

UDK: 632.4

Jelena Lazarević<sup>1</sup>

**PRILOG PROUČAVANJU FIZIOLOŠKIH KARAKTERISTIKA  
PATOGENE GLJIVE *HERPOTRICHIA JUNIPERI*  
CONTRIBUTION TO THE STUDY OF THE PHYSIOLOGICAL  
CHARACTERISTICS OF THE PATHOGENIC FUNGUS  
*HERPOTRICHIA JUNIPERI***

**Izvod**

Ispitivan je uticaj temperature na klijanje askospora, porast inicijalne hife porast micelije kao i sposobnost lučenja oksidacionih fermenta gljive *H. juniperi*. Za ispitivanje uticaja temperature na porast micelije i lučenje oksidacionih fermenta korišćeni su različiti izolati *H. juniperi*.

**Ključne reči:** *Herpotrichia juniperi*, temperatura, klijanje spora, porast inicijalne hife, porast micelije, lučenje oksidacionih fermenta

**Abstract**

We have examined the influence of temperature to germination of ascospores, increase of growing (initial) hypha, increase of mycelium, and ability for secretion of oxidation ferments of *Herpotrichia juniperi*. For examination of temperature influence to mycelium increase and secretion of oxidation ferments, we have used different isolates of *H. juniperi*.

**Key words:** *Herpotrichia juniperi*, temperature, spore germination, growth of germ tube, mycelia growth, secretion of oxidation ferments.

**UVOD**

Crna paučinavost četina, *Herpotrichia juniperi* (Duby) Petrak, ispoljava se kao karakteristična bolest na četinama i izbojcima četinara koje obavlja i izaziva izumiranje četina i sušenje grana. Odlikuje se epi-endofitnom micelijom koja je tamna i končasta. Endofitna micelija izaziva nekrozu, dok epifitna gotovo potpuno prekriva zaražene četine. One dobijaju prvo sivomrku, a zati

---

<sup>1</sup> Mr Jelena Lazarević, Biotehnički institut - Podgorica

crnu boju i brzo propadaju. Četine dugo ostaju na granama jer su povezane spletom hifa gljive. Javlja se u planinskim predelima, na mestima gde se naslage snega zadržavaju duže u toku proleća. Njena pojava i razvoj uslovljeni su dugim zadržavanjem snežnog pokrivača i u korelaciji su sa visinom snežnog pokrivača.

*Herpotrichia juniperi* u Srbiji i Crnoj Gori predstavlja problem u planinskim i visokoplaninskim šumskim ekosistemima, gde otežava a u nekim slučajevima i potpuno onemogućava prirodno obnavljanje šume. Zabeležena je na domaćinima: *Pinus heldreichii*, *Pinus mugo*, *Picea abies*, *Juniperus nana*, *J. communis*, *Pinus sylvestris* i *A. alba*. Veće štete zabeležene su na *Pinus heldreichii*, *Pinus mugo*, *Picea abies* i *Juniperus nana*, dok *A. alba* pokazuje visoku otpornost prema ovom patogenu.

*H. juniperi* pripada rodu *Herpotrichia*, prema Dennis (1978) klasi *Ascomycetes*, podklasi *Loculoascomycetes*, redu *Pleosporales* i fam *Pleosporaceae*. Prema ovoj klasifikaciji, plodonosna tela gljive su pseudotecije, koje se formiraju na miceliji, površinske su ili blago utisnute u substrat. Pseudotecije su sferične ili subsferične, prečnika 200-450 $\mu$ . Askusi su cilindrično batinasti, sa kratkom drškom. Odlikuju se dvostrukom membranom. Razdvojeni su brojnim pseudoprafizama, koje su bezbojne i končaste. U askusima se nalazi 8 spora. Askospore su poredane koso, ili uspravno, u jednom ili dva reda (biserijalne). Prave su ili blago savijene, vretenasto sužene na krajevima. Imaju 1-3 septe i blago su stegnute u nivou septi, svetlo su smeđe do smeđe boje. Prema novijim klasifikacija mesto roda *Herpotrichia* je sledeće: *Ascomycota*, *Loculoascomycetes*, *Pleosporales*, *Lophiostomataceae*.

U ovom radu prikazani su rezultati istraživanja nekih fizioloških karakteristika gljive *H. juniperi*: uticaj temperature na klijanje askospora i porast inicijalne hife gljive, uticaj temperature na porast micelije gljive, kao i lučenje oksidacionih fermenta. Za ispitivanje porasta micelije i lučenja oksidaza korišćeni su različiti izolati gljive.

Uticaj temperature na klijanje askospora, kao i ispitivanje fermentne aktivnosti gljive *H. juniperi*, prema dostupnim podacima iz literature, do sada nije rađeno. Uticaj temperature na porast micelije *H. juniperi* ispitivali su Gaumann et al. (1934, cit Bazzigher, 1976), a zatim Bazzigher (1976).

## MATERIJAL I METODE

Prikupljeni su izbojci četinarara sa simptomima bolesti - razvijenom micelijom *H. juniperi* i izvršena izolacija patogena poreklom sa različitih domaćina.

Uticaj temperature na klijanje askospora i porast inicijalnih hifa *H. juniperi* ispitivan je na 0, 6, 10, 15, 20, 25, 30 i 35 °C. Korišćene su askospore *Herpotrichia juniperi* iz plodonosnih tela obrazovanih u prirodnim uslovima sa

domaćina *Pinus heldreichii* - lok. Širokar, Sovrh (materijal sakupljen 11. avgusta 1999). Ogljed je postavljen u februaru 2000. godine.

