

## Black Leaf and Stem of Alfalfa Caused by *Phoma medicaginis* Malbr & Roum. var. *medicaginis* Boerema

Latif R. SUSURI

### ABSTRACT

*Phoma medicaginis* has recently been spreading on alfalfa causing black leaf and stem in irrigation fields near Prizren. The average number of lesions is from 18 up to 30 on leaves with an average diameter of 1-10 mm. The average size of pycnidia from diseased alfalfa leaves, stems and PDA is 325 x 338  $\mu\text{m}$ , whereas the average size of pycnidiospores is 7.3 x 3.6  $\mu\text{m}$ . Maximum spore production in average was on PDA 140.9 x 10<sup>4</sup>/ml.

### KEY WORDS

*Phoma medicaginis*, *Medicago sativa*

## Crna pjegavost lucerne uzrokovana gljivom *Phoma medicaginis* Malbr & Roum. var. *medicaginis* Boerem

### SAŽETAK

Gljiva *Phoma medicaginis* zadnjih godina se intenzivno širi na lucerni u okolini Prizrena. Broj pjega na listovima lucerne iznosi 18-30 sa promjerom od 1-10 mm. Dimenzije piknida iznose 325 x 338, a piknospora 7.3 x 3.6  $\mu\text{m}$ . Najveći broj piknospora gljiva formira na podlozi dekstrozni agar od krumpira i to 140.9 x 10<sup>4</sup>/ml.

### KLJUČNE RIJEČI

*Phoma medicaginis*, *Medicago sativa*

University of Prishtina, Agricultural Faculty  
Department of Plant Pathology, 38000 Prishtina, Kosova  
Phone: +381 (0)38 540 846  
E-mail: lsusuri@hotmail.com

Received: June 1, 2001

## UVOD

Gljive koje u određenim klimatskim uvjetima najčešće uzrokuju bolesti lucerne su: *Phoma medicaginis* Malbr. & Roum. var. *medicaginis* Boerema, *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* (Atk.) Snyder & Hans., *Pseudopeziza medicaginis* (Lib.) Sacc., *Stemphylium botryosum* Wallr., *Phytophthora megasperma* Drechs., *Rhizoctonia solani* Kuehn., *Erysiphe polygoni* DC, *Pythium debaryanum* Hesse. (Graham 1979).

Medju navedenim gljivama po svojoj štetnosti, u uvjetima navodnjavanja, zadnjih godina posebno se ističe *Phoma medicaginis* Malbr. & Roum. var. *medicaginis* Boerema. Za ovu gljivu postoje i sinonimi: *Phoma herbarum* f. *medicaginis* Rab (1862), *Phoma herbarum* West. var. *medicaginis* Fckl. (1869), *Phoma medicaginis* Malbr. et Roum (1886), *Diplodina medicaginis* Oud. (1903), *Ascochyta imperfecta* Peck. (1911), *Ascochyta pisi* var. *medicaginis* Sacc. (1920), *Phoma trifoli* John. & Vall. (1933). Ova bolest lucerne je rasprostranjena i u SAD. Stewart et al. (1908) navode da uzročnik pjegavosti pripada rodu *Ascochyta*, dok PECK (1909) je označio kao *Ascochyta imperfecta*. Kasnije su ovu gljivu proučavali mnogi istraživači (Vallea & Fergus 1929, Johnson & Vallea 1933, Richards 1934, Remsberg & Hungerford 1936).

Rosella (1929) pojavu gljive *Ascochyta medicaginis* Fuckl. konstatovao u Francuskoj, dok Cornelli (1932) istu gljivu opisivao u Italiji pod nazivom *Phyllosticta medicaginis* (Fckl.) Sacc.

Pojava ove gljive na lucerni konstatirana je u blizini Prizrena 1989 godine (Susuri & Doda 1990).

Cilj ovog rada je da iz zaraženih listova lucerne, iz okoline Prizrena, izolira uzročnika pjegavosti kao i prouče neke morfološke i fiziološke karakteristike dobivenih izolata.

