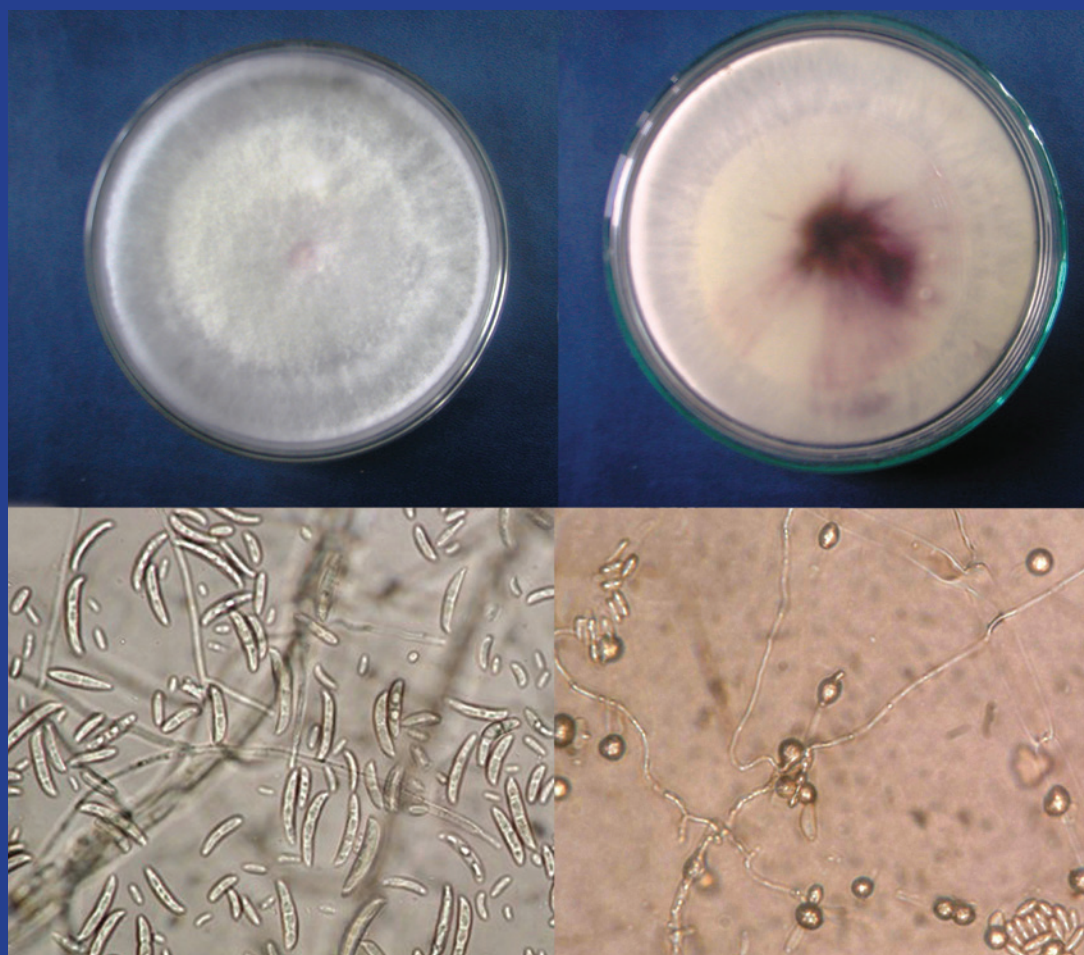


# ZAŠTITA BILJA PLANT PROTECTION





INSTITUT ZA ZAŠTITU BILJA I ŽIVOTNU SREDINU - BEOGRAD  
INSTITUTE FOR PLANT PROTECTION AND ENVIRONMENT - BELGRADE

# **ZAŠTITA BILJA PLANT PROTECTION**

Časopis „Zaštita bilja“ izdaje Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Beograd.  
„Zaštita bilja“ izlazi godišnje u jednom volumenu od četiri pojedinačna broja.

---

„Plant Protection“ journal is published by the Institute  
for Plant Protection and Environment, Belgrade.  
The journal is published annually in one volume containing four issues.

---

**Godišnja pretplata:** za privatna lica u Srbiji 2.500,00 dinara, za ustanove i preduzeća u Srbiji, 3.500,00 dinara. Za pojedince u inostranstvu 40 USD, za preduzeća i ustanove u inostranstvu 80 USD.

**Subscription – Individuals:** 2.500,00 din. per year. Companies, institutions: 3.500,00 din. Per year, in Serbia. Individuals: 40 USD per year. Companies, institutions: 80 USD per year, for abroad.

Svu prepisku i pretplate slati na adresu izdavača sa naznakom (ČASOPIS).

All correspondance and subscription orders should be addressed to publisher (FOR JURNALS).

---

Uredništvo i administracija:  
Editorial and Business staff:

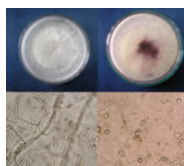
Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu,  
Institute for Plant Protection and Environment,  
Teodora Dražera 9, 11040 Beograd – Belgrade  
Srbija – Serbia

---

Post office box 33-79

**Telefon:** +381 11 2660-049, 2660-049, 2663-672

Fax: +381 11 2669-860



*Fusarium oxysporum* - Kolonija na KDA podlozi, makro i mikrokonidija i hlamidospora  
(Foto: Pavlović)

*Fusarium oxysporum* - Colony on PDA, macro and microconidia, and chlamidospores  
(Photo: Pavlović)

### **Glavni i odgovorni urednik – Editor in Chief**

Dr Nenad Dolovac, Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu

---

### **Urednici – Editors**

Dr Milana Mitrović, Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu  
Dr Danijela Pavlović, Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu  
Dr Slobodan Kuzmanović, Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu

---

### **Redakcioni odbor – Editorial Board**

Prof. dr Radmila Petanović, Univerzitet u Beogradu – Poljoprivredni fakultet, Beograd  
Dr Ivo Toševski, Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Beograd  
Dr Tatjana Cvrković, Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Beograd  
Dr Milana Mitrović, Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Beograd  
Dr Sanja Radonjić, Univerzitet Crne Gore – Biotehnički fakultet, Podgorica  
Prof. dr. Snježana Hrnčić, Univerzitet Crne Gore – Biotehnički fakultet, Podgorica  
Prof. dr Albert Fischer, University of California, Department of Plant Sciences  
Dr Danijela Pavlović, Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Beograd  
Dr Dragana Marisavljević, Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Beograd  
Prof. dr Branka Krstić, Univerzitet u Beogradu – Poljoprivredni fakultet, Beograd  
Prof. dr Aleksandra Bulajić, Univerzitet u Beogradu – Poljoprivredni fakultet, Beograd  
Dr Slobodan Kuzmanović, Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Beograd  
Dr Tatjana Popović, Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Beograd  
Dr Svetlana Živković, Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Beograd  
Dr Žarko Ivanović, Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Beograd  
Dr Violeta Oro, Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Beograd  
Dr Emil Rekanović, Institut za pesticide i zaštitu životne sredine, Beograd  
Prof. dr Ljubinko Jovanović, Educons Univerzitet, Fakultet za Ekološku Poljoprivredu, S. Kamenica

---

## SADRŽAJ

### Naučni radovi

- Dragana Radunović, Veljko Gavrilović, Marija Krstić*  
BAKTERIOLOŠKE KARAKTERISTIKE SOJEVA *ERWINIA AMYLOVORA* POREKLOM  
IZ JABUČASTIH VOĆAKA I BILJAKA SPONTANE FLORE U CRNOJ GORI .....7-13
- Katarina Milojević, Ivana Stanković, Ana Vučurović, Danijela Ristić,*  
*Dušan Nikolić, Aleksandra Bulajić, Branka Krstić*  
BIOLOŠKA I MOLEKULARNA KARAKTERIZACIJA VIRUSA  
MOZAIKA KRASTAVCA POREKLOM IZ LUBENICE U SRBIJI .....14-25
- Ferenc Bagi, Snežana Pavlović, Vera Stojšin, Branko Konstantinović,*  
*Dragana Budakov, Bojan Konstantinović, Nataša Ilić*  
MIKROBIOTA SEMENA AMBROZIJE ..... 26-34
- Dušica Delić, Olivera Stajković-Srbinović, Svetlana Živković, Nada Protić,*  
*Nataša Rasulić, Đorđe Kuzmanović, Aleksandar Simić*  
GROWTH PROMOTION OF ALFALFA, *MEDICAGO SATIVA* L.  
BY INOCULATION OF A PRECEDING CROP WITH RHIZOBACTERIA.....35-42
- Nataša Rasulić, Dušica Delić, Olivera Stajković-Srbinović, Dragana Jošić,*  
*Nenad Dolovac, Đorđe Kuzmanović*  
MIKROBIOLOŠKE OSOBINE DISTRIČNIH KAMBISOLA NA  
PODRUČJU ISTOČNE SRBIJE U ZAVISNOSTI OD NAČINA KORIŠĆENJA.....43-49

## CONTENTS

### Scientific papers

- Dragana Radunović, Veljko Gavrilović, Marija Krstić*  
BACTERIAL CHARACTERISTICS OF *ERWINIA AMYLOVORA* STRAINS ORIGINATING  
FROM POME FRUITS AND ORNAMENTAL PLANTS IN MONTENEGRO .....7-13
- Katarina Milojević, Ivana Stanković, Ana Vučurović, Danijela Ristić,  
Dušan Nikolić, Aleksandra Bulajić, Branka Krstić*  
BIOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF  
CUCUMBER MOSAIC VIRUS INFECTING WATERMELON IN SERBIA .....14-25
- Ferenc Bagi, Snežana Pavlović, Vera Stojšin, Branko Konstantinović,  
Dragana Budakov, Bojan Konstantinović, Nataša Ilić*  
MYCOBIOTA OF RAGWEED SEEDS .....26-34
- Dušica Delić, Olivera Stajković-Srbinić, Svetlana Živković, Nada Protić,  
Nataša Rasulić, Đorđe Kuzmanović, Aleksandar Simić*  
POBOLJŠANJE RASTA LUCERKE, *MEDICAGO SATIVA* L. POMOĆU  
INOKULACIJE PREDUSEVA RIZOSFERNIM BAKTERIJAMA .....35-42
- Nataša Rasulić, Dušica Delić, Olivera Stajković-Srbinić, Dragana Jošić,  
Nenad Dolovac, Đorđe Kuzmanović*  
MICROBIOLOGICAL PROPERTIES OF DYSTRIC CAMBISOLS  
IN REGION OF EASTERN SERBIA DEPENDING ON EXPLOITATION WAY.....43-49





## BAKTERIOLOŠKE KARAKTERISTIKE SOJEVA *ERWINIA AMYLOVORA* POREKLOM IZ JABUČASTIH VOĆAKA I BILJAKA SPONTANE FLORE U CRNOJ GORI

DRAGANA RADUNOVIĆ<sup>1</sup>, VELJKO GAVRILOVIĆ<sup>2</sup>, MARIJA KRSTIĆ<sup>3</sup>

<sup>1</sup>*Biotehnički fakultet, Savjetodavna služba u biljnoj proizvodnji, Podgorica, Crna Gora*

<sup>2</sup>*Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Beograd, Srbija*

<sup>3</sup>*Ministarstvo poljoprivrede i ruralnog razvoja Crne Gore, Podgorica, Crna Gora*

### REZIME

U radu su prikazane karakteristike sojeva *Erwinia amylovora* poreklom sa kruške, dunje i gloga izolovanih u različitim lokalitetima u kontinentalnom delu Crne Gore. Prva pojava simptoma uočena je sredinom juna, kada je posle dužeg kišovito i prohladnog perioda došlo do porasta temperature (preko 20°C). Na biljkama domaćinima primećeni su karakteristični simptomi ispoljeni u vidu plamenjače mladara i nekroza na višegodišnjim granama.

Bakterije na korišćenim podlogama formiraju karakteristične kolonije, a dobijeni izolati su gram negativni, ne fluoresciraju na King-podlozi B, a glukozu metabolišu i oksidativno i fermentativno. Prouzrokuju HR duvana i nekrozu inokulisanih, nesazrelih plodova kruške, praćenu obilnom produkcijom bakterijskog eksudata. Na osnovu rezultata odgajivačkih i biohemijskih odlika proučavanih sojeva i poređenjem rezultata sa odlikama referentnih sojeva, zaključeno je da proučavani izolati poreklom sa kruške, dunje i gloga ispoljavaju tipične karakteristike *Erwinia amylovora*.

**Cljučne reči:** *Erwinia amylovora*, jabučaste voćke, patogenost, biohemijske odlike, Crna Gora

### UVOD

Bakteriozna plamenjača koju prouzrokuje *Erwinia amylovora*, spada u najranije opisane i ekonomski najznačajnije patogene jabučastih voćaka i ukrasnih biljaka, pripadnika familije *Rosaceae*. Prva pojava ove bakterije u Evropi je zabeležena u Engleskoj polovinom prošlog veka i od tada se proširila na teritoriji svih evropskih zemalja gde se gaje jabučaste voćke, ali i ostali domaćini ove bakterije (van der Zwet and Keil, 1979; Panić i Arsenijević, 1996).

Bakterija je na teritoriji bivše Jugoslavije eksperimentalno potvrđena kao parazit dunje i kruške 1989. godine u Bosni i Hercegovini (Gradiška), Srbiji (Šabac) i Makedoniji. Već u prvoj godini njene pojave nastale su velike štete, što je rezultiralo krčenjem

zasada kruške i dunje u rejonima gde je došlo do pojave bolesti (Arsenijević i Gavrilović, 2007).

U Crnoj Gori simptomi bakteriozne plamenjače kruške su prvi put nađeni u okolini Bijelog Polja, a epifitotična pojava bolesti na dunji je zabeležena je 2003. godine, kada je i eksperimentalno potvrđeno prisustvo bakterije (Obradović et al., 2003; Arsenijević i Gavrilović, 2007). Od tada se prisustvo i rasporstranjenost bakterije u Crnoj Gori intenzivnije prati, naročito imajući u vidu i činjenicu da se površine pod jabučastim voćkama iz godine u godinu povećavaju.

Cilj ovog rada je da se utvrdi rasprostranjenost i spektr domaćina *E. amylovora* u Crnoj Gori i prouče patogene i bakteriološke odlike izolovanih sojeva, poreklom sa različitih domaćina, tokom 2012. godine.

## MATERIJAL I METODE

Tokom 2012. godine organizovani su pregledi zasada jabučastih voćaka, kao i pojedinačnih stabala na okućnicama, sa ciljem utvrđivanja simptoma bakteriозne plamenjače i prikupljanja uzoraka obolelih voćaka radi laboratorijskih proučavanja. Posmatranja su obavljena u kontinentalnom delu Crne Gore (Nikšić, Pljevlja, Bijelo Polje, Berane, Andrijevica, Kolašin). Obilazak zasada je počeo nakon perioda cvetanja, a nastavljen je tokom intenzivnog porasta mladara, kada se simptomi bakteriозne plamenjače obično pojavljuju.

Uzorci sa simptomima bolesti ispoljeni u vidu plamenjače mladara i nekroze grana su dopremani u Laboratoriju za fitopatologiju Biotehničkog fakulteta u Podgorici. Prethodno su evidentirani podaci o voćnoj vrsti i sorti, lokalitetu, a kasnije su prikupljeni meteorološki podaci za lokalitete u kojima je izvršeno uzorkovanje.

### Izolovanje bakterije i provera patogenosti

Izolovanje bakterije izvršeno je standardnim metodom razmaza na mesopeptonskoj podlozi obogaćenoj sa 5% saharoze (NAS) i Kingovoj podlozi B (KB), koje se široko upotrebljavaju za izolovanje fitopatogenih bakterija parazita voćaka (Rudolph, 1990; Arsenijević, 1997).

Patogenost izolovanih sojeva proverena je infiltracijom lišća duvana u cilju dokazivanja hipersenzibilne reakcije (HR) duvana i inokulacijom nesazrelih plodova kruške (sorte Vilijamova i Santa Marija). Plodovi su inokulisani suspenzijom bakterija koncentracije  $10^8$  cfu/ml, pomoću bakteriološke igle, nanošenjem kapi suspenzije na mesto inokulacije. Rezultati testa hipersenzitivnosti su očitavani posle 24 časa, nekroza infiltriranog tkiva označava pozitivnu reakciju. Rezultati inokulacionog testa na plodovima kruške očitavani su posle 3-4 dana od inokulacije, pri čemu nekroza inokulisanog tkiva praćena produkcijom bakterijskog eksudata označava pozitivnu reakciju (Klement, 1990; Arsenijević 1997; Gavrilović, 1998; Obradović et al., 2003).

Odgajivačke odlike proučavanih izolata proučene su posmatranjem i opisom izgleda kolonija na sledećim hranljivim podlogama: mesopeptonska podloga sa 5% saharoze (NAS), King-ova podloga B, mesopeptonska podloga (NA) i podloga sa kvašćevim ekstraktom, glukozom i kalcijum karbonatom (YDC). Proučavan je oblik kolonija bakterija, veličina, boja, izgled oboda kolonije i sl. (Klement 1990; Gavrilović, 1998).

Proučene su i biohemijske odlike dobijenih

izolata, koju su značajne za detekciju *E. amylovora*: razlikovanje po Gramu, fluorescentnost, metabolizam glukoze (O/F test), aktivnost oksidaze, katalaze, pektolitičkih fermenta, hidroliza želatina, eskulina, Tween 80 (aktivnost lipolitičkih fermenta), redukcija nitrata, stvaranje amonijaka, razvoj u tečnoj podlozi sa 5%, odnosno 7% NaCl, razvoj na temperaturama 34°C i pri 36°C, osetljivost prema streptomycinu i hloramfenikolu (Lelliot and Stead, 1987; Sands, 1990; Arsenijević, 1997; Gavrilović, 1998; Jones and Geider, 2001).

U radu su kao kontrolni, korišćeni referentni sojevi CFBP 1430 i NCPPB 595, iz nacionalnih kolekcija Francuske i Velike Britanije. Meteorološki podaci su obrađeni korišćenjem meteoroloških stanica METOS, postavljenih u pomenutim područjima za potrebe Savjetodavne službe u biljnoj proizvodnji, stručne službe Ministarstva poljoprivrede Crne Gore (Tabela 1.).

## REZULTATI

Simptomi bakteriозne plamenjače su uočeni u fazi intenzivnog porasta mladara dunje, kruške i gloga. Na obolelim stablima se uočava nekroza mladara, koji kod dunje dobijaju mrku, a kod kruške crnu boju. Vrhovi mladara su lučno savijeni, ali bez pojave bakterijskog eksudata, što je karakterističan i prepoznatljiv znak prisustva *E. amylovora*. Na obolelim stablima gloga zapaženi su simptomi plamenjače mladara i cvasti, koji postaju crne boje, ali kao i u prethodnim slučajevima, ne dolazi do pojave kapi bakterijskog eksudata, karakteristične bleđožute boje. Simptomi bolesti su zapaženi polovinom juna, kada je zabeležen porast temperature vazduha, što je uticalo na pojavu simptoma bolesti.

### Izolacija bakterije i provera patogenosti

Na mesopeptonskoj podlozi obogaćenoj saharozom (NAS), bakterija formira karakteristične sluzaste i ispupčene kolonije (levan tip). Kolonije se javljaju posle 2-3 dana razvoja u termostatu pri 27°C. Na King-ovoj podlozi B bakterija formira kolonije bele boje, sjajne, koje ne stvaraju fluorescentni pigment. Bakterije na ovoj podlozi postaju uočljive posle 3 dana razvoja, pri pomenutoj temperaturi.

Dobijeni sojevi prouzrokuju HR duvana, što se ispoljava nekrozom infiltriranog lišća, nakon 18-24 časa od inokulacije. Takođe prouzrokuju i nekrozu inokulisanih nedozrelih plodova kruške, praćenu obilnom produkcijom bakterijskog eksudata bleđo žute boje. Prvi znaci bolesti na inokulisanim plodo-

**Tabela 1.** Meteorološki podaci iz posmatranih lokaliteta.  
**Table 1.** Meteorological data from monitored localities.

Datum Date	Padavine Precipitation (mm)	Temperatura Temperature (°C)			Vlažnost Vazduha Rel. humidity (%)
		sr. dnevna	minimum	maximum	
01.5.2012	-	17,22	6,6	27,42	55
02.5.2012	-	16,78	5,92	27,25	56
03.5.2012	-	15,2	5,55	25,04	70
04.5.2012	-	14,53	5,53	21,82	67
05.5.2012	-	12,16	2,9	20,41	70
06.5.2012	-	12,59	2,96	22,3	70
07.5.2012	2	12,54	6,52	18,92	81
08.5.2012	0,2	13,08	5,46	21,62	78
09.5.2012	0,2	14,86	3,62	25,05	65
10.5.2012	-	15,68	4,71	24,85	57
11.5.2012	-	17,73	7,17	26,52	55
12.5.2012	-	17,26	6,33	28,36	66
13.5.2012	0,2	14,56	7,51	21,44	72
14.5.2012	54,6	8,85	6,85	10,74	99
15.5.2012	-	9,82	6,37	14,07	85
16.5.2012	7,4	10,71	8,46	16,12	90
17.5.2012	2,8	8,62	6,55	13,1	75
18.5.2012	-	11,65	3,97	19,52	57
19.5.2012	-	12,62	1,8	22,98	70
20.5.2012.	-	14,29	4,67	23,06	76
21.5.2012.	2,8	14,87	8,43	24,07	82
22.5.2012.	41	10,46	6,7	12,87	95
23.5.2012.	1	11,13	5,95	15,83	89
24.5.2012.	5	12,66	8,14	17,51	94
25.5.2012.	6,2	13,62	8,26	19,89	90
26.5.2012.	8,2	12,09	8,87	18,73	93
27.5.2012.	3,2	11,05	5,41	17,12	87
28.5.2012.	0,4	11,7	2,12	21,06	75
29.5.2012.	10,4	9,89	4,78	18,74	91
30.5.2012.	0,6	12,25	3,33	21,45	79
31.5.2012.	8	13,62	5,92	24,25	83
01.6.2012.	0,2	14,66	6,08	22,4	82
02.6.2012.	0,2	15,39	6,88	23,48	81
03.6.2012.	0,2	16,61	8,01	25,58	74
04.6.2012.	-	15,94	6,44	23,9	68
05.6.2012.	14,8	14,43	11,54	19,44	88
06.6.2012.	0,2	15,42	5,92	23,41	72
07.6.2012.	-	17,03	7,33	26,33	77
08.6.2012.	0,2	19,47	9,32	29,41	76
09.6.2012.	-	20,56	9,75	30,73	68
10.6.2012.	-	19,91	9,81	29,45	68
11.6.2012.	-	17,53	10,64	24,59	76
12.6.2012.	-	18,32	9,74	24,6	71
13.6.2012.	-	18,38	8,25	24,8	69
14.6.2012	-	16,79	6,26	27,53	63
15.6.2012	-	18,28	7,76	28,53	68
16.6.2012	-	20,1	8,33	31,34	65
17.6.2012	-	21,12	8,87	31,86	65
18.6.2012	-	22,42	11,84	32,98	65
19.6.2012	0,4	22,46	12,21	34,05	66
20.6.2012	0,6	21,86	11,35	32,74	70
21.6.2012	-	23,49	13,85	33,54	70
22.6.2012	-	23,61	12,69	33,01	65
23.6.2012	1,4	22,16	13	32,32	78
24.6.2012	0,2	20,39	14,62	31,09	86
25.6.2012	6,2	20,55	13,03	29,96	83
26.6.2012	-	19,86	11,66	27,78	74
27.6.2012	-	17,36	7,79	25,93	64
28.6.2012	-	17,69	5,98	29,48	67
29.6.2012	-	21,25	10,19	31,68	65
30.6.2012	-	22,76	12,79	33,86	71
01.7.2012	-	24,04	12,79	35,05	65

vima se ispoljavaju u vidu vlažnih, tamno zelenih pega, oko mesta inokulacije. Posle dva dana, nekroze se šire i dolazi do obrazovanja eksudata, a nakon 4-5 dana nekrotira čitav plod. Pri pomenutim testovima patogenosti dobijeni sojevi se identično ponašaju kao referentni sojevi CFBP 1430 i NCPPB 595.