Suspenzije askospora u sterilisanoj destilovanoj vodi nanošena je na voda-agar podlogu (Booth, 1971) i kasnije bojena lacto-phenol cotton blue bojom. Kontrola je vršena posle 3, 6, 12, 24 i 48 časova. Klijanje je posmatrano na uzorku od 100 spora, i merene su inicijalne hife najmanje 100 kljalih askospora. Posle 48 časova inicijalne hife *H. juniperi* na 15 i 20° C su razgranate i isprepletane, tako da ih nije bilo moguće izmeriti, te stoga vrednosti za dužinu inicijalnih hifa posle 48 h nisu prikazane.

Uticaj temperature na porast micelije *H. juniperi* ispitivan je na MEA (Booth, 1971), na temperaturama 0, 5, 10, 15, 18, 22, 24, 28 i 33° C. Korišćeni su izolati gljive iz četina: *Pinus heldreichii* - lok. Orjen, Zubački kabao i *Pinus mugo*, *Picea abies* i *Juniperus nana* - lok. Durmitor, Jablan bara.

Hranljiva podloga inokulisana je fragmentima micelije gljive veličine 6x6 mm. Porast micelije gljive pačen je 25 dana, merenjem dva unakrsna prečnika kolonije iz kojih je određivana aritmetička sredina. Ogljed je postavljen u 3 ponavljanja, pri čemu je svakim od izolata inokulisano 3 Petri posude.

Takođe je ispitan porast micelije različitih izolata gljive na krompir dekstroza agar (PDA) podlozi, na sledećim temperaturama: 3, 5, 6, 10, 15 i 22 °C. Uz navedene, ispitan je i porast micelije izolata iz *P. heldreichii* - lok. Prokletije - Ropojana. Podloga je, takođe, pravljena prema recepturi Bootha (1971). Ovaj ogled urađen je sa jednim ponavljanjem, pri čemu je svakim izolatom inokulisano po 5 Petri posuda.

Ispitivano je lučenje oksidacionih fermenta micelije *H. juniperi* primenom Bavendammovog metoda (prema Davidsonu i sar., cit. Karadžić, 1977). Korišćeni su izolati gljive iz četina: *Pinus heldreichii* - lok. Prokletije, Ropojana, i *Pinus mugo*, *Picea abies*, i *Juniperus nana* - lok. Durmitor, Jablan bara.

Metod se sastoji u stavljanju komadića micelije gljive na hranljivu podlogu, kojoj je dodato 0,5% galne ili taninske kiseline. Ogljed je izveden u 5 ponavljanja. Taninska i galna kiselina dodavane su u MEA podlogu. Kao kriterijum za ocenjivanje lučenja oksidaza korišćeni su veličina difuzione zone, boja i ton. Kao kontrolna, korišćena je gljiva *Trametes versicolor*. Intenzitet boje određen je prema kodeksu boja Seguya (1936). Prikazani su rezultati kontrole vršene posle 14 dana.

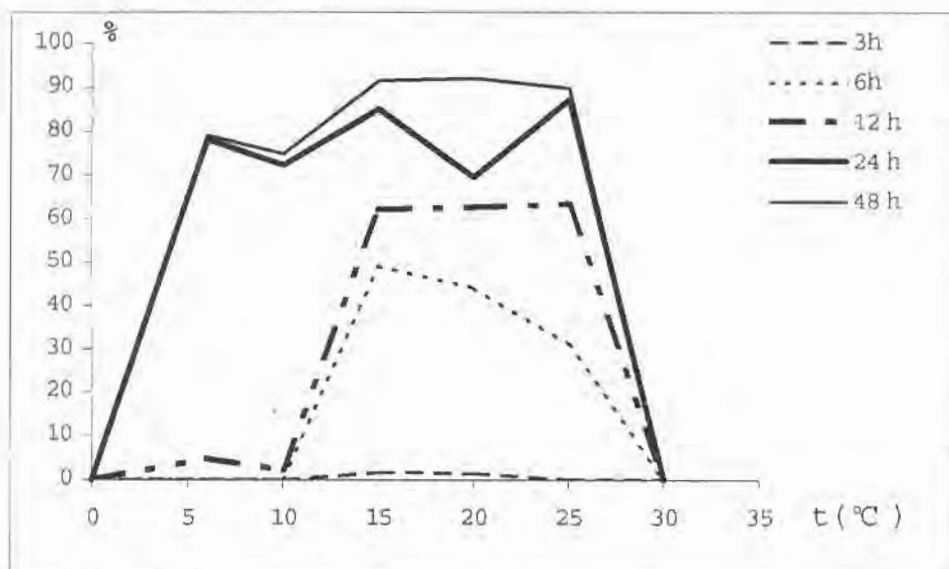
## REZULTATI I DISKUSIJA

### I. Uticaj temperature na klijanje askospora i porast inicijalnih hifa *H. juniperi*

Tokom ovog oglada praćeno je isključivo klijanje hijalinskih askospora *H. juniperi*, jer tamne i debelozidne nisu zapažane na napravljenim preparatima. Podaci koji slede stoga se odnose na hijalinske askospore. Zapaženo je takode da askospore mogu da kličaju dok se nalaze u askusu ili unutar plodonosnog tela. U suspenziji spora nalazio se znatan broj dvoćelijskih, kao i troćelijskih askospora, od kojih je deo klićao.

Do klijanja askospora gljive *H. juniperi* dolazi na temperaturama između 0 i 30° C.

Uticaj temperature na klijanje spora gljive *H. juniperi* prikazan je na grafiku 1.

