



Gibberella zae na semenu kantariona u Srbiji

Snežana Pavlović • Tatjana Stević • Mira Starović •
Dragana Jošić • Tatjana Popović • Maja Ignjatov • Saša Stojanović

received: 31 October 2011, accepted: 02 February 2012.

© 2012 IFVC

doi:10.5937/ratpov49-1164

Izvod: Ispitivanjem zdravstvenog stanja semena kantariona iz kolekcije Instituta za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“ proizvedenog tokom 2008. i 2009. godine u lokalitetima Pančevo, Gorobilje i Kačarevo, prvi put je u Srbiji utvrđeno prisustvo vrste *Gibberella zae* (anamorf *Fusarium graminearum*). Ova vrsta je identifikovana na osnovu makroskopskih i mikroskopskih osobina dobijenih monospornih izolata. Svi ispitivani izolati su u *in vitro* uslovima formirali peritecije, te su na osnovu ovog i drugih osobina identifikovani kao *F. graminearum* (syn. *F. graminearum* Grupa 2). Patogenost je potvrđena pojavom nekroze klijanaca nakon inokulacije semena kantariona.

Ključne reči: kantarion, *Gibberella zae*, *Fusarium graminearum*, morfološke osobine, patogenost

Uvod

Kantarion (*Hypericum perforatum* L.) je veoma zastupljena biljna vrsta u Srbiji (Menković et al. 2002, Šavikin-Fodulović et al. 2003), ali je zbog prekomerne eksploatacije svrstana u vrste čije se sakupljanje i promet kontrolišu (>Službeni glasnik RS<< 45/2005), da bi se osiguralo i sprečilo ugrožavanje njenog trajnog opstanka.

Sve veća potražnja kantariona u Srbiji nametnula je potrebu njegovog plantažnog gajenja. Primena hemijskih sredstava u proizvodnji lekovitog bilja nije dozvoljena, pa je setva zdravstveno ispravnog semena značajan preduslov uspešne proizvodnje lekovitog bilja. Seme lekovitih biljaka je pogodan supstrat za razvoj brojnih patogenih gljiva, među kojima vrste iz roda *Fusarium* zauzimaju značajno mesto (Pavlović et al. 2006).

Gibberella zae (Schwein.) Petch (anamorf: *Fusarium graminearum* Schwabe) je destruktivan

patogen, koji u znatnoj meri smanjuje klijavost zrna, prouzrokuje palež klijanaca i trulež korena (Jovičić & Milošević 1990, Chongo et al. 2001). Ima širok krug domaćina. Najviše ugrožava proizvodnju strnih žita i kukuruza, mada parazitira gajene biljke iz većeg broja rodova (Bagi 1999, Jovičić & Milošević 1990, Krnjaja et al. 2009, Lević et al. 2009, Petrović et al. 2010, Ignjatov et al. 2011).

Veliki napredak u identifikaciji vrsta roda *Fusarium* je ostvaren poslednjih decenija uvođenjem molekularnih metoda kao dopuna osnovnim morfološkim i fiziološkim osobinama (O'Donnell et al. 1998, Geiser et al. 2004, Zeller et al. 2004, Leslie & Summerell 2006). Bliža genetska karakterizacija i brzo razlikovanje *F. graminearum* od morfološki sličnih vrsta pripadnika *F. graminearum* kompleksa uspešno je rađena u našim uslovima sa izolatima poreklom sa sirka (Ristić et al. 2011).

Proučavanjem mikopopulacije semenakantariona (Pavlović et al. 2000, 2006) utvrđeno je prisustvo pet vrsta iz roda *Fusarium* (*F. oxysporum*, *F. proliferatum*, *F. sporotrichioides*, *F. subglutinans* i *F. verticillioides*). Tokom 2008. i 2009. izolovana je vrsta *Gibberella zae* (anamorf: *F. graminearum*), koja do sada nije bila poznata kao patogen semena kantariona, zbog čega je pristupljeno ispitivanju morfoloških osobina izolata i proveriti njihove patogenosti.

