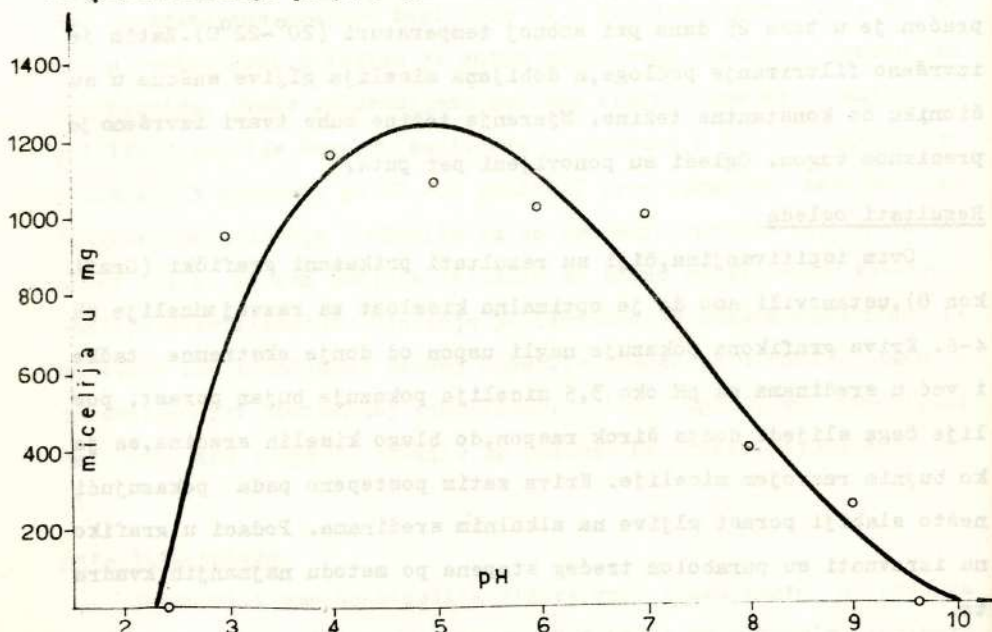
Rezultati oglada

Ovim ispitivanjima, čiji su rezultati prikazani grafički (Grafikon 8), ustanovili smo da je optimalna kiselost za razvoj micelije pH 4-6. Kriva grafikona pokazuje nagli uspon od donje ekstremne tačke i već u sredinama sa pH oko 3,5 micelija pokazuje bujan porast, poslije čega slijedi dosta širok raspon, do blago kiselih sredina, sa jako bujnim razvojem micelije. Kriva zatim postepeno pada pokazujući nešto slabiji porast gljive na alkalnim sredinama. Podaci u grafikonu izravnati su parabolom trećeg stepena po metodu najmanjih kvadrata.

6.33. Diskusija

Prema ispitivanjima koja je vršio B o c k m a n n (7) gljiva

C.herbarum dobro raste na sredinama čija je kiselost sa pH 5,6; 6,4; 7,2 i 8,0; sa tendencijom bujnijeg porasta na alkalnim sredinama. Naši rezultati razlikuju se od ovih po tome što je već u sredinama sa blago kiselim reakcijama zapažena tendencija opadanja brzine porasta micelije. Podloge sa kiselim reakcijama bile su pogodnije. Rezultati dobijeni pri ispitivanju uticaja kiselosti na klijanje konidija također potvrđuju da su blago kisele sredine optimalne za razvoj gljive. Kako i pH ćeličnog soka lista bijelog jasena ima vrijednost između 5,5 i 5,8, može se zaključiti da uslovi u tkivu lista domaćina odgovaraju razvoju gljive. Najnovija istraživanja koja su vršili A r y a i P a n w a r (4) odgovaraju našim rezultatima. I ovi autori su utvrdili da je optimalna kiselost za razvoj C.herbarum od pH 4,5-6. Prema istim istraživačima interval kiselosti pri kojoj se gljiva razvija je pH 3-9.



Grafikon 8. Uticaj kiselosti na porast micelije C.herbarum

Fig.8. Influence of pH concentration on the growth of mycelium of C.herbarum

Naši rezultati uglavnom odgovaraju zapažanjima drugih istraživača, koji su uticaj kiselosti ispitivali kod raznih Cladosporium vrsta. Tako, prema ispitivanjima Mathura i saradnika (44), zabilježena je optimalna kiselost, za C. variabile, pri pH 5,5. Za gljivu C. cucumerinum Strider (59) je utvrdio optimalan porast pri pH 3,5-4,0; dok je za istu ovu vrstu Leben (39) ustanovio optimum pH 5,1-6,0. Prema istom ovom autoru minimum je bio pri pH 3,2. Demmler (17) navodi da se Cladosporium vrste najbolje razvijaju u granicama pH 5-7.

Vidimo, dakle, da i druge Cladosporium vrste imaju optimalan razvoj u kiselim sredinama, što je opšta karakteristika većine gljive za razliku od drugih mikroorganizama (Ghann, 25).

6.4. Svjetlost

6.4.1. Uticaj dnevne i vještačke svjetlosti

Materijal i metod

Ispitivali smo uticaj obične svjetlosti (dnevne i vještačke) na brzinu porasta micelije, na klijavost konidija, porasta inicijalne hife i na brzinu obrazovanja reproduktivnih organa. Podloge od Czapek i krompir dekstroznog agara, koje su bile razlivene u Petri sudove, po 15 ccm, i zasijane fragmentima micelije, stavljene su u termostat pri optimalnoj temperaturi (21°C). Jedna polovina ovih kultura razvijala se u potpunoj tami, dok je druga polovina u toku dana bila pod uticajem dnevne, a u toku noći vještačke svjetlosti. Razvoj je praćen u toku 15 dana. Oglеди su ponovljeni dva puta, s tim što je pri svakom ponavljanju uzimano po 10 proba. Mjerenjem unakrsnih prečnika na početku i na kraju razvoja izračunali smo prosječni dnevni porast. Ovi podaci obradjeni su varijacionom statistikom i prikazani su tabelarno (Tabela 16).

Rezultati ogleda

Podaci iz tabele 16 pokazuju da ne postoje veće razlike u brzini

ni porasta micelije u tami i pri svjetlosti. Slični rezultati su do-
biveni i prilikom ispitivanja klijavosti konidija, porasta inicijal-
ne hife i brzine obrazovanja konidija, tako da ove podatke posebno i
ne iznosimo.

Tabela 16. Porast micelije u tami i pri svjetlosti
Table 16. Growth of the mycelium in dark and light conditions

Podloga		M	i	m	s	V	n	Var. širina
Czapek	tama	2,51	0,12	0,26	10,36	33		2,00 - 2,84
	svjetlost	2,49	0,12	0,15	6,02	14		2,10 - 2,70
Krompir	tama	4,75	0,18	0,38	8,00	34		4,21 - 5,71
	svjetlost	4,90	0,24	0,34	6,94	17		4,40 - 5,50

6.42. Uticaj ultraviolettne svjetlosti na klijanje konidija

Materijal i metod

Konidije gljive, nanesene na sterilne mikroskopske pločice, u su-
hom premazu, izlagali smo uticaju ultraviolettne svjetlosti u aseptic-
noj komori, eksponirajući gornju stranu pločica u vremenu od: 5, 10,
15, 20, 30 sekundi, zatim 1, 2, 3, 5, 10, 15 i 20 minuta. Pločice smo zatim
prenosili u eksikatoru sa 100% r.v.v., pri uslovima sobne temperatu-
re (20°-22°C). Izvor ultraviolettne svjetlosti bila je lampa Philips
(IUV 30W), koja je od mikroskopskih pločica sa konidijama bila uda-
ljena 55 cm. Ogledi su ponovljeni tri puta, s tim što je za svaku kom-
binaciju i za svako ponavljanje uzeto po tri probe. Kontrola klija-
vosti vršena je poslije 24 i 48 sati inkubacije pri optimalnim uslo-
vima temperature i vlažnosti. Rezultati su upoređivani sa onim do-
bijenim na kontrolnim pločicama, koje prethodno nisu bile izlagane u
ticaju ove svjetlosti.

U tabeli 17 prikazano je procentualno smanjenje klijavosti ko-
nidija nastalo uticajem ultraviolettne svjetlosti u različitom vreme-
nu trajanja. Podaci imaju relativnu vrijednost jer jačina svjetlos-
nog zračenja nije mjerena.

Rezultati ogleda

Rezultati mjerenja, koji su prikazani u tabeli 17, pokazuju da uticaj ultravioletnog zračenja na klijavost konidija, pri eksponacijama do 1 minute, nije bitan. Procenat klijavosti bio je u granicama rezultata dobijenih na kontrolnim pločicama. Međutim, dužim dejstvom ovih zraka klijavost se postepeno smanjuje, tako da pri inkubaciji od 5 mi

Tabela 17. Uticaj ultravioletne svjetlosti na klijanje konidija
Table 17. Influence of ultraviolet light on the germination of conidia

Vrijeme eksponiranja	% smanjenja klijavosti	
	nakon 24 ^h	nakon 48 ^h
1 minut	0	0
2 "	35	22
3 "	61	40
5 "	82	51
10 "	94	80
15 "	94	91
20 "	99,2	93

nuta biva umanjena za oko 50%. Potpun gubitak sposobnosti klijanja nije zapažen ni poslije dejstva ove svjetlosti u trajanju od 20 minuta.

6.43. Diskusija

Dobijeni rezultati pokazuju da konidije C. herbarum imaju veliku otpornost na uticaj ultravioletne svjetlosti. Slična mjerenja vršili su i drugi istraživači, čiji se rezultati uglavnom isti. Tako, prema rezultatima Engliša i saradnika (21), smanjenje klijavosti konidija C. herbarum uticajem ove svjetlosti bilo je slijedeće:

Trajanje eksponiranja	Smanjenje klijavosti %
0,5 minuta	5,5
1 "	4,5
2 "	24,4
5 "	54,9

Autori smatraju da je ovako visoka otpornost konidija C. herbarum uslovljena tammom bojom njihovih zidova, što su zaključili i drugi istraživači (D i m o n d i D u g g a r, prema E n g l i s h-u i saradnicima, 21). Oni smatraju da je visoka otpornost reproduktivnih organa nekih gljiva na uticaj ultravioletne svjetlosti zavisana od pigmentata, veličine samih organa i broja jedara u ćelijama. Da bi potvrdili ovo mišljenje E n g l i s h i saradnici (21) ispitivali su uticaj ove svjetlosti i na konidije drugih gljiva sa obojenim reproduktivnim organima (Alternaria sp.) i bezbojnim organima za reprodukciju (Botrytis cinerea i Penicillium spp.). Rezultati su pokazali da je redukcija klijavosti konidija obojenih zidova znatno manja od onih sa bezbojnim zidovima.

Prema rezultatima T h a n o s-a (60), koji je dejstvu ove svjetlosti izlagao konidije gljiva C. cucumerinum, C. epiphyllum i Monilinia fructicola, inhibicija klijavosti nastala je mnogo ranije. Za pomenute Cladosporium vrste zapaženo je, na primjer, smanjenje klijanja već nakon 15 sekundi dejstva ove svjetlosti, dok je zračenje u trajanju od 2 minuta bilo letalno. Za Monilinia vrstu odgovarajuća redukcija klijavosti nastala je tek poslije inkubacije od 5 minuta, dok je za potpun gubitak vitalnosti bilo potrebno duže dejstvo.

Ove razlike u pogledu otpornosti pojedinih Cladosporium vrsta, koje su dobijene od raznih istraživača, nastale su vjerovatno zbog različite jačine izvora zračenja i nejednake udaljenosti izvora svjetlosti od objekta posmatranja.

Visokom otpornošću konidija C. herbarum na uticaj ultravioletne svjetlosti može se objasniti i pojava ove gljive na velikim visinama, gdje je bila izolovana čak na 4-9000 metara nadmorske visine, D e V r i e s (18).

6.5. Podloga

6.51. Porast micelije na raznim hranljivim podlogama

Materijal i metod

Razvoj micelije ispitivali smo na slijedećim hranljivim podlogama: C z a p e k agar, K r o m p i r dekstrozni agar, M a l c a gar, O v a s agar, E k s t r a k t lista jasena i dekstrozni agar, C z a p e k - K r o m p i r agar i V o d e n i agar. Sastav ovih podloga bio je slijedeći:

C z a p e k agar

NaNO ₃	3.- gr.
KH ₂ PO ₄	1.- "
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5 "
KCl	0,5 "
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,01 "
Glukoza D	30.- "
Agar	20.- "
Destilovana voda	1.- litar

K r o m p i r dekstrozni agar

Krompir	40.- gr.
Glukoza D	20.- "
Agar	20.- "
Destilovana voda	1.- litar

M a l c a agar

Pivski slad 5 Ba	
Agar	2%

O v a s agar

Ovas (zrno)	120.- gr.
Agar	20.- "
Destilovana voda	1.- litar

E k s t r a k t lista jasena

List jasena (suh)	100.- gr.
Glukoza D	20.- "
Agar	20.- "
Destilovana voda	1.- litar

C z a p e k - K r o m p i r agar

Czapek podloga prednjeg sastava

Krompir 40.- gr.

Agar 20.- "

V o d e n i agar

Agar 20.- gr.

Destilovana voda . . 1.- litar

Cilj ovih oglada bio je odredjivanje brzine i intenziteta razvoja micelije na različitim supstratima, odredjivanje najpovoljnije podloge za razvoj gljive i utvrđjivanje opštih karakteristika kolonija.

Pripremljene podloge razlivena su u Petri sudove, u svaki po 15 cm, i zatim zasijave fragmentima micelije veličine 2x2 mm. Praćenje razvoja micelije vršeno je u termostatu pri optimalnoj temperaturi (21°C), u toku 15 dana. Registrovanje brzine porasta vršeno je svako dnevno, mjerenjem unakrsnih prečnika kolonija, s tim što je prvo mjereno, kao i u slučaju ispitivanja uticaja temperature, izvršeno poslije tri dana inkubacije, tj. nakon vidljivo obrazovane kolonije nove micelije. Na kraju je izračunat prosječan dnevni porast.

Rezultati oglada

Prosječan dnevni porast micelije u toku 15 dana razvoja prikazan je tabelarno (tabela 18), gdje su podaci obradjeni varijacionom statistikom, dok je intenzitet razvoja micelije prikazan grafički (grafikon 9.).

Ovi rezultati pokazuju da je najbrži porast micelije na podlozi: krompir dekstrozni agar, malo agar i ekstrakt lista jasena. Na ovim supstratima prosječan dnevni porast micelije bio je približno jednak (4,75; 4,65; 4,73 mm). Micelija najsporije raste na podlozi od vodeno g agar (1,63 mm), ali su i ostale podloge (Czapek agar, ovas agar i Czapek - krompir agar) slabi supstrati za razvoj C. herbarum.

