

ODGAJIVAČKE I PATOGENE ODLIKE *Colletotrichum trifolii*, PROUZROKOVAČA ANTRAKNOZE LUCERKE

Tanja Vasić¹, Jasmina Radović¹,
Rade Stanisavljević¹, Goran Jevtić¹, Sanja Gajić²

¹Institut za Krmno bilje Kruševac

²Trajal kooperacija, Kriševac

Izvod: Na većem broju lucerušta u Srbiji, od 2003. do 2005. godine utvrđen je gubitak oko 30 % zelene mase lucerke. Izolovanje prouzrokovača obavljeno je standardnim mikološkim postupkom, čime je dobijen veći broj čistih kultura gljive. Proverom patogenosti utvrđeno je da svih pet izolata prouzrokuju trulež na inokulisanim biljkama lucerke. Odgajivačke karakteristike su proučene gajenjem izolata na šest različitih podloga i šest različitih temperatura. Utvrđeno je da je najpovoljnija podloga za razvoj ispitivanih izolata podloga od krompira i agara (KDA). Na svim ispitivanim podlogama gljiva je obilno sporulisala. Optimalna temperatura za razvoj ispitivanih izolata je 25°C.

Gljučne reči: *Colletotrichum trifolii*, antraknoza, odgajivačke odlike, lucerka

Uvod

Prouzrokovač antraknoze lucerke (*Colletotrichum trifolii*) prvi put je opisana u SAD od strane Bain-a and Essary-a, (1906), a u bivšoj Jugoslaviji sedamdesetih godina prošlog veka na području Istre (Lušin i sar. 1971).

Prouzrokovač antraknoze smanjuje vigor individualnih biljaka lucerke i utiče na proređivanje sklopa a samim tim i na dugovečnost lucerišta (Barnes et al., 1969). Takođe uništava biljku i pravi ozbiljna oštećenja rastućim stabljikama i novim kruničnim pupoljcima lucerke. U svojim istraživanjima Jones et al. (1978) navode da biljke inficirane sa *C. trifolii*, na polju pokazuju 22-85 % niži nivo preživljavanja i imaju za 7 % slabije razvijen korenov sistem.

Gljiva se brzo širi za vreme toplog (20-25°C) i vlažnog vremena (Stuteville and Erwin, 1990). U regionima sa toplom i umerenom klimom, *C. Trifolii* se održava u stabljikama i kruni korena. Isti autor iznosi da je opstanak konidija patogena u žetvenim ostacima i na površini žetvene opreme važan izvor širenja patogena u narednoj setvi.

Materijal i metode

Pet izolata *Colletotrichum* spp. (Luc-7, Luc-17, Luc-27, Luc-33 i CBS 158.83) podvrgnuta su intenzivnijim proučavanjima korišćenjem dve različite metode. U ogledu korišćene su biljke lucerke sorte K-28, koje su iz polja prenete i presađene u sudove.

Prva metoda sa povređivanjem (A), podrazumeva inokulaciju povređenih stabljika lucerke nanošenjem fragmenata kolonije proučavanih izolata.

Druga metoda bez povređivanja (B), podrazumeva inokulaciju nepovređenih biljaka lucerke nanošenjem fragmenata kolonije proučavanih izolata.

Ocena otpornosti biljaka vršena je po skali Barnes et al. (1969), od 1 do 4.

Za inokulaciju je korišćeno ukupno pet izolata, i to: četiri izolata *Colletotrichum* spp. poreklom iz Srbije i peti determinisani kontrolni izolat ovog parazita, poreklom iz Holandije. Očitavanje je vršeno posle 15 i 30 dana.

Uticaj podloga na porast i sporulaciju izolata *Colletotrichum* spp. (Luc-7, Luc-17, Luc-27, Luc-33 i CBS-158.83) vršeno je na šest različitih podloga, i to na: krompir-dekstroznoj podlozi, podlozi od slada, Čapek-ovoj kiseloj podlozi, kao i na podlogama od mrkve, kukuruznog brašna i ovsenih pahuljica. Navedene podloge su pripremljene prema recepturama: Dhingra and Sinclair-a (1995), Vukojević (1998) i Waller-a et al. (1998).

