

COLLETOTRICHUM LINICOLA-OSETLJIVOST RAZLIČITIH GENOTIPOVA LUCERKE

Tanja Vasić¹, Snežana Anđelković¹, Jasmina Radović¹, Snežana Babić¹,
Jordan Marković¹

Abstrakt

Antraknoza ili trulež krune lucerke, izazvana gljivoma iz roda *Colletotrichum*, je bolest koja nanosi značajne štete na lucerki u Srbiji. U toku višegodišnjeg perioda, u toku leta i rane jeseni, sakupljane su biljke lucerke sa simptomima antraknoze. Stabljične infekcije izazivaju sušenje i povijanje gornjeg dela biljke, što dovodi do karakterističnog simptoma tzv. "pastirska kuka". Ispitivanje stepena osetljivosti različitih genotipova lucerke u eksperimentalnim uslovima obavljeno je sa jednim izolatom Coll-44 (*C. linicola* poreklom iz Srbije). Deset komercijalnih genotipova lucerke različitog geografskog porekla (K-1, K-28, Zaječarska 83, Osječka 12, NS Slavija, Banja Luka, Affinity 401 + Z, Florida 77, Vernal S i Pery) ispitivano je u ovom radu.

Inokulisane biljke lucerke pokazale su tipične simptome antraknoze. Nekrotične lezije pojavile su se na stabljikama zaraženih biljaka i došlo je do povijanja u gornjoj trećini stabala. Micelija parazita prorasta niz stablo i kada se stabljike osuše, nastupa antraknoza krune i korena. Osetljivost različitih genotipova lucerke prema ispitivanim izolatima *C. linicola* određena je prema skali od 0-5. Ispitivani genotipovi lucerke su ispoljili različitu osetljivost prema testiranom izolatu vrste *C. linicola*.

Ključne reči: lucerka, antraknoza, *Colletotrichum linicola*, genotipovi, osetljivost

Uvod

Kao prouzrokovači antraknoze na lucerki obično se navode *C. trifolii*, *C. destructivum*, *C. dematium* i *C. truncatum* (Devine et al., 1971; Boland and Brochum, 1989; Frassyssinet, 2008; Hyde et al., 2009). Antraknoza na lucerki je zastupljena u Americi, Italiji, Hrvatskoj, Izraelu, Novom Zelandu, Australiji i Južnoj Americi (Vasić, 2007). U Srbiji je pojava antraknoze lucerke prvi put zabeležena u julu 1980. godine u okolini Subotice (Robotić i Klokočar-Šmit, 1983). Vasić et al. (2014) saopštavaju da na lucerki osim napred navedenih gljiva iz roda *Colletotrichum*, antaraknozu izaziva i vrsta *C. linicola*. Vrsta *C. linicola* je do tada bila zabeležena samo na lanu, tako da je ovo prvo saopštenje u svetu Prisustvo bolesti doprinosi da se usev lucerke proređuje i dovodi do skraćivanja perioda iskorištavanja lucerišta. Biljke u podmaklim fazama razvoja bolesti u gornjem delu stabla povijene su u vidu kuke, što je tipičan simptom. Kako bolest napreduje, infekcija se širi i sa stabljike prelazi u zonu korenovog vrata i korena. Infekcija krune i korena karakteriše se suvom truleži sa promenom boje napadnutog tkiva u plavo-crnu (Vasić et al., 2014).

¹Institut za krmno bilje, Kruševac, Globoder, Srbija, e-mail: tanja.vasic@ikbks.com

Infekcija krune može biti sa ili bez stabličnih lezija. Obolele biljke na ovaj način mogu da propadnu u toku jedne vegetacione sezone ili prilično oslabljene, često podlegnu mrazu u zimskim uslovima (Barnes et al., 1969). Štete koje nastaju usled prisustva i razvoja prouzrokovaca antraknoze posledica su smanjene količine i kvaliteta zelene mase od 10 čak i do 70% u zavisnosti od sorte lucerke, klimatskih i edafskih uslova (Stuteville and Erwin, 1990).

Cilj ovih istraživanja je da se determinišu osetljivost ispitivnih genotipova lucerke prema novom prouzrokovacu antraknoze *C. linicola* u Srbiji i mogućnost dobijanja tolerantnih genotipova lucerke.