Što se tiče intenziteta razvoja micelije na ispitivanim podlo

gama (grafikon 9) zapaženo je da micelija na podlogama k r o m p i r dekstrozni agar, m a l c agar i e k s t r a k t lista jasena ima ravnomjeran porast (prirašćivanje je pravolinijsko), dok je na ostalim podlogama zabilježeno opadanje brzine porasta sa starenjem kultura.

Tabela 18. Uticaj podloge na porast micelije
Table 18. Influence of medium on the growth of mycelium

Podloga	M	±	m	s	V	n	Var. širina
Czapek	2,51	0,12	0,26	10,36	33		2,00 - 2,84
Krompir	4,75	0,18	0,38	8,00	34		4,21 - 5,71
Malc	4,65	0,17	0,19	4,09	12		4,28 - 4,91
Ovas	2,84	0,14	0,17	5,98	13		2,58 - 3,36
List jasena	4,73	0,08	0,07	1,48	9		4,62 - 4,86
Czapek-krompir	2,88	0,23	0,50	17,36	36		1,58 - 4,00
Vodeni agar	1,63	0,12	0,09	5,52	8		1,54 - 1,79

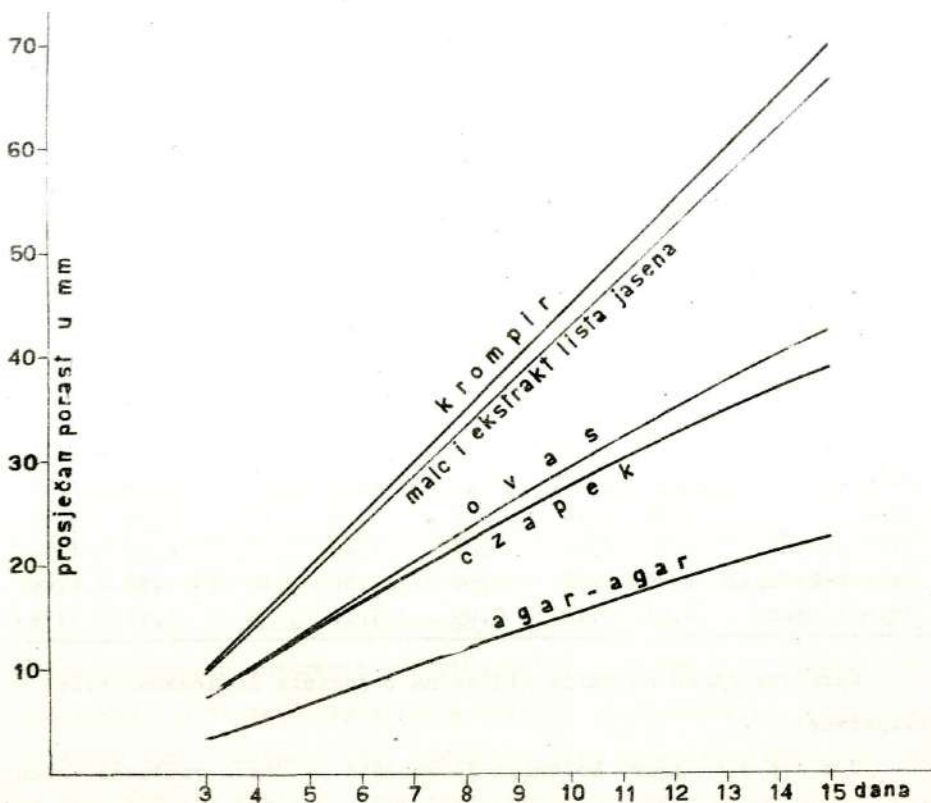
Karakteristike kolonija gljive na pojedinim podlogama bile su slijedeće:

C z a p e k agar. Kolonija je vunasta, sa dosta vazdušne micelije. Boja je u početku blijedo siva, a docnije sivo mrka, tako da je kolonija u sredini uvijek nešto tamnija. Rub kolonije je bezbojan i razvija se nepravilno.

K r o m p i r dekstrozni agar. Kolonija je talasasta. Boja je u početku maslinasto zelena, a docnije zeleno mrka, prošarana sivkastim površinama vazdušne micelije. Rub kolonije je jasan, bjeličast i razvija se pravilno.

M a l c agar. Porast micelije je bujan, kolonija je somotasta, maslinasto zelena, bez vazdušne micelije, tako da je njena površina praškastog izgleda. Rub kolonije je jasno razvijen i obrazuje pravilan krug.

O v a s agar. Porast micelije je srednji. Kolonija se formira talasasto, bez vazdušne micelije. Boja micelije je mrko zelena, a rub kolonije je slabo vidljiv i pravilan.



Grafikon 9. Intenzitet razvoja C. herbarum na raznim podlogama
 Fig. 9. The intensity of growth of C. herbarum on different media

Ekstrakt lista jasena. Micelija ima bujan porast. Boja je maslinasto zelena. Površina kolonije je somotasta, a rub pravilan i slabo vidljiv.

Czapek - Krompir agar. Na ovoj kombinovanoj podlozi kolonije imaju brzinu porasta približno istu kao na Czapek podlozi standardnog sastava, dok su boja i pravilnost ruba slični onim na podlogama od krompir dekstroznog agara.

Vodeni agar. Na ovoj podlozi micelija raste vrlo slabo. Boja je mrko zelena, u sredini kolonije nešto tamnija. Rub kolonije je zrakast, slabo vidljiv i dosta pravilan.

Na ispitivanim podlogama nije zapaženo lučenje pigmenta. Obra zovanje reproduktivnih organa na svim podlogama zapaženo je već pos

lije 3 dana, tj. odmah sa pojavom nove micelije. Međutim, formiranje savršene forme Mycosphaerella tulasnei Jancz. nije zabilježeno.

6.52. Uticaaj glucida na porast micelije

Materijal i metod

Uporedo sa ispitivanjima uticaja hranljive podloge na porast micelije C. herbarum, ispitivali smo i uticaj glucida na brzinu razvoja gljive. Koristili smo slijedeće glucide kao izvor ugljenične ishrane: glukoza D, saharoza, laktoza i skrob. Korištena je standardna Czapek agar podloga, u kojoj je samo mijenjan izvor ugljenika. Razvoj micelije praćen je u toku 15 dana u Petri sudovima, u termosatu, pri optimalnoj temperaturi (21°C), mjerenjem unakrsnih prečnika kolonija na početku i na kraju razvoja. Srednje vrijednosti dnevnog porasta obradjene su varijacionom statistikom i prikazane su u tabeli 19. Ogledi su ponovljeni tri puta, a ukupan broj proba (n), za pojedine izvore ugljenika, označen je u tabeli.

Tabela 19. Uticaj glucida na porast micelije

Table 19. Influence of glycosides on the growth of mycelium

Vrsta glucida	M	±	m	s	V	n	Var. širina
Glukoza	2,51	0,12	0,26	10,36	33	2,00 - 2,84	
Saharoza	2,64	0,12	0,20	7,58	23	2,06 - 2,92	
Laktoza	2,87	0,20	0,27	9,41	15	2,28 - 3,28	
Skrob	2,68	0,27	0,38	14,18	17	2,22 - 3,33	

Iz ove tabele vidi se da izvor ugljenika nije imao većeg uticaja na brzinu porasta micelije. Pretpostavljali smo da će najbrži porast biti na podlozi sa glukozom, a najsporiji sa skrobom. Međutim, prosječni dnevni porast micelije najveći je na podlozi sa laktosom (2,87 mm), zatim na onim sa skrobom i saharozom, dok je na glukoznoj podlozi bio najmanji (2,51 mm). Ovo navodi na zaključak da gljiva ima jednaku sposobnost da asimiliše sve ispitivane vrste glucida, ko je, uz pomoć svojih fermenta, prethodno razlaže.

7. FERMENTNA AKTIVNOST

7.1. Oksido-redukциони procesi

Imajući u vidu značaj ovih fermenata u procesu razgradnje zido
va biljnih ćelija, što je do sada naročito isticano kod gljiva prouz
rokovača truleži drveta, bilo je od interesa ispitati da li i gljiva
C. herbarum proizvodi ove materije i u kakvom intenzitetu. Smatra se
da je uloga ovih fermenata naročito značajna u procesima delignifi
kacije, gdje se pomoću njih ligninska supstanca prevodi u oblike lak
še rastvorljive u vodi (D i o n i L y r, cit. C h i a r a p p a ,
11). C h i a r a p p a osim toga pripisuje ovim fermentima i spo
sobnost oksidacije fenola u druge fitotoksične materije, kao i sposo
bnost inaktivacije proteina, auksina i hormona.

7.1.1. Aktivnost oksidaza

Za ova ispitivanja upotrebljen je metod kojeg je prvi opisao
B a v e n d a m m (6), a koji je docnije prihvaćen i razradjen od D a
v i d s o n - a i saradnika (15). U našim ogledima, za razliku od D e
v i d s o n - a, umjesto malc podloge upotrebljena je nešto svjetli
ja podloga od krompir dekstroznog agar. Poslije pripremanja i hla
djenja u podlogu je na svakih 29,75 cm dodavano po 5,25 cm 0,5% ra
stvara galne, odnosno taninske kiseline. Vrijednost pH podloga bila
je 4,3. Zasiijavanje je vršeno fragmentima micelije veličine 2x2 mm,
iz čiste kulture stare 2 mjeseca. Petri sudovi u kojima su praćeni
ovi ogledi držani su u termostatu pri temperaturi 21°C. Ispitivanja
su izvršena u tri serije, sa po šest proba, a kao test organizam kori
štena je gljiva Coriolus versicolor (Fr.) Quel. Praćenje aktivnosti
oksidaze vršeno je u toku 7 dana.

Rad sa galnom kiselinom. Prosječan dnevni porast micelije i širina
zone obojavanja podloge izneti su u tabeli 20. Zapaženo je da oboja
vanje podloge nastaje već nakon 24 sata inkubacije. Micelija raste

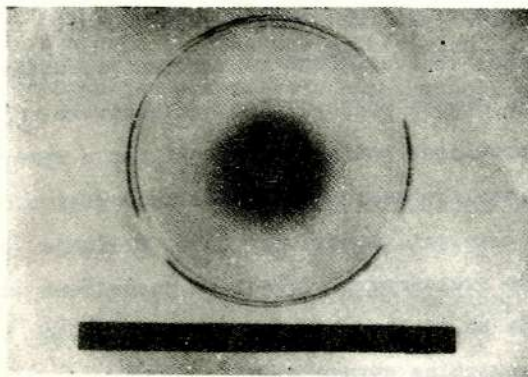
na podlozi sa galnom kiselinom, iako znatno sporije nego na kontrolnim podlogama. Prosječan dnevni porast iznosio je 2,17 mm. Obojavanje podloge je vrlo intenzivno, tako da već poslije 7 dana prečnik obojene, difuzione, zone iznosi 42-48 mm (mjereno zajedno sa kolonijom micelije), dok širina samog oreola obojene zone izvan kolonije glji

Tabela 20. Oksidacija podloge sa galnom i taninskom kiselinom
Table 20. Fermentation of media with gallic and tannic acid

Kiselina u podlozi	Intenzitet reakcije	Prosječan dnevni porast micelije u mm	Prečnik obojene zone mm	Grupa po Davidsonu
Galna	++++	2,17	42-48	6
Taninska	++++	2,12	21-28	

ve iznosi oko 30 mm. Boja difuzione zone, prema kodeksu boja od S e g u y-a (53) pripada tonovima 158, 146 i 126. Najintenzivnije obojavanje javlja se u zoni inokuluma, dok je prema periferiji boja svjetlija. Obojavanje podloge sa galnom kiselinom prikazano je na slici

4.



Slika 4. Oksidacija podloge sa galnom kiselinom uticajem C. herbarum
Photo 4. Fermentation of media with gallic acid by C. herbarum

Rad sa taninskom kiselinom. Na ovoj podlozi je također dobijena pozitivna reakcija, s tim što je obojavanje nešto svjetlije nego na podlozi sa galnom kiselinom. Micelija raste približno isto (prosječan dnevni porast je 2,12 mm). Obojavanje podloge počinje 24 sata inkubacije, a širina obojene zone je ovdje znatno manja, 21-28 mm zajedno

sa kolonijom gljive, dok je širina samog oreola obojene zone iznosi la prosječno 10 mm (mjereno nakon 7 dana inkubacije).

Diskusija

Prema stepenu obojavanja podloge i širini difuzione zone D a v i d s o n i saradnici su podijelili gljive u pet grupa. U grupu "++++" svrstane su one vrste čiji je intenzitet oksidacionih procesa najizraženiji, dok su u grupu "+" svrstane gljive sa najslabije i zraženim ovim procesima. Gljiva C. versicolor, koju smo mi koristili kao test organizam, svrstana je prema ovim autorima u grupu "++++" (difuziona zona neprozirna, tamno obojena i širi se znatno ispred zone inokuluma). Isti intenzitet obojavanja pokazala je i proučavana gljiva C. herbarum.

7.12. Aktivnost reduktaza

Za ova ispitivanja koristili smo metod koji je opisao K r s t i ć (36), po kojem se aktivnost ovog fermenta ocjenjuje na osnovu redukcije metil zelenila. Pripremljeni rastvor ove boje (Methyl green - Hema Drug) u bidestilovanoj vodi, u 0,005% koncentraciji, dodavan je u jednakom omjeru u tečnu Czapek podlogu (100 ccm rastvora boje i 100 ccm podloge). Ovako pripremljene podloge razlivali smo u epruvete, u svaku po 5 ccm, zatim ih, poslije zasijavanja micelijom gljive, čuvali u potpunoj tami, u termostatu, pri temperaturi 23°C. Praćenje obojavanja podloge vršeno je svakodnevno. Ogledi su ponovljeni tri puta a u svakoj seriji bilo je po 10 epruveta zasijanih micelijom i po 3 epruvete bez micelije (kontrolne epruvete).

Obezbojavanje podloge, odnosno aktivnost reduktaze, pratili smo i na drugi način. U Czapek-agar podlogu dodavali smo po 1 ccm 0,1% rastvora metil zelenila na svakih 30 ccm podloge. Podloge su, zatim, razliveno u Petri sudove i zasijane micelijom i dalje čuvane u termostatu, pri konstantnoj temperaturi, kao i u prethodnom slučaju. Ovi ogledu su također ponovljeni tri puta, s tim što je pri svakom ponavljanju bilo po 5 proba. Kao kontrola služile su iste podloge, u ko

58

je, međutim, nije unesena micelija gljive.

Rezultati oglada

Ogled 1. Neznatno obezbojavanje podloge zapaženo je već poslije 3 dana inkubacije. Zeleno plava boja postepeno se gubila, podloga je dobijala svjetlo zelenkastu nijansu, da bi nakon 12 dana postala potpuno bezbojna. Za isto vrijeme kontrolne podloge zadržale su svoju osnovnu zeleno plavu boju.

Ogled 2. Obezbojavanje podloge razvijalo se postepeno, uporedo sa širenjem kolonije gljive, ali je ova zona jedva prelazila rub kolonije (oko 1 mm).