### Bakteriološke odlike proučavanih sojeva

Na mesopeptonskoj podlozi obogaćenoj sa 5% saharoze (NAS), sojevi formiraju okrugle kolonije, sjajne, glatke, ravnih ivica, koje posle 3 dana razvoja dostižu prečnik 2,5-3 mm. Izrazito su ispupčene i sluzaste konzistencije, što je znak stvaranja levana, složenog makromolekula polisaharidne prirode, koji nastaje razlaganjem saharoze.

Na Kingovoj podlozi B, kolonije su sjajne, blago ispupčene, bele boje, ravnih ivica, koje posle 3 dana razvoja dostižu 1,5-2 mm. Ne stvaraju fluorescentni pigment na pomenutoj podlozi, po čemu se razlikuju od kontrolnog soja IZB 203 (*Pseudomonas syringae*), koji fluorescira na ovoj podlozi.

Na mesopeptonskoj podlozi (NA) kolonije bakterije su bele boje, sjajne, prečnika 1-1,5 mm, ravnih ivica, a na podlozi sa kvašćevim ekstraktom,

glukozom i  $\text{CaCO}_3$  su bele boje, blago ispupčene, prečnika 2 mm, sjajne i sluzaste.

Referentni sojevi *E. amylovora* korišćeni pri ovim istraživanjima, u pogledu odgajivačkih odlika se identično ponašaju kao i proučavani sojevi dobijeni sa kruške, dunje i gloja, poreklom iz različitih lokaliteta u Crnoj Gori.

Proučavani sojevi se razvijaju u tečnim podlogama sa 5% i 7% NaCl, pri čemu je razvoj u drugoj podlozi (7%) znatno slabiji nego u prvoj (5%), sudeći po gustini suspenzije bakterije. Bakterija se razvija pri temperaturi od 34°C, ali ne i pri 36°C. Biohemijske odlike sojeva *E. amylovora* poreklom sa dunje, kruške i gloja, prikazani su u tabeli 2.

Na osnovu podataka prikazanih u tabeli za- paža se da su svi sojevi gramnegativni, ne fluoresceniraju na King-podlozi B, a glukozu metabolišu u aerobnim (oksidativno), ali i pri anaerobnim uslovi- ma (fermentativno); stvaraju katalazu, ali ne i oksidazu, lipazu (Tween 80) i pektolitičke fermente; hidrolizuju želatin, ali ne i eskulin i skrob; ne stvaraju amonijak i ne redukuju nitrate; pokazuju osetljivost prema streptomycinu i hloramfenikolu. Pri ovim testovima se identično ponašaju i kontrolni sojevi CFBP 1430 i NCPPB 595.

**Tabela 2.** Biohemijske odlike proučavanih sojeva.  
**Table 2.** Biochemical characteristics of investigated strains.

Test/Tests	Proučavani sojevi Investigated strains	*Kontrolni soj 1 Check strain 1	*Kontrolni soj 2 Check strain 2
Gram	-	-	-
Fluorescentnost- Fluorescence	-	-	-
O/F test	O/F	O/F	O/F
Activinost - Activity:			
oxidase	-	-	-
catalase	-	-	-
pectinase	-	-	-
Hidroliza – Hidrolises:			
Želatin- Gelatin	+	+	+
Eskulin – Aesculin	-	-	-
Tween 80	-	-	-
Stvaranje amonijaka – Amonia production	-	-	-
Redukcija nitrata - Nitrate reduction	-	-	-
Rast pri :			
5 % NaCl	+	+	+
7 % NaCl	+	+	+
34°C	+	+	+
36°C	-	-	-
Ostljivost - Sensitivity			
Streptomycin - streptomycin	+	+	+
Hloramfenikol -chloramphenicol	+	+	+

\*Kontrolni soj 1- Check strain 1: CFBP 1430; Kontrolni soj 2 – Check strain 2 NCPPB 595; + pozitivan rezultat , positive result; - negativan rezultat, negative result.

## DISKUSIJA

Poslednjih godina došlo je do značajnog širenja *E. amylovora* u kontinentalnom delu Crne Gore, gde je prouzrokovala značajnije štete, tako da danas predstavlja ozbiljnu pretnju uspešnom gajenju jabučastih voćaka i ukrasnih biljka domaćina bakterije. Imajući u vidu da se površine pod ovim voćkama u Crnoj Gori intenzivno povećavaju, prisustvu bakterije i praćenju njenog širenja se mora posvetiti posebna pažnja (Balaž et.al., 2012).

Obilaskom više lokaliteta u kontinentalnom delu države, prisustvo bakterije je do sada eksperimentalno potvrđeno na području Nikšića, Pljevalja, Bijelog Polja, Berana, Andrijevice i Kolašina. Posebno su se osetljivim pokazale dunja i kruška, koje se i u podacima iz literature navode kao veoma osetljive prema ovoj bakteriji (Panić i Arsenijević, 1996; Arsenijević i Gavrilović, 2007). Karakteristični simptomi bolesti su uočeni u vreme intenzivnog porasta mladara, kada je posle dužeg prohladnog vremena usledio porast temperatura, koji je uz obilnu vlagu doprineo ostvarenju infekcije i pojavi bolesti (tab.1). Ovaj podatak ne iznenađuje jer je temperatura jedan od ključnih, ali i limitirajućih faktora razvoja i širenja bakterije (van der Zwet and Beer, 1995).

Izolacija *E. amylovora* je moguća na raznim hranljivim podogama, ali su se u ove svrhe naročito povoljnim pokazale mesopeptonska podloga obogaćena saharozom (NAS) i King-ova podloga B (KB). Na prvoj podlozi bakterija formira karakteristične kolonije levan tipa, a na drugoj podlozi kolonije bez fluorescentnog pigmenta. Ovo su veoma važna svoj-

stva *E. amylovora*, pa se njeno prisustvo prilikom izolovanja vać naslućuje na osnovu izgleda kolonija. Slične simptome na krušci može proukovati i fitopatogena bakterija *Pseudomonas syringae*, koja fluorescira na KB. Stoga se ove dve pomenute podloge koriste i kao diferencijalne za izolovanje *E. amylovora* i preporučuju se za izolovanje ove bakterije (Gavrilović, 1998; Sobiczewski et.al, 1997).

Ovde treba istaći i značaj pojave bakteriozne plamenjače na glogu. Ovo je široko rasprostranjena biljka ukrasne flore i domaćin koji je veoma osetljiv prema *E. amylovora*. Prema podacima iz literature, 13 vrsta gloga je osetljivo prema patogenu, tako da biljke gloga mogu predstavljati značajan izvor inokuluma za širenje bakterije na jabučaste voćke (van der Zwet and Keil, 1979; Panić i Arsenijević, 1996).

Proučavani izolati poreklom sa različitih domaćina *E. amylovora* su ispoljili izrazitu uniformnost u pogledu patogenih i biohemijskih odlika, što se navodi i u podacima drugih autora (Mitrev, 1993; Gavrilović, 1998; Obradović, 2003). Identično se ponašaju i referentni, korišćeni sojevi, tako da se može zaključiti da je u pogledu ovih odlika populacija *E. amylovora* u Crnoj Gori homogena.

Buduća istraživanja će obuhvatiti molekularnu analizu dobijenih sojeva, unapređenje metoda detekcije, utvrđivanje prisustva bakterije na novim domaćinima i mogućnost njenog epifitnog održavanja na biljkama domaćina (Johnson et al., 2006; Pirc et al., 2009). Ova istraživanja biće od velikog značaja za proučavanje epidemiologije patogena i razrade mera suzbijanja u ekološkim uslovima Crne Gore.

## LITERATURA

Arsenijević, M. (1997): Bakterioze biljka. S-Print, Novi Sad, pp: 576.

Arsenijević, M., Gavrilović, V. (2007): Praktični priručnik o bakterioznoj voćaka i ukrasnih biljaka. Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Beograd, pp 79.

Balaž, J., Radunović, D., Krstić, M. (2012): Status of *Erwinia amylovora* in Montenegro. Proceedings of International symposium on Current trends in Plant Protection, Belgrade, 25-28.September: 373-379.

Gavrilović, V. (1998): Bakteriološke odlike sojeva *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al. različitog porekla. Zaštita bilja, 224: 121-167.

Johnson, K.B., Sawyer, T.L., Temple, T.N. (2006): Rates of Epiphytic Growth of *Erwinia amylovora* on Flowers Common in the Landscape. Plant Disease, 90: 1331-1336.

- Jones, A.L., Geider, K. (2001): Gram – negative bacteria: *Erwinia amylovora*. In : Schaad, N.W., Jones, J.B. Chun, W. (Eds): Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria, APS, St. Paul, Minnesota, USA.
- Klement, Z. (1990): Inoculation plant tissues. Canker and dieback disease. In: Methods in Phytobacteriology. Klement, Z., Rudolph, K., Sands, D. (eds). Akademiai Kiado, Budapest, pp. 105-106.
- Lelliott, R A., Stead, D.E. (1987): Methods for the diagnosis of bacterial disease of plants. British Society for Plant Pathology. Blackwell Scientific Publications. Oxford, London, Edinburgh. pp. 200
- Mitrev, V. (1993): Proučavanje bakterije *Erwinia amylovora* (Burrill 1882) Winslow et al.1920 kao parazita voćaka u Makedoniji. Magistarska teza. Poljoprivredni fakultet, Novi Sad, pp. 1-77.
- Obradović, A., Vučinić Zora, Gavrilović, V (2003): Epifitotična pojava bakteriozne plamenjače dunje u Srbiji i Crnoj Gori. VI savetovanje o zaštiti bilja, Zlatibor, 24-28. novembra 2003. godine. Društvo za zaštitu bilja Srbije. Zbornik rezimea: 84.
- Panić, M., Arsenijević, M.(1996): Bakteriozna plamenjača voćaka i ukrasnih biljaka - *Erwinia amylovora*-. Monografska studija. Zajednica za voće i povrće Beograd D.D i Poljoprivredni fakultet, Novi Sad. S-Print, Novi Sad, pp. 419.
- Pirc, M., Ravnikar, M., Tomlinson, J., Dreo, T. (2009): Improved fireblight diagnostics using quantitative real-time PCR detection of *Erwinia amylovora* chromosomal DNA. Plant Pathology, 58: 872-881.
- Rudolph, K. (1990): Isolation of Bacteria. In: Methods in Phytobacteriology. Klement, Z., Rudolph, K., Sands, D. (eds). Akademiai Kiado, Budapest, pp. 45-76.
- Sobiczewski, P., Deckers, T., Pulawska, J. (1997): Fire Blight (*Erwinia amylovora*). Some aspects of epidemiology and control. Phare, Brussels, Belgium.
- Zwet, T. van der, Beer, S.V. (1995): Fire Blight-its Nature, Prevention and Control. A Practical guide to Integrated Diseases Management. U.S. Department of Agriculture. Agricultural Bulletin No 631, pp. 97.
- Zwet, T. van der, Keil, H.L. (1979): Fire Blight – A Bacterial Disease of Rosaceous plants. U.S. Department of Agriculture, Agriculture Handbook 510, Washington, D.C., pp. 200.

**(Priljeno: 08. 04. 2013.)**  
**(Prihvaćeno: 13. 05. 2013.)**

## BACTERIAL CHARACTERISTICS OF *ERWINIA AMYLOVORA* STRAINS ORIGINATING FROM POME FRUITS AND ORNAMENTAL PLANTS IN MONTENEGRO

DRAGANA RADUNOVIĆ<sup>1</sup>, VELJKO GAVRILOVIĆ<sup>2</sup>, MARIJA KRSTIĆ<sup>3</sup>

<sup>1</sup>*Biotechnical Faculty, Extension Service in Plant Production, Podgorica, Montenegro*

<sup>2</sup>*Institute for Plant Protection and Environment, Belgrade, Serbia*

<sup>3</sup>*Ministry of Agriculture and Rural Development, Podgorica, Montenegro*

### SUMMARY

#### SUMMARY

Results of characterization of *Erwinia amylovora* strains originating from pear, quince and hawthorn were presented in this paper. First symptoms of disease were observed in June appeared as typical shoot blight. Isolations of bacteria were carried out on Nutrient agar enrichment with 5 % sucrose (SNA) and King medium B (KB). Bacteria on first medium formed typical levan type of colony, lacking fluorescence on KB. Investigated strains initiated HR in tobacco and necrosis on artificially inoculated immature pear fruits following with abundant oozing. Bacteria are Gram negative, non fluorescence, metabolism of glucose is both, aerobe and anaerobe (O/F). Positive results were recorded in gelatin hydrolyses, and catalase activity; negative results were recorded in aesculin and TWEEN 80 test, activity of oxidase, pectinase tests, ammonia production and nitrate reduction. Investigation strains are sensitive to streptomycin and chloramphenicol, grow in medium with 5 and 7 % NaCl as well as on 34 °C. Growth of bacteria was not recorded on 36°C. On the basis of obtained results was concluded that population of *E. amylovora* strains in Montenegro appear high level of homogeneity with check strains (CFBP 1430 and NCPPB 595).

**Key words:** *Erwinia amylovora*, pome fruits, pathogenicity, biochemical characteristics, Montenegro

**(Received: 08. 04. 2013.)**

**(Accepted: 13. 05. 2013.)**

## BIOLOŠKA I MOLEKULARNA KARAKTERIZACIJA VIRUSA MOZAIKA KRSTAVCA POREKLOM IZ LUBENICE U SRBIJI

KATARINA MILOJEVIĆ, IVANA STANKOVIĆ, ANA VUČUROVIĆ, DANIJELA RISTIĆ, DUŠAN NIKOLIĆ,  
ALEKSANDRA BULAJIĆ, BRANKA KRSTIĆ

Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Beograd  
e-mail: branka.krstic@agrif.bg.ac.rs

### REZIME

Proučavanjem pojave i rasprostranjenosti virusa mozaika krastavca u usevu lubenice u Srbiji tokom 2012. godine, prisustvo virusa utvrđeno je u pet od šest pregledanih lokaliteta. Prisustvo virusa ustanovljeno je u 24,05% serološki testiranih uzoraka (DAS-ELISA), a najzastupljeniji je bio na lokalitetu Silbaš. Tokom ovih istraživanja virus mozaika krastavca češće je bio prisutan u mešanim infekcijama sa ZYMV i/ili WMV (12,66%), dok je prisustvo pojedinačne infekcije utvrđeno u nešto nižem procentu, 11,39%. Mehaničkim inokulacijama *N. glutinosa*, dobijeno je pet izolata, od kojih su dva odabrana za dalju biološku karakterizaciju. Na osnovu tipa i jačine simptoma na test-biljkama, utvrđena je fenotipska varijabilnost ispitivanih izolata. Molekularna detekcija obavljena je amplifikacijom fragmenta dužine 871 bp kod svih ispitivanih izolata korišćenjem para prajmera CMVCPfwd/CPREV, koji omogućavaju umnožavanje gena za protein omotača i deo 5' i 3' UTR regiona. Analizom sekvenci kompletnog gena za protein omotača i rekonstrukcijom filogenetskog stabla, utvrđena je pripadnost izolata CMV iz lubenice iz Srbije podgrupi IA, koja obuhvata većinu izolata odabranih za filogenetsku analizu.

**Ključne reči:** CMV, lubenica, DAS-ELISA, biotest, RT-PCR, filogenetske analize

### UVOD

Lubenica (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai) vodi poreklo iz Namibije (severna Afrika) gde i danas postoji u divljoj formi zajedno sa drugim *Citrullus* vrstama i ubraja se među najstarije gajene biljke. Počeci gajenja lubenice datiraju još iz starog Egipta gde je jedna od vodećih povrtnarskih kultura već 4000 godina (Szamosi et al., 2009). Ukupan prinos lubenice u svetu tokom 2011. godine iznosio je 104,5 miliona t sa oko 3,5 miliona ha koliko je bilo zasejano ovom kulturom. U Srbiji, pod ovom kulturom nalazi se uku-

pno 13,8 hiljada ha, a najznačajniji regioni gajenja lubenice po površini i prinosu su Bačka, Srem i Mačva (FAO, 2011).

Brojni fitopatogeni organizmi ugrožavaju proizvodnju lubenice u mnogim proizvodnim područjima širom sveta, ali ekonomski najveće štete u pogledu smanjenja prinosa i kvaliteta izazivaju biljni virusi (Providenti, 1996; Lecoq et al., 2003). Od opisanih 35 vrsta virusa infektivnih za lubenicu, kao ekonomski najznačajniji i najrasprostranjeniji virusi lubenice navode se: virus mozaika krastavca (*Cucumber mosaic virus*, CMV), virus žutog mozaika kukinija (*Zucchini yellow mosaic virus*, ZYMV), virus mozaika lubenice (*Watermelon mosaic virus*, WMV), vi-



rus prstenaste pegavosti papaje (*Papaya ringspot virus*, PRSV) i virus mozaika bundeve (*Squash mosaic virus*, SqMV) (Yuki et al., 2000; Papayianis et al., 2005; Köklü and Yilmaz, 2006; da Silveira et al., 2009).

Virus mozaika krastavca tipičan je predstavnik roda *Cucumovirus*, familije *Bromoviridae* i jedan je od pet ekonomski najznačajnijih virusa na povrću i ukrasnom bilju (Scholthof et al., 2011). Prvi put je opisan 1916. godine u Americi kao prouzročivač oboljenja na krastavcu i muskatnoj tikvi (Francki et al., 1979). Od tada, CMV se proširio u mnoge delove sveta i danas se ubraja u grupu opšte rasprostranjenih virusa, ali se njegovo dominantno prisustvo vezuje za umereno tople regione gde su i najpovoljniji uslovi za razvoj njegovih vektora, vaši. Virus mozaika krastavca se prenosi na neperzistentan način sa više od 80 vrsta vaši, a najefikasniji vektori ovog virusa su *Myzus persicae* i *Aphis gossypii* (Garcia-Arenal and Palukaitis, 2008).

Smatra se da je CMV jedan od virusa sa najširim krugom domaćina koji uključuje oko 1300 vrsta iz više od 500 rodova iz 100 botaničkih familija (Garcia-Arenal and Palukaitis, 2008). Jedan je od najznačajnijih virusa biljaka iz familije tikava, uključujući i lubenicu, i odgovoran je za brojne epidemije i značajne gubitke u proizvodnji u većini regiona gajenja ovih kultura. Virus mozaika krastavca prisutan je na biljkama familije tikava i u našoj zemlji. Prva istraživanja virusa mozaika krastavca na biljkama iz familije tikava sprovedena su 1966. godine kada je prvi put opisan na dinji (Stakić i Nikolić, 1966) i drugim biljkama iz familije tikava (Pejčinovski, 1978). Ispitivanja viroza tikava, vršena u Srbiji u poslednjih desetak godina ukazuju da je CMV jedan od stalno prisutnih i ekonomski štetnih virusa na velikom broju gajenih vrsta ove familije (Dukić i sar., 2001; Krstić et al., 2002; Vučurović i sar., 2008, 2011; Vučurović et al., 2012a), dok je prisustvo ovog virusa na lubenici prvi put zabeleženo 2012. godine (Milojević et al., 2012).

Budući da je CMV u našoj zemlji stalno prisutan na vrstama iz familije Cucurbitaceae u veoma visokom procentu (Vučurović i sar., 2011; Vučurović et al., 2012a) i s obzirom na rastući značaj gajenja lubenice u Srbiji i prethodnu detekciju CMV na lubenici (Milojević et al., 2012), osnovni cilj ovih istraživanja bio je da se ispita njegova zastupljenost u usevu lubenice u Srbiji, kao i da se filogenetskim analizama odredi pripadnost odabranih izolata iz lubenice poreklom iz Srbije genetičkim grupama ovog virusa.

## MATERIJAL I METODE

### Sakupljanje uzoraka lubenice

Tokom 2012. godine, radi utvrđivanja prisustva, rasprostranjenosti i učestalosti pojave CMV u usevu lubenice, pregledano je šest različitih lokaliteta gajenja u Srbiji: Medveđa, Mačkovac, Silbaš, Gornji Tavankut, Togočevce i Surčin. Ukupno je sakupljeno 79 uzoraka od čega 57 uzoraka sa različitim tipovima simptoma koji su upućivali na virusnu zarazu, a 22 uzorka su sakupljena sa slučajno odabranih biljaka koje nisu ispoljile simptome virusne zaraze.