## MATERIAL I METODE RADA

Zaraženi fragmenti, iz tipičnih pjega sa listova, veličine 0.5-1 cm, koji su prethodno sterilizirani u 96% alkoholu, oprani sterilnom vodom a potom su aseptično (izolaciona komora IBK 1H1) stavljeni u Petri posude sa dekstroznim agarom od krumpira. Kulture su inkubirane u termostatu na temperaturi od 21°C. Drugog dana inkubiranja, na obodu fragmenata, pojavio se micelij, koji je pomoću kopljaste igle, uz primjenu stereomikroskopa, prenijet na petrijevim posudama sa dekstroznim agarom od krumpira. Nakon nekoliko prečišćavanja dobivena je ~ista kultura koja je služila za dalja istraživanja.

Za praćenje porasta i razvoja gljive upotrijebljene su hranjive podloge: dekstrozni agar od krumpira (PDA), dekstrozni agar od kukuruznog brašna (CMA), dekstrozni agar od mrkve (CA), sabouraud maltozni agar (SMA), malt agar (MA) i vodeni agar (WA) (TUIITE

1969, DHINGRA & SINCLAIR 1995). Petrijeve posude sa hranljivim podlogama, inokulirani su micelijom sa supstratom promjera 5 mm, u tri ponavljanja, zatim stavljeni su na inkubiranje u termostat, na temperaturi od 21°C, u trajanju od 17 dana.

Porast, promjena boje zračnog micelija i formiranje reproduktivnih organa praćeno je 1, 2, 3, 6, 9, 12, 15, 17 dana. Oblik i veličina reproduktivnih organa kao i izgled micelija određeni su optičkim mikroskopom.

Nakon inkubacije, pomoću okularnog mikrometra, obavljeno je mjerenje reproduktivnih organa. Za određivanje gustoće inokuluma upotrijebljen je po jedan disk micelij iz svake petrijeve posude, tri diska za svaku podlogu, a zatim stavljeni u epruvete sa 10 ml sterilne vode. Radi oslobađanja piknospora iz piknida, epruvete su stavljene na električni vibrator u trajanju od 1-2 minute. Radi odstranjivanja dijelova micelija i podloge, suspenzija piknospora je filtrirana kroz dvostruki sloj gaze, a zatim pomoću kapilarne cijevi stavljena je u hemacitometru na brojanje.

## REZULTATI

Simptomi bolesti prouzrokovane od *Phoma medicaginis* javljaju se u proljeće na svim nadzemnim dijelovima lucerne. Na listovima prve pjege su sitne kafene do mrke boje. Slične pjege se javljaju i na lisnoj dršci i na stabljici. Tokom jakih zaraza dolazi do oštećenja sijanca lucerne, koji postaju mrki i na kraju potpuno propadaju.

Zaraženi dijelovi biljke imaju različiti oblik pjega. Najčešće javljaju se okrugle ili nešto izdužene pjege, koje se u nekim slučajevima spajaju, dok po obodu javlja se nekroza nešto otvorene boje. Listovi sa većim brojem pjega, tokom jačih zaraza, opadaju. Prosječan broj pjega na liskama lucerne iznosi 18-30, veličine 1-10 mm. Na stabljikama također javljaju se izdužene pjege mrke boje, koje se ponekada spajaju i često puta je prstenasto obavijaju. Slični simptomi se javljaju na peteljka lista i na grančicama. Dijelovi biljke iznad pjega se suše i propadaju. Pjege na stabljici imaju veće dimenzije u odnosu na one koje se javljaju na listovima (Tab. 1).

*Ph. medicaginis* formira višestanični micelij, sa septiranim hifama, maslinaste boje sa različitim nijansama. Kolonije gljive na hranljivim podlogama uglavnom su okruglaste, sa valovito nazubljenim obodima. Na zaraženim listovima kao i na hranljivim podlogama gljiva formira vegetativne organe, piknide sa piknosporama. Piknidi su okruglasti, zatvoreno kafene boje, na vrhu imaju ostiolu koja služi za oslobađanje piknospora. Ovi organi su jedno ili višestanični, bezbojni, ovalnog do cilindričnog oblika. Dimenzije svih vrsta piknida (sa zaraženih listova i sa podloga) iznose 325 x 338, dok piknospora su 7.3 x 3.6  $\mu$ m.