Na osnovu ovih ispitivanja može se zaključiti da gljiva C. herbarum proizvodi reduktazu, ali je njena aktivnost znatno slabija od oksidaza. Međutim, interesantno je da ova gljiva ne proizvodi ovaj ferment u kulturama u kojima nema redukujućih materija. Ovo su pokazali ogledi koji su bili posebno postavljeni, korištenjem filtrata ove gljive u koji je dodavano metil zelenilo. Vidljive promjene boje ovako pripremljenih supstrata nisu nastupile ni poslije 30 dana inkubacije.

7.2. Hidrolitički fermenti

Ispitivanje aktivnosti hidrolitičkih fermenata nekih Cladosporium vrsta bilo je predmet izučavanja mnogih istraživača. Naročito je bio ispitan ferment celulaza, čija je aktivnost konstatovana i kod C. herbarum (A r a k a w a, 3; D e V r i e s, 18). Našim istraživanjima željeli smo da utvrdimo da li i ovaj izolat C. herbarum luči ove fermente i kakva je njihova aktivnost.

7.21. Saharaza

Materijal i metod

Pripremili smo 10 Erlen-Mayer-ovih boca sa po 250 ccm Czapek tečne podloge različite kiselosti (pH 2,5-10,5). Poslije izvršene sterilizacije, izdvojeno je iz svake boce po 50 ccm podloge, koja je

zatim razlivena u po 3 epruvete. Ostatak podloge u bocama zasijali smo micelijom gljive i držali pri sobnoj temperaturi (20° - 22° C) u toku 25 dana. Poslije ovog perioda inkubacije dobijeni filtrat gljive tretiran je reagensima Feling I i II radi utvrđivanja prisustva monosaharida. Ovi ogledi ponovljeni su pet puta. Podloge u epruветama služile su kao kontrola i one nisu bile zasijavane.

Rezultati oglеda

Analiza je pokazala pozitivnu reakciju pri tretiranju filtrata gljive Felingovim rastvorima, što znači da je u filtratu bilo slobodnih monosaharida. Što se tiče kontrolnih podloga prisustvo monoza otkriveno je u onim uzorcima u kojima je, radi dobijanja kiselih sredina, dodavana hlorovodonična kiselina. U ostalim uzorcima tragovi monoza nisu zapaženi. Na osnovu ovih rezultata može se zaključiti da je pojava monosaharida u filtratu gljive posljedica aktivnosti saharaze, ali i da je njihovu pojavu moguće izazvati i dejstvom nekih kiselina.

7.22. Celulaza

Materijal i metod

Rad sa filter papirom. H a z r a i saradnici (30) opisali su metod brzog odredjivanja aktivnosti fermenta celulaza kod gljiva. Ovaj metod poslužio nam je kao osnov za naše ogledе.

U Petri sudovima (prečnika 10 cm) pripremili smo podloge krompir dekstroznog agara i agar-agara (po 15 ccm u svakom sudu), preko kojih smo postavili sterilisan filter papir. Ovako pripremljene podloge zasijane su micelijom i čuvane u termostatu pri temperaturi od 21° C.

Nakon 30-dnevnog razvoja micelije na filter papiru, na kojem je imala bujan porast, skinuli smo papir sa podloge i očistili ga od vegetativnih dijelova gljive razvijenih na površini. Filter papir je zatim tretiran hlor-cink-jod reagensom, pripremljenim prema receptu D o p - G a u t i e - a (19).

Rad sa sterilnom vatom. Po ugledu na L u t z-ova istraživanja (42) pripremili smo uobičajenu tečnu Czapek podlogu iz koje je izostavljen izvor ugljenične ishrane. U podlogu je, umjesto šećera, stavljena sterilna vata, poslije čega je izvršeno zasijavanje micelijom gljive. Kulture su ostavljene da se razvijaju u toku 60 dana u termostatu pri temperaturi 21°C, poslije čega je izvršena analiza prisustva monoza u filtratu.

Rezultati oglada

Pri upotrebi filter papira zapažene su, poslije tretiranja hlor cink-jodom, različite nijanse obojavanja u pojedinim zonama. Filter papir izvan kolonije gljive bio je tamno plave boje, dok se u zoni i nokuluma boja mijenjala, po rubu je bila crvenkasta a u sredini kolo nije svjetlo smeđe boje.

Mikroskopskom analizom celuloznih vlakana, uzetih iz sredine ranije formirane kolonije gljive, zapaženo je da su ovi protkani micelijom i da je proces njihovog razaranja u toku. Vlakna su bila ispucale i mjestimično prošarana šupljinama.

Medjutim, iako su promjene u gradnji celuloznih vlakana bile uočljive, ipak nam se čini da ovaj metod nije dovoljno siguran za određivanje intenziteta aktivnosti celulaze.

Rad sa sterilnom vatom dao je još nesigurnije rezultate. Iako je porast micelije na svim podlogama sa sterilnom vatom bio bujan, u filtratu gljive nije zabilježeno prisustvo šećera. Pretpostavljamo da gljiva razlaže izvjesnu količinu celuloze, koju u cjelini koristi za svoje potrebe ili je osjetljivost Felingovih rastvora nedovoljna da otkrije male količine šećera u supstratu.

Ovi rezultati naveli su nas da ispitamo brzinu asimilacije šećera iz podloge i da utvrdimo vrijeme kada i posljednja zaliha ovog izvora ugljenika biva iskorištena iz podloge. U ovom cilju izvedeni su slijedeći ogladi:

krompir tečnu podlogu sa glukozom pripremili smo u Erlen-Mayer

ovim bocama, po 250 ccm u svakoj boci, koje smo zatim zasijali micelijom gljive. Poslije 30 dana razvoja pri sobnoj temperaturi (20^o-22^oC) kontrolisali smo prisustvo glukoze u podlozi. Tretiranje Felsingovim rastvorima pokazalo je da je u podlozi ovog šećera bilo u dovoljnoj količini. Do istog rezultata došli smo i prilikom kontrole nakon 60 dana inkubacije. Potpuno isčezavanje slobodnog šećera iz podloge za bilježeno je nakon 4 mjeseca.

Ovi ogledi, koji su izvedeni u tri serije sa po 10 proba, ukazuju na relativno sporu asimilaciju glukoze iz podloge, u kojoj je šećer bio zastupljen sa 2%. Do ovoga je svakako došlo i zbog postojanja drugog izvora ugljenika u podlozi (krompir i mogući sastojci u tekućoj vodi).

Diskusija

Već smo naveli da je ispitivanje aktivnosti celulaze bilo vršeno i od drugih istraživača. Tako su H u s e i n i R i c h (32) i S t r i d e r (59) ustanovili da gljiva Cladosporium cucumerinum ta kodjer proizvodi znatnu količinu ovog fermenta i da u procesu razvoja bolesti njemu pripada važna uloga. A r a k a w a (3) je utvrdio da C. herbarum razlaže hidrocelulozu i da je ovaj proces stimulisan prisustvom ksiloze. D e V r i e s (18) je, ispitujući aktivnost celulaze na podlogama gdje je izvor ugljenika bio filter papir, ustanovio da mnoge Cladosporium vrste, među kojima i C. herbarum, vrše razlaganje celuloze.

Naša ispitivanja potvrđuju rezultate drugih autora prema kojima C. herbarum proizvodi ferment celulazu. Medjutim, prema našoj ocjeni, aktivnost ovog fermenta kod našeg izolata nije jako izražena ili su metodi koje smo koristili nedovoljno precizni.

8. VJEŠTAČKE INFEKCIJE

8.1. Infekcije u prirodi

Materijal i metod

U proljeće 1962.godine posadili smo na jednoj parceli, u rasadniku "Sedrenik" pored Sarajeva, 80 sadnica bijelog jasena i 20 sadnica crnog jasena. Starost ovih sadnica bila je 4 godine.

Prvu seriju inokulacija izvršili smo 24.aprila 1962.godine. Ta da je bilo inokulisano 18 sadnica bijelog jasena,medju kojima je bilo 15 sadnica u fazi pred otvaranja pupoljaka,dok su 3 sadnice već imale razvijene prve listove. Inokulacije su izvršene suspenzijom konidija u tekućoj vodi,polijevanjem vrhova sadnica. Konidije su uzete iz čiste kulture gljive,uzgojene na tačnoj krompir dekstroznoj podlozi,starosti 60 dana. Cilj ovih oglada bio je utvrđivanje mogućnosti infekcije u prirodi,pod normalnim uslovima,neposredno pred kretanje vegetacije. Klimatske prilike,naime,u vrijeme inokulacija, bile su nepovoljne za razvoj bolesti. Vrijeme je bilo sunčano i toplo. Srednja dnevna temperatura za Sarajevo,prema podacima Hidrometeorološkog zavoda u Sarajevu,iznosila je 17,0°C. Maksimalna temperatura bila je 24,8°C, a minimalna 7,9°C. Srednja relativna vlaga vazduha iznosila je svega 57%.

Drugu seriju inokulacija izvršili smo 4.maja 1962.godine, koristeći ponovo suspenziju konidija pripremljenu na isti način. U ovoj seriji bile su inokulisane sve preostale sadnice (62 sadnice bijelog jasena i 20 sadnica crnog jasena),koje su tada imale formirane prve listove. Neke od ovih sadnica inokulisali smo poslije prethodnog povredjivanja listova,što je izvršeno sterilnom iglom (ukupno 15 sadnica bijelog jasena). Preostale sadnice inokulisali smo na način kao i u prethodnoj seriji. Ovim smo željeli utvrditi značaj povreda liš

ća na mogućnost lakšeg ostvarivanja infekcija. Druga serija inokulacija, za razliku od prve serije, izvedena je pri klimatskim prilikama povoljnijim za razvoj bolesti. Vrijeme je bilo oblačno, a zabilježene su i slabe padavine u nekoliko narednih dana. Srednja dnevna temperatura na dan inokulisanja iznosila je 10,8°C, maksimalna je bila 17,2°C, a minimalna 1,1°C. Srednja relativna vlaga vazduha bila je 79%.

Rezultati ogljeda

Prva serija inokulacija. Prvim pregledom sadnica, koji je izvršen 30. aprila, tj. 6 dana nakon izvršenih inokulacija, nisu zapažene nikakve promjene. Većina inokuliranih sadnica nije bila prolistala, tako da se određena zapažanja i nisu mogla ostvariti. Drugi pregled ovih sadnica izvršen je 4. maja. Tada je na sadnicama, što su u vrijeme inokulisanja imale razvijene listove, zapažena pojava mrkih nekrotičnih pjega po obodu lista. Ove pjege bile su sitne a njihov broj mali. Preostale sadnice su još uvijek bile bez znakova bolesti.

Slijedeća analiza sadnica izvršena je 10. maja. Tada je, od ukupno 18 sadnica koliko je inokulirano u prvoj seriji, pojava nekroze na mladom lišću bila zapažena samo na 3 sadnice. To su bile iste sadnice na kojima su ove promjene bile zapažene i pri prethodnoj kontroli, dakle, one sadnice što su na dan inokulisanja (24. aprila) imale razvijene listove. Jedna od ovih sadnica imala je nekrotiran vrh izbojka (pojava koja je bila tipična u vrijeme razvoja bolesti u Pančevačkom ritu 1960. godine). U toku narednih kontrola uspjeha vještačkih infekcija, što je obavljano svakih 10-15 dana, na sadnicama nisu bile zabilježene dalje promjene. One su se do kraja ljeta normalno razvijale.

Druga serija inokulacija. Kao i u prethodnom slučaju ni ovdje nisu zapažene nikakve promjene na sadnicama pri kontroli koja je izvršena 6 dana nakon izvršenih inokulacija. Prilikom druge kontrole, koja je izvršena 18. maja, stanje je bilo slijedeće: od ukupno 15 sadnica bijelog jasena, što su bile inokulirane poslije prethodnog pov

redjivanja lišća, sitne nekrotične pjega mrke boje zapažene su na 13 sadnica. Ove nekroze bile su lokalne i nisu ostavljale posljedice u daljem razvoju biljaka. Između preostalih 47 sadnica bijelog jase na, koje u vrijeme inokulisanja nisu bile povredjivane, slične pojave nekrotičnih pjega zapažena je na 30 sadnica. Nekroza vršnog izbojka koji je postao mrk i povijen, zapažena je među ovim sadnicama samo u jednom primjeru. U toku daljeg razvoja biljaka pojava nekrotičnih pjega zabilježena je na gotovo svim sadnicama, ali su ove bile ograničene samo na mlado lišće.

Na našoj oglednoj plohi zapazili smo, na sadnicama bijelog jase na, pojavu lisnih vašiju, tako da je postojala sumnja o eventualnom učešću ovih insekata u procesu razvoja zapaženih nekroza, bilo kao njihovi direktni prouzrokovani ili indirektno, lučenjem medne rose, koja je pospješila razvoj C. herbarum. Da bismo provjerili da li je pojava nekrotičnih pjega bila ograničena samo na inokulisane sadnice, izvršili smo detaljan pregled svih sadnica bijelog jasena u rasadniku "Sedrenik". Na ovaj način sve ostale sadnice jasena (koje nisu bile predmet naših tretiranja) služile su kao kontrola. Pojava vašiju bila je zapažena i na ovim sadnicama, ali razvoj sličnih nekroza nije konstatovan. O ulozi vašiju u procesu infekcije biće govora u diskusiji ovog poglavlja.

Što se tiče sadnica crnog jasena, pojava nekrotičnih pjega bila je zapažena samo na 3 sadnice, dok su ostale bile bez ikakvih promjena na lišću.

Da bismo potvrdili da je C. herbarum prouzrokovao pojavu nekrotičnih pjega na lišću bijelog jasena izvršena je reizolacija gljive iz ovih dijelova tkiva. Novi izolat bio je identičan prethodnom. Reizolacija je izvršena 18. maja iste godine i to sa svake sadnice posebno. Iz nekrotičnih pjega lista crnog jasena reizolacija nije uspjela.

Diskusija

Analizirajući rezultate inokulacija pod prirodnim uslovima može se konstatovati da se tipični simptomi bolesti, koji su ranije bili opisani, ne javljaju. Izuzeci koji su u par slučajeva zabilježeni nisu dovoljni za donošenje realnijih zaključaka. Ipak je zapaženo da su inokulacije bile uspješnije ako su ove izvršene poslije prethodnog otvaranja pupoljaka. U ovakvim slučajevima uspjeh inokulacija je preko 50%. Zapažen je također slab uspjeh vještačkih infekcija u prvoj seriji, što se može tumačiti i neodgovarajućim klimatskim prilikama za pojavu bolesti. Osim toga i fenofaza u razvoju biljaka, period pred kretanje vegetacije, ne odgovara uslovima koji su nužni za pojavu i razvoj ove bolesti. Naime, u slučaju prve serije inokulacija, gljiva je potrebnu vlagu za svoj razvoj nalazila samo u atmosferi, dok je u drugom slučaju izvjesna količina vlage bila obezbjeđena i procesom transpiracije, koja za uspjeh infekcija može da ima veliki značaj. Prema Newhall-u (47) gljiva Cladosporium fulvum se razvija i u uslovima relativne vlage vazduha od 80%, jer se na površini lišća još uvijek nalazi dovoljno vlage koja obezbjeđuje uslove za klijanje konidija.