### Serološke analize

Sakupljeni simptomatični i asimptomatični uzorci lubenice tokom 2012. godine, testirani su primenom direktne imunoenzimske metode na ploči (DAS-ELISA) korišćenjem komercijalnih poliklonalnih antiseruma (Bioreba AG, Switzerland) specifičnih za detekciju pet ekonomski najznačajnijih virusa lubenice: CMV, WMV, ZYMV, SqMV i PRSV, kako bi se utvrdile pojedinačne infekcije CMV ili mešane infekcije sa drugim virusima u koje je ovaj virus uključen. Specifična poliklonalna antitela i poliklonalna antitela konjugovana sa alkalnom fosfatazom korišćena su u razređenju 1:1000 u odgovarajućem puferu za sve testirane viruse. Uzorci su pripremani homogenizacijom biljnog materijala u ekstrakcionom puferu u odnosu 1:6. Nakon 1-2 časa od dodavanja supstrata p-nitrofenilfosfata, intenzitet bojene reakcije očitavan je spektrofotometrijski (Microplate reader, DASrl, Italy). Pozitivnom reakcijom smatrane su vrednosti apsorpcija na 405 nm dva i više puta veće od vrednosti apsorpcije negativne kontrole (komercijalno dostupna negativna kontrola).

### Biološka karakterizacija izolata virusa mozaika krastavca

U cilju potvrde infektivne prirode oboljenja i dobijanja izolata odabran je po jedan uzorak lubenice sa svakog od pet lokaliteta u kojima je serološki dokazano prisustvo CMV. Inokulumom pripremljenim homogenizacijom lišća prirodno zaraženih biljaka lubenice u prisustvu 0,01 M fosfatnog pufera (pH 7) mehanički je inokulisano po pet biljaka *Nicotiana glutinosa* za svaki od odabranih uzoraka. Na ovaj način je dobijeno pet izolata koji se nisu razli-

kovali na osnovu tipa ispoljenih simptoma na lišću *N. glutinosa*. Za dalju detaljnu biološku karakterizaciju, mehaničkim inokulacijama niza test-biljaka, odabrana su dva izolata: izolat 449-12 iz lokaliteta Silbaš i 473-12 iz Gornjeg Tavankuta. U ispitivanje kruga domaćina i tipa ispoljenih simptoma uključene su sledeće test biljke: *Cucurbita pepo* 'Olinka', *Cucumis sativus* 'Delicates', *C. melo* 'Ananas', *Citrullus lanatus* 'Creamson sweet', *Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa*, *N. tabacum* 'Samsun', *N. glutinosa*, *N. rustica*, *N. debneyii*, *S. lycopersicum* 'San Pjer', *Datura stramonium*, *Petunia x hybrida* i *Gomphrena globosa*.

Ispitivani izolati CMV inokulisani su na pet biljaka svake vrste eksperimentalnog domaćina u fenofazi 2-3 prava lista. Pojava i tip simptoma praćeni su u periodu do mesec dana nakon inokulacije. Moguće latentne infekcije test biljaka bez simptoma proveravane su DAS-ELISA metodom.

### Molekularna karakterizacija

U cilju molekularne detekcije i identifikacije CMV kao i potvrde rezultata dobijenih biološkim i serološkim analizama, primenjena je metoda reverzne transkripcije praćena lančanom reakcijom polimeraze (reverse transcription-polimerase chain reaction, RT-PCR).

Ekstrakcija ukupnih RNK iz 100 mg lišća pet odabranih prirodno zaraženih biljaka lubenice obavljena je primenom RNeasy Plant Mini Kit-a (Qiagen, Hilden, Germany), prema preporuci proizvođača. Ukupna izolovana RNK korišćena je kao matrica za RT-PCR primenom para prajmera CMV-CPfwd/CPrev (Milojević et al., 2012) koji omogućavaju umnožavanje fragmenta genomne RNA3 dužine 871 bp koji obuhvata kompletan gen za protein omotača („coat protein“, CP gen) i deo 5' i 3' UTR regiona. Reakciona smeša za RT-PCR sadržala je 5 µl 5x Qiagen OneStep RT-PCR pufera koji sadrži 12,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 µl dNTP Miks (koji sadrži po 10 mM svakog dNTP), 1 µl RT-PCR enzimskog miksa, 1,5 µl svakog prajmera (finalne koncentracije 0,6 µM), 1 µl izolovane ukupne RNK i RNase free vodu do ukupne zapremine od 25 µl. Kao pozitivna kontrola korišćen je izolat, 151-08 poreklom iz *C. pepo* 'Olinka' iz Srbije (GenBank Acc. No. HM065509), a kao negativna kontrola lišće nezaražene biljke lubenice. Reakcija je izvedena korišćenjem Thermocycler-a (Biometra, UK) po sledećem protokolu: reverzna transkripcija 30 min na 50°C; inicijalna denaturacija nukleinskih kiselina 15 min na 95°C; denaturacija 30 s na 94°C, elongacija 30 s na 58°C i ekstenzija 30 s na 72°C (35 ciklusa); finalna ekstenzija 72°C u

trajanju od 10 min. Uzorci su elektroforetski razdvojeni na 1% agaroznom gelu, obojeni u rastvoru etidijum-bromida i posmatrani pod UV transiluminatorom. Pozitivnom reakcijom smatrana je pojava traka očekivane veličine od oko 871 bp. Za određivanje veličine umnoženih amplicona korišćen je marker, MassRuler™DNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences GmbH, Lithuania).

Za dalju molekularnu karakterizaciju odabran je izolat 473-12 poreklom iz Gornjeg Tavankuta dobijen tokom ovih istraživanja, kao i izolat 449-12 iz Silbaša koji je na osnovu analize sekvence i stepena sličnosti sa izolatima iz drugih delova sveta prethodno identifikovan kao CMV (Milojević et al., 2012). Nakon prečišćavanja dobijenog RT-PCR produkta korišćenjem QIAquick PCR Purification Kit-a (Qiagen) izolat 473-12 je poslat na uslužno sekvencioniranje (Macrogen, South Korea). Sekvencioniranje je obavljeno u oba smera, prajmerima koji su korišćeni i za amplifikaciju u RT-PCR reakciji. Dobijena sekvenca je obrađena pomoću Clustal W programa (Thompson et al., 1994) integrisanog unutar MEGA5 softvera (Tamura et al., 2011) čime je dobijena konsenzus sekvenca koja je zatim, sa relevantnim podacima vezanim za ispitivan izolat, deponovana u GenBank bazu podataka. Analiza dobijene sekvence prvo je obavljena upotrebom BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) analize poređenjem sa sekvencama odgovarajućeg regiona genoma virusa, dostupnim u GenBank bazi podataka (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Za proračun nukleotidne i aminokiselinske sličnosti odabranog izolata sa izolatima ovog virusa iz drugih delova sveta, kao i za filogenetske analize upotrebljen je softverski paket MEGA5.

Filogenetske analize obavljene su rekonstrukcijom filogenetskog stabla na osnovu nukleotidnih sekvenci kompletnog CP gena dva izolata iz lubenice poreklom iz Srbije i 36 sekvenci preuzetih iz GenBank (Tabela 1), korišćenjem Maximum parsimony metoda i bootstrap analize sa 1000 ponavljanja. Kao „outgrupa“ za rekonstrukciju filogenetskog stabla korišćena je sekvenca *Tomato aspermy virus* (Tabela 1). Na osnovu rezultata testa najbolje prilagođenog modela nukleotidne susstitucije za izračunavanje prosečne vrednosti genetičke udaljenosti unutar i između podgrupa izolata koje su se izdvojile u filogenetskom stablu, korišćen je Kimura 2-parameter sa Gamma distribucijom (K2+G) u okviru softvera MEGA5.

**Tabela 1.** Sekvence CP gena izolata CMV dostupnih u GenBank korišćene za filogenetsku analizu.  
**Table 1.** CP gene sequences of CMV isolates from GenBank used in the phylogenetic analysis.

Virus Virus	Izolat <sup>a</sup> Isolate <sup>a</sup>	Zemlja Country	Biljka domaćin Host plant	Pristupni broj GenBank Accession Number
CMV	473-12 <sup>b</sup>	Srbija	<i>Citrullus lanatus</i>	KC878465
CMV	449-12 <sup>b</sup>	Srbija	<i>Citrullus lanatus</i>	JX280942
CMV	S	Južna Afrika	/ <sup>c</sup>	AF063610
CMV	LS	SAD	/	AF127976
CMV	trk7	Mađarska	<i>Trifolium repens</i>	L15336
CMV	Q	Australija	/	M21464
CMV	Tfn	Italija	<i>Solanum lycopersicum</i>	Y16926
CMV	RB	Kina	<i>Phaseolus angularis</i>	AJ006990
CMV	P1	Kina	/	AJ006988
CMV	RZ	Kina	<i>Nicotiana tabacum</i>	EF159146
CMV	CTL	Kina	<i>Brassica chinensis</i>	EF213025
CMV	Cb7	Kina	<i>Solanum lycopersicum</i>	EF216867
CMV	PHz	Kina	<i>Pinellia ternata</i>	EU723569
CMV	BX	Kina	<i>Pinellia ternata</i>	DQ399550
CMV	FC	SAD	/	D10544
CMV	C94M3	SAD	<i>Cucumis melo</i>	AF523344
CMV	NS	Mađarska	<i>Raphanus sativus</i>	AJ511990
CMV	LiRS	Holandija	<i>Lilium</i> sp.	AJ131617
CMV	P6	Velika Britanija	/	D10545
CMV	/	Kolumbija	<i>Musa</i> sp.	U32859
CMV	I17F	Francuska	<i>Solanum lycopersicum</i>	X16386
CMV	R	Francuska	<i>Ranunculus</i> sp.	Y18138
CMV	NT9	Tajvan	<i>Solanum lycopersicum</i>	D28780
CMV	Cas	Poljska	<i>Lilium</i> sp.	DQ018286
CMV	113	SAD	/	AF523340
CMV	Simp2	Poljska	<i>Lilium</i> sp.	FJ621495
CMV	MAD99/4	Španija	<i>Cucurbita pepo</i> var. <i>melopepo</i>	AJ829770
CMV	MAD96/1	Španija	<i>Cucumis melo</i>	AJ829768
CMV	C	SAD	<i>Nicotiana tabacum</i>	D00462
CMV	Fny	SAD	/	D10538
CMV	M	Velika Britanija	/	D10539
CMV	Leg	Japan	/	D16405
CMV	E5	Japan	/	D42080
CMV	/	Japan	/	D43800
CMV	Mf	Južna Koreja	/	AJ276481
CMV	Kor	Južna Koreja	/	L36251
CMV	Ly2	Južna Koreja	<i>Lilium longiflorum</i>	AJ296154
CMV	PR36	SAD	/	M98500
TAV <sup>d</sup>	V	Australija	/	NC003836

<sup>a</sup> - Podaci preuzeti iz GenBank; <sup>b</sup> - Izolati poreklom iz lubenice iz Srbije; <sup>c</sup> - Nepoznata biljka domaćin;

<sup>d</sup> - Sekvenca *Tomato aspermy virus* korišćena kao „outgrupa“.

<sup>e</sup> - All data are from GenBank; <sup>f</sup> - Isolates originating from watermelon from Serbia; <sup>g</sup> - Host plant is not known; <sup>h</sup>

<sup>i</sup> - *Tomato aspermy virus* sequence used as „outgroup“.

## REZULTATI I DISKUSIJA

### Simptomi u polju i učestalost pojave CMV u usevu lubenice

U svim pregledanim lokalitetima gajenja lubenice tokom 2012. godine zabeležena je pojava izraženih simptoma što je očigledno bila posledica ranih virusnih infekcija. Najučestaliji simptomi na listovima bili su različiti vidovi mozaika, od blagog do izraženog, ali zabeležena su i različita hlorotična prošaravanja kao i blaga deformisanost lista sa manje ili više izraženom klobučavosti. Uočene su i biljke koje su zaostajale u porastu, dok su pojedine zaraže biljke imale veoma redukovanu lisnu površinu što je kasnije dovelo do nitavosti lista. Ovakvi tipovi simptoma na biljkama lubenice zabeleženi su i od strane Desbiez and Lecoq (1997) i Papayiannis et al. (2005). Tokom pregleda i sakupljanja uzoraka, pojava simptoma na plodovima lubenice nije uočena iako su simptomi u vidu prošaravanja i deformacija zabeleženi u drugim područjima gajenja u svetu (Provvidenti, 1996; Lecoq and Desbiez, 2012). Tip i pojava simptoma nisu mogli da budu povezani sa detektovanim virusom, jer kao što je u literaturi opisano virusi infektivni za biljke iz familije tikava, pa i lubenicu, izazivaju različite simptome koji nemaju dijagnostički značaj (Provvidenti, 1996; Desbiez and Lecoq, 1997).

Iako u uzorcima bez simptoma nije detektovano prisustvo ni jednog testiranog virusa, zbog ranije detekcije ZYMV u asimptomatičnim uzorcima lubenice (Vučurović i sar., 2012) potrebno je povremeno testirati i ovakve uzorke.

### Serološka detekcija

Ispitivanjima sprovedenim tokom 2012. godine, prisustvo CMV dokazano je u pet od šest pregledanih lokaliteta (Tabela 2). Od 79 sakupljenih i testiranih uzoraka lubenice, prisustvo CMV detektovano je u 19 (24,05%), i to kako u pojedinačnim (11,39%) tako i u mešanim infekcijama sa druga dva detektovana virusa, ZYMV i WMV. Od mešanih infekcija, najzastupljenija je bila trostruka infekcija dokazana u 6,33% testiranih uzoraka, dok su dvostruke infekcije CMV sa ZYMV ili WMV dokazane u nešto manjem procentu testiranih uzoraka, 3,80%, odnosno 2,53%. U najvećem procentu CMV je bio prisutan na lokalitetu Silbaš gde je detektovan u 38,46% testiranih uzoraka. U poslednje dve godine pojačan monitoring useva lubenice ukazao je na prisustvo CMV, ZYMV i WMV u pojedinačnim i/ili mešanim infekcijama (Vučurović i sar., 2012; Vučurović et

al., 2012b; Milojević et al., 2012) kao prouzrokovala velikih ekonomskih gubitaka kod ovog useva. Dosadašnja istraživanja prisustva i rasprostranjenosti CMV kao patogena biljaka familije Cucurbitaceae u Srbiji ukazuju da se zastupljenost ovog virusa po godinama značajno menjala, ali i da je njegova zastupljenost najčešće bila visoka, preko 50% (Krstić et al., 2002; Vučurović i sar., 2008, 2009). Iako je tokom 2012. godine CMV bio prisutan u nižem procentu, detektovan je u većini pregledanih lokaliteta gajenja lubenice u pojedinačnim ili mešanim infekcijama. Kako je CMV često prisutan u visokom procentu u usevima tikava (Krstić et al., 2002; Dukić i sar., 2004; Vučurović i sar., 2008, 2009), kao i usled lakog i brzog širenja virusa na neperzistentan način vašima i širokog kruga domaćina (Garcia-Arenal and Palukaitis, 2008), neophodno je stalno praćenje stanja i prisustva ovog virusa u našoj zemlji.

### Biološka karakterizacija izolata CMV iz lubenice

Detaljna biološka karakterizacija odabranih izolata CMV (449-12 i 473-12) obavljena je na osnovu ispoljavanja i tipa simptoma nakon mehaničkih inokulacija 14 različitih vrsta biljaka iz četiri botaničke familije Cucurbitaceae, Solanaceae, Amarantaceae i Chenopodiaceae (Tabela 3).

*Cucurbita pepo* 'Olinka', *Cucumis melo* 'Ananas', *C. sativus* 'Delikates', *Nicotiana debneyii* i *S. lycopersicum* 'San Pjer' reagovala su pojavom mozaika, simptoma tipičnog za zaraze izazvane ovim virusom. Na biljkama *Citrullus lanatus* 'Creamson sweet', osim mozaika koga su izazvala oba izolata, izolat 449-12 izazvao je i pojavu simptoma u vidu zadržavanja zelene boje oko nerava. Oba ispitivana izolata bila su infektivna za eksperimentalne domaćine iz roda *Chenopodium*, kao i biljke *Gomphrena globosa*. Oba izolata prouzrokovala su tipične simptome CMV u vidu mozaika i deformacija na *N. tabacum* 'Samsun', dok je *N. glutinosa* reagovala pojavom mozaika, klobučavosti i nitavosti. Ispitivani izolati razlikovali su se po tipu i jačini ispoljenih simptoma na biljkama *N. rustica*. Izolat 473-12 osim mozaika i klobučavosti, izazvao je i pojavu nitavosti na ovoj test biljci, na osnovu čega se može zaključiti da je agresivnost ovog izolata bila veća. Biljke *Petunia x hybrida* i *Datura stramonium* nisu ispoljile simptome nakon mehaničkih inokulacija odabranim izolatima, mada se u literaturi navodi da su kako *P. x hybrida* (Fletcher, 2012; Gautam et al., 2012) tako i *D. stramonium* (Iqbal et al., 2011) domaćini ovog virusa. Simptomi koji su zabeleženi

**Tabela 2.** Prisustvo i procentualna zastupljenost virusa mozaika krastavca u pojedinačnim i mešanim infekcijama useva lubenice tokom 2012. godine.

**Table 2.** Presence and incidence of *Cucumber mosaic virus* in single and mixed infections in watermelon crops during 2012.

Lokalitet Locality	Br. polja No of fields	Br. testiranih uzoraka No of tested samples	Pojedinačna infekcija Single infection		Mešana infekcija Mixed infection		Ukupno Total
			CMV	CMV+ ZYMV	CMV+ WMV	ZYMV+ CMV+ WMV	
Medveda	2	9	0 <sup>a</sup>	1 (11,11)	2 (22,22)	0	3 (33,34)
Mačkovac	3	16	2 (12,50) <sup>b</sup>	1 (6,25)	0	0	3 (18,75)
Silbaš	1	13	5 (38,46)	0	0	0	5 (38,46)
Gornji Tavankut	2	17	1 (5,88)	0	0	3 (17,65)	4 (23,53)
Togočevce	2	15	1 (6,67)	1 (6,67)	0	2 (13,33)	4 (26,67)
Surčin	1	9	0	0	0	0	0
<b>Ukupno Total</b>	11	79	9 (11,39)	3 (3,80)	2 (2,53)	5 (6,33)	19 (24,05)

Broj zaraženih uzoraka; \*\*% zaraženih uzoraka izračunat na osnovu ukupnog broja testiranih uzoraka.  
Number of infected samples; \*\*% infected samples calculated over the total number of tested samples.

**Tabela 3.** Reakcije test biljaka na mehaničke inokulacije 449-12 i 473-12 izolatima *Cucumber mosaic virus* (CMV).

**Table 3.** Reactions of test plants on mechanical inoculation with 449-12 and 473-12 isolates of *Cucumber mosaic virus* (CMV).

Test biljke Test plants	449-12	473-12
<i>Cucurbita pepo</i> 'Olinka'	M*	M
<i>Cucumis sativus</i> 'Delikates'	M	M
<i>Cucumis melo</i> 'Ananas'	M	M
<i>Citrullus lanatus</i> 'Creamson sweet'	M, ZBN	M
<i>Chenopodium quinoa</i>	LNP	LNP
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	LNP	LNP
<i>Solanum lycopersicum</i> 'San Pjer'	M	M
<i>Nicotiana tabacum</i> 'Samsun'	M, LD	M, LD
<i>Nicotiana glutinosa</i>	M, K, N	M, K, N
<i>Nicotiana debneyii</i>	M	M
<i>Nicotiana rustica</i>	M, K	M, K, N
<i>Datura stramonium</i>	/	/
<i>Petunia hybrida</i>	/	/
<i>Gomphrena globosa</i>	LNP	LNP

\* - M - mozaik, ZBN - zadržavanje zelene boje oko nerava, LNP - lokalne nekrotične pege, LD - deformacije, K - klobučavost, N - nitavost, / - bez simptoma.

\*\* - M - mosaic, ZBN - dark green vein banding, LNP - local necrotic spots, LD - leaf deformation, K - puckering, N - shoestring, / - no reaction.

na inokulisanim test biljkama u saglasnosti su sa simptomima zabeleženim za CMV i od strane drugih autora (Krstić et al., 2002; Tóbiás and Tulipan, 2002; Vučurović i sar., 2011).

### Molekularna detekcija i identifikacija

Rezultati seroloških analiza prisustva CMV u usevu lubenice u Srbiji potvrđeni su molekularnom RT-PCR metodom primenom specifičnih prajmera CMVCPfwd/CPrev koji omogućavaju umnožavanje CP gena. Poređenjem amplifikovanih fragmenata testiranih uzoraka i pozitivne kontrole sa korišćenim markerom, prisustvo pojedinačnog fragmenta očekivane veličine oko 871 bp, utvrđeno je kod svih pet ispitivanih uzoraka lubenice kao i kod pozitivne kontrole. Do amplifikacije nije došlo u negativnoj kontroli, ekstraktu RNA pripremljenom od nezaraženog lišća lubenice.

Nakon sekvencioniranja PCR produkta dobijenog korišćenjem istog para prajmera kao u RT-PCR i obrade u Clustal W programu, dobijena je sekvenca kompletnog CP gena i deo 5' i 3' UTR regiona, koja je prijavljena u GenBank bazu podataka, posle čega joj je dodeljen pristupni broj (GenBank Acc. No. KC878465). Dalja identifikacija obavljena je višestrukim uparivanjem i proračunom genetičke sličnosti sekvence dobijene u ovom radu sa sekvencama CP gena izolata iz drugih delova sveta deponovanih u GenBank korišćenjem MEGA5 softvera. Najviši stepen identičnosti od 99,8% sekvenca odabranog izolata 473-12 iz lubenice iz Srbije pokazala je sa sekvencama izolata Fny iz SAD (D10538), Ny iz Australije (U22821) i izolatom 702-07 (GQ340670) iz Srbije. Sličnost nukleotidne sekvence ovih izolata od 99,8% nije rezultirala promenom ni jedne aminokiseline, tako da je aminokiselinska identičnost ovih izolata iznosila 100%. Nukleotidna identičnost između dva srpska izolata poreklom iz lubenice iznosila je 98,6% odnosno 99,5% aminokiselinske sličnosti.

