

IDENTIFIKACIJA I ZASTUPLJENOST *FUSARIUM* VRSTA NA SJEMENU GRAHORICE, BIJELE VUČIKE TE NEKIH SAMONIKLIH MAHUNARKI

T. Miličević⁽¹⁾, J. Kaliterna⁽¹⁾, D. Ivić⁽²⁾, Andrea Stričak⁽¹⁾

Izvorni znanstveni članak
Original scientific paper

SAŽETAK

Ispitana je zastupljenost *Fusarium* vrsta na sjemenu kultiviranih mahunarki - grahorice (*Vicia sativa*) i bijele vučike (*Lupinus albus*) te na sjemenu samoniklih mahunarki - roščićave svinduše (*Lotus corniculatus*), divlje lucerne (*Medicago sativa*), bagrema (*Robinia pseudoacacia*), trnovca (*Gleditsia triacanthos*), ljekovitoga kokotca (*Melilotus officinalis*), ptičje grahorice (*Vicia cracca*) i livadne kukavičice (*Lathyrus pratensis*). Determinirano je ukupno 13 *Fusarium* vrsta: *F. verticillioides*, *F. acuminatum*, *F. avenaceum*, *F. tricinctum*, *F. oxysporum*, *F. scirpi*, *F. semitectum*, *F. culmorum*, *F. proliferatum*, *F. pseudograminearum*, *F. sporotrichioides*, *F. sambucinum* i *F. heterosporum*. Na sjemenu kultiviranih mahunarki utvrđene su vrste *F. verticillioides* i *F. proliferatum*, a ostalih 11 *Fusarium* vrsta utvrđeno je na sjemenu samoniklih mahunarki, od kojih su najzastupljenije bile vrste *F. avenaceum* i *F. acuminatum*.

Ključne riječi: *Fusarium* vrste, sjeme, Fabaceae, mahunarke

UVOD

Porodica Fabaceae (Leguminosae) po brojnosti vrsta treća je porodica kritosjemenjača nakon porodica Orchidaceae i Asteraceae i obuhvaća 730 rodova te oko 19400 vrsta. Bolesti mahunarki uzrokovane fitopatogenim gljivama javljaju se, u jačem ili slabijem intenzitetu, redovito svake godine u svim područjima svijeta i značajno utječu na sniženje potencijalnog uroda tih kultura, ali i na kvalitetu konačnoga proizvoda, trgovinu biljnim materijalom i širenje uzgoja mahunarki u nova područja (Porta-Puglia i Aragona, 1997.). Jedne od najznačajnijih bolesti zasigurno su bolesti sjemena te bolesti koje se prenose sjemenom. Među najčešćim su patogenima koji uzrokuju takve bolesti gljive iz roda *Fusarium* (Leslie i Summerell, 2006.). Vrste iz roda *Fusarium* mogu biti saprofiti, sekundarni kolonizatori nekrotiziranoga biljnoga tkiva (Leslie i Summerell, 2006.) ili endofiti (Yates i sur., 1997.), no veliki broj njih su paraziti biljaka i uzročnici manje ili više značajnih biljnih bolesti. Rasprostranjenost, ekologija i značenje velikoga broja *Fusarium* vrsta još uvijek je slabo ili vrlo slabo istražena (Leslie i Summerell, 2006.). Determinacija *Fusarium* vrsta temelji se na njihovim opisima objavljje-

nima u pojedinačnim radovima ili u različitim kompilacijskim priručnicima. Do početka 21. stoljeća determinacija *Fusarium* vrsta temeljila se isključivo na morfološkim karakteristikama (Booth, 1977.; Neslon i sur., 1983.; Balmas i sur., 2000.). Kako bi se standardizirao postupak determinacije navedenih gljiva, Summerell i sur. (2003.) te Leslie i Summerell (2006.) sastavili su listu u kojoj je navedeno koje se *Fusarium* vrste još uvijek mogu točno determinirati samo na osnovi morfoloških karakteristika. Za mnoge *formae speciales* vrsta *F. oxysporum* i *F. solani* potrebno je provesti testove patogenosti, dok je vrste iz tzv. "*Gibberella fujikuroi* kompleksa" moguće točno determinirati uglavnom korištenjem molekularnih tehnika ili križanjem izolata i dobivanjem fertilnoga potomstva u vidu vijabilnih askospora u peritecijima (Summerell i sur., 2003.; Leslie i Summerell, 2006.).

(1) Prof.dr.sc. Tihomir Miličević (tmilicevic@agr.hr), Joško Kaliterna, dipl.ing., Andrea Stričak, studentica - Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska (2) Dr.sc. Dario Ivić - Zavod za zaštitu bilja, Hrvatski centar za poljoprivredu, hranu i selo, Zagreb, Hrvatska

MATERIJAL I METODE

Izolacija *Fusarium* vrsta

Fusarium vrste izolirane su i uzgajane na krum-pir-dekstroznom agaru (KDA), vodenom agaru (VA), agaru s lišćem karanfila (LKDA) te miklobutanil-se-

lektivnom agaru (MSA) i malahit zelenilo-selektivnom agaru (MZSA). MSA je pripremljen prema Vujanoviću i sur. (2002.), a MZSA prema Castelli i sur. (1997.). Istraživanjem je obuhvaćeno devet vrsta iz porodice Fabaceae, a popis i porijeklo uzoraka prikazani su u Tablici 1.

