

MORFOLOŠKE KARAKTERISTIKE FITOPATOGENIH GLJIVA *Leptosphaeria maculans* I *Leptosphaeria biglobosa* UZROČNIKA RAKA STABLA ULJANE REPICE U SRBIJI

Petar Mitrović¹, Željko Milovac¹, Milan Jocković¹, Ana Marjanović-Jeromela¹,
Nenad Dušanić¹, Radovan Marinković¹

Izvod: Rak stabla i suva trulež korena je ekonomski najvažnije oboljenje uljane repice širom sveta. Ovu bolest prouzrokuju dve vrste fitopatogenih gljiva iz roda *Leptosphaeria*: *Leptosphaeria maculans* (Desm.) ces. and de Not anamorf *Phoma lingam* (Tode. Fr.) Desmas, i *Leptosphaeria biglobosa* Shoem and Brun. Na hranjivoj PDA podlozi pri temperaturi 25±1°C proučavane su morfološke osobine (porast, izgled i boja micelije, izgled ivice kolonije, prisustvo plodonosnih tela, miris i lučenje pigmenta, veličina, oblik i boja piknida i piknospora) 12 izolata (izolovanih u Srbiji K-112, K-113, K-114, K-115, K-117, K-8, LJ-3, L-10, GS-27, St-12, S-2 i C-5) i 2 kontrolna (L.m,L.b) gljive. Izolati K-112, K-113, K-114, K-115, K-117 imaju brz i pravilan porast, luče žuto mrki pigment, dok K-8, LJ-3, L-10, GS-27, St-12, S-2 i C-5 obrazuju nepravilne kolonije bez pigmenta, imaju spor porast i obilniju sporulaciju. Ogljed je postavljen u četiri ponavlja a porast micelije navedenih izolata je meren u cm posle 5, 10 i 15 dana.

Ključne reči: izolati, *Leptosphaeria maculans*, *Leptosphaeria biglobosa*, morfološke osobine, hranjiva podloga

Uvod

Na krompir dekstroznoj podlozi (PDA), u zavisnosti od izolata i lokaliteta, gljiva obrazuje vazdušnu miceliju, sivobele boje, dok je supstratna micelija mlečnobele boje. Vremenom dolazi do obrazovanja bledocrnog pigmenta u podlozi (Pound 1947). Kolonije su pravilnog ili nepravilnog oblika, često sa režnjevitom ivicom (Pound 1947, Mitrović 1997). Humpherson-Jones (1986) i Koch et al. (1989) navode da izolati A grupe imaju spor i nepravilan rast na nizu agarizovanih podloga, dok izolati B grupe imaju brz porast i pravilan oblik. Mitrović (1997) takođe navodi da avirulentni izolati imaju brz porast u odnosu na virulentne izolate. Piknidi su dosta ravnomerno raspoređeni na površini kolonije i crne su boje. Gljiva obrazuje dva tipa piknida: tip 1 su piknidi skleroidnog oblika mrke boje sa suženom ostiolom prečnika 200500 µm i Tip 2 su piknidi loptastog oblika, crni, prečnika 200600 µm sa zidom koji je sastavljen od nekoliko slojeva ćelija od kojih je spoljašnji sloj ćelija sa zadebljanim zidom. Konidije (piknospore) su bezbojne, cilindrične, jednoćelijske, uglavnom prave, neke iskrivljene, sa ili bez kapi ulja na krajevima, veličine 35 x 1,52 µm (Punithalingam & Holliday 1972). Osim piknida gljiva obrazuje i savršeni stadijum.