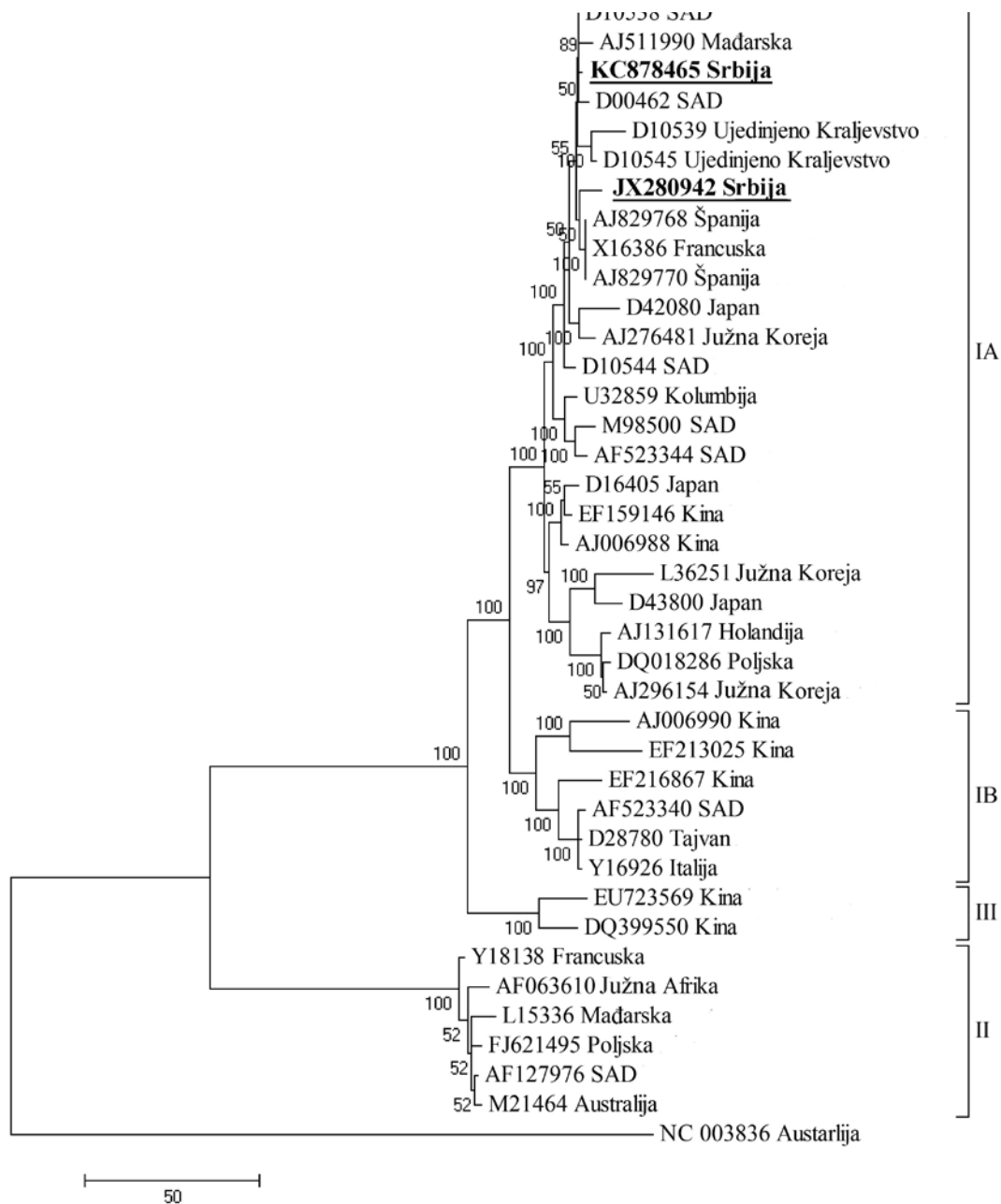
Upoređivanjem sekvenci za protein omotača srpskih izolata iz lubenice sa izolatima korišćenim za filogenetske analize, najveću nukleotidnu identičnost od 94,3% do 99,8%, odnosno 94,6% do 100% na aminokiselinskom nivou srpski izolati su pokazali sa ostalim izolatima iz IA podgrupe, dok je nukleotidna identičnost sa izolatima IB podgrupe bila niža, 92,6% do 95,4% (98,1% do 99,1% aminokiselinska identičnost). Najniži stepen nukleotidne identičnosti od 62,9% do 66,6% (75% do 78,5% aminokiselinske identičnosti) naši izolati ispoljili su sa izolatima grupisanim u II podgrupu, dok je nukleotidna identičnost sa III podgrupom bila od 89,8% do 90,5% (96,1% aa sličnost). Kako navode Yu et al. (2005), stepen

nukleotidne identičnosti izolata u okviru podgrupe I je od 88,8% do 99,2%, dok divergentnost između I i II podgrupe iznosi oko 25% (Roossinck et al., 1999). Prema tome, na osnovu najvišeg stepena homologije sekvence CP gena sa izolatima IA podgrupe, potvrđeno je da odabrani izolati iz lubenice pripadaju IA podgrupi virusa mozaika krastavca.

### Filogenetske analize

Filogenetsko stablo (Slika 1) rekonstruisano Maximum parsimony metodom na osnovu sekvenci 38 izolata CMV pokazuje jasno izdvajanje tri podgrupe (I, II i III), gde je ovakva podela podržana visokom homologijom između sekvenci iste grupe i visokim bootstrap vrednostima koja je za svaku podgrupu iznosila 100%, što je u potpunosti saglasnosti sa rezultatima Liu et al. (2009) i Jacquemond (2012). Genetički diverzitet između tri glavne podgrupe iznosio je od  $0,099 \pm 0,012$  do  $0,356 \pm 0,035$ . Unutrašnji diverziteti podgrupa kretali su se od  $0,013 \pm 0,008$  za podgrupu II, do  $0,039 \pm 0,08$  za podgrupu III i  $0,042 \pm 0,005$  za podgrupu I. Najveći broj izolata svrstan je u podgrupu I koja se dalje deli na dve podgrupe IA i IB, sa unutrašnjim diverzitetima od  $0,030 \pm 0,004$ , odnosno  $0,044 \pm 0,003$ . U podgrupi IA nalaze se izolati iz raznih delova sveta, Evrope (Mađarska, Srbija, Ujedinjeno Kraljevstvo, Španija, Holandija, Poljska i Francuska), Azije (Japan, Južna Koreja, Kina) i Amerike (SAD i Kolumbija). Ovoj podgrupi sojeva pripadaju i odabrani izolati iz lubenice iz Srbije. U podgrupi IB nalaze se izolati iz Azije (Kina i Tajvan) kao i po jedan izolat iz Italije i SAD, dok su u okviru podgrupe II svrstani izolati iz Evrope (Francuska, Mađarska i Poljska), Afrike (Južna Afrika), Severne Amerike (SAD) i Australije. Izdvajanje podgrupe III na osnovu CP gena sa samo dva izolata, BX i PHz, poreklom iz Kine u saglasnosti je sa prethodnim literaturnim navodima (Liu et al., 2009; Jacquemond, 2012).

Pojava CMV može biti jedan od ograničavajućih faktora gajenja lubenice u Srbiji imajući u vidu štete koje CMV, sam ili u kombinaciji sa drugim virusima, nanosi u svim regionima gajenja ove kulture u svetu. Zbog svega navedenog, neophodna su dalja istraživanja koja bi trebalo da budu usmerena na proučavanje genetičkog diverziteta u okviru prirodne populacije ovog virusa prisutne u našoj zemlji kako na lubenici tako i na drugim biljkama domaćinima, načina održavanja, dospevanja i zaražavanja biljaka lubenice, a sve to u cilju preduzimanja odgovarajućih mera kontrole.



**Slika 1.** Filogenetsko stablo rekonstruisano na osnovu nukleotidnih sekvenci kompletnog CP gena 38 izolata CMV korišćenjem MEGA 5 softvera upotrebom Kimura 2-parametar modela sa Gamma distribucijom i Maximum parsimony metoda sa bootstrap analizom sa 1000 ponavljanja gde su bootstrap vrednosti (>50%) prikazane pored odgovarajućih grana. Stablo je „rutovano“ sa TAV. Izolati iz lubenice iz Srbije su podvučeni i naznačeni fontom Bold.

**Figure 1.** Maximum parsimony tree based on nucleotide sequences of complete coat protein gene of 38 isolates of CMV. The tree was rooted with TAV. Phylogram was generated with MEGA 5 using Kimura 2-parametar model Gamma distributed. Bootstrap analysis was performed with 1000 replicates and bootstrap values (>50%) are shown next to relevant branches. The Serbian CMV isolates from watermelon are underlined and bolded.

## ZAHVALNICA

Istraživanja saopštena u ovom radu realizovana su kao deo projekta III-43001 (Agrobiodiverzitet i korišćenje zemljišta u Srbiji: integrisana procena biodiverziteta ključnih grupa artropoda i biljnih patogena) koji finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

## LITERATURA

da Silveira, D. M., Queiroz, M. A., Lima, J. A. A., Nascimento, A. K. Q., Lima, N. I. S. (2009): Levantamento sorológico de vírus em espécies de cucurbitáceas na região do submédio São Francisco, Brasil. *Tropical Plant Pathology*, 34: 123-126.

Desbiez, C., Lecoq, H. (1997): Zucchini yellow mosaic virus. *Plant Pathology*, 46: 809-829.

Dukić, N., Berenji, J., Krstić, B., Vico, I., Bulajić, A. (2004): Prisustvo i rasprostranjenost viroza obične tikve (*Cucurbita pepo* L.) u Vojvodini. *Bilten za hmelj, sirak i lekovito bilje*, 35/36: 71-79.

Dukić, N., Krstić, B., Katis, I., Papavassiliou, C., Berenji, J., Vico, I. (2001): Etiologija propadanja tikvica (*Cucurbita pepo* L.) u Jugoslaviji. V jugoslovensko savetovanje o zaštiti bilja, Zlatibor, Zbornik rezimea, 85.

FAO (2011): FAO Corporate Statistical Database ŠOnlineĆ. Š1 pĆ Available at <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor> (Cited 16 January 2013, verified 10 April 2013). FAO Corporate Statistical Database (FAOSTAT), United Nations Food and Agriculture Organization (FAO), Rome.

Fletcher, J. D. (2012): New plant disease records in New Zealand: Additional hosts of alfalfa mosaic virus and cucumber mosaic virus. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 30: 505-506.

Francki, R. I. B., Mossop, D. W., Hatta, T. (1979): Cucumber mosaic virus. CMI/AAB Description of Plant Viruses, No 213.

García-Arenal, F., Palukaitis, P. (2008): Cucumber mosaic virus. In Mahy, B. W. J. and van Regenmortel, M. H. V. (eds.) *Desk Encyclopedia of Plant and Fungal Virology*. Elsevier, Amsterdam 171-176.

Gautam, K. K., Kumar, S., Raj, S. K. (2012): Molecular characterization of *Cucumber mosaic virus* strain causing severe mosaic disease on petunia in India. *Phytoparasitica*, 40: 425-431.

Iqbal, S., Ashfaq, M., Shah, H. (2011): Biological characterization of Pakistani isolates of *Cucumber mosaic cucumovirus* (CMV). *Pakistan Journal of Botany*, 43: 3041-3047.

Jacquemond, M. (2012): Cucumber mosaic virus. *Advances in Virus Research*, 84: 439-504.

Köklü, G., Yilmaz, O. (2006): Occurrence of cucurbit viruses on field-grown melon and watermelon in the Thrace region of Turkey. *Phytoprotection*, 87: 123-130.

Krstić, B., Berenji, J., Dukić, N., Vico, I., Katis, N. I., Papavassiliou, C. (2002): Identification of viruses infecting pumpkins (*Cucurbita pepo* L.) in Serbia. *Zbornik Matice srpske za prirodne nauke*, 103: 57-65.

Lecoq, H., Desbiez, C. (2012): Viruses of Cucurbit Crops in the Mediterranean Region. *Advances in Virus Research*, 84: 67-126.

Lecoq, H., Desbiez, S., Wipf-Schibel, C., Girard, M. (2003): Potential involvement of melon fruit in long distance dissemination of cucurbit potyviruses. *Plant Disease*, 87: 955-959.



- Liu, Y. Y., Yu, S. L., Lan, Y. F., Zhang, C. L., Hou, S. S., Li, X.D., Chen, X. Z., Zhu, X, P. (2009): Molecular variability of five *Cucumber mosaic virus* isolates from China. *Acta Virologica*, 53: 89-97.
- Milojević, K., Stanković, I., Vučurović, A., Ristić, D., Nikolić, D., Bulajić, A., Krstić, B. (2012): First report of *Cucumber mosaic virus* infecting watermelon in Serbia. *Plant Disease*, 96: 1706.
- Papayiannis, L. C., Ioannou, N., Boubourakas, I. N., Dovas, C. I., Katis, N. I., Falk, B. W. (2005): Incidence of Viruses Infecting Cucurbits in Cyprus. *Journal of Phytopathology*, 153: 530-535.
- Pejčinovski, F. (1978): Virusot na mosaicot na krastavicata koj odgleduvanite rastenija od familijata Cucurbitaceae vo SR Macedonija. Godišen zbornik na Zemljodelskot fakultet, Skopje, XXVII-XXVIII: 97-116.
- Provvidenti, R. (1996): Diseases Caused by Viruses. In: Zitter, T. A., Hopkins, D. L. and Thomas, C. E. (eds.) *Compendium of Cucurbit Diseases*. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA 37-40.
- Roossinck, M. J., Zhang, L., Hellwald, K. H. (1999): Rearrangements in the 59 nontranslated region and phylogenetic analyses of Cucumber mosaic virus RNA 3 indicate radial evolution of three subgroups. *Journal of Virology*, 73: 6752-6758.
- Scholthof, K. B., Adkins, S., Czosnek, H., Palukaitis, P., Jacquot, E., Hohn, T., Hohn, B., Saunders, K., Candresse, T., Ahlquist, P., Hemenway, C., Foster, G. D. (2011): Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 12: 938-954.
- Stakić, D., Nikolić, V. (1966): Virus mozaika lubenice-novo virozno oboljenje u Jugoslaviji. *Savremena poljoprivreda*, 3: 289-302.
- Szamosi, C., Solmaz, I., Sari, N., Barsony, C. (2009): Morphological characterization of Hungarian and Turkish watermelon (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. et Nakai) genetic resources. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 56: 1091-1105.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. (2011): MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28: 2731-2739.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. J. (1994): CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22: 4673-4680.
- Tóbiás, I., Tulipán, M. (2002): Results of virological assay on cucurbits in 2001. *Növényvédelem*, 38: 23-27.
- Vučurović, A., Bulajić, A., Đekić, I., Berenji, J., Krstić, B. (2008): Virusi-stalni problem u usevu tikava u Srbiji. IX savetovanje o zaštiti bilja, Zlatibor, Zbornik rezimea, 96-97.
- Vučurović, A., Bulajić, A., Đekić, I., Ristić, D., Berenji, J., Krstić, B. (2009): Prisustvo i rasprostranjenost virusa uljane tikve i molekularna karakterizacija virusa žutog mozaika kukuruznika. *Pesticidi i fitomedicina*, 24: 85-94.
- Vučurović, A., Bulajić, A., Stanković, I., Ristić, D., Krstić, B. (2011): Karakterizacija virusa mozaika krastavca poreklom iz tikava u Srbiji. *Pesticidi i fitomedicina*, 26: 325-336.
- Vučurović, A., Bulajić, A., Milojević, K., Stanković, I., Ristić, D., Berenji, J., Krstić, B. (2012): Prisustvo i karakterizacija virusa žutog mozaika kukuruznika u usevu lubenice u Srbiji. *Ratararstvo i povrtarstvo*, 42: 151-159.
- Vučurović, A., Bulajić, A., Stanković, I., Ristić, D., Berenji, J., Jović, J., Krstić, B. (2012a): Non-persistently aphid-borne viruses infecting pumpkin and squash in Serbia and partial characterization of *Zucchini yellow mosaic*

virus isolates. *European Journal of Plant Pathology*, 133: 935-947.

Vučurović, A., Bulajić, A., Stanković, I., Ristić, D., Nikolić, D., Berenji, J., Krstić, B. (2012b): First report of *Zucchini yellow mosaic virus* in watermelon in Serbia. *Plant Disease*, 96: 149.

Yu, C., Wu, J., Zhou, X. (2005): Detection and subgrouping of *Cucumber mosaic virus* isolates by TAS-ELISA and immunocapture RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, 123: 155-161.

Yuki, V. A., Rezende, J. A. M., Kitajima, E. W., Barroso, P. A. V., Kuniyuki, H., Groppo, G. A., Pavan, M. A. (2000): Occurrence, distribution, and relative incidence of five viruses infecting cucurbits in the state of São Paulo, Brazil. *Plant Disease*, 84: 516-520.

**(Primljeno: 10. 04. 2013.)**

**(Prihvaćeno: 09. 05. 2013.)**

## BIOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF CUCUMBER MOSAIC VIRUS INFECTING WATERMELON IN SERBIA

KATARINA MILOJEVIĆ, IVANA STANKOVIĆ, ANA VUČUROVIĆ, DANIJELA RISTIĆ, DUŠAN NIKOLIĆ,  
ALEKSANDRA BULAJIĆ, BRANKA KRSTIĆ

*University of Belgrade, Faculty of Agriculture, Belgrade*  
*e-mail: branka.krstic@agrif.bg.ac.rs*

### SUMMARY

Investigation of the presence and distribution of *Cucumber mosaic virus* in watermelon crops in Serbia during 2012 revealed that the virus was present in five out of six surveyed localities. CMV was detected in 24.05% of total serologically tested samples using DAS-ELISA method and the virus was the most prevalent in the locality of Silbaš. During this investigation, *Cucumber mosaic virus* was present more often in mixed infections with ZYMV and/or WMV (12.66%), while the single infection was detected in lower percentage, 11.39%. Five CMV isolates were obtained by mechanical inoculations of *N. glutinosa* and two of them were selected for further biological characterization. Concerning type and severity of symptoms on test plants, the investigated isolates exhibited different phenotypic features. Molecular detection was performed by amplification of a fragment of 871 bp in all tested isolates, using the primer pair CMVCPfwd/CPrev that amplify the entire coat protein gene and part of 5' and 3' UTR regions. The affiliation of Serbian CMV isolates from watermelon to subgroup IA, the group that includes most of the isolates selected for phylogenetic analysis, was determined by sequence analysis of the complete CP gene and reconstruction of phylogenetic tree.

**Key words:** CMV, watermelon, DAS-ELISA, bioassay, RT-PCR, phylogenetic analysis

**(Received: 10. 04. 2013.)**

**(Accepted: 09. 05. 2013.)**

## MIKOBIOTA SEMENA AMBROZIJE

FERENC BAGI<sup>1</sup>, SNEŽANA PAVLOVIĆ<sup>2</sup>, VERA STOJŠIN<sup>1</sup>, BRANKO KONSTANTINOVIĆ<sup>1</sup>,  
DRAGANA BUDAČKOVIĆ<sup>1</sup>, BOJAN KONSTANTINOVIĆ<sup>1</sup>, NATAŠA ILIĆ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet,  
Departman za fitomedicinu i zaštitu životne sredine, Novi Sad  
<sup>2</sup>Institut za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“ Beograd  
e-mail: bagifer@polj.uns.ac.rs

### REZIME

Rezultati ovih istraživanja ukazuju na činjenicu da je seme ambrozije pogodan supstrat za razvoj mnogobrojnih mikroorganizama među kojima gljive zauzimaju značajno mesto. U radu su prikazana istraživanja saprofitne i patogene mikrobiote semena ambrozije iz prirodne populacije na uzorcima sa pet lokaliteta: Budisava, Novi Sad-Detelinara, Kač, Bački Maglić i Kisač. U okviru primenjenih metoda koje preporučuje (ISTA- International Rules for Seed Testing) ustanovljeno je prisustvo gljiva iz rodova *Fusarium*, *Sordaria*, *Alternaria*, *Epicoccum*, *Chaetomium*, *Penicillium*, *Cladosporium* i *Aspergillus*. Najčešće izolovana gljiva je rod *Chaetomium*. Stepen kontaminacije *Chaetomium* kretao u širokom rasponu u zavisnosti od lokaliteta i taj procent je bio od 19,1-50%. Utvrđene su je često mešana infekcija gljivama iz različitih rodova. Postoje značajne razlike između zaraženosti semena iz različitih lokaliteta. Visoka kontaminacija semena ambrozije gljivama predstavlja opasnost od moguće sinteze mikotoksina koje mogu negativno da utiču na sastav eterskog ulja ambrozije koje se koristi u kozmetičke i farmaceutske svrhe. Kako je korovska vrsta *Ambrosia artemisiifolia* široko rasprostranjena u našoj zemlji, neophodno je paralelno sa primenom hemijskih i mehaničkih mera borbe ispitati i mogućnost korišćenja bioloških mera suzbijanja.

**Ključne reči:** mikrobiota, seme, *Ambrosia artemisiifolia*

### UVOD

*Ambrosia artemisiifolia* L., u narodu poznata kao ambrozija, pelenasta ambrozija, li-mundžik (Simonović,1959), je adventivna biljka unešena semenom deteline u Evropu iz Severne i Srednje Amerike oko 1800. godine (Priszter, 1960). Rasprostranjena je u većini evropskih zemalja odakle je preneti i u naše krajeve. Pelenasta ambrozija jednogodišnja ruderalna korovska

biljka visine 20–150 cm (Šarić,1991). Od vremena unošenja u Evropu, populacije ove vrste bile su male i dugo su se nalazile u periodu mirovanja, da bi se naglo počele širiti u prvoj polovini dvadesetog veka. Tendencija širenja nastavljen je i dalje, zahvaljujući fleksibilnosti ove biljke prema osnovnim faktorima životne sredine. Široka ekološka valenca (Bazzaz, 1974) omogućava joj da veoma lako postane dominantan korov u različitim uslovima. Zahvaljujući svojoj invazivnoj prirodi, pelenasta ambrozija je u početku osvojila staništa

sa otvorenim tipom vegetacije, neobrasle terene. Posmatrajući ponašanje populacija, konstatovano je osvajanje novih prostora sa prirodnom vegetacijom poluzatvorenog tipa, najčešće degradiranih livada. Danas, pelenasta ambrozija zakorovljuje gotovo sve useve i zasade, brzo se širi i postaje kosmopolita.