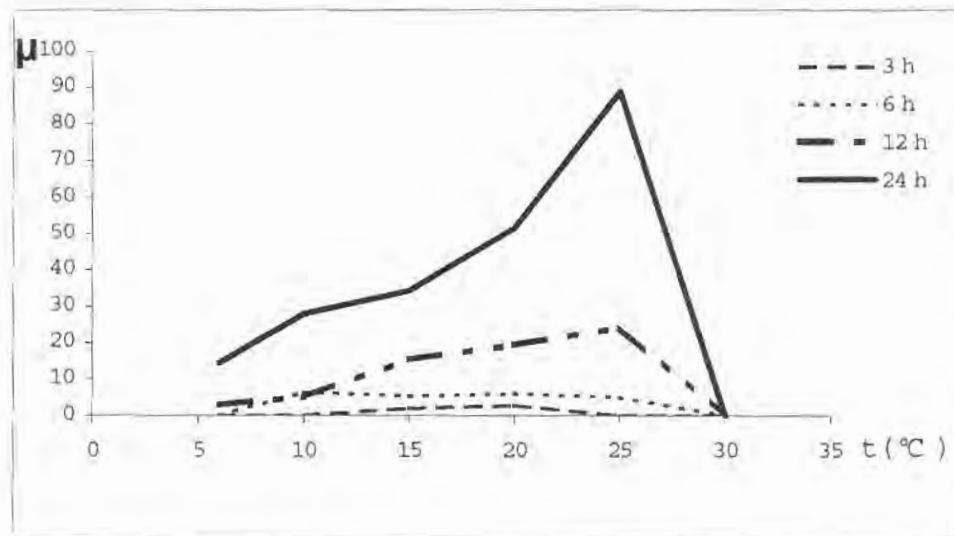


Grafik 1. Uticaj temperature na klijanje askospora *H. juniperi*  
 Graphic 1. The influence of temperature to *H. juniperi* ascospores germination

Na 15 i 20° C askospore pojedinaćno kličaju već posle 3 h. Posle 6 sati na ovim temperaturama zabeležen je preko 40% klićalih spora. Na temperaturi od 25° C posle 6 sati zabeležen je znaćajan procenat (preko 20%) klićalih askospora. Na nižim temperaturama (6 i 10° C) do pojedinaćnog klićanja spora dolazi tek posle 12 sati. Na temperaturi od 0° C askospore gljive *H. juniperi* klićale su posle 6 dana (144 sata). Pojedinaćno klićanje zabeleženno je i na 30° C.

Najveći broj (%) askospora gljive *H. juniperi* klija na temperaturama između 15 i 25° C. Uočava se da na navedenim temperaturama procenat klijanja malo varira, kako posle 12, tako i 24 i 48 h. Procenat klijanja askospora je visok. Posle 24 sata on na 15 i 25° C iznosi 85, odnosno 87 %, a na 20° C - 69,6 %. Posle 48 sati, na navedenim temperaturama, klijalno je oko 90% spora.

Uticaj temperature na porast inicijalne hife prikazan je na grafiku 2.



Grafik 2. Uticaj temperature na porast inicijalne hife *H. juniperi*

Graphic 2. The influence of temperature to growth of germ tube *H. juniperi*

Najbrži porast inicijalne hife zabeležen je na 25° C (posle 24 časa prosečna dužina inicijalnih hifa iznosi 88,81 μ). Međutim, kada se govori o optimalnim temperaturama za njen razvoj, u obzir treba uzeti i pojavu grananja.

Na temperaturama od 15 i 20° C do klijanja dolazi već posle 3 sata, a do grananja inicijalnih hifa već posle 24 h. Na ovim temperaturama spore klijavu sa većim brojem inicijalnih hifa, a naročito većim po pojedinačnoj ćeliji askospore. Prosečna dužina inicijalnih hifa posle 24 h na ovim temperaturama iznosi 50,6 i 51,4 μ, a procenat klijanja askospora 70 i 85 %. Optimalnom temperaturom za klijanje spora i porast inicijalnih hifa zato smatramo temperaturu između 15 i 20° C.

Na 25° C grananje je zabeleženo tek posle 48 h. Posle 48 h granaju se hife i na 10° C, dok se na 6° C granaju samo pojedinačne hife. Na temperaturi od 0° C klijanje askospora gljive *H. juniperi* zabeleženo je posle 6 dana. Srednja dužina izmerenih inicijalnih hifa u ovom slučaju iznosila je 16,27 μm. S obzirom na to da su ovom prilikom belježene i inicijalne hife znatnih dužina

(npr. 28,5  $\mu\text{m}$ , 33,6  $\mu\text{m}$ , maksimalno 53,8  $\mu\text{m}$ ) može da se pretpostavi da do klijanja pojedinih spora na ovoj temperaturi može da dođe i ranije.

Što se tiče samog načina klijanja, pod povoljnim uslovima, askospore kličaju sa 1-4, a ponekad i sa 5, 6 inicijalnih hifa, pri čemu može da klija svaka od ćelija askospore.

Inicijalna hifa češće formira na jednoj od dve krajnje ćelije, pri čemu u odnosu na uzdužnu osu spore može da bude postavljena u pravcu ili pod uglom (najčešće pravim - bočno klijanje). Na temperaturama od 15 i 20° C spore kličaju sa većim brojem inicijalnih hifa. Zapaženo je formiranje dve inicijalne hife iz jedne ćelije, češće krajnje, do kojeg dolazi na ovim temperaturama.

Klijanje nastaje u povoljnim uslovima bez vidljivog povećanja zapremine askospora.

