

Zaštita bilja  
Vol. 63 (1), Nº 279, 36–44, 2012, Beograd

UDK: 633.31-226 (497.11);  
Naučni rad

## FITOPLAZMOZE LUCERKE (*Medicago sativa* L.) U CENTRALNOJ SRBIJI

SLOBODAN KUZMANOVIĆ<sup>1</sup>, MIRA STAROVIĆ<sup>1</sup>, SAŠA STOJANOVIĆ<sup>1</sup>, GORAN ALEKSIĆ<sup>1</sup>,  
TATJANA POPOVIĆ<sup>1</sup>, DRAGANA JOŠIĆ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, T. Drajzera 9, Beograd, Srbija,

<sup>2</sup>Institut za zemljište, Genetička laboratorija, T. Drajzera 7, Beograd, Srbija

*e-mail: mirastarovic@izbis.org.rs*

### REZIME

Simptomi kržljivosti, proliferacije, filodija, žutila i crvenila lucerke uočeni su prvi put u četiri lokaliteta u Centralnoj Srbiji (Tuleš, Sićevo, Ljubava i Belanovice) tokom 2008 godine. Godišnji indeks porasta zaraze kretao se od 2 do 6, a smanjenje prinosa zelene mase između 30–50%. Primenom RFLP i analize sekvenci 16S rDNK, identifikovano je prisustvo fitoplazmi u uzorcima lucerke koje pripadaju 16SrIII-B i 16SrXII-A grupama. Fitoplazma Stolbur tipa bila je dominantna i dokazana je u 80% uzoraka simptomatičnih biljaka.

**Ključne reči:** lucerka, fitoplazma, 16SrIII-B fitoplazma, Stolbur, rasprostranjenost

### UVOD

Lucerka (*Medicago sativa* L.) je najvažnija leguminozna biljka u Srbiji. Gaji se zbog visokog prinosa kvalitetnog sena. Značajna je kultura i sa aspekta očuvanja strukture zemljišta i njegove plodnosti. Površine pod lucerkom u Srbiji menjaju se iz godine u godinu, ali se kreću oko 200 000 ha (Djukić, 2005). U našim uslovima ostvaruje dva otkosa.

Simptomi kržljivosti, proliferacije, filodija, žutila i crvenila lucerke uočeni su u nekoliko

lokaliteta u Centralnoj Srbiji tokom 2008. godine (Starović i sar., 2012). Na prikupljenim uzorcima utvrđeno je prisustvo Stolbur fitoplazme i fitoplazme žutila deteline (“Clover yellows edge”-SYE) (Starović i sar., 2012).

Brojni su podaci o fitoplazmozama lucerki u svetskoj literaturi. Najzastupljeniji simptom “veštičinih metli”, povezan je, u zavisnosti od geografske pozicije, sa različitim grupama fitoplazmi: sa fitoplazmom filodija pasulja (“faba bean phyllody” – FBP) (Marccone et al. 1997; Khan et al. 2002), proliferacije de-

teline (“clover proliferation” – CP) (Wang and Hiruki 2001), zvezdastog žutila (“aster yellows” – AY) (Valiunas et al. 2000), Australijskog žutila lucerke (ALuY) (Pilkington et al. 2003), *Candidatus Phytoplasma asteris* u Boliviji (Jones et al. 2005) i fitoplazmom lucerke u Argentini (Conci et al. 2005). Prisustvo stolbur fitoplazme potvrđeno je na lucerki u Italiji (Marzachi i sar., 2000) u Indiji (Suryanarayana et al. 1996) i u SAD (Peters et al. 1999). Takođe, lucerka je rezervoar fitoplazme žutila repice (Wang and Hiruki 2001).

## MATERIAL I METODE

### TERENSKA ISPITIVANJA

#### Prikupljanje materijala

Po deset uzoraka lucerke koje su ispoljavale simptome i jedan uzorak biljaka bez simptoma sakupljeno je za PCR analizu u lokalitetima Tuleš, Sićevo i Ljubava (Tab. 1) tokom 2008 i 2009. godine (ukupno 66 uzoraka), a tokom 2010. u lokalitetu Belanovice.