¹ Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Maksima Gorkog 30, Novi Sad, Srbija (petar.mitrovic@nsseme.com)

Materijal i metode rada

Izolacija gljive i dobijanje monospornih kultura

Inficirane biljke uljane repice su prikupljene tokom 2009/10. godine u regionu Vojvodine. Oboleli biljni delovi (koren, prizemno stablo, gornji deo stable, list, cvet, ljuska, seme) sa jasno izraženim simptomima bolesti su poslužili za izolaciju gljive. Fragmenti obolelog tkiva su potapani u 3% rastvor natriumphipohlorata u trajanju od 3-5 minuta, a nakon toga su isprani destilovanom vodom i prirodno sušeni u kontrolisanim uslovima. Nakon sušenja, fragmenti obolelog tkiva su naneti na hranjivu podlogu od krompir dekstroznog agara (PDA) (Difco Detroit USA) koja je prethodno razlivena u Petri kutije. Da bi se sprečio razvoj bakterija, u podlogu je dodavano 50 mg streptomycin-sulfata (Galenika Beograd, Srbija) po litru. Petri kutije sa ovako zasejanom podlogom su stavljene u termostat na temperaturi od $25\pm 1^{\circ}\text{C}$. Posle 10-15 dana je posmatrano obrazovanje sporonosnih organa pod binokularom. Dobijanje čistih kultura (izolata) je urađeno na sledeći način: Piknospore, koje se oslobađaju iz piknida u vidu jedne sluzaste kapljice, poreklom sa hranjive podloge, vrhom kopljaste igle su prenete u plastične epruvete u kojima je prethodno dodato 2 ml sterilne vode. Pripremljena suspenzija konidija je razlivena u Petri kutije. Posle 48 časova je posmatrano klijanje konidija pod binokularom. Klijaše konidije, zajedno sa delom podloge, prenete su na PDA podlogu i stavljene u termostat na $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ radi razvoja monospornih izolata gljive. Na ovaj način je izolovano 119 izolata gljive, a u ovim ispitivanjima su korišćeni sledeći izolati: K-112, K-113, K-114, K-115, K-117, K-8, LJ-3, L-10, GS-27, St-12, S-2 i C-5. Pored ovih izolata korišćena su i dva referentna izolata dobijena iz Centra za poljoprivredna proučavanja, Rothamsted, iz Velike Britanije, a označeni su sa L.m (*Leptosphaeria maculans*) i L.b (*Leptosphaeria biglobosa*). Izolati koji su izolovani u Vojvodini označeni su početnim slovom biljnog dela (K-koren, C-cvet, L-list, S-seme) sa koga su izolovani, izuzev izolata sa stabla koji su označeni sa dva slova (St-prizemno stablo do 30 cm visine, GS-gornji delovi stabla i grana i Lj-ljuska). Nakon toga, izolati su presejani na kosu PDA podlogu i čuvani na temperaturi $+ 4^{\circ}\text{C}$.

Morfološke karakteristike

Na PDA podlozi pri temperaturi $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ proučavane su makroskopske osobine izolata (12 izolovanih i 2 kontrolna) gljive (porast, izgled i boja micelije, izgled ivice kolonije, prisustvo plodonosnih tela, miris i lučenje pigmenta), kao i mikroskopske odlike (građa i izgled micelije, veličina, oblik i boja piknida i piknospora) (Muntanjola-Cvetković 1987). Porast micelije navedenih izolata je izražen u cm posle 5, 10 i 15 dana. Ogled je postavljen u četiri ponavlja

Rezultati istraživanja

Morfološke karakteristike proučavanih izolata

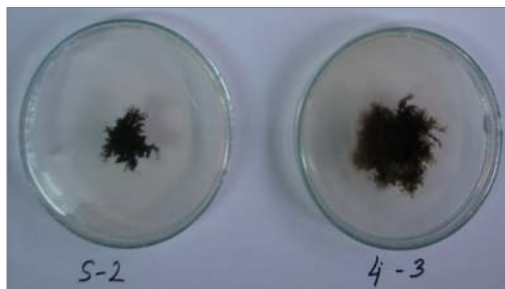
Na PDA podlozi posle 5 dana (na temperaturi $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) izolati (L.m, St-12, LJ-3, L-10, C-5, GS-27, S-2, K-8) obrazuju okruglasto nepravilne kolonije sa režnjevitim obodom. Micelija je rastresita bele do prljavo bele boje. Supstratna micelija je prljavo bele boje i nepravilnog oblika. Kod druge grupe izolata (L.b, K-112, K-113, K-114, K-115, K-117) vazдушna micelija je prljavo bele boje, a kolonije su okruglastog oblika. Supstratna je takođe prljavo bele boje okruglastog oblika sa ravnim obodom.

