

UDK 633.34 :561.28Fusarium

Gljive iz roda *Fusarium* na semenu soje

- Originalni naučni rad -

Slađana MEDIĆ-PAP¹, Mirjana MILOŠEVIĆ¹ i Stevan JASNIĆ²

¹Nacionalna laboratorija za ispitivanje semena, Novi Sad

²Naučni institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad

Izvod: Gljive roda *Fusarium* izolovane su iz semena četiri sorte soje: Afrodita, Ravnica, Balkan i Vojvodanka. Determinacija je izvršena na bazi morfoloških i odgajivačkih karakteristika pri čemu je utvrđeno da izolati pripadaju sledećim vrstama: *F. graminearum*, *F. semitectum*, *F. equiseti*, *F. sporotrichioides*, *F. acuminatum* i *F. proliferatum*. Provera patogenosti ovih gljiva je ispitana na sterilnom filter papiru u laboratoriji i u sterilnom supstratu u staklari. Na osnovu rezultata inokulacionih oglada utvrđeno je da su svi izolati u manjoj ili većoj meri ispoljili patogenost prouzrokujući trulež semena, nekrozu klice i propadanje ponika ili zaostajanje biljaka u porastu.

Ključne reči: *Fusarium* spp., seme, soja.

Uvod

Sinclair i *Backman*, 1989, navode da su iz semena soje izolovane sledeće vrste iz roda *Fusarium*: *F. dimerum*, *F. equiseti*, *F. graminearum*, *F. moniliforme*, *F. oxysporum*, *F. rigiusculum*, *F. semitectum* i *F. solani*. U našoj zemlji postoji mali broj podataka o pojavi i intenzitetu štetnosti gljiva iz roda *Fusarium* na semenu soje pošto se ove gljive javljaju sporadično i intenzitet zaraze zavisi od vremenskih uslova tokom vegetacije. Iz tog razloga cilj ovih istraživanja bio je utvrđivanje zaraženosti semena, determinacija i provera patogenosti vrsta iz roda *Fusarium* izolovanih iz semena soje.

Materijal i metod

Izolacija gljiva roda *Fusarium* vršena je iz semena četiri sorte soje: Afrodita, Ravnica, Balkan i Vojvodanka. Tokom dve godine ispitano je 75 uzoraka *J. Sci. Agric. Research/Arh. poljopr. nauke* 67, 239 (2006/3), 35-45

semena iz različitih lokacija u Vojvodini. Izolacija na hranljivu PDA podlogu, pH 4,5 (APDA), vršena je stavljanjem slučajno odabranih 100 semena soje po uzorku. Seme je prethodno površinski sterilisano u 1% rastvoru NaOCl. Za izolaciju po jednom uzorku je korišćeno 20 Petri kutija sa po 5 semena u svakoj. Inkubacija je vršena na temperaturi od 25°C bez prisustva svetla tokom sedam dana.

Gljive iz roda *Fusarium* koje su se razvile iz semena, u cilju dobijanja monospornih izolata presejani su na CLA podlogu, **Fisher i sar.**, 1982. Ovi izolati su gajeni na sobnoj temperaturi pod veštačkim ultravioletnim svetlom (tri neonske cevi od 40 W uz dodatak tzv. crne lampe (*black light* - Philips TLD 36W/08). Dobijeni monosporni izolati, **Hansen i Smith**, 1932, zasejavani su u po dve Petri kutije na PDA i CLA podlogu. Nakon 10 do 14 dana posle zasejavanja ovi izolati su korišćeni za ispitivanje morfoloških svojstava i determinaciju vrste. Taksonomske karakteristike su utvrđene na osnovu izgleda kolonija gljiva na PDA podlozi i formiranja konidija, konidiofora i hlamidospora na CLA podlozi, **Nelson i sar.**, 1983, i **Burgess i sar.**, 1994.

Ispitivanje patogenosti. - Za ispitivanje patogenosti gljiva iz roda *Fusarium* korišćeno je 6 izolata i to: 4/21 (*F. graminearum*), 19/14 (*Fusarium semitectum*), 6/20 (*Fusarium equiseti*), 2/14 (*Fusarium sporotrichioides*), 7/14 (*Fusarium acuminatum*) i 51/9 (*Fusarium proliferatum*).