#### Stepen pojave oboljenja

U lucerištima uočeni su po prvi put fitoplazmozni simptomi u lokalitetima Tuleš, Sićevo, Ljubava i Belanovice u leto 2008 godine. Procenat zaraženih biljaka ocenjivan je sva četiri lokaliteta tokom 2008–2010. Drveni ram površine  $\frac{1}{4}$  m<sup>2</sup> bacan je 10 puta po dijagonali u svakoj parceli i izračunavan je procenat obolelih biljaka i godišnji indeks porasta zaraze u dve uzastopne godine.

#### Procena prinosa zelene mase

Prinos zelene mase drugog otkosa određen je na svakoj parceli merenjem pokošene nadzemne mase direktno na parceli i preračunata na t ha<sup>-1</sup> (Katić i sar., 2011) tokom 2010. godine.

### Detekcija i identifikacija fitoplazmi

Nukleinske kiseline su ekstrahovane iz lišća lucerke po metodi koju su opisali Angelini i saradnici (2001). Sukcesivnim korišćenjem para prajmera P1/16S-Sr i R16F2n/R2 (Lee et al. 2006) u umetnutom (nested) PCR detektovano je prisustvo fitoplazmi u simptomatičnim uzorcima lucerke. Ekstrahovana DNA iz 8 asimptomatičnih biljaka korišćena je kao negativna kontrola. PCR amplifikacije su izvedene prema Gundersen i Lee (1996) korišćenjem DreamTaqGreen PCR Master Mix (Fermentas, Lithuania) u aparatu Eppendorf Master Cycler Personal, Germany.

Polimorfizam dužine restrikcionih fragmenata- Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) R16F2n/R2 amplikona dobijen je pojedinačnim digestijama restrikcionim endonukleazama: *AluI* i *TruI*. Dobijeni RFLP profili upoređivani su sa referentnim profilima Stol, AY, FD-C i CYE fitoplazmi. *HpaII* i *HhaI* restrikcione endonukleaze dodatno su korišćene pri analizi amplikona koji su pokazali sličnosti sa CYE fitoplazmom posle digestije sa *AluI* i *TruI*, a njihovi profili su dodatno upoređeni sa PoiBI i CYE fitoplazmama. Produkti amplifikacije razdvajani su elektroforezom na 1.2 % agaroznim gelovima, a RFLP produkti na 2.3% agaroznim gelovima, obojeni etidijum bromidom i vizuelizovani pomoću UV transiluminatora.

## REZULTATI I DISKUSIJA

### Simptomi oboljenja

Prvi simptomi u polju uočeni su tokom juna u vidu proliferacije izdanaka sa skraćenim internodijama, filodija i sitnog atipičnog lišća (Sl.1), zatim žutila i crvenila vršnih liski (Sl. 2). Obolele biljke ne donose cvet ili je on sasušen (Sl.3). Stabljike zaraženih biljaka mogu ispoljiti i simptom spljoštenosti.

**Slika 1.** Početni simptomi – proliferacija izdanaka, skraćene internodije, filodije i sitno atipično lišće

**Figure 1.** Early symptoms of phytoplasma disease (shoot proliferation, short internods, phyllody and small atypical leaves)



**Slika 2.** Simptomi žutila i crvenila lišća

**Figure 2.** Advance symptoms: yellowing and reddening of the leaves

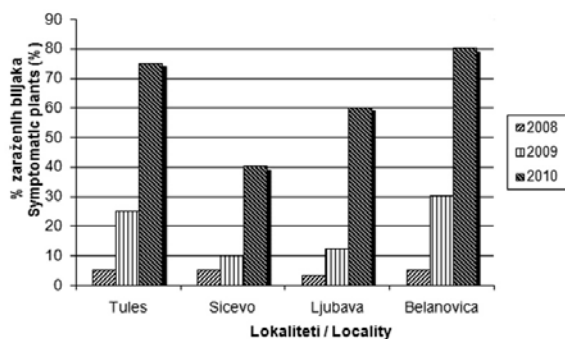
**Slika 3.** Obolele biljke ne donose cvet

**Figure 3.** Diseased plants failing to flower



### Stepen pojave oboljenja

Tokom prve godine istraživanja procenat zaraženih biljaka kretao se između 3 (Ljubava) – 5 % (Belanovice i Tuleš). Sledeće godine taj procenat je bio i do 6 puta veći (Belanovice). U trećoj godini procenat zaraženih biljaka iznosio je 75%