Na temperaturama povoljnim za klijanje, inicijalne hife rastu u početku pretežno linearno, da bi već posle 24 h počele da se granaju. Zapaža se da dužina inicijalne hife nema uticaja na pojavu grananja i da do grananja dolazi i u slučaju jako kratkih (7,8  $\mu$ ) hifa. Nerazgranate hife posle 48 h počinju da se uvijaju (spiralizuju) na krajevima, ili kolenasto i cik-cak savijaju, a hifa se na samom kraju proširi. Pojavljuju se savijeni i zadebljali segmenti unutar hife. I razgranate hife zaustavljaju rast, počinju da se spiralizuju - uvijaju, savijaju i zadebljavaju. Pretpostavlja se da se kroz proces spiralizacije, zadebljavanja i širenja hife "konzerviraju", transformišu u trajnu formu i obustavljaju rast. Čvorasta proširenja (zadebljanja) predstavljaju hlamidospore (trajne bespolne spore) koje imaju ulogu u opstanku gljive tokom nepovoljnih perioda.

Na temperaturama koje su blizu minimalnoj i maksimalnoj spore bubre i kličaju sa zastojeom i retko.

Na 30° C dolazi do povećanja zapremine askospora- one kao da bubre, i mali procenat ovih klija (po nekoliko spora). Spore prvo bubre, a zatim kličaju. Među sporama povećane zapremine pojavljuju se one sa zadebljalim zidovima. Na 0° C spore *H. juniperi* ponašaju se slično kao i na 30 °C: dolazi do povećanja zapremine spora; i u ovom slučaju javljaju se spore sa zadebljalim zidovima.

Ovakve spore javljaju se pri graničnim, nepovoljnim temperaturnim uslovima, pa može da se smatra da su one, na 0 i 30 °C ipak fiziološki aktivne, što se ispoljava na ovaj način. Kako se broj spora zadebljanih zidova sa vremenom izlaganja ovim temperaturama povećava u odnosu na nabubrele i normalne spore, pretpostavlja se da se ovo zadebljavanje zidova, a možda i bubrenje, javlja kao reakcija odbrane na visoke ili niske temperature. Ove temperature predstavljaju verovatno granične temperature na kojima spore ispoljavaju fiziološku aktivnost.

Na temperaturi od 35 °C, ni posle 6 dana, nisu zabeležene spore koje kličaju ili kod kojih dolazi do promene zapremine ili zadebljavanja zidova spora. Spore koje su izlagane temperaturi od 35° C u trajanju od 24 h su gubile

klijavost. Ako su ovoj temperaturi bile izložene 24 h, ni posle izlaganja nižoj temperaturi (25° C - 24 h) nisu klijale. Spore koje su izlagane temperaturi od 35° C samo 1 sat, a zatim premeštene na nižu temperaturu (25 °C) klijale su u manje-više istom procentu i na isti način kao spore koje nisu izlagane visokoj temperaturi. Askospore izlagane temperaturi od 35° C 3 ili 6 sati, pa potom izlagane nižim temperaturama mogu da klijaju. Posle tročasovnog izlaganja temperaturi od 35° C zapaža se pojava uvećanih, nabubrelih spora.

Tačna dužina izlaganja spora visokoj temperaturi (35 °C) koja je potrebna da spreči njihovo klijanje nije određena. Smatralo se da nije od značaja utoliko što se u prirodnim uslovima, na lokalitetima gde se gljiva javlja, takva temperatura ne javlja često, svakako, ne u dužim intervalima.

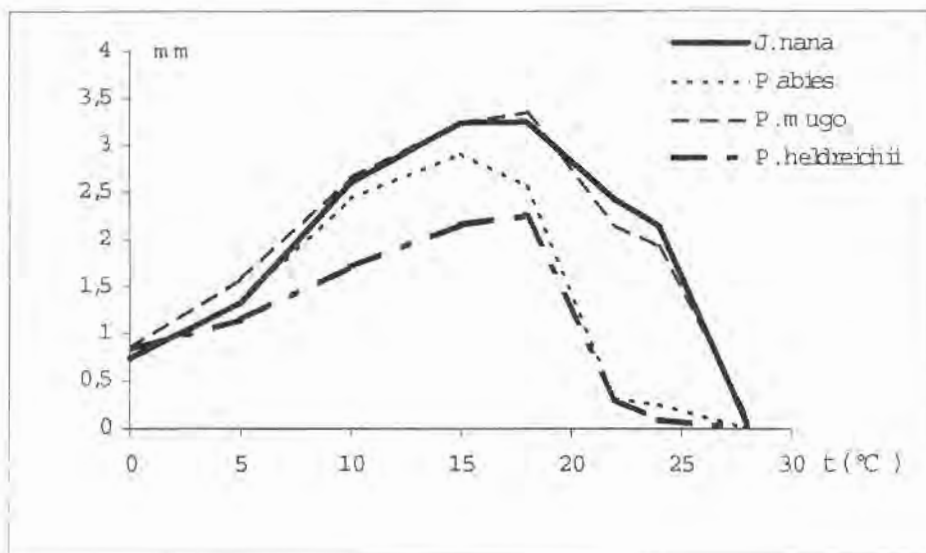
U februaru 2001. izvršena je provera klijavosti askospora *H. juniperi* sa *P. heldreichii* sa istog materijala kao i u prethodnoj godini na temperaturama od 15 i 20 °C. Dužina formiranih inicijalnih hifa, prema izračunatim srednjim vrednostima, ne razlikuje se znatno od vrednosti merenih predhodne godine. Procenat klijavosti spora, međutim, značajno opada, i iznosi, na 15 °C- 57,95 %, a na 20 °C -32, 94 %.