Seme soje sorte Balkan površinski sterilisano 1% rastvorom NaOCl je korišćeno za ispitivanje patogenosti odabranih izolata. Ovo seme je potopljeno u suspenziju konidija pet sati. Seme u kontrolnoj varijanti bilo je potopljeno u sterilnu vodu. Koncentracija spora u suspenziji određena je Türk-Bürkerovom pločicom i podešena na 1×10^6 konidija/ml. Klijanje konidija praćeno je na predmetnoj pločici u kapi suspenzije.

Ogled na filter papiru je postavljen u pet ponavljanja sa po 20 semena u svakom odnosno ukupno 100 semena. Seme je naklijavano u termostatu pri temperaturi od 25°C u odsustvu svetla. Nakon 7 dana utvrđena je klijavost semena, ukupna dužina klice i nekroze na klicama i opisani su simptomi.

Ogled u sterilnom supstratu je izveden u četiri ponavljanja. Jedno ponavljanje je predstavljalo jednu saksiju sa sterilnim supstratom u koju je zasejano po 10 veštački inokulisanih semena soje. Saksije sa semenom su postavljene u staklari na temperaturi od 24°C. Ocena ogleda izvršena je nakon 14 dana. Pri ocenjivanju evidentiran je: ukupan broj izniklih biljaka, biljaka sa simptomima i zdravih biljaka.

Dobijeni rezultati su statistički obrađeni putem ANOVA u programu Costat. Poređenje srednjih vrednosti tretmana izvršeno je Duncan testom za prag značajnosti 0,05.

Rezultati i diskusija

Simptomi na semenu. - Seme zaraženo gljivama iz roa *Fusarium* je najčešće bez vidljivih simptoma. Ukoliko je seme jače zaraženo može biti slabije naliveno, sitnije i šturo. Na semenu zaraženom gljivom *F. graminearum* se može javiti

crvenoroze obojavanje semenjače. Nakon sedam dana razvoja na APDA podlozi zaražena semena bivaju prekrivena micelijom parazita.

Izolacija i determinacija sa semena gljiva iz roda *Fusarium*. - Izolacijom iz semenu soje utvrđeno je prisustvo sledećih vrsta iz roda *Fusarium*: *F. graminearum*, *F. acuminatum*, *F. sporotrichioides*, *F. semitectum*, *F. proliferatum* i *F. equiseti*. Najčešće izolovane vrste bile su: *F. semitectum* i *F. graminearum*. Ostale vrste bile su prisutne u značajno nižem procentu.

Na PDA podlozi izolat 4/21 formira bujnu i gustu ružičasto belu miceliju, koja starenjem po površini postaje žuta. Supstratna micelija je intenzivno karmincrvena. Izolat na CLA podlozi obrazuje razgranate monofijalide sa makrokonidijama, skoro paralelnih zidova sa 3-5 ređe 6 jasno vidljivih septi (Slika 1). Na osnovu morfoloških karakteristika utvrđeno je da izolat 4/21 pripada vrsti *F. graminearum*.



Slika 1. *F. graminearum* (izolat 4/21) makrokonidije (x 1260)

F. graminearum (strain 4/21) macroconidia (x 1260)

Kolonije izolata 19/14 na PDA podlozi su bujne i vataste. Vazдушna micelija je krem boje, a supstratna micelija stvara pigment žute boje koji kasnije dobija svetlomrku nijansu. Na CLA podlozi izolat 19/14 obrazuje svetlo narandžaste sporodohije na kojima se formiraju makrokonidije srpastog oblika blago povijene sa bazalnim ćelijama u obliku stopala (*foot-shaped*) (Slika 2a). Na vazdušnoj miceliji izolata obrazuju se vretenaste, uglavnom prave makrokonidije paralelnih zidova. Bazalna ćelija makrokonidija se završava papilom (Slika 2b). Makrokonidije se nalaze u parovima formirajući veoma karakterističan oblik u vidu zečjijih ušiju (*rabbit-ear*) (Slika 2c). Na osnovu morfoloških karakteristika utvrđeno je da izolat 19/14 pripada vrsti *F. semitectum*.