**Grafik 1.** Procenat zaraze fitoplazmama u četiri lokaliteta u tri uzastopne godine 2008–2010.

**Graf. 1** Disease incidence in four localities in Serbia over 3 years in Serbia

### Prinos zelene mase

Prinos zelene mase lucerke u drugom otkosu u trećoj godini istraživanja (2010) bio je 3.6,

u Tulešu, 40 % Sićevu, 60% Ljubavi i 80 % u Belanovici (Graf. 1). Godišnji indeks porasta zaraze kretao se od 2 do 6. U lokalitetu Belanovice konstatovano je značajno prisustvo viline kosice (*Cuscuta*) (Sl. 4), čime se može objasniti najviši godišnji indeks porasta zaraze.

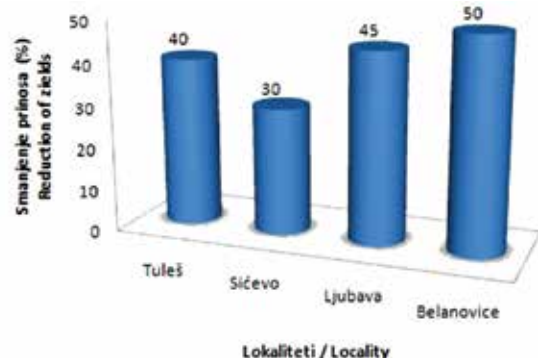


**Slika 4.** Vilina kosica – vector fitoplazmi u lucerki

**Figure 4.** *Cuscuta* – phytoplasma vector in alfalfa

4.2, 3.3 i 3 t ha<sup>-1</sup> u lokalitetima Tuleš, Sićevo, Ljubava i Belanovica, dok je prinos zdrave lucerke iznosio 6 t ha<sup>-1</sup>. Ovi rezultati ukazuju da je zaraza

fitoplazmama uslovlila smanjenje prinosa zelene mase lucerke od 30% (Sićevo) do 50% (Belanovice) (Graf. 2). Zbog izuzetno visokog procenta zaraženih biljaka i značajnog smanjenja prinosa u sva četiri lokaliteta, dalje gajenje lucerke postalo je neprofitabilno, zbog čega je ona preorana tokom 2010. godine u lokalitetu Tuleš.



**Grafik 2.** Procenat smanjenja prinosa lucerke u četiri lokaliteta u 2010 godini

**Graf. 2.** Reduction of yields in four localities

### Detekcija i identifikacija fitoplazmi

Umnožavanje prajmerima P1/16S-Sr rezultiralo je ampliconom od 1.5 kb koji obuhva-

ta veliki deo 16S rDNK (Tab. 1) i to kod 27 od 60 biljaka sa simptomima. Ovaj amplicon je detektovan kod svih uzoraka sa simptomima (8) u lokalitetu Belanovica. Posle nested PCR-a, fragmenti od 1.2 kb detektovani su kod 51 biljke sa simptomima. Kod biljaka bez simptoma nije bilo amplifikovanih produkata. RFLP analiza- delovanje restrikcionih endonukleaza *AluI* i *TruI* na amplicone od 1.2 kb, rezultovala je dobijanjem 2 tipa profila. Kod 48 pozitivnih uzoraka RFLP profil bio je identičan Stol fitoplazmi koja pripada podgrupi 16SrXII-A, a samo 3 uzorka su imala profil identičan CYE - clover yellow edge fitoplazmi koja pripada 16SrIII fitoplazmama. Pripadnost 16SrIII-B subgroupi dokazana je dodatnom restrikcionom analizom pomoću *HpaII* i *HhaI* enzima koji daju različite profile za podgrupe B (CYE) i H (poinsettia branch-inducing -PoiBI) u okviru 16SrIII grupe, što se na osnovu delovanja restrikcionih endonukleaza *AluI* i *TruI* nije moglo ustanoviti.