Posle 10 dana (L.m, L-10, LJ-3, K-8, GS-27, St-12, S-2, C-5) kolonije imaju nepravilan okruglastorežnjevit do režnjevit oblik sa nepravilnim i nazubljenim ivicama. Centralni deo kolonije je crne boje, koja potiče od obrazovanih piknida, dok je rubni deo prljavo bele boje. Supstratna kolonija je takođe, po obliku nepravilna, crna (mrka) boje, nazubljenih ivica sa rubom prljavo bele boje. Kod izolata L.b, K-112, K-113, K-114, K-115, K-117 vazдушna kolonija je okruglastog oblika, po ivicama nazubljena. Centralni deo kolonije je žutomrke boje, dok je rub prljavo bele, sa početkom formiranja sporeosnih tela. Supstratna kolonija je okruglasta, sa pojavom žutomrke pigmenta u centralnom delu, dok je rub prljavo bele boje nazubljenih ivica.

Posle 15 dana (L.m, L-10, LJ-3, K-8, GS-27, St-12, S-2, C-5) vazдушna kolonija zbog obilne fruktifikacije, ima mrku boju, a samo pojedini delovi ruba kolonije su prljavo bele boje. Sa starošću rubni deo kolonije postaje sve nepravilniji. Izgled vazdušne i supstratne kolonije (LJ-3 i S-2) ispitivanih izolata je prikazan na slikama 1 i 2.

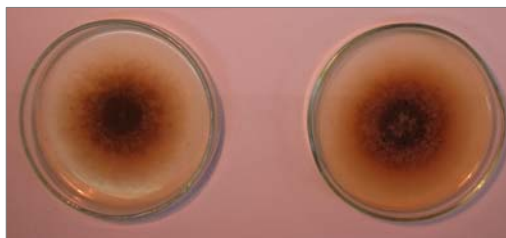


Slika 1. Izgled vazdušne kolonije na PDA podlozi kod (S-2 i LJ-3) izolata

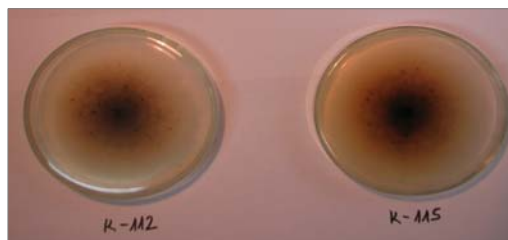


Slika 2. Izgled supstratne kolonije na PDA podlozi kod (S-2 i LJ-3) izolata

Posle 15 dana (L.b, K-112, K-113, K-114, K-115, K-117) u supstratnom delu kolonije je došlo do intenzivnijeg formiranja žutomrkog pigmenta. Vazдушna kolonija je sivomrka, dok je rub kolonije prljavobele boje. Izgled vazdušne i supstrate kolonije kod ispitivanih izolata K-112 i K-115 je prikazan na slikama 3 i 4. Piknidi su okruglasti, mrke boje, pojedinačni ili u stromatičnim tvorevinama. Prečnik piknida kod L.b, K-112, K-113, K-114, K-115 i K-117 izolata se kretao od 240-480 μm, a kod izolata L.m, L-10, LJ-3, K-8, GS-27, St-12, S-2, C-5, od 220 x 510 μm.



Slika 3. Izgled vazdušne kolonije na PDA podlozi kod K-112 i K-115 izolata



Slika 4. Izgled supstrate kolonije na PDA podlozi kod K-112 i K-115 izolata

Piknospore se oslobađaju iz piknida u vidu jedne želatinozne kapi, krem do ružičaste boje (Sl. 5). Piknospore su jednoćelijske, hijalne, kratko cilindrične, uglavnom prave, neke malo povijene, sa ili bez kapi ulja na krajevima veličine 1,30 x 2,20 x 2,80–5,40 μm, uglavnom kod svih ispitivanih izolata. Porast micelije i sporulacija ispitivanih izolata prikazan je u tabeli 1.