Tablica 1. Uzorci sjemena mahunarki korišteni u istraživanju

Table 1. Samples of legumes seeds used in this research

| Kultivirane mahunarke - Cultivated legumes | | |
|---|-----------------------|----------------------|
| Vrste - Species | Kultivari - Cultivars | Lokalitet - Locality |
| Grahorica (<i>Vicia sativa</i> L.) | Ratarka | Zagreb |
| | Nepoznata (šifra: OS) | Osijek |
| Vučika (<i>Lupinus albus</i> L.) | Nepoznata | Osijek |
| Samonikle mahunarke - Wild legumes | | |
| Vrste - Species | | Lokalitet - Locality |
| Roščičeva svinduša (<i>Lotus corniculatus</i> L.) | - | Zagreb |
| Divlja lucerna (<i>Medicago sativa</i> L.) | - | Knin |
| Bagrem (<i>Robinia pseudoacacia</i> L.) | - | Knin |
| Trnovac (<i>Gleditsia triacanthos</i> L.) | - | Knin |
| Ljekoviti kokotac (<i>Melilotus officinalis</i> (L.) Lam.) | - | Split |
| Ptičja grahorica (<i>Vicia cracca</i> L.) | - | Ivanić-Grad |
| Livadna kukavičica (<i>Lathyrus pratensis</i> L.) | - | Ivanić-Grad |

Po 100 zrna iz svakog uzorka mahunarki postavljeno je na vlažni filter-papir i držano sedam dana na sobnoj temperaturi, kako bi se procijenila površinska kontaminacija sjemena. Sjeme je površinski sterilizirano potapanjem u otopinu 1% natrij-hipoklorita, tijekom jedne do deset minuta. Nakon potapanja, sjeme je dva puta isprano u sterilnoj vodi, posušeno u struji zraka nekoliko sati i inokulirano na MSA. Fragmenti razvijena micelija precijepljeni su na KDA i inkubirani u tami na 22°C. Nakon sedam do deset dana, na temelju pregleda konidija razvijenih na KDA i pojave karakterističnoga pigmenta u agaru, odbačene su kolonije za koje je utvrđeno da ne pripadaju rodu *Fusarium*. Iz kolonija za koje se ispostavilo da pripadaju rodu *Fusarium* dobiveni su monosporni izolati, koristeći metodu pojedinačne spore ili metodu vrha hife.

Determinacija *Fusarium* vrsta

Svi izolati, osim onih za koje je nakon prvoga pregleda ustanovljeno da pripadaju tzv. "*Gibberella fujikuroi* kompleksu vrsta", determinirani su na temelju morfoloških karakteristika. Morfološke karakteristike izolata utvrđene su na KDA i LKDA, pri čemu je utvrđeno: a) prisutnost mikrokonidija; b) građa konidiofora; c) oblik mikrokonidija; d) prisutnost, raspored i morfologija stijenke hlamidospora; e) oblik makrokonidija - zakrivljenost, broj pregrada, oblik vršne i bazalne stanice, i f) izgled kolonije na KDA s gornje i donje strane nakon 14 dana. Vrste su određene prema Leslie i Summerell (2006.), uz usporedbu s Nelson i sur. (1983.) te Booth (1977.). Izolati vrsta iz tzv. "*Gibberella fujikuroi*" kompleksa vrsta determinirani su sekvenciranjem fragmenata gena translacijskog elongacijskog faktora 1 α (EF-1

α) umnoženih lančanom reakcijom polimeraze. Izolati s vrstama iz tzv. "*Gibberella fujikuroi*" kompleksa pregledani su stereomikroskopski i mikroskopski, s namjerom da se odbaci eventualna mogućnost zamjene s vrstama *F. oxysporum* ili *F. solani*. Nakon potvrde da se radi o vrstama iz "*Gibberella fujikuroi*" kompleksa, izolati su inokulirani na KDA slojem celofana na površini. Nakon sedam dana celofan je odvojen s agara, a micelij koji se razvio na njemu sastrugan je u keramičke tarionike. U tarionike je višekratno ulijevan tekući dušik, pri čemu je micelij drobljen dok nije dobiven fini prah sa što manjim česticama. Od svakog izolata odvagano je 8 do 19 mg praha, iz kojeg je ekstrahirana ukupna DNA, uz korištenje kompleta Dneasy Plant Mini Kit® (Qiagen Inc., SAD) prema uputama proizvođača te je na spektrofotometru utvrđena količina ukupne ekstrahirane DNA (Eppendorf AG, Njemačka). Lančana reakcija polimerazom izvedena je prema izmijenjenom protokolu O' Donnell i sur. (1998.). U reakciji su korištene početnice EF-1 i EF-2 (O' Donnell i sur., 1998.):

5' - ATGGGTAAGGAGGACAAGAC - 3'

5' - GGAAGTACCAGTGATCATGTT - 3'.