U uzorcima lucerke iz različitih regiona Italije prvi put je detektovana Stolbur fitoplazma

**Tabela 1.** Detekcija fitoplazmi u uzorcima lucerke sa i bez simptoma kolekcionisanim u 2008 (L1-L44) i 2009 (L45-L88) direktnom, nested i PCR-RFLP analizama

**Table 1.** Phytoplasma detection from symptomatic and asymptomatic (as) alfalfa collected in 2008 (L1-L33) and 2009 (L34-L66) by direct-, nested- and PCR-RFLP analyses

Lokalitet Locality	Broj PCR testiranih uzoraka PCR tested sample no	Broj P1/16S- Sr pozitivnih uzoraka /P1/ 16S-Sr positive samples no	Broj R16F2n/ R2 pozitivnih uzoraka R16F2n R2 positive samples no	RFLP tip odgovarajuće grupe RFLP type corresponding to group	
				16SrIII-B	16SrXII-A
Tuleš	L1-L10	5	9	-	9
	L11 (bs)	0	0	-	-
	L34-L43	8	10	3 (L41)	7 (L42)
	L44 (bs)	0	0	-	-
Sićevo	L12-L21	2	7	-	7
	L22 (bs)	0	0	-	-
	L45-L54	3	8	-	8
	L55 (bs)	0	0	-	-
Ljubava	L23-L32	3	7	-	7
	L33 (bs)	0	0	-	-
	L56-L65	6	10	-	10
	L66 (bs)	0	0	-	-
<b>Ukupno</b> (% simptomatičnih uzoraka) <b>Total</b> (% of symptomatic samples)	<b>66</b> <b>(60=100%)</b>	<b>27</b> <b>(45%)</b>	<b>51</b> <b>(85%)</b>	<b>3</b> <b>(5%)</b>	<b>48</b> <b>(80%)</b>

(Marzachi et al., 2000). Analizom 16S rDNA sekvenci reprezentativnih izolata L41 i L42 iz Tuleša potvrđeno je prisustvo 16SrIII-B i 16SrXII-A podgrupa fitoplazmi (Starović i sar., 2012). Pored lucerke, u Srbiji je Stolbur fitoplazma detektovana na različitim biljnim vrstama koje imaju veliki ekonomski značaj: vinova loza (Duduk et al. 2004; Kuzmanović et al. 2003; 2008; Josic et al. 2006), kukuruz (Duduk and Bertaccini, 2006), šargarepa (Duduk et al. 2008a), a u novije vreme i kod značajnih lekovitih biljaka poput kupine (Kuzmanovic et al. 2011), ehinacee (Pavlovic et al. 2011), kantariona (Pavlovic et al, 2012), bokvice (Josic et al. 2012), saponarije (Josic et al., 2012). Istraživanja elongacionog faktora *tuf* gena u uzorcima lucerke u kojima je detektovana 16SrXII-A fitoplazma ukazala su na prisustvo TufAY/*HpaII* produkata koji odgovaraju TufAY-b tipu (Starović i sar., 2012), koji je u Srbiji dokazan i na kukuruzu (Duduk i Bertaccini, 2006), celeru (Ivanovic i sar., 2011) i kelju (Trkulja i sar., 2011).

Samo je 5% testiranih uzoraka lucerke sa ispoljenim simptomima fitoplazmi, bilo zaraženo 16SrIII-B fitoplazmom i to u lokalitetu Tuleš. Fitoplazma iz 16SrIII-B podgrupe je već ranije identifikovana na *Cirsium arvense* u više od 10 lokaliteta širom Srbije (Rančić i sar., 2005) i na krušci (Duduk i sar., 2008b). Duduk i saradnici (2008a) su utvrdili prisustvo fitoplazme iz 16SrIII-B podgrupe, po prvi put, u insektu *Psammotettix notatus* (Melichar), skakvcu iz podfamilije *Deltocephalinae*, nađene na polju mrkve. Na gajenoj *T. pratense* oboleloj od patuljave bolesti u više lokaliteta u Češkoj Republici, pored rabdovirusa utvrđeno je i pet različitih podgrupa fitoplazmi: 16SrI-B, 16SrI-C, 16SrIII-B i 16SrX-A, na *T. repens* 16SrI-C i *T. hybridum* dve

podgrupe fitoplazmi: 16SrI-C i 16SrIII-B (Franova et al. 2004).

