

# Višejedarna *Rhizoctonia* sp. – patogen hrizanteme

Ivana Vico, Branka Krstić, Aleksandra Bulajić i Nataša Dukić

Poljoprivredni fakultet, Beograd-Zemun

## REZIME

Na saksijским biljkama hrizanteme (*Chrysanthemum Indicum* Groep, sin. *Chr. x grandiflorum*) sa lokaliteta Mala Pruga, Zemun Polje, uočeni su simptomi u vidu sužavanja i nekroze stabljika, sušenja pupoljaka, cvetova i listova. Nekrotični proces započeo je na mestima gde su stabljike sečene u cilju provociranja obimnog cvetanja biljaka. Odatle, nekroza se širila da bi posle tri nedelje od pojave prvih simptoma zahvatila čitavu biljku.

Iz obolelih stabljika izolovana je gljiva čija je patogenost potvrđena veštačkim inokulacijama zdravih stabljika hrizanteme. Na osnovu morfoloških (makroskopskih i mikroskopskih) i bioloških odlika, fitopatogena gljiva, prouzrokovač nekroze hrizanteme, identifikovana je kao višejedarna *Rhizoctonia* sp. (*Rhizoctonia solani*).

**Ključne reči:** Višejedarna *Rhizoctonia* sp.; hrizantema; *Rhizoctonia solani*

## UVOD

Gljive koje pripadaju rodu *Rhizoctonia* DC. ex Fr. predstavljaju raznolik, kompleksnu i širom sveta rasprostranjenu grupu koja obuhvata, kako saprobne i mikorizne, tako i fitopatogene vrste. One su česti prouzrokovači bolesti različitih biljaka medju kojima i cveća. Dve osnovne grupe čine rod *Rhizoctonia*; dvojedarne vrste, čije ćelije sadrže najčešće dva jedra i višejedarne vrste, čije ćelije sadrže više od dva jedra (Parmeter i Whitney, 1970; Yokoyama i Ogoshi, 1988; Sneh i sar., 1991).

*Rhizoctonia* spp. zaražavaju značajne vrste cveća i ukrasnih drvenastih biljaka. Promene koje izazivaju najčešće se uočavaju na prizemnom delu stabla i korenu, ali se simptomi mogu javiti i na lišću i cvetovima. Razvoju bolesti naročito pogoduje

gajenje biljaka u gustom sklopu u uslovima povećane vlažnosti, kada uvelost i nekroza vode potpunom uginuću biljaka. Tada za samo nekoliko dana od pojave prvih simptoma mogu propasti čitavi redovi zaraženih biljaka (Kackley-Dutt i Gould, 1996; Raabe i McCain, 2002). Pošto se gljive iz roda *Rhizoctonia* održavaju u zemljištu, vrlo je česta pojava i propadanja klijanaca kod vrsta koje se proizvode iz semena kao što su zimzelen (*Vinca* sp.), lepi čovek (*Impatiens* sp.) i zevalica (*Antirrhinum* sp.). Kod zaraženih biljaka, osim uobičajene nekroze i truleži korena i krune, javlja se i nekroza stabla i sušenje lišća i cvetova. Tako se na azaleji (*Rhododendron* sp.), begoniji (*Begonia* sp.), lepom čoveku (*Impatiens* sp.), ruži (*Rosa* sp.) i zimzelenu (*Vinca* sp.), javljaju i nekroza stabla i trulež korena, kao posledica infekcije gljivama iz

roda *Rhizoctonia*. Na biljkama magnolije (*Magnolia* sp.), oleandera (*Nerium* sp.) ili filodendrona (*Philodendron* sp.) dolazi do nekroze listova. Na biljkama hrizanteme (*Chrysanthemum* sp.) gljive iz roda *Rhizoctonia* najčešće prouzrokuju nekrozu osnove stabljike, trulež korena i zakržljavanje, ali i sušenje listova i nekrozu čitavih biljaka (Kackley-Dutt i Gould, 1996; Horst i Nelson, 1997; Chase, 1998; Raabe i McCain, 2002).