S. Pavlović* • T. Stević
Institute for Medicinal Plant Research "Dr. J. Pančić", Tadeuša Koščuška 1, 11000 Belgrade, Serbia
e-mail: spavlovic@mocbilja.rs

M. Starović • T. Popović • S. Stojanović
Institute for Plant Protection and Environment, Teodora Dražera 9, 11000 Belgrade, Serbia

D. Jošić
Institute of Soil Science, Belgrade, Teodora Dražera 7, 11000 Belgrade, Serbia

M. Ignjatov
Institute of Field and Vegetable Crops, Maksima Gorkog 30, 21000 Novi Sad, Serbia

Zahvalnica: Ovo istraživanje je izvršeno u okviru projekta TR31018 finansiranog od strane Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije

Materijal i metode

Uzorkovanje semena i izolacija gljive

Seme kantariona uzorkovano je iz kolekcije proizvedene 2008. i 2009. godine u Institutu za proučavanje lekovitog bilja "Dr Josif Pančić" u lokalitetima Pančevo, Gorobilje i Kačarevo. Uzorci su obrazovani od četiri grupe po sto semenki iz svake partije semena po standardnom postupku (Malone & Muskett 1964, ISTA 2003).

Seme je inkubirano na vlažnom filter papiru i krompir dekstroznoj podlozi (KDA) pri 25°C u mraku. Fragmenti micelije obrazovane na semenu preneti su u Petri kutije na krompir dekstroznu podlogu (KDA) nakon 7-10 dana (ISTA 2003). Makroskopskim i mikroskopskim pregledom kolonija odabrani su oni izolati koji ukazuju na prisustvo *F. graminearum*.

Monosporne kulture izolovane su po postupku Nirenberg & O'Donnell (1998) od čistih kultura izolata koji su gajeni na ravnoj KDA podlozi u uslovima prirodne smene dana i noći pri sobnoj temperaturi tokom 7 dana. Monosporne kulture su čuvane u epruvetama na kosim podlogama na temperaturi +4°C. Na ovaj način dobijen je veliki broj izolata, od kojih je za dalja istraživanja odabrano pet označenih kao K-60, K-62, K-65, K-59 i K-70.

Test patogenosti

Seme kantariona je površinski sterilisano sa 2% NaOCl u toku 2 minuta, a zatim isprano sterilnom destilovanom vodom i prosušeno na filter papiru. Sterilisano seme je potapano u suspenziju konidija

(10^3 ml^{-1}) od svakog izolata u toku 12 h. Suspenzija konidija je pripremljena od kultura starih 10 dana odgajenih na KDA pri temperaturi od 25°C (Molt & Simone 1967). Kontrolna semena su potapana u sterilnu destilovanu vodu. Po 200 semena inokulisano sa svih pet izolata posejano je u saksije sa sterilnim substratom. Posle 30 dana, substrat je prosejan i stepen nekroze iskljalih biljaka je ocenjen po skali od 0-3, gde je 0 = nema promene, 1 = slaba virulentnost (nekroza pri vrhu korena), 2 = srednja virulentnost (koren i prizemni deo stabaceta nekrotirani) i 3 = jaka virulentnost (nekrotirani svi delovi klijanaca i neklijala semena).