Na navedenim podlogama proučavan je izgled, struktura, boja i porast micelije, kao i fruktifikacija, odnosno formiranje reproduktivnih organa odabranih izolata *Colletotrichum* spp.

Prosečni dnevni prirast kolonije izračunavan je prema formuli Brasier-a and Weber-a, (1987), a nivo sporulacije iskazan je prema skali Quesad-a and Lopez-a (1980).

Za ispitivanje uticaja temperature na porast kolonija i sporulaciju gljive *Colletotrichum* spp. korišćene su čiste kulture gore navedenih izolata. Oni su gajeni u tami na krompir-dekstroznoj podlozi na temperaturama od $5 \pm 1^\circ\text{C}$, $10 \pm 1^\circ\text{C}$, $15 \pm 1^\circ\text{C}$, $20 \pm 1^\circ\text{C}$, $25 \pm 1^\circ\text{C}$ i $30 \pm 1^\circ\text{C}$.

Rezultati i diskusija

Simptomi bolesti

Tokom trogodišnjeg perioda praćenja (2003-2005), na većem broju lokaliteta, ustanovljeno je da se u toku leta i jeseni, u lucerištima pojavljuju obolele biljke sa karakterističnim izgledom. Nekoliko stabala na jednoj biljci ili bokoru dobijaju slamasto žutu do sedefastu boju i venu. Obolele biljke imaju karakteristično povijen vrh na dole, tzv. "Pastirska kuka".

Patogen se širi sa biljke na biljku i lucerište veoma brzo postaje prošarano zonama žuto-sedefastih biljaka. Toplo i vlažno vreme tokom leta i početkom jeseni pogoduje razvoju bolesti. U gustom sklopu smanjena je cirkulacija vazduha i obezbeđeni su povoljni uslovi za infekciju. Razvoj bolesti se nastavlja sve do u jesen. Kako bolest napreduje, gljivična infekcija se širi i sa stabljike prelazi u kronicu korena i koren. Krunična infekcija može biti sa ili bez stabljičnih lezija. Obolele biljke na ovaj način mogu da propadnu.

Uticaj različitih metoda inokulacije na osetljivost biljaka lucerke prema *Colletotrichum* spp.

Svi proučavani izolati, korišćenjem dve navedene metode inokulacije (A i B), prouzrokovali su simptome karakteristične za antraknozu lucerke, dok na kontrolnim biljkama, koje su inokulisane samo podlogom bez micelije nije došlo do pojave simptoma bolesti.

Međutim, intezitet pojave simptoma posle 15 dana se između metoda inokulacije razlikovao. Intezitet pojave simptoma kod prvog metoda (A) bio je nešto jači u odnosu na drugi metod (B), što se objašnjava činjenicom da je konidijama trebao izvesni vremenski period da klijaju, formiraju apresoriju, probiju kutikulu i ostvare infekciju. Posle 30 dana nakon inokulacije nije bilo bitnijih razlika u ispoljavanju simptoma između navedenih metoda inokulacije (tab. 1).

Tabela 1. Patogenost izolata Colletotrichum spp. prema lucerki inokulisanoj dvema metodama inokulacije

Table 1. Pathogenicity of strains Colletotrichum spp. in alfalfa inoculate in two methods inoculation

Izolati Strains	Prva metoda (A) <i>The first method (A)</i>		Druga metoda (B) <i>The second method (B)</i>	
	posl.15dana <i>After 15 day.</i>	posl.30dana <i>After 30 day.</i>	posl.15dana <i>After 15 day.</i>	posl.30dana <i>After 30 day.</i>
Luc-7	+	++	+	++
Luc-17	++	+++	+	+++
Luc-27	++	+++	+	+++
Luc-33	++	+++	+	++
CBS158.83	++	+++	++	+++
Kontrola <i>Control</i>	-	-	-	-

LEGENDA: - bez pojave lezija (klasa 1),
 + lezije su prisutne na stabljici, ali nema suvih stabljika (klasa 2),
 ++ brojne lezije na stabljici, stabljike počinju da se suše (klasa 3),
 +++ stabljike su propale, suve (klasa 4).