Produkti reakcije podvrgnuti su elektroforezi u TBE puferu pri 70 V na 1.5 % agaroznom gelu. Nakon elektroforeze, gel je držan u otopini etidij bromida (EtBr), ispran je u vodi te očitavan na transiluminatoru (Bio - Rad Laboratories, SAD). Nakon provjere rezultata, produkti reakcije pročišćeni su korištenjem GenElute® Pcr Clean-Up kita (Sigma Chemical, SAD) prema uputama proizvođača. U 10 do 12 μ l pročišćenog produkta dodano je 1 μ l otopine početnice Ef-1 koncentracije 3.2 pmol/ml te je smjesa podvrgnuta sekvenciranju. Sekvenciranje je provedeno uslužno na DNA Servisu Instituta "Ruđer

Bošković", a dobivene su sekvence očitane u programu BioEdit. Usporedba s drugim sekvencama provedena je korištenjem GenBank baze podataka (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>). Pri usporedbi sekvenci korištena je "megablast" opcija programa BLAST 2.2.20 (Zhang i sur., 2000.). Prilikom određivanja vrste istraživanih izolata na temelju usporedbe sekvenci, kao referentni izolati uzimani su prvenstveno izolati ARS Culture Collection (Agricultural Research Service, SAD), uneseni u GenBank bazu podataka pod oznakom "NRRL". Isto tako, pri određivanju vrste uzeta je u obzir i sličnost sekvenci istraživanih izolata s ostalim sekvencama GenBank baze podataka, međusobna pokrivenost sekvenci te broj izolata determiniranih kao pojedina vrsta među prvih deset do dvadeset najbližnjih sekvenci.

REZULTATI I RASPRAVA

Fusarium vrste utvrđene su na sjemenu obje kultivirane mahunarke (grahorici i bijeloj vučiki), a od samoniklih mahunarki na sjemenu rošćićave svinduše, divlje lucerne, ljekovitoga kokotca i ptičje grahorice (Tablice 2. i 3.). Na sjemenu bagrema, trnovca i livadne kuka-vičke nije utvrđena prisutnost *Fusarium* vrsta. Sličnost sekvenci fragmenta EF-1 fragmenata gena *Fusarium* izolata iz istraživanja sa sekvencama iz GenBanke baze podataka prikazana je u Tablici 4. Postotak zaraženosti sjemena mahunarki *Fusarium* vrstama prikazan je u Tablici 5.

Tablica 2. Izolati, *Fusarium* vrste i njihova zastupljenost na sjemenu kultiviranih mahunarki

Table 2. Isolates, *Fusarium* species and their occurrence on seeds of cultivated legumes

| Uzorci – Samples | Izolati Isolates | Vrste - Species | Zastupljenost <i>Fusarium</i> vrsta (%) Occurrence of <i>Fusarium</i> species (%) |
|--------------------|---------------------|---------------------------|--|
| Grahorica, Ratarka | FGa(R)-1 | <i>F. verticillioides</i> | <i>F. verticillioides</i> 88 % <i>Fusarium</i> sp. 12 % |
| | FGa(R)-2 | <i>F. verticillioides</i> | |
| | FGa(R)-3 | <i>F. verticillioides</i> | |
| | FGa(R)-4 | <i>F. verticillioides</i> | |
| | FGa(R)-5 | <i>F. verticillioides</i> | |
| | FGa(R)-6 | Nepoznata | |
| | FGa(R)-7 | <i>F. verticillioides</i> | |
| | FGa(R)-8 | <i>F. verticillioides</i> | |
| Grahorica, "OS" | FGa(OS)-1 | <i>F. verticillioides</i> | <i>F. verticillioides</i> 100 % |
| | FGa(OS)-2 | <i>F. verticillioides</i> | |
| Vučika | FVu-1 | <i>F. verticillioides</i> | <i>F. verticillioides</i> 67 % <i>F. proliferatum</i> 33 % |
| | FVu-2 | <i>F. verticillioides</i> | |
| | FVu-3 | <i>F. proliferatum</i> | |

Tablica 3. Izolati, *Fusarium* vrste i njihova zastupljenost na sjemenu samoniklih mahunarki

Table 3. Isolates, *Fusarium* species and their occurrence on seeds of wild legumes

| Uzorci – Samples | Izolati Isolates | Vrste - Species | Zastupljenost <i>Fusarium</i> vrsta (%) Occurrence of <i>Fusarium</i> species (%) |
|--|---------------------|----------------------|--|
| Divlja lucerna (<i>Medicago sativa</i> L.) | FMS-1 | <i>F. tricinctum</i> | <i>F. acuminatum</i> 46 % <i>F. tricinctum</i> 38 % <i>F. avenaceum</i> 8 % <i>F. oxysporum</i> 8 % |
| | FMS-2 | <i>F. tricinctum</i> | |
| | FMS-3 | <i>F. tricinctum</i> | |
| | FMS-4 | <i>F. tricinctum</i> | |
| | FMS-5 | <i>F. acuminatum</i> | |
| | FMS-6 | <i>F. oxysporum</i> | |
| | FMS-7 | <i>F. acuminatum</i> | |
| | FMS-8 | <i>F. acuminatum</i> | |
| | FMS-9 | <i>F. acuminatum</i> | |
| | FMS-10 | <i>F. avenaceum</i> | |
| | FMS-11 | <i>F. tricinctum</i> | |
| | FMS-12 | <i>F. acuminatum</i> | |
| | FMS-13 | <i>F. acuminatum</i> | |
| Rošćićeva svinduša (<i>Lotus corniculatus</i> L.) | FLC-1 | <i>F. culmorum</i> | <i>F. culmorum</i> 50 % <i>Fusarium</i> spp. 50 % |
| | FLC-2 | Nepoznata | |
| Ljekoviti kokotac (<i>Melilotus officinalis</i> (L.) Lam.) | FMO-1 | <i>F. acuminatum</i> | <i>F. acuminatum</i> 80 % <i>Fusarium</i> spp. 20 % |
| | FMO-2 | <i>F. acuminatum</i> | |
| | FMO-3 | <i>F. acuminatum</i> | |
| | FMO-4 | <i>F. acuminatum</i> | |
| | FMO-5 | Nepoznata | |