2. Prosečan dnevni porast različitih izolata gljive *H. juniperi* na MEA u zavisnosti od temperature prikazan je na grafiku 3.

Na MEA podlozi svi ispitivani izolati pokazali su najbolji porast na temperaturama od 15 i 18 °C. Izolati iz munike, planinskog bora i planinske kleke neznatno brže rastu na temperaturi od 18° C, a izolat iz smrče na 15° C. Ove razlike možemo smatrati minimalnim.

Micelija izolata iz *P. mugo* pokazuje brži porast u odnosu na ostale ispitivane izolate, sledi izolat iz *J. nana*, zatim iz *P. abies*, dok izolat iz *P. heldreichii* raste upadljivo sporije: na optimalnoj temperaturi 1,1 mm sporije u odnosu na izolat iz *P. mugo*, što je za trećinu sporije (izolat iz *P. mugo* raste brzinom od 3, 35 mm na dan, a iz *P. heldreichii* 2,25 mm).

Na temperaturi od 28° C izolati iz *P. heldreichii* i *P. abies* ne rastu, dok onih iz *P. mugo* i *J. nana* pokazuju minimalan porast, s tim da je porast izolata iz planinskog bora u odnosu na kleku znatno bolji (0,15 prema 0,05 mm dnevno). Micelije ovih izolata, zapravo, pokazuju malo bolji porast prvih nekoliko dana po inokulaciji (4 - 8 dan), a kasnije se on smanjuje do minimalnog. Porast micelije izolata iz munike i smrče znatno opada već na 22° C na 0,3 mm dnevno, i za izolat iz munike na 24° C raste minimalno.



Grafik 3. Prosečan dnevni porast micelije različitih izolata *H. juniperi* na MEA podlozi u zavisnosti od temperature

Graphic 3. Average daily growth of different isolates of *H. juniperi* on MEA depending on the temperature

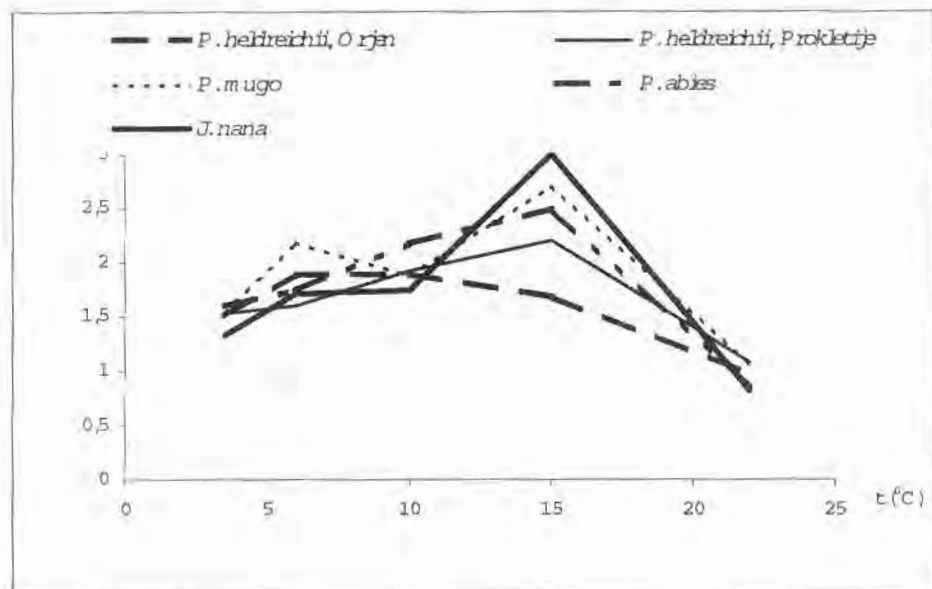
Pošto porast micelije gljive nije ispitivan na temperaturama ispod 0° C, minimalna temperatura na kojoj je ona fiziološki aktivna nije određena. Na 0° C micelija gljive ima mnogo bolji porast nego na temperaturama bliskim gornjim kardinalnim tačkama.

Različiti izolati gljive *H. juniperi* se, osim brzinom porasta, donekle razlikuju i izgledom (razvijenošću, poleglošću) i tonom boje kulture. Ove razlike nisu velike. Za sve je karakteristična sivo-crna, vunasta, vazdušasta micelija bez sjaja. Micelija izolata iz munike ima nijansu sivo plave, svetlije boje i manje je polegla. Micelija izolata iz planinskog bora ima svetliju žuto-smeđe-sivu nijansu, takođe je dosta vazdušasta. Izolati iz smrče i planinske kleke su sivo crni, plavičasti, polegljijeg izgleda i tamniji nego prethodni.

Boja, kao i opšti izgled (poleglost) kulture zavise takođe od temperature na kojoj se ona razvija. Na višim temperaturama micelija gljive ima tamniju boju, više je polegla, ali je takođe končasta. Starenjem micelija postaje tamnija, dok je obod koji raste nešto svetliji. Izlaganjem micelije iz termostata dnevnom svetlu, ona posle nekoliko dana formira po svom rubu prsten tamne i jako polegle, urasle u podlogu micelije i tako prekida, ili jako usporava rast.

Prosečan dnevni porast različitih izolata gljive *H. juniperi* na PDA u zavisnosti od temperature prikazan je na grafiku 4.





