

GIBBERELLA MONILIFORMIS* WIN. ANAMORF: *FUSARIUM VERTICILLIOIDES* NA LEKOVITOM BILJU U SRBIJI*Snežana Pavlović¹, Gorica Vuković²**¹Institut za proučavanje lekovitog bilja »Dr Josif Pančić«, Beograd, Srbija²Gradski zavod za javno zdravlje, Beograd, Srbija

Cilj istraživanja je bio upoznavanje raznih tipova simptoma nedovoljno proučavanih oboljenja na gajenom belom slezu, ehinacei, kantarionu i žalfiji, ispitivanje etiologije, kao i identifikacija prouzrokovača bolesti lekovitog bilja u našoj zemlji. Uzrok bolesti kod ovih biljaka mogu biti gljive iz različitih rodova, među kojima su najčešće one iz roda *Fusarium*. Iz semena tih biljaka, kao i sa korena i stabla belog sleza i korena ehinacee, izolovana je *Gibberella moniliformis* Win. anamorf: *Fusarium verticillioides* /Sacc./ Nirenberg. Rađeno je sa ukupno 37 izolata *Gibberella moniliformis*, izolovanih u periodu od 2002. do 2006. godine. Iz uzoraka sakupljenih na više lokaliteta, izolacija iz nadzemnih i podzemnih delova obavljena je po standardnom postupku, uz korišćenje sledećih podloga: PDA, SNA, CA i CLA. Za proučavanje teleomorfno stadijuma korišćena je modifikovana metoda. Uz identifikaciju patogena, opisani su simptomi i ispitana patogenost. Trulež korena i korenovog vrata belog sleza, ehinacee, kantariona i žalfije, koju prate simptomi patuljastog, asimetričnog porasta, uvelosti, hloroze i smežuranosti listova, je oboljenje prisutno u svim ispitivanim područjima. Bolest značajno umanjuje prinose ovih komercijalno važnih biljnih vrsta.

Ključne reči: *Gibberella*, *Fusarium*. bolesti, beli slez, žalfija, ehinacea, kantarion.

Uvod

Bolesti belog sleza, ehinacea, kantariona i žalfije su nedovoljno proučavani u našoj zemlji. Prouzrokovači bolesti kod ovih biljaka mogu biti gljive iz različitih rodova među kojima su najčešće izolovane vrste iz roda *Fusarium*. Vrste iz roda *Fusarium* se svrstavaju u najznačajnije patogene gajenog bilja, parazitiraju seme, klijance i sve delove odraslih biljaka. Veliku štetu prouzrokuju na korenu belog sleza i ehinaceama. *Gibberella moniliformis* Win. (sin: *G. fujikuroji* /Saw./ Wr); anamorf: *Fusarium verticillioides* /Sacc./ Nirenberg (sin: *F. moniliforme*) je izolovana sa semena belog sleza, kantariona, žalfije, vrste *Echinacea purpurea*, ali ne i *Echinacea angustifolia*, kao i sa korena i stabla belog sleza i korena *Echinacea purpurea*.

Eksperimentalni deo

Istraživanja su izvedena u periodu od 2002. do 2006. godine u Institutu za proučavanje lekovitog bilja "Dr Josif Pančić" u Beogradu. Prikupljanje obolelih biljaka je obavljeno

na oglednim parcelama Instituta za proučavanje lekovitog bilja na lokalitetu Pančevo i kod koperanata Instituta na više lokaliteta. Uzorci su uzimani sa proizvodnih parcela na svakih mesec dana u periodu od marta do novembra. Prilikom prikupljanja uzoraka obolelih biljaka na terenu vršeno je vađenje biljaka sa simptomima uvenuća i opšte zakržljalosti, hloroze i smežuranosti listova. Po donošenju u laboratoriju uzorci su najpre isprani tekućom vodom, a zatim je posle površinske dezinfekcije vršena izolacija gljiva. Izolacija iz sakupljenih uzoraka listova lisnih peteljki, stabla i korena belog sleza, ehinacea, žalfije i kantariona vršena je po standardnom postupku [1]. Prilikom ovih istraživanja koristili smo sledeće podloge: krompir dekstrozni agar (PDA) [2], sintetičku hranljivu podlogu (SNA-Syntetic Nutrition Agar) [3], podlogu od šargarepe (CA- carot agar) [4] i vodeni agar sa sterilnim listićima karanfila (CLA) [5]. Za proučavanje teleomorfog stadijuma heterotalusne gljive iz sekcije *Liseola* korišćena je modifikovana metoda koju je opisao Leslie [4].