U toku 2004. godine na lokalitetu Mala Pruga, Zemun Polje, proizvođači cveća uočili su sušenje i propadanje saksijskih biljaka hrizanteme (*Chrysanthemum Indicum* Groep, sin. *Chr. x grandiflorum*). Na zaraženim biljkama javila se nekroza koja je zahvatala stabljike, cvetove i listove. Opisane promene na hrizantemi mogu izazivati pripadnici obe grupe – i višejedarne i dvojedarne *Rhizoctonia* spp. Zbog sličnosti u simptomima koje izazivaju, a razlika u osobinama samih gljiva prouzrokovaca, u cilju ranog uključivanja odgovarajućih mera zaštite i sprečavanja i predviđanja budućih pojava bolesti, bila je neophodna pravilna identifikacija prouzrokovaca.

## MATERIJAL I METODE

### Izolacija

Iz stabljika hrizanteme sa simptomima nekroze obavljena je izolacija na krompir dektroznu podlogu (KDA) uobičajenim postupkom. Nakon prethodne sterilizacije (jedan minut, 2% rastvor natrijum-hipohlorita - NaOCl) iseći stabljika dužine do 10mm uranjeni su ili postavljeni na KDA podlogu. Inkubacija je obavljena na 23°C u mraku. Nakon razvoja kolonija oko isečaka fragmenti su preneti na KDA, a potom i na vodeni agar (VA) odakle su isecanjem vrhova hifa dobijene kulture vrha hifa.

### Provera patogenosti izolata

Kod dobijenih izolata patogenost je proveravana po metodi D'Ercole (1991). Iseći stabljika sa zdrave biljke hrizanteme dužine 20 mm su, nakon sterilizacije u 2% rastvoru natrijum-hipohlorita (NaOCl) u trajanju od jednog minuta, pobadani, uspravno, u kulture dobijenih izolata odgajenih na KDA, starih sedam dana. Kontrolne peteljke pobadane su u sterilnu KDA podlogu. Petri kutije sa isečcima stabljika inkubirane su u vlažnoj komori i pregledane svakodnevno do sedmog dana po

inokulaciji. Iz stabljika sa simptomima obavljena je reizolacija na KDA, po prethodno opisanom postupku.

### Identifikacija izolata

U cilju identifikacije, kod dobijenih izolata ispitivane su makroskopske i mikroskopske morfološke karakteristike, kao i neke biološke odlike. Praćeni su izgled i karakteristike kolonije, izgled, veličina i karakteristike micelije i spora, kao i broj jedara u ćeliji.

**Makroskopske odlike** - Nakon inkubacije na temperaturi od 24°C na KDA podlozi u trajanju od sedam dana, utvrđivane su makroskopske odlike izolata po kriterijumima koje je predložila Muntanola-Cvetković (1987). Posmatrane su sledeće karakteristike: brzina porasta kolonije, izgled kolonije, odlike ruba kolonije, boja kolonije, prisustvo ili odsustvo plodonosnih tela, eksudacija, miris kolonije i pigmentacija podloge.

**Mikroskopske odlike** - Za posmatranje i proučavanje mikroskopskih odlika gljiva korišćene su kulture stare sedam dana odgajene na KDA i VA podlozi. Od mikroskopskih osobina praćen je izgled micelije, izgled, grananje i septiranost hifa, karakteristike septi, prisustvo i odsustvo sporulacije i izgled micelijskih tvorevina. Merena je širina hife, zatim dužina ćelije, dužina hife od mesta grananja do prve septe i veličina spora i micelijskih tvorevina.

**Broj jedara u ćeliji** - Kod ispitivanih izolata posmatran je i broj jedara u ćeliji kao značajna karakteristika za njihovu determinaciju. Odredjivanje broja jedara obavljeno je primenom dve metode: bojenjem šafraninom O (Bandoni, 1979) i bojenjem anilskim plavim u laktofenolu (0.5% rastvor) (Burpee i sar., 1978). Bojenje šafraninom (Šafranin O Indikator, Chemapol, Praha Českoslovakia) korišćeno je za brzo odredjivanje broja jedara u ćeliji gljive, na osnovu bojenja jedaraca. Pored kapi 0.5% rastvora šafranina na mikroskopsku pločicu je stavljana kap 3% KOH. Fragment micelije je uranjan u te dve kapi pri čemu su se kapi izmešale. Preko fragmenta je postavljana pokrovna ljustica i preparat je posmatran. Bojenje anilinskim plavim (Anilinblau - Chinablau Wasserloslich, Merck, Germany) rastvorenim u laktofenolu (0,5 % rastvor) izvodjeno je direktnim ukapavanjem rastvora boje na miceliju gljive u kulturi, ili na fragment micelije na mikroskopskoj pločici. Obojene hife su pokrивane