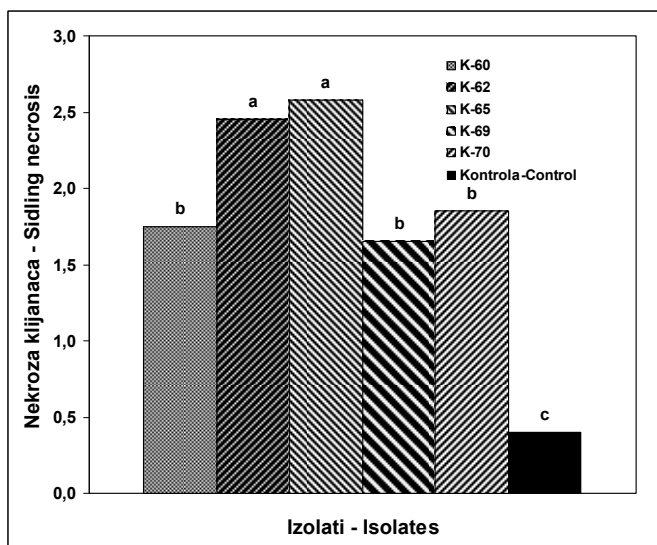
Ispitivanje morfoloških osobina izolata

Morfološke osobine kolonija izolata (izgled i brzina razvoja kolonija, tekstura micelije, pigmentacija supstrata) ispitivane su na 25° i 30°C na KDA, a mikroskopske odlike (oblik i način formiranja makrokonidija, izgled konidiogenih ćelija, izgled makrokonidija, prisustvo ili odsustvo hlamidospora, formiranje sklerocija) na KDA, krompir saharoznom agaru (KSA), malc agaru (MA), sabouraud dekstroznom agaru (SDA) i domaćinu. Na osnovu morfoloških i patogenih osobina dobijenih izolata izvršena je identifikacija patogena (Burgess et al. 1994, Nelson et al. 1983, Lević et al. 2008, Summerell et al. 2003).

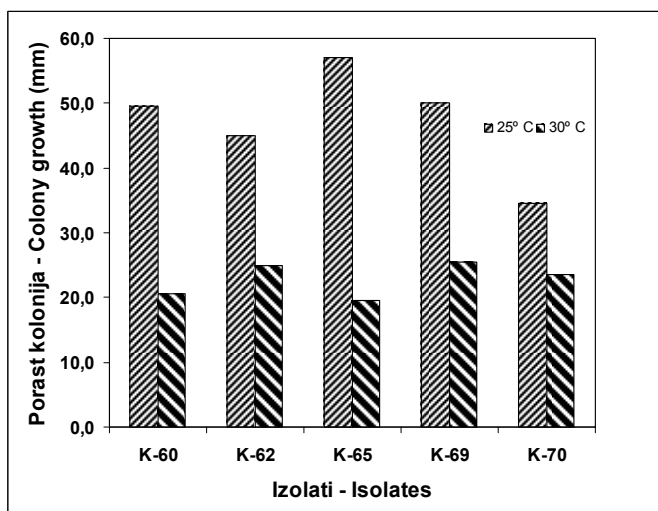
Rezultati i diskusija

Izolacija patogena

Gibberella zeae (Schwein.) Petch (anamorf: *Fusarium graminearum* Schwabe) izolovana je sa



Graf. 1. *Gibberella zeae* – stepen nekroze veštački inokulisanih klijanaca kantariona
Graph 1. *Gibberella zeae* – degree of artificially inoculated seedlings of St. John's wort



Graf. 2. *Gibberella zeae* – porast kolonija na 25°C i 30°C nakon tri dana
Graph 2. *Gibberella zeae* – colony growth at 25°C and 30°C after three days

semena kantariona u sva tri ispitivana lokaliteta: Pančevo (izolati K-60 i K-62), Gorobilje (K-65 i K-69) i Kačarevo (K-70).

Patogene odlike

Odabranih pet izolata patogena ispoljili su visok stepen nekroze klijanaca kantariona od 1,65 (izolat K-69) do 2,58 (izolat K-65), u proseku 2,1 (Graf. 1). Izolati K-62 i K-65 prouzrokovali su značajno veću nekrozu od ostala tri izolata između kojih nije bilo značajnih razlika.

Morfološke osobine

Micelija *Gibberella zeae* bujna, pamučasta, u početku belo žućkasta boje, u zavisnosti od podloge kasnije postaje svetlo do tamno ružičasta. Pigmentacija podloge je tamno ružičasta, boje breskve ili oker sa bordo poljima. Sporodihije narandžaste boje formiraju se nakon 7-10 dana gajenja na vodenom agaru sa listovima karanfila (KLA).

Porast kolonija nakon tri dana varira u zavisnosti od izolata, ali je svim izolatima zajedničko da imaju značajno smanjen porast pri temperaturi od 30°C (Graf. 2).