Slika 5. Izgled želatinoznih, ružičasto-crvenkastih kapi piknospora oslobođenih iz piknida na zaraženom stablu uljane repice

Tabela 1. Prečnik (cm) i sporulacija kolonija ispitivanih izolata *L. maculans* i *L. biglobosa* na PDA podlozi i temperaturi $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$

Izolati	Posle 5 dana	Sporulacija	Posle 10 dana	Sporulacija	Posle 15 dana	Sporulacija
L.b	1,55	-	4,30	-	9	+
K-112	1,57	-	4,02	+	9	+
K-113	1,50	-	4,42	+	9	+
K-114	1,50	-	4,35	+	9	++
K-115	1,60	-	4,40	+	9	++
K-117	1,57	-	4,45	-	9	+
L-10	1,67	-	2,35	+	4,10	+++
LJ-3	1,73	-	2,60	+	4,55	+++
K-8	1,57	-	2,95	++	4,60	+++
L.m	1,51	-	3,30	++	4,70	+++
St-12	1,48	-	2,95	++	3,90	+++
S-2	1,40	-	2,32	+	2,70	+++
C-5	1,80	-	2,42	++	4,05	+++
GS-27	1,50	-	2,40	+	3,05	+++

- Nema sporulacije; + Slaba sporulacija; ++ Srednja sporulacija; +++ Jaka sporulacija

Na osnovu tabele 1 može se zapaziti da izolati (L.b, K-112, K-113, K-114, K-115, K-117) imaju brz porast na PDA podlozi. Sporulacija kod izolata (L.m, L-10, LJ-3, K-8, St-12, S-2, C-5 i GS-27) je dosta slabija u odnosu na grupu izolata koji pripadaju. Razlike u porastu koje se mogu zapaziti između ispitivanih izolata su zbog reznjevitog izgleda kolonija prilikom merenja.

Diskusija

Na PDA podlozi u početnim fazama razvoja, a i kasnije, svi ispitivani izolati (L.m, L-10, LJ-3, K-8, GS-27, St-12, S-2, C-5, L.b, K-112, K-113, K-114, K-115, K-117), stvaraju vazдушnu miceliju sivobeke boje dok je supstratna micelija u početku mlečnobeke boje, što je u skladu sa Williams & Fitt (1999) i Fitt et al. (2006). Vremenom dolazi do stvaranja bledocrnog pigmenta u podlozi kod izolata (L.m, L-10, LJ-3, K-8, GS-27, St-12, S-2, C-5) (Pound 1947; Humpherson-Jones, 1986; Williams & Fitt 1999; Mitrović i Marinković 2007), dok izolati (L.b, K-112, K-113, K-114, K-115, K-117) stvaraju i na PDA podlozi žutomrki pigment (Fitt et al. 2006; Hony et al. 2009).

Izolati (L.m, L-10, LJ-3, K-8, GS-27, St-12, S-2, C-5) imaju spor i nepravilan porast na PDA podlozi, sa rubom koji je često sa reznjevitim ivicama, što je u skladu sa Pound (1947), Koch et al. (1989), Mitrović i Marinković (2007), Williams & Fitt (1999), dok L.b, K-112, K-113, K-114, K-115, K-117, imaju brz porast sa dosta pravilnim rubom (McGee & Petrie 1978, Humpherson-Jones 1983, 1986). Brun et al. (1997) navode da u odsustvu RFLP analize a na osnovu virulentnosti, produkcije pigmenta i stvaranja fitotoksina sirodezmin PI svi izolati se mogu svrstati u dve grupe: grupa A i B. Koch et al. (1989) navodi da izolati A grupe (*L. maculans*) imaju spor i nepravilan porast na nizu agarizovanih podloga, dok izolati B grupe (*L. biglobosa*) imaju brz i pravilan porast.