| Uzorci – Samples | Izolati Isolates | Vrste - Species | Zastupljenost <i>Fusarium</i> vrsta (%) Occurrence of <i>Fusarium</i> species (%) |
|---|---------------------|-----------------------------|---|
| Ptičja grahorica (<i>Vicia cracca</i> L.) | FVC-1 | <i>F. sambucinum</i> | <i>F. avenaceum</i> 50 % <i>F. sambucinum</i> 10 % <i>F. semitectum</i> 10 % <i>F. pseudograminearum</i> 6 % <i>F. scirpi</i> 6 % <i>F. sporotrichioides</i> 6 % <i>F. tricinctum</i> 6 % <i>F. heterosporum</i> 6 % |
| | FVC-2 | <i>F. avenaceum</i> | |
| | FVC-3 | <i>F. avenaceum</i> | |
| | FVC-4 | <i>F. pseudograminearum</i> | |
| | FVC-5 | <i>F. semitectum</i> | |
| | FVC-6 | <i>F. avenaceum</i> | |
| | FVC-7 | <i>F. avenaceum</i> | |
| | FVC-8 | <i>F. scirpi</i> | |
| | FVC-9 | <i>F. sporotrichioides</i> | |
| | FVC-10 | <i>F. avenaceum</i> | |
| | FVC-11 | <i>F. avenaceum</i> | |
| | FVC-12 | <i>F. semitectum</i> | |
| | FVC-13 | <i>F. avenaceum</i> | |
| | FVC-14 | <i>F. sambucinum</i> | |
| | FVC-15 | <i>F. tricinctum</i> | |
| | FVC-16 | <i>F. heterosporum</i> | |
| | FVC-17 | <i>F. avenaceum</i> | |
| | FVC-18 | <i>F. avenaceum</i> | |

Korištenje selektivnih hranjivih podloga MSA i MZSA pokazalo se praktičnim u izolaciji *Fusarium* vrsta sa sjemena. Uzevši u obzir sastav tih podloga, pretpostavljalo se da je MSA jače selektivan u odnosu na MZSA te tako prikladniji za izolaciju *Fusarium* spp. sa sjemena jače kontaminiranoga drugim gljivama. Preliminarnom analizom zdravstvenoga stanja sjemena grahorice i vučike, utvrđena je jaka kontaminacija s *Rhizopus* vrstama, koji su zbog brzoga rasta onemogućavali izolaciju ostalih gljiva. Na MSA, *Rhizopus* vrste nisu se razvijale, kao niti gljive iz roda *Cladosporium*, *Penicillium* ili *Alternaria*, dok su kolonije *Fusarium* vrsta na toj podlozi rasle. Pretpostavljeno je da sjeme samoniklih mahunarki sakupljeno iz prirodnih staništa neće biti jače kontaminirano gljivama, koje bi, zbog brzoga rasta, mogle onemogućiti izolaciju *Fusarium* spp., što se pokazalo točnim. Na MZSA kolonije *Fusarium* spp. rasle su sporije u usporedbi s MSA, uočen je i rast *Cladosporium* i *Alternaria* vrsta, no razvoj kolonija ciljanih vrsta iz roda *Fusarium* bio je dovoljan da se te gljive uoče i izoliraju. Zanimljivo, i na MSA i na MZSA uočena je relativno izražena sporulacija *Fusarium* kolonija. U Tablici 4. prikazana je usporedba rezultata morfološke identifikacije vrsta iz „*Gibberella fujikuroi*” kompleksa sa sličnošću odabranih sekvenci iz GenBank baze podataka. Kako je sekvenciranje provedeno samo na jednome lancu DNA, određen broj sekvenci bio je slabije kvalitete, s većim brojem praznina, što je otežavalo njihovu analizu. Zbog slabije kvalitete određenoga broja sekvenci, nije se pristupilo izradi filogenetskoga stabla, a dodatni razlog za samo osnovnu usporedbu sekvenci bila je i činjenica da je većina sekvenciranih izolata na temelju morfologije determinirana kao *F. verticillioides*. Karakteristični lanci mikrokonidija i monofijalni konidiofori relativno su robusna obilježja koja omogućuju determinaciju te vrste, iako je opisan određen broj *Fusarium* vrsta koje su vrlo slične i s kojima bi se *F. verticillioides* mogao eventualno zamijeniti (Leslie i Summerell, 2006.; Lević, 2008.). Ukoliko bi se među prvim izolatima s najbližijom sekvencijom u GenBank bazi našla većina izolata upisanih kao *F. verticillioides* ili bi među prvi tri najbliž-