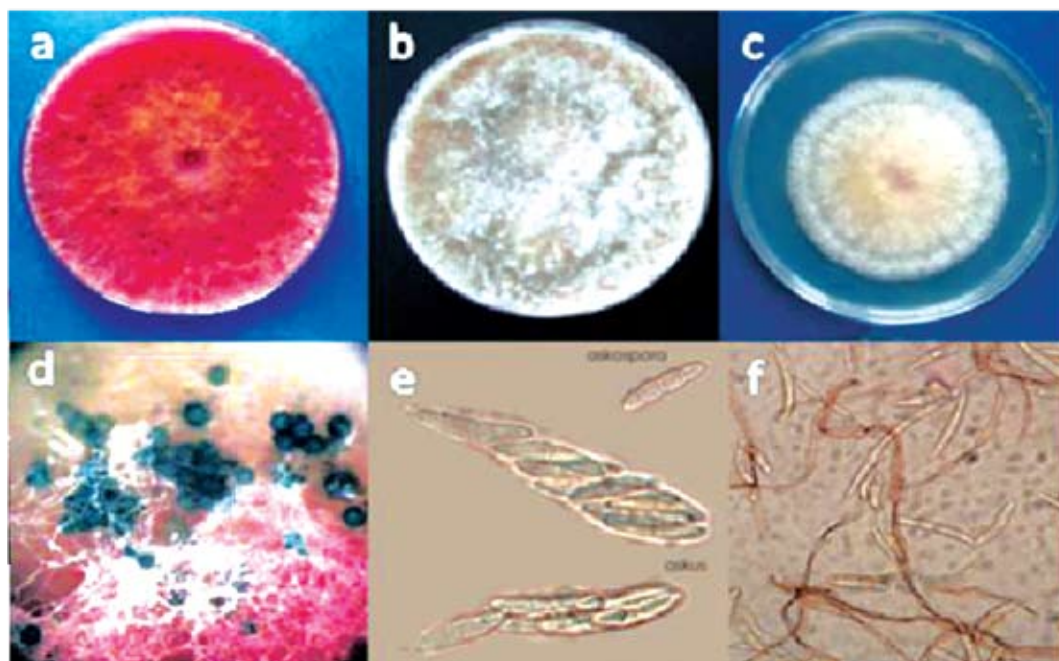
Konidiofore su razgranate sa bočnim mono fjalidama cilindričnog oblika. Makrokonidije su uglavnom srpasto povijene sa vršnom ćelijom koja je nešto duža od ostalih i ravnomerno se sužava, bazalna ćelija se završava sa manje ili više izraženim stopalom. Makrokonidije su hijalinske, u masi blede ružičaste, najčešće sa pet septi, retko sa 3-4, veličine 26,0-60,0 µm x 3,5-6,0 µm (Sl. 1 f). Hlamidospore su prisutne na hifama, ponekad na konidijama.

Svi ispitivani izolati su formirali peritecije na KSA posle 55 dana inkubacije pri 25°C. Na osnovu ovih osobina može se zaključiti da ovi izolati pripadaju teleomorfu *Gibberella zeae* (Schwabe) Petch ili anamorfu vrste *F. graminearum* Schwabe (syn. *F. graminearum* Grupa 2 Burgess, Wearing & Toussoun).

Gibberellazeae je poznata kao homotalusnavrsta. Peritecije su tamno plave skoro crne loptastog ili jajastog oblika, sa bradavičasto ornamentisanom površinom peridije i sa izraženom ostiolom (Sl. 1d). Formiraju se na površini supstrata u grupama ili pojedinačno. Prečnik peritecija je 180-260 µm. Askusi su hijalinski, elipsoidni i sadrže osam askospora, koje mogu biti prave ili savijene sa jednom i tri septe, hijalinske ili svetlo ružičaste u masi. Prosečna dimenzija askusa je 68,8-81,2 µm x 12,5-14,0 µm. (Sl. 1d). Askospore su prave ili savijene, većinom sa tri septe, ali prisutne su i sa jednom septom, hijalinske, svetlo ružičaste u masi. Prosečna dimenzija askospora 17,5-21,2 µm x 3,0-5,5 µm (Sl. 1d).

Na semenu kantariona do sada su identifikovane vrste *F. oxysporum*, *F. subglutinans*, *F. sporotrichioides*, *F. verticillioides* i *F. proliferatum* (Pavlović 2009). Prisustvo vrste *F. graminearum* utvrđeno je samo na semenu gajenog povrtića (*Tanacetum parthenium* (L.) Schultz Bip.) (Kostić et al. 2003).

Unutar vrste *F. graminearum* utvrđeno je postojanje i grupe 1 (syn. *F. graminearum* grupa 1 Burgess, Wearing & Toussoun), koja pripada teleomorfu *Gibberella coronicola* Aoki & O'Donnell ili anamorfu *F. pseudograminearum* Aoki & O'Donnell. Predstavnici ove vrste ne



Slika 1. *Gibberella zeae*. Izgled kolonija na krompir saharoznom agaru (a), na saboura dekstroznom agaru (b), na podlozi od slada (c), peritecije obrazovane na krompir saharoznom agaru (d), askusi sa askosporama (e), makrokonidije (f).