Međutim, postoji saopštenje da neki izolati A grupe (*L. maculans*) imaju brži porast od B grupe (*L. biglobosa*) izolata, te na bazi brzine porasta na podlogama ih je teško razlikovati (Delwiche 1980 cit. loc. Williams 1992, Kharbanda & Stevens 1993, Salisbury et al. 1995). Ipak, na osnovu morfoloških i biohemijskih karakteristika Koch et al. (1989), Petrie (1988), Hill et al. (1984) su izolate podelili u dve grupe agresivne i neagresivne sojeve.

Svi ispitivani izolati na PDA podlozi formiraju okruglaste piknide, mrke boje, pojedinačno ili u stromatičnim tvorevinama. Prečnik piknida kod L.b, K-112, K-113, K-114, K-115, K-117 izolata se kreće od 240 do 480 μm , a kod izolata L.m, L-10, LJ-3, K-8, GS-27, St-12, S-2, C-5 od 220 do 510 μm što je u skladu sa (Punithalingam and Holliday 1972, Hong et al. 2009). Piknospore iz piknida se oslobađaju u vidu jedne želatinozne mase krem do ružičaste boje. Piknospore su bezbojne kratko cilindrične jednočelijske uglavnom prave neke malo povijene sa ili bez kapi ulja na krajevima veličine 1,302,20x2,805,40 μm . Slične rezultate navode i drugi autori (Punithalingam i Holliday 1977; Williams 1992; Mitrović i Marinković 2007; Hong et al. 2009).

Zaključak

U morfološkom pogledu od 12 ispitivanih izolata 5 izolata (K-112, K-113, K-114, K-115 i K-117) ima pravilan i brz porast na PDA podlozi u odnosu na (L-10, LJ-3, K-8, GS-27, St-12, S-2 i C-5) izolate. Micelija kod svih izolata je prljavo bele boje. Veličina oblik i boja kod svih izolata je ista s tim da je veličina piknida nešto manja kod K-112, K-113, K-114, K-115 i K-117. Izolati L-10, LJ-3, K-8, GS-27, St-12, S-2 i C-5 na PDA podlozi obilnije sporulišu u odnosu na K-112, K-113, K-114, K-115 i K-117. Na osnovu morfoloških karakteristika se može zaključiti da izolati (K-112, K-113, K-114, K-115 i K-117) pripadaju vrsti *Leptosphaeria biglobosa* dok (L-10, LJ-3, K-8, GS-27, St-12, S-2 i C-5) vrsti *Leptosphaeria maculans*.

Napomena

Ovaj rad je deo projekta TR31025 koji se finansira od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Literatura

- Brun H, Levivier S, Eber F, Renard M, Chevre A M (1997): Electrophoretic analysis of natural populations of *Leptosphaeria maculans* directly from leaf lesions. *Plant Pathology* 46 147-154.
- Fitt L D B, Brun H, Barbetti J M, Rimmer R S (2006): World-wide importance of phoma stem canker (*Leptosphaeria maculans* and *L. biglobosa*) on oilseed rape (*Brassica napus*). *European Journal of Plant Pathology* 114: 3-15.
- Humperson-Jones F M (1983): Pathogenicity studies on isolates of *Leptosphaeria maculans* from brassica seed production crops in south-east England. *Annals of Applied Biology* 103: 37-44.