nije sekvence bio izolat *Gibberella moniliformis* NRRL 43697, smatrali bismo to potvrdom da se radi o vrsti *F. verticillioides*. Izolat Fvu-3 s vučike imao je polifijalne konidiofore te je determiniran kao *F. proliferatum*, što smatramo i potvrđenim na temelju sekvence. Naime, svih deset najbližijih izolata iz GenBank baze navode se kao *F. proliferatum*, a najbližnja sekvenca bila je ona izolata *Fusarium proliferatum* NRRL 31071. S druge strane, niti na temelju morfologije niti na temelju sekvence, nije bilo moguće determinirati izolate FGa(R)-6 (grahorica), FLC-2 (svinduša) i FMO-5 (kokotac). U slučaju izolata FGa(R)-6 i FLC-2, najbližnje sekvence u GenBank bazi bile su s izolatima, koji, također, nije determiniran do razine vrste (*Fusarium* sp. NRRL 25622). Moguće je da se radi o do sada neopisanoj *Fusarium* vrsti, no daljnji rad na spomenutim izolatima prelazio je okvire postavljenih ciljeva ovog istraživanja.

Tablica 4. Sličnost sekvenci fragmenta EF-1 gena *Fusarium* izolata iz istraživanja sa sekvencama iz GenBanke baze podatakaTable 4. Similarities of sequences of partial EF-1 gene from *Fusarium* isolates in this research with sequences from GenBank database

| Izolati <i>Isolates</i> | Morfološka identifikacija <i>Morphological identification</i> | Pristupni broj za usporedbu <i>Accession numbers for comparison</i> | Referentni izolati za usporedbu <i>Referent isolates for comparison</i> | Postotak pokrivenosti sekvenci <i>Percentage of query coverage of the sequence</i> | Maksimalna sličnost sekvenci <i>Maximal identity of the sequence</i> |
|----------------------------|---|---|--|--|--|
| FGa(R)-1 | <i>Fusarium verticillioides</i> | EF453022.1 | <i>Gibberella moniliformis</i> NRRL 43697 | 90 % | 88 % |
| FGa(R)-2 | <i>Fusarium verticillioides</i> | EF453022.1 | <i>Gibberella moniliformis</i> NRRL 43697 | 95 % | 90 % |
| FGa(R)-3 | <i>Fusarium verticillioides</i> | EF453022.1 | <i>Gibberella moniliformis</i> NRRL 43697 | 95 % | 98 % |
| FGa(R)-4 | <i>Fusarium verticillioides</i> | EF453022.1 | <i>Gibberella moniliformis</i> NRRL 43697 | 77 % | 96 % |
| FGa(R)-5 | <i>Fusarium verticillioides</i> | EF453022.1 | <i>Gibberella moniliformis</i> NRRL 43697 | 76 % | 93 % |
| FGa(R)-6 | <i>Fusarium</i> sp. | AF160301.1 | <i>Fusarium</i> sp. NRRL 25622 | 67 % | 99 % |
| FGa(R)-7 | <i>Fusarium verticillioides</i> | EF453022.1 | <i>Gibberella moniliformis</i> NRRL 43697 | 95 % | 96 % |
| FGa(R)-8 | <i>Fusarium verticillioides</i> | EF453022.1 | <i>Gibberella moniliformis</i> NRRL 43697 | 95 % | 98 % |
| FGa(OS)-1 | <i>Fusarium verticillioides</i> | EF453022.1 | <i>Gibberella moniliformis</i> NRRL 43697 | 88 % | 90 % |
| FGa(OS)-2 | <i>Fusarium verticillioides</i> | EF453022.1 | <i>Gibberella moniliformis</i> NRRL 43697 | 45 % | 83 % |
| FVu-1 | <i>Fusarium verticillioides</i> | EF453022.1 | <i>Gibberella moniliformis</i> NRRL 43697 | 80 % | 93 % |
| FVu-2 | <i>Fusarium verticillioides</i> | EF453022.1 | <i>Gibberella moniliformis</i> NRRL 43697 | 89 % | 90 % |
| FVu-3 | <i>Fusarium proliferatum</i> | AF291058.1 | <i>Fusarium proliferatum</i> NRRL 31071 | 97 % | 98 % |
| FLC-2 | <i>Fusarium</i> sp. | AF160301.1 | <i>Fusarium</i> sp. NRRL 25622 | 55 % | 90 % |
| FMO-5 | <i>Fusarium</i> sp. | EF452998.1 | <i>Fusarium proliferatum</i> NRRL 43667 | 42 % | 84 % |