U našoj zemlji pelenasta ambrozija je utvrđena na većem broju lokaliteta. Pretpostavlja se da je do Sremskih Karlovaca, gde je prvi put konstatovana (Slavnić, 1953), dospela iz Rumunije, najverovatnije brodovima koji su saobraćali Dunavom. Danas je pelenasta ambrozija široko rasprostranjena u celoj Vojvodini i ne retko gradi veoma velike, monodominantne zajednice, najčešće na slobodnim, otvorenim, peskovitim i ruderalnim staništima. Jedan je od najčešćih korova najrazličitijih useva i agrobiocenoza. U poslednjih nekoliko godina zabeleženo je značajno prisustvo ove korovske biljke i u Centralnoj Srbiji, uglavnom u nižim predelima i dolinama reka.

Uporedo sa problemima koje izaziva u poljoprivredi, pelenasta ambrozija postaje značajan problem i u urbanim sredinama, pre svega, zbog ogromne produkcije polena koji je izuzetan alergen. Osnovni problem, u zdravstvenom pogledu, su alergije koje polen ove biljke izaziva kod ljudi. Kod polena ambrozije određeno je šest vrsta antigena. Antigeni sa površine polenovog zrna se rastvaraju u sluznici nosne šupljine i respiratornog trakta. Nakon reakcije antigen-antitelo dolazi do oslobađanja histamina koji je odgovoran za alergijske simptome. Ogromna produkcija polenovih zrna i prenošenje polena vetrom (anemofilija), omogućavaju da se polenova zrna prenesu na udaljenosti od 10 do 100 km (Radišić, 2002). U vreme cvetanja pelenaste ambrozije, alergije se manifestuju u vidu «travne groznice», bronhijalne astme, raznih osipa na koži i konjuktivitisa što nanosi nesagledive zdravstvene posledice, a samim tim i privredne štete. Alergijske reakcije su prisutne kod više od 10% ljudske populacije, a u slučaju dugotrajnog i višegodišnjeg izlaganja visokim koncentracijama polena, jedan deo populacije oboleva od hroničnog bronhitisa i bronhijalne astme.

S obzirom na značaj ambrozije kao korovske i alergijske biljke, cilj ovog rada je bio određivanje mikopopulacije semena sa više lokaliteta, što može imati značaja sa stanovišta pronalazanja bioagensa koji bi se potencijalno mogao koristiti u suzbijanju ove korovske vrste.

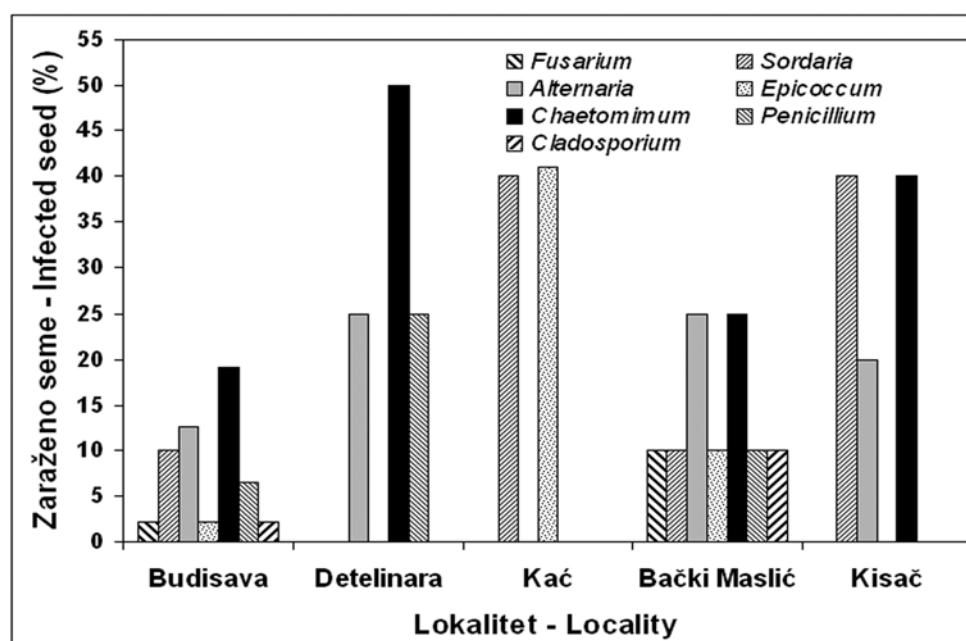
## MATERIJAL I METODE

Ispitivanja su izvršena u herbološkoj i fitopatološkoj laboratoriji Departmana za fitomedicinu, Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu, kao i u fitopatološkoj laboratoriji Instituta za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“, Beograd. Uzorci semena prikupljeni susa pet lokaliteta: Bački Maglić, Kisač, Budisava, Kač i Novi Sad – Detelinara tokom 2010. godine. Po 100 semenki u četiri ponavljanja iz svakog lokaliteta (ISTA, 2003), posle površinske sterilizacije 2% rastvorom natrium hipohlorita (NaClO), su inkubirana na navlaženom filtera papiru na 25 °C tokom 7 dana. Nakon inkubacije izvršen je pregled na prisustvo micelije gljiva na semenu. Sa semena na kojima se razvila micelija izvršena je izolacija po standardnom postupku gljiva (Kiraly i sar., 1970; Dhingra i Sinclair, 1986) na mesopeptonsku (MPA) i krompir dekstroznu (KDA) podlogu sa agarom. Posle sedam dana inkubacije na 25°C, izolovane gljive su presejane na podlogu od lista karanfila (CLA) pripremljene po metodi Fisher i sar. (1982). Podloga sa fragmentima lista karanfila (CLA) je korišćena za proučavanje morfoloških karakteristika *F. oxysporum* jer pospešuje sporulaciju gljiva kao i stvaranje sporodohija u periodu od 7-10 dana u uslovima kombinovanja fluorescentne i bliske ultraljubičaste svetlosti (Lević, 2008).

Determinacija izolovanih gljiva vršena je na osnovu morfoloških i odgajivačkih karakteristika ispitivanih izolata. Formiranje reproduktivnih organa kao i morfologija konidija (miko, makrokonidije, hlamidospore, obrazovanje piknida i peritecije) praćena je tokom dva meseca. Mikroskopske fotografije su snimljene na mikroskopu Olympus BX51 pri uvećanju 600x. Za determinaciju izolovanih gljiva korišćeni su standardni determinatori (Boot, 1971; Neergard, 1979; Gerlachi Nirenberg, 1982; Burgess i sar., 1994; Nelson i sar., 1983; Simmons, 2007).

## REZULTATI I DISKUSIJA

Izolacijama sa semena ambrozije identifikovane su gljive iz sledećih rodova: *Fusarium*, *Alternaria*, *Penicillium*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, i vrste *Epicoccum purpureascens* i *Sordaria fimicola*. Procenat zaraženog semena sa izolovanim gljivama se razlikovao po lokalitetima (Graf. 1). Na osnovu procenta pojave pojedinih izolovanih gljiva izračunat je udeo datih gljiva u ukupnoj izolovanoj mikrobioti sa semena ambrozije.



**Graf. 1.** Procenat zaraze semena ambrozije iz različitih lokaliteta.

**Graph. 1.** Percentage of seed infection of common ragweed originating from different locations.

### ***Chaetomium* spp.**

Vrste roda *Chaetomium* su izolovane sa svih prikupljenih uzoraka, a procenat semena sa ovom gljivom je iznosio od 19,1% u lokalitetu Budisava do 50% u lokalitetu Novi Sad-Detelinara (Graf. 1). Vrste iz roda *Chaetomium* su kosmopolitske vrste, mogu se naći širom sveta najčešće u zemljištu, kompostu, trulim biljkama vlažnim zidovima i dr. Prenose se i semenom žalfije (Pavlović 2010). Ovaj rod sadrži 95 vrsta (Kirk i sar. 2008). Vrste roda *Chaetomium* sp. na hranjivoj PDA podlozi imaju brz porast. Vazдушna micelija je u početku pamučasta, a površina kolonije je bela, vremenom postaje žućkasta i maslinasto siva (Sl.1).

Obrazuju okrugle, ovalne peritecije, braon ili crne boje, okružene dugim spiralnim ili uspravnim flamentoznim dodacima. Askusi su sa 4-8 askospora, koje su ovalne, sferične ili oblika limuna, jednoćelijske, braon boje (Sl.2,3 i 4). Poznato je da *Chaetomium* proizvodi mikotoksin *chetoglobisins* A i C, koji može kod osoba sa slabim imunosistemom da izazove razna oboljenja.

### ***Alternaria* spp.**

*Alternaria* vrste su utvrđene na uzorcima iz lokaliteta Bački Maglič, Budisava, Kisač i Detelinara, a procenat zaraženog semena sa gljivama iz ovog roda se kretao između 12,7% (Budisava) i 25%

(Detelinara i Bački Maglič) (Graf. 1).

*Alternaria* je značajan rod gljiva čiji predstavnici su kako saprofiti, tako i patogeni. Vrste ovog roda ustanovljene su na semenu mnogih ratarskih, povrtarskih i lekovitih biljaka (Jovičević i Milošević, 1990). *Alternaria alternata* je najzastupljenija vrsta na semenu lekovitog bilja (Pavlović i sar., 2000 i 2000a). Procenat zaraženog semena kamilice ovom gljivom kretao se od 2 do 17%, a semena kantariona od 6 do 11%. Seme lincure bilo je zaraženo ovom gljivom čak 72% (Pavlović, 2011), dok se procenat zaraze semena bosiljka kretao od 14 % do 23% u u 2010. i 2011. Godini (Starović i sar. 2012).

Gljive iz ovog roda parazitiraju biljke od nicanja do kraja vegetacije, javljaju se na stablu, listu, plodu i semenu. Na hranjivoj podlozi KDA obrazuju bujnu vazдушnu miceliju koja je u početku prljavo bele boje, kasnije postaje sivkasto tamno maslinasta ili skoro crna (Sl. 5). Konidiofore gljive su proste, septirane, smeđebraon. Konidije su formirane u dugim, razgranatim nizovima, polimorfne, pravilno elipsoidne, okruglaste ili izdužene, sa 3-7 poprečnih i 1-3 uzdužnih septi, sa ili bez kratkog kljuna (Sl. 6).

### ***Fusarium oxysporum***

Schlecht. Emend. Snyd & Hans.

Vrsta *F. oxysporum* konstatovana je u uzorcima iz lokaliteta Budisava sa procentom zaraze od

2,13 % i Bački Maglić sa 10% (Graf. 1). Utvrđena je velika varijabilnost izolata u pogledu strukture i boje vazdušne micelije i pigmentacije supstratne micelije, što se slaže sa drugim autorima (Burgess i sar., 1994). Boja vazdušne micelije izolata vrste *F. oxysporum* na PDA podlozi je varirala od bele, bledoljubičaste do boje crvenog vina. Pigmentacija kolonije je bila od bledoljubičaste boje do boje crnog vina (Sl. 7 i 8).

Makrokonidije formirane na CLA podlozi su ujednačenog oblika i veličine. Mikrokonidije su bubrežaste, ovalne ili eliptične, hijalinske, obično jedno ili dvoćelijske (Sl. 9.) Svi naši izolati obrazovali su hlamidospore (Sl. 10).

### ***Epicoccum purpurascens***

Ehrenb.ex Schlecht.

*Epicoccum purpurascens* je utvrđena na semenu ambrozije iz lokaliteta Budisava (procenat zaraze 2,12 %) i Bački Maglić (procenat zaraze 10 %) (Graf. 1). Ova gljiva formira bujnu vunastu narančastu micelijuna podlozi KDA (Sl. 11). Konidije obrazuje u sporodohijama na kratkim zadebljanim konidioforama. (Sl. 12). Konidije su okrugle, tamno braon u masi. Ova gljiva je često prisutna na semenu ratarskih i povrtarskih biljaka, kao i na semenu cveća i lekovitog i aromatičnog bilja (Stević i sar., 2012., Ristić i sar., 2012).

### ***Sordaria fimicola***

(Rob.) Ces.& De Not.

*Sordaria fimicola* je utvrđena u svim lokalitetima, osim u lokalitetu Novi Sad-Detelinara, pri čemu se procenat pojave kretao između 10 i 40% (Graf. 1). Ova vrsta gljiva ima kratak životni ciklus (Alexopoulos i sar., 1996). Formira retku beličastu miceliju na KDA podlozi. Kolonije rastu veoma brzo tako da za četiri dana ispunjavaju Petri kutiju na sobnoj temperaturi. Supstratna micelija je tamna, skoro crna, tako da cela kolonija izgleda tamno siva skoro crna. Peritecije se u podlozi formiraju za 7 dana (Sl. 13). One su kruškastog oblika, tamno smeđe, skoro crne (Sl. 14). Askusi su bezbojni, sa osam askospora koje su elipsoidne, svetlo smeđe do skoro crne boje (Sl. 15).

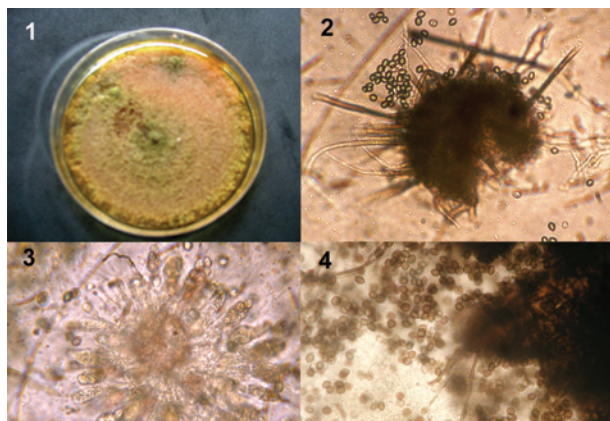
### ***Penicillium sp.*, *Cladosporium sp.* i *Aspergillus sp.***

Predstavnici roda *Penicillium* su utvrđeni u lokalitetima Budisava (procenat zaraze 6,4%), Detelinara (procenat zaraze 25%) i Bački Maglić (pro-

cent zaraze 10%). Vrste iz roda *Cladosporium* su utvrđene na semenu ambrozije iz Budisave (procenat zaraze 2,1%) i Bačkog Maglića (procenat zaraze 10%). *Aspergillus* je utvrđen u svima lokalitetima u procentu zaraze od 2,13% do 10,6%. Vrste iz roda *Penicillium*, *Aspergillus* i *Cladosporium* su redovno prisutne na semenu biljaka u većem ili manjem procentu. (Pavlović i sar 2006). Često se navedeni rodovi javljaju u mešanim zarazama na semenu. (Sl. 16-19).

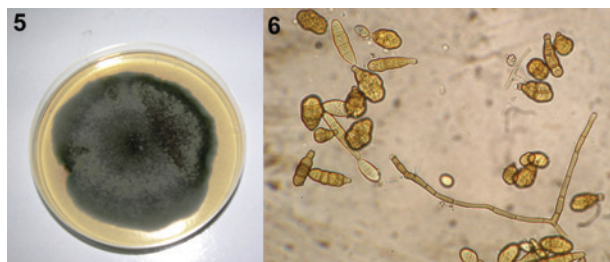
Obzirom na veliku pokrovnost i socijalnost kao i na osobinu da je relativno otporna na primenu većine herbicida (Veljković, 1996), pelenasta ambrozija se relativno teško suzbija. Herbicidi, registrovani u našoj zemlji, a koji se najčešće koriste u suzbijanju ovog širokolisnog korova su: dikamba, mezotrion, bentazon i klopivalid u kukuruzu, imazamoks, bentazon, oksasulfuron, metribuzin i acetohlor u soji, acetohloru u suncokretu, klopivalid metamitron i desmedifam+fenmedifam u šećernoj repi kao i glifosat i glufosinat-amonijum na nepoljoprivrednim površinama, strnjištima kao i u voćnjacima i vinogradima (Janjić i Elezović, 2010).

Ova istraživanja su usmerena ka evidentiranju mikrobiote semena ambrozije. Podaci o mikrobioti semena ambrozije predstavljaju osnovu za pronalaženje takvih patogena koji bi se mogli koristiti u biološkoj borbi protiv ambrozije. Prema podacima američkih autora u domovini ambrozije, u Severnoj Americi do sada je opisano oko 50 fitopatogenih gljiva – parazita ambrozije i oko 200 fitopagenih insekata (Farr i sar. 1989). Intenzivna naučna istraživanja suzbijanja ambrozije putem patogena gljiva se vrše širom sveta: u SAD (Johnson i sar., 1996; Wheeler i sar., 1998; Becker, 2001; Sheikh i sar., 2001), u Kanadi (Alex, 1992; Briere i sar., 1995), u Australiji (Sullivan, 1999), u Rusiji (Sokolov i sar., 1991), u Kini (Wang, 1990, Li, 1993). U neposrednom susedstvu, u Mađarskoj, koja je po klimatskim i edafskim uslovima veoma bliska agroekološkim uslovima Vojvodine, poklanja se velika pažnja suzbijanju ambrozije fitopatogenim gljivama (Bohar i Kiss, 1999; Vajna, 2002; Kiss i sar., 2003). Tri vrste roda *Fusarium* (*F. sporotrichoides*, *F. semitectum* i *F. equiseti*) izolovane su sa stabla ambrozije u Srbiji (Konstantinović i sar., 2005). Stojšin i sar., (2004) su dokazali patogenost *Sclerotinia sclerotiorum* izolovane sa ambrozije, a utvrdili su i prisustvo plamenjače prouzrokovane predstavnikom iz roda *Plasmopara* na ovoj korovskoj vrsti.



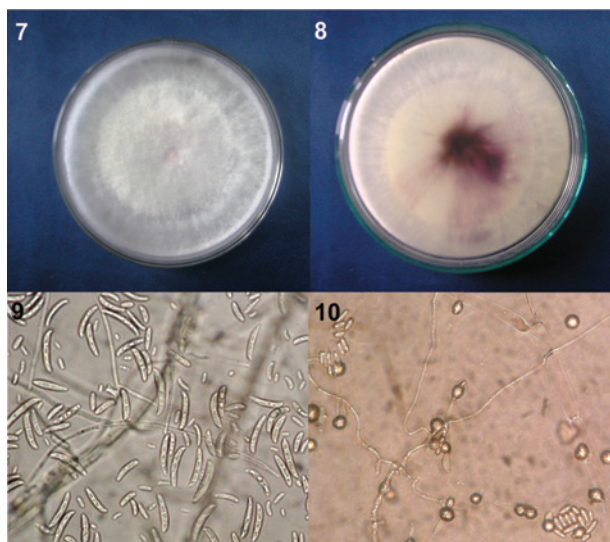
**Sl. 1-4.** *Chaetomium* sp. - Kolonija na KDA podlozi (Sl. 1), peritecija (Sl. 2), nedozreli askusi (Sl. 3) i askopore (Sl. 4) (Foto: Pavlović).

**Fig. 1-4.** *Chaetomium* sp. - Colony on PDA (Fig. 1), perithecia (Fig. 2), immature asci (Fig. 3), and ascospores (Fig. 4) (Photo: Pavlović).



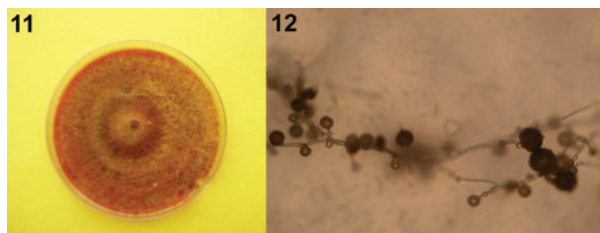
**Sl. 5-6.** *Alternaria* sp. - Kolonija na KDA podlozi (Sl. 5), konidiofore i konidije (Sl. 6) (Foto: Pavlović)

**Fig. 5-6.** *Alternaria* sp. - Colony on PDA (Fig. 5), conidiophores and conidia (Fig. 6) (Photo: Pavlović)



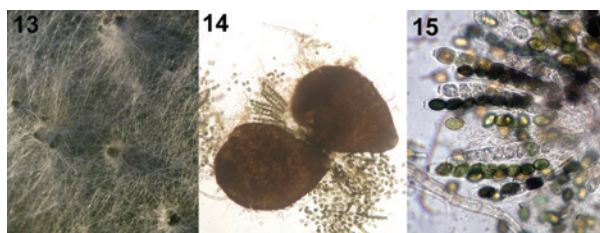
**Sl. 7-10.** *F. oxysporum*. - Kolonija na KDA podlozi (Sl. 8), makro i mikrokonidija (Sl. 9) i hlamidospora (Sl. 10) (Foto: Pavlović).

**Fig. 7-10.** *F. oxysporum*. - Colony on PDA (Fig. 8), macro and microconidia (Fig. 9), and chlamidospores (Fig. 10) (Photo: Pavlović).



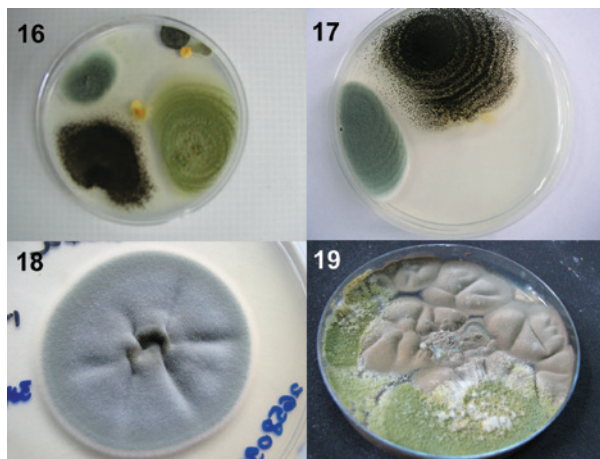
**Sl. 11-12.** *E. purpurascens*. - Kolonija na KDA podlozi (Sl. 11) i konidije (Sl. 12) (Foto: Pavlović).