Tablica 1. *Ph. medicaginis*. Prosečna veličina reproduktivnih organa u  $\mu\text{m}$   
 Table 1. *Ph. medicaginis*. The average size of spores in  $\mu\text{m}$

Autori - Authors	Piknidi - Pycnidia	Piknospore - Pycnidiospores
Peterson 1942	-	6-15 x 2.5-4
Mead 1964	140 x 234	4-15 x 2.4
Punithalingam & Gibson 1976	200 x 300	4.5-8 x 2-3
Susuri & Doda 1989	256 x 292	13.2 x 3.4
Our results 1991	325 x 338	7.3 x 3.6

Tablica 2. *Ph. medicaginis*. Kumulativni porast micelija u mm i formiranje spora u različitim podlogama od 1-17 dana.  
 Table 2. *Ph. medicaginis*. Cumulative average of mycelia growth in mm and sporulation on different media from 1-17 days

Podloga - Media	Porast micelija u mm - Mycelia growth in mm	Piknospore x $10^4/\text{ml}$ - Pycnidiospores
CA	38.0	123.7
PDA	37.8	140.9
CMA	37.2	94.5
MA	33.0	35.8
SMA	24.0	1.0
WA	12.4	11.8

Srednje vrijednosti iz tri pokusa sa po tri ponavljanja - Data are averages of three trials with three replicates each.

Porast micelija *Ph. medicaginis* na hranljivim podlogama je različit (Tab. 2). Najbolji porast gljive je na podlogama agar od mrkve (CA) sa promjerom od 38.0 mm, okruglastom kolonijom maslinasto mrke boje.

Na podlogama dekstrozni agar od krumpira (PDA) zračni micelij je bogat sa kolonijom okruglastog oblika, sa valovitim obodom, maslinaste boje. Na podlogama agar od kukuruznog brašna (CMA) *Ph. medicaginis* formira kolonije sa slabim zračnim micelijom, maslinasto žute boje, dok na malt agaru (MA) kolonije su okruglastog oblika sa nazubljenim obodom, srednje bogatim zračnim micelijom maslinaste kafene boje. Na sabouraud maltoznom agaru (SMA) zračni micelij je vrlo bogat, okruglastog oblika, po obodu nazubljen, maslinasto pepeljaste boje. Najmanji porast micelija konstatiran je na vodenom agaru (WA) 12.4 mm, sa slabim zračnim micelijom, bijele do plavkaste boje.

Dva tjedna nakon inkubiranja, na dekstroznom agaru od krumpira i dekstroznom agaru od mrkve, *Ph. medicaginis*, formira piknide sa piknosporama.

Na svim ispitivanim hranljivim podlogama, osim na vodenom agaru, iz piknida se kroz ostiolu oslobađaju u jednu želatinastu masu piknospore, bijele boje. Gustina piknida zavisi od vrste hranljive podloge.

Broj piknospora na jedan ml suspenzije iznosi od  $1 \times 10^4$  do  $140.9 \times 10^4/\text{ml}$ . Maksimalan broj piknospora ova gljiva formira na dekstroznom agaru od krumpira (PDA) dok najmanji na sabouraud maltozni agar (SMA).

## DISKUSIJA

Na temelju dobivenih rezultata može se konstatirati da pjegavost lucerne prouzrokuje gljiva *Phoma medicaginis*.

Na zaraženim listovima lucerne javljaju se simptomi u vidu pjega kafene boje, okružene jednom zonom žute boje. Na pjegama gljiva formira piknide sa piknosporama.

Dimenzije piknida iznose  $325 \times 338 \mu\text{m}$ , dok piknospore su  $7.3 \times 3.6 \mu\text{m}$ . Peterson & Melchers (1942) konstatiraju da ova gljiva formira piknospore sa dimenzijama  $6-15 \times 2.5-4 \mu\text{m}$ . Mead (cit. Graham 1979) navodi da promjer piknida iznosi  $140 \times 234 \mu\text{m}$ , dok piknospora  $4-15 \times 2.4 \mu\text{m}$ . Punithalingam & Gibson (1976) isti~u da piknidi imaju promjer od  $200-300 \mu\text{m}$ , sa piknosporama  $4.5-8 \times 2-3 \mu\text{m}$ . Dimenzije piknida gljive *Ascochyta imperfecta* iznose  $256.5 \times 292.6 \mu\text{m}$ , a piknospora  $3.4-4.4 \times 13.4-14.5 \mu\text{m}$  (Susuri & Nysrete Doda 1990).