Uticaj različitih podloga na porast kolonija i sporulaciju

Izgled kolonija dosta se razlikovao u odnosu na hranljivu podlogu.

Krompir-dekstrozna podloga - Ivična zona hijalna do prljavo bela. Kolonija je zonirana, somotasta do pamučasta, svetlo maslinasto zelena i prelazi ka centru u sivu boju. Ivična zona naličja kolonije je bezbojna do prljavo bele boje. Nije uočeno formiranje stromatičnih tvorevina.

Podloga od kukuruznog brašna - Ivice kolonije su cele, blago talasaste, sluzaste. Kolonije su sastavljene od slabo supstratne micelije, zrakaste strukture, beličasto krem boje. Sa naličja, kolonija je blago obojena u beličasto maslinastu boju. Nema formiranaja stromatičnih tvorevina.

Podloga od mrkve - Ivična zona je bele do prljavo bele boje. Centralna zona kolonije je svetlo maslinasto zelena, dok je u samom centru, blede siva. Sa naličja, kolonije ivična zona je prljavo bele boje, sa tamno maslinastim centralnim delom, zrakasto raspoređenom micelijom, sa začecima crnih stromatičnih tvorevina.

Čapekova kisela podloga - Ivična zona kolonija je prljavo bele boje do blede ružičaste i prelazi u svetlo zelenkastu boju. Dok je centralna zona blago zonirana, blede oker maslinasto zelena, brašnasta a središnja zona svetlo maslinaste boje. Naličje kolonija je blago zonirano. Ivična zona prljavo bele boje sa sivkasto braon centrom. Nema formiranaja stromatičnih tvorevina.

Podloga od ovsenih pahuljica - Ivična zona kolonija je bele do prljavo bela, dok je središna zona beličasta, svetlo maslinaste boje. Sa naličja kolonija je oker maslinasto zelene boje, bez formiranja stromatičnih tvorevina.

Različite podloge značajno su uticale na radijalni porast svih pet proučavanih izolata. Najveći porast kolonija ostvarili su izolati Luc-7, Luc-33 i CBS 158.83 na krompir dekstroznoj podlozi, dok su izolati Luc-17 i Luc-27, najveći porast imali na podlozi od mrkve. Za izolate Luc-7, Luc-17, Luc-27 i Luc-33 najnepovoljnija podloga je bila od ovsenih pahuljica, a za izolat CBS158.83, Čapekova kisela podloga (tab. 2).

Tabela 2. Uticaj različitih podloga na porast kolonija i sporulaciju pet proučavanih izolata C.trifolii

Table 2. Influence of different substrate in growth colony and sporulation five investigated strains of C. trifolii

Podloge Medium	Izolati - Strains				
	Luc-7	Luc-17	Luc-27	Luc-33	CBS158.83
	Prečnik kolonije (mm)* Diameter in size (mm)*				
PDA	65,00 b	68,20 b	66,80 b	77,40 a	44,80 c
MA	63,20 b	69,00 ab	71,60 a	71,40 a	39,60 c
CMA	52,40 c	55,40 bc	61,60 a	59,60 ab	40,00 d
CA	63,00 b	71,60 a	76,00 a	74,8 a	43,00 c
CDA	65,00 b	69,00 ab	68,20 ab	71,60 a	34,80 c
OMA	44,40 b	43,20 b	47,00 ab	57,40 a	40,00 b
	Sporulacija*** Sporulation***				
PDA	++ +	++ +	++ +	++ +	++ +
MA	++ +	++ +	++ +	++ +	++ +
CMA	++	++	++	++ +	++ +
CA	++	++ +	++	++ +	++ +
CDA	++ +	++	++ +	++ +	++
OMA	++ +	++ +	++ +	++ +	++ +

* Podaci u redovima obeleženi istim slovima nisu statistički značajno različiti na osnovu Duncan-ovog testa ($P=0,05$)

** Prosečan dnevni prirast obračunat po formuli $(D_2 - D_1) / (T_2 - T_1)$ (Brasier i Weber, 1987)

*** Sporulacija: + = slaba, ++ = srednja i +++ = obilna (Quesada i Lopez, 1980)

Vrsta hranljive posloge je uticala na sposobnost formiranja konidija *C. trifolii* u većem ili manjem broju. Kod četiri izolata različite podloge su uticale na nivo sporulacije, a izolat Luc-33 na svim podlogama je obilno sporulisao.

