UTJECAJ TEMPERATURE I pH PODLOGE NA RAST GLJIVE BOTRYTIS CINEREA

Damjanović, Ana-Marija

Master's thesis / Diplomski rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of agriculture / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Poljoprivredni fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:151:706922

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek - Repository of the Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek

zir.nsk.hr

Image not found or type unknown

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA

POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Ana-Marija Damjanović

Sveučilišni diplomski studij: Bilinogojstvo

Smjer: Zaštita bilja

UTJECAJ TEMPERATURE I pH PODLOGE NA RAST GLJIVE *BOTRYTIS CINEREA*

Diplomski rad

Osijek, 2015.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA

POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Ana-Marija Damjanović

Sveučilišni diplomski studij: Bilinogojstvo

Smjer: Zaštita bilja

UTJECAJ TEMPERATURE I pH PODLOGE NA RAST GLJIVE *BOTRYTIS CINEREA*

Diplomski rad

Povjerenstvo za obranu diplomskog rada:

1. Izv. prof. dr. sc. Karolina Vrandečić, predsjednik
2. Prof. dr. sc. Jasenka Ćosić, mentor
3. Prof. dr. sc. Nada Parađiković, član

Osijek, 2015.

Sadržaj

1. Uvod 1

2. Pregled literature 2

2.1. *Botrytis cinerea* 2

2.2. Utjecaj hranjive podloge i temperature na razvoj fitopatogenih gljiva 5

3. Materijali i metode 9

3.1. Priprema hranjivih podloga 10

3.1.1. PDA podloga 10

4. Rezultati 11

5. Rasprava 21

6. Zaključak 22

7. Popis literature 23

8. Sažetak 26

9. Summary 27

10. Popis tablica 28

11. Popis slika 29

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

BASIC DOCUMENTATION CARD

1. Uvod

Bitni čimbenici za razvoj biljnih bolesti su temperatura, relativna vlaga zraka, svjetlost i pH podloge. Svaka fitopatogena gljiva ima specifične zahtjeve prema čimbenicima okoline. Ukoliko okolišni čimbenici ne ispunjavaju uvjete za rast i razvoj gljive, infekcija se neće ostvariti niti će se bolest razvijati. Ukoliko su okolišni čimbenici povoljni dolazi do zaraze i razvoja bolesti, a intenzitet zaraze ovisi, između ostaloga, o tome da li gljiva ima optimalne uvjete za svoj rast i razvoj ili ne.

Za razvoj gljive *Botrytis cinerea* potrebna je visoka relativna vlažnost zraka i temperature između 2 i 35°C (optimum 20 do 25°C), a pri optimalnim uvjetima za razvoj gljiva može izazvati gubitak prinosa, ovisno o biljnoj vrsti i osjetljivosti genotipa, veći od 50%.

Cilj ovog diplomskog rada jest utvrditi kako različite vrijednosti pH podloge i različite temperature utječu na brzinu razvoja gljive *Botrytis cinerea*. Ispitivan je utjecaj pH podloge 8,0, 6,5 i 5,5 pri uzgoju gljive na temperaturama 15°C, 22°C, 30°C. Hranjiva podloga koja je korištena u istraživanju je bila PDA.

2. Pregled literature

2.1. *Botrytis cinerea*

Gljiva *Botrytis cinerea* je ubikvist i polifag. Polifagnost je u stvari diferencijacija brojnih formi i biotipova unutar vrste koji su prilagođeni vrstama biljaka koje su po botaničkoj sistematici vrlo udaljene (Radman, 1978.). Uzročnik je bolesti poznate pod nazivom siva plijesan na mnogim poljoprivrednim kulturama na svim kontinentima od suptropskih do hladnijih klimata (Jarvis, 1977.). Napada biljke u vanjskom uzgoju i u zaštićenim prostorima, a domaćini su joj povrtne kulture kao na primjer luk, rajčica, paprika, grašak, špinat, kupus, grah, krastavci, bundeve, ratarske kulture kao što su soja, suncokret, uljana repica i duhan te plodove voćaka (jagode, kupine, maline) (slika 1.) i bobice vinove loze (slika 2.). Ime siva plijesan bolest je dobila po sivkasto – smećkastom izgledu paučinastog micelija, konidiofora i konidija (slika 3.) na napadnutom biljnom tkivu (Mlikota, 2001.). Najčešća je i najopasnija bolest plodova različitog povrća, voća i vinove loze, osobito ako u razdoblju pred kraj vegetacije i u berbi padnu jake kiše, prinos može biti umanjen za više od 50%. Uzročnik bolesti se može naći na odumrlim biljnim ostatcima (Cvjetković, 2010.).

Ekološki uvjeti za rast gljive su temperature između 2 i 35°C, koje uz visoku vlagu omogućuju klijanje konidija. Optimalne temperature za klijanje spora su 20 do 23°C (Cvjetković, 2010.), a optimalne temperature za rast i razvoj micelija su između 20 i 22°C. Radman (1978.) navodi da parazit stvara obilje konidija koje mogu ostvariti zarazu na vlažnom tkivu već kod temperatura između 1 i 3°C , a optimum je između 20 i 30°C uz 100% vlagu zraka. Da bi počele klijati konidije trebaju visoku relativnu vlagu zraka. Raniji radovi su ukazali da klijanje konidija ovisi o prisutnosti vodenog filma koji obavija konidiju (Brown, 1915., Brown i Harvey, 1927.). Williamson i sur., (1993.) su utvrdili, ako nije prisutna voda za klijanje konidija, potrebna je relativna vlaga zraka 100%, dok je Ilieva (1970.) utvrdila da je za istu svrhu potrebna relativna vlaga zraka viša od 85%. Klijanje konidija pri visokoj relativnoj vlazi zraka je moguće zbog kondenzacije vode na okolnim površinama pri vlazi višoj od 95%. Čimbenici koji uz visoku relativnu vlagu zraka utječu na razvoj bolesti su svjetlost, kiselost sredine i starost konidija. Gljiva *B. cinerea* može klijati u tami, ali je klijavost u tim uvjetima vrlo slaba. Crveno svjetlo i spektar blizu ultraljubičastog svjetla (280-380 nm) inhibiraju klijanje konidija, dok kontinuirano ultraljubičasto svjetlo inhibira sporulaciju (Jarvis, 1977, Nicot i sur., 1996.).

Za klijanje konidija optimalni pH sredine je između 3,0 i 7,0, dok micelij može rasti na pH od 2,0 do 8,5 (Webb, 1919.). Postotak klijanja ovisi o starosti kolonija, a najbolje klijaju konidije koje su stare 16 dana (Singh, 1940). Konidije počinju klijati kada dospiju na osjetljivo biljno tkivo. Klična cijev se izdužuje po biljnoj površini, gljiva formira apresorij i prodire u biljno tkivo pomoću infekcijske hife. Brown i Harvey (1927.) tvrde da se penetracija odvija mehaničkim putem, dok McKeen (1974.) tvrdi da se penetracija odvija enzimatskim putem, na način da se razgradi kutikula pomoću pektolitičkih enzima.

Micelij formira konidije na koloniziranom tkivu čime započinje ciklus bolesti. Gljiva započinje novi ciklus bolesti pomoću konidija, taj se ciklus ponavlja sve dok ne nastanu ekstremni uvjeti poput hladnoće, suše ili nedostatka domaćina, u tim uvjetima gljiva stvara sklerocije ili savršeni stadij.

Nespolni (anamorfni) stadij *Botrytis cinerea* Pers. i spolni (telemorfni) stadij *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetz. su stadiji u životnom ciklusu iste fitopatogene gljivice. Spolni stadij je prvi puta opisao 1866. Anton De Bary (Lorenz i Eichhorn, 1983.) pod imenom *Peziza fuckeliana*, a 1869. ga je preimenovao u *Sclerotinia fuckeliana*. Whetzel je 1945. godine telemorfni stadij prebacio u rod *Botryotinia* i od tada nosi naziv *Botryotinia fuckeliana*. Uspješnim *in vitro* križanjima 1939. Groves i Drayton su potvrdili da je *B. fuckeliana* telemorfni stadij anamorfs *B. cinerea* (Jarvis, 1977.).

Od prvih proučavanja gljivica je bila poznata kao *B. cinerea* upravo zato jer je u prirodi detektiran uglavnom nespolni stadij (Topolovec–Pintarić, 2000.). Kao pripadnik roda *Botrytis*, koji postoji još od 1729. god., svrstava se u pododjel *Deuteromycota*, razred *Hyphomyctes*, porodica *Moniliaceaae* (Ainsworth, 1971.). Mnogi taksonomi daju prednost spolnom stadiju u nomenklaturi i sistematici carstva gljiva te se na temelju toga ova gljivica ubraja u pododjel *Ascomycota*, razred *Dicomycetes*, porodica *Sclerotiniaceae* (Ainsworth, 1971.). Nespolni stadij je u prirodi dominantan, raširen i ima važnu ulogu u epidemiologiji gljive, dok se spolni stadij u prirodi rijetko nalazi i ne igra važnu ulogu u životnom ciklusu gljive.

Rodu *Botrytis* pripadaju i neke vrste koje su specijalizirane na određenog biljnog domaćina, dok patogena gljiva *B. cinerea* ima široki spektar domaćina. Tako ova gljiva ima više od 200 biljnih domaćina (Javris, 1977.). Štete koje uzrokuje očituju se tijekom vegetacije i nakon berbe te tijekom skladištenja i transporta. Odgovara joj umjereni klimat,

širi se pomoću vjetra, a jedna je od najčešće utvrđivanih gljivica u uzorcima zraka (Paddy i Kelly, 1954., Richards, 1956.).



Slika 1. *Botrytis cinerea* na jagodi (Katedra za fitopatologiju)



Slika 2. *Botrytis cinerea* na bobama vinove loze

(izvor: http://www.znanjenapoklon.rs/pub/article/14065403767605_botritis.jpg)



Slika 3. Konidiofori i konidije *Botrytis cinerea* (Katedra za fitopatologiju)

2.2. Utjecaj hranjive podloge i temperature na razvoj fitopatogenih gljiva

U laboratoriju je proučavan utjecaj hranjive podloge (PDA, podloga od mrkve) i temperature (15, 20 i 30°C) na rast i razvoj micelija i formiranje sklerocija fitopatogene gljive *Sclerotinia sclerotiorum* (Mikić i sur., 2014.). Statističkom obradom podataka utvrđeno je da se pri temperaturama 15 i 20°C na PDA podlozi značajno bolje razvio micelij, nego na podlozi od mrkve i temperaturi 30°C. Također, na PDA podlozi i temperaturama 15 i 20°C su se formirale i sklerocije, dok su na temperaturi 15°C sklerocije bile veće od onih formiranih na 20°C.