Visok procenat (66) detektovanih fitoplazmi u 60 simptomatičnih biljaka sugerise da one mogu biti prouzrokovač ovog oboljenja lucerke u ispitivanim lokalitetima. Ne ispoljavaju se razlike u simptomima između biljaka zaraženih fitoplazmom Stolbur (16SrXII-A) i fitoplazmom Clover yellow edge (16SrIII-B). Simptomi na lucerki ne mogu biti dijagnostički, jer ne manifestuju razlike kod dokazanih grupa fitoplazmi. Ovo je već ranije pokazano na primeru mešane zaraze Stolbur i Aster Yellows fitoplazmom na paradajzu, koji ispoljavaju identične simptome (Vellios i Lio-liopoulou, 2007). Davis i Sinclair (1998) ukazuju da različite fitoplazme mogu ispoljiti identične simptome na određenim biljnim vrstama, kao i da vrlo bliske fitoplazme mogu ispoljiti različite simptome na istoj biljnoj vrsti.

Ispoljeno smanjenje prinosa zelene mase lucerke zaražene fitoplazmama u jednom otkosu koje se kretalo između 30-50% je vrlo značajno. Za utvrđivanje štetnosti fitoplazmi na lucerki neophodno je izračunati i prosečno godišnje smanjenje prinosa u dva otkosa, kao i prinos i kvalitet suve materije.

## ZAHVALNICA

Zahvaljujemo se dr Marti Martini (Università di Udine, Italy) i dr Bojanu Duduku (IPZS, Beograd) koji su nam ustupili AY, CYE i PoiBI markere. Zahvaljujemo se i Ministarstvu prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, koje je finansirala projekte TR-31018 i III46007 iz kojih su proistekli dobiveni rezultati.

## LITERATURA

- Angelini E, Clair D, Borgo M, Bertaccini A, Boudon- Padieu E. (2001) Flavescence dorée in France and Italy - occurrence of closely related phytoplasma isolates and their near relationships to Palatinate grapevine yellows and an alder yellows phytoplasma. *Vitis*, 40: 79–86.
- Bobev SG, De Jonghe KWA. (2011) First Report of Stolbur Phytoplasma on Blackberry (*Rubus fruticosus*) in Bulgaria, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/JF293091>,
- Conci L, Meneguzzi N, Galdeano E, Torres L, Nome C, Nome S. (2005) Detection and molecular characterisation of an alfalfa phytoplasma in Argentina that represents a new subgroup in the 16S rDNA Ash Yellows group ('Candidatus Phytoplasma fraxini'). *European Journal of Plant Pathology*, 113: 255–265.
- Davis RE, Sinclair WA. (1998) Phytoplasma identity and disease etiology. *Phytopathology*, 88: 1372–1376.
- Duduk B, Botti S, Ivanović M, Bertaccini A. (2004) Stolbur (Bois noir) and European stone fruit yellows (ESFY) Phytoplasmas on grapevine in Serbia. V Congress of Plant Protection, Zlatibor, November, 22–26, Book of Abstracts, 134–135.
- Duduk B, Bertaccini A. (2006) Corn with symptoms of reddening: New host of stolbur phytoplasma. *Plant disease*, 90(1): 1313–1319.
- Duduk B, Perić P, Marčić D, Drobnjaković T, Picciau L, Alma A, Bertaccini A. (2008a) Phytoplasmas in carrots: disease and potential vectors in Serbia. *Bulletin of Insectology*, 61 (2):327–331.
- Duduk B, Paltrinieri S, Ivanović M, Bertaccini A. (2008b) Phytoplasmas infecting fruit trees in Serbia. *Acta Horticulturae*, 781: 351–358.
- Đukić D. (2005) Stanje i perspective lucerke u Evropi i našoj zemlji. *Ratarstvo i povrtarstvo* 41: 155–169.
- Fialová R, Válová P, Balakishiyeva G, Danet, JL, Šafárová D, Foissac X, Navrátil M. (2009) Genetic variability of stolbur phytoplasma in annual crop and wild plant species in South Moravia. *Journal of Plant Pathology*, 91 (2): 411–416.
- Franova J, Paltrinieri S, Botti S, Simkova M, Bertaccini A. (2004) Association of Phytoplasmas and Viruses with Malformed Clovers. *Folia Microbiol.*, 49 (5): 617–624.
- Gundersen DE, Lee IM. (1996) Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopathologia Mediterranea*, 35: 144–151.
- Ivanović Z, Trkulja N, Živković S, Pfaf-Dolovac E, Dolovac N, Jović J, Mitrović M. (2011) First report of stolbur phytoplasma infecting celery in Serbia. *Bulletin of Insectology*, 64: S239–S240.
- Jones P, Arocha Y, Plata G. (2005) First report of a 'Candidatus Phytoplasma asteris' isolate associated with a witches' broom disease of alfalfa in Bolivia. *Plant Pathology*, 54: 559.
- Jošić D, Kuzmanović S, Stojanović S, Živković S, Aleksić G, Starović M. (2006) Identification of phytoplasma on different cultivar of *Vitis vinifera*. *Bibliotheca Fragmenta Agronomica*. IX ESA Congress, Warszawa, Poland, Proceedings Book I, 11: 129–130.
- Jošić D, Pavlović, S, Pivić, R, Kuzmanović, S, Stojanović, S, Popović, T, Starović M. (2012) Cultivated and Wild Plantain (*Plantago major*) is a Host of Stolbur Phytoplasma in Serbia. *Journal of Medicinal Plants Research*, Vol. 6(2): 284–288.