Prema Graham et al. (1980); Robotić i sar. (1983); Milijić i sar. (1986); Stuteville and Erwin (1990) najpogodnija podloga za razvoj *C. trifolii* je krompir dekstrozna podloga. Prema ovim autorima kolonije su tamno maslinaste sa svetlo sivom, dobro razvijenom vazdušnom micelijom. Na svim podlogama na kojima je gljiva rasla konstatovano je da je došlo do sporulacije posle 14. dana, dok Robotić i sar. (1983) napominju da do sporulacije može doći i nakon 30. dana na Čapekovoj kiselj podlozi.

Uticaj temperature na razvoj i sporulaciju proučavanih izolata *Colletotrichum spp.*

Temperatura je značajno uticala na radijalni porast kolonija svih pet proučavanih izolata. Optimalna temperatura za porast kolonija *C. trifolii* je 25°C, dok je najnepovoljnija, 5°C.

Tabela 3. Uticaj različitih temperatura na porast kolonija i sporulaciju pet proučavanih izolata *C. trifolii*

Table 3. Influence of different temperature in growth colony and sporulation five investigated strains of *C. trifolii*

Temp. Temp. (°C)	Izolati - Strains				
	Luc-7	Luc-17	Luc-27	Luc-33	CBS158.83
Prečnik kolonije (mm)* - Diameter in size (mm) *					
5	23,0 b	26,4 a	23,8 b	21,4 b	13,2 c
10	28,2 c	29,6 b	31,2 a	29,4 bc	14,2 d
15	55,6 a	53,8 a	56,6 a	48,8 b	31,6 c
20	79,6 b	79,6 b	84,8 a	80,4 ab	49,0 c
25	89,4 a	86,0 a	90,0 a	72,8 b	55,8 c
30	80,4 a	81,2 a	74,2 b	75,6 b	37,2 c
Sporulacija*** - Sporulation***					
5	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-
15	++	+++	++	++	++
20	++	+++	+++	++	+++
25	+++	+++	+++	+++	+++
30	+++	+++	+++	+++	+++

* Podaci u redovima obeleženi istim slovima nisu statistički značajno različiti na osnovu Duncan-ovog testa ($P=0,05$)

** Prosečan dnevni prirast obračunat po formuli $(D_2 - D_1) / (T_2 - T_1)$ (Brasier i Weber, 1987)

*** Sporulacija: + = slaba, ++ = srednja i +++ = obilna (Quesada i Lopez, 1980)

Različite temperature gajenja su uticale na sposobnost formiranja konidija *C. trifolii*. Na temperaturama od 5°C i 10°C nijedan od proučavanih izolata nije formirao konidije, dok je na ostalim temperaturama došlo do sporulacije (tab. 3).

Prema Robotić i sar. (1983) optimalna temperatura za razvoj patogena na svim podlogama je između 24-28°C, a minimalna 5°C dok je sporulacija obilna na temperaturama 24°C, 28°C i 29°C, a 30. dana nakon zasejavanja dolazi do sporulacije na svim ispitivanim temperaturama, osim na 5°C.

Wellty et al. (1982); Stuteville and Erwin (1990) ustanovili su da je optimalna temperatura za porast i sporulaciju *C. trifolii* između 20°C i 28°C i ukazuju na sposobnost patogena da se razvija u širokom temperaturnom dijapazonu.

Zaključak

Na osnovu rezultata dobijenih tokom istraživanja može se zaključiti:

Korišćenjem dva različita metoda inokulacije (A i B) reprodukovani su simptomi karakteristični za prouzrokovачa antraknoze lucerke. Proučavani izolati *C.*

trifolii najbolje su se razvijali na KDA podlozi, dok je najslabiji porast ostvaren na CDA podlozi.

Optimalna temperatura za porast izolata *C. trifolii* sa lucerke je 25°C, a najnepovoljnija temperatura je 5°C. Na svim proučavanim podlogama na kojima je gljiva rasla konstatovano je da je došlo do sporulacije posle 14. dana.