Kim i sur. (2005.) su istraživali utjecaj hranjivog supstrata, temperature, vodnog potencijala, pH podloge i svjetla na rast micelija i na proizvodnju piknida *Sphaeropsis pyriputrescens*. Najpogodnije podloge za razvoj svih šest testiranih izolata su bile podloge od jabučnog soka i podloge od kruškinog soka. Podloga od kukuruza nije se pokazala pogodnom za rast micelija ili proizvodnju piknida. Gljiva je inkubirana na temperaturama -3, 0, 5, 10, 15, 17, 20, 22, 25, 30 i 35°C. Porast gljive utvrđen je na temperaturama od -3 do 25°C, s najboljim rastom na 20°C i potpuno bez rasta na 30°C. Gljiva je rasla pri vodnom potencijalu -5,6 MPa na PDA podlozi. Gljiva je rasla pri pH vrijednosti supstrata od 3,3 do 6,3, s najboljim rastom pri pH vrijednosti između 3,3 i 4,2. Nakon 10 dana inkubacije nije utvrđen rast micelija pri pH vrijednosti većoj od 7,2, ali se rast nastavio

kada je gljiva precijepljena na PDA podlogu. Bez obzira na okolišne uvjete, nekoliko piknida se formiralo na 20°C u mraku. Produkcija piknida značajno je porasla uz fluorescentno svijetlo, no kontinuirano svjetlo je smanjilo proizvodnju piknida, ovisno o životnim uvjetima. Zobena podloga (OMA – oat meal agar) najviše je odgovarala proizvodnji piknida i konidija. Piknidi koji su se formirali u 3 tjedna starim kulturama na zobenoj podlozi na 20°C i pri manje od 12 sati svjetla producirali su obilje konidija te je stoga ovaj postupak preporučen za proizvodnju inokuluma.

Xiao i sur., (2011.) su istraživali razvoj zaštite na kemijskoj bazi za trulež uzrokovanu gljivom iz roda *Sphaeropsis na* uskladištenim jabukama. U *in vitro* uvjetima ispitivali su osjetljivost *Sphaeropsis pyriputrescens* na tri registrirana fungicida (tiabendazol, fludioxonil i pirimetanil) i to primjenom poslije berbe. Testirani su fungicidi i njihov utjecaj na rast micelija i klijanje konidija trideset izolata gljive *Sphaeropsis pyriputrescens*. U voćnjaku 2 do 5 tjedana prije berbe jabuke sorte Golden delicious inokulirane su patogenom. Poslije berbe, voće je tretirano tiabendazolom, fludioxonilom ili pirimetanil te je skladišteno na 0°C, i promatrano je truljenje do 9 mjeseci poslije berbe. Porast micelija smanjen je za 50% (EC50) pri uporabi 0,791, 0,005, i 2,828 µg/ml tiabendazola, fluodioxonila i pirimetanila. Fludioxonil i pirimetanil također su imali učinak umanjili klijavost konidija ispitivane gljiveza 50% kod uporabe 0,02 µg/ml fludioxonila i 5,626 µg/ml pirimetanila. Rezultati upućuju da *Sphaeropsis* trulež može biti učinkovito kontrolirana fungicidima na osnovi tiabendazola, fludioxonila i pyrimetanila.

Odumrli listovi jagode inokulirani su gljivom *Botrytis cinerea* i inkubirani su na različitim temperaturama u rasponu od 5 do 30°C. Sporulacija gljive, odnosno formiranje konidija po cm^2 na plojci lista mjereno je nakon inkubacije na vlažnom između trećeg i jedanaestog dana. Optimalna temperatura za sporulaciju je bila između 17 i 18°C za cijelo vrijeme trajanja vlažnosti. Broj konidija između 10^5 i 10^7 po cm^2 je utvrđen na temperaturama između 15 i 22°C i to nakon sedam dana kontinuirane vlažnosti. Kako se temperatura povećavala ili snižavala, odnosno udaljavala od optimalne, za isto vrijeme trajanja vlažnosti sporulacija se smanjivala. Na 25°C je utvrđena vrlo slaba sporulacija, dok na 30°C nije bilo sporulacije. Na najnižoj temperaturi 5°C je bio najduži latentni period gljive na mrtvom listu jagode (6 do 7 dana), a pri temperaturama od 15 do 22°C latentni period je bio samo tri dana. Izmjena vlažnog i suhog perioda (trajanje vlažnog perioda 5,12 i 24 sata) direktno je utjecala na intenzitet sporulacije. Ukupan broj „vlažnih“ sati kao i trajanje

svakog pojedinog vlažnog perioda ima vrlo jak utjecaj na količinu proizvedenog inokuluma na 20°C (Sosa-Alvarez i sur., 1995.).

Ilić i sur. (2012.) su proveli istraživanje u laboratorijskim uvjetima. Ispitivali su patogenost 30 izolata 14 *Fusarium* vrsta koje su izolirali s korova i biljnih ostataka u istočnoj Hrvatskoj. Testove su provodili na klijancima pšenice i kukuruza. Otkrili su da je najpatogenija *Fusarium* vrsta bila *Fusarium graminearum* koju su izolirali s *Amranthus retroflexus, Abutilon theophrasti* i *Chenopodium album*. Primijetili su značajnu varijabilnost u patogenosti za pšenicu i kukuruz između i unutar vrsta. Izolati *Fusarium solani* koji su uzeti s *Sonchus arvensis* i *Fusarium verticillioides* uzetih s *Chenopodium album* su bili vrlo patogeni za pšenicu, dok su za kukuruz bili nepatogeni. Izolati *Fusarium venenatum* u bili patogeni za obje ispitivane vrste, te je to prvo izvješće o patogenosti *Fusarium venenatum*. Provedeno istraživanje je potvrdilo da korovi i biljni ostatci mogu poslužiti kao alternativni domaćini i kao izvor biljnih patogena.

Svitlica i sur. (2011.) su pratili porast i sporulaciju odabranih izolata *Fusarium graminearum, Fusarium verticillioides* i *Fusarium subglutinans*. Porast i sporulacija su praćeni tijekom 15 dana na sedam hranjivih podloga različite pH vrijednosti (4,5, 6,5 i 7,0) i na dva svjetlosna režima (24 sata tama i 12 sati svjetlo / 12 sati tama) na temperaturi 25°C. Od hranjivih supstrata za istraživanje su korištene podloge PDA, vodeni agar (WA), vodeni agar s dodatkom samljevenog zrna pšenice (WA1), vodeni agar s dodatkom samljevenoga zrna kukuruza (WA2), vodeni agar s dijelovima stabljike kukuruza (WA3), agar s lišćem karanfila (CLA), modificirani V-8 juice agar (sok od rajčice s 8 začina zamijenjen je običnim sokom od rajčice bez začina). Na PDA podlozi i u tami svi su izolati formirali najbujniji micelij i imali su najbrži porast. Bez obzira na podlogu najslabija sporulacija je utvrđena kod *Fusarium graminearum*, dok su na svim podlogama dobro sporulirali *Fusarium verticillioides* i *Fusarium subglutinans*. Na pH 4,5 je utvrđen statističko značajno sporiji porast micelija svih ispitivanih vrsta gljiva.

Fernandez i sur. (2014.) su proučavali utjecaj temperature na morfološke karakteristike *Botrytis cinerea* i njegovu povezanost s genetičkim varijacijama. Za potrebe istraživanja prikupljeno je 6 izolata s različitih domaćina koji su izolirani i kategorizirani po nekoliko metoda kao što su rast micelija, otpornost na fungicide, patogenost i utjecaj temperature. Utvrdili su da na temperaturi od 4, 12 i 28°C između izolata postoje jasne morfološke razlike. Svi izolati su analizirani molekularno i klasificirani su kao skupina II. Rezultati

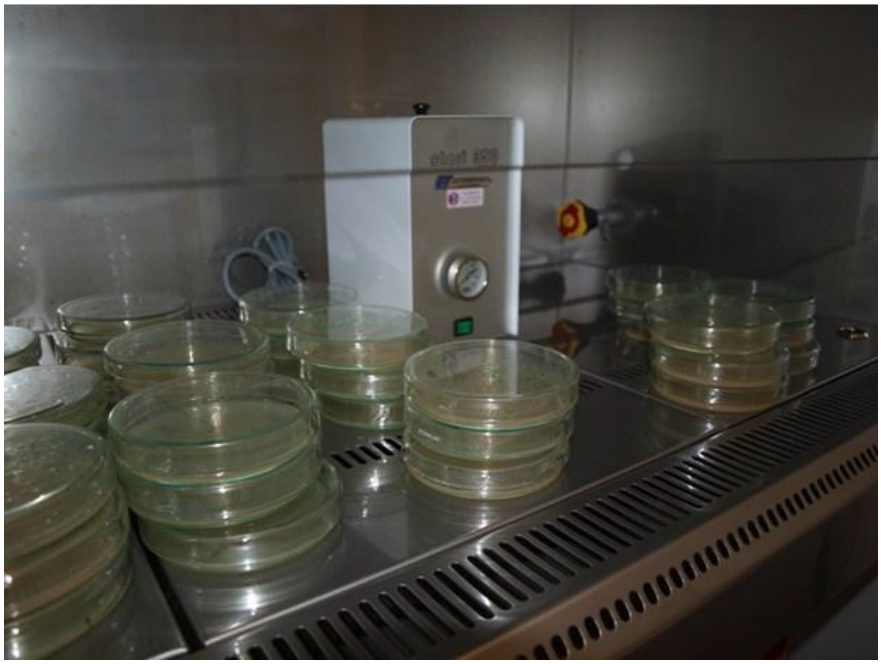
istraživanja su pokazali da su porast micelija, otpornost na fungicide i patogenost neovisni o molekularnim karakteristikama već da značajno ovisne o temperaturi uzgoja.