Grafik 4. Prosečan dnevni porast micelije različitih izolata *H. juniperi* na PDApodlozi u zavisnosti od temperature

Graphic 4. Average daily growth of different isolates of *H. juniperi* on PDA depending on the temperature

Tab. 1. Prosečan dnevni porast micelije različitih izolata gljive *H. juniperi* na podlogama MEA i PDA u zavisnosti od temperature

Tab. 1. Average daily growth of different isolates of *H. juniperi* on MEA and PDA depending on temperature

T (°C)	Porast micelije (mm/dan); poreklo izolata <i>Mycelial growth (mm/day) origin of isolate</i>							
	<i>P. heldreichii</i> -Orjen		<i>P. mugo</i>		<i>P. abies</i>		<i>J. nana</i>	
	MEA	PDA	MEA	PDA	MEA	PDA	MEA	PDA
10	1,71	1,80	2,65	1,90	2,65	2,17	2,6	1,69
15	2,16	1,68	3,24	2,70	2,91	2,49	3,24	3,01
22	0,3	0,97	2,15	1,04	0,31	0,84	2,42	0,82

Na PDA podlozi svi izolati najbrže rastu na temperaturi od 15° C, s tim da najbolji porast ima izolat iz *J. nana*, iz *P. mugo*, a zatim iz *P. abies*. Porast izolata iz munike sa lokaliteta Prokletije, na optimalnih 15° C, pokazao se boljim nego za izolat iz istog domaćina sa lokaliteta Orjen - Zubački kabao, ali slabiji od ostalih izolata. Interesantno je da na svim, osim na optimalnoj temperaturi, najbrži porast pokazuje micelija izolata iz *P. abies*. Micelija izolata

iz *P. mugo* pokazuje na 6° C znatno brži porast nego micelije ostalih izolata; posle toga, na 10° C, brzina porasta pada, da bi maksimum dostigla na 15° C.

Porast micelije na MEA podlozi pokazao se boljim nego na PDA podlozi, što je prikazano u tabeli 1.

Na 22° C porast micelije različitih izolata je ujednačeniji, za *P. abies* i *P. heldreichii* znatno bolji, dok je za *J. nana* i *P. mugo* znatno slabiji. Na temperaturama ispod 10° C porast micelije brži je na PDA podlozi.

3. Rezultati ispitivanja stepena oksidacije galne i taninske kiseline dati su u tabeli 2.

Tab. 2. Reakcija i porast različitih izolata *H. juniperi* i *Trametes versicolor* na MEA podlozi sa galnom (G) i taninskom (T) kiselinom posle 14 dana

Tab. 2. Reaction and growth of different isolates of *H. juniperi* and *Trametes versicolor* on MEA with gal (G) and tannin (T) acid after 14 day.

Poreklo izolata <i>Origin of isolate</i> <i>H. juniperi</i>	Reakcija <i>Reaction</i>	Prečnik difuzione zone <i>Diameter of diffusion zone (mm)</i>	Prečnik micelije <i>Diameter of mycelium (mm)</i>	Grupa po Group according DAVIDSON	Boja po Color according SEGLY
<i>Pinus heldreichii</i>	G +++++	41-52 (45,5)	13-17 (14,6)	8	701 (186-171)
	T +++++	40-57 (48,3)	34-44 (39,1)	8	708-713
<i>Pinus mugo</i>	G +++++	40-48 (45,1)	13-16 (14,1)	8	701 (186-171)
	T +++++	43-55 (46,6)	30-40 (34,5)	8	708-713
<i>Picea abies</i>	G +++++	46-52 (47,8)	12-16 (14,9)	8	701 (186-171)
	T +++++	42-56 (45,8)	26-36 (31,5)	8	708-713
<i>Juniperus nana</i>	G +++++	45-49 (47,9)	12-17 (14,8)	8	701 (186-171)
	T +++++	42-55 (48,2)	30-42 (36)	8	708-713
<i>Trametes versicolor</i>	G +++++	33-36 (34,1)	0	6	701(192)
	T +++++	44-61 (52,6)	45-54 (48,5)	6	708

Ispitivani izolati *H. juniperi* oksidišu galnu i taninsku kiselinu bez značajnijih razlika. Reakcija svih ispitivanih izolata na galnoj kiselini označena je kao + + + + +, a na taninskoj sa + + + +, dok izvesna razlika postoji u širini formirane difuzione zone i brzini porasta micelije. Na osnovu jasnog rasta na podlozi sa dodatkom galne kiseline i dobrog rasta na podlozi sa dodatkom taninske kiseline, gljiva je, prema ključu Davidsona i sar., svrstana u 8 grupu.

U literaturi koja nam je bila dostupna nema podataka o temperaturi pogodnoj za klijanje spora *H. juniperi*.

Bazzigher (1976) smatra da do klijanja askospora dolazi odmah po njihovom rasejavanju, što prema literaturi i sopstvenim istraživanjima odgovara periodu avgust-oktobar (kasno leto i jesen). Temperature koje su se pokazale

povoljnim za klijanje i rast inicijalnih hifa tokom ovih istraživanja mogu da potvrde ovu hipotezu.

Može se pretpostaviti da inicijalne hife ostvaruju primarne infekcije neposredno posle rasejavanja spora, a zatim se, zadebljavanjem zidova micelije, kao i spora, transformišu u trajnu formu gljive. Micelija nastavlja da raste kasnije, kada se za to steknu povoljni uslovi spoljašnje sredine.

Prema Gaumannu (1951, cit Bazzigher, 1976) *H. juniperi* je patogen koji se razvija na suboptimalnim temperaturama, a njegov razvoj vezan je prvenstveno za uslove visoke vlažnosti vazduha, koja ne može *in vivo* da se ostvari na temperaturama optimalnim za rast gljive. Smatra se da u vreme topljenja snega, u vazдушnom »džepu« koji se formira između tla i snežnog pokrivača, relativna vlažnost vazduha iznosi oko 100%, a da temperatura može da se podigne i znatno iznad 0 °C. Pod ovim uslovima dolazi u prirodi do porasta micelije gljive *H. juniperi*.