Hranljive podloge utječu na porast i razvoj gljive *Ph. medicaginis*. Na vodenom agaru (WA) kolonije zračnog micelija su slabe, skoro prilepljene za podlogu, sa promjerom od 12.4 mm, dok na agaru od mrkve (CA) promjer kolonije, sa bogatim zračnim micelijem, iznosi 38.0 mm. Izolati gljive na dekstroznom agaru od krumpira (PDA) imaju promjer kolonija od 37.8 mm, sa velikim brojem reproduktivnih organa  $140.9 \times 10^4/\text{ml}$ . Ova gljiva također dobro sporulira i na agaru od mrkve  $123.7 \times 10^4/\text{ml}$ , dok najmanji broj piknospora konstatiran je na sabouraud maltoznom agaru  $1 \times 10^4/\text{ml}$ .

*Phoma medicaginis* var. *pinodella*, osim piknida sa piknosporama, formira i hlamidospore (Punithalingam & Gibson 1976).

Na porast i sporulaciju, osim čvrstih hranljivih podloga, na gljivu *A. imperfecta* utječu i tečne sintetične podloge sa ugljikohidratima kao izvorima ugljika (manoza, maltoza i glukoza). Na tim podlogama, osim dobrog porasta micelija, gljiva formirala i hlamidospore (Susuri & Nysrete Doda 1990).

Gljive koje pripadaju rodu *Ascochyta*, dobro rastu u sredini sa reakcijom od pH 2.8-7.4 (Crossan cit. Susuri 1985), dok *Ascochyta pisi* raste u sredini sa pH 3.8-6.5 (Susuri 1985). *Pb. medicaginis* dobro raste na hranljivim podlogama u sredini gdje je pH 6.5.

### ZAKLJUČAK

Pjegavost lucerne prouzrokuje *Phoma medicaginis*, koja formira piknide (325 x 338 µm) sa piknosporama (7.3 x 3.6 µm).

Simptomi bolesti javljaju se na listovima, lisnoj dršci i na stabljici u vidu pjega mrke smeđe boje, okruglaste do nešto izdužene. Broj pjega na listovima lucerne kreće se u prosjeku od 18-30, sa promjerom od 1-10 mm.

Najbolji porast micelija (*Pb. medicaginis*) konstatiran je na dekstroznom agaru od mrkve (38.0 mm) i dekstroznom agaru od krumpira (37.8 mm).

Maksimalan broj piknospora ova gljiva formira na dekstroznom agaru od krumpira (PDA) 140.9 x 10<sup>4</sup>/ml, dok najmanji na sabouraud maltoznom agaru (SMA).

### LITERATURA

- DHINGRA, O.D. & J.B. SINCLAIR. 1995. Basic Plant Pathology Methods. Cultivation and Sporulation media p. 345-402. Second Edition. CRC Lewis Publishers. Boca Raton, London, Tokyo.
- EDMUNDS, L.K. & E.W. HANSON. 1960. Host range, Pathogenicity, and Taxonomy of *Ascochyta imperfecta*. Phytopath. 50: 105-108.
- GRAHAM, J.H. 1979. A Compendium of Alfalfa Diseases. APS, St. Paul, Minneapolis.
- JOSIFOVI], M. 1970. Poljoprivredna Enciklopedija 2:110-117. Jug. Leksi. Zavod. Zagreb.
- PETERSON, M.L. & L.E. MELCHERS. 1942. Studies on Black Stem of Alfalfa Caused by *Ascochyta imperfecta*. Phytopath. 32: 590-597.
- PUNITHALINGAM, E. & I.A.S. GIBSON. 1976. *Phoma medicaginis* var. *pinodella*. CMI Descript. of Pathogenic Fungi and Bacteria, Set 52: 518.
- SUSURI, L. & NYSRETE DODA. 1990. Morfološka i fiziološka proučavanja *A. imperfecta* i *S. botryosum* prouzrokovala pjegavosti lucerne (*Medicago sativa* L.). GZB. Zagreb (Rezime).
- SUSURI, L. 1985. Proučavanje *Ascochyta pisi* Lib. parazita graška *Pisum sativum* L. Poljopri. Znanst. Smotra 66: 393-406.
- TUITE, J. 1969. Plant Pathological Methods. Fungi and Bacteria. Burgess Publi. Company, Minneapolis.

---

acs68\_06