Siwulski i sur. (2011.) su istraživali utjecaj temperature inkubacije i pH podloge supstrata na rast micelija *Mycogena perniciosa* i *Verticillium fungicola*. Temperature tijekom istraživanja su bile 15, 20, 25 i 30°C, a pH vrijednost 5,5, 6,0, 6,5, 7,0 i 7,5. Utvrđeno je da temperatura i kiselost supstrata značajno utječu na razvoj micelija oba patogena. Rast micelija za oba ispitivana patogena bio je najbrži pri temperaturi 25°C, dok je temperatura 15°C značajno inhibirala rast micelija. *Mycogena perniciosa* je imala najbolji rast pri pH 5,5, dok je *Verticillium fungicola* na istoj pH vrijednosti imala najslabiji rast.

3. Materijali i metode

Pokus je proveden u laboratoriju Katedre za fitopatologiju na Poljoprivrednom fakultetu u Osijeku.

Za izradu pokusa bilo je potrebno 36 Petrijevih zdjelica s pripremljenom hranjivom PDA podlogom čiji je pH 5,5, 6,5 i 8,0, etilni alkohol, razvijena čista kultura gljive *Botrytis cinerea*, plamenik i laboratorijska igla. Nacjepljivanje gljive na PDA podlogu s različitom vrijednostima pH obavljeno je u komori za rad u čistom (Slika 4.). Prvo je uključen laminarij, potom je dezinficiran s 96%-tnim etilnim alkoholom, u njega je poredano 36 Petrijevih zdjelica (za svaku temperaturu inkubacije 12 Petrijevih zdjelica, a za svaku pH vrijednost 4 Petrijeve zdjelice) i jednu Petrijevu zdjelicu s razvijenom kulturom gljive *Botrytis cinerea*. Za nacjepljivanje kulture na hranjivu podlogu bila je potrebna laboratorijska igla koja je dezinficirana alkoholom, nakon toga spaljena na plameniku dok se vrh nije užario, stavljena u laminarij da se malo ohladi i pomoću nje je nacjepljivana gljiva na hranjivu podlogu na sredinu Petrijeve zdjelice. Kada je nacjepljivanje gljive na PDA podlogu završilo, po 4 Petrijeve zdjelice za svaki pH odložene su u termostat komoru na temperature 15, 22 i 30°C. Razvoj gljive na podlogama različite kiselosti i na različitim temperaturama je praćen 3., 7., 10., 14. i 17. dan od nacjepljivanja.



Slika 4. Komora za rad u čistom (foto Ana-Marija Damjanović)

3.1. Priprema hranjivih podloga

Prije pripreme hranjivih podloga potrebno je sterilizirati Petrijeve zdjelice. Zdjelice se umotavaju po 4 komada u novinski papir i stavljaju u autoklav koji omogućuje vlažnu sterilizaciju. Sterilizacija se vrši 20 minuta na temperaturi 120ºC i 1,5 bar. Nakon hlađenja zdjelice se vade i slažu na stol, a zatim se u njih razlijeva pripremljena hranjiva podloga. Priprema svake hranjive podloge se obavlja po receptu, a na kraju pripreme treba podesiti njezinu pH vrijednost. Za potrebe našeg pokusa pH vrijednost je podešena na 8,0, 6,5 i 5,5. Hranjive podloge se do uporabe čuvaju u hladnjaku na 4°C.

3.1.1. PDA podloga

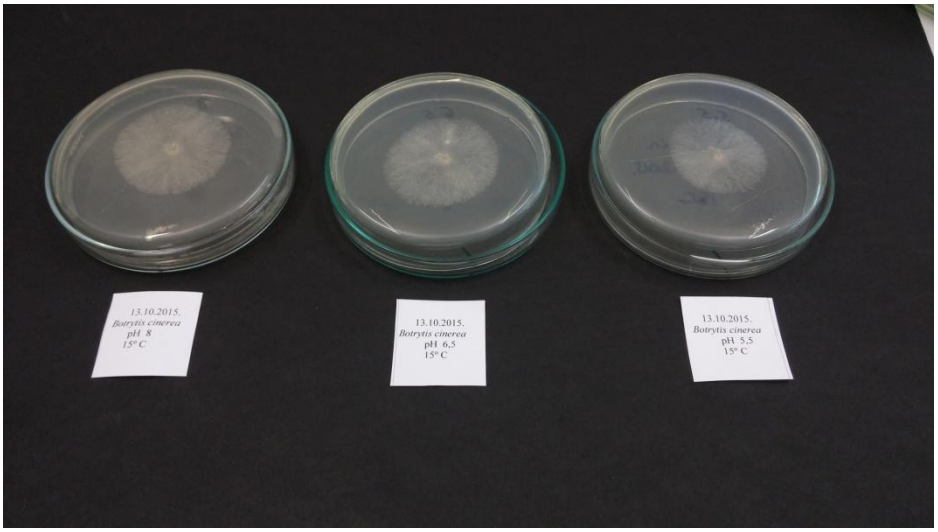
PDA je standardna podloga koja se koristi u laboratoriju. Njezina priprema se obavlja na način da 42 grama gotove podloge s 3 grama čistog agara stavlja u Erlenmeyer tikvicu u kojoj se nalazi 1000 ml destilirane vode. Kako bi se sadržaj dobro otopio podloga se kuha u vodenoj kupelji, a nakon kuhanja se mjeri njezina pH vrijednost. U standardnoj podlozi pH je oko 6,5, a ako pH podloge treba promijeniti dodaje se 0,1 mol NaOH ili 0,1 mol HCl, ovisno o izmjerenoj i željenoj vrijednosti pH. Erlenmeyer tikvica se zatvara aluminijskom folijom ili čepovima od medicinske vate i stavlja u autoklav na temperaturu od 120ºC, a vrijeme potrebno da se izvrši sterilizacija podloge je 20 minuta. Nakon što se podloga rashladi na 60ºC u nju se dodaje antibiotik koji je prethodno razrijeđen u steriliziranoj vodi (Jukić, 2015). Nakon što je podloga pripremljena razlijevamo ju u Petrijeve zdjelice u količini 10 ml.

4. Rezultati

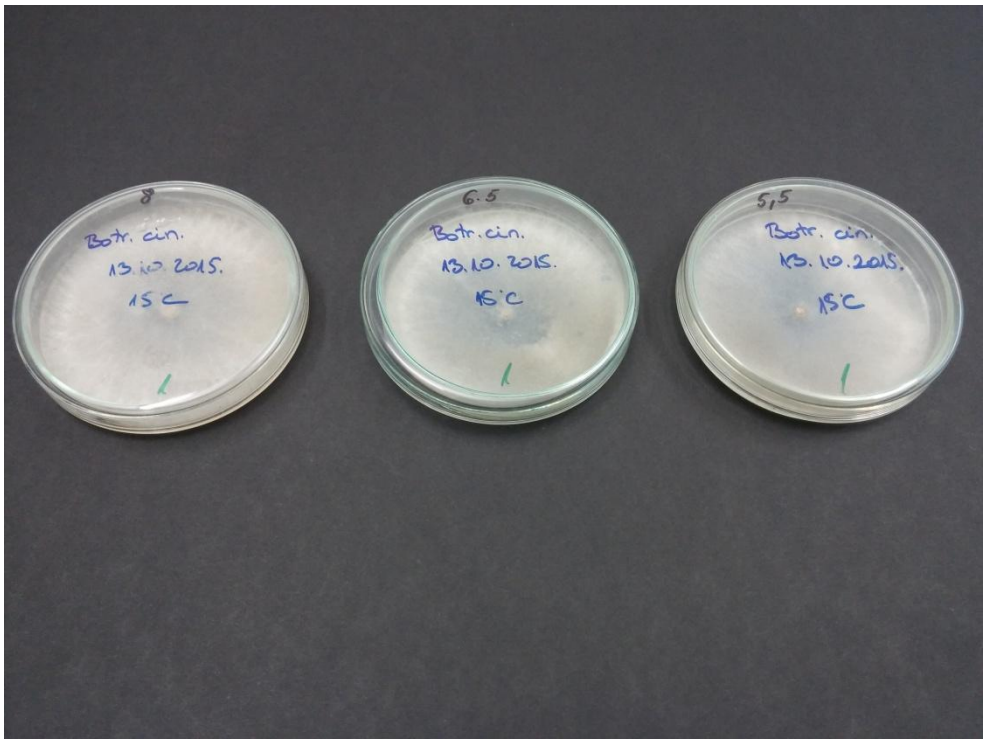
Pri temperaturi 15°C (Tablica 1.) treći dan od nacjepljivanja (slika 5.) promjer micelija gljive je na podlozi čiji je pH bio 5,5 bio 4,22 cm, na podlozi s pH 6,5 4,3 cm te na podlozi s pH 8,0 4,4 cm te između navedenih varijanti pokusa nisu utvrđene statistički značajne razlike. Sedam dana nakon nacjepljivanja (slika 6. i 7.) gljiva je u svim varijantama pokusa prerasla PDA podlogu (bez obzira na pH supstrata).