Nasuprot uslovima koje smo imali pri obavljanju inokulacija u prvoj seriji, klimatske prilike u vrijeme druge serije bile su znatno povoljnije za razvoj gljive. Vazduh je bio bogatiji vlagom, a mlađo lišće je ove uslove još poboljšavalo, što je uticalo na bolji uspjeh vještačkih infekcija.

Osim toga i pojava vašiju, o kojima je bilo riječi, vjerovatno je uticala na veći uspjeh infekcija u drugoj seriji. Značaj vašiju u procesu infekcije nekih gljiva bio je ranije zapažen od nekih istraživača. Tako su Arya i Panwar (4) pokazali da je uspjeh infekcija od C. herbarum na pšenici bio znatno veći u prisustvu ovih insekata (78%), nego bez njih (38%). O ulozi vašiju u procesu infekcije od C. herbarum pisali su i Hausermann i Thomas

(31), koji su istakli značaj medne rose u procesu infekcije.

Iako je u našim ogledima uspjeh inokulacija bio 69%, ipak, razvoj nekrotičnih pjega (njihov broj i veličina) pokazuju da uslovi u rasadniku "Sedrenik" ne odgovaraju razvoju C. herbarum. Ovome je doprinjeo i sam položaj rasadnika, koji leži na uzvišici gdje je cirkulacija vazduha vrlo dobra, što je uticalo na naše rezultate.

Ogledima koje smo izveli naredne 1963. godine pokušali smo obezbjediti povoljnije uslove za razvoj bolesti u kom cilju su postavljene laboratorijski pokusi.

8.2 Infekcije u laboratorijskim uslovima

Materijal i metod

Ovi ogledi postavljeni su na dva načina.

U prvom slučaju inokulacije smo izvršili na trogodišnjim sadnicama bijelog jasena, porijeklom iz okoline Sanskog Mosta. Ukupno je zasadjeno 20 sadnica, a njihovo inokulisanje izvršeno je 8. aprila u trenutku kada su pupoljci bili u fazi otvaranja. Inokulisane sadnice, koje su se razvijale u saksijama, čuvane su u uslovima sobne temperature (20° - 22° C). Poslije 7 dana inkubacije, pošto nisu bile zapažene nikakve promjene na izbojcima i mladom lišću, izvršena je provjera klijavosti konidija sa izbojaka sadnica, što je dalo negativne rezultate. Zbog toga smo posumnjali u pogodnost uslova za nastanak infekcija, pa su 15. aprila izvršene nove inokulacije na isti način, suspenzijom konidija u tekućoj vodi, poslije čega su sadnice pokrivene staklenim cilindrima. Zalijevanje zemljišta u saksijama vršeno je svakodnevno i obilato, tako da je, i pored mogućnosti isparavanja vlage ispod cilindra i kroz zemljište, vazduh ispod cilindra bio zasićen vodenom parom, čime su uslovi za klijanje konidija i infekcije bili obezbjedjeni.

U drugom slučaju, pripremili smo izbojke bijelog jasena, koji su inokulisani po istom metodu. Iz Arboretuma Šumarskog fakulteta u Sarajevu uzeli smo ukupno 100 komada izbojaka, dužine oko 20 cm, koji su

održavani u staklenim sudovima pri sobnoj temperaturi. Tekuća voda u sudovima zamjenjivana je svakodnevno. Inokulacije ovih izbojaka iz vršene su u vrijeme otvaranja pupoljaka, s tim što smo i ovdje izvršili njihovo povredjivanje na 50 primjeraka. Sudovi su, poslije izvršenog inokulisanja, pokriveni staklenim cilindrima u toku narednih 72 sata, što je trebalo da obezbjedi maksimalnu relativnu vlagu za period, koji je po našoj ocjeni bio dovoljan za klijanje konidija i penetraciju micelije u tkivo domaćina. Stakleni cilindri su zatim uklonjeni, a sudovi su, zajedno sa izbojcima, dalje održavani izvan laboratorije uz redovno prskanje vodom radi održavanja vlažnosti. Promjene na izbojcima praćene su svakodnevno.

Rezultati oglada

Ogledi u saksijama. Pojava prvih nekrotičnih pjega (Slika 5) za pažena je na najmlađem dijelu izbojaka devet dana nakon izvršenih inokulacija. Njihova veličina bila je oko 2 mm. Narednog dana veličina ovih pjega znatno se povećala, zahvatajući izbojak u dužini oko 1 cm, a ubrzo zatim cijeli vršni izbojak bio je nekrotiran. Nekrotične pjege su se zatim širile prema osnovi izbojka, tako da se ovaj sve više povijao. I novi izbojci koji su naknadno tjerali bili su ubrzo nekrotirani i osušeni. Pojava sušenja vršnih izbojaka zapažena je na svim sadnicama, a najkasnije nakon 12 dana inkubacije.

Da bismo provjerili kako će se bolest dalje razvijati, ako su u slovi vlage za razvoj gljive nepovoljni, uklonili smo sa jednog dijela sadnica staklene cilindre. Nekoliko dana doznije izgled ovih sadnica se naglo popravio i njihov dalji razvoj je bio sasvim normalan. Za isto vrijeme preostale sadnice ispod cilindara trpjele su i dalje od nekroza vršnih izbojaka i ostavljale su utisak potištenosti. Bilo je jasno da su ovakvi uslovi za razvoj bolesti vrlo povoljni. Medju tim, uslovi vlažnosti u laboratoriji, i pored relativno niske temperature koja je u njoj održavana (oko 20°C), nisu bili povoljni infekciji od C. herbarum.

Ogledi sa izbojcima. I ovdje su, kao i na sadnicama u saksijama, zapažene slične promjene. Prva pojava nekrotičnih pjega zapažena je na zeljastim dijelovima izbojaka i na mladom lišću nakon 7 dana inkubacije. Nisu zapažene razlike između izbojaka na kojima je prethodno izvršeno povredjivanje lisnih pupoljaka i onih koje nisu bile tretirane na ovaj način. Međutim, dalji razvoj ovih promjena nije bilo moguće pratiti, jer je vitalnost izbojaka bilo teško održavati zbog čega i dobijeni rezultati ostavljaju utisak nesigurnosti.

Diskusija

Na osnovu ovih ogleda možemo zaključiti da se u uslovima niske relativne vlage, kakvi su postojali u našoj laboratoriji za vrijeme trajanja ogleda, infekcije ne ostvaruju. Za uspjeh infekcija bila je potrebna maksimalna relativna vlaga, dok temperaturni uslovi nisu imali posebnog značaja. Mi smo ranije eksperimentalno utvrdili da je optimum za klijanje konidija 98-100% relativne vlage. Do sličnih rezultata došao je i H a s p e r (29) koji je sa konidijama C. fulvum vršio inokulacije na Solanum lycopersicum. On je ustanovio da inokulacije u prirodi daju negativne rezultate, jer klijanje konidija biva zaustavljeno sušom i visokom temperaturom.

A r y a i P a n w a r (4) su također ukazali da je uspjeh infekcija sa gljivom C. herbarum na pšenici zavisio od visoke relativne vlage i da je potrebno držati mlade biljke najmanje 48 sati u uslovima 100% vlage vazduha. Ovi istraživači su osim toga pokazali da je uspjeh infekcija veći u slučajevima kada se infekcije vrše sa suspenzijom konidija u hranljivim rastvorima.

U našim ogledima pojavile su se izvjesne razlike u vremenu inkubacije kod sadnica u saksijama i izbojaka u staklenim sudovima. Ovo je vjerovatno rezultat veće receptivnosti izbojaka, zbog težih uslova pod kojim su održavani.

9. PENETRACIJA GLJIVE U LISNO TKIVO I ANATOMSKE PROMJENE U NJEMU

Prema dosadašnjim ispitivanjima utvrđeno je da C. herbarum prodi-
re u tkivo domaćina kroz stome ili direktno kroz epidermis, šireći
se zatim intercelularno. Mnoga istraživanja su pokazala da se slič
no ponašaju i druge Cladosporium vrste. Tako je B o n d (8) za glji-
vu C. fulvum ustanovio da njene hife prodiru kroz stome lista paradaj-
za, bez prethodnog formiranja apresorija ili drugih modifikacija na
hifama, a zatim se šire intercelično. Isti autor navodi da je sličan
mehanizam infekcije i kod C. cucumerinum i C. herbarum, na osnovu čega
sugerira da je ova karakteristika opšta za sve Cladosporium vrste. I
H a s p e r (29) je, ispitujući mehanizam infekcije kod C. fulvum, do-
bio slične rezultate. Najnovija istraživanja, koja su izvršili A r y a
i P a n w a r (4) za gljivu C. herbarum na pšenici, pokazuju da hife
ove gljive prodiru u tkivo domaćina kako kroz stome tako i direktno
kroz epidermis, a da se dalje razvijaju inter i intracelularno.

Bilo je zbog toga interesantno ispitati način prodiranja C. her-
barum u tkivo lista jasena, u kom cilju su bili postavljeni slijede-
ći ogledi:

Materijal i metod

Na mlado lišće četverogodišnjih sadnica bijelog jasena nanosili
smo suspenziju konidija gljive u hranljivoj podlozi (tečna Czapek po-
dloga bez dodatka šećera). Lišće smo zatim postavili na sterilnu pla-
stičnu rešetku u vlažnoj komori i držali u uslovima sobne temperatu-
re (oko 23°C). Tri dana docnije izvršena je mikroskopska analiza pre-
sjeka lista radi utvrđivanja načina penetracije micelije. Analiza o-
vog tkiva vršena je i docnije. Radi lakšeg osmatranja presjeci su bo-
jeni hlor-cink-jodom.

Rezultati oglada

Ove analize su pokazale da inicijalna hifa prodi-
re u tkivo lis-
ta jasena kroz stome, ali isto tako je zapažena i penetracija direkt
70

no kroz epidermis (Slika 6). U tkivu se micelija razvijala inter i intracelularno, pretežno u sloju epidermisa, a kasnije i u sundjerastom parenhimu (Slika 7). Micelija u tkivu lišća je bezbojna, ili je vrlo slabo obojena. Konidiofore, koje gljiva ubrzo obrazuje, izbijaju na površinu lista kroz stome ili direktno probijaju epidermis (Slika 8). Na hifama koje prodiru u tkivu nisu zapažena nikakve modifikacije, kako se to i na slici 6 može vidjeti. Konidije, poslije klijanja i prodiranja hifa u epidermis, se odvajaju od površine lista i ostanu stojeće na svojim primarnim hifama.

Na lišću, koje je bilo postavljeno na hranljivu podlogu od krompir dekstroznog agara, na kojoj se razvijala kultura gljive, konstatovali smo relativno brzu dezintegraciju tkiva. Poslije 30 dana razvoja struktura ćeličnih zidova bila je potpuno narušena, a njihova unutrašnjost ispunjena hifama gljive.

Slične analize vršene su i na nekrotiranom tkivu prirodno inficiranog materijala, gdje smo zapazili da su samo ćelije epidermisa ispunjene micelijom gljive, dok je unutrašnjost tkiva ostala nepromijenjena.

Diskusija

Ova naša istraživanja, iako ograničena na specifične uslove, pri kojima je lišće jasena bilo toliko funkcionalno oslabljeno da je praktično služilo samo kao hranjivi supstrat za razvoj gljive, ipak pokazuju da micelija prodire u tkivo lista jasena direktno kroz epidermis i kroz stome i da se dalje širi inter i intraćelično. Za donošenje ovih zaključaka upotrebljen metod rada bio je dovoljno siguran. Slične zaključke nije bilo moguće izvesti analizom nekrotiranog tkiva prirodno inficiranog materijala zbog potpune dezorganizacije zastraženog tkiva. Ovim su potvrđeni rezultati koje su dobili A r y a i P a n w a r (4).

10. INKUBACIONI PERIOD

U našim istraživanjima mehanizam infekcije nije bio detaljnije proučen, tako da je proces penetracije, infekcije i daljeg razvoja organizma u tkivu domaćina ostao nejasan. Zbog toga i sam pojam inkubacionog perioda, koji se ovdje pominje, nije precizno određen. Među tim, upotrebi ovog termina u našem slučaju ne može se posebno prigovoriti, jer je vremenski period kada se bolest manifestuje u prirodi vrlo kratak, što su i brojne inokulacije, o kojima je ranije bilo riječi, potvrdile, tako da se period penetracije može i zanemariti.

Usvajajući ovu primjedbu može se zaključiti da je vrijeme inkubacije 9-12 dana i da ovo zavisi pretežno od uslova relativne vlage. Ovaj period može se znatno skratiti, ako se na mlado lišće nanese hranljiva podloga. Mi smo tako inokulisali nekoliko sadnica jasena, koje su prethodno bile 'okupane' tečnom Czapek ili krompir podlogom, tako da su isključile konidije, koristeći ovaj hranljivi izvor, mnogo brže osvajale tkivo lista. Na ovako inokulisanim biljkama prvi simptomi bolesti pojavili su se već poslije 6 dana. Međutim, ogledi koje smo izveli na sadnicama bijelog jasena u rasadniku pokazali su da je inkubacioni period nešto duži, oko 14 dana.

Slične ogledе izvodili su i H a u s e r m a n n i T h o m a s (31), koji su iz zaraženih plodova jabuke izolovali C. herbarum, a za tim suspenzijom konidija ove gljive u 8% malc ekstraktu inokulisali zdrave plodove. Tipične simptome bolesti dobili su samo u zonama sa hranljivom podlogom. Autori pretpostavljaju da se i prirodne infekcije dešavaju samo u slučajevima ako gljiva koristi razne nečistoće na tkivu domaćina, kao što su, na primjer, medna rosa i sl. Do sličnih rezultata došli su i A r y a i P a n w a r (4).

I druge Cladosporium vrste imaju približno jednako trajanje inkubacionog perioda. Tako je H a s p e r (29) za gljivu C. fulvum utvrdio da inkubacija, pri optimalnim uslovima temperature, traje 10-14 dana.

11. PREZIMLJAVANJE

Da bismo provjerili način prezimljavanja gljive pod prirodnim uslovima vršili smo izolacije iz vršnih i bočnih izbojaka zaraženih sadnica u toku cijele zime 1962., 1963. i 1964. godine. Posljednje izolacije izvršene su 20. januara 1964. godine, u periodu kada je temperatura bila znatno ispod nule. Pri svakom pokušaju izolacije uvijek je dobijena kultura C. herbarum. Ovo navodi na zaključak da gljiva prezimjava kao saprofit u raznim dijelovima domaćina, kao (vjerovatno) i na drugim mjestima, o čemu je na početku ovog rada bilo riječi. Pri uslovima povoljnim za njen razvoj gljiva pokazuje parazitske odlike. Obrazovanje savršenog (peritecijskog) stadijuma (Mycosphaerella tu lasnei Janz.) nije zapaženo, tako da je značaj askospora, koje kod nekih drugih prouzrokovaca sličnih oboljenja ostvaruju primarne infekcije, ovdje nesumnjivo sporedan.