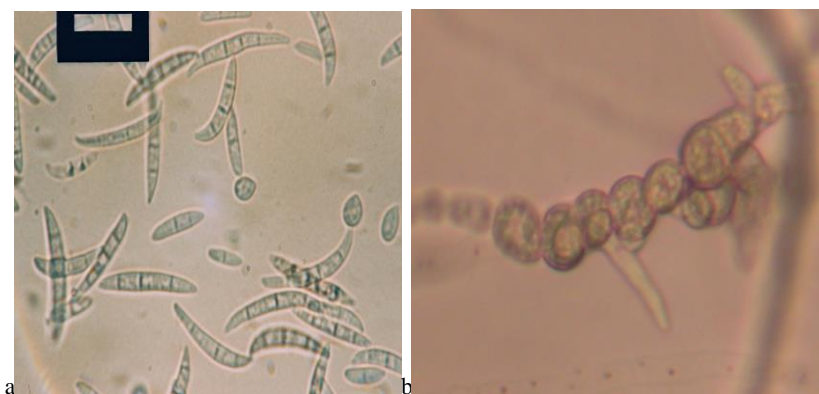
Na PDA podlozi izolat 2/14 obrazuje bujnu svetloroza vazдушnu miceliju koja je u središnjem delu žute boje. Supstratna micelija je intenzivno karmincrveno obojena. Na CLA podlozi obrazuje obilne narandžaste sporodohije na kojima se formiraju makrokonidije srpastog oblika sa 3-5 septi. Mikrokonidije se obrazuju obilno. One su ovalnog do kruškolikog i fusiformnog oblika sa 0-1 septom i bazom



Slika 2. *F. semitectum* (izolat 19/14) makrokonidije a) iz sporodohija (x 1260) b) formirane na vazdušnoj miceliji (x 630) c) u parovima (zečije uši) x 1260

F. semitectum (strain 19/14) macroconidia a) formed on sporodochia (x 1260) b) formed on aerial mycelium (x 630) c) in pairs (rabbit-ear) x 1260

sa papilom (Slika 3a). Hlamidospore se obilno formiraju u lancima (Slika 3b). Na osnovu morfoloških karakteristika utvrđeno je da izolat 2/14 pripada vrsti *Fusarium sporotrichioides*.



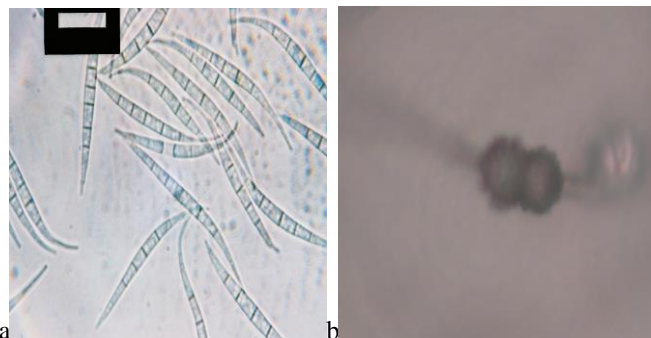
Slika 3. *Fusarium sporotrichioides* (izolat 2/14) a) makrokonidije i mikrokonidije (x1000)

b) hlamidospore formirane u lancu (x1260)

Fusarium sporotrichioides (strain 2/14) a) macroconidia and microconidia (x1000)

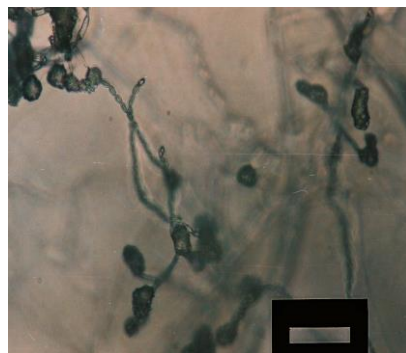
b) chlamidospores in chain (x1260)

Izolat 6/20 na PDA podlozi formira uniformnu vazdušnu miceliju krem boje i mrku supstratnu miceliju. Na CLA podlozi ovaj izolat obrazuje obilne svetlonarandžaste sporodohije. Makrokonidije su septirane (5-7 septi), tankih zidova. Apikalna ćelija je izdužena i jako povijena, dok je bazalna ćelija izdužena i u obliku stopala (Slika 4a). Hlamidospore su tamnomrke sa nazubljenim zidovima. Obrazuju se obilno najčešće u grupama po dve (Slika 4b). Na osnovu morfoloških karakteristika utvrđeno je da izolat 6/20 pripada vrsti *Fusarium equiseti*.