Tablica 1. Utjecaj pH podloge i temperature 15°C na razvoj gljive *Botrytis cinerea* (cm)

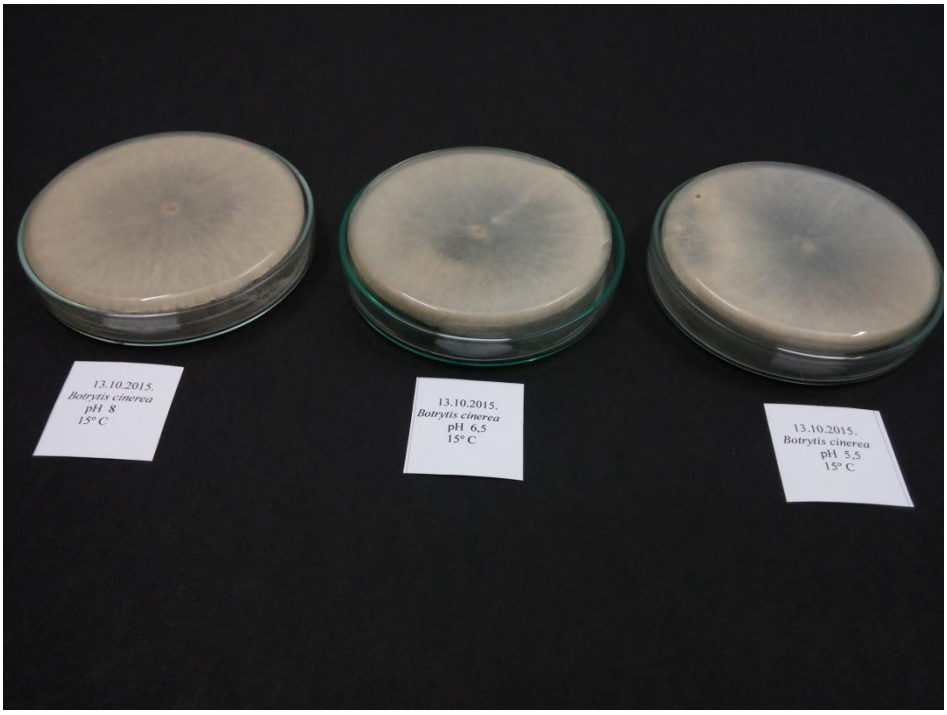
pH	3. DAN					7. DAN				
	PONAVLJANJE					PONAVLJANJE				
	1	2	3	4	$\bar{x}$	1	2	3	4	$\bar{x}$
8,0	4,8	4,1	4,5	4,2	4,4	9,5	9,5	9,5	9,5	9,5
6,5	4,9	4,2	4,2	3,9	4,3	9,5	9,5	9,5	9,5	9,5
5,5	4,0	4,7	4,0	4,2	4,22	9,5	9,5	9,5	9,5	9,5
LSD 0,05 0,01	0,49 0,71									



Slika 5. Utjecaj pH podloge na porast *Botrytis cinerea* pri 15°C (3.dan)
(foto Ana-Marija Damjanović)



Slika 6. Utjecaj pH podloge na porast *Botrytis cinerea* pri 15°C (7.dan)
(foto Ana-Marija Damjanović)

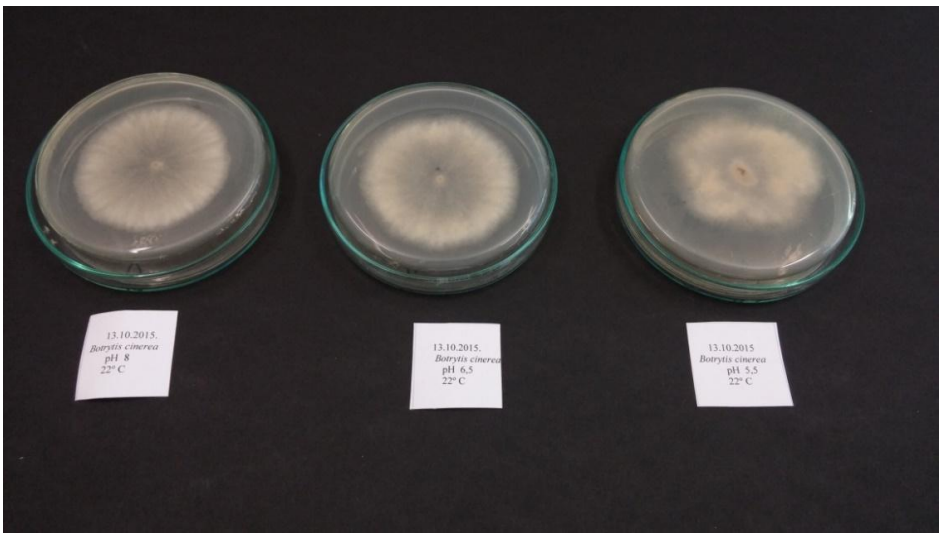


Slika 7. Utjecaj pH podloge na porast *Botrytis cinerea* pri 15°C (7.dan)
(foto Ana-Marija Damjanović)

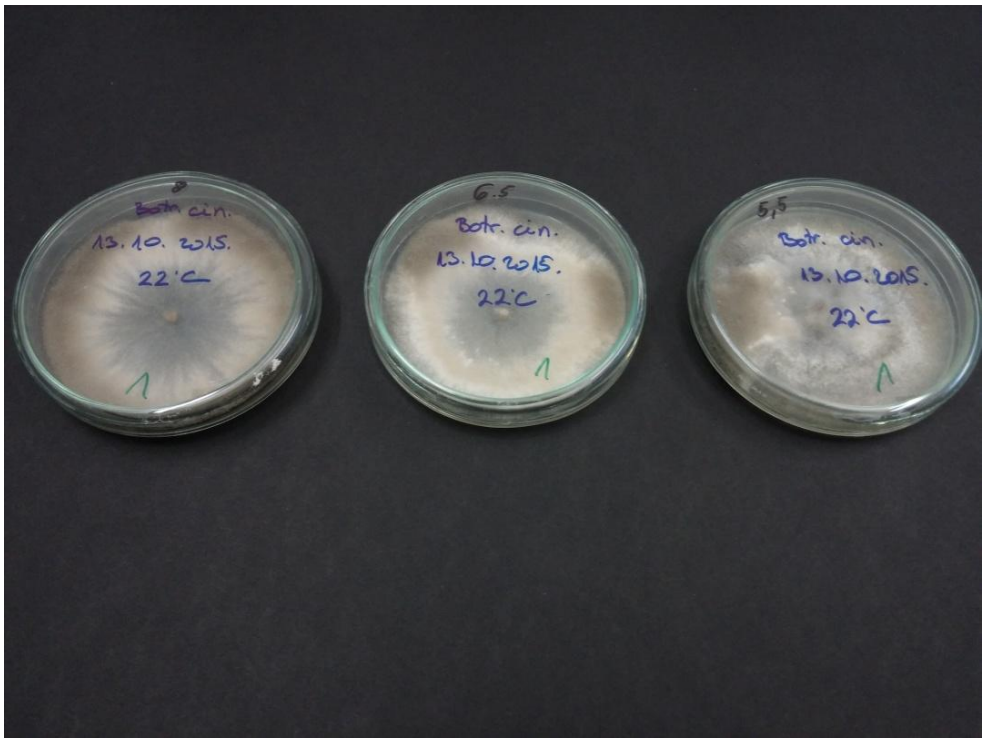
Pri temperaturi 22°C (Tablica 2.) treći dan od nacjepljivanja (slika 8.) gljiva se najbolje razvijala na pH 6,5, a na pH 8,0 razvoj gljive je bio najslabiji. Na pH 5,5 micelij je bio najgušći, dok je na pH 8,0 gustoća micelija bila najslabija. Sedam dana nakon nacjepljivanja (slika 9. i 10.) gljiva je u svim varijantama pokusa ispunila Petrijeve zdjelice. Na podlozi čiji je pH bio 5,5 micelij je i dalje bio najgušći i najtamniji. Iako je gljiva pri temperaturama 15 i 22°C nakon 7 dana prerasla cijelu PDA podlogu, razvoj gljive bio je bolji jer je micelij iz varijante pokusa na 22°C bio gušći i bolje razvijen. Porast micelija na podlozi čiji je pH 6,5 bio je statistički vrlo značajno bolji u odnosu na porast micelija na podlozi s pH 8,0. Između ostalih varijanti u pokusu nije bilo statistički značajnih razlika.

Tablica 2. Utjecaj pH podloge i temperature 22°C na razvoj gljive *Botrytis cinerea* (cm)

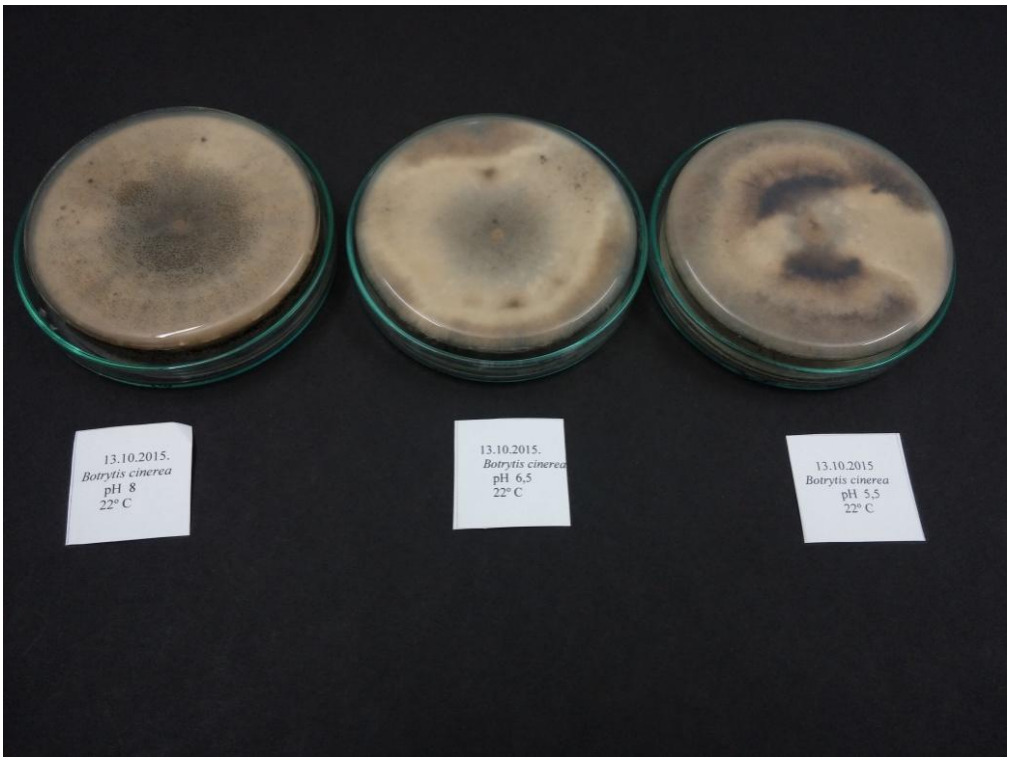
pH	3. DAN					7. DAN				
	PONAVLJANJE					PONAVLJANJE				
	1	2	3	4	$\bar{x}$	1	2	3	4	$\bar{x}$
8,0	6,9	6,8	6,5	6,2	6,6	9,5	9,5	9,5	9,5	9,5
6,5	6,7	7,2	9,0	8,5	7,8	9,5	9,5	9,5	9,5	9,5
5,5	6,6	6,2	7,5	8,5	7,2	9,5	9,5	9,5	9,5	9,5
LSD 0,05 0,01	0,82 1,18									