12. MOGUĆNOST SUZBIJANJA BOLESTI

Mogućnost primjene hemijskih sredstava u zaštiti biljaka od bolesti koje prouzrokuju Gliadosporium vrste istraživali su mnogi autori. Tako je A t a n a s o v (5) utvrdio da sredstva na bazi kaptana u 0,25% koncentraciji i sredstva na bazi cineba u 0,35% koncentraciji uspješno sprječavaju razvoj C. cucumerinum na krastavcima. Autor preporučuje da se prskanja ovim sredstvima trebaju ponavljati svakih 8 dana. E l e n k o v (20) je, ispitujući 19 raznih preparata u borbi protiv C. fulvum, ustanovio da je bakarni oksihlorid u 1% koncentraciji bio najefikasniji. Ovim sredstvom reducirane su nekrotične pjege za 82-95% u odnosu na netretirane površine. Sredstva na bazi bakra u borbi protiv C. herbarum preporučuje S m o l a k (56). Nasuprot ovim rezultatima N e w h a l l (47) je konstatovao da su sredstva na bazi bakra neefikasna za suzbijanje lisnih pjega prouzrokovanih

od C.fulvum. Negativne rezultate u suzbijanju ove gljive dala su i sredstva na bazi sumpora (G u b s, 26; N e w h a l l, 47). Za borbu protiv gljiva C.fulvum i C.cucumerinum S t a n k o v i ć i O s t o j i ć (58) preporučuju organske fungicide na bazi cineba, cirama, tirama i maneba, a za C.carpophilum bakarna sredstva, zatim sredstva na bazi kaptana i DNC.

U našim istraživanjima ispitivali smo uticaj nekih fungicida na klijanje konidija i porast micelije u laboratorijskim uslovima i mogućnost njihove primjene na terenu.

12.1. L a b o r a t o r i j s k a i s p i t i v a n j a

12.11. Uticaj nekih fungicida na klijanje konidija

Materijal i metod

Sposobnost inhibicije klijavosti konidija ispitivali smo za neke fungicide u različitim koncentracijama: sumporola (1%; 0,5%; 0,1%, 0,01%), bakarnog sulfata (0,1%; 0,05%; 0,01%; 0,005%), bakarnog oksihlorida-25 (0,5%; 0,1%; 0,05%; 0,01%), ortocida-50 (0,1%; 0,05%; 0,01%, 0,005%) i ortofaltana (0,1%; 0,05%; 0,01%; 0,005%).

U destilovanoj vodi pripremili smo rastvore, odnosno suspenzije, ovih fungicida, sa dodatkom konidija iz kulture stare 2 mjeseca. Ova ko pripremljene suspenzije nanosili smo na sterilne mikroskopske pločice i stavljali ih zatim u eksikatoru u uslove maksimalne relativne vlage, pri sobnoj temperaturi (20°-23°C). Kao kontrola služile su pločice sa suspenzijom konidija bez dodatka fungicida. Kontrola klijavosti vršena je poslije 24 i 48 sati inkubacije. Ogladi su ponovljene šest puta, s tim što je pri svakom ponavljanju uzeto po 4 uzorka.

Rezultati oglada

Inhibicija klijavosti konidija uticajem ovih fungicida prikazana je u tabeli 21. Ovi podaci pokazuju da je sumporol efikasan samo u jakim koncentracijama, većim od 1%. Sredstva na bazi bakra i organski fungicidi inhibuju klijanje u minimalnim koncentracijama. Tako

Tabela 21. Uticaj nekih fungicida na klijanje konidija
 Table 21. Influence of some fungicides on the germination
 of conidia

Fungicid	% klijavosti pri koncentracijama fungicida											
	1%		0,5%		0,1%		0,05%		0,01%		0,005%	
	24 ^h	48 ^h	24 ^h	48 ^h	24 ^h	48 ^h	24 ^h	48 ^h	24 ^h	48 ^h	24 ^h	48 ^h
Sumporol	+	++	24	31	26	30	32	37	-	-	-	-
Cu-sulfat	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	11
Cu-oksihlorid	0	0	0	0	0	0	+	+	+	34	-	-
Ortoid-50.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	18
Ortofaltan	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	30
Kontrola	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Oznake: + = pojedinačno klijanje konidija
 ++ = klijanje koje nije bilo moguće mjeriti
 zbog gustine suspenzije fungicida

bakarni sulfat, ortoid i ortofaltan u koncentracijama od 0,01% potpuno reduciraju klijavost. Nešto slabiju inhibiciju pokazuje bakarni oksihlorid, koji potpunu redukciju klijavosti ostvaruje u 0,1% koncentraciji.

12.12. Uticaj nekih fungicida na porast micelije

Materijal i metod

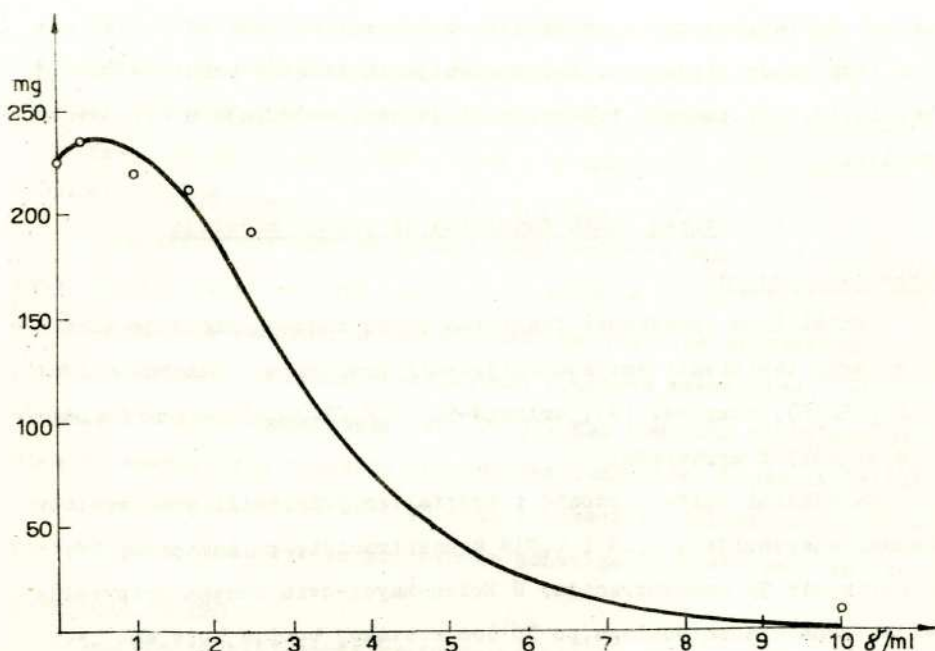
Inhibicionu sposobnost fungicida prema razvoju micelije gljive C. herbarum ispitivali smo kod slijedećih preparata: bakarni sulfat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), sumporol (S), ortoid-50 ($\text{C}_9\text{H}_8\text{Cl}_3\text{NO}_2\text{S}$), ortofaltan ($\text{C}_9\text{H}_4\text{NO}_2\text{SCL}$) i agrimycin.

Za bakarni sulfat, ortoid i ortofaltan pripremili smo rastvor odnosno suspenzije u 0,1% i 0,01% koncentraciji; za sumporol 10%; a za agrimycin 5% koncentraciju. U Erlen-Mayer-ovim bocama pripremljena je tečna Czapek podloga, po 30 ccm u svakoj boci, u koje smo pomoću sterilne pipete dodali po 2, 4, 6, 8 i 10 kapi ovih fungicida. Ovo je izvršeno u aseptičnoj komori, pošto je prethodno izvršena sterilizacija podloge. Veličina jedne kapi fungicida bila je 1/21 dio mililitra. Ovako pripremljene podloge, sa različitim količinama fungicida

u njima, zasijane su micelijom i stavljene u termostat pri temperaturi 21°C. Nakon 15 dana inkubacije izvršeno je filtriranje micelije, a zatim i njeno sušenje do konstantne težine. Ovi ogledi ponovljeni su 10 puta, s tim što je pri svakom ponavljanju uzeto po 2 uzorka za svaku kombinaciju sredstva i po 2 uzorka podloge u kojoj nije bilo fungicida (kontrolni uzorci).

Rezultati oglada

Inhibicija porasta micelije C.herbarum uticajem pojedinih fungicida prikazana je u grafikonima 10-14, na taj način što su količine fungicida, preračunate u težinske jedinice, nanasene na apscisu, a težina suhe materije (micelije) na ordinatu.



Grafikon 10. Uticaj Cu-sulfata na porast micelije C.herbarum

Fig. 10. Influence of Copper sulphate on the growth of mycelium of C.herbarum

Utica; bakarnog sulfata. Minimalne količine ovog sredstva, do 0,3 mikrograma po mililitru, djeluju stimulatивно na porast micelije.

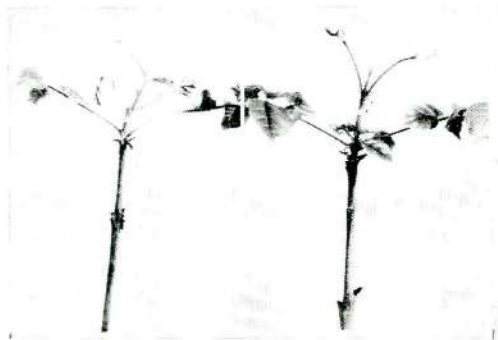


Photo 5. Appearance of first necrotic spots on the leaders of inoculated plants of ash



Photo 6. Germination of conidia of *C. herbarum* on the surface of an ash leaf and penetration of germ tube

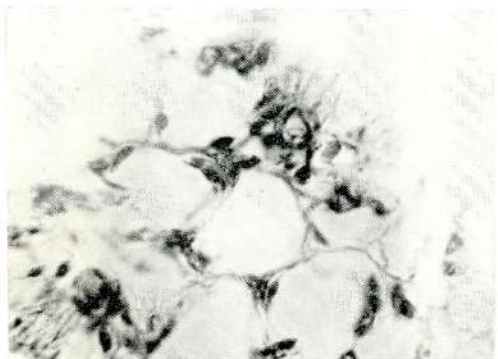


Photo 7. Development of mycelium of *C. herbarum* in the leaf tissue of ash

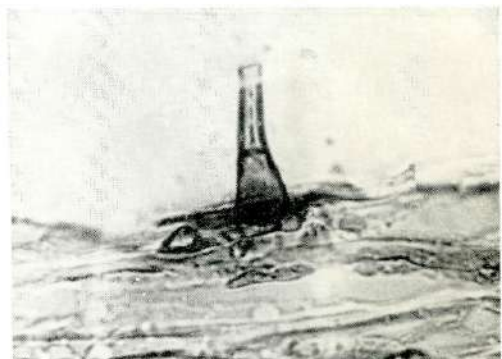


Photo 8. A conidiophore of *C. herbarum* emerging through the epidermis of an ash leaf

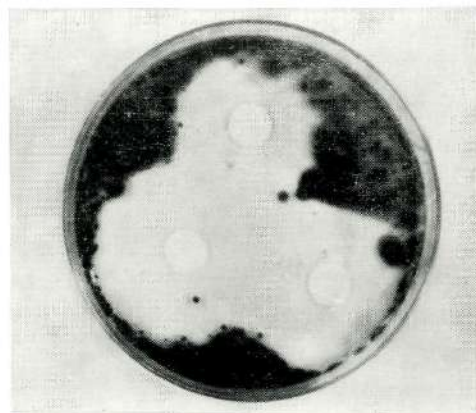
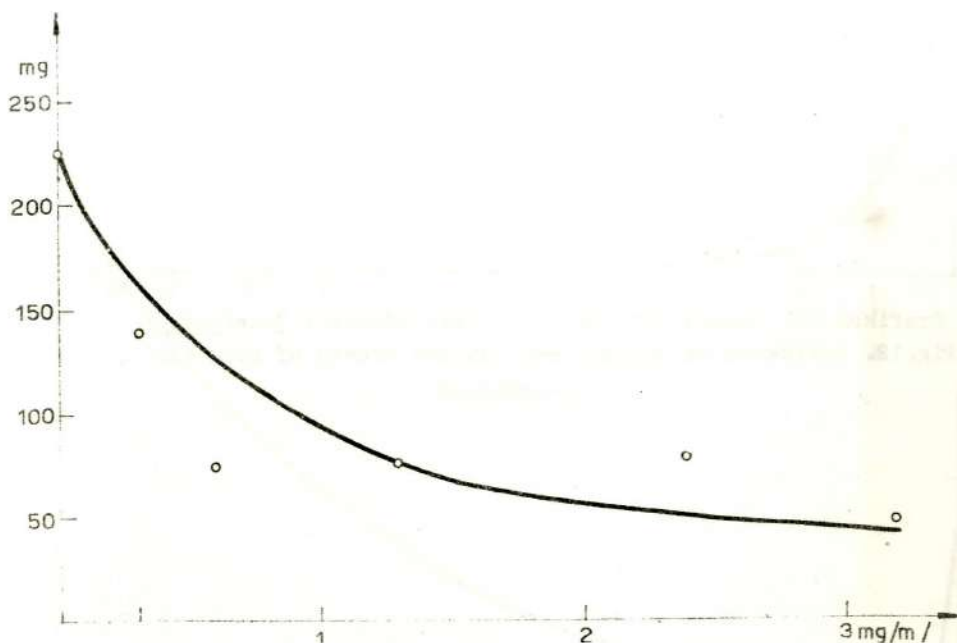


Photo 9. The inhibition of the growth of mycelium by Orthocide

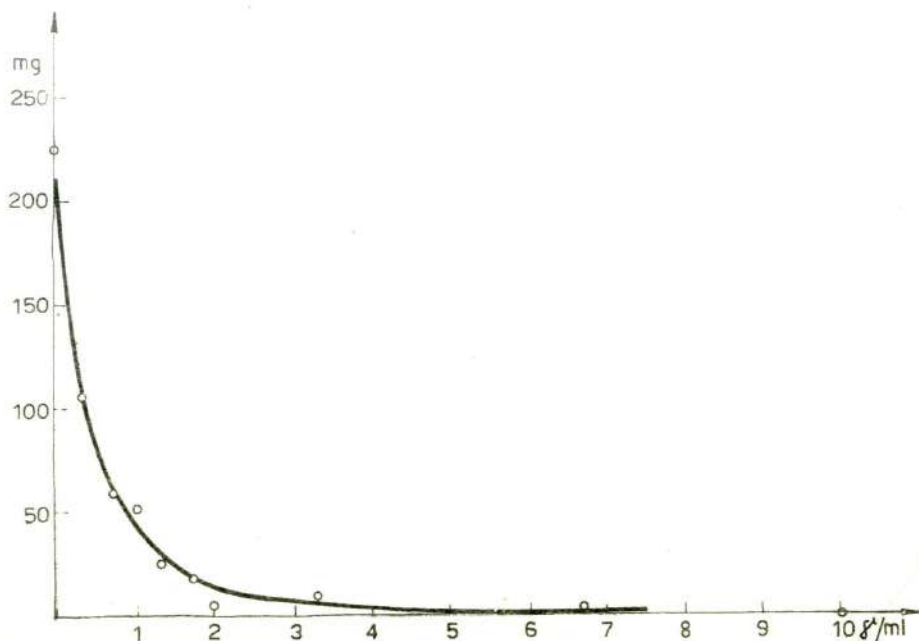
Medjutim, već pri količinama većim od 1 mikrograma po mililitru brzi na porasta opada. Ovo opadanje porasta, kako se vidi iz grafikona 10, u početku je naglo, tako da je već pri količini od 3,3 mikrograma po mililitru porast bio neznatan (oko 40 mg suhe materije). Potpuna inhibicija porasta zabilježena je pri količinama većim od 17 mikrograma po mililitru.