- Katić S, Milić D, Katanski S, Karagić Đ, Vasiljević S. (2011). Genetički doprinos oplemenjivanju lucerke: prinos eksperimentalnih populacija u odnosu na priznate sorte. *Ratarstvo i povrtarstvo*, 48: 91–98.
- Khan AJ, Botti S, Al-Subhi AM, Gundersen-Rindal DE, Bertaccini AF. (2002) Molecular identification of a new phytoplasma associated with alfalfa witches'-broom in Oman. *Phytopathology* 92: 1038–1047.
- Kuzmanović S, Starović M, Tošić M, Stojanović S, Tomić T. (2003) Phytoplasmas on grapevine in Serbia. 14th Meeting of ICVG, Locorotondo, Italy, Extended abstract, pp. 93–94.
- Kuzmanović S, Martini M, Ermacora F, Ferrini F, Starović M, Carraro L, Osler R, Tošić M. (2008) Incidence and molecular characterization of *Flavescence doree* and *stolbur* phytoplasma in grapevine cultivars from different viticultural areas of Serbia. *Vitis*, 47(2): 105–111.
- Kuzmanović S, Starović M, Pavlović S, Gavrilović V, Aleksić G, Stojanović S, Jošić D. (2011). Detection of Stolbur phytoplasma on blackberry – a new natural host in Serbia. *Genetika*, 43(3): 559–568.
- Langer M, Maixner M. (2004) Molecular characterization of grapevine yellows associated phytoplasmas of the stolbur-group based on RFLP-analysis of non-ribosomal DNA. *Vitis*, 43:191–200.
- Lee IM, Gundersen-Rindal DE, Davis RE, Bartoszyk IM. (1998) Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48: 1153–1169.
- Lee IM, Bottner KD, Munyaneza JE, Davis RE, Crosslin JM, Du Toit L, Crosby T. (2006) Carrot purple leaf: a new carrot disease associated with *Spiroplasma citri* and phytoplasmas in Washington. *Plant Disease*, 90: 989–993.
- Marcone C, Ragozzino A, Seemüller E. (1997) Detection and identification of phytoplasmas infecting vegetable, ornamental and forage crops in Southern Italy. *Journal of Plant Pathology*, 79: 211–217.
- Marzachi C, Veratti F, d'Aquilio M, Vischi A, Conti M, Boccardo G. (2000) Molecular hybridization and PCR amplification of non-ribosomal DNA to detect and differentiate stolbur phytoplasma isolates from Italy. *Journal of Plant Pathology*, 82: 201–212.
- Pavlović S, Starović M, Stojanović S, Popović T, Aleksić G, Dražić S, Jošić D. (2011) *Echinacea purpurea* – a host of 16SrXII-A phytoplasma group in Serbia. *Phytopathogenic Mollicutes*, 1(1):35–39.
- Pavlović S, Jošić D, Starović M, Stojanović S, Aleksić G, Stojšin V, Radanović D. (2012) The first Stolbur Phytoplasma occurrence on two St. John's Wort species (*Hypericum perforatum*