Slika 8. Utjecaj pH podloge na porast *Botrytis cinerea* pri 22°C (3.dan)
(foto Ana-Marija Damjanović)



Slika 9. Utjecaj pH podloge na porast *Botrytis cinerea* pri 22°C (7.dan)
(foto Ana-Marija Damjanović)

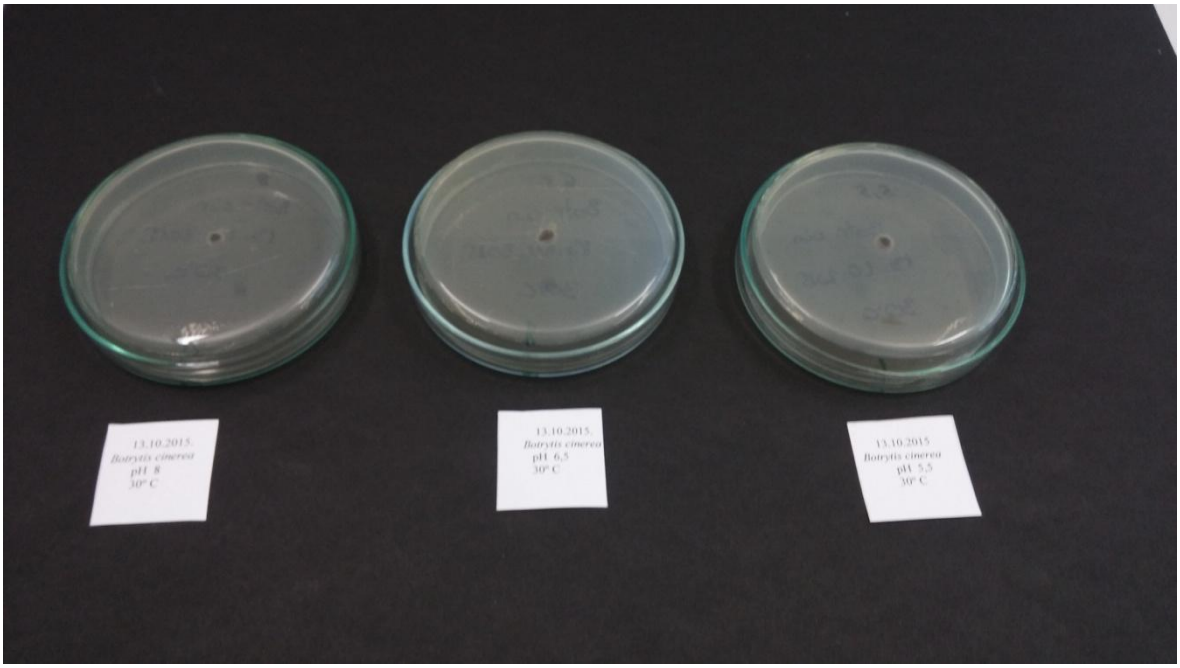


Slika 10. Utjecaj pH podloge na porast *Botrytis cinerea* pri 22°C (7.dan)
(foto Ana-Marija Damjanović)

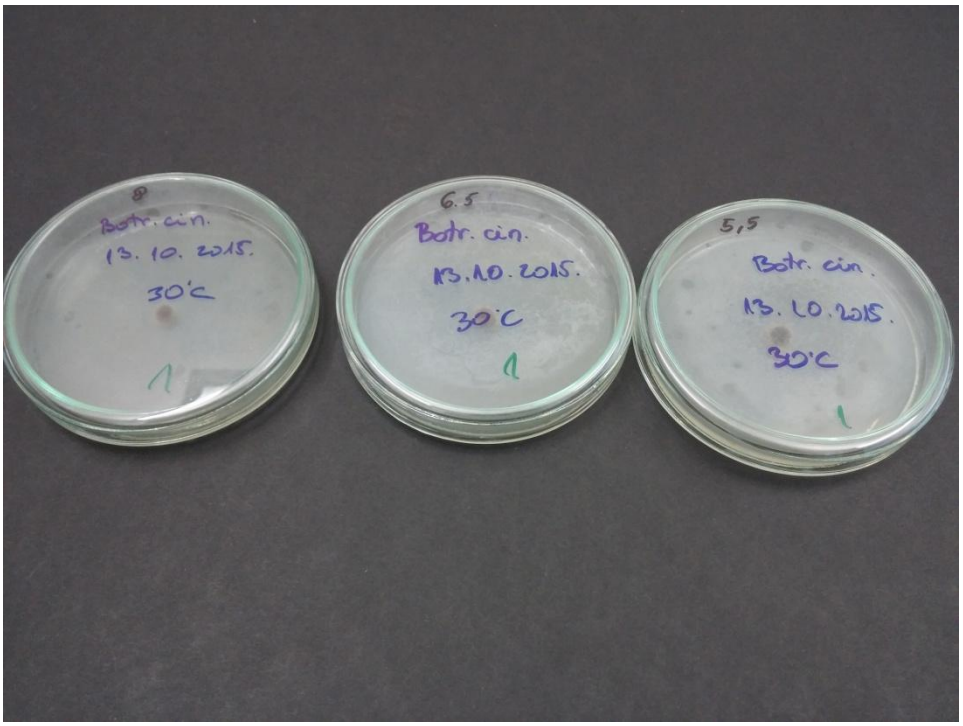
Tablica 3. Utjecaj pH podloge i temperature 30°C na razvoj gljive *Botrytis cinerea* (cm)

pH	3. DAN					7. DAN					10. DAN					14. i 17. DAN				
	PONAVLJANJE					PONAVLJANJE					PONAVLJANJE					PONAVLJANJE				
	1	2	3	4	$\bar{x}$	1	2	3	4	$\bar{x}$	1	2	3	4	$\bar{x}$	1	2	3	4	$\bar{x}$
8,0	0,6	0,6	0,6	0,6	0,60	1,0	1,5	1,0	1,0	0,87	1,0	1,5	1,0	1,6	1,27	1,0	1,5	1,0	1,6	1,27
6,5	0,8	0,8	0,6	0,7	0,72	1,1	1,4	1,4	1,1	1,25	1,4	1,6	1,4	1,4	1,45	1,7	1,6	1,4	1,4	1,52
5,5	0,6	0,8	0,8	0,6	0,70	1,5	1,5	1,2	1,0	1,30	1,5	1,6	1,2	1,0	1,32	1,5	1,6	1,2	1,0	1,32
LSD 0,05 0,01	0,14 0,20					0,22 0,32					0,17 0,25					0,20 0,29				

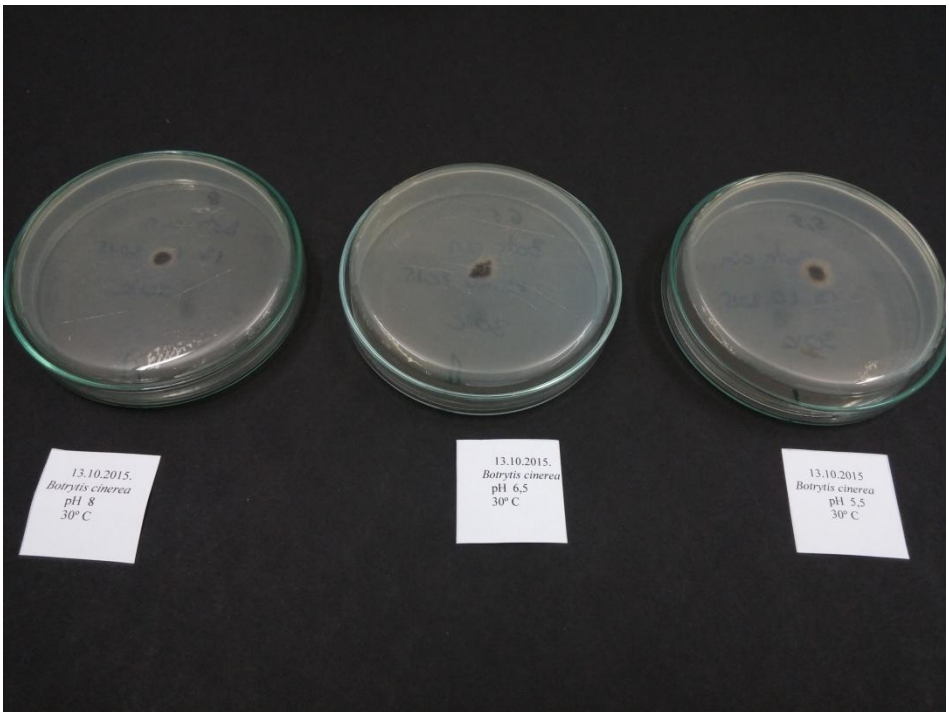
Pri temperaturi 30°C (Tablica 3.) gljiva je imala značajno slabiji razvoj u odnosu na razvoj na temperaturama 15 i 22°C. Nakon 3 dana (slika 11.) od nacjepljivanja gljiva je najbolji razvoj imala na pH 6,5. Sedamnaestog dana od nacjepljivanja razvoj gljive na podlozi s pH 6,5 bio je statistički značajno bolji u odnosu na razvoj gljive na podlozi čiji je pH 8,0. Na slikama 12. i 13. prikazan je razvoj gljive 7. dan od nacjepljivanja, na slikama 14 i 15 deseti dan od nacjepljivanja, na slikama 16 i 17 četrnaesti dan od nacjepljivanja, a na slikama 18 i 19 sedamnaesti dan od nacjepljivanja.