- Humperson-Jones F M (1986): The occurrence of virulent pathotypes of *Leptosphaeria maculans* in *brassica* seed crops in England. *Plant Pathology* 35: 224-231.
- Hill C B, Xu X H, Williams P H (1984): Correlations of virulence growth rate pigment production and allozyme banding patterns which differentiate virulent and avirulent isolates of *Leptosphaeria maculans*. *Eucarpia. Cruciferae News* 9: 79 .
- Hong S K, Kim W G, Shin D B, Choi H W, Lee Y K, Lee S Y. (2009): Occurrence of stem canker on rape caused by *Leptosphaeria biglobosa* in Korea. *Plant Pathol. J.* 25(3): 294-298.
- Kharbanda P D, Stevens R R (1993): Seed testing for blackleg of Canola. Vegreville AB Canada: AECV93-E1.
- Koch E, Badaway A M H, Hope H H. 1989 □ Differences between aggressive and non aggressive single spore lines of *Leptosphaeria maculans* in cultural characteristics and phytotoxin production. *J. Phytopathol.* 124: 52-62.
- McGee D C, Petrie G A (1978): Variability of *Leptosphaeria maculans* in relation to blackleg of oilseed rape. *Phytopathology* 68: 625 – 630.
- Mitrović P (1997): Paraziti kupusa. Magistarska teza. Poljoprivredni fakultet, Novi Sad
- Mitrović P, Marinković R. (2007): *Phoma lingam* – a rapeseed parasite in Serbia. Proc. of the 12th Intern. Rapeseed Congress Wuhan China. March 26-30 2007/ IV □ 217-219.
- Muntanola-Cvetković, M. (1987): Opšta mikologija. Književne novine, Beograd
- Petrie G A. (1988): The rapid differentiation of virulent and weakly virulent strains of *Leptosphaeria maculans* (blackleg or stem canker) and related pycnidial fungi from *Brassica* seeds and stems. *Can. J. Plant Pathol.* 10: 188-190.
- Pound S G. (1947): Variability in *Phoma lingam*. *Journal of agricultural research.* vol. 754: 113-133.
- Punithalingam E, Holliday E (1972): *Leptosphaeria maculans* CMI Descriptions of pathogenic fungi and Bacteria. No. 331.
- Salisbury P A, Ballinger D J, Wratten N, Plummer K M, Howlett B. (1995): Blackleg disease on oilseed *Brassica* species in Australia: a review. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 35: 665-72.
- Williams P H. (1992): Biology of *Leptosphaeria maculans*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 14: 30-35.
- Williams H R, Fitt L D B. (1999): Differentiating A and B groups of *Leptosphaeria maculans* casual agent of stem canker (blackleg) of oilseed rape. *Plant Pathology* 48: 161-175

MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF PLANT PATHOGENIC FUNGUS *Leptosphaeria maculans* and *Leptosphaeria biglobosa* CAUSE OF CANCER STEM RAPESEED IN SERBIA

Petar Mitrović¹, Željko Milovac¹, Milan Jocković¹, Ana Marjanović-Jeromela¹, Nenad Dušanić¹, Radovan Marinković¹

Abstract

Cancer stem and blackleg is economically the most important disease of oilseed rape worldwide. This disease is caused by two species of plant pathogenic fungi of the genus *Leptosphaeria*: *Leptosphaeria maculans* (Desm.) ces. and de Not anamorf *Phoma lingam* (Tode. Fr.) Desmas, i *Leptosphaeria biglobosa* Shoem and Brun. On nutrient PDA medium at 25 ± 1 ° C were studied morphological traits (growth, appearance and color of mycelia, set the edge colonies, the presence of fruiting bodies, the smell and the secretion of pigment, the size, shape and color of pycnidia and piknospora) 12 isolates (isolated in Serbia K -112, K-113, K-114, K-115, K-117, K-8, LJ-3, L-10, GS-27, St-12, S-2 and C-5) and control 2 (Lm, Lb) mushrooms. Isolates K-112, K-113, K-114, K-115, K-117 having a quick and regular increase, secreted yellow brown pigment, while K-8, LJ-3, L-10, GS-27, ST-12, S-2 and C-5 form irregular colonies with no pigment, have slow growth and abundant sporulation. The experiment was set up in the four repeats and mycelial growth isolates listed was measured in cm after 5, 10 and 15 days.

Key words: isolates, *Leptosphaeria maculans*, *Leptosphaeria biglobosa*, morphological characteristics, nutrient medium

¹ Institute of Field and Vegetable Crops, Novi Sad, Serbia