mikroskopskom ljuspicom i odmah posmatrane pod mikroskopom. Broj jedara je određivan u po 100 slučajno odbranih ćelija hifa ili moniliformnih ćelija u kulturama starim sedam dana, odgajenim na KDA i VA.

## REZULTATI

### Simptomi oboljenja

Na zaraženim saksijским biljkama hrizanteme javili su se simptomi u vidu sužavanja i nekroze stabljika. Nekrotični proces zahvatao je stabljiku od vrha, tačnije od mesta gde je prethodno vršena rezidba u cilju provociranja obimnog cvetanja. Nekrotične zone na stabljikama prvo su se javile na pojedinim delovima, potom su se širile i na kraju zahvatale čitavu biljku (Slika 1). Pupoljci, cvetovi



Sl. 1. *Rhizoctonia* sp.: Simptomi nekroze stabljika, listova, pupoljaka i cvetova prirodno zaražene saksijske biljke hrizanteme

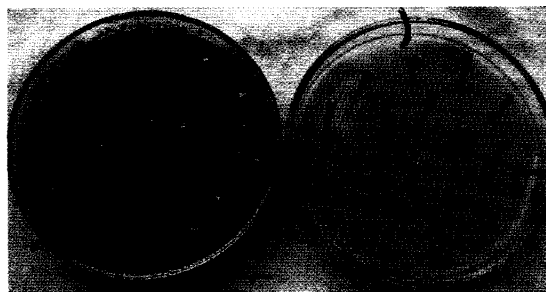
Fig. 1. *Rhizoctonia* sp.: Symptoms of stem, leaf, bud and flower necrosis of naturally infected potted chrysanthemum plants

i listovi su se sušili i, nekrotirani, ostajali da vise na biljci. Zaražene biljke, iz kojih je obavljena izolacija, a koje su zatim održavane u uslovima staklenika, potpuno su nekrotirale tri nedelje od uočavanja prvih simptoma.

### Izolati i njihova patogenost

Iz obolelih stabljika hrizanteme sa simptomima nekroze izolovana je gljiva na KDA podlogu. Nakon dobijanja čistih i kultura vrha hife, patogenost izolata potvrđena je inokulacijom isečaka zdravih stabljika. Nakon dva dana od inokulacije mogla se uočiti nekroza dužine oko 3-4 mm u osnovi isečka,

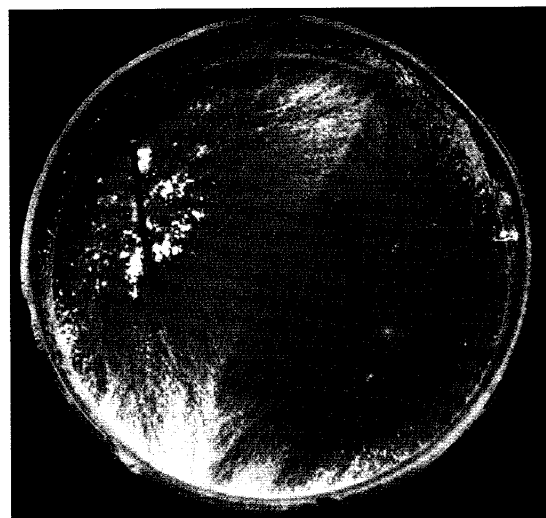
da bi sedam dana od inokulacije nekroza zahvatila čitav isečak. Preko stabljika se mogao uočiti bujan porast micelije izolata (Slika 2). Na kontrolnim



Sl. 2. Nekroza isečaka stabljika hrizanteme veštački zaraženih gljivom *Rhizoctonia* sp. (levo) i kontrolne stabljike (desno)

Fig. 2. Stem necrosis of chrysanthemum fragments artificially inoculated with *Rhizoctonia* sp. (left) and control (right)

isečcima nisu uočene nikakve patološke promene. Iz inokulisanih stabljika sa simptomima nekroze izvršena je reizolacija na KDA podlogu (Slika 3).