Materijal i metode

U cilju iznalaženja potencijalnih izvora otpornosti lucerke na vrstu *Colletotrichum linicola*, ispitivana je reakcija 10 komercijalnih genotipova lucerke, različitog porekla, četiri domaća komercijalna genotipa (K-1, K-28, Zajčarska 83 i NS Slavija), kao i dva genotipa iz bližeg okruženja Osječka 12 (Hrvatska) i Banja Luka (Bosna i Hercegovina). U ogled su takođe, uključeni i referentni američki komercijalni genotipovi (Affinity 401 + Z (HR), Florida 77 (MR), Vernal S (S) i Perry (LR)) koji pokazuju različite nivoe otpornosti prema *C. trifolii* (O'Neill, 1996; Gray et al., 2003). Affinity 401 + Z se opisuje kao visoko otporan genotip (Gray et al., 2003), Vernal S kao osetljiv (Ostazeski et al., 1969; Elgin and Ostazeski, 1982), dok se Florida 77 navodi kao srednje otporan i Perry kao osetljiv genotip (O'Neill, 1996; Gray et al., 2003).

Srpski izolat Coll-44 za ova istraživanja je odabran na osnovu morfoloških i molekularnih osobina. Ogled je postavljen u proleće 2014. godine u uslovima staklenika Instituta za krmno bilje, Kruševac. Seme lucerke posejano je u plastične kontejnere na dubini od 2 cm u sterilni supstrat (Klasman 1). U kontejnerima biljke lucerke gajene su četiri nedelje i nakon toga rasađene u veće saksije. Tri nedelje po rasađivanju, biljke su inokulisane. U vreme inokulacije biljke su bile starosti sedam nedelja. Suspenzija konidija pripremljena je od kultura ispitivanih izolata, koje su gajene 10 dana na PDA podlozi pri temperaturi od 25°C, u mraku. Koncentracija spora određena je pomoću hemocitometra po Thom-u i iznosila je $4-6 \times 10^{-4}$ spora/ml. Biljke lucerke povredene su kosidbom i prskane suspenzijom spora. Ogled je postavljen u deset ponavljanja po izolatu i po sorti, a kao negativna kontrola poslužile su biljke lucerke inokulisane sterilnom vodom.

Osetljivost različitih genotipova lucerke prema ispitivanom izolatu *Colletotrichum linicola* određivana je po modifikovanoj metodi Ostazeski et al. (1969), prema skali od 0-5.

- 0- Biljke bez simptoma,
- 1- Pojedinačne vodenaste pege u osnovi,
- 2- Prisutne udubljene lezije,
- 3- Pojava lezija duž stabla,
- 4- Nekroza celog stabla,
- 5- Uvenue i sušenje celih stabala.

Rezultati i diskusija

Ispitivani izolati na stabljikama zaraženih biljaka lucerke izazvaju tipične simptome antraknoze. Posle 15 dana od inokulacije na testiranim biljkama javile su se pre svega nekrotične lezije na stablu i lagano povijanje vrha gornje trećine stabla. Nekrotične lezije širile su se dalje na celu biljku i kod pojedinih biljaka dovele do potpunog sušenja i propadanja biljaka. Ocena intenziteta razvoja bolesti vršena je na osnovu skale od 0-5. Reakcija ispitivanih genotipova lucerke kao i ocena indeksa oboljenja nakon inokulacije ispitivanim izolatima *C. linicola* prikazana je u tabeli 1.

Tabela 1. Ocena osetljivost komercijalnih genotipova lucerke prema izolatu *C. linicola*
 Table 1. Evaluation of sensitivity in commercial genotypes of alfalfa to isolate *C. linicola*

Genotipovi Genotypes	% biljaka sa ocenom Percentage of plants in score classes					Indeks oboljenja Severity index %	Otporne biljke Resistant plants (1+2%)
	1	2	3	4	5		
K-1	0	30	40	0	30	3.3	30
K-28	30	10	20	0	40	3.2	40
Zaječarska 83	30	30	10	10	20	2.6	60
Osječka 12	30	20	20	20	10	2.6	50
NS Slavija	20	10	10	20	40	3.5	30
Banja Luka	0	30	20	20	30	3.5	30
Affinity 401 + Z	0	10	30	20	40	3.9	10
Florida 77	10	10	30	20	30	2.6	20
Vernal S	10	20	30	0	40	3.4	30
Perry	10	10	50	0	30	3.3	20
Kontrola	-	-	-	-	-	-	-

Na osnovu indeksa oboljenja prema izolatu Coll-44 genotipovi Florida 77, Zaječarska 83 i Osječka 12 sa indeksom oboljenja 2,6 pokazali su značajnu otpornost. Međutim, kod ostalih genotipova K-28, K-1, Perry, Vernal S, NS Slavija, Banja Luka i Affinity 401 + Z primećena značajna osetljivost prema ispitivanom izolatu.