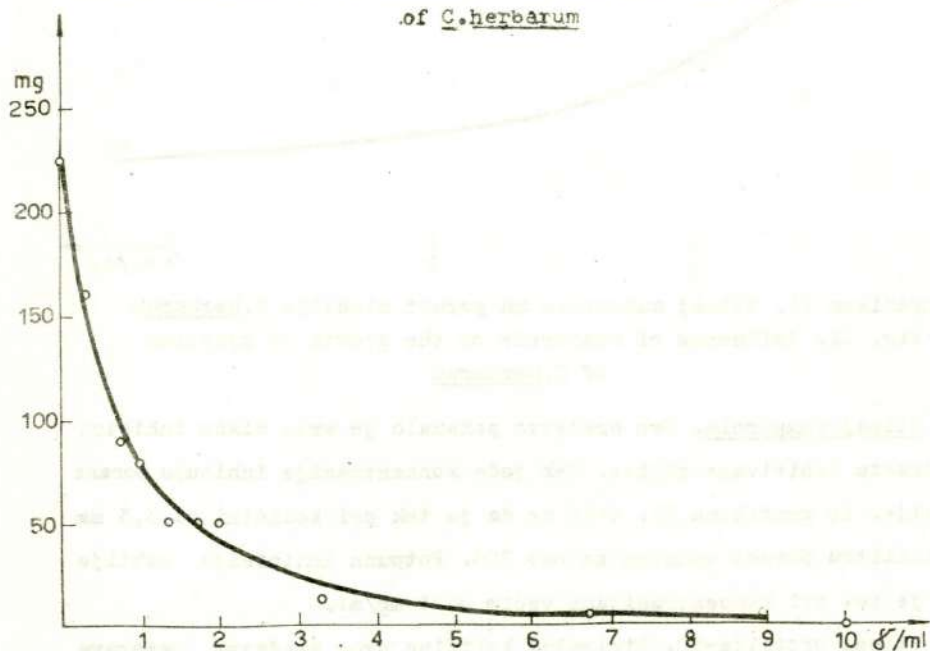
Grafikon 11. Uticaj sumporola na porast micelije C. herbarum
 Fig. 11. Influence of sumporole on the growth of mycelium
 of C. herbarum

Uticaj sumporola. Ovo sredstvo pokazalo je vrlo slabu inhibiciju porasta ispitivane gljive. Tek jače koncentracije inhibuju porast micelije. Iz grafikona 11. vidi se da je tek pri količini od 3,3 mg po mililitru porast umanjen za oko 70%. Potpuna inhibicija zabilježena je tek pri koncentracijama većim od 4 mg/ml.

Uticaj ortocida-50. Minimalne količine ovog sredstva usporavaju razvoj micelije. Pri koncentraciji od 0,3 mikrograma po mililitru porast je bio umanjen za oko 50%, a daljim povećanjem koncentra-



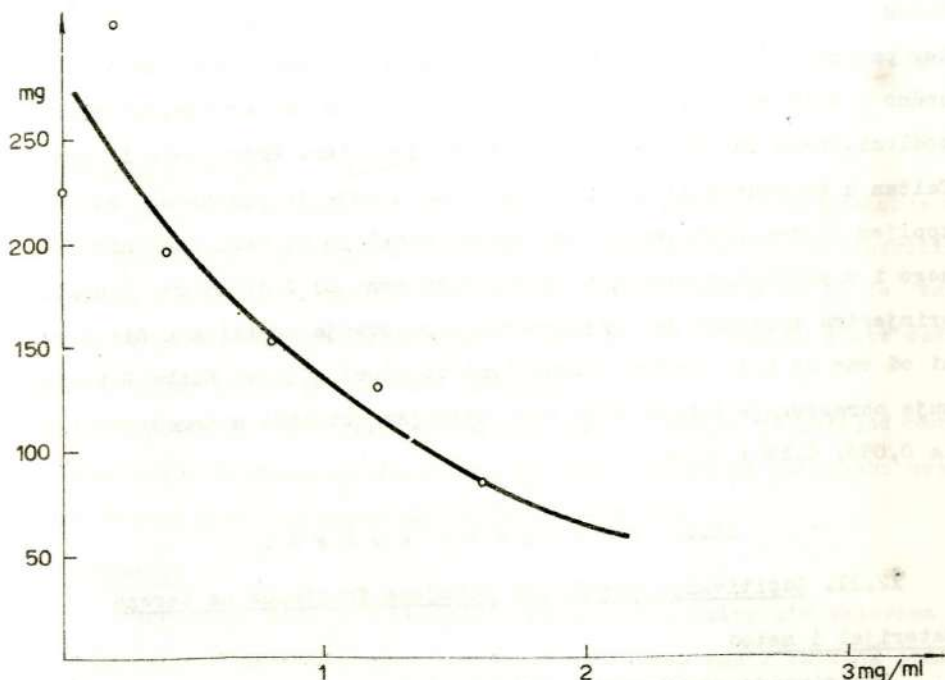
Grafikon 12. Uticaj ortocida na porast micelije C. herbarum
 Fig. 12. Influence of orthocida-50 on the growth of mycelium
 of C. herbarum



Grafikon 13. Uticaj ortofaltana na porast micelije C. herbarum
 Fig. 13. Influence of orthofaltana on the growth of mycelium
 of C. herbarum

cije na 6 mikrograma po mililitru razvoj micelije bio je neznan.-
Količina od 10 mikrograma po mililitru potpuno inhibuje porast glji
ve,kako se to vidi i u grafikonu 12.

Uticaј ortofaltana. Kao i ortocid i ovo sredstvo pokazuje veli
ku sposobnost inhibicije porasta micelije. Kriva u grafikonu 13 ima
sličan tok onoj za ortocid. Ipak,neznatne razlike u efikasnosti ovih
sredstava pokazuju da je ortofaltan nešto slabiji. Potpuna inhibici
ja porasta micelije i ovdje je zabilježena pri koncentraciji od 10
mikrograma po mililitru.



Grafikon 14. Uticaj agrimycina na porast micelije C.herbarum
Fig. 14. Influence of agrimycine on the growth of mycelium
of C.herbarum

Uticaј agrimycina. Ovaј antibiotik,kao i mnogi drugi (terramy
cin,hystericin,ambramycin i chloramphenicol), čija su fungicidna svo
jstva ispitivana po drugim metodama,pokazuje vrlo slabu inhibiciju
razvoja micelije C.herbarum. Pri količinama do 0,2 mg/ml djeluje sti

mulativno. Daljim povećanjem koncentracije antibiotika porast opada, tako da je pri količini od 1,6 mg/ml smanjen za oko 60%. Kriva koja pokazuje dejstvo agrimycina prikazana je u grafikonu 14.

Diskusija

Ovi ogledi pokazuju da sredstva na bazi kaptana, faltana i bakra imaju veliku sposobnost inhibicije porasta micelije i klijanja konidija C. herbarum. Nasuprot njima sredstva na bazi sumpora i antibiotici nemaju efikasnosti u ispitivanim koncentracijama.

Da bismo provjerili sposobnost penetracije ovih fungicida u podlogu (krompir i Czapek), postavili smo i ogled sa konfetama od filter papira. Ovi ogledi pokazuju da se na konfetama, potopljenim prethodno u 0,1% rastvor bakarnog sulfata, micelija ne razvija, ali je na podlozi, izvan filter papira, porast bio normalan. Ortocid-50 i ortofaltan u koncentracijama 0,05% do 0,5%, u koje je prethodno bio potopljen filter papir, sprječava razvoj micelije ne samo na konfetama nego i u podlozi, obrazujući inhibicionu zonu od 2 do 15 mm. U nekim primjerima zapaženo je sprječavanje obrazovanja konidija u široj zoni od one do koje dopiru vegetativni dijelovi gljive. Slika 9 prikazuje obrazovanje inhibicione zone uticajem ortocida u koncentracijama 0,05%; 0,1% i 0,5%.

12.2. T e r e n s k i o g l e d i

12.21. Ispitivanje mogućnosti primjene fungicida na terenu

Materijal i metod

Ispitivanje mogućnosti zaštite sadnica jasena na terenu primjenom fungicida započeto je još 1961. godine. Međutim, zbog učestalih kiša u vrijeme tretiranja sadnica, ogledi nisu dali očekivane rezultate.

Ova tretiranja ponovljena su i 1962. godine. Tada, zbog sušnog perioda, nije došlo do pojave bolesti, tako da su rezultati opet izostali.

Da bismo ipak provjerili laboratorijske rezultate primjenjene u prirodnim uslovima, pripremili smo ogleda na našoj parceli bijelog jasena u rasadniku "Sedrenik" pored Sarajeva. Odabrano je 60 sadnica, od kojih je 30 tretirano 0,3% suspenzijom ortocida, a 30 sadnica 1,5% bakarnim oksihloridom-25. Preostalih 20 sadnica bijelog jasena na parceli služile su kao kontrola. Ovo tretiranje izvršeno je u proljeće 29. aprila 1963. godine. Narednog dana sve sadnice su bile inokulisane suspenzijom konidija, poslije čega je polovina biljaka prekrivena perforiranim najlon kesicama, radi obezbjeđenja povoljne vlage i uspjeha infekcija.

Po istom metodu ovaj ogled je ponovljen i 1964. godine, kada je tretiranje izvršeno 1. i 2. maja.

Rezultati ogleda

Kontrolom ogleda iz 1963. godine ustanovljeno je da infekcije nisu uspjele na sadnicama koje su prethodno bile tretirane fungicidima. Na kontrolnom redu, međutim, od ukupno 20 sadnica, na 16 je zapažena pojava mrkih pjega na mladom lišću, među kojima su i sve sadnice (ukupno 10) sa pokrivenim izbojcima.

Ogledi iz 1964. godine nisu dali rezultate, jer je uslijed čestih kiša došlo do spiranja fungicida sa sadnica, tako da je pojava uvenuća vršnih izbojaka zapažena na većini sadnica.

Diskusija

Mogućnost primjene hemijskih sredstava u prirodnim uslovima je vrlo teška. Iako su sredstva na bazi bakra, kaptana i faltana pokazala u laboratoriji veliku efikasnost, njihova primjena u prirodi je otežana. Poteškoće dolaze zbog kiša, koje onemogućavaju duže zadržavanje fungicida na površini biljaka, dok s druge strane intenzivan razvoj bolesti ovisi o ovim uslovima. Suviše često ponavljanje tretiranja, što bi vjerovatno koristilo, nema ekonomske opravdanosti. Ipak, prema našem mišljenju (ako se isključe ovi nenormalni uslovi), tretiranje sadnica hemijskim sredstvima treba preporučiti.

Neki strani istraživači (H a s p e r, 29; N e w h a l l, 47), koji su proučavali oboljenja prouzrokovana od Cladosporium vrsta, došli su do zaključka da je najefikasniji način borbe regulisanje režima vlage vazduha. U ovu svrhu mnogi istraživači preporučuju izgradnju ventilacionog sistema. Ovo se svakako odnosi na staklene bašte, gdje su slične pojave vrlo česte. U šumskim rasadnicima, gdje su uslovi zemljišta, naročito u pogledu režima vode, nepovoljni za biljke, vjerovatno da bi dreniranje zemljišta imalo sličan efekat u sprječavanju razvoja bolesti. Ovakve mjere su i inače poznate u zaštiti bilja.

13. OPŠTI ZAKLJUČCI

Na osnovu naših ispitivanja pojave uvenuća izbojaka i lišća bijelog jasena, prouzrokovane od Cladosporium herbarum, koja su vršena u laboratoriji i na terenu, kao i na osnovu analize klimatskih uslova u doba razvoja bolesti, mogu se izvesti slijedeći zaključci:

1. Visoka relativna vlaga vazduha, pojava većih količina padavina i nešto niže temperature, osnovni su uslovi za pojavu bolesti.

2. Starost sadnica i njihov uzgoj na zemljištima sa visokim nivoom podzemne vode također je od značaja, jer slabi vitalnost biljaka. Mladje sadnice, uzgojene na ovakvim zemljištima više trpe.

3. Optimalna temperatura za klijanje konidija je 21°C - 23°C , minimalna 1°C , a maksimalna 31°C .

4. Optimalna temperatura za porast micelije je 21°C - 23°C , minimalna -2°C , a maksimalna 30°C .

5. Optimalna relativna vlažnost vazduha za klijanje konidija je 100%, a minimalna 91,5%.

6. Gljiva ima veliku otpornost prema niskim i visokim temperaturama, kao i prema dejstvu ultravioletnih zraka.

7. Optimalna kiselost supstrata za razvoj gljive iznosi pH 5-6, minimalni pH je 2,4 a maksimalni pH je 9,6.

8. Gljiva proizvodi i luči oksidacione fermente vrlo intenzivno, dok je aktivnost reduktaze nešto slabije. Od hidrolitičkih fermenta, koji su bili u ovom radu izučavani, gljiva proizvodi saharazu i celulazu.

9. Micelija gljive prodire u tkivo lista jasena kroz stome ili direktno kroz epidermis, a zatim se širi inter i intracelularno.

10. Hemijska sredstva na bazi kaptana, faltana i bakra imaju veliku fungistatičnu vrijednost, dok su elementarni sumpcer i antibiotici slabe efikasnosti.

CLADOSPORIUM HERBARUM (Link) Fr. AS A PARASITE OF ASH
(Fraxinus excelsior L.) - biology, ecology and control

by
M. Usčuplić

SUMMARY

Severe damage was found in some nurseries and young plantations of deciduous trees during the spring 1960 and 1961. Over 50% of the ash (Fraxinus excelsior L.) was infected. It was thought that this damage was due to the effect of low temperature but further investigations indicated that it was caused by an attack of Cladosporium herbarum (Link) Fr. This fungus has been found in Yugoslavia many times before, causing various kinds of damage. Nowadays, the fungus is known as an important cause of stain of timber (particularly steamed timber of beech).