Slika 4. *Fusarium equiseti* (izolat 6/20) a) makrokonidije (x 1000) b) hlamidospore (x1260)
Fusarium equiseti (strain 6/20) a) macroconidia (x 1000) b) chlamidospores (x1260)

Na PDA podlozi izolat 51/9 formira bledoroze vazdušnu miceliju. Supstratna micelija je svetlo do tamnoljubičaste boje, a u starijoj kulturi postaje skoro crna. Na CLA podlozi mikrokonidije se formiraju u obliku lanaca i lažnih glavica. Lanci mikrokonidija se obrazuju na polifijalidama i imaju karakterističan "V" oblik (Slika 5). Mikrokonidije su većinom jednoćelijske, dok se retko mogu uočiti i dvoćelijske. Oblik im je veoma varijabilan, ali najčešće su jajaste ili ovalne sa izduženom i zaravnjenom osnovom. Makrokonidije se obrazuju na monofijalidama i veoma su retke, izdužene tanke, skoro prave obično imaju 3-5 septi. Na osnovu morfoloških karakteristika utvrđeno je da izolat 51/9 pripada vrsti *F. proliferatum*.



Slika 5. *F. proliferatum* (izolat 51/9) mikrokonidije u lancima i lažnim glavicama (in situ) (x400)
F. proliferatum (strain 51/9) microconidia in chains and false heads (in situ) (x400)

Na PDA podlozi izolat 7/14 obrazuje vazdušnu miceliju svetloroze boje. Supstratna micelija je intenzivno karmincrveno obojena. Makrokonidije se formiraju u sporodohijama na nerazgranatim monofijalidama. One su veoma izdužene, sa debelim zidovima i naglašenom dorzoventralnom krivinom i pretežno pet septi. Bazalna ćelija im je u obliku stopala, dok je apikalna u vidu zarezeta (Slika 6). Na osnovu morfoloških karakteristika utvrđeno je da izolat 7/14 pripada vrsti *F. acuminatum*.



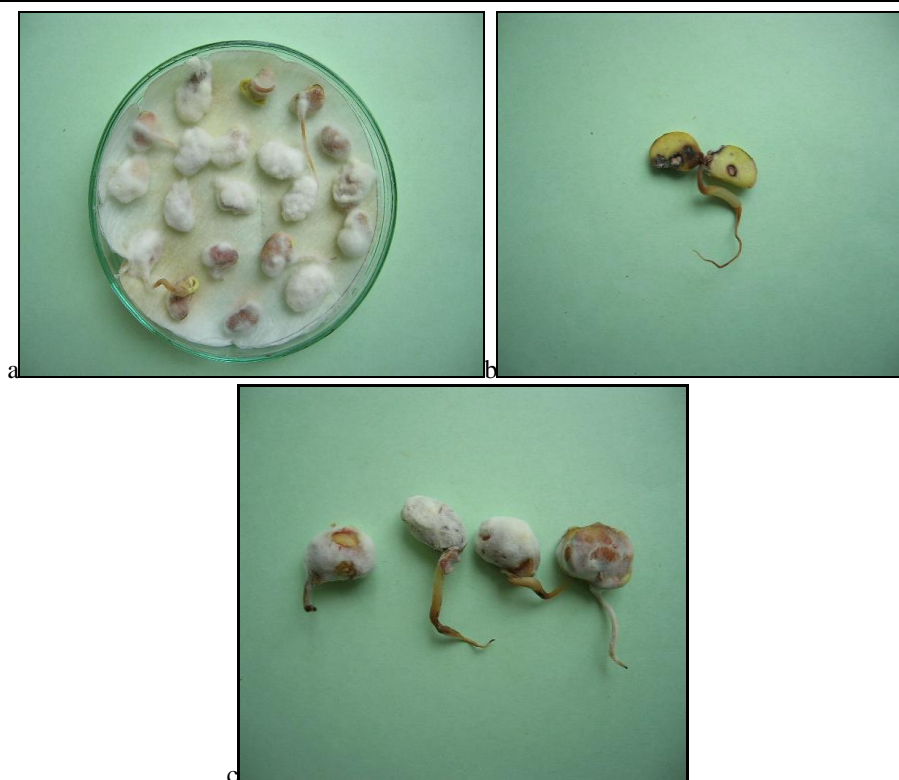
Slika 6. *F. acuminatum* (izolat 7/14) makrokonidije (x 1000)
F. acuminatum (strain 7/14) macroconidia (x 1000)

Provera patogenosti gljiva iz roda *Fusarium* na filter papiru i u sterilnom supstratu. - Iz Tabele 1 uočava se da su svi izolati vrsta iz roda *Fusarium* prilikom provere patogenosti na filter papiru značajno uticali na smanjenje klijavosti semena soje u odnosu na kontrolnu varijantu. Najveći stepen patogenosti ispoljili su izolati 2/14 (*F. sporotrichioides*) i 7/14 (*F. acuminatum*). Svi ispitani izolati su takođe uticali i na smanjenje prosečnih dužina klica i prouzrokovali su značajne nekroze na klicama (Tabela 1).

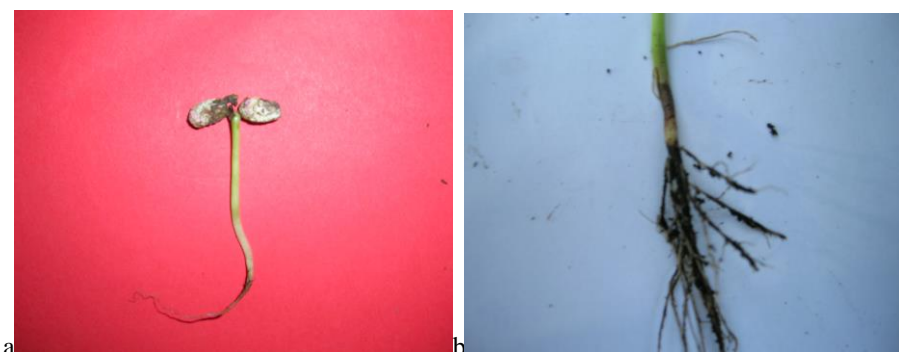
Simptomi prouzrokovani različitim vrstama iz roda *Fusarium* na semenu soje su bili veoma slični. Neklijalo seme je u potpunosti bilo prekriveno micelijom izolata (Slika 7a). Na iskljalom veštački zaraženom semenu simptomi truleži su se mogli uočiti na kotiledonima, klici i prvim listovima (Slike 7b i c).

Rezultati oglada sa veštačkom zarazom semena u zemljištu pokazuju da su svi ispitani izolati gljiva iz roda *Fusarium* u manjoj ili većoj meri uticali na propadanje ponika soje kao i na pojavu truleži semena. Stepenn patogenosti izolata je bio ujednačen. Seme inokulisano izolatom 4/21 *F. graminearum* imalo je međutim najmanji broj iskljalih biljaka. Svi izolati su usporili klijanje semena, a zatim uticali na propadanje ponika (Tabela 1).

Simptomi prouzrokovani različitim vrstama roda *Fusarium* na mladim izniklim biljkama bili su gotovo identični. Kod veštački zaraženog semena dolazilo je do propadanja klice, te ona nisu klijala. Na iskljalim biljkama ispoljava se truleži ili nekroza kotiledona, hipokotila i korenčića klice. Napadnute biljke veoma zaostaju u porastu i suše se (Slike 8a i b).



Slika 7. Simptomi na a) semenu *F. proliferatum* (izolat 51/9) b) na kotiledonima *F. graminearum* (izolat 4/21) c) na klici *F. sporotrichioides* (izolat 2/14)
Symptoms a) *F. proliferatum* (strain 51/9) on seed b) *F. graminearum* (strain 4/21) on cotyledons c) *F. sporotrichioides* (strain 2/14) on germ



Slika 8. *F. graminearum* (izolat 4/21) a) simptomi na poncima b) simptomi na korenu i prizemnom delu stabla
F. graminearum (strain 4/21) a) symptoms on seedlings b) symptoms on root and lower part of stem

U domaćoj literaturi ima mali broj podataka o pojavi i štetnosti gljiva iz roda *Fusarium* na soji pošto se ove gljive javljaju sporadično, a intenzitet zaraze zavisi od vremenskih uslova tokom vegetacije, **Tošić i sar.**, 1986, **Aćimović**, 1988, **Komnenić**, 1989, **Jasnić i sar.**, 2005. Daleko veća zastupljenost ovih gljiva na semenu je u humidnijim i toplijim područjima kao što je Južna Amerika, **Avilla i sar.**, 2003, **Braccini i Dhingra**, 1996. Prema mnogim autorima gljive iz roda *Fusarium* mogu da u laboratorijskim uslovima pri veštačkim infekcijama semena različitim metodama (filter papir, metod hladnog naklijavanja u zemljištu i dr.) izazovu simptome truleži i propadanje semena i mladih biljaka soje.

Gally i sar., 1998, ukazuju da trulež plumule (terminalnog pupoljka) prouzrokuju tri vrste iz roda *Fusarium* spp. (*F. oxysporum*, *F. equiseti* i *F. pallidoroseum*) kao i da ove gljive dovode do truleži semena i lezija na kotiledonima i hipokotilu biljaka isključivo iz zaraženog semena. **Roy i Ratnayake**, 1997, su dokazali patogenost devet od jedanaest izolata *F. pallidoroseum*. **Yasem de Romero i sar.**, 2002 su utvrdili patogenost tri vrste gljiva iz roda *Fusarium* (*F. graminearum*, *F. solani* i *F. oxysporum*) veštačkim zaražavanjem semena i površine zemljišta. Slabiji porast nadzemnog dela i korena zaraženih biljaka i u našim ogledima bio je evidentan u odnosu na biljke iz kontrole.

Pioli i sar., 2004, vrše veštačke inokulacije biljaka starih 14 dana izolatima *F. graminearum* iz semena i stabla soje. Prosečan procenat uginulih biljaka bio je 42% kod izolata sa stabla i 21% kod izolata iz semena. Na biljkama su se javili simptomi uvenuća, svetlomrke nekroze oko mesta inokulacije, hloroze između nerava listova i gubitak turgora prostih listova. **Martinelli i sar.**, 2002, dokazuju da izolati *F. graminearum* dobijeni iz semena soje mogu biti patogeni na biljkama soje i pšenice. Ovi izolati su prouzrokovali trulež mahuna i korena isptivanih sorti soje i fuzarioze klasa pšenice.

Koristeći različite metode inokulacije semena i biljaka gljivama *F. oxysporum* i *F. graminearum* **Komnenić**, 1991, je dobila simptome nekrotiranja i sušenja korena i hipokotila ponika što je dovelo i do delimičnog propadanja biljaka. Biljke čije seme nije istrulilo zaostajale su u porastu u odnosu na zdrave biljke u kontroli.

I u našim ogledima biljke koje su nikle iz veštački inokulisanog semena gljivama iz roda *Fusarium* ispoljile su veoma slične simptome koje su opisali pomenuti autori.

Zaključak

Iz semena soje su izolovane sledeće gljive iz roda *Fusarium*: *F. graminearum*, *F. acuminatum*, *F. sporotrichioides*, *F. semitectum*, *F. proliferatum* i *F. equiseti*. Proverom patogenosti utvrđeno je da su svi izolati ispoljili veću ili manju patogenost u laboratorijskim uslovima utičući na smanjenje klijavosti, prosečne dužine klice i prouzrokujući značajne nekroze na klicama.

Literatura

- Aćimović, M.** (1988): Prouzrokovaci bolesti soje i njihovo suzbijanje, izd. Naučna knjiga, Beograd.
- Avilla, M., A. Braccini, I. Motta, C. Scapim and L. Braccini** (2003): Sowing season and quality of soybean seeds. *Sci. Agr.* **60** (2): 1-13.
- Braccini, A., and O. Dhingra** (1996): Identification of fungi associated with soybean (*Glycine max* L. Merrill) and cucumber (*Cucumis sativus* L.) seeds by different detection methods. *Revista UNIMAR* 18: 495-503.
- Burgess, L., B. Summerell, S. Bullock, K. Gott and D. Backhouse** (1994): Laboratory Manual for *Fusarium* Research, 3rd ed. University of Sydney, Sydney, Australia.
- Fisher, N., L. Burgess, T. Toussoun and P. Nelson** (1982): Carnation leaves as a substrate for perserving cultures of *Fusarium* species. *Phytopathology* 72: 151-153.
- Gally, T., B. Gonzalez, M. Sobero y Rojo and G. Lori** (1998): Plumele soft rot caused by *Fusarium equiseti*, *F. oxysporum*, and *F. pallidoroseum* on soybean seedlings in Argentina. *Plant Dis.* 82: 1063.
- Hansen, H. and R. Smith** (1932): The mechanisms of variations in imperfect fungi: *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 37: 369-371
- Jasnić, S., M. Vidić, F. Bagi i V. Đorđević** (2005): Patogenost *Fusarium* vrsta na soji. *Zb. Matice srp. prir. nauke* 109: 113-121.
- Kommenić, M.** (1991): Parazitna mikoflora semena soje u SR Srbiji. Magistarski rad, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd-Zemun
- Martinelli, J., C. Bocchese, W. Xie, K. O'Donnell and C. Kistler** (2002): A Soybean Pod Blight and Root Rot Caused by Several Lineages of the *Fusarium graminearum* Species Complex, ed. Agriculture Research Service, Tektran.
- Nelson, P., T. Toussoun and W. Marasas** (1983): *Fusarium* species An Illustrated Manual for Identification, ed. the Pennsylvania State University Press, Park, PA, USA.
- Pioli, R., L. Mozzoni and E. Monadi** (2004): First report of pathogenic association between *Fusarium graminearum* and soybean. *Plant Dis.* 88: 220.
- Roy, K. S. and Ratnayake** (1997): Frequency of occurrence of *Fusarium pallidoroseum*, effects on seeds and seedlings and associations with other fungi in soybean seed and pods. *Can. J. Plant Pathol.* 19: 188-192.
- Sinclair, J. and P. Backman** (1989): Compendium of Soybean Diseases, 3rd ed. the American Phytopathological Society, St. Paul, MN, USA.
- Tošić, M., M. Panić, T. Stojanović i D. Antonijević** (1986): Bolesti soje na području SR Srbije u 1985. godini. *Zb. rad. Republičkog savetovanja o unapređenju proizvodnje soje, suncokreta i uljane repice, Arandelovac, 1986, Industrija biljnih ulja i proteina* str. 1-21.
- Yasem de Romero, M., A. Pasqualini, E. Romero and J. Ramallo** (2002): Aggressivness of three species of *Fusarium* in soybean. II Effects on initial growth of emerged plants. *Fitopatologia* 37: 120-127.

Fungi of the Genus *Fusarium* on the Soybean Seed

- Original scientific paper -

Sladana MEDIĆ-PAP¹, Mirjana MILOŠEVIĆ¹ and Stevan JASNIĆ²

¹National Laboratory for Seed Testing, Novi Sad

²Research Institute of Field and Vegetable Crops, Novi Sad

S u m m a r y

The isolation of fungi of the genus *Fusarium* was done using seeds of the four most commonly grown soybean varieties in the Vojvodina Province: Afrodita, Ravnica, Balkan and Vojvođanka. The analysis of morphological and growth properties confirmed that the isolates belonged to the following species: *Fusarium graminearum*, *F. semitectum*, *F. equiseti*, *F. sporotrichioides*, *F. acuminatum* and *F. proliferatum*. Pathogenicity of the fungi of the genus *Fusarium* was tested on the sterile filter paper in the laboratory and the sterile substrate in the glasshouse. All isolates on the filter paper decreased germination and the germ length in the inoculated seeds, and they also caused seed necrosis at a very high percentage. In the greenhouse, all isolates caused greater or lesser deterioration of soybean seedlings and the occurrence of rotten seeds.

Received: 03/03/2006

Accepted: 21/06/2006

Adresa autora:

Sladana MEDIĆ-PAP

Nacionalna laboratorija za ispitivanje semena

Maksima Gorkog 30

21000 Novi Sad

Srbija

Email: sladjam@ifvcns.ns.ac.yu