Dobijeni rezultati ukazuju na veliku varijabilnost u osetljivosti ispitivanih genotipova lucerke prema testiranom izolatu okarakterisanog kao *C. linicola*. U toku ovih istraživanja utvrđeno je da su domaći genotipovi lucerke K-1, K-28, NS Slavija pokazali veliku osetljivost prema ispitivanom izolatu *C. linicola* (tabela 1).

Fitopatogene gljive iz roda *Colletotrichum* su najznačajnije patogene gljive koji ugrožava useve pod lucerkom, prouzrokujući najčešće veoma značajne ekonomske štete (Elgin and Ostazeski, 1982; Allen et al., 1982; O'Neill et al., 1989). Problemi i štete od bolesti lucerke koji se u našim uslovima javljaju su veliki i teško rešivi između ostalog i zbog nepostojanja komercijalnih genotipova koje pokazuju otpornost prema gljivičnim prouzrokovateljima bolesti. Lucerka je visoko varijabilna vrsta, pre svega zbog svoje prirodne tetraploidnosti, što uslovljava kontrolu svake osobine sa najmanje 4 gena (Vasić, 2013). Izolat Coll-44 bio je veoma patogena prema domaćim genotipovima lucerke. Nakon četiri nedelje od inokulacije izazvao je potpuno sušenje i propadanje

biljaka genotipova K-28, K-1, Perry, Vernal S, NS Slavija, Banja Luka i Affinity 401 + Z. Genotipovi Florida 77, Zaječarska 83 i Osječka 12 pokazali su značajnu otpornost prema ispitivanom izolatu.

Genotip Affinity 401 + Z u ovim istraživanjima je pokazao veliku osetljivost prema izolatu Coll-44. Međutim, na osnovu broja otpornih biljaka genotip Zaječarska 83 pokazuje veliku otpornost prema ispitivanom izolatu sa čak 60 % i Osječka 12 sa 50 % preživelih biljaka, dok ostali genotipovi K-1, NS Slavija i Banja Luka pokazuju veliku osetljivost. Američki genotipovi Affinity 401 + Z, Vernal S i Florida 77 pokazuju veliku osetljivost prema testiranom izolatu.

Prema Ostazeski et al. (1969), osetljiv genotip ima 10% zdravih biljaka, dok se za genotip koja ima preko 65% zdravih biljaka može reći da je otporan. Genotip Arc, koji je otporan na rasu 1. *C. trifolii*, ima indeks oboljenja 2.72 odnosno 2.25 (Ostazeski et al., 1979). Devine et al. (1973) navode da je pet populacija lucerke dobijeno sa povećanom otpornošću prema *C. trifolii*. Otpornost prema *C. trifolii* može se povećati sa 5 na 82% nakon dva ili tri ciklusa selekcije (Devine et al., 1971). Međutim, pojava rasa *C. trifolii* ukazuje da je stvaranje otpornih genotipova lucerke složenije nego što se mislilo. Prirodna otpornost prema prouzročivaču antraknoze još je nedovoljno poznata. Čini se da je otpornost kod genotipa Arc kontrolisana jednim dominantnim alelom i da poseduje vertikalnu otpornost prema rasi 1 *C. trifolii*, dok je otpornost kod genotipa Saranac AR, Vangaurd i Florida 77 složenije prirode i ovi genotipovi su otporni prema rasama 1 i 2 *C. trifolii* (Devine et al., 1971; Elgin and Ostazeski, 1982).