Fig 1. *Gibberella zeae*. – The appearance of colonies on potato sucrose agar (a), on sabouraud dextrose agar (b), on malt extract agar (c), perithecia formed on potato sucrose agar (d), asci with ascospores (e), macroconidia (f)

formiraju peritecije, ni u prirodi, ni *in vitro* jer su heterotalusni. Ova vrsta prouzrokuje trulež prizemnog dela stabla pšenice. Za razliku od *F. pseudograminearum*, izolati *F. graminearum* formiraju peritecije u prirodi i *in vitro* (homotalusne su) i prouzrokuju bolesti nadzemnih delova-fuzariozu klasa i trulež klipa i stabla kukuruza (Bagi et al. 1999). –

Populacija vrste *F. graminearum* izolovana sa semena kantariona u ovim istraživanjima je veoma heterogena. Među izolatima postoje razlike u odgajivačkim i patogenim odlikama. Ova činjenica ukazuje na potrebu preciznije karakterizacije ovih izolata i upoznavanja strukture populacije *F. graminearum* izolovane sa semena lekovitog bilja, što će biti predmet budućih istraživanja.

Zaključak

Činjenica da primena hemijskih sredstava nije dozvoljena u proizvodnji lekovitog bilja upućuje na značaj poznavanja mikoflore semena. *Gibberella zeae* (anamorf: *Fusarium graminearum*) je po prvi put izolovana sa semena kantariona. Izolati su ispoljili srednju i visoku virulentost prema klijancima kantariona. Izolati sa kantariona formiraju peritecije *in vitro* i svrstani su u *Fusarium graminearum* Grupa 2: *F. graminearum* Schwabe grupa 2 Burgess, Wearing & Toussoun.