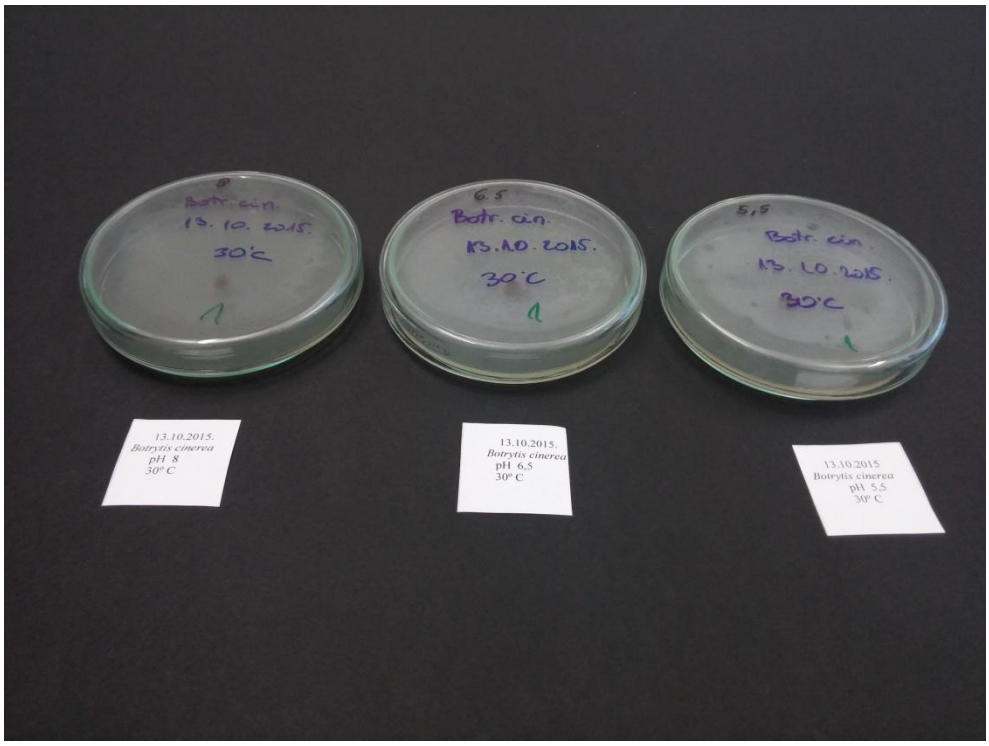
Slika 11. Utjecaj pH podloge na porast *Botrytis cinerea* pri 30°C (3.dan)
(foto Ana-Marija Damjanović)



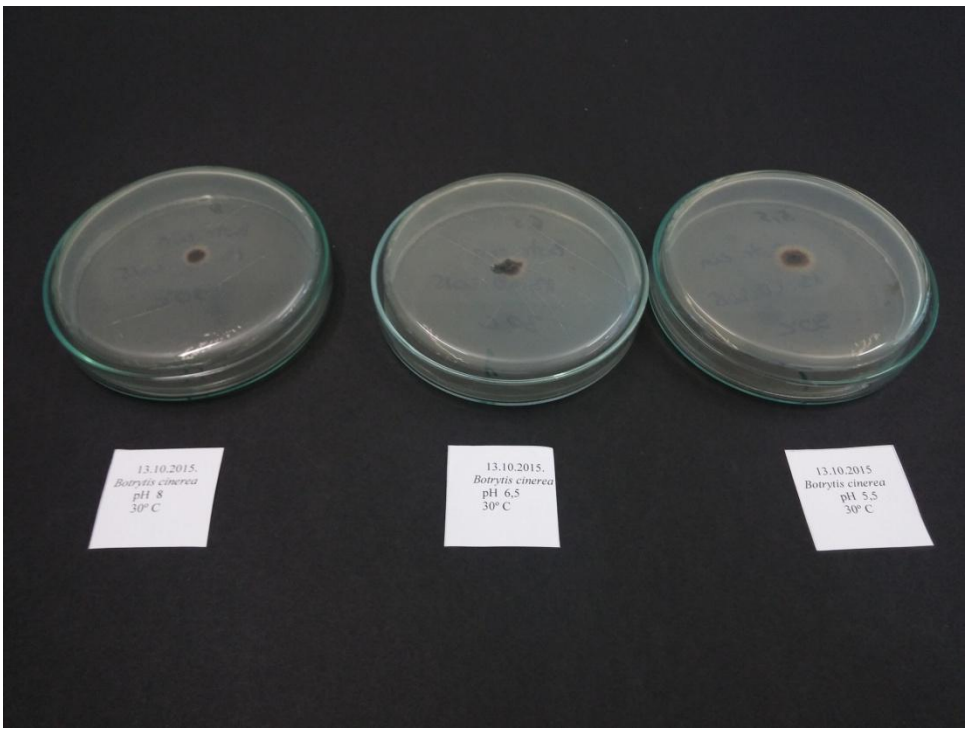
Slika 12. Utjecaj pH podloge na porast *Botrytis cinerea* pri 30°C (7.dan) (foto Ana-Marija Damjanović)



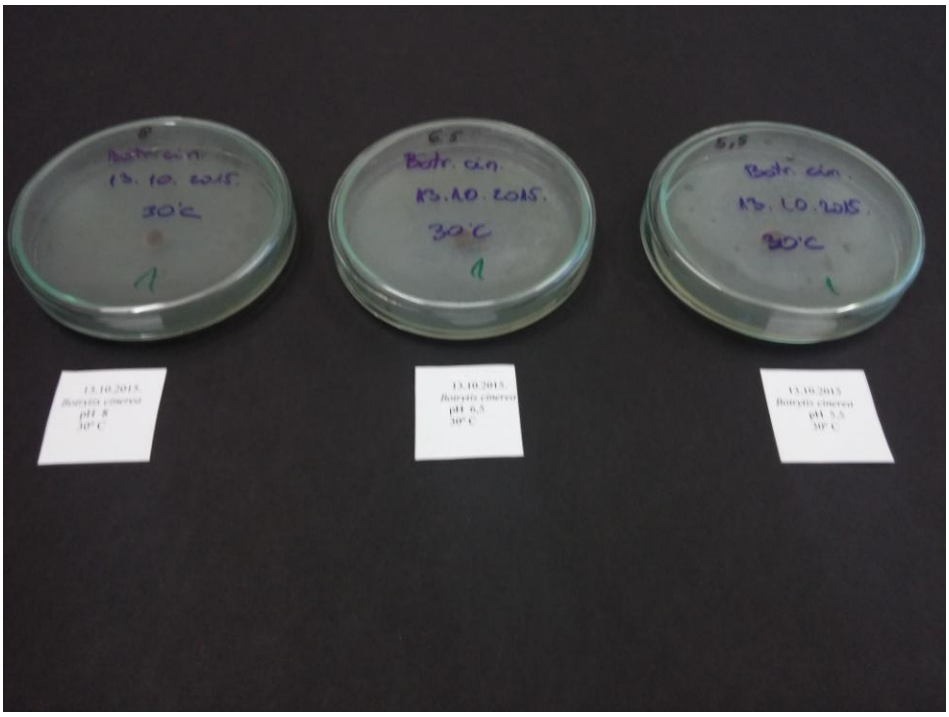
Slika 13. Utjecaj pH podloge na porast *Botrytis cinerea* pri 30°C (7.dan) (foto Ana-Marija Damjanović)



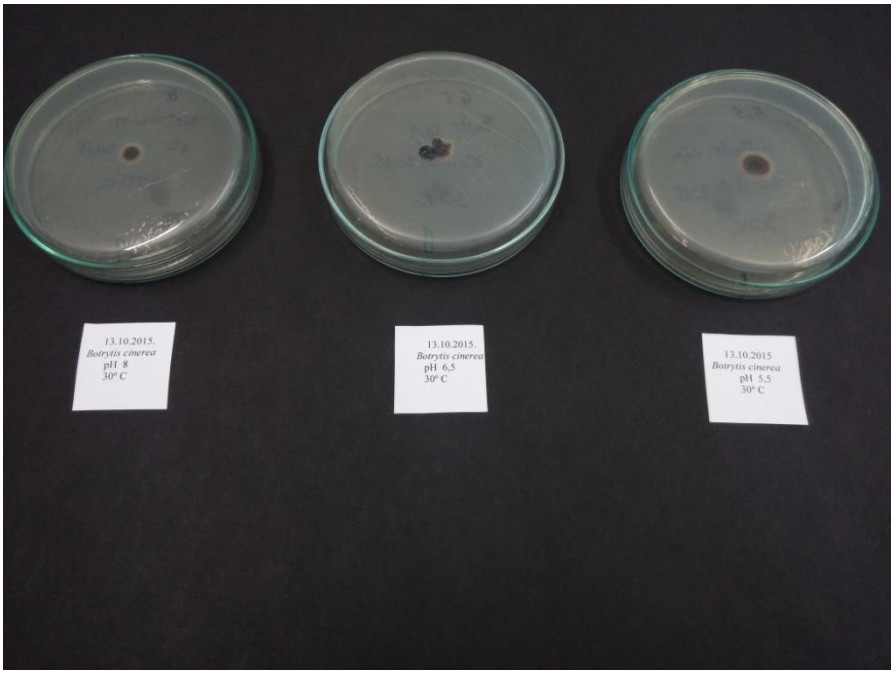
Slika 14. Utjecaj pH podloge na porast *Botrytis cinerea* pri 30°C (10.dan)
(foto Ana-Marija Damjanović)



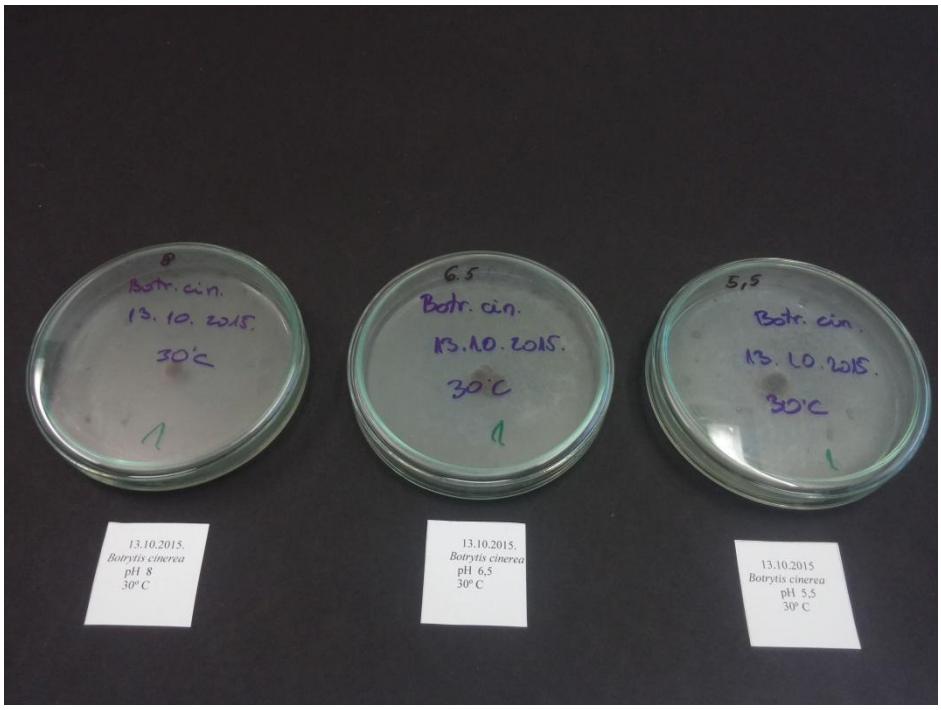
Slika 15. Utjecaj pH podloge na porast *Botrytis cinerea* pri 30°C (10.dan)
(foto Ana-Marija Damjanović)