Elgin and Ostazeski (1982) testiraju nivo otpornosti genotipova Florida 77 i Perry prema izolatima *C. trifolii* rasa 1 i 2, i dolaze do zaključka da je kod genotipa Florida 77 u odnosu na rasu 1 *C. trifolii* bilo 11% otpornih biljaka, a u odnosu na rasu 2 iste vrste, bilo je otporno 10% biljaka. Isto tako kod genotipa Perry prema rasama 1 i 2 *C. trifolii* bilo je 2% zdravih biljaka. Genotip Vernal S pokazao je veću osetljivost u kontrolisanim uslovima nego na polju (Barnes et al., 1969). U uslovima postavljenog eksperimenta, može se zaključiti da je najveću otpornost pokazao američki genotip Vernal S, i ako je on u radovima predstavljen kao osetljiv genotip na antraknozu (Devine et al., 1971). Najmanju otpornost prema izolatima testirane vrste pokazali su domaći genotipovi K-1 i K-28. Isto tako, Hrvatski genotip Osječka 12 pokazuje veliku osetljivost prema ispitivanim izolatima *C. linicola*.

Vasić et al. (2009) proučavali su uticaj četiri izolata *C. trifolii* na četiri komercijalna genotipa lucerke (K-28, NS Mediana, Affinity + Z i Alfagrade) i utvrdili su značajnu osetljivost ispitivanog biljnog materijala prema vrsti *C. trifolii*.

Dobijeni rezultati ukazuju na visoku varijabilnost reakcije u sistemu genotip - izolat u testiranom biljnom materijalu. Pored toga, odgovor pojedinačnih biljaka u okviru genotipova na inokulaciju patogenim izolatima, takođe je bio jako varijabilan. Manji broj pojedinačnih biljaka uspele su, da i pored jasnih simptoma oboljenja donesu seme. Potomstvo ovih biljaka odličan je izvor otpornosti na ispitivane izolate patogena i biće uključeno u sledeći ciklus selekcije na ovu osobinu. Imajući u vidu rezultate Devine et al. (1971) koji ukazuju da je nakon nekoliko ciklusa selekcije moguće podići nivo otpornosti, nastavak istraživanja u ovom pravcu ima veliki potencijalni značaj.

Izdvojeni genotipovi lucerke koji su ispoljili viši nivo otpornosti biće dalje korišćeni u poljskim ogledima u različitim klimatskim uslovima kako bi se tačnije procenio nivo otpornosti na *C. linicola* vrstu.

Zahvalnost

Munistarstvo prosvete, nauke u tehnološkog razvoja Republike Srbije, projekt TR 31057.

Literatura

- Allen, S.J., Barnes, G.L., Caddel, J.L. (1982): A new race of *Colletotrichum trifolii* on alfalfa in Oklahoma. *Plant Disease* 66, 922-924.
- Barnes, D.K., Ostazeski, S.A., Schillinger, J.A., Hanson, C.H. (1969): Effect of Anthracnose (*Colletotrichum trifolii*) Infection on Yield, Stand, and Vigor of Alfalfa. *Crop Science* 9, 344-346.
- Boland, G.J., Brochu, L.D. (1989): *Colletotrichum destructivum* on alfalfa in Ontario and cultivar response to anthracnose. *Canadian Journal of Plant Pathology* 11: 303-307.
- Devine, T.E., Hanson, C.H., Ostazeski, S.A., Campbell, T.A. (1971): Selection for Resistance to Anthracnose (*Colletotrichum trifolii*) in Four Alfalfa Populations. *Crop Science* 11: 854-855.
- Devine, T.E., Hanson, C.H., Ostazeski, S.A., Hunt, O.J. (1973): Registration of alfalfa germplasm. *Crop Science* 13: 289.
- Elgin, J.H., Jr. Ostazeski, S.A. (1982): Evaluation of Selected Alfalfa Cultivars and Related Medicago Species for Resistance to Race 1 and Race 2 Anthracnose. *Crop Science* 22: 39-42.
- Frayssinet, S. (2008): *Colletotrichum destructivum* a new lucerne pathogen in Argentina. *Australasian Plant Disease Notes* 3: 68.
- Gray, F., Hollingsworth, C., Koch, D. (2003): ‘‘B-1136 Alfalfa Disease Management’’. University of Wyoming. A full copy of this publication can be accessed at www.uwyo.edu/ces/plantsci.htm (accessed may, 2003).
- Hyde, K.D., Cai, L., Cannon, P.F., Crouch, J.A., Crous, P.W., Damm, U., Goodwin, P.H., Chen, H., Johnston, P.R., Jones, E.B.G., Liu, Z.Y., McKenzie, E.H.C., Moriwaki, J., Noireung, P., Pennycook, S.R., Pfenning, L.H., Prihastuti, H., Sato, T., Shivas, R.G., Tan, Y.P., Taylor, P.W.J., Weir, B.S., Yang, Y.L., Zhang, J.Z. (2009). *Colletotrichum* - names in current use. *Fungal Diversity* 39: 147-182.
- Ostazeski, S.A., Barnes, D.K., Hanson, C.H. (1969): Laboratory Selection of Alfalfa for Resistance to Anthracnose, *Colletotrichum trifolii*. *Crop Science*, 9: 351-354.
- Ostazeski, S.A., Elgin, J.H., Jr., McMurtray, J.E. (1979): Occurrence of anthracnoses on formerly anthracnose-resistant "Arc" alfalfa. *Plant Disease Report* 63: 734-736.
- O'Neill, N.R., Elgin, J.H., Jr. and Baker, C.J. (1989): Characterization of Induced Resistance to Anthracnose in Alfalfa by Races, Isolates and Species of *Colletotrichum*. *Phytopathology* 79: 750-756.
- O'Neill, N.R. (1996): Pathogenic Variability and Host Resistance in the *Colletotrichum trifolii*/*Medicago sativa* Pathosystem. *Plant Disease* 80: 450-457.