**Fig. 11-12.** *E. purpurascens*. - Colony on PDA (Fig. 11), and conidia (Fig. 12) (Photo: Pavlović).



**Sl. 13-15.** *S. fimicola*. - Izgled peritecija na KDA podlozi (Sl. 13 i 14) i askusa i askospora (Sl. 15) (Foto: Pavlović).

**Fig. 13-15.** *S. fimicola*. - Appearance of perithecia on PDA (Fig. 13 and 14) and asci and ascospores (Fig. 15) (Photo: Pavlović).



**Sl. 16-19.** Mešana zaraza semena sa *Penicillium* sp., *A. niger* i *A. flavus* (Sl. 16), kolonije *Penicillium* sp i *A. niger* na KDA podlozi (Sl. 17), kolonija *Cladosporium* sp. na KDA podlozi (Sl. 18), mešana zaraza semena sa *Cladosporium* sp. i *Aspergillus* sp. (Sl. 19) (Foto: Pavlović).

**Fig. 16-19.** Seed mix infection with *Penicillium* sp., *A. niger* and *A. flavus* (Fig. 16), colony of *Penicillium* sp. and *A. niger* on PDA podlozi (Fig. 17), colony of *Cladosporium* sp. on PDA (Fig. 18), mix infection with *Cladosporium* sp. and *Aspergillus* sp. (Fig. 19) (Photo: Pavlović).



## ZAHVALNICA

Ovaj rad je deo projekta Tehnološkog razvoja pod brojem BT-46005 i TR -31018, finansiran od strane Ministarstva za prosvetu i nauku Republike Srbije.

## LITERATURA

- Alex, J. (1992): Biological control of weeds of Ontario. Proceedings of the 38th annual meeting of the Canadian Pest Management Society, Fredericton, New Brunswick, Canada, 27-31 July, pp. 111-117.
- Alexopoulos C.J., Mims, C.W., Blackwell, M. (1996): Introductory Mycology. John Wiley and Sons ., pp. 1- 361.
- Bazzaz, F. A. (1974): Ecophysiology of *Ambrosia artemisiifolia*: A. successional dominant. Ecology, 55: 115-119.
- Becker, H. (2001): Fungi can whack invasive weeds. Agricultural Research (Washington), Vol.49, No.11: 18-19.
- Bohar, Gy., Kiss, L. (1999): First report of *Sclerotinia sclerotiorum* on common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia*) in Europe. Plant Disease, Vol. 83, No. 3: 302.
- Boot, C. (1971): The genus *Fusarium*, Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England, pp. 1-237.
- Briere, S. C., Watson, A. K., Paulitz, T. C., Hallett, S. G. (1995): First report of a *Phoma* sp. on common ragweed in North America. Plant Disease, Vol.79, No.9: 968.
- Burgess, L.W., Summerell, B.A., Bullock, S., Gott, K.P., Backhouse, D. (1994): Laboratory Manual for *Fusarium* Research. Third Edition, University of Sydney and Royal Botanic Gardens, Sydney, pp: 1-133.
- Dhingra O.D., Sinclair, J.B. (1986): Basic Plant Pathology Methods, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, USA, pp. 1-355
- Farr, D.F., Bills, G.F., Chamuris, G.P., Rossman, A.Y. (1989): Fungi on Plants and Plant Products in the United States. APS Press, The American Phytopathological Society, St. Paul, MN, USA.
- Fisher, N.L., Burgess, L.W., Toussoun T.A. Nelson P.E. (1982): Carnation leaves as a substrate and for preserving cultures of *Fusarium* species. Phytopathology, 72: 151-153.
- Gerlach W., Nirenberg, H. (1982): The genus *Fusarium* - a pictorial atlas. Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land und Forstwirtschaft, Berlin-Dahlem, pp. 1- 209.
- ISTA (2003): International Rules for Seed Testing. Annexe to Chapter 7. Seed Health Testing Methods. Seed Science and Technology, Zürich, Switzerland.
- Janjić, V., Elezović, I. (2010): Pesticidi u poljoprivredi i šumarstvu u Srbiji 2010. Sedamnaesto izmenjeno i dopunjeno izdanje. Društvo za zaštitu bilja Srbije. Beograd.
- Johnson, D. R., Wyse, D. L., Jones, K. J. (1996): Controlling weeds with phytopathogenic bacteria. Weed Technology, 1996, Vol.10, No.3: 621-624.
- Jovičević, B., Milošević, M. (1990): Bolesti semena. Dnevnik, Novi Sad. pp.1-291.
- Kiraly Z., Klement Z., Solymosy F., Voros J. (1970): Methods in Plant Pathology. Ed. by Z. Kiraly, Akademiai Kiado, Budapest, pp. 237-477.

- Kirk, P.M., Cannon, P.F., Minter, D.W., Stalpers, J.A. (2008): Dictionary of the Fungi (10th ed.). Wallingford, UK: CABI. pp. 131.
- Kiss, L., Vajna, L. and Bohar, Gy. (2003): Possibilities of biological control of common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia* L.). *Növényvédelem*, 39 (7): 319-331.
- Konstantinović, B., Meseldžija M., Stojšin, V., Bagi, F., Balaž, F. (2005): Integral control of *Ambrosia artemisiifolia* L. in the city of Novi Sad. *Savremena Poljoprivreda*. Vol. 54, 1-2: 175-180.
- Lević, J. (2008): Vrste roda *Fusarium* u oblasti poljoprivrede, veterinarske i humane medicine. eds. Institut za kukuruz "Zemun Polje" and Društvo genetičara Srbije, Cicero, Beograd, pp. 1- 1226.
- Li, H. K.; Li, Y. N. (1993): Survey of pathogens as potential biological control agents to control the ragweed, *Ambrosia artemisiifolia*. *Chinese Journal of Biological Control*, 1993, Vol.9, No.1: 45-46.
- Neergard, P. (1979): Seed pathology. Vol. 1, The Macmilan press Ltd, Copenhagen, pp. 1-839.
- Nelson, P.E., Toussoun, T.A., Marasas, W.F.O. (1983): *Fusarium* species. An illustrated manual for identification. The Pennsylvania State University Press, University Park and London, pp. 1-193.
- Pavlović S., Dražić S., Jevđović R., Poštić D. (2006): Fungi on Sage seed in Serbia and their effect to seed germination. 4<sup>th</sup> Conference on Medicinal and Aromatic Plants of South East European Countries, Jasi- Romania 28<sup>th</sup>- 31<sup>st</sup> May 2006, Book of Proceedings, pp. 210-213.
- Pavlović, S. (2010): Mikoze nekih značajnijih lekovitih biljaka u Srbiji. *Lekovite sirovine*, Beograd, 30, pp. 47-64.
- Pavlović, S., Dražić S., Ivanović M. (2000a): Microflora of St. John's wort seeds. Proceedings from the First Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries, Eds: Dragana Sekulović, Srboľjub Maksimović, Jan Kišgeci, Institute for Medicinal Plant Research "Dr Josif Pančić" and FPAGRI, Belgrade, pp. 269-274
- Pavlović, S., Dražić, S. (2000): Microflora of chamomile seeds *Chamomilla recutita* (L.) Rausch.: Proceedings from the First Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries, Eds: Dragana Sekulović, Srboľjub Maksimović, Jan Kišgeci, Institute for Medicinal Plant Research "Dr Josif Pančić" and FPA-GRI, Belgrade, pp. 339-346.
- Pavlović, S., Stojanović, S., Starović M., Jošić, D., Menković, N. (2011). Parasitic Mycobiota of Yellow gentiana (*Gentiana lutea* L.). *Zbornik Matice Srpske*, 120: 175-180.
- Priszter, Sz. (1960): Adventivgyomnövényeinkterjedése. *Mezőgazdasági Kiadó*, Budapest.
- Radišić, P. (2002): Polen ambrozije (*Ambrosia* spp.) kao aeroalergen. XXIII Seminar iz zaštite bilja Vojvodine. Novi Sad.
- Ristić D., Stanković I., Vučurović A. Berenji J., Krnjajić S., Krstić B. Bulajić A. (2012): *Epicoccum nigrum* novi patogen semena sirka u Srbiji. *Ratarstvo i povrtarstvo* 49 (2): 160-166.
- Sheikh, T., Wheeler, T.A., Dotray, P.A., Zak, J.C. (2001): Biological control of woollyleaf bursage (*Ambrosia grayi*) with *Pseudomonas syringae* pv. *tagetis*. *Weed Technology*, Vol.15, No. 2: 375-381.
- Simmons, G. E. (2007): *Alternaria*: An identification Manual, pp. 1-775. APS.
- Simonović, D. (1959): Botanički rečnik, imena biljaka. Srpska Akademija Nauka. Beograd.

Slavnić, B. Ž. (1953): Prilog flori našeg Podunavlja. Hrvatsko prirodoslovno društvo. Glasnik biološke sekcije. Zagreb.

Sokolov, M. S., Vyalykh, A. K., Isaeva, L. I. (1991): Situation, problems and prospects in the use of ecologically safe pesticides Šmycoherbicides and biological control agentsĆ in plant growing. *Agrokimiya*, No.4.: 39-157.

Starović, M., Pavlović, S., Stojanović, S., Stević, T., Kuzmanović, S., Popovic, T., Jošić, D. (2012): Mycopopulation of basil seeds. Proceedings of the 7th CMAPSEEC, Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries, pp. 303-308.

Stević, T., Pavlović, S., Stanković, S., Šavikin, K. (2012): Pathogen microorganisms of medicinal hebal drugs. *Archives of Biological Sciences* 64 (1): 49-58.

Stojšin, V., Bagi, F., Balaž, F., Tomić, Z. (2004): Potencijalni patogeni *Ambrosia artemisiifolia* L. u biološkoj borbi. V Kongres o zaštiti bilja, Zlatibor, 22-26. novembar. pp. 212-213.

Sullivan, P.R. (1999): Current and recent weed biological control projects relevant to New South Wales. ED: Blackmore, P. Practical weed management: protecting agriculture and the environment. 10th Biennial Noxious Weeds Conference, Ballina, Australia, 20-22., July.

Šarić, T. (1991): Atlas korova. Svetlost. Sarajevo.

Vajna, L. (2002): Downy mildew epidemic on common ragweed in Hungary caused by *Plasmopara halstedii*. *Plant Pathology*, 51: 809.

Veljković, B. (1996): Rasprostranjenost novo unešenih korovskih vrsta *Ambrosia artemisiifolia* L. i *Iva xanthifolia* Nutt. u Jugoslaviji. Peti kongres o korovima. Banja Koviljača, pp. 351-363.

Wang, R. (1990): Biological control of weeds in China: a status report. Proceedings of the VIII International Symposium on Biological Control of Weeds, pp. 689-693.

Wheeler, T. A., Dotray, P., Winchester, J. (1998): Root rot by *Rhizoctonia solani* on *Ambrosia grayi* in Texas. *Plant Disease*, Vol.82, No.8: 959.

**(Primljeno: 11. 03. 2013.)**  
**(Prihvaćeno: 03. 04. 2013.)**

## MYCOBIOTA OF RAGWEED SEEDS

FERENC BAGI<sup>1</sup>, SNEŽANA PAVLOVIĆ<sup>2</sup>, VERA STOJŠIN<sup>1</sup>, BRANKO KONSTANTINOVIĆ<sup>1</sup>,  
DRAGANA BUDAKOV<sup>1</sup>, BOJAN KONSTANTINOVIĆ<sup>1</sup>, NATAŠA ILIĆ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>University of Novi Sad, Faculty of Agriculture,

Department of Plant and Environment Protection, Novi Sad, Serbia

<sup>2</sup>Institute for Medicinal Plant Research "Dr Josif. Pančić", Belgrade, Serbia

e-mail: bagifer@polj.uns.ac.rs

### SUMMARY

Results of this research indicate that seed of common ragweed is a favorable substrate for development of many different microorganisms, among which fungi take important place. Therefore, saprophytic and parasitic mycobiota of common ragweed seed from natural populations are studied in this publication. Common ragweed seeds were collected from five localities: Budisava, Novi Sad–Detelinara, Kać, Bački Maglić and Kisač. Within methods that were used (ISTA–International Rules for Seed Testing), we determined presence of fungi from the following genera: *Fusarium*, *Sordaria*, *Alternaria*, *Epicoccum*, *Chaetomium*, *Penicillium*, *Cladosporium* and *Aspergillus*. The most commonly isolated fungi was *Chaetomium* spp. Seed contamination rate greatly varied depending on locality between 19,1 and 50%. Mixed infections with fungi from different genera were common. High common ragweed seed contamination endangers purity of essential oil which is used in pharmaceutical and cosmetic industry due to possible mycotoxin synthesis. Additionally, as *Ambrosia artemisiifolia* is widely distributed weed in our country, against which it is necessary to regularly apply chemical and mechanical control measures, results of this research may also indicate the possibility to use biological agents in control of common ragweed.

**Key words:** mycobiota, seed, *Ambrosia artemisiifolia*

(Received: 11. 03. 2013.)

(Accepted: 03. 04. 2013.)

## GROWTH PROMOTION OF ALFALFA, *MEDICAGO SATIVA* L. BY INOCULATION OF A PRECEDING CROP WITH RHIZOBACTERIA

DUŠICA DELIĆ<sup>1</sup>, OLIVERA STAJKOVIĆ-SRBINOVIĆ<sup>1</sup>, SVETLANA ŽIVKOVIĆ<sup>2</sup>, NADA PROTIĆ<sup>3</sup>,  
NATAŠA RASULIĆ<sup>1</sup>, ĐORĐE KUZMANOVIĆ<sup>1</sup>, ALEKSANDAR SIMIĆ<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Institute of Soil Science, Belgrade

<sup>2</sup>Institute for Plant Protection and Environment, Belgrade

<sup>3</sup>EKO-LAB, Padinska Skela, Belgrade

<sup>4</sup> University of Belgrade, Faculty of Agriculture, Belgrade  
e-mail: vukmirdusica@yahoo.com

### SUMMARY

In the greenhouse experiment, the possibility of alfalfa (*Medicago sativa* L.) growth promotion by inoculation of preceding barley (*Hordeum vulgare* L.), with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) was examined. The aim of experiment was to select the effective strains as biofertilizer applied in plant rotation. Effects of inoculation with two *Azotobacter* and two *Pseudomonas* strains as well as one *Sinorhizobium*, *Enterobacter* and *Bacillus* strain on shoot dry weight and total N content of alfalfa were determined. The results pointed out significant plant growth promotion abilities of strains A1, A2 and P1 which increased alfalfa shoot dry weight over untreated control  $\emptyset$ , by 41, 39 and 35 %, respectively. These three strains increased total N content of alfalfa plants by 34.92- 40.45% in respect to control  $\emptyset$ . The presented study showed a significant positive influence of preceding barley inoculation with rhizobacteria alone and their mixture on shoot yield and total N content of alfalfa. Results indicated that strains of *Azotobacter* sp., *Pseudomonas* sp. and *Enterobacter* sp. alone can be investigated in further researches as potential agents of biofertilizer for plant growth promotion of alfalfa.

**Key words:** alfalfa, plant growth promotion, inoculation, previous crop, barley

### INTRODUCTION

Providing an adequate supply of nutrients is important for alfalfa (*Medicago sativa* L.) production and essential for maintaining high, quality and profitable yields. Application of mineral fertilizers significantly increases quality and quantity of yield because the content of plant nutrients in the soil is variable and often unavailable. However, in last decades with the increasing world population there have been economic and ecological problems associated with excessive use of mineral fertilizers and other synthetic chemicals. The principle goal of ag-

riculture is the production of high quality, safe and affordable food for world population. Hence there has been an ever-increasing interest in the use of native and non-native beneficial microorganisms to improve plant health and productivity while ensuring safety for human consumption and protection of the environment (Avis et al., 2008; do Vale Barreto Figueredo et al., 2011). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) are beneficial bacteria which colonize the rhizosphere and plant roots and have ability to enhance plant growth by variety of mechanisms that involve increasing nitrogen (N) uptake (biological N fixation-BNF), solubilisation of mineral nutrients, stimulation of root growth (phytohor-

mone production) and suppression of root diseases (Martinez-Viveros et al., 2010; Bhattacharyya and Jha, 2012). Strains with PGPR activity belonging mainly to phylum Proteobacteria: genera *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Gluconacetobacter*, *Pseudomonas*, *Serratia* and rhizobial bacteria have been reported (Egamberdiyeva et al. 2004; Abbas-Zadeh et al. 2010; Antoun and Prévost 2000; Bhattacharyya and Jha, 2012). Due to ability of plant growth promotion, PGPR appeared as bacterial inoculants, a promising alternative for mineral and organic fertilization, pesticides and other supplements (Bhattacharyya and Jha, 2012).

Barley (*Hordeum vulgare* L.) is a major cereal grain followed by legumes in crop rotation. One of an important advantage of using barley as cover crops is its trait to suppress weeds through physical as well as chemical allelopathic effects (Nagabhushana et al., 2001; Saini, 2006). Good cover crop, inexpensive and easy to grow barley should be considered an integral part of any farming system that wants to efficiently utilize nutrients, improve soil quality, and increase farm profitability mostly by reducing herbicide costs. Based on these characteristics barley is suitable preceding crop to legumes particularly, alfalfa. Inoculation of preceding crops with PGPR could help establishment of population of these bacteria in soil and rhizosphere of the next crop (Goos et al., 2001).

In recent years there has been a growing interest in using bacterial inoculants as biofertilizers. Selection of effective strains with PGPR properties is one of the important steps in examination of potential bacterial inoculants. The experiment was designed to determine possibility of alfalfa growth promotion by inoculation of barley as preceding crop alfalfa with some rhizobacteria with the aim to select effective strains as biofertilizer applied in plant rotation.

## MATERIAL AND METHODS

*Sinorhizobium meliloti* strain L3Si, *Bacillus megaterium* SNji, *Enterobacter* sp. strain E1 *Azotobacter* sp. strains A1 and A2, as well as *Pseudomonas* sp. strains P1 and P2 from the Collection of the Institute of Soil Science were used for the inoculation of barley. The inoculation effects of these PGPR on the yield of alfalfa cultivar K-28 as subsequent crop to barley were examined in pot experiment under greenhouse conditions.

The pots were filled with 1.9 kg of non-sterile soil with following characteristics: pH (in H<sub>2</sub>O) 7.4, 0.09% N, 1.48% C, 21 mg kg<sup>-1</sup> available P (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>), 400 mg kg<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>O. The experiment was designed with 7 inoculated treatments which represented alfalfa plants as subsequent crop grown in pots after cutting inoculated barley. Treatments were compared with two control treatments without inoculation: Ø (alfalfa plants after uninoculated preceding crop) and Øo (alfalfa without preceding crop). The experiment was carried out with 3 replications in completely randomised system and the pots were kept in greenhouse conditions. *Bacillus* and *Enterobacter* sp. strains and *Pseudomonas* sp. strains were cultivated for 24h in nutrient broth medium and King B medium, respectively (King et al., 1954; Vincent, 1970; Bergey, 1984-1989; Sarić, 1989). *S. meliloti* strain was cultivated in yeast mannitol broth (YMB) for 48h while *Azotobacter* sp. strains were cultivated in N free mannitol broth with Vinogradsky solution for 72h.

Barley (*Hordeum vulgare* L.) seeds were surfaced-sterilized with 0.1% HgCl<sub>2</sub> solution (Vincent, 1970) and inoculated (2 ml plant<sup>-1</sup> of liquid culture) with single strains or with their mixture in a ratio 1:1. Liquid culture of single strain contained >10<sup>9</sup> cells ml<sup>-1</sup>. Ten seeds per pot were planted and after 2 weeks seedlings were thinned to 5 plants pot<sup>-1</sup>. Barley plants were removed in filleting stage and alfalfa (*Medicago sativa* L.) as subsequent crop was sown in the same pots. Alfalfa seeds were surfaced-sterilized, planted and thinned as the same way like barley. The plants were kept for six weeks. Plant shoots were separated from roots and dried in an oven at 70 °C to constant weight and the average dry weight per plant was calculated. The percentage of shoot N was determined from dried and ground plant samples using the CNS analyser and it was used to calculate total N content in mg per pot. The data were statistically processed by the LSD and Duncan test using the statistical program SPSS 10.0. Correlation coefficients were calculated to study the associative relations among the measured traits. All references to significance in the text imply statistical significance at P<0.05, unless otherwise stated.

## RESULTS

In our study barley as crop preceding alfalfa was inoculated with seven single effective rhizobacterial strains belonging to *S. meliloti*, *B. megaterium*, *Enterobacter* sp., *Azotobacter* sp. and *Pseudo-*

*monas* sp. as well as their mixture. Effects of barley inoculation with PGPR strains on alfalfa yield were examined. The height of the alfalfa plants was 29.95–35.89 cm without significant differences among treatments. The greatest average values of alfalfa shoot dry weight (SDW) were obtained in the inoculated treatments with *Azotobacter* sp. strains A1 and A2 followed by *Pseudomonas* sp. strain P1, (698.59, 690.62 and 672.65 mg plant<sup>-1</sup>, respectively) (Table 1). These results indicated that alfalfa shoot dry weight (SDW) was significantly influenced by inoculation the preceding barley with A1, A2 and P1 strains in respect to the other inoculated treatments and control  $\emptyset$ . The results pointed out significant plant growth promotion abilities of strains A1, A2 and P1 which increased alfalfa SDW over control  $\emptyset$ , by 41, 39 and 35 %, respectively. Shoot dry weight values were in highly significant positive correlation with shoot total N content ( $r=0.98$ ). The highest average values of total N content was detected

also, in A1, A2 and P1 treatments and there are no significant differences between them. Among the strains applied, the treatment with a *Pseudomonas* sp. strain P1 resulted in the greatest value of total N content (21.162 mg plant<sup>-1</sup>) followed by A1 and A2 strains. These three strains increased total N content of alfalfa plant by 34.92–40.45% in respect to control  $\emptyset$ .

However, it should not neglect influence of strain mixture as well as *Enterobacter* sp. E1 and *Pseudomonas* sp. strain P2 on plant parameters bearing in mind that these strains significantly increased (by about 27%) SDW and total N content of alfalfa over control  $\emptyset$ .