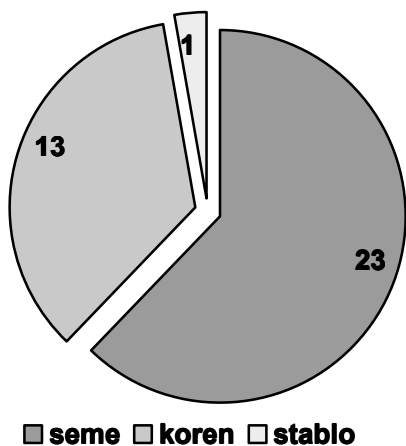
Zasejane Petri kutije inkubirane su u termostatu na temperaturi od $25\pm 2^{\circ}\text{C}$. Posle 2-4 dana micelija gljive oko zasejanih fragmenata je mikroskopirana, a zatim je isečak micelije prenošen u Petri kutiju ($\text{Ø}60\text{ mm}$) sa PDA radi dobijanja čiste kulture izolata.

Identifikacija vrsta vršena je na osnovu makroskopskih i mikroskopskih odlika izolata. Makroskopske odlike podrazumevaju izgled i brzinu razvoja kolonija na PDA podlozi, pigmentaciju supstrata i dr. Mikroskopske odlike podrazumevaju prisustvo ili odsustvo mikrokonidija, oblik i način formiranja mikrokonidija i konidiogenih ćelija, odlike makrokonidija, prisustvo ili odsustvo hlamidospora i dr.

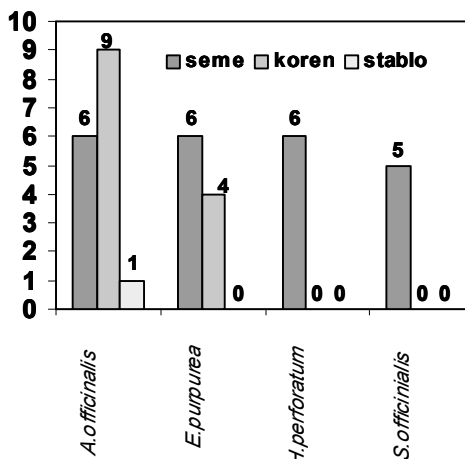
Ispitivanje makroskopskih odlika, opšti izgled kolonije i pigmentacija supstrata kod proučavanih izolata praćeni su na PDA podlozi na temperaturi 20°C . Prema radnoj metodi [5] prečnik razvoja kolonija odabranih izolata, odgajenih na PDA podlozi u mraku, pri temperaturama od 25°C i 30°C , meren je posle 73h, odnosno tri dana. Prečnik kolonije izražen je u mm i određena je prosečna vrednost iz tri ponavljanja. Identifikacija vrsta vršena je prema ključevima za determinaciju gljiva roda *Fusarium* koje su dali Booth [6], Gerlach i Nirenberg [7], Nelson i sar. [8] i Burgess i sar. [5]. Na ovaj način dobijeno je preko 200 izolata gljiva iz roda *Fusarium*. Za dalji rad odabrali smo samo vrstu *F. verticillioides*.

Rezultati

Gibberela moniliformis je izolovana sa semena svih ispitivanih lekovitih biljaka osim *Echinacea angustifolia*, kao i sa korena i stabla belog sleza i korena *Echinacea purpurea* (Tab. 1, Graf. 1 i 2).



Graf. 1. Ukupan broj izolata *Gibberella moniliformis* dobivenih sa ispitivanih lekovitih biljaka.



Graf. 2. Broj izolata *Gibberella moniliformis* dobivenih sa ispitivanih lekovitih biljaka.