Tablica 4. Postotak sjemena zaraženoga *Fusarium* vrstama u ispitanim uzorcima mahunarkiTable 4. Percentage of seeds infected by *Fusarium* species in examined samples of legumes

| Kultivirane mahunarke - <i>Cultivated legumes</i> | | |
|---|-------------------------|--|
| Vrste - <i>Species</i> | Uzorci - <i>Samples</i> | <i>Fusarium</i> spp. na sjemenu (%) <i>Fusarium</i> spp. on seeds (%) |
| Grahorica | Ratarka | 8 % |
| | "OS" | 2 % |
| Vučika | - | 3 % |
| Samonikle mahunarke - <i>Wild legumes</i> | | |
| Vrste - <i>Species</i> | | <i>Fusarium</i> spp. na sjemenu (%) <i>Fusarium</i> spp. on seeds (%) |
| Roščićava svinduša (<i>Lotus corniculatus</i> L.) | | 2 % |
| Divlja lucerna (<i>Medicago sativa</i> L.) | | 13 % |
| Bagrem (<i>Robinia pseudoacacia</i> L.) | | 0 % |
| Trnovac (<i>Gleditsia triacanthos</i> L.) | | 0 % |
| Ljekoviti kokotac (<i>Melilotus officinalis</i> (L.) Lam.) | | 5 % |
| Ptičja grahorica (<i>Vicia cracca</i> L.) | | 18 % |
| Livadna kukavičica (<i>Lathyrus pratensis</i> L.) | | 0 % |

Sa sjemena svih kultiviranih i samoniklih mahunarki uključenih u istraživanje ukupno je determinirano 13 *Fusarium* vrsta. Razina zaraze *Fusarium* vrstama bila je približno slična kod svih ispitivanih uzoraka te se kretala u rasponu od 2 % (roščićava svinduša) do 18 % (ptičja grahorica). Na bagremu i trnovcu nije utvrđena zaraza *Fusarium* vrstama, što može biti razumljivo, jer se radi o stablašicama u urbanim sredinama. Te su vrste bile uključene u istraživanje iz razloga što je iz literature poznato da se *Fusarium* vrste mogu naći i na drvenastim domaćinima te na sjemenu drvenastih biljaka. S obzirom na to da većina *Fusarium* vrsta živi u tlu (Leslie i Summerell, 2006.; Lević, 2008.), veća je vjerojatnost da će kolonizirati biljne dijelove koji su uz tlo ili bliži tlu, dok su mahune bagrema i trnovca smještene relativno visoko na stablima te su kao takve prilično udaljene od inokuluma. Isto je tako važno napomenuti da su urbane sredine relativno siromašne biljnom vegetacijom, a samim time i biljkama, koje su potencijalni izvor inokuluma. S druge strane, sve samonikle mahunarke korištene u istraživanju rasle su u prirodnim staništima s bujnom vegetacijom te je na taj način zasigurno omogućen prijenos vrsta iz roda *Fusarium* s izvora inokuluma na mahune i sjeme. Na sjemenu livadne kukavičice također nisu pronađene *Fusarium* vrste, što je bilo donekle neočekivano, s obzirom na to da su uzorci uzeti s istoga lokaliteta i u isto vrijeme kada su uzeti i uzorci sjemena ptičje grahorice, na kojoj je zaraza *Fusarium* vrstama iznosila čak 18 %. Iako je teško utvrditi razlog zbog čega je kod jedne vrste utvrđen najveći postotak zaraze *Fusarium* vrstama, dok kod druge uopće nisu nađene. Na sjemenu bijele vučike na temelju jednog uzorka utvrđena je prosječna zaraza *Fusarium* vrstama od 3%. Slične, niske zaraze, navode i drugi autori u svojim istraživanjima (Abdel-Hafez, 1984.; Jeske i Prusinski, 2001.). Jeske i Prusinski (2001.) su na naizgled zdravome sjemenu utvrdili zarazu *Fusarium* vrstama 1% do 14%, dok se na sjemenu s vidljivim znakovima zaraze kretala 2% do 12%. Embaby i Abdel-Galil (2006.) utvrdili su zarazu *Fusarium* vrstama na sjemenu bijele vučike u visini 11%, dok je Abdel-Hafez (1984.) utvrdio prisustvo *Fusarium* vrsta u 30 % ispitanih uzoraka sjemena iste *Lupinus* vrste, s prosječnom zarazom sjemena 1,46%. Zaraza sjemena ostalih biljnih vrsta koje su obuhvaćene ovim istraživanjem još je slabije istražena pa ne postoji dovoljno podataka kojima bi se ovdje dobiveni rezultati mogli uspoređivati. Što se tiče strukture populacije *Fusarium* vrsta, na sjemenu grahorice i bijele vučike te samoniklih mahunarki utvrđen je relativno manji broj *Fusarium* vrsta u odnosu na istraživanja drugih autora (Kellock i sur., 1978.; Jeske i Prusinski, 2001.). Na sjemenu oba uzorka grahorice dominantna je bila vrsta *F. verticillioides*, čineći 90% izolata s te kulture. Na sjemenu samonikle lucerne i ljekovitoga kokotca najčešća vrsta bila je *F. acuminatum*, a na sjemenu ptičje grahorice dominirala je *F. avenaceum*. Rezultati istraživanja upućuju kako *Fusarium* vrste koje naseljavaju sjeme mahunarki ovise o lokaciji, godini, klimi, okolnim biljkama ili biljnim ostacima te u slučaju kultiviranih mahunarki, o kultivaru i agrotehničkim mjerama. Na