Sl. 3. *Rhizoctonia* sp.: Reizolati iz veštački zaraženih isečaka stabljika hrizanteme

Fig. 3. *Rhizoctonia* sp.: Reisolates from artificially inoculated chrysanthemum stem fragments

### Identifikacija izolata

#### Makroskopske odlike

Kolonije ispitivanih izolata brzo rastu (prosečno 27.7 mm/dan), dobro su razvijene i bujne. Obod im je neprekidan i ravan, a micelija raste i po staklu. Pramenavost je vrlo blago izražena, a karakteristično je i formiranje sklerocija na površini kolonije. Formiranju sklerocija prethodi grupisanje

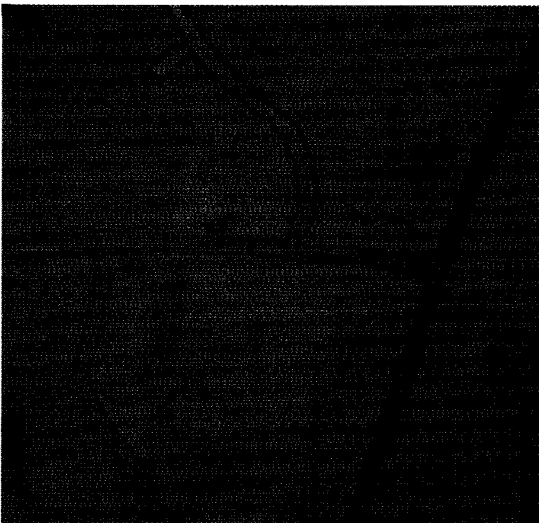
moniliformnih ćelija u beličaste grudvice. Sklerocije se formiraju 5-6 dana po zasejavanju na KDA podlogu i obično su rasporedjene po obodu kolonije. Sklerocije su brojne, čvrste, okruglaste, svetlo do tamnosmedje boje, često grupisane, prečnika 0.5-3 mm (Slika 4).



Sl. 4. *Rhizoctonia* sp.: Izgled kolonije na KDA podlozi  
Fig. 4. *Rhizoctonia* sp.: Colony appearance on PDA

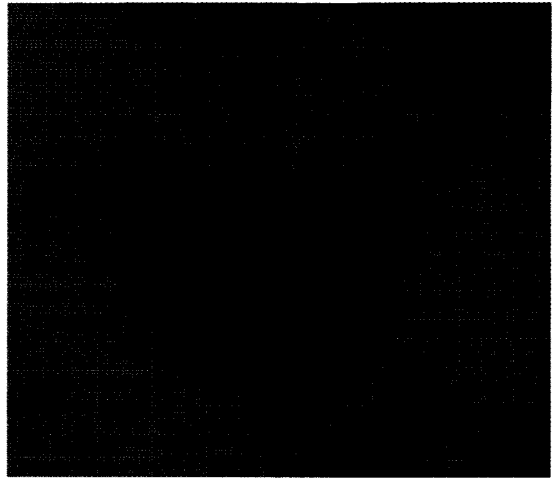
#### Mikroskopske odlike

Micelija ispitivanih izolata gljive je talasasta i višećelijska. Mlade hife se granaju pod oštrim, a starije pod skoro pravim uglom. Na mestu sa kog polazi bočna grana nalazi se karakteristično suženje. Vrlo blizu suženja na bočnoj grani nalazi se septa (Slika 5).