Tabela.1. Spisak izolata *Gibberella moniliformis* korišćenih u istraživanjima

Domaćin	Izolat	Mesto izolacije	Lokalitet
<i>Althea officinalis</i>	S-1	Seme	Pančevo
	S-3	Seme	Pančevo
	S-5	Koren	Pančevo
	S-11	Seme	Pančevo
	S-12	Seme	Pančevo
	S-19	Seme	Pančevo
	S-23	Koren	Zrenjanin
	S-33	Prizemno stablo	Zrenjanin
	S-39	Koren	Ruma
	S-44	Koren	Ruma
	S-47	Koren	Pančevo
	S-50	Koren	Pančevo
	S-52	Koren	Pančevo
	S-55	Koren	Banatsko Novo Selo
	S-63	Koren	Banatsko Novo Selo
<i>Echinacea purpurea</i>	S-66	Seme	Pančevo
	E-33	Seme	Pančevo
	E-28	Seme	Pančevo
	E-45	Seme	Pančevo
	E-51	Seme	Pančevo
E-59	Koren	Pančevo	

	E-64	Koren	Indija
	E-123	Koren	Indija
	E-126	Koren	Indija
	E-168	Seme	Pančevo
	E-452	Seme	Pančevo
<i>Hypericum perforatum</i>	K-1	Seme	Pančevo
	K-22	Seme	Pančevo
	K-24	Seme	Pančevo
	K-25	Seme	Pančevo
	K-27	Seme	Pančevo
	K-28	Seme	Pančevo
<i>Salvia officinalis</i>	Ž-51	Seme	Pančevo
	Ž-55	Seme	Pančevo
	Ž-72	Seme	Pančevo
	Ž-78	Seme	Pančevo
	Ž-81	Seme	Pančevo

Rađeno je sa ukupno 37 izolata *Gibberella moniliformis*: 23 su dobivena sa semena, 13 sa korena i jedan sa stabla ispitivanih lekovitih biljaka. Sa sleza je izolovano 16, sa *Echinacea purpurea* 10, sa kantariona 6 i sa žalfije 5 izolata.

Fusarium verticillioides formira na PDA obilnu, vunastu, beličastu vazдушnu miceliju koja kasnije poprima nijanse svetlo i tamno ljubičaste. Boja micelije i pigmentacija podloge znatno variraju u zavisnosti od izolata (Tabela 2).

Tabela 2. Morfologija kolonija *G. moniliformis* na PDA nakon 10-14 dana inkubacije u mraku na 20°C.

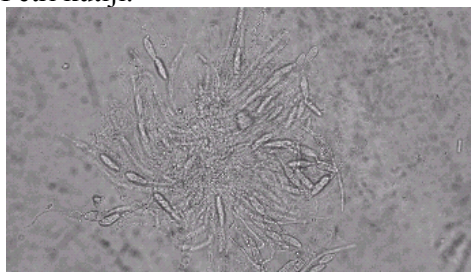
Opis vazdušne micelije	Pigmentacija podloge	Izolati
Vazдушna micelija vunasta bela; centralni deo sa bujnijom micelijom, svetlo ljubičast; ivice blago talasaste.	Središni deo je tamno ljubičast, prema periferiji svetlo ljubičast; po ivicama beličasta zona širine 1 cm.	S-1, S-5, S-23, E-64, E-28
Micelija u centru ružičasta, bujna, vunasta, sa nijansima sivo ljubičaste, po periferiji bela (1,5 cm) i ra-stresitija; ivice blago talasaste	Središni deo tamno smeđ ovičen svetlo i tamno ružičastim prsten-ovima; ivice bele.	S-3, S-19, K-1, K-3
Centralni deo sa vunastom kompaktnom bujnom micelijom prljavo bele (bež) boje; periferni deo kolonije sa bujnijom, vunastom, belom micelijom; ivice cele	Podloga po celoj površini boje breskve.	S-1, E-45, S-39, K-23, Ž-51, Ž-55

Micelija veoma razvijena u centru kolonije, uzdignuta, vunasta, sivo ljubičasta; periferni deo sa rastresitom micelijom; ivice cele	Centralni deo tamno ljubičaste boje; u perifernom delu naizmenični prstenovi svetlo i tamno ljubičaste boje; ivice bele.	S-12, Ž-72, Ž-81, E-51
Micelija sednje bujna, vunasta, svetlo ružičasta; ivice blago talasaste.	Tamno ružičasta, sa nijansama svetlo ružičaste boje.	S-33, S-5, Ž-78
Micelija vunasta u centru, rasteresita ka periferiji, beličasta; ivice cele.	Svetlo bež, skoro bele boje.	S-44, S-47, K-22, K-25
Micelija vunaste, zrakasta, sivo ljubičasta sa nijansama bledo ružičaste boje; ivice cele.	Svetlo ljubičasta u centru, sa nijansama tamno ljubičaste boje.	S-66, E-168, E-123
Micelija bela, sa nijansama ljubičaste i ružičaste u pojedinim delovima kolonije, periferni deo sa rastresitom micelijom; ivice blago talasaste.	U centru tamno smeđa, pema priferiji sa svetlijim nijansama smeđe boje.	S-55, E-28, S-63, E-452, K-28, E-126, K-27
Sivo bela micelija, vunasta, bujna u centru, prema ivicama rastresita sa tamnim rubom; ivice cele.	U centru je plavičasta boja a prena periferiji crvenkasto narandžasta.	S-52, K-24, E-33, E-59