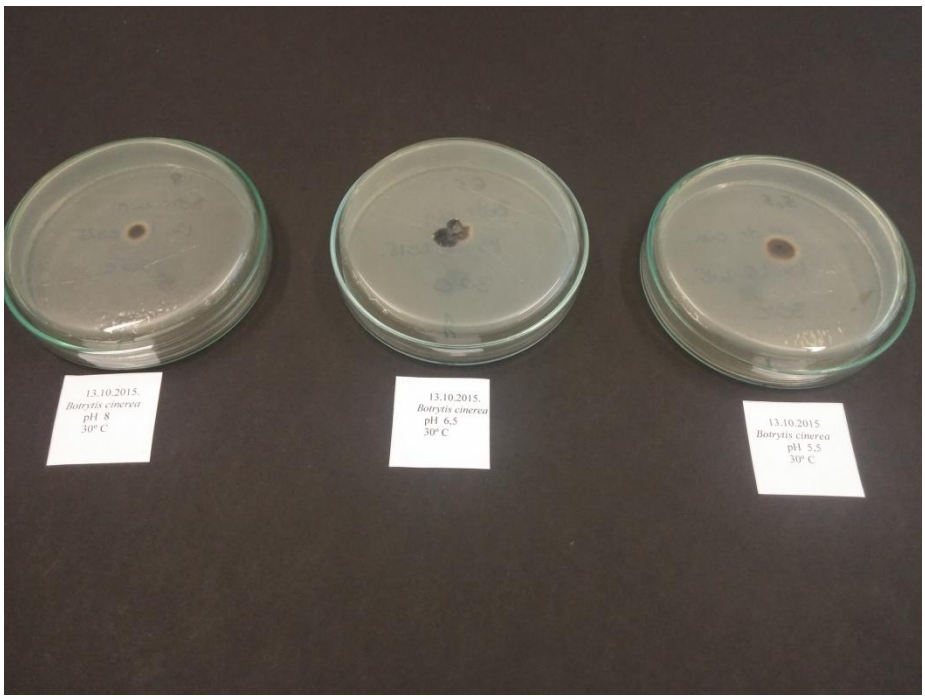
Slika 16. Utjecaj pH podloge na porast *Botrytis cinerea* pri 30°C (14.dan)
(foto Ana-Marija Damjanović)



Slika 17. Utjecaj pH podloge na porast *Botrytis cinerea* pri 30°C (14.dan)
(foto Ana-Marija Damjanović)



Slika 18. Utjecaj pH podloge na porast *Botrytis cinerea* pri 30°C (17.dan)
(foto Ana-Marija Damjanović)



Slika 19. Utjecaj pH podloge na porast *Botrytis cinerea* pri 30°C (17.dan)
(foto Ana-Marija Damjanović)

5. Rasprava

Gljiva *Botrytis cinerea* pripada najznačajnijim uzročnicima biljnih bolesti, a u povoljnim uvjetima za razvoj gljive gubitci prinosa mogu biti veći i od 50%. Bolest je poznata pod nazivom siva plijesan.

Na razvoj gljive vrlo značajan utjecaj imaju okolinski čimbenici. Ekološki uvjeti pogodni za rast gljive su temperature 2 i 35°C i vrlo visoka vlaga zraka, dok su optimalne temperature za rast i razvoj micelija između 20 i 22°C. Za klijanje konidija optimalni pH je između 3,0 i 7,0, dok micelij može rasti na pH od 2,0 do 8,5 (Webb, 1919.).

Konidije gljive mogu klijati u tami, ali je klijavost u tim uvjetima vrlo slaba. Crveno svjetlo i spektar blizu ultraljubičastog svjetla (280-380 nm) inhibira klijanje konidija, dok kontinuirano ultraljubičasto svjetlo inhibira sporulaciju (Jarvis, 1977., Nicot i sur., 1996.).

Rezultati naših istraživanja u skladu su s podatcima iz literature. Gljiva se na temperaturama 15 i 22°C razvijala statistički vrlo značajno bolje u odnosu na porast gljive na 30°C. Na temperaturi 30°C razvoj gljive na pH 6,5 bio je statistički vrlo značajno bolji u odnosu na porast micelija na pH 8,0. Na temperaturama 15 i 22°C gljiva se jednako dobro razvijala na u svim varijantama pokusa bez obzira na kiselost podloge.

6. Zaključak

Temeljem istraživanja o utjecaju temperature i pH supstrata na porast micelija gljive *Botrytis cinerea* koja su provedena u Laboratoriju za fitopatologiju Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku može se zaključiti:

- Gljiva se razvijala statistički vrlo značajno bolje na temperaturama 15 i 22°C u odnosu na porast gljive na 30°C. Na temperaturama 15 i 22°C micelij je već sedam dana od nacjepljivanja ispunio Petrijevu zdjelicu bez obzira na pH podloge. Na 30°C i nakon četrnaest dana od nacjepljivanja promjer micelija je bio manji od 2 cm bez obzira na kiselost podloge.
- Na temperaturi 30°C razvoj *Botrytis cinerea* na pH 6,5 bio je statistički vrlo značajno bolji u odnosu na porast micelija na pH 8,0.
- Na temperaturama 15 i 22°C gljiva se jednako dobro razvijala na u svim varijantama pokusa bez obzira na kiselost podloge.

7. Popis literature

1. Ainsworth, G. C., (1971.): Dictionary of the Fungi. Commonwealth Mycologicl Institute, Kew, Surrey, UK.
2. Brown, W. (1915.): Studies int he physiology of parasitism. X. On the entrance of parasitic fungi in vito the host plant. Ann. Bot. 41:643-662.
3. Brown, W., Harvey, C. C. (1927.): Studies int he physology of parasitism. X. On the entrance of parasitic fungi i the host plant. Ann. Bot. 41:643-662.
4. Cvjetković, B. (2010.): Mikoze i pseudomikoze voćaka i vinove loze, Zrinski d.d., Čakovec.
5. Fernandez, J. G., Ferbabdez-Baldo, A. M., Sansone, G., Calvente, V., Benuzzi, D., Salinas, E., Raba, J., Sanz, M. I. (2014.): Effect of temperature on the morphological characteristics of Botrytis cinerea and its correlated with the genetic variability. Journal of Coastal Life Medicine 2014; 2(7): 543-548.
6. Ilić, J., Ćosić, J., Jurković, D., Vrandečić, K. (2012.): Pathogenicity of *Fusarium spp*. isolated from weeds and plant debris in eastern Croatia to wheat and maize. Poljoprivreda 18(2):7-11.
7. Ilieva, E. (1970.): Some biological studies on *Botrytis cinerea*, the casual agent of grey mould of glasshouse tomatoes. Gradinar Losar. Nauka 7:73-81.
8. Jarvis, W. R. (1977.): Botryotinia and Botrytis species, taxonomy, physiology and pathogenicity. Research Branch, Cnada Department od Agriculture Monogrph No. 15. Pp. 195.
9. Jukić, A. (2015): Utjecaj hranjive podlog i temperature na razvoj gljive *Chalara elegans*, Diplomski rad, Poljoprivredni fakultet Osijek.
10. Kim, Y. K., Xiao, C. L., Rogers, J. D. (2005.): Influence of culture media and environmental factors on mycelial growth and pycnidial production of *Sphaeropsis pyriputrescens*. Mycologia 97:25-32.
11. Lorenz, D. H., Eichorn, K. W., (1983.): Untersuchungen an *B. fuckeliana* Whetz., dem Perfekt stadium von *B. cinerea* Pers. in *Vitis vinifera*, Phytopathology, 63(9):1151-1157.
12. McKeen, W. E. (1974.): Mode of penetration of epiderml allwalls od *Vicia faba* by *Botrytis cinere*a. Phytopthology. 64: 455.
13. Mikić, I., Radan, Z., Ćosić, J., Vrandečić, K. (2014.): Utjecaj hranjive podloge i temperature na razvoj Sclerotinia sclerotiorum. Poljoprivreda, 20(2):8-11.

14. Mlikota, F. (2001.): Alternativne metode suzbijanja sive plijesni (*Botrytis cinerea* Pers. Ex. Fr.) pri skladištenju stolnog grožđa. Disertacija. Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
15. Nicot, P. C., Mermier, M., Vaissiere, B. E., Lagier, J. (1996.): Diferential spore production by Botrytis cinerea on agar medium and plant tissue under near-ultraviolet light-absorbing polyethylene film. Plant Diease. 80(5): 555-558.
16. Paddy, S. M., Kelly, C. D. (1954.): Aerobiological studies of fungi and bacteria over the Atlantic Ocean; Can. J. Bot., 32:202-212.
17. Radman, Lj. (1978.): Bolesti ratarskih kultura. Sarajevo.
18. Richards, M. (1956.): A census of mould spores int he air over Britain in 1952; Trans. Br. Mycolo. Soc., 39:431-441.
19. Singh, B. (1940.): The Effect of growth substances on spore germintion, growth and sporulation of certin fungi. Doctoral Thesis, University of London.
20. Siwulski, M., Sobieralski, K., Gorski, R., Lisiecka, J., Sas-Golak, I. (2011.): Temperature and pH impact on the mycelium growth of *Mycogene perniciosa* and *Verticillium fungicola* isolates derived from polish and foreign mushroom growing houses. Journal of plant protection research, 51(3).
21. Sosa-Alvarez, M., Madden, L. V., Ellis, M. A. (1995.): Effects of Temperature and Wetness Duration on Sporulation of Botrytis cinerea on Strawberry Leaf Residues. Plant Disease, 7(96):609-615.
22. Svitlica, B., Ćosić, J., Šimić, B., Vrandečić, K., Bunjevac, I., Božić, M. (2011.): Utjecaj uvjeta uzgoja na porast i sporulaciju Fusarium vrsta. Poljoprivreda, 17(1):42-51.
23. Topolovec-Pintarić, S. (2000.): Urođena i stečena otpornost *Botrytis cinerea* Pers. ex Fr. na botriticide u vinogradima i suodnos rezistentnih patotipova. Doktorska disertacija. Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
24. Webb, R. W. (1919.): Studies in the physiology of the fungi. Germination of the spores of centrain fungi in relation to hydrogen ion concentration. Ann. Mo. Bot. Gard. 6:201-222.
25. Williamson, B. G., Duncan, G. H., Harrison J. G., Harding, L. A., Zimand, G. (1994.): Grey mould (*Botrytis cinerea*) of roses. Schottish Crop Research Institute Annual Report 1993:91-93.