Sl. 5. *Rhizoctonia* sp.: Izgled hifa na VA podlozi  
Fig. 5. *Rhizoctonia* sp.: The appearance of hyphae on WA

Moniliformne ćelije (specifične kratke, proširene ćelije čiji je odnos dužine prema širini najčešće 1-3:1) javljaju se u dugim lancima (Slika 6). Širina hifa

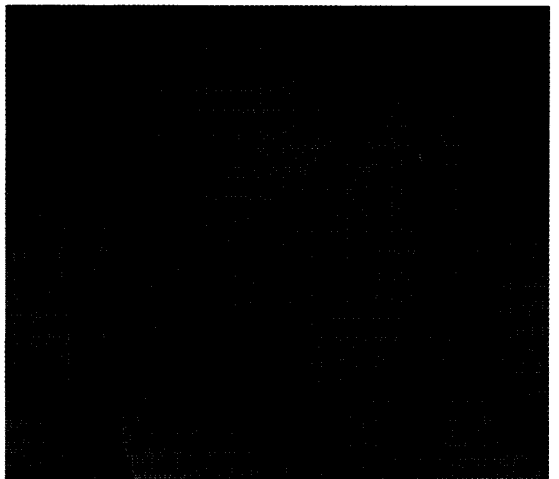


Sl. 6. *Rhizoctonia* sp.: Izgled moniliformnih ćelija  
Fig. 6. *Rhizoctonia* sp.: The appearance of moniliform cells

varira od 7.5-10  $\mu\text{m}$ , a širina suženja iznosi 4-7  $\mu\text{m}$ . Od suženja do prve septe na bočnoj grani dužina je oko 5  $\mu\text{m}$ . Moniliformne ćelije su veličine 12-32 x 20-36  $\mu\text{m}$ . Mlade hife su hijalinske, a starenjem dobijaju smeđju boju.

#### Broj jedara u ćeliji

U ćelijama hifa i moniliformnim ćelijama ispitivanih izolata prisutno je više jedara, i to najčešće 3-8 (Slika 7). Ovakvi rezultati su dobijeni bez obzira



Sl. 7. *Rhizoctonia* sp.: Jedra u ćelijama hifa  
Fig. 7. *Rhizoctonia* sp.: Nuclei in hyphal cells

na primenjenu metodu bojenja. Medjutim, metoda bojenja anilinskim plavim u laktofenolu se pokazala pogodnijom od metode bojenja jedara šafraninom. Prednost bojenja anilinskim plavim je u tome što je metoda brza, a preparat je moguće posmatrati odmah. Osim toga, jedra su jasno uočljiva jer se intenzivno boje u tamnoplavu boju.

Na osnovu simptoma oboljenja, izolacije prouzrokovala i potvrde patogenosti izolata gljive, kao i njihovih morfoloških osobina i broja jedara u ćeliji, a poredjenjem sa podacima iz literature (Sneh i sar., 1991; Ceresini, 1999) dobijeni izolati su identifikovani kao višejedarna *Rhizoctonia* sp. (*Rhizoctonia solani*).

## DISKUSIJA

Gljive iz roda *Rhizoctonia* vrlo često se sreću kao prouzrokovali oboljenja ukrasnih biljaka. Zaražene biljke ispoljavaju niz simptoma medju kojima najčešće trulež korena i krune i poleganje klijanaca. Razlog tome je, pre svega, to što ove gljive žive i održavaju se u zemljištu. Poznato je preko 500 domaćina gljiva iz roda *Rhizoctonia*, a samo neke od osetljivih vrsta su: dalija, hrizantema, ladolež, lepi čovek, ljiljan, iris, bršljan, lala, dan i noć, begonija, kala, karanfil, gladiola, gerber, ljubičica, zevalica, zvezdan, itd. (Kackley-Dutt i Gould, 1996; Raabe i McCain, 2002). Kako navode Horst i Nelson (1997) i Chase (1998), gljive iz roda *Rhizoctonia* najčešće zaražavaju ukrasno bilje u prizemnom delu, izazivajući nekrozu krune ili korena, ali simptomi se mogu javiti i na stabljikama i listovima. U ovim ispitivanjima simptomi su se na hrizantemi javljali na nadzemnim delovima, i to prvo na vrhovima stabljike, na mestu gde su rezidbom nanošene povrede. Prema podacima Chase (1998), upravo zbog ovakvih razlika u simptomima koje se javljaju na biljkama, važno je obaviti identifikaciju, odnosno utvrditi da li je prouzrokoval oboljenja dvojedarna ili višejedarna *Rhizoctonia* sp. U našim ispitivanjima iz biljaka hrizanteme sa simptomima nekroze stabljika izolovana je gljiva koja po svojim osobinama odgovara *Rhizoctonia* spp., odnosno