*B. megaterium* strain SNj and *S. meliloti* strain L3Si did not improve alfalfa properties investigated in this study in comparison with control  $\emptyset$ . Small and white nodules scattered on alfalfa roots were indicators of ineffective symbiotic association between host plant and rhizobial strain L3Si.

**Table 1.** Effect of barley inoculation with PGPR on parameters of alfalfa as subsequent crop.  
**Tabela 1.** Efekat inokulacije ječma PGPR rizobakterijama na neke osobine lucerke kao narednog useva.

PGPR*	Alfalfa parameters Parametri lucerke				
	Height cm	SDW mg plant <sup>-1</sup>	Total N content mg plant <sup>-1</sup>	SDW index	Total N content index
	Visina cm	SDW mg biljka <sup>-1</sup>	Sadržaj ukupnog N mg biljka <sup>-1</sup>	SDW indeks	Indeks ukupnog sadržaja N
$\emptyset$ **	34.1 ab	495 de	15.1 d	100	100
$\emptyset$ ***	33.2 ab	543 d	15.9 d	110	106
A1	35.0 a	699 a	20.3 ab	141	135
A2	34.8 a	691 a	20.5 ab	140	138
P1	34.6 a	673 ab	21.2 a	136	140
P2	30.5 ab	607 c	19.1 bc	123	127
L3Si	30.0 ab	411 f	13.2 e	83	88
SNj	28.5 b	488 e	15.1 d	99	100
Mix***	31.9 ab	630 bc	19.3 bc	127	128
E1	35.9 a	640 bc	18.6 c	129	124
LSD 0.01	6.98;	57.41;	1.73;	-	-
LSD 0.05	5.27	43.34	1.31		

PGPR\* - plant grow promoting rhizobacteria;  $\emptyset$ \*\* - control treatment-alfalfa plants after uninoculated preceding crop;  $\emptyset$ \*\*\* control treatment- alfalfa without preceding crop; Mix\*\*\* - mixture of strains applied; Means in a column followed by the same letter are not significantly different according to Duncan's multiple range test ( $P \leq 0.05$ ).

PGPR\* - rizobakterije koje poboljšavaju rast biljke;  $\emptyset$ \*\* - kontrolni tretman-biljke lucerke posle neinokulisanog prethodnog useva;  $\emptyset$ \*\*\* - kontrolni tretman-biljke lucerke bez prethodnog useva; Mix\*\*\* - mešavina sojeva; Na osnovu Duncan's multiple range test srednje vrednosti u kolonama označene istim slovom nisu statistički značajno različite ( $P \leq 0.05$ ).

## DISCUSSION

There has been a growing interest in using bacterial inoculants (biofertilizers) in agricultural production including legumes and cereals (Figueroa et al., 2008; do Vale Barreto Figueredo et al., 2011). Significant increases in growth and yield of agronomical important crops in response to inoculation with PGPR have been extensively reported (Kloepper et al. 1978; Zhang et al. 1996; Gupta et al. 2002; Vessey 2003; Gray and Smith 2005; Figueredo et al. 2008). In addition, there is interest in inoculation of preceding crops with PGPR with intention to establish PGPR population in soil and rhizosphere of the next crop (Domit et al., 1990; Goos et al., 2001).

In our study possibility of alfalfa growth promotion by inoculation of preceding barley with PGPR was determined in order to evaluate the plant growth promoting potential of some strains as inoculums as well as their influence on subsequent crop. Presented results indicated that among 5 strains with significant plant growth promoting activity (A1, A2, P1, P2 and E1), strains of *Azotobacter* sp. and one strain (P1) of *Pseudomonas* sp. own the greatest plant growth promoting potential.

The both applied strains of *Azotobacter* sp. significantly increased alfalfa SDW (about 40% over control) probably due to its N fixing or the other plant growth promoting abilities which is in agreement with results of some authors (Kennedy et al. 2004; Milošević et al., 2012). It was reported that particular species of *Azotobacter* (*A. paspali*) with some cereal can fixed 15-90 kg N ha<sup>-1</sup>, which indicates *Azotobacter* genera as a good diazotrophic useful for both cereals and legumes (Franche et al., 2009).

Presented results showed different plant growth promotion abilities of *Pseudomonas* sp. strains P1 and P2 indicating that the growth-promoting ability of some bacteria may be highly specific to certain plant species, cultivar and genotype (Lucy et al. 2004). Direct plant growth promoting effect of biocontrol agent such as *Pseudomonas* sp. in pathogen-free environment is often associated with following mechanism solubilization insoluble P source and regulation of plant growth regulators (Avis et al., 2008). In our results, middle PGPR effectiveness of *Pseudomonas* sp. P2 and *Enterobacter* sp. strain E1 should not be neglected because these strains significantly increased SDW over  $\emptyset$  by 22% and 29%, respectively. Particular *Pseudomonas* species could increase yield of some plant species by

25% as well as 60% (Adjanohoun, 2011). *Enterobacter* and *Pseudomonas* genera have been identified as diazotrophic rhizobacteria with nitrogen-fixing and PGPR ability in rhizosphere of various plants that increase the height and plant yield (Minorsky, 2008; Franche et al., 2009; Zabihi et al., 2010).

Species of *Bacillus* are the most extensively studied (Minorsky, 2008; Hayat et al., 2010). Diversified populations of aerobic endospore forming bacteria of *Bacillus* species occur in agricultural fields and contribute to crop productivity. It is very likely that plant growth promotion by rhizosphere bacilli may be a result of combined action of two or more of these mechanisms (Richardson et al. 2009; Kumar et al., 2011). These bacteria competitively colonize the roots of plant and can act as biofertilizers and/or antagonists (biopesticides) or simultaneously both. However, in presented study *B. megaterium* SNji and *S. meliloti* strain L3Si did not show promoting abilities. The results of some authors concerning *Bacillus* species also pointed to its negative effect on maize (Adjanohoun, 2011).

Rhizobia are a vast group of soilborne rhizobacteria with representatives that have proven plant growth promoting activities through N fixation. Rhizobial strains are well known N fixers which in symbiosis with legumes form N fixing nodules but they can associate with roots of non-legumes without forming true nodules resulting in the growth promotion of legumes and non-legumes by different mechanisms (Avis et al., 2008; Mehboob et al., 2009). These bacteria can equally produce plant growth regulations-phytohormones and solubilize organic and inorganic phosphates that would have a role in their plant growth promoting activities. Also presence of rhizobial strains indirectly stimulate the plant to active its defence mechanisms when challenged with pathogen through the production plant defence compounds (Avis et al., 2008). Rhizobia have a diverse range of activity. In contrast, some studies have revealed that rhizobial inoculation may also have deleterious effect on growth and yield of non-legumes and legumes and only specific rhizobial strains had potential to be used as PGPR (Antoun and Prevost, 2000). In this study *S. meliloti* strain L3Si applied as inoculant of preceding barley was ineffective in spite of its high effectiveness in BNF with alfalfa in our previous experiments (Delić et al., 2012). Significantly lower values of alfalfa parameters in comparison the control- $\emptyset$  indicated bad relationship between the symbionts. Reasons for these results can be founded in natural variations in environment, cultivar, soil and indigenous microflora of a specific area (Mehboob et al.,



2008) and represent the major challenges in the use of bio-inoculants. Characterization of the degree to which symbiotic microbes vary in the provision of mutualistic benefits in relation to environmental quality, host species and plant community structure is critical to developing an understanding of their role as agents of productivity and selection in natural populations (Martines-Viveros et al., 2010; Thrall, 2011).

The mixture of strains applied in presented study promoted alfalfa SDW similar like middle effective strains E1 and P1 (by 27% over  $\emptyset$ ). Except strain competition for place on rhizoplan and internal of the root tissue, the important role is played by plants in selecting and enriching the types of bacteria by the constituents of their root exudates. Therefore, the bacterial community in the rhizosphere

develops depending on the nature and concentrations of organic constituents of exudates, and the corresponding ability of the bacteria to utilize these as sources of energy (Saharan and Nehra, 2011). It is not certain if plants actively select beneficial soil microbial communities in their rhizosphere. Composition of root exudates was shown to vary with plant species and stage of plant growth (Jaeger et al. 1999).

The presented study showed a significant positive influence of preceding barley inoculation with rhizobacteria alone and their mixture on shoot yield and total N contents of alfalfa. Results indicated that strains of *Azotobacter* sp., *Pseudomonas* sp. and *Enterobacter* sp. alone can be investigated in further researches as potential agent of biofertilizer for plant growth promotion of alfalfa.

#### ACKNOWLEDGEMENT

This study was supported by Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia, Projects, No TR-37006 and III 46007.

#### REFERENCES

- Abbas-Zadeh, P., Saleh-Rastin, N., Asadi-Rahmani, H., Khavazi, K., Soltani, A., Shoary-Nejati, A. R., Miransari, M. (2010): Plant growth-promoting activities of fluorescent pseudomonads, isolated from the Iranian soils. *Acta Physiol. Plant.*, 32: 281–288.
- Adjanohoun, A., Allagbe M., Noumavo P. A., Gotoechan-Hodonou H., Sikirou R., Dossa K. K., GleleKakaï R., Kotchoni S. O., Baba- Moussa L. (2011): Effects of plant growth promoting rhizobacteria on field grown maize. *Journal of Animal & Plant Sciences*, Vol. 11 (3): 1457-1465.
- Antoun, H., and Prevost, D. (2000): PGPR activity of *Rhizobium* with nonleguminous plants. Available on <http://www.ag.auburn.edu/argentina/pdfmanuscripts/tableofcontents.pdf>
- Avis T.J., Gravel V., Antoun H., Tweddell R.J. (2008): Multifaceted beneficial effects of rhizosphere microorganisms on plant health and productivity. *Soil Biol. Biochem.*, 40: 1733–1740.
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1984-1989): J.G.Holt, Editor-in-Chief, Williams and Wilkins, Baltimore, MD, USA, 1-4.
- Bhattacharjee, R.B., Singh, A., Mukhopadhyay, S.N. (2008): Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertilizer for non-legumes: prospects and challenges. *Appl. Microbiol. Biot.*, 80: 199-209.
- Bhattacharyya, P.N., Jha, D. K. (2012): Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) emergence in agriculture. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 28: 1327–1350.
- Delić, D., Stajković Srbinović, O., Kuzmanović, Đ., Rasulić, N., Maksimović, S., Radović, J., Simić, A. (2012): Influence of Plant Growth Promoting Rhizobacteria on Alfalfa *Medicago sativa* L. yield by Inoculation of a Preceding Italian Ryegrass, *Lolium multiflorum* Lam. *Breeding Strategies for Sustainable Forage and Turf Grass*

- Improvement*, (Ed. Susanne Barth and Dan Milbourne) Springer, Netherland, pp. 333–339.
- Domit, L.A., Costa, J.A., Vidor, C., Pereira, J.S. (1990): Inoculation of cereal seeds with *Bradyrhizobium japonicum* and its effect on soybeans grown in succession. *Rev. Brasileira Ci Solo*, 14: 313–319.
- Egamberdiyeva D., Juraeva D., Poberejskaya S., Myachina O., Teryuhova P., Seydaliyeva L., Aliev A. (2004): Improvement of wheat and cotton growth and nutrient uptake by phosphate solubilising bacteria in: Jordan DL and Caldwell DF (eds.), Proceedings of the 26th Southern Conservation Tillage Conference for Sustainable Agriculture, June 8–9, Raleigh, North Carolina.
- Gray, E.J., Smith, D.L. (2005): Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. *Soil Biol. Biochem.*, 37: 395–412.
- Gupta, C.P., Dubey, R.C., Maheshwari, D.K. (2002): Plant growth enhancement and suppression of *Macrophomina phaseolina* causing charcoal rot of peanut by fluorescent *Pseudomonas*. *Biol. Fertl. Soils*, 35: 399–405.
- Hayat R., Ali S. (2010): Nitrogen fixation of legumes and yield of wheat under legumes-wheat rotation in Pot-hwar. *Pak. J. Bot.*, 42(3): 2317–2326.
- Franche, C., Lindström, K., Elmerich, C. (2009): Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant and Soil*, 321: 35–59.
- Goos, R.J., Johnson, B.E., Carr, P.M. (2001): Establishment of *Bradyrhizobium japonicum* for soybean by inoculation of a preceding wheat crop. *Plant Soil*, 235: 127–133.
- Figueiredo, M.V.B., Burity, H.A., Martinez, C.R., Chanway, C.P. (2008): Alleviation of drought stress in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by co-inoculation with *Paenibacillus polymyxa* and *Rhizobium tropici*. *Appl. Soil Ecol.*, 40: 182–188.
- Jaeger, C.H. III, Lindow, S.E., Miller, W., Clark, E., Firestone, M.K. (1999): Mapping of sugar and amino acids availability in soil around roots with bacterial sensors of sucrose and tryptophan. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 2685–2690.
- King, E. O., Ward, M. K., Raney, D. E. (1954): Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J. Lab. Clin. Med.*, 44: 301–307.
- Kennedy, I. R., Choudhury, A. T. M. A., Kecskès, M. L. (2004): Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-framing systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited? *Soil Biol. Biochem.*, 36: 1229–1244.
- Kloepper, J.W., Schroth, M.N. (1978): Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. In: Proceedings of the 4th international conference on plant pathogenic bacteria. Gilbert-Clarey, Tours, pp. 879–882.
- Kumar, A., Prakash, A., Johri, B.N. (2011): *Bacillus* as PGPR in Crop Ecosystem. In: *Bacteria in Agrobiology: Crop Ecosystems*. D.K. Maheshwari (ed.), Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Lucy, M., Reed, E., Glick, B.R. (2004): Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Review Antonie Van Leeuwenhoek*, 86: 1–25.
- Martínez-Viveros, O., Jorquera, M.A., Crowley, D.E., Gajardo, G., Mora, M.L. (2010): Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 10: 293–319.
- Minorsky, P.V. (2008): On the inside. *Plant Physiol.*, 146: 323–324.

- Mehboob, I., Naveed, M., Zahir, Z.A. (2009): Rhizobial Association with Non-Legumes: Mechanisms and Applications. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 28 ( 6): 432-456.
- Mehboob, I., Zahir, Z.A., Mahboob, A., Shahzad, S.M., Jawad A., Arshad. M. (2008): Preliminary screening of *Rhizobium* isolates for improving growth of maize seedlings under axenic conditions. *Soil Environ.*, 27: 64-71.
- Milošević, N., Tintor B., Protić R., Cvijanović G., Dimitrijević T. (2012): Effect of inoculation with *Azotobacter chroococcum* on wheat yield and seed quality. *Romanian Biotechnological Letter*, 17 (3): 7352-7357.
- Nagabhushana, G. G., Worsham, A. D., Yenish, J. P. (2001): Allelopathic cover crops to reduce herbicide use in sustainable agriculture systems. *Allelopathy J.*, 8: 133-146.
- Richardson, A.E., Barea, J.M., McNeill, A.M., Prigent-Combaret C. (2009): Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant Soil*, 321: 305-339.
- Saharan, B.S., Nehra, V. (2011): Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A Critical Review Life Sciences and Medicine Research: LSMR-21.
- Sarić, Z. (1989): Praktikum iz mikrobiologije. Naučna knjiga. Beograd.
- Saini, M., Price, A., van Santen, E. (2006): Cover crop residue effects on early-season weed establishment in a conservation-tillage corn-cotton rotation. Southern Conservation Systems Conference, June 26-28, Amarillo TX, pp. 175-182.
- do Vale Barreto Figueiredo, M., Seldin, L., Fernando de Araujo, F., de Lima Ramos Mariano, L. (2010): Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Fundamentals and Applications. D.K. Maheshwari (ed.), *Plant Growth and Health Promoting Bacteria*, Microbiology Monographs 18, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- do Vale Barreto Figueiredo, M., Sérgio Ferreira de Araújo, A., Almeida Burity, H., de Andrade Lira Junior, M. (2011): Biodiversity and the potential of PGPR: plant microorganism Interactions. *Chapter 7*, *Microbial Ecology of Tropical Soils*. Editor's: Ademir Sérgio Ferreira de Araújo; Márcia do Vale Barreto Figueiredo- Nova Science Publishers, Inc. New York.
- Vessey, J.K. (2003): Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil* 255: 571-586.
- Vincent, M.J. (1970): Manual for the practical study of root-nodule bacteria. In: *IBP Handbook*, vol. 15. Blackwell. Oxford.
- Thrall, P.H., Laine, A.L., Broadhurst, L.M., Bagnall, D. J., Brockwell, J. (2011): Symbiotic Effectiveness of Rhizobial Mutualists Varies in Interactions with Native Australian Legume Genera. Matthias Rillig, Freie Universität Berlin, Germany. *PLOS ONE (eISSN-1932-6203)* <http://www.plosone.org/article/info:doi/10.1371/journal>.
- Zabihi, H.R., Savaghebi, G.R., Khavazi, K., Ganjali, A., Miransari, M. (2010): *Pseudomonas* bacteria and phosphorous fertilization, affecting wheat (*Triticum aestivum* L.) yield and P uptake under greenhouse and field conditions. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33 (1): 145-152.
- Zhang, F., Dasthi, N., Hynes, R.K., Smith, D.L. (1996): Plant growth promoting rhizobacteria and Soybean *Glycine max* (L.) Merr. C Nodulation and nitrogen fixation at suboptimal root zone temperatures. *Ann. Bot.*, 77: 453-459.

**(Received: 15. 04. 2013.)**

**(Accepted: 22.05. 2013.)**

## POBOLJŠANJE RASTA LUCERKE, *MEDICAGO SATIVA* L. POMOĆU INOKULACIJE PREDUSEVA RIZOSFERNIM BAKTERIJAMA

DUŠICA DELIĆ<sup>1</sup>, OLIVERA STAJKOVIĆ-SRBINOVIĆ<sup>1</sup>, SVETLANA ŽIVKOVIĆ<sup>2</sup>, NADA PROTIĆ<sup>3</sup>,  
NATAŠA RASULIĆ<sup>1</sup>, ĐORĐE KUZMANOVIĆ<sup>1</sup>, ALEKSANDAR SIMIĆ<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Institut za zemljište, Beograd

<sup>2</sup>Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Beograd

<sup>3</sup>EKO-LAB, Padinska Skela, Beograd

<sup>4</sup>Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Beograd  
e-mail: vukmirdusica@yahoo.com

### REZIME

U eksperimentu u sudovima ispitana je mogućnost poboljšanja rasta lucerke (*Medicago sativa* L.) pomoću inokulacije ječma (*Hordeum vulgare* L.) kao preduseva bakterijama koje poboljšavaju rast biljaka (PGPR). Cilj eksperimenta je bio odabiranje efikasnih sojeva koji bi se primenili u plodoredu u formi biološkog đubriva. U radu je korišćeno sedam sojeva koji pripadaju sledećim bakterijskim vrstama: *Sinorhizobium meliloti*, *Bacillus megaterium*, *Enterobacter* sp, *Azotobacter* sp, kao i vrsti *Pseudomonas* sp. Efekat inokulacije ječma primenjenim sojevima je određen na osnovu suve nadzemne mase (SDW) i sadržaja ukupnog azota (N) u biljnoj masi lucerke. Rezultati su ukazali na sposobnost nekih sojeva da poboljšaju rast biljaka. Značajno je povećan prinos lucerke u odnosu na kontrolu Ø (lucerka gajena posle neinokulisanog ječma kao preduseva) inokulacijom sojevima *Azotobacter*-a A1 (41%) i A2 (39%) i *Pseudomonas*-a P1 (35%). Sadržaj ukupnog N je bio u korelaciji sa vrednostima SDW. Rezultati su ukazali na uticaj inokulacije ječma kao preduseva na prinos lucerke i njen kvalitet kao i da sojevi *Azotobacter* sp., *Pseudomonas* sp. i *Enterobacter* sp. imaju PGPR potencijal što daje osnovu za dalja ispitivanja i mogućnost primene kao bio-đubriva.

**Ključne reči:** lucerka, poboljšanje rasta biljaka, inokulacija, predusev, ječam

(Primljeno: 15. 04. 2013.)

(Prihvaćeno: 22.05. 2013.)

## MIKROBIOLOŠKE OSOBINE DISTRIČNIH KAMBISOLA NA PODRUČJU ISTOČNE SRBIJE U ZAVISNOSTI OD NAČINA KORIŠĆENJA

NATAŠA RASULIĆ<sup>1</sup>, DUŠICA DELIĆ<sup>1</sup>, OLIVERA STAJKOVIĆ-SRBINOVIĆ<sup>1</sup>, DRAGANA JOŠIĆ<sup>1</sup>,  
NENAD DOLOVAC<sup>2</sup>, ĐORĐE KUZMANOVIĆ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut za zemljište, Beograd

<sup>2</sup>Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Beograd

### REZIME

Jedan od najzastupljenijih tipova zemljišta u brdsko-planinskom području istočne Srbije je distrični kambisol. U cilju utvrđivanja biogenosti ovog tipa zemljišta u istočnoj Srbiji, ispitana je zastupljenost ukupne mikroflore, gljivica, aktinomiceta, amonifikatora, azotobakteria i oligonitrofila, kao i dehidrogenazna aktivnost navedenog tipa zemljišta. Uzorci su uzeti iz zemljišta korišćenih na tri različita načina, a to su oranice, voćnjaci i šume. Korišćene su standardne mikrobiološke metode zasejavanja određenog decimalnog razređenja na odgovarajuće hranjive podloge. Dobijeni rezultati su pokazali najveću zastupljenost ukupne mikroflore u oraničnom zemljištu. Nije ustanovljena korelacija između broja ostalih grupa mikroorganizama i načina korišćenja zemljišta. Utvrđena je mala zastupljenost azotobakteria, kao indikatora plodnosti zemljišta, u lokalitetima pod šumom. Nije konstatovana korelacija dehidrogenazne aktivnosti analiziranih uzoraka sa ukupnim brojem mikroorganizama.