- L. and *Hypericum barbatum* L.) in Serbia. *Journal of Medicinal Plants Research*. 6(5): 906–911.
- Peters RD, Lee ME, Grau CR, Driscoll SJ, Winberg RM, Kurtzweil NC, Lukaesko LA, Lee IM. (1999) First report of aster yellows phytoplasma in alfalfa, *Plant Disease*, 83: 488.
- Pilkington LJ, Gibb KS, Gurr GM, Fletcher MJ, Nikandrow A, Elliott E, van de Ven Read RDMY. (2003) Detection and identification of a phytoplasma from Lucerne with Australian lucerne yellows disease. *Plant Pathology*, 52:754–762.
- Rančić D, Paltrinieri S, Toševski I, Petanović R, Stevanović B, Bertaccini A. (2005) First report of multiple inflorescence disease of *Cirsium arvense* and its association with a 16SrIII-B subgroup phytoplasma in Serbia. *Plant Pathology*, 54: 561.
- Schneider B, Gibb KS, Seemüller E, (1997) Sequence and RFLP analysis of the elongation factor Tuf gene in differentiation and classification of phytoplasmas. *Microbiology* 143: 3381–3389.
- Starović M, Kuzmanović S, Gavrilović V, Aleksić G, Popović T, Stojanović S, Jošić D. (2012). Detection and identification of two phytoplasmas – 16SrIII-B and 16SrXII-A from Alfalfa (*Medicago sativa*) in Serbia. *Journal of Phytopathology*, 160: 758–760.
- Suryanarayana V, Singh SJ, Muniyappa V, Reddy HR. (1996) Little leaf of *Medicago sativa* L. - A new phytoplasma disease in India. *International Journal of Tropical Plant Diseases*, 14: 167–71.
- Trkulja N, Ivanović Z, Pfač-Dolovac E, Dolovac N, Živković S, Jović J, Mitrović M. (2011) Stolbur phytoplasma infection of kale crops (*Brassica oleracea* var. *gemmifera* L.) in Serbia. *Bulletin of Insectology*, 64:S81–S82.
- Valiunas D, Jomantiene R, Davis RE, Sindaraviciene I, Alminaitė A, Staniulis J. (2000) Molecular detection and characterization of phytoplasmas infecting vegetables, legumes, and ornamental plants in Lithuania. In: Metspalu L, Mitt S. (Eds), Proc International Conference Development of Environmentally Friendly Plant Protection in the Baltic Region, 22–29 Septembere, 2000. Tartu, Estonia, pp 220–223.
- Vellios E, Lioliopoulou F. (2007) Detection and characterization of phytoplasmas infecting tomato plants in Greece. *Bulletin of Insectology*, 60(2): 157–158.
- Wang K, Hiruki C. (2001) Use of heteroduplex mobility assay for identification and differentiation of phytoplasmas in the aster yellows group and the clover proliferation group. *Phytopathology*, 91: 546–552.

**(Priljeno: 13.06.2012.)**

**(Prihvaćeno: 24.08.2012.)**



## PHYTOPLASMA DISEASES OF ALFALFA (*Medicago sativa* L.) IN CENTRAL SERBIA

SLOBODAN KUZMANOVIĆ<sup>1</sup>, MIRA STAROVIĆ<sup>1</sup>, SAŠA STOJANOVIĆ<sup>1</sup>, GORAN ALEKSIĆ<sup>1</sup>,  
TATJANA POPOVIĆ<sup>1</sup>, DRAGANA JOŠIĆ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute for plant protection and environment, Teodora Drajzera 9, Belgrade, Serbia,

<sup>2</sup>Institute for soil, Teodora Drajzera 7, Belgrade, Serbia

*e-mail: mirastarovic@izbis.org.rs*

### SUMMARY

The symptoms of stunting, phylody, yellowing and reddening of alfalfa were observed for the first time in the four localities in Central Serbia: Tuleš, Sićevo, Ljubava and Belanovice, during 2008. Annual index of infection increase was between 2-6, while the reduction of the green mass was between 30-50%. Application of RFLP and sequence analysis 16S rDNA identified the presence of the phytoplasma in the samples of alfalfa belonging to 16SrIII-B and 16SrXII-A groups. Solbur type phytoplasma was the dominant type found in the 80% of plants exhibiting the symptoms.

Key words: alfalfa, phytoplasma, 16SrIII-B phytoplasma, Stolbur, distribution

**(Received: 13.06.2012.)**

**(Accepted: 24.08.2012.)**