26. Xiao, C. L., Kim, Y. K., Boal, R. J. (2011.): Control of Sphaeropsis rot in stored apple fruit caused by *Sphaeropsis pyriputrescens* with postharvest fungicides. Plant Dis. 95:1075-1079.

8. Sažetak

U radu je istraživan utjecaj različitih temperatura (15, 22, 30°C) i tri različite pH vrijednosti PDA podloge (5,5, 6,5 i 7,5) na razvoj gljive *Botrytis cinerea* koja je uzročnik sive plijesni. Gljiva se razvijala statistički vrlo značajno bolje na temperaturama 15 i 22°C u odnosu na porast gljive na 30°C. Na temperaturama 15 i 22°C micelij je već sedam dana od nacjepljivanja ispunio Petrijevu zdjelicu bez obzira na pH podloge. Na 30°C i nakon četrnaest dana od nacjepljivanja promjer micelija je bio manji od 2 cm bez obzira na kiselost podloge. Na temperaturi 30°C razvoj *Botrytis cinerea* na pH 6,5 bio je statistički vrlo značajno bolji u odnosu na porast micelija na pH 8,0. Na temperaturama 15 i 22°C gljiva se jednako dobro razvijala na u svim varijantama pokusa bez obzira na kiselost podloge.

Ključne riječi: pH hranjive podloge, temperatura, *Botrytis cinerea*.

9. Summary

In this thesis we investigated the effect of different temperatures (15, 22, 30°C) and three different pH values (5.5, 6.5 and 7.5) on the development of the fungus *Botrytis cinerea*. The fungus developed statistically significantly better at 15 and 22°C in relation to the growth of the fungus at 30° C. At 15 and 22°C seven days from inoculation the mycelium filled Petri dishes (regardless of the pH value of the substrate). After fourteen days from the inoculation at 30°C mycelium diameter was less than 2 cm regardless of the pH value of the substrate. The development of *Botrytis cinerea* at 30°C and at pH 6.5 was statistically significantly better in comparison to the growth of mycelium at pH 8.0. At 15 and 22°C fungi are equally well developed on the all treatments regardless of the acidity of the substrate.

Key words: pH of the nutrition media , temperature, *Botrytis cinerea*.

10. Popis tablica

Tablica 1. Utjecaj pH podloge i temperature 15°C na razvoj gljive *Botrytis cinerea* (cm) (str. 11)

Tablica 2. Utjecaj pH podloge i temperature 22°C na razvoj gljive *Botrytis cinerea* (cm) (str. 13)

Tablica 3. Utjecaj pH podloge i temperature 30°C na razvoj gljive *Botrytis cinerea* (cm) (str. 15)

11. Popis slika

Slika 1. *Botrytis cinerea* na jagodi (Katedra za fitopatologiju) (str. 4)

Slika 2. *Botrytis cinerea* na bobama vinove loze (izvor: http://www.znanjenapoklon.rs/pub/article/14065403767605_botritis.jpg) (str. 4)

Slika 3. Konidiofori i konidije *Botrytis cinerea* (Katedra za fitopatologiju) str. (5)

Slika 4. Komora za rad u čistom (foto Ana-Marija Damjanović) (str. 9)

Slika 5. Utjecaj pH podloge na porast *Botrytis cinerea* pri 15°C (3.dan) (foto Ana-Marija Damjanović) (str. 11)

Slika 6. Utjecaj pH podloge na porast *Botrytis cinerea* pri 15°C (7.dan) (foto Ana-Marija Damjanović) (str. 12)

Slika 7. Utjecaj pH podloge na porast *Botrytis cinerea* pri 15°C (7.dan) (foto Ana-Marija Damjanović) (str. 12)

Slika 8. Utjecaj pH podloge na porast *Botrytis cinerea* pri 22°C (3.dan) (foto Ana-Marija Damjanović) (str. 13)

Slika 9. Utjecaj pH podloge na porast *Botrytis cinerea* pri 22°C (7.dan) (foto Ana-Marija Damjanović) (str. 14)

Slika 10. Utjecaj pH podloge na porast *Botrytis cinerea* pri 22°C (7.dan) (foto Ana-Marija Damjanović) (str. 14)

Slika 11. Utjecaj pH podloge na porast *Botrytis cinerea* pri 30°C (3.dan) (foto Ana-Marija Damjanović) (str. 16)

Slika 12. Utjecaj pH podloge na porast *Botrytis cinerea* pri 30°C (7.dan) (foto Ana-Marija Damjanović) (str. 17)

Slika 13. Utjecaj pH podloge na porast *Botrytis cinerea* pri 30°C (7.dan) (foto Ana-Marija Damjanović) (str. 17)

Slika 14. Utjecaj pH podloge na porast *Botrytis cinerea* pri 30°C (10.dan) (foto Ana-Marija Damjanović) (str. 18)

Slika 15. Utjecaj pH podloge na porast *Botrytis cinerea* pri 30°C (10.dan) (foto Ana-Marija Damjanović) (str. 18)

Slika 16. Utjecaj pH podloge na porast *Botrytis cinerea* pri 30°C (14.dan) (foto Ana-Marija Damjanović) (str. 19)

Slika 17. Utjecaj pH podloge na porast *Botrytis cinerea* pri 30°C (14.dan) (foto Ana-Marija Damjanović) (str. 19)

Slika 18. Utjecaj pH podloge na porast *Botrytis cinerea* pri 30°C (17.dan) (foto Ana-Marija Damjanović) (str. 20)
Slika 19. Utjecaj pH podloge na porast *Botrytis cinerea* pri 30°C (17.dan) (foto Ana-Marija Damjanović) (str. 20)

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku **Diplomski rad**
Poljoprivredni fakultet u Osijeku
Sveučilišni diplomski studij, smjer Zaštita bilja

UTJECAJ TEMPERATURE I pH PODLOGE NA RAST GLJIVE *BOTRYTIS CINEREA*

Ana-Marija Damjanović

U radu je istraživan utjecaj različitih temperatura (15, 22, 30°C) i tri različite pH vrijednosti PDA podloge (5,5, 6,5 i 7,5) na razvoj gljive *Botrytis cinerea* koja je uzročnik sive plijesni. Gljiva se razvijala statistički vrlo značajno bolje na temperaturama 15 i 22°C u odnosu na porast gljive na 30°C. Na temperaturama 15 i 22°C micelij je već sedam dana od nacjepljivanja ispunio Petrijevu zdjelicu bez obzira na pH podloge. Na 30°C i nakon četrnaest dana od nacjepljivanja promjer micelija je bio manji od 2 cm bez obzira na kiselost podloge. Na temperaturi 30°C razvoj *Botrytis cinerea* na pH 6,5 bio je statistički vrlo značajno bolji u odnosu na porast micelija na pH 8,0. Na temperaturama 15 i 22°C gljiva se jednako dobro razvijala na u svim varijantama pokusa bez obzira na kiselost podloge.

Rad je izrađen pri: Poljoprivredni fakultet u Osijeku

Mentor: Prof. dr. sc. Jasenka Ćosić

Broj stranica: 30
Broj grafikona i slika: 19
Broj literaturnih navoda: 26
Broj priloga: 0
Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: pH hranjive podloge, temperatura, *Botrytis cinerea*

Datum obrane:

Stručno povjerenstvo za obranu rada:

1. izv.prof.dr. Karolina Vrandečić, predsjednik
2. prof.dr.sc. Jasenka Ćosić, mentor
3. prof.dr.sc. Nada Parađiković, član

Rad je pohranjen: Knjižnica Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku**,** Sveučilištu u Osijeku, Kralja Petra Svačića 1d.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek **Graduate thesis**
Faculty of Agriculture
University Graduate Studies, Plant production, course Plant Protection

INFLUENCE OF TEMPERATURE AND pH OF NUTRITION MEDIA ON GROWTH OF *BOTRYTIS CINEREA*

Ana-Marija Damjanović

In this thesis we investigated the effect of different temperatures (15, 22, 30°C) and three different pH values (5.5, 6.5 and 7.5) on the development of the fungus *Botrytis cinerea*. The fungus developed statistically significantly better at 15 and 22°C in relation to the growth of the fungus at 30° C. At 15 and 22°C seven days from inoculation the mycelium filled Petri dishes (regardless of the pH value of the substrate). After fourteen days from the inoculation at 30°C mycelium diameter was less than 2 cm regardless of the pH value of the substrate. The development of *Botrytis cinerea* at 30°C and at pH 6.5 was statistically significantly better in comparison to the growth of mycelium at pH 8.0. At 15 and 22°C fungi are equally well developed on the all treatments regardless of the acidity of the substrate.

Thesis performed at: Faculty of Agriculture in Osijek

Mentor: prof. dr. sc. Jasenka Ćosić

Number of pages: 30
Number of figures: 19
Number of tables: 3
Number of references: 26
Number of appendices: 0
Original in: Croatian

Key words: pH of the nutrition media, temperature, *Botrytis cinerea*

Thesis defended on date:

Reviewers:

1. izv.prof.dr. Karolina Vrandečić,
2. prof.dr.sc. Jasenka Ćosić,
3. prof.dr.sc. Nada Parađiković,

Thesis deposited at: Library, Faculty of Agriculture in Osijek, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Kralja Petra Svačića 1d.