**Cljučne reči:** biogenost, distrični kambisoli, mikroflora

### UVOD

Mikroorganizmi su najznačajnija biološka komponenta zemljišta jer svojim enzimatskim sistemima aktivno učestvuju u procesima razgradnje organske materije, sintezi humusa i stvaranju pristupačnih biljnih asimilativa, (Milošević i sar., 2003). Tolerantnost mikroorganizama na pesticide i teške metale omogućava da se pojedini rodovi i vrste koriste u bioremedijaciji zemljišta. Pored toga, u rizijskoj sferi žive bakterije koje koloniziraju koren biljaka i pospešuju biljni rast (PGPR) tako što sintetišu određene supstance korisne za biljke (Glick, 1995), olakšavaju usvajanje određenih hraniva iz zemljišta (Zahir et al. 2004, Cakmakci et al., 2006) i štite biljke od bolesti. Brojnost pojedinih grupa mikroorganizama i aktivnost dehidrogenaze se koriste kao jedan od

pokazatelja opšte mikrobiološke aktivnosti i potencijalne plodnosti zemljišta. Mala brojnost pojedinih grupa mikroorganizama (npr. azotofiksatora) kao i mala vrednost dehidrogenazne aktivnosti upućuju na smanjenu biogenost, odnosno plodnost zemljišta, (Milošević, 2008). Svaki tip zemljišta ima svoju karakterističnu mikrobiocenu, a način korišćenja zemljišta može uticati pozitivno ili negativno na mikrobiološku aktivnost, što se neposredno odražava i na plodnost zemljišta, (Tintor i sar., 2009).

Termin distrični kambisoli se odnosi na zemljišta sa niskim stepenom zasićenosti bazama (Antić i sar., 1990). Rasprostranjena su u brdsko-planinskom području istočne Srbije, na nadmorskoj visini od 500 do 1100m. Pretežno su lakog mehaničkog sastava, lako propusna za vodu i sa većim sadržajem humusa i ukupnog azota, (Kašanin et Knežević, 2004). Utvrđeno je da su fizičko-hemij-

ske karakteristike zemljišta najvažnije svojstvo koje utiče na broj i aktivnost mikroorganizama, (Milošević i sar., 1997, Marinković i sar., 2007). Distrični kambisoli se odlikuju izraženim aciditetom i niskim stepenom zasićenosti bazama što se može negativno odraziti na biogenost, a time i plodnost ovog tipa zemljišta. Za ocenu biogenosti ovih zemljišta ispitana je njihova biološka aktivnost u zavisnosti od načina korišćenja (oranice, šume i voćnjaci). U tom cilju je određena zastupljenost različitih grupa mikroorganizama, kao i njihova dehidrogenazna aktivnost.

## MATERIJAL I METODE

Brojnost i enzimatska aktivnost mikroorganizama su najveći u površinskom sloju zemljišta zbog čega su uzorci zemljišta sa odabranih 29 lokaliteta za mikrobiološke analize uzeti aseptično sa dubine od 0-25cm. U pripremljenim uzorcima su izvršene sledeće agrohemijske analize: pH u nKCl elektrometrijskom metodom, sadržaj humusa i lako pristupačni oblici fosfora i kalijuma Al metodom.

Osnovni parametri za ocenu biogenosti zemljišta su bili: ukupna mikroflora, ukupan broj gljivica, aktinomiceta, amonifikatora, azotobaktera, oligonitrofila, kao i dehidrogenazna aktivnost zemljišta. Brojnost mikroorganizama je utvrđena standardnim mikrobiološkim metodama zasejavanja određene količine suspenzije zemljišta na odgovarajuće hranljive podloge korišćenjem decimalnih razređenja ( $10^{-1}$ - $10^{-8}$ ), (Pochon et Tardieux, 1962). Brojnost ukupne mikroflore je određena na agarizovanom zemljišnom ekstraktu, gljivica na podlozi Chapek, aktinomiceta na sintetičkom agaru sa saharozom po Krasiljnikovu, amonifikatora na tečnoj podlozi sa asparaginom kao izvorom azota, azotobaktera na tečnoj bezazotnoj podlozi sa manitom i oligonitrofila na podlozi po Fjodorovu. Dehidrogenazna aktivnost zemljišta je određena po metodi Lenhard-a (1956), modifikovana po Thalmann-u 1968, koja se bazira na merenju ekstincije trifenolformazana (TPF) koji je nastao redukcijom 2,3,5-trifeniltetrazolijumhlorida.

## REZULTATI I DISKUSIJA

U tabeli 1 date su osnovne hemijske osobine ispitivanih zemljišta. Na osnovu određene pH vrednosti, može se reći da se ispitivana zemljišta odlikuju izraženim aciditetom, što se poklapa sa literaturnim

podacima, (Antić i sar., 1990), a što se može negativno odraziti na brojnost i enzimatsku aktivnost zemljišnih mikroorganizama. Naime, vrednost pH zemljišta direktno utiče na mobilnost hranljivih elemenata, tj. uslovljava njihovu pristupačnost za biljke, ali isto tako uslovljava sastav mikrobne populacije zemljišta, (Tintor i sar., 2009). Najveću kiselost su pokazala zemljišta pod šumskom vegetacijom tj. bila su uglavnom jako kisela, dok su zemljišta pod oranicama i voćnjacima bila nešto blaže kiselosti, odnosno u većini slučajeva su bila kisela i slabo kisela. Što se tiče sadržaja organske materije, može se reći da su ispitivana zemljišta pokazala visok sadržaj humusa, što je od velikog značaja jer je organska materija izvor energije za metabolizam zemljišnih mikroorganizama. Naročito su šumska zemljišta i voćnjaci pokazali visok sadržaj humusa, dok su oranice bile slabije humozne, verovatno usled stalnog iznošenja organske materije putem žetve, što nije slučaj sa šumama i voćnjacima. Snabdevenost ispitivanih zemljišta lako pristupačnim fosforom je bila nezadovoljavajuća, naročito šumskih zemljišta, dok su oranice i voćnjaci pokazali veći sadržaj ovog elementa, verovatno usled unošenja fosfora putem đubrenja. Sva ispitivana zemljišta su bila dobro obezbeđena lako pristupačnim kalijumom, osim jednog lokaliteta pod šumom i jednog lokaliteta oranice.

Brojnost mikroorganizama i dehidrogenazna aktivnost, koje ukazuju na stepen biogenosti ispitivanog zemljišta, (Milošević i sar., 1992) prikazane su u tabeli 2. Ukupan broj mikroorganizama u ispitivanim oraničnim zemljištima je varirao od  $3,00-82,33 \cdot 10^6 \cdot g^{-1}$ , u voćnjacima od  $8,33-18,67 \cdot 10^6 \cdot g^{-1}$ , a u uzorcima šumskih zemljišta od  $1,33-10,33 \cdot 10^6 \cdot g^{-1}$ . Najveći ukupan broj mikroorganizama je konstatovan u oranicama, zatim u voćnjacima, a najmanji u zemljištima pod šumskom vegetacijom, što se može pripisati povoljnom uticaju primenjenih agrotehničkih mera na biogenost zemljišta.

Gljivice su pokazale neujednačenu zastupljenost u ispitivanim uzorcima, što znači da njihova brojnost nije zavisila od načina korišćenja zemljišta. U uzorcima oranica njihov broj se kretao od  $2,67-18,67 \cdot 10^4 \cdot g^{-1}$ , u voćnjacima od  $10,67-20,67 \cdot 10^4 \cdot g^{-1}$ , dok je njihova brojnost najviše varirala u uzorcima šumskog zemljišta i kretala se od  $3,33-22,67 \cdot 10^4 \cdot g^{-1}$ , što ujedno predstavlja i najveći broj ovih značajnih razlagača organske materije u zemljištu.

Broj aktinomiceta u ispitivanim oranicama je varirao od  $2,33-59,00 \cdot 10^4 \cdot g^{-1}$ , u voćnjacima od  $3,00-25,67 \cdot 10^4 \cdot g^{-1}$ , dok se u šumskim zemljištima kretao od  $0-28,33 \cdot 10^4 \cdot g^{-1}$ . Najveću ujednačenost broja aktinomiceta su pokazali uzorci iz voćnjaka kod kojih je zabeležen i najveći broj ovih značajnih humifikatora (uzorak br. 3).

Amonifikatori, kao korisnici organskog azota i razlagači proteina, su jedna od najzastupljenijih grupa mikroorganizama u zemljištu, (Bogdanović, 1990). Njihova brojnost u zemljištima tipa černoze ma može da dostigne vrednosti od  $10^7$ - $10^9$ ·g<sup>-1</sup>, (Govedarica i sar., 2000). U ispitivanim uzorcima oranica njihov broj se kretao od 1,50-250,00·10<sup>5</sup>·g<sup>-1</sup>, a u voćnjacima od 4,50-110,00·10<sup>5</sup>·g<sup>-1</sup>. Uzorci šumskih zemljišta su pokazali najmanju zastupljenost amonifikatora koja je varirala od 0-250,00·10<sup>5</sup>·g<sup>-1</sup>.

Azotobakter, kao indikator plodnosti zemljišta i najjači asocijativni fiksator atmosferskog azota, je pokazao slabu zastupljenost u ispitivanim uzorcima oranica i voćnjaka, dok je u šumskim zemljištima na devet od deset lokaliteta utvrđeno njegovo potpuno odsustvo. Izuzetak je lokalitet oranice (uzo-

rak br. 1) gde je zabeležen broj od 250·g<sup>-1</sup>. Prema literaturnim podacima azotobakter u oranicama može da dostigne brojnost od 10<sup>3</sup>·g<sup>-1</sup>, (Vojinović i sar., 1982; Govedarica i sar., 1996; Jarak i sar., 2003), što navodi na zaključak da distrični kambisoli ne pružaju optimalne uslove za aktivnost ovog azotofiksatora, verovatno usled svojih nepovoljnih hemijskih osobina, a prvenstveno kisele reakcije i male snabdevenosti fosforom (Milošević i sar., 2007). Istraživanja su pokazala da su ovi parametri hemijskog svojstva zemljišta uticali na odsustvo azotobaktera.

Oligonitrofilni, kao fiksatori atmosferskog azota za zadovoljenje sopstvenih potreba i snabdevači biljaka pristupačnim oblicima azota, (Bogdanović, 1990), su predstavljali dominantnu fiziološku grupu mikroorganizama u ispitivanim uzorcima.

**Tabela 1.** Osnovne hemijske osobine ispitivanog zemljišta.  
**Table 1.** Main chemical properties of investigated soil.

Način korišćenja zemljišta A way of using soil	Oznaka uzorka Sign of sample	pH	Humus %	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> mg/100g	K <sub>2</sub> O mg/100g
Oranica Arable land	1	6,00	5,20	21,72	40,00
	2	3,90	4,75	7,15	17,60
	3	4,50	3,21	6,86	23,60
	4	3,95	4,90	11,50	40,00
	5	4,90	7,19	4,79	24,40
	6	4,65	2,61	1,36	34,60
	7	5,90	3,71	11,41	18,80
	8	6,85	4,56	17,03	11,00
	9	4,25	3,17	3,63	16,00
	10	6,35	3,17	13,19	32,00
	11	4,15	3,79	5,39	20,00
	12	5,65	7,64	8,27	22,60
	13	5,75	3,45	2,56	20,00
Šuma Forest	1	4,10	5,05	2,58	18,60
	2	3,80	4,81	4,56	30,40
	3	4,50	6,22	7,06	19,00
	4	3,60	4,54	4,61	16,80
	5	3,20	4,89	3,68	23,40
	6	3,45	6,90	2,09	17,60
	7	4,95	3,50	4,65	25,00
	8	3,55	4,79	21,66	27,40
	9	5,10	5,05	4,32	40,00
	10	4,30	2,46	3,34	8,80
Voćnjak Orchard	1	4,30	7,68	3,66	27,50
	2	5,00	5,88	6,57	16,00
	3	4,30	4,69	1,00	27,00
	4	5,20	5,58	2,85	20,00
	5	5,15	4,95	18,49	24,40
	6	6,30	7,37	13,16	40,00

Njihova zastupljenost u ispitivanim oranicama je varirala od  $21,67-121,00 \cdot 10^5 \cdot g^{-1}$ , u voćnjacima od  $31,67-72,00 \cdot 10^5 \cdot g^{-1}$ , a u uzorcima šumskih zemljišta je bila najmanja i kretala se od  $0,67-55,33 \cdot 10^5 \cdot g^{-1}$ . I ovde je najveći broj pokazao lokalitet voćnjaka (uzorak br.10).

Utvrđivanje aktivnosti enzima koji učestvuju u mineralizaciji organske materije u zemljištu je

pokazatelj biološke aktivnosti zemljišta, (Najdenovska i sar., 2004). Jedan od tih enzima je oksidoredukujući enzim dehidrogenaza. Dehidrogenazna aktivnost ispitivanih oranica se kretala od  $4,23-286,52 \mu g$  TPF/g, voćnjaka od  $7,62-273,62 \mu g$  TPF/g, a šumskih lokaliteta od  $3,06-214,58 \mu g$  TPF/g i nije bila u korelaciji sa brojem ispitivanih grupa mikroorganizama.

**Tabela 2.** Broj mikroorganizama po gramu apsolutno suvog zemljišta i dehidrogenazna aktivnost.  
**Table 2.** Number of microorganisms per gram of absolute dry soil and dehydrogenase activity

Način korišćenja zemljišta A way of using soil	Oznaka uzorka Sign of sample	Ukupna mikroflora ( $\times 10^6$ ) Total microflora ( $\times 10^6$ )	Gljive ( $\times 10^4$ ) Fungi ( $\times 10^4$ )	Aktinomicete ( $\times 10^4$ ) Actinomycetes ( $\times 10^4$ )	Oligonitrofil ( $\times 10^5$ ) Oligonitrophiles ( $\times 10^5$ )	Amonifikatori ( $\times 10^5$ ) Ammonifiers ( $\times 10^5$ )	Azotobakter MPN Azotobacter MPN	Dehidrogenaza ( $\mu g$ TPF/g) Dehydrogenase activity ( $\mu g$ TPF/g)
Oranica Arable land	1	19,33	13,33	59,00	97,00	45,00	250,00	150,67
	2	7,00	14,00	17,00	21,67	9,50	0	12,95
	3	8,67	6,00	5,33	39,67	250,00	0	279,78
	4	3,00	6,33	6,00	31,00	2,50	25	4,23
	5	82,33	13,00	8,33	92,67	25,00	4	127,64
	6	4,00	11,33	2,67	51,67	1,50	4	13,11
	7	14,67	7,67	25,67	28,67	9,50	25	14,48
	8	20,67	7,67	16,33	87,33	15,00	45	42,90
	9	43,33	15,33	2,33	25,00	0,90	0	286,52
	10	6,67	18,67	22,00	121,00	2,50	25	194,60
	11	41,67	2,67	3,00	26,33	20,00	9	15,40
	12	23,00	10,33	12,00	64,67	25,00	7	87,49
	13	7,00	7,33	4,33	27,33	9,50	7	16,93
Šuma Forest	1	7,67	22,67	32,33	24,67	25,00	0	100,8
	2	7,33	19,00	12,67	40,33	9,50	4	167,12
	3	10,33	3,33	7,00	55,33	250,00	0	97,50
	4	6,00	18,67	28,33	32,33	25,00	0	44,55
	5	3,00	20,33	6,67	13,33	9,50	0	3,06
	6	1,33	2,00	4,33	7,67	25,00	0	7,95
	7	5,00	6,67	14,00	30,67	2,50	0	214,58
	8	8,67	8,67	2,33	22,00	45,00	0	4,10
	9	6,00	7,33	6,67	28,33	7,50	0	76,84
	10	2,33	14,00	5,00	11,67	2,00	4	171,13
Voćnjak Orchard	1	8,67	6,67	6,67	56,67	9,50	4	175,73
	2	12,67	3,67	3,67	62,67	4,50	0	99,17
	3	8,33	3,67	3,67	72,00	11,50	0	51,69
	4	18,67	25,67	25,67	58,33	9,50	95	7,62
	5	13,00	14,00	14,00	63,00	15,00	0	137,56
	6	11,00	3,00	3,00	31,67	110,00	4	273,62



## ZAKLJUČAK

Distrični kambisoli na području istočne Srbije nisu pokazali veliku biogenost, što se može pripisati uglavnom nepovoljnim hemijskim osobinama ovog tipa zemljišta, a prevashodno kiseloj reakciji. Brojnost ukupne mikroflore je bila najveća u oranicama, dok zastupljenost aktinomiceta, amonifi-

katora, azotobaktera i oligonitrofila nije zavisila od načina korišćenja zemljišta. Kao što je i očekivano, gljivice su bile najbrojnije u lokalitetima pod šumom. U istim lokalitetima je zastupljenost azotobaktera bila najmanja, odnosno kod najvećeg broja uzoraka nije zabeleženo njegovo prisustvo. Dehidrogenazna aktivnost nije bila u korelaciji sa brojnošću mikroorganizama.

## ZAHVALNICA

Rad je realizovan u okviru Projekata Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, TR-37006 i III 46007.

## LITERATURA

Antić, M., Jović, N., Avdalović, V. (1990): Pedologija, Naučna knjiga, Beograd.

Bogdanović, V. (1990): Zastupljenost mikroorganizama u deponiji pepela. Zemljište i biljka, 39 (2): 139-145.

Cakmakci, R.I., Aydin, D.F., Sachin, A.F. (2006): Growth promotion of plants by plant growth-promoting rhizobacteria under greenhouse and two different field soil conditions. Soil Biol. And Biochem. 38: 1482-1487.

Glick, B.R. (1995): The enhancement of plant growth by free living bacteria, Can. J. Microbiol. 41:109-117.

Govedarica, M., Milošević, N., Jarak, M., Ubavić, M., Radanović, Z. (1996): The effect of farthworm and green manure on the microbiological activity in wheat. Zemljište i biljka, 45, (2): 121-126.

Govedarica, M., Milošević, N., Jarak, M., Đurić, S., Milošević, D., Konstatinović, B. (2000): Uticaj herbicida na mikrobiološku aktivnost u zemljištu pod usevom pšenice. EKO-konferencija 2000. Zdravstveno bezbedna hrana, Tematski zbornik, II: 25-30.

Jarak, M., Belić, M., Govedarica, M., Milošević, N., Đurić, S. (2003): Effect of phosphogypsum and peat on microbiological and chemical properties of arenosol. Zemljište i biljka, 52, (1-3): 1-6.

Kašanin, O., Knežević, M. (2004): Osobine i proizvodni potencijal distričnog smeđeg zemljišta na crvenom peščaru u bukovim šumama GJ „Čestobrodica“, Glasnik Šumarskog fakultet, Beograd, 89: 147-153.

Marinković, J., Milošević, N., Tintor, B., Vasin, J (2007): Zastupljenost pojedinih grupa mikroorganizama na različitim tipovima zemljišta, Zbornik radova Instituta za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad, 43: 319-328.

Marinković, J., Milošević, N., Tintor, B., Sekulić, P., Nešić, LJ. (2008): Mikrobiološka svojstva fluvisola na različitim lokalitetima u okolini Novog Sada, Zbornik radova Instituta za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad, vol.45, br 2: 215-223.

Milošević, N., S.Redžepović, M. Govedarica i M. Jarak (1992): Activity of dehydrogenase and cellulolytic enzymes in some hydromorphic soils. Zemljište i biljka, Vol. 41, N°3: 159-170.

Milošević, N., M. Ubavić, M. Čuvarđić i S. Vojin (1997): Mikrobi zemljišta: značaj i mogućnosti. Unapređenje, korišćenje i očuvanje zemljišta. Jugoslovensko društvo za proučavanje zemljišta, Novi Sad: 389-397.

Milošević, N., M. Ubavić, M. Čuvarđić i S. Vojin (2003): Mikrobi-značajno svojstvo za karakterizaciju plodnosti poljoprivrednog zemljišta. Agroznanje, poljoprivredni naučno stručni i informativni časopis, Banja Luka, God IV, N°2: 81-88.

Milošević, N., Govedarica, M., Ubavić, Hadžić, V. i Nešić, Lj (2003): Mikrobiološke karakteristike zemljišta: osnova za kontrolu plodnosti, Zbornik radova Instituta za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad, 39: 101-107.

Milošević, N., Tintor, B., Dozet, D. i Cvijanović, G (2007): Mikrobiološka svojstva zemljišta prirodnih travnjaka, Zbornik radova Instituta za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad, 44: 541-546.

Milošević, N. (2008): Mikroorganizmi-bioindikator zdravlja/kvaliteta zemljišta, Zbornik radova Instituta za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad, 45: 505-515.

Najdenovska, O., S. Đorđević i T. Mitkova (2004): Overall heavy metal content and biochemical activity in the soil planted with potato. Zemljište i biljka, Vol. 53, N° 3: 191-196.

Pochon et Tardieux (1962): Tehnikues d'analyse en microbiologique du Soil edit de la tourel, Paris.

Thalman, A. (1968): Zur Methodil des Bestimmung der Dehydrogenase Activat in Boden Mittles Tripheyltetrazoliumchlorid TTC, London Forch 21: 249-258.

Tintor, B., N. Milošević i J. Vasin (2009): Mikrobiološka svojstva černozema južne Bačke u zavisnosti od načina korišćenja zemljišta, Zbornik radova Instituta za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad, vol.46, br 1: 189-198.

Vojinović, Ž., R. Milošević, M. Peno, N. Veselinović i B. Miličić (1982): Stanje mikrobiocenoza u zemljištima oštećenim poplavnim vodama Timoka. Zemljište i biljka, Vol. 31, N° 3: 307-313.

Zahir, ZA, Arshad, M, Frankenberger WT (2004): Plant growth promoting rhizobia: applications and perspectives in agriculture. Adv. Agron.,81: 97-168.

**(Primljeno: 29. 03. 2013.)**

**(Prihvaćeno: 24. 04. 2013.)**

## MICROBIOLOGICAL PROPERTIES OF DYSTRIC CAMBISOLS IN REGION OF EASTERN SERBIA DEPENDING ON EXPLOITATION WAY

NATAŠA RASULIĆ<sup>1</sup>, DUŠICA DELIĆ<sup>1</sup>, OLIVERA STAJKOVIĆ-SRBINOVIĆ<sup>1</sup>, DRAGANA JOŠIĆ<sup>1</sup>,  
NENAD DOLOVAC<sup>2</sup>, ĐORĐE KUZMANOVIĆ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Soil Science, Belgrade*

<sup>2</sup>*Institute for Plant Protection and Environment, Belgrade*

### SUMMARY

One of the most represented types of soil in the hilly- mountainous region of Eastern Serbia is the dystric cambisol. Aiming to establish biogenity of such type of soil in Eastern