- Robotić, V., Klokočar-Šmit, Z. (1983): *Colletotrichum trifolii* Bain et Essary prozrokoivač antraknoze lucerke. Zaštita bilja, Beograd. 34(2), 164: 225-239.
- Stuteville, D.L., Erwin, D.C. (1990). Compendium of alfalfa diseases, second edition. St. Paul, Minnesota USA: The American Phytopathological Society, Aps Press, 84.
- Vasić, T. (2007): *Colletotrichum trifolii* (Bain et Essary), prouzrokoivač antraknoze, u kompleksu propadanja lucerke u Srbiji. Poljoprivredni fakultet, Zemun-Beograd, 1-88.
- Vasić, T., Radović, J., Lugić, Z., Marković, J., Jevtić, G., Gajić, S. (2009): Occurrence of *Colletotrichum trifolii* (Bain et Essary), the inducer of alfalfa anthracnose in Serbia. In: C. Huyghe (ed.) Sustainable Use of Genetic Diversity in Forage and Turf Breeding. Springer, Ch 53, 369-374.
- Vasić, T. (2013): Karakterizacija vrsta roda *Colletotrichum*, prouzrokoivača antraknoze lucerke u Srbiji i osetljivost genotipova. Poljoprivredni fakultet, Zemun-Beograd, 1- 178.
- Vasić, T., Bulajić, A., Krnjaja, V., Jevremović, D., Živković, S., Andjelković, B. (2014): First report of anthracnose on alfalfa caused by *Colletotrichum linicola* in Serbia. Plant Disease. Volume 98, Number 9. Page 1276.

COLLETOTRICHUM LINICOLA- SENSITIVITY OF DIFFERENT ALFALFA GENOTYPES

*Tanja Vasić¹, Snežana Anđelković¹, Jasmina Radović¹, Snežana Babić¹,
Jordan Marković¹*

Abstract

Southern anthracnose or crown rot, caused by *Colletotrichum linicola*, is a disease that has been detected on alfalfa in Serbia. During longer period, especially in summer and autumn, alfalfa plants with anthracnose symptoms were studied in the field. Stem infection resulted in wilting and death of the upper portion of the stem, giving rise to the characteristic “shepherd’s crook” symptom. To examine the level of sensitivity of different alfalfa genotypes in experimental conditions, one isolate: Coll-44 (*C. linicola* originating from Serbia). Ten commercial alfalfa genotypes of different origin (K-1, K-28, Zajecarska 83, Osjecka 12, NS Slavija, Banja Luka, Affinity 401 + Z, Florida 77, Vernal S and Perry) were examined in this study. Infected plants showed typical symptoms of anthracnose. Necrotic lesions appeared on the plant stems and gentle bending of the top of the upper third of stems occurred on tested plants. Necrotic lesions further spread onto the whole plant and in some plants led to withering. Assessment of damage by pathogen inoculation was based on the scale of 0-5. Investigated genotypes showed contrasting resistances to *C. linicola* isolates.

Key words: alfalfa, anthracnose, *Colletotrichum linicola*, genotypes, sensitivity

¹Institute for forage crops, Kruševac-Serbia, 37251, Globoder, e-mail: tanja.vasic@ikbks.com