sjemenu grahorice i bijele vučike utvrđene su samo vrste iz tzv. "*Gibberella fujikuroi* kompleksa", *F. verticillioides* i *F. proliferatum*. U Saudijskoj su Arabiji te vrste utvrđene kao dominantne na sjemenu vučike te su navedene pod imenom *F. moniliforme*, tada važećim imenom (Abdel-Hafez i sur., 1984.), iako se, u stvari, radilo o vrsti *F. verticillioides* ili vrsti *F. proliferatum* (Summerell i sur., 2003.). Od 10 *Fusarium* izolata koje su Embaby i Abdel-Galil (2006.) u Egiptu izolirali sa sjemena vrste *Lupinus termis* njih je šest pripadalo vrsti *F. oxysporum*, dok su ostali izolati bili determinirani do razine roda. Za razliku od spomenutih vrsta, Jeske i Prusinski (2001.) na sjemenu bijele vučike utvrdili su vrste *F. avenaceum*, *F. solani*, *F. culmorum*. Na sjemenu samoniklih mahunarki obuhvaćenih u ovom istraživanju populacija *Fusarium* vrsta bila je vrlo raznovrsna. Pošto su *Fusarium* vrste relativno slabo istražene na samoniklim mahunarkama, podatke iz ovog istraživanja moguće je usporediti s podacima vezanim za njihove kultivirane srodnike. Na sjemenu *Medicago* vrsta (*M. littoralis* i *M. truncatula*) u Južnoj Africi utvrđene su vrste *F. acuminatum*, *F. reticulatum*, *F. avenaceum*, *F. equiseti*, *F. graminearum* i *F. sambucinum*. U Australiji na sjemenu kultiviranih *Medicago* vrsta utvrđeni su *F. avenaceum*, *F. acuminatum*, *F. equiseti* i *F. culmorum* (Kellock i sur., 1978.), a Barbetti i Allen (2005.) utvrdili su izuzetno visoku prisutnost *F. acuminatum* (do 83 %) te *F. avenaceum* (do 65%) na mahunama *Medicago* vrsta na nekoliko lokacija. Iz gore navedenog očito je da su *F. acuminatum* i *F. avenaceum* česte na sjemenu kultiviranih *Medicago* vrsta. U ovom istraživanju navedene vrste bile su, također, dominantne na sjemenu samoniklih mahunarki. Poznato je da su *F. avenaceum* i *F. acuminatum* patogene za mnoge mahunarke (Leath i Kendall, 1978.; Bateman, 1997.; Satyaprasad i sur., 2000.; Lager i Gerhardson 2002.) pa je za pretpostaviti da bi se moglo raditi o vrstama koje preferiraju određene biljke iz navedene porodice te žive u različitim saprofitnim, endofitskim ili moguće parazitskim odnosima s tim biljkama. Od ostalih vrsta koje su utvrđene na sjemenu samoniklih mahunarki u ovom istraživanju, prevladavaju vrste koje su uglavnom zastupljene i na sjemenu kultiviranih mahunarki, kao što su *F. culmorum*, *F. oxysporum*, *F. sambucinum*, *F. semitectum*, *F. pseudograminearum* ili *F. scirpi*. Iz navedenoga može se zaključiti da je većina vrsta utvrđenih na sjemenu samoniklih mahunarki u ovom istraživanju do sada pronađena na sjemenu mahunarki u istraživanjima drugih autora. Ovim istraživanjem potvrđeno je da se na sjemenu mahunarki mogu naći vrste kao što su *F. oxysporum*, *F. semitectum*, *F. equiseti*, *F. sporotrichioides*, *F. culmorum*, *F. tricinctum*, *F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. avenaceum* ili *F. acuminatum*. Osim navedenih vrsta, utvrđene su gljive za koje nisu pronađeni nikakvi podaci u literaturi o njihovoj eventualnoj prisutnosti na sjemenu mahunarki, a to su *F. pseudograminearum*, *F. heterosporum* i *F. scirpi*, koje su u ovim istraživanjima utvrđene na ptičjoj grahorici. Isto tako, pronađeni su izolati FGa(R)-6, FLC-2 i FMO-5, za koje nije bilo moguće utvrditi kojoj vrsti pripadaju niti na temelju sekvenci.

ZAKLJUČAK

Utvrđeno je ukupno 13 *Fusarium* vrsta na sjemenu ispitivanih mahunarki, a zastupljenost pojedinih *Fusarium* vrsta bila je različita, ovisno o uzorku sjemena i biljnoj vrsti. Na sjemenu kultiviranih mahunarki (grahorica i bijela vučika) utvrđene su dvije *Fusarium* vrste, *F. verticillioides* i *F. proliferatum*, a na sjemenu samoniklih mahunarki (roščičeve svinduše, divlje lucerne, ljekovitoga kokotca i ptičje grahorice) utvrđeno je više vrsta, od kojih su dominantne vrste bile *F. avenaceum* i *F. acuminatum*. Većina utvrđenih *Fusarium* vrsta spominju na mahunarkama i drugi autori u svijetu, dok za tri vrste, *F. pseudograminearum*, *F. heterosporum* i *F. scirpi*, koje su utvrđene na sjemenu ptičje grahorice, ovo je prema dostupnim literaturnim podacima prvi nalaz u svijetu.