Peritecije su okruglaste, neravne površine, protoparanhimatične teksture sa izraženom ostiolom, crne, prečnika 280 µm (Sl. 1). Ukrštanjem test izolata poreklom sa belog sleza sa dva izolata *F. verticillioides* sa kantariona dobiveno je fertilno potomstvo. Peritecije su formirane na površini supstrata, obično po ivicama Petri kutije, dok je izolat S-23 formirao obilje peritecija po celoj Petri kutiji.

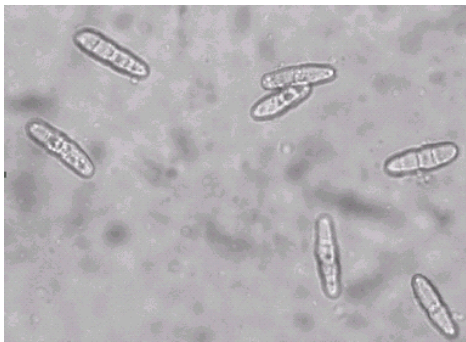


Sl. 1. *G. moniliformis*. Peritecije na CA (in situ)



Sl. 2. *G. moniliformis*. Izgled askusa.

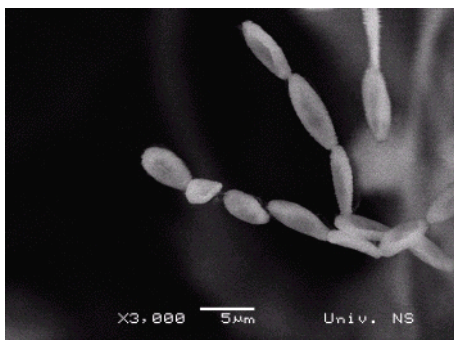
Askusi su elipsoidni, hijalinski, sa 4 do 8 askospora. Dužina askusa kreće se od 49,2 do 88,9 µm a širina 7,5 do 12,5 µm (Sl. 2). *Askospore* su dvoćelijske, retko sa 2-3 septe, elipsoidne, prave ili blago povijene, blago sužene u predelu septi, hijalinske, prosečne veličine 15,80 x 5,92 µm (Sl. 3).



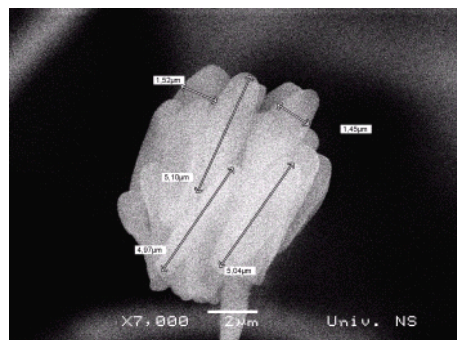
Sl. 3. Izgled askospora *G. moniliformis*.

Mikrokonidije su jednoćeljske, retko sa jednom septom, ovalne, hijelinske, formirane na vrhu monofialida, u vidu dužih ili kraćih nizova ili »lažnih glavicica«, dimenzija $5,2 - (11,9 \pm 0,810) - 18,0 \times 1,1 - (3,43 \pm 0,146) - 5,5 \mu\text{m}$. Obrazovanje mikrokonidija je obilno i brzo, već nakon tri dana od zasejavanja na svim podlogama (Sl. 4-7). Makrokonidije se formiraju retko, na monofialidama, one su prave ili blago povijene, tankih zidova, vršna ćelija je sužena pri vrhu, bazalna sa izraženom petom, sa 3-5 septi, hijelinske, dimezije jako variraju i iznose $16,5 - (47,5 \pm 7,075) - 79,0 \times 3,0 - (3,9 \pm 0,095) - 5,0 \mu\text{m}$. Dimenzije mikro i makro konidija ne zavise od izolata i biljke domaćina.