višejedarnoj *Rhizoctonia* sp. (*Rhizoctonia solani*). Izolati su ispoljili patogenost i visoku virulentnost prema zdravim stabljikama hrizanteme, što odgovara i podacima koje navode Kackley-Dutt i Gould (1996), Horst i Nelson (1997), Chase (1998), Raabe i McCain (2002). Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je prouzrokoval nekroze stabljika i propadanja saksijskih biljaka hrizanteme na lokalitetu na kome su ispitivanja vršena višejedarna *Rhizoctonia* sp. (*Rhizoctonia solani*).

## LITERATURA

- Bandoni, R. J.:** Safranin O as a rapid stain for fungi. *Mycologia*, 71: 873-874, 1979.
- Burpee, L. L., Sanders, P. L., Cole, H. Jr. and Kim, S. H.:** A staining technique for nuclei of *Rhizoctonia solani* and related fungi. *Mycologia*, 70: 1281-1283, 1978.
- Ceresini, P.:** *Rhizoctonia solani*. Pathogen profile in Course PP-728 Soilborne Plant Pathogens, 1999.
- D'Ercole, N.:** Les facteurs de deperissement progressif du fraisier. International Workshop, Boredeaux, France, 1991.
- Horst, K. R. and Nelson, P.E.:** *Rhizoctonia* stem rot. Compendium of chrysanthemum diseases. APS Press, St. Paul, Mn, USA, 1997.
- Kackley-Dutt, K. and Brooks-Gould, A.:** Diseases caused by the fungus *Rhizoctonia* in Root and Crown Rot of Herbaceous Ornamentals in the Landscape <http://aesop.rutgers.edu/~floriculture/publications/RRROTOLAN.htm>, 1996.
- Muntanola-Cvetković, M.:** Opšta mikologija. NIRO "Književne novine", Beograd, 1987.
- Parameter J. R. Jr., and Whitney, H.S.:** Taxonomy and nomenclature of the imperfect stage. *Biology and Pathology of Rhizoctonia solani*. (J. R. Parmeter, Jr., ed.). University of California Press, Berkley, CA, USA, 1970.
- Raabe, R.D. and McCain, A.H.:** Floriculture and Ornamental Nurseries Chrsantemum (*Chrsanthemum grandiflora*), Disease Control Outlines, UC Pest Management Guidelines: UC ANR Publication 3392, 2002.
- Sneh, B., Burpee, L. L. and Ogosbi, A.:** Identification of *Rhizoctonia* species. APS Press, St Paul, Minn., USA, 1991.
- Yokoyama, K. and Ogosbi, A.:** Hyphal fusion - like reaction between *Rhizoctonia solani* and binucleate *Rhizoctonia*. Proc. 5th International Congress of Plant Pathology, 1988 (Abstract 199).

# Multinucleate *Rhizoctonia* sp. a Pathogen of Chrysanthemum

## SUMMARY

Potted chrysanthemum plants (*Chrysanthemum Indicum* Groep, sin. *Chr. x grandiflorum*) originating from Mala Pruga, Zemun Polje, exhibited a variety of symptoms including stem and leaf necrosis, as well as bud and flower rot. Necrosis started on stems, which were previously cut in order to provoke flowering. Further on, necrosis spread and covered larger plant areas, and after a period of three weeks killed the plants.

From diseased plants fungal isolates were obtained which proved to be pathogenic to healthy stems of chrysanthemum. According to macroscopic and microscopic as well as some biological properties the causal agent of chrysanthemum stem necrosis was identified as multinucleate *Rhizoctonia* sp. (*Rhizoctonia solani*).

**Keywords:** Multinucleate *Rhizoctonia* sp.; Chrysanthemum; *Rhizoctonia solani*