Climatic conditions were analysed to examine their relationship with the disease.

The appearance of the disease on ash, attacking leaders and young leaves, occurred in early spring (from beginning of flushing to the end of June). The critical period for its development was from mid April to mid May, when, under rainy weather conditions, the disease could be expected.

In 1960 and 1961 high relative humidity was the main factor associated with infection. In a nursery near Belgrade, where this study was made, the mean relative humidity in 1960 for the above critical period was 81% and in 1961 86%. In 1962 the disease did not occur and in that year the mean relative humidity was 59%.

The disease was also associated with the number of rainy days in the critical period. In 1960, there were 11 such days and in 1961, even 14. However, in 1962 there were only 2 rainy days.

With regard to temperature, it seems that this was less important than moisture. The mean daily temperature for the critical period was: in 1960, 15,6°C; in 1961, 16,7°C; in 1962, 16,1°C.

Apart from these climatic conditions there were some other factors in the nursery which increased susceptibility, such as high level of soil water and aphid infection.

The size of the one-celled conidia were 4,78 x 9,07 μ (3,72x6,20-9,30x16,43 μ).

The size of the two-celled conidia were 5,37 x 13,54 μ (3,72x9,30-10,85x21,70 μ).

The size of the conidiophores were 3,64 x 98,70 μ (2,80x16,00-4,65x291,40 μ).

The optimum temperature for germination of conidia and the growth of germ tubes, on PDA media, was 22°C (4-30°C). The development of new conidia under optimal temperature conditions took place only 2 days after germination. In some cases the conidia germinated directly into conidiophores. No development of conidia took place at 4°C or 29°C within 10 days of incubation.

The optimum temperature for the growth of the mycelium on PDA media was 22°C (0-30°C).

The optimum relative humidity for germination of conidia and the growth of germ tubes was 97-100%, the minimum being 91,5%. The viability of conidia was lost after incubating at 60% RH for 24 hours (at 22°C).

The optimum pH of the medium for germination of conidia and the growth of germ tubes was 5,5. The optimum pH for growth of the mycelium was 5,0 (2,4-9,6).

There was no effect of daylight or darkness on the growth of the mycelium, and the fungus was fairly resistant to ultraviolet light. Five minutes exposure to u/v light reduced the germination of conidia to 50%, and after twenty minutes exposure some germination still took place.

The best media for culturing C. herbarum were agar incorporating an extract of ash leaves, malt-agar and potato-dextrose agar. The fungus produced the enzymes oxidase, reductase and cellulase.

Artificial infection succeeded only if high atmospheric humidity was provided. The germinating conidia of the fungus penetrated the epidermis directly or through stomata.

Control of the disease, using chemical methods was uncertain, although organic fungicides gave good results in the laboratory. Field control was difficult because of the high rainfall during the critical infection period. Therefore preventive measures are advised including control of the soil water regime.

L i t e r a t u r a

1. A ć i m o v i ć M. (1960.): Neki paraziti povrtarskih kultura u Vojvodini.- Zaštita bilja 62.
2. A n s e l m e C. - B o u r g e o i s M. - C h a m p i o n R. (1960.): L'analyse sanitaire des semences. Resultats obtenus sur les semences de Lin issues des campagnes 1957, 1958 et 1959.- C.R.Aced.Agric.Fr., 46.
3. A r a k a w a S. (1934.): The influence of sugars on the cellulose decomposition by the soil fungi.- Trans.Tottori Soc. agric.Sci., V, (RAM, 1935., str.332).
4. A r y a H.C. - P a n w a r K.S. (1955.): Some studies on a virulent strain of Cladosporium herbarum (Link) Fr. on Wheat. Indian phytopathology, vol.VIII.
5. A t a n a s o v S. (1957.): New effective compounds against scab on Cucumbers and Melons.- Veg.Grg and Hort., Sofia, 6 (RAM, 1958., str.568).
6. B a v e n d a m m W. (1928.): Über das Vorkommen und den Nachweis von Oxydasen bei Holzzerstörenden Pilzen.- Zuschr. Pflanzenkrank.u.Pflanzenschutz., 38.
7. B o c k m a n n H. (1933.): Die Schwarzepilze des Getreides unter besonderer Berücksichtigung ihrer Pathogenität und des Vorkommens von Rassen innerhalb der Gattungen Cladosporium Link und Alternaria Nees.- Angew.Bot., XV. (RAM, 1934 str.21).
8. B o n d T.E.T. (1938.): Infection experiments with Cladosporium fulvum Cooke and related species.- Ann.Appl. Biol., XXV.
9. B u t i n H. (1957.): Die blatt und rindenbewohnenden Pilze der Pappel unter besonderer Berücksichtigung der Krankheitserreger.- Mitt.biol.Zent.Anst., Berl., 91, 64.
10. B u t l e r J.E. (1955.): Plant pathology.
11. C h i e r a p p a L. (1959.): Extracellular oxidative enzymes of wood-inhabiting fungi associated with the heart rot of living grapevines.- Phytopathology, Vol.49.

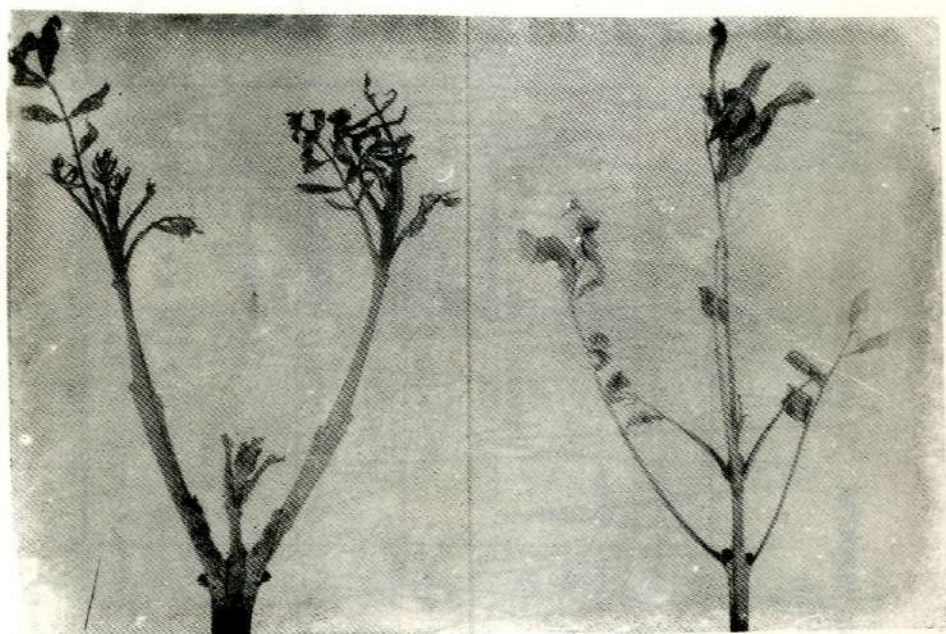
12. C h o w d h u r y S. (1937.): Germination of fungal spores in relation to atmospheric humidity.- Indian J.agric.Sci.VII. (RAM, 1938., str.56).
13. C o n v e r s e R.H. (1956.): The production and germination of conidia of Cladosporium effusum in the laboratory.Phytopathology, 1.
14. C r e e l m a n D.W. (1961.): A summary of the prevalence of plant diseases in Canada in 1960.- Canad.Pl.Dis.Surv.,41.
15. D a v i d s o n R.W. - C a m p b e l l W.A. - B l a i s d e l D.J. (1938.): Differentiation of Wood decaying Fungi by their Reactions on gallic or tannic Acid Medium.- Jour. Agr.Res., 57.
16. D e l p C.J. and all (1951.): Cladosporium rot of grapes in storage.- Phytopathology, 1.
17. D e m m l e r F.P. (1932.): Zur Physiologie von Cladosporium. Phytopathologische zeitschrift, V,3.
18. D e V r i e s G.A. (1952.): Contribution to the knowledge of the genus Cladosporium Link ex Fr.- Tesis. Bearn Uitgeverij Drukkerij Hollandia.
19. D o p P. - G a u t i e A. (1928.): Manuel de technique botanique.- Paris.
20. E l e n k o v E. (1958.): Effective chemical substances for spraying Tomato against leaf mould (Cladosporium fulvum). Selskost.Misul.,3, (RAM,1961., str.188).
21. E n g l i s h H. - G e r h a r d t F. (1946.): The effect of ultraviolet radiation on the viability of fungus spores and on the development of decay in sweet cherries.- Phytopathology, 2.
22. F e r r a r i s T. (1910.): Flora Italica cryptogame.-
23. G a l l o w a y L.D. (1937.): Paints and mould growth: causes and remedies describes.- Paint Varn.Lacq.Manuf.,VII,(RAM 1938., str.195).
24. G a r d n e r M.W. (1925.): Cladosporium leaf mould of tomato: fruit invasion and seed transmission.- Jour.Agric.Resear. Can.
25. G u m a n n E. (1950.): Principles of plant infection.-

26. G u b s E.F. (1929.): Tomato leaf mould. The use of fungicides for its control in greenhouses.- Massachusetts Agric.Exp. stat.Bull., 248.
27. H a d ž i s t e v i ć D. (1955.): Pojava biljnih štetočina i bolesti na teritoriji NR Srbije u 1953.godini.- Zaštita bilja 27.
28. H a r v e y J.M. (1955.): A method of forecasting decay in California storage grapes.- Phytopathology,4.
29. H a s p e r E. (1925.): Biologie und Bekämpfung des Cladosporium fulvum Cooke auf Solanum lycopersicum.-Zeitschr.für Pflanzenkrankh. XXXV, 3-4.
30. H a z r a A.K. - B o s e S.K. - G u h s B.C. (1958.): A rapid method of survey of cellulolytic power of Fungi.-Sci. Cult.,24.
31. H a u s e r m a n n E. - T h o m a s E.A. (1938.): Über ein Russfleckenvorkommen auf Aepfeln in der Gegend von Zürich. Ber.schweiz.bot.Ges., XLVIII.
32. H u s a i n A. - R i c h S. (1958.): Extracellular pectic and cellulolytic enzymes of Cladosporium cucumerinum.- Phyt. o pathology, 48.
33. I n o u e Y. (1937.): Studies on the leaf-mould of Tomatoes.- Forsch.Pfl.kr.,Kyotō III (RAM, 1938., str.778).
34. J o s i f o v i ć M. (1964.): Poljoprivredna fitopatologija.-
35. K r s t i ć M. (1947.): Važnije bolesti šumskih biljaka u ra sadnicima.- Beograd.
36. K r s t i ć M. (1956.): Prilog proučavanju metoda za odredji vanje vitaliteta biljnih embriona.- SAN, CCLXIV, Beograd
37. K r s t i ć M. (1958.): Nezabeležene fitopatološke pojave u ra sadnicima i šumama Srbije.- Zaštita bilja 45.
38. K r s t i ć M. (1962.): Zaštita drveta, II deo.- Beograd.
39. L e b e n C. (1954.): Influence of acidic buffer sprays on in fection of tomato leaves by Alternaria solani.- Phytopa thology, 2.
40. L e p p i k E.E. (1960.): Cercospora travesiana and some other pathogens of Fenugreek new to North America.- Plant Dis. Repr., 44,1.

41. L o b i k A.L. (1927.): Fungi parasitizing fruit trees and their control.- Terek Regional Plant Prot.Stat.News II.
42. L u t z L. (1934.): Sur les ferments solubles sécrétés par les Champignons Hymenomycetes. Cytolise de la cellulose. C.R. Ac.,149,2.
43. M a r i n k o v i ć P. (1965.): Nova proučavanja biologije patogene gljive Dothichiza populea Saac.et Briard.-Glasnik Šumarskog fakulteta Beograd.
44. M a t h u r R.L. - M a t h u r B.L. - S e h g a l S.P.(1960.) Studies on a leaf spot disease of Spinach caused by Clado sporium variabile (Cooke) de Vries in Rajasthan.- Indian Phytopathology 12.
45. M i j u š k o v i ć M. (1950.): Biljne bolesti u NR Crnoj Gori u 1949.godini.- Zaštita bilja 1.
46. M i j u š k o v i ć M. (1953.): Neke bolesti i štetočine agruma na Crnogorskom primorju.- Zaštita bilja 19.
47. N e w h a l l A.G. (1928.): The relation of humidity and ventilation to the leaf mould disease of Tomatoes.-Ri-m.Bull Ohio Agric.Exper.Stat.,XIII.
48. N e w h a l l A.G. - W i l s o n J.D. (1929.): A preliminary report on forced-air ventilation for the control of Cladosporium leaf mould of greenhouse tomatoes.-Phytopath.1
49. N u m i ć R. (1962.): Prilog poznavanju parazitne mikoflore Bosanske Posavine.- Zaštita bilja 67-68.
50. O u d e m a n s C.A.J.A. (1923.): Enumeratio systematica fungorum.- Vol.IV.
51. P a n j a n M. (1963.): Bolesti rajčice u stakleničkom uzgoju. Zaštita bilja, 75.
52. R a b e n h o r s t's L. (1907.): Kryptogamen-flora.- Band I.
53. S e g u y E. (1936.): Code universal des couleurs.- Ed. Paul Lechevalier, Paris.
54. S m a l l T. (1928.): Tomato 'mildew' or leaf-mould.-Furteenth Ann.Rept.Cheshunt Exper.and Res.Stat.
55. S m i t h G. (1960.): An introduction to industrial mycology.
56. S m o l a k J. (1959.): K černi Jablak.- Ovocnar.Zelinar 7,2, (RAM, 1960., str.720).

57. S o r a u e r P. (1932.): Handbuch der Pflanzenkrankheiten.-
Band III, Teil II, Berlin.
58. S t a n k o v i ć A. - O s t o j i ć N. (1963.): Pregled pes-
ticida.- Hemizacija poljoprivrede, 54.
59. S t r i d e r D.L. (1960.): Studies on the physiology of para-
sitism as related to scab of Cucumber incited by Clados-
porium cucumerinum.- Diss.Abstr.20.
60. T h a n o s A. (1951.): Effect of ultraviolet light on the ger-
mination of spores of Monilinia fructicola, Cladosporium
cucumerinum and C.epiphyllum.- Phytopathology, 1.
61. V i e n n o t - B o u r g i n G. (1949.): Les champignons pa-
rasites.- Tome II, Paris.
62. V u k č e v i ć R. (1954.): Biljne štetočine i bolesti utvrđje-
ne na Kosmetu od 1949.-1953.godine. Zaštita bilja, 26.
63. W a l k e r J.C. (1950.): Environment and host resistance in
relation to cucumber scab.- Phytopathology, 12.
64. W a l t e r H. (1931.): Die Hydratur der Pflanze und ihre phy-
siologisch-ökologisch Bedeutung.- Jena.