Različite temperature gajenja su u velikoj meri uticale na sposobnost proučavanih izolata *C. trifolii* da formiraju konidije, na temperaturama od 5°C i 10°C nije došlo do formiranja konidija.

Literatura

- Braiser, C. M., Webber, J. F. (1987): Positive correlation between in vitro growth rate and pathogenesis in *Ophiostoma ulmi*. *Plant Pathology*, 36: 462-466.
- Barnes, D.K., Ostazeski, S.A., Schullinger, J.A., Hanson, C.H. (1969): Effect of Anthracnose (*Colletotrichum trifolii*) Infection on Yield, Stand, and Vigor of Alfalfa. *Crop Science*, 9, 344-346.
- Dhingra, O.D., Sinclair, J.B. (1995): *Basic Plant Pathology Methods*, second edition. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, USA.
- Graham, J.H., Devine, T.E., Hanson, C.H. (1976): Occurrence and Interaction of Three Species of *Colletotrichum* on Alfalfa in the Mid-Atlantic United States. *Phytopathology*, 66, 538-541.
- Lušin, V., Brnetić, D., Keglević, S. (1971): Izveštajna služba zaštite bilja u SR Hrvatskoj u 1970. *Biljna zaštita*, 1: 1-28.
- Jones, E.R., Carroll, R.B., Swain, R.H., Bell, K.W. (1978): Role of anthracnose in stand thinning of alfalfa in Delaware. *Agronomy Journal*, 70, 351-353.
- Queseda, L.G., Lopez, E.H. (1980): Forma sexual medios de cultivo para *Colletotrichum gleosporioides*, patógeno del mango en Cuba. *Ciencias de la Agricultura*, 7: 11-17.
- Robotić, V., Klokočar-Šmit, Z., Đukić, D. (1983): Reakcija nekih sorti lucerke prema *Colletotrichum trifolii* Bain et Essary. Zbornik naučnih radova sa IV Jugoslovenskog simpozijuma o krmnom bilju, Novi Sad, 378-386.
- Stuteville, D.L., Erwin, D.C. (1990). *Compendium of alfalfa diseases*, second edition. The American Phytopathological Society St. Paul, Minnesota.
- Milijić, S., Spasić, M., Perišić, M., Babović, M. (1986): Prilog proučavanju pojave sušenja i truljenja lucerke. *Arhiv za poljoprivredne nauke* 47, 165, 69-74.
- Vukojević, J. (1998): *Praktikum iz mikologije i lihenologije*. Univerzitet u Beogradu.
- Waller, J.M., Ritice, B.J., Holdemess, M. (1998): *Plant clinic handbook*. CAB International, Wallingford, Oxon.
- Welty, R.E. (1982): Forage legumes hosts of races 1 and 2 of *Colletotrichum gleosporioides*. *Plant Disease*, 66, 653-655.

IN CULTURE AND PATHOGENIC CHARACTERISTIC *Colletotrichum trifolii* BAIN ET ESSARY, ANTRACNOSE INDUCER IN ALFALFA

Tanja Vasić¹, Jasmina Radović¹,
Rade Stanisavljević¹, Goran Jevtić¹, Sanja Gajić²

¹Institute for forage crops, Kruševac

²Trayal corporation, Kriševac

Summary: During three years period (2003-2005), in Serbia in higher number in alfalfa field observed losses about 30% green masses of alfalfa. From collected material from field, by standard mycological procedures, the great number of *Colletotrichum* spp. strains was isolated. Pathogenicity of five strains to consolidate that to cause rot in inoculate plant alfalfa. Inoculate characteristics are studied with six different mediums and six different temperatures. To consolidate the highest colony growth on the most isolates have been obtained on potato-dextrose agar, while the colony have had lowest grown on oat meal agar (tab. 2). Sporulation was abundant on all medium. Optimal growth temperature for observed isolates was 25° C. Very small growth was observed on 5° C for all isolates (tab.3). According to investigation of pathogenic and in culture characteristics selected strains, we can make a conclusion that these are *Colletotrichum trifolii* Bain et Essary, antracnose inducer in alfalfa.

Key words: *Colletotrichum trifolii*, antracnose, culture characteristics, alfalfa