Uticaj temperature na porast micelije *H. juniperi* ispitivali su Gaumann i sar. (1934, cit Bazzigher, 1976), a zatim Bazzigher (1976). Gauman i sar. (1934 cit. Bazzigher, 1976) zabeležili su da *H. juniperi* ne raste iznad temperature od 24 °C Bazzigher (1976) međutim, smatra da se ovaj podatak odnosi na izolati koji su Gaumann i sar. koristili u eksperimentu, dok je on kod većeg broja izolata slab porast micelije beležio na temperaturama blizu 30 °C.

Bazzigher je ispitivao porast micelije na MEA za izolati iz različitih biljaka domaćina. Porast micelije izolati *H. juniperi* iz smrče i bora krivulja se znatno ne razlikuju, dok je brzina rasta izolata iz kleke je za oko 1/3 manja.

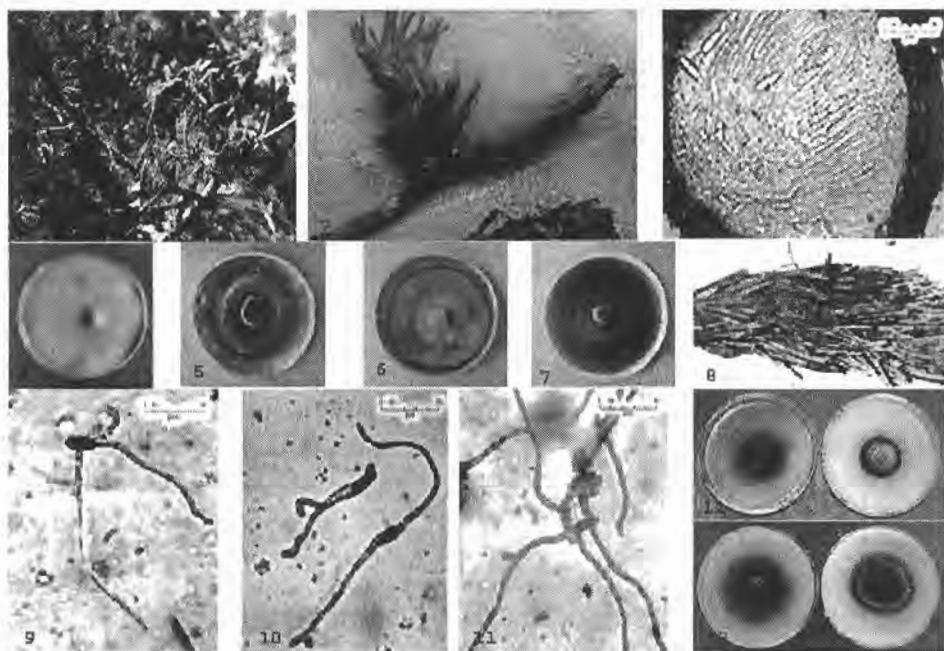
Rezultati sprovedenih istraživanja, kada se govori o temperaturi optimalnoj za porast micelije *H. juniperi*, slažu se sa rezultatima Bazzighera i ona iznosi 15-18° C. Kada se govori o gornjem pesimumu, postoje izvesne razlike, ali se pokazalo da pojedini izolati pokazuju minimalan porast blizu 30 (28° C) (*P. mugo* i *J. nana*), a drugi *P. heldreichii* i *P. abies* ne

Kako porast micelije na temperaturama ispod 0° C nije praćen, navodimo samo rezultate istraživanja navedenog autora, prema kojima je gljiva fiziološki aktivna do -5° C.

Međutim, razlika postoji kada se govori o brzini porasta različitih izolata. Izolat iz *J. nana* je prilikom sprovedenih istraživanja pokazao jednako brz porast kao i izolati iz planinskog bora i smrče. Značajna razlika javlja se u brzini porasta micelije izolata iz munike, koja raste za trećinu sporije.

Vrednosti koje je izmerio Bazzigher (1976) za porast micelije na MEA podlozi iz smrče, planinskog bora i kleke su, u odnosu na sprovedena istraživanja, nešto niže i iznose, posle 14 dana, na optimalnih 15° C oko 38-39 mm za smrču i planinski bor, prema 43,5 mm (smrča) i 50,2 mm (planinski bor); i oko 25 mm za izolat iz kleke, prema 47,7 mm (izmereno tokom sprovedenih

istraživanja). Posle 14 dana, na 15° C micelija izolata iz munike rasla je prosečno 36.33 mm.



**Fototablica I.** 1 - crna paučinavost četina na izbojcima: *P. mugo*; 2 - izgled micelije gljive ispod snega na *P. mugo*; 3 - presek kroz askokarp *H. juniperi*; Različiti izolati *H. juniperi* iz četina: 4- *P. mugo*, 5. - *P. heldreichii*, 6. - *P. abies*, 7- *J. nana* u kulturi; 8- crna paučinavost četina na *P. heldreichii*, izgled micelije tokom leta; Klijanje askospora *H. juniperi*: 9 - na 10° C posle 24 h; 10- na 25° C posle 24 h; 11- na 10° C posle 48 h; Lučenje oksidacionih fermenta *H. juniperi*: reakcija na MEA podlogama sa galnom (nebojena podloga) i taninskom (mlečno bela podloga) kiselinom: 12- posle 7 dana; 13- posle 14 dana.