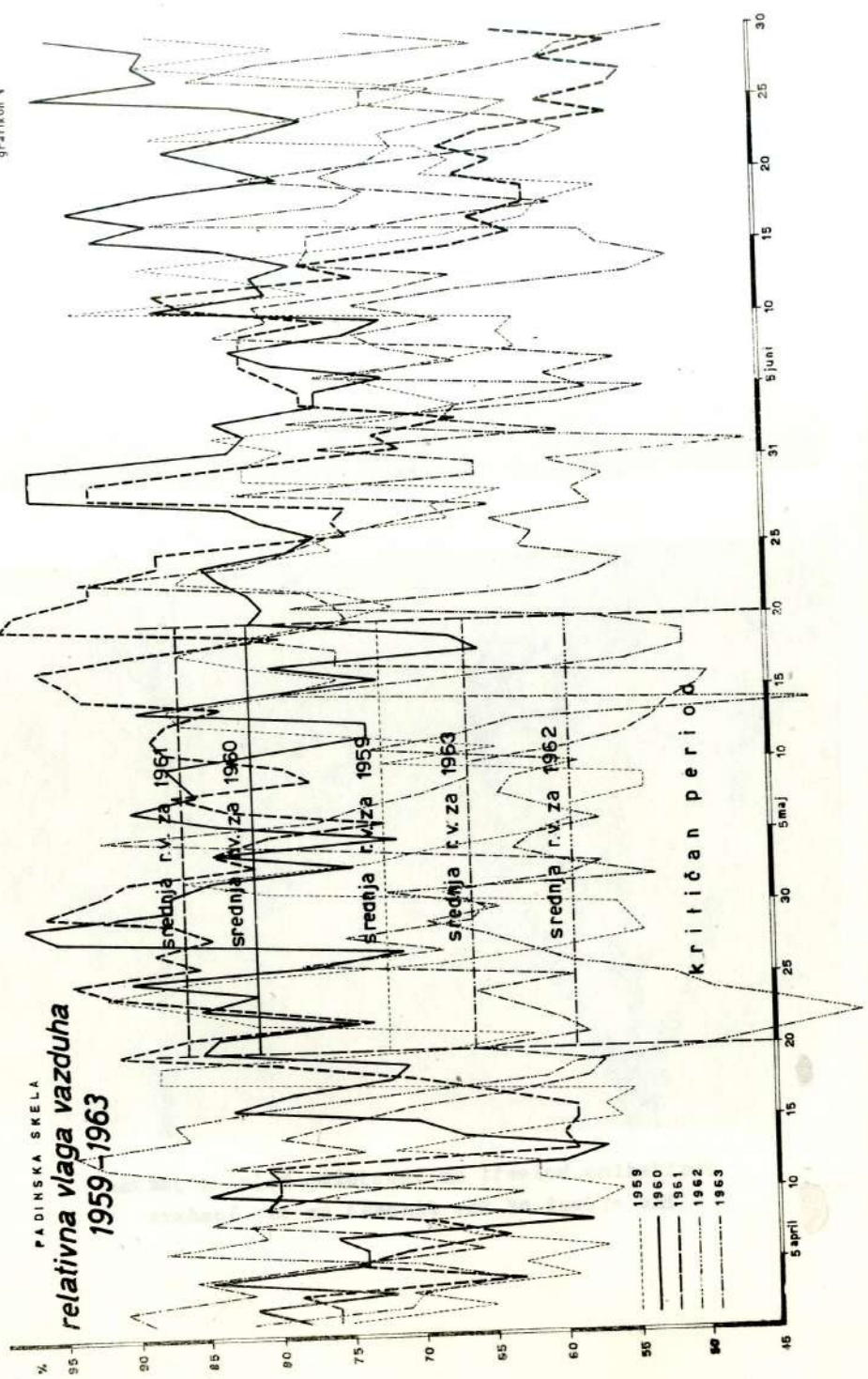
TABLA I



Posljedice bolesti na izbojcima bijelog jasena
The effect of the disease on ash leaders

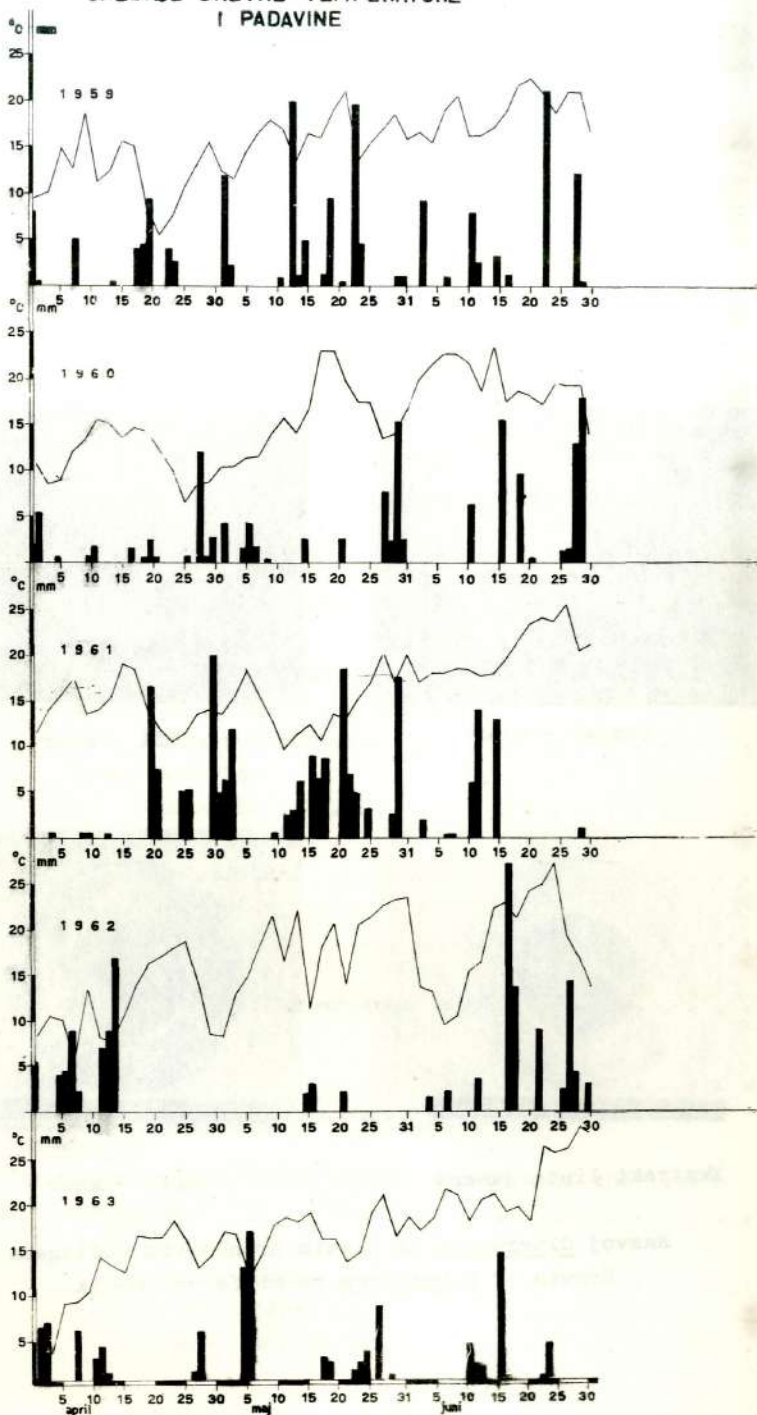
grafikon 4

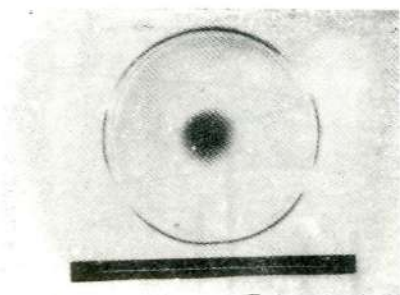
PADINSKA SKELA relativna vlaga vazduha 1959-1963



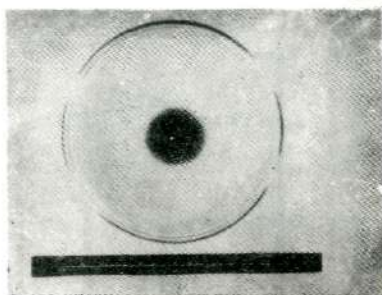
kritičan period

SREDNJE DNEVNE TEMPERATURE
I PADAVINE

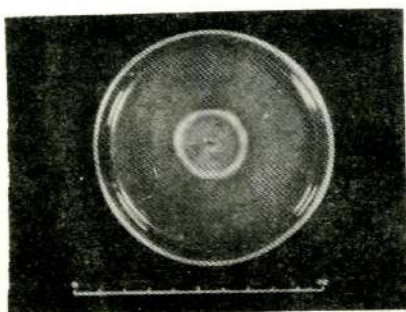




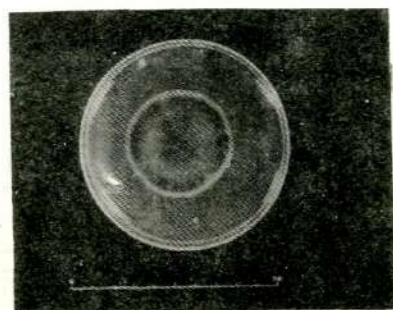
agar - agar



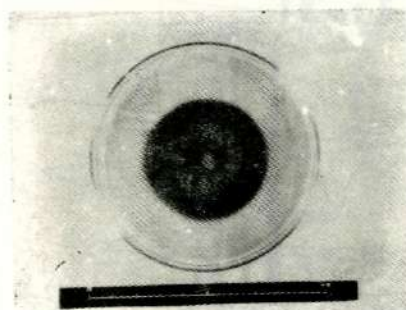
OVAS - agar



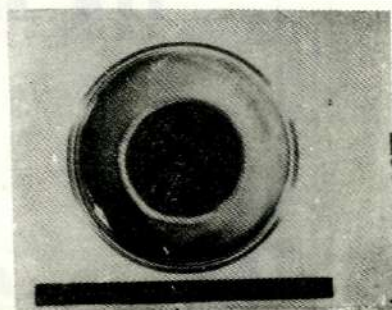
Czapek - agar



PDA - agar



Ekstrakt lista jasena



malc - agar

Razvoj C. herbarum na raznim hranljivim podlogama
 Growth of C. herbarum on different media

S A D R Ź A J
C o n t e n t s

Strana

PREDGOVOR	
Author's preface	5
1. U V O D	
Introduction	6
1.1. Istorijat dosadašnjih istraživanja The history of previous work	7
2. SIMPTOMI BOLESTI I VRIJEME POJAVE NEKROZA NA BIJELOM JASENU	
The symptoms and occurrence of necrosis on ash	11
3. POSLJEDICE BOLESTI	
The effects of the disease	12
4. USLOVI ZA RAZVOJ BOLESTI	
The environmental conditions of infection	12
4.1. Klimatski uslovi	
The influence of climatic conditions	12
4.1.1. Relativna vlaga vazduha Relative humidity	13
4.1.2. Padavine Rainfall	14
4.1.3. Temperatura Temperature	15
4.1.4. Zaključak Conclusions	16
4.2. Ostali uslovi	
The influence of other external conditions	17
5. EKSPERIMENTALNI RAD	
Experimental work	19
5.1. Taksonomske i morfološke karakteristike gljive	
<u>C.herbarum</u>	
Taxonomic-morphological characteristics of the strain of <u>C.herbarum</u>	19
5.1.1. Konidije	
The conidia	19
5.1.2. Konidiofore	
The conidiophores	22

6. UTICAJ NEKIH FAKTORA SREDINE NA RAZVOJ <u>C.HERBARUM</u>	
The influence of some factors on the development of <u>C.herbarum</u>	24
6.1. Temperatura	
Temperature	24
6.11. Uticaj temperature na klijanje konidija i porast inicijalne hife Influence on the germination of conidia and the growth of germ tubes	24
6.12. Uticaj temperature na brzinu obrazovanja konidija Influence on the development of conidia	28
6.13. Način klijanja konidija Germination characteristics of conidia	29
6.14. Uticaj temperature na porast micelije Influence on the growth of mycelium	30
6.15. Uticaj ekstremnih temperatura na miceliju i konidije Influence of extreme temperature	34
6.2. Vlažnost	
Moisture	37
6.21. Uticaj r.v.v. na klijanje konidija i porast inicijalne hife Influence of RH on the germination of conidia and the growth of germ tubes	37
6.22. Uticaj niske r.v. na vitalnost konidija Influence of low RH on viability of conidia	41
6.3. Kiselost	
Hydrogen-ion concentration	43
6.31. Uticaj kiselosti na klijanje konidija Influence on the germination of conidia	43
6.32. Uticaj kiselosti na porast micelije Influence on the growth of mycelium	44
6.33. Diskusija Discussion	45
6.4. Svjetlost	
Light	
6.41. Uticaj dnevne i vještačke svjetlosti Influence of diffuse daylight and artificial light	47

6.42. Uticaj ultravioletne svjetlosti na klijanje konidija Influence of ultraviolet light on the germination of conidia	48
6.43. Diskusija Discussion	49
6.5. Podloga	
Media	51
6.51. Porast micelije na raznim hranljivim podlogama Influence of different media on the growth of mycelium	51
6.52. Uticaj glucida na porast micelije Influence of various glycosides on the growth of mycelium	55
7. FERMENTNA AKTIVNOST	
Enzyme activity	56
7.1. Oksido-redukциони procesi	
Oxidase and reductase	56
7.11. Aktivnost oksidaza Oxidase activity	56
7.12. Aktivnost reduktaza Reductase activity	58
7.2. Hidrolitički fermenti	
Hydrolysing enzymes	59
7.21. Saharaza Saccharase	59
7.22. Celulaza Cellulase	60
8. VJEŠTAČKE INFEKCIJE	
Artificial infections	63
8.1. Infekcije u prirodi Field inoculation	63
8.2. Infekcije u laboratorijskim uslovima Laboratory inoculation	67
9. PENETRACIJA GLJIVE U LISNO TKIVO I ANATOMSKE PROMJENE	
Penetration of the fungus into tissue and anatomical changes	70
10. INKUBACIONI PERIOD	
The incubation period	72

11. PREZIMLJAVANJE	
The overwintering of the fungus	73
12. MOGUĆNOST SUZBIJANJA BOLESTI	
The control of the disease	73
12.1. Laboratorijska ispitivanja	
Laboratory observations	74
12.11. Uticaj nekih fungicida na klijanje konidija Influence of some fungicides on the germination of conidia	74
12.12. Uticaj nekih fungicida na porast micelije Influence of some fungicides on the growth of mycelium	75
12.2. Terenski ogledi	
Field observations	80
12.21. Ispitivanje mogućnosti primjene fungicida na terenu The possibility of chemical control	80
13. OPŠTI ZAKLJUČCI	
General conclusions	
SUMMARY	84
LITERATURE	87