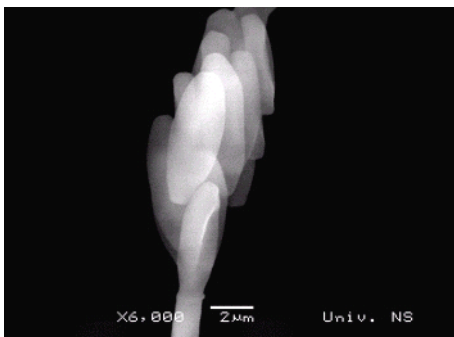
Makrokonidije se formiraju u svetlo žutim sporodohijama na CLA podlozi, izuzetno na hifama. Obilnije obrazovanje blede narandžastih sporodohija sa makrokonidijama dobiveno je ukoliko su izolati gajeni na podlozi sa 1,7 % agara i pet sterilnih zrna integralnog pirinča. Hlamidospore su odsutne kod svih izolata.



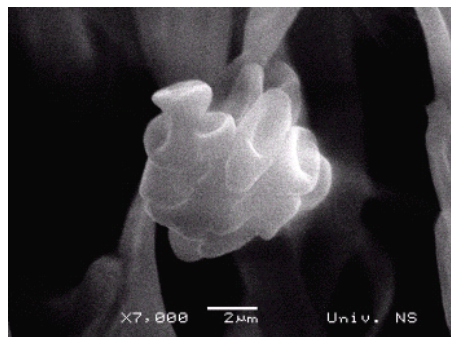
Sl. 4. *F. verticillioides* – mikrokonidije u nizu.



Sl. 5. *F. verticillioides* – mikrokonidije u lažnim glavicama.



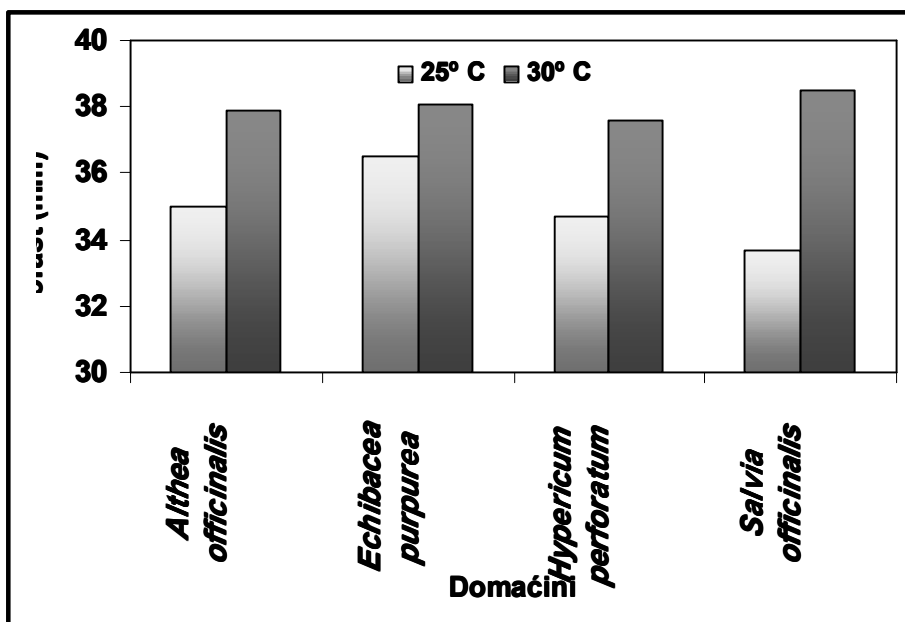
Sl. 6. *F. verticillioides* – mikrokonidije u lažnim glavicama.



Sl. 7. *F. verticillioides* – mikrokonidije u lažnim glavicama.

F. verticillioides se veoma brzo razvija na svim ispitivanim podlogama, dobijeni rezultati predstavljaju prosek tri, a prikazani su na Graf. 3.

Grafikon 3. Prečnik kolonija (u mm) *Fusarium verticillioides* gajenih na podlozi PDA, na 25° i 30° C nakon tri dana.