**Phototable I** 1 – brown felt blight on twigs of *P. mugo*; 2 – appearance of mycelium of the fungus below the snow pack; 3 – section through the ascocarp of *H. juniperi*; Different isolates of *H. juniperi* from needles: 4- *P. mugo*, 5. - *P. heldreichii*, 6. - *P. abies*, 7- *J. nana* in culture; 8- brown felt blight on *P. heldreichii* during the summer; Germination of *H. juniperi* ascospores: 9 - on 10° C after 24 h; 10- on 25° C after 24 h; 11- on 10° C after 48 h; Secretion of oxidational ferments of *H. juniperi*: reaction on MEA with gall (non colored nutrient medium) and tannin (milk-white nutrient medium) acid: 12- 7 days after inoculation; 13- 14 days after inoculation

T= 0° C	T= 5° C	T=10° C	T=15° C	T=18° C	T=22° C	T=24° C	Poreklo izolata
							<i>Juniperus nana</i>
							<i>Picea abies</i>
							<i>Pinus mugo</i>
							<i>Pinus heldreichii</i>

**Fototablica II:** Porast micelije različitih izolata *H. juniperi* u zavisnosti od temperature na MEA podlozi (starost kulture 25 dana)

*Phototable II* Growth of different isolates of *H. juniperi* on MEA depending on the temperature (25 days old culture)

Rezultati izvedenog ogleada pokazuju da *H. juniperi* intenzivno luči oksidacione fermente. Postojanje drugih fermenta koji svojom aktivnošću mogu da prouzrokuju smrt – nekrozu ćelija četina, tek bi trebalo ispitati.

## ZAKLJUČAK

Askospore *H. juniperi* klijaju u temperaturnom rasponu 0-30 °C. One klijaju obrazujući 1-4, ponekad 5, 6 inicijalnih hifa. Optimalna temperatura za klijanje askospora iznosi 15-20 °C. Procenat klijanja na ovim temperaturama je visok i iznosi, posle 24 časa, preko 85 %, dok dužina inicijalnih hifa iznosi 50 μ.

Micelija gljive *H. juniperi* raste na temperaturama između -5 i 28 °C. Optimalna temperatura za porast micelije gljive *H. juniperi* iznosi 15-18 °C.

Brzina porasta micelije različitih gljive *H. juniperi* na MEA je različita: izolati iz *P. mugo*, *P. abies* i *J. nana* rastu prilično ujednačeno, dok je porast micelije izolata iz *P. heldreichii* za oko trećinu sporiji, kako na optimalnoj temperaturi, tako i na ostalim temperaturama. Prosečan dnevni porast prva tri navedena izolata na optimalnim temperaturama iznosi oko 3 ( 2,9 – 3,3 ) mm, a izolata iz munike oko 2,2 mm (na MEA).

Pokazalo se da micelija *H. juniperi* raste bolje na MEA nego na PDA podlozi.

*H. juniperi* luči oksidacione fermente. Ispitivani izolati oksidišu galnu i taninsku kiselinu bez značajnih razlika.

### LITERATURA

- Bazzigher, G. (1976): Die schwarze Schneeschimmel der Koniferen (*Herpotrichia juniperi* (Duby) Petrak und *Herpotrichia coulteri* (Peck) Bosc). European Journal of Forest Pathology 6, 109-122.
- Booth C. (1971): Methods in Microbiology, Volume 4, Academic Press
- Dennis R.W. G. (1978): British Ascomycetes. J.Kramer. Vaduz.
- Karadžić D. (1977): Proučavanje uzroka pojave "crvenog srca" u bukovim stablima, magistarski rad, Šumarski fakultet, Beograd
- Lazarević J. (2001): Bioekologija fitopatogene gljive *Herpotrichia juniperi* (Duby) Petrak, magistarski rad, Šumarski fakultet, Beograd.

### CONTRIBUTION TO THE STUDY OF THE PHYSIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF THE PATHOGENIC FUNGUS *HERPOTRICHIA JUNIPERI*

by

Jelena Lazarević

Biotechnical institute – Podgorica

#### Summary

Brown felt blight, *Herpotrichia juniperi* (Duby) Petrak is spread through mountain-sub alpine regions. It develops on needles and twigs under the snow in areas where the snow pack persists for a long time. In Serbia and Montenegro, *H. juniperi* proved to be a problem in high mountain forest ecosystems where can make difficult or totally unable natural regeneration of forest. The greatest damages were recorded on *Pinus heldreichii*, *Pinus mugo*, *Picea abies*, *Juniperus nana*, but also on *Pinus sylvestris* and *Juniperus communis*, while *Abies alba* demonstrated high resistance to this pathogen.

We have examined certain physiological characteristics of pathogenic fungus and conclude:

Ascospores of *H. juniperi* germinate in temperature range 0-30° C, with optimum at 15-20 ° C. Average length of growing hypha after 24 hours at 15 and 20 ° C is 50.6 and 51.4 μ, and percentage of spore germination is 70 and 85 %.

*H. juniperi* grows between -5 and 28° C, and has its temperature optimum at 15-18 ° C. Growth of different isolates of *H. juniperi* is not equal. Average

daily growth on MEA of isolate from *P. mugo*, *P. abies* and *J. nana* is pretty equal -on optimal temperature is 3 (2.9-3.3) mm, and is slower for about third from *P. heldreichii* isolate - 2.2 mm.

*H. juniperi* secretes oxidation ferments. Exanimate isolates *H. juniperi* are oxidizing gal and tannin acid without significant differences.