LITERATURA

1. Abdel-Hafez, S.I.I. (1984): Mycoflora of bean, broad bean, lentil, lupine and pea seeds in Saudi Arabia. *Mycopathologia* 88: 45-49.
2. Balmas, V., Santori, A., Corazza, L. (2000): Le specie di *Fusarium* più comuni in Italia - Suggerimenti per il loro riconoscimento. *Petria* 10(1): 1-60.
3. Barbetti, M.J., Allen, J.G. (2005): Association of *Fusarium* species, with potential for mycotoxicosis, on pods of annual Medicago in Western Australia. *Australian Journal of Agricultural Research* 56: 279-284.
4. Bateman, G.L. (1997): Pathogenicity of fungi associated with winter loss and injury in white lupin. *Plant Pathology* 46: 157-167.
5. Booth, C. (1977): *Fusarium* - Laboratory Guide to the Identification of the Major Species. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Velika Britanija.
6. Castellá, G., Bragulat, M. R., Rubiales, M. V., Cabanes, F. J. (1997): Malachite green agar, a new selective medium for *Fusarium* spp. *Mycopathologia* 137: 173-178.
7. Embaby, E.M., Abdel-Galil, M.M. (2006): Seed borne fungi and mycotoxins associated with some legume seeds in Egypt. *Journal of Applied Sciences Research* 2: 1064-1071.
8. Jeske, M., Prusinski, J. (2001): Impact of dimetiphine, etephon and diquat on the health status of white lupin seeds (*Lupinus albus* L.). *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities* 4.
9. Kellock, A.W., Stubbs, L.L., Parbery, D.G. (1978): Seed-borne *Fusarium* species on subterranean clover and other pasture legumes. *Australian Journal of Agricultural Research* 29: 975-982.
10. Lager, J., Gerhardson, B. (2002): Pathogenicity of clover root pathogens to pea, bean and lucerne. *Journal of Plant Diseases and Protection* 109: 142-151.
11. Leath, K.T., Kendall, W.A. (1978): *Fusarium* root rot of forage species: Pathogenicity and host range. *Phytopathology* 68: 826-831.
12. Leslie, J.F., Summerell, B.A. (2006): *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Publishing, SAD.
13. Lević, J.T. (2008): Vrste roda *Fusarium* u oblasti poljoprivrede, veterinarske i humane medicine. Institut za kukuruz "Zemun Polje", Beograd, Srbija.
14. Nelson, P.E., Toussoun, T.A., Marasas, W.F.O. (1983): *Fusarium* species. The Pennsylvania University Press, USA.
15. O'Donnell, K., Kistler, H.C., Cigelnik, E., Ploetz, R.C. (1998): Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 95: 2044-2049.
16. Porta-Puglia, A., Aragona, M. (1997): Improvement of grain legumes - General part: diseases. *Field Crops Research* 53: 17-30.
17. Satyaprasad, K., Bateman, G.L., Ward, E. (2000): Comparisons of isolates of *Fusarium avenaceum* from white lupin and other crops by pathogenicity tests, DNA analyses and vegetative compatibility tests. *Journal of Phytopathology* 148: 211-219.
18. Summerell, B.A., Salleh, B., Leslie, J.F. (2003): An utilitarian approach to *Fusarium* identification. *Plant Disease* 87: 117-128.
19. Vujanovic, V., Hamel, C., Jabaji-Hare, S., St-Arnaud, M. (2002): Development of a selective myclobutanil agar (MBA) medium for the isolation of *Fusarium* species from asparagus fields. *Canadian Journal of Microbiology* 48: 841-847.
20. Zhang, D., Schwartz, S., Wagner, L., Miller, W. (2000): A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology* 7: 203-214.
21. Yates, I., Bacon, C.W., Hinton, D.M. (1997): Effects of endophytic infection by *Fusarium moniliforme* on corn growth and cellular morphology. *Plant Disease* 81: 723-728.

IDENTIFICATION AND OCCURRENCE OF *FUSARIUM* SPECIES ON SEEDS OF COMMON VETCH, WHITE LUPINE AND SOME WILD LEGUMES

SUMMARY

The presence and occurrence of Fusarium species was examined on the seeds of cultivated legumes - common vetch (Vicia sativa), white lupine (Lupinus albus), and wild legumes: bird's-foot trefoil (Lotus corniculatus), wild alfalfa (Medicago sativa), black locust (Robinia pseudoacacia), honey locust (Gleditsia triacanthos), sweet clover (Melilotus officinalis), bird vetch (Vicia cracca) and meadow vetchling (Lathyrus pratensis). Thirteen Fusarium species were identified - F. verticillioides, F. acuminatum, F. avenaceum, F. tricinctum, F. oxysporum, F. scirpi, F. semitectum, F. culmorum, F. proliferatum, F. pseudograminearum, F. sporotrichioides, F. sambucinum and F. heterosporum. Species F. verticillioides and F. proliferatum were determined on seeds of the cultivated legumes (common vetch and white lupine). Other 11 Fusarium species were determined on seeds of wild legumes (bird's-foot trefoil, wild alfalfa, sweet clover and bird vetch) among which the most prevalent were species F. avenaceum and F. acuminatum.

Key-words: *Fusarium species, seed, Fabaceae, legumes*

(Primljeno 03. ožujka 2013.; prihvaćeno 03. svibnja 2013. - Received on 3 March 2013; accepted on 3 May 2013)