Zaključak

Na svim ispitivanim biljkama identifikovana je vrsta *Fusarium verticillioides*. Na osnovu rezultata postignutih tokom ovih proučavanja mogu se izvesti sledeći zaključci. Propadanje klijanaca, trulež korena i korenovog vrata belog sleza, ehinacea, kantariona i žalfije, koju prate simptomi patuljastog, asimetričnog porasta, uvelosti, hloroze i

smežuranosti listova, je oboljenje prisutno u proizvodnim područjima gajenja ovih biljaka u okolini Beograda (lokaliteti Pančevo, Zrenjanin, Banatsko Novo Selo, Indija, Ruma i Stara Pazova).

Taksonomske karakteristike vrste su prisustvo monofialida, mikrokonidija u dugačkim lancima, lažnim glavicama i makrokonidija. Hlamidospore su bile odsutne kod svih izolata. *Fusarium verticillioides* karakteriše heterotalusni sistem razmnožavanja. Peritecije se u prirodi javljaju samo na izumrlom materijalu. Ovaj stadijum je poznat pod imenom *Gibberella moniliformis* Win. Parazit preživljava na biljnim ostacima, konidije formirane na ostacima su osnovni izvor inokuluma, prenose se vetrom i tako dospevaju na nadzemne delove biljke.

Rezultati ovih istraživanja, koja su pre svega diagnostičkog karaktera, omogućiće potpunije upoznavanje mikoflore lekovitog i aromatičnog bilja u nas. Ovi rezultati će takođe omogućiti uspešniju zaštitu lekovitog i aromatičnog bilja, odnosno njegovu veću i ekonomičniju proizvodnju.

Literatura

- [1] O.D. Dingra, J.B. Sinclair, Basic Plant Pathology Methods CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, USA, 1986, 1-355.
- [2] M. Muntanjola-Cvetković, Opšta mikologija, NIRO Književne novine, Beograd, 1982, 13-320.
- [3] H.I. Nirenberg, K.O. O'Donnell, New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex, Mycologia, 90(3), 1998, 434-458.
- [4] K.J. Leslie, Mating populations in *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium* Section *Liseola*), Phytopathology, 81, 1991, 1059-1060.
- [5] L.W. Burgess, B.A. Summerell, S. Bullock, K. Gott, D. Backhouse, Laboratory Manual for *Fusarium* Research, Third Edition, *Fusarium* Research Laboratory, Department of Crop Science, University of Sydney and Royal Botanic Gardens, Sydney, 1994, 1-133.
- [6] C. Booth, The Genus *Fusarium*, Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England, 1971, 1-237.
- [7] W. Gerlach and H. Nirenberg, The Genus *Fusarium* and Pictorial Atlas, Biologische Bundes-Anstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für Microbiologie, Berlin-Dahlen, 1982.
- [8] P.E. Nelson, T.A. Toussoun, W.F.O. Marasas, *Fusarium* species. An illustrated Manual for identification, The Pennsylvania State University Press, University Park and London, 1983, 1-193.

Summary

***GIBBERELLA MONILIFORMIS* WIN. ANAMORF: *FUSARIUM VERTICILLIOIDES* IN MEDICINAL PLANTS IN SERBIA**

Scientific paper

Pavlović Snežana¹, Gorica Vuković²

¹Institute for Medicinal Plant Research »Dr J. Pančić«, Belgrade, Serbia

²Institute for Public Health, Belgrade, Serbia

Plant diseases on mallow, coneflower, St. John's wort and sage in Serbia were studied only in small extent. Causal agents in these plants can be fungi belonging to different taxa, among them the most often species from the genus *Fusarium*. *Gibberella moniliformis* Win. anamorf: *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg was isolated from the seeds of marshmallow, St. John's wort, coneflower, and sage, as well as from the stem and root of coneflower. The aim of investigation was to recognise symptoms of certain diseases in cultivated medicinal plants and identification of causal agents. In 37 isolates of *Gibberella moniliformis*, isolated during the period 2002-2006, using selected nutritive media (PDA, SNA, CA and CLA), standard and modified methods (Leslie 1991), *Fusarium verticillioides* was recorded, its symptoms were described, as well as its pathogenicity. Root rot in marshmallow, St. John's wort, coneflower, and sage, followed by symptoms of asymmetric growth, chlorosis and wilt is often present in cultivated plants in areas examined. Disease significantly decreases yields of these commercially important plant species.

Keywords: *Gibberella*, *Fusarium*, diseases, marshmallow, sage, echinacea, St. John's wort.