Literatura

- Bagi F (1999): Ispitivanje heterogenosti populacije gljive *Fusarium graminearum* Schwabe patogena pšenice i kukuruza. Doktorska disertacija, Poljoprivredni fakultet Novi Sad
- Burgess LW, Summerell BA, Bullock S, Gott K, Backhouse D (1994): Laboratory Manual for *Fusarium* Research. *Fusarium* Research Laboratory, Department of Crop Sciences, University of Sydney and Royal Botanic Gardens, Sydney, pp. 133
- Chongo G, Gossen BD, Kutcher HR, Gilbert J, Turkington TK, Fernandez MR, McLaren D (2001): Reaction of seed-ling roots of 14 crop species to *Fusarium graminearum* from wheat heads. *Can. J. Plant Pathol.* 23: 132-137
- Geiser DM, Jimenez Gasco MM, Kang S, Makalowska I, Veeraghavan N, Ward TJ, Zhang N, Kuldau GA, O'Donnell K (2004): *Fusarium* ID v.1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *Europ. J. Plant Pathol.* 110: 473-479
- Ignjatov M, Petrović D, Nikolić Z, Jovičić D (2011): Morfološka i molekularna identifikacija izolata *Fusarium* spp. poreklom sa paradajza. XVI Savetovanje o biotehnologiji, Čačak. Zbornik radova 447-452
- ISTA (2003): International Rules for Seed Testing. Annex to Chapter 7. Seed Health Testing Methods. Seed Science and Technology, Zürich, Switzerland. 07-1.64: 3084-3088
- Jovičić B, Milošević M (1990): Bolesti semena- Novi Sad: Dnevnik
- Kostić M, Nastovski T, Pavlović S, Rajković S (2003): Bioagensi u gajenom povratiču – *Tanacetum parthenium* (L.) Schultz Bip., (*Asteraceae*). *Lekovite sirovine* 23: 101-108
- Krnjaja V, Lević J, Ivanović M, Tomić Z (2009): Virulence of *Fusarium* species to alfalfa seedlings. *Zbornik Matice srpske za prirodne nauke* 109: 65-72
- Lević J (2008): Vrste roda *Fusarium* u oblasti poljoprivrede, veterinarske i humane medicine. Cicero, Beograd
- Lević J, Stanković S, Krnjaja S, Bočarov-Stanković S (2009): *Fusarium* species: The occurrence and the importance in agriculture of Serbia. *Zbornik Matice srpske za prirodne nauke* 116: 33-48
- Leslie JF, Summerell BA (2006): The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell Publishing, 388.
- Malone JP, Muskett AE (1964): Seed borne fungi. Plant Pathology Division, Ministry of Agriculture, The Queen's University, Belfast, pp.1-384
- Menković N, Šavikin-Fudulović K, Gojgić-Cvijović G, Tasić S, Vajs V, Milosavljević S (2002): Antibacterial activity of *Hypericum atomarium* Boiss. aerial parts, 50th GA, Barcelona, Book of abstracts, pp. 164-165
- Molt PM, Simone J (1967): Technique de dentamination ortificielle des semences de Mais par les Fusarioses, *Revue de Zoologie Agricole et Appliquée* No 1-3: 29-32
- Nelson PE, Toussoun TA, Marasas WFO (1983): *Fusarium* species. An illustrated manual for identification. The Pennsylvania State University Press, University Park and London, pp. 1-193
- Nirenberg H, O'Donnell KO (1998): New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia*, 90 (3): 434-458
- O'Donnell K, Cigelnik E, Casper HH (1998): Molecular phylogenetic, morphological and mycotoxin data support reidentification of the Quorn mycoprotein gungus as *Fusarium venenatum*. *Fungal Genet. Biol.* 23: 57-67
- Pavlović S (2009): Mikoze značajnijih lekovitih biljaka u Srbiji. Doktorska disertacija, Poljoprivredni fakultet u Novom Sadu
- Pavlović S, Dražić S, Ivanović M (2000): Microflora of St. John's wort seeds, Proceedings from the First Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries, Eds: Dragana Sekulović, Srbojub Maksimović, Jan Kišgeci, Institute for Medicinal Plant Research "Dr Josif Pančić" and FPAGRI, Belgrade, pp. 339-346
- Pavlović S, Stojanović S, Starović M (2006): Current study on the parasitic microorganisms of the medicinal and aromatic plants in Serbia. Proceedings of the 4th Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries, Isai, Romania, 214-219
- Petrović D, Ignjatov M, Vujaković M, Taški-Ajduković K, Nikolić Z, Milošević M, Jovičić D (2010): Mikopopulacija semena kukuruza (2006-2008). *Ratar. Povrt.* 47: 561-566
- Ristić D, Vučurović A, Stanković I, Nikolić D, Berenji J, Krstić B, Bulajić A (2011): Molekularna identifikacija izolata *Fusarium graminearum*, patogena sirka u Srbiji. *Ratar. Povrt.* 48: 347-352
- Summerell BA, Salleh B, Leslie JF (2003): A utilisation approach to *Fusarium* identification. *Plant Dis.* 87: 117-128
- Republika Srbija (2005): Zakon o semenu. Službeni glasnik RS 45: 12-24.
- Šavikin-Fudulović K, Aljančić I, Vajs V, Menković N, Macura S, Gojgić G, Milosavljević S (2003): Hyperatomarin, an antibacterial prenilated phloroglucinol from *Hypericum atomarium*. *Degenni, J. Nat. Prod.* 66: 1236-1238
- Zeller KA, Bowden RI, Leslie JF (2004): Population differentiation and recombination in wheat scab population of *Gibberella zeae* from United States. *Mol. Ecol.* 13: 563-571

Gibberella zeae on St. John's Wort in Serbia

Snežana Pavlović · Tatjana Stević · Mira Starović ·
Dragana Jošić · Tatjana Popović · Maja Ignjatov · Saša Stojanović

Summary: *Gibberella zeae* (anamorph *Fusarium graminearum*) was determined on seed of St. John's wort produced in localities Pančevo, Gorobilje and Kačarevo during 2008 and 2009. Morphological characteristics of monosporial isolates were described. All tested isolates formed *in vitro* perithecia, and were classified as *F. graminearum* (syn. *F. graminearum* Group 2). Pathogenicity was confirmed by the artificial inoculation of St. John's wort seed.

Key words: St. John's wort, *Gibberella zeae*, *Fusarium graminearum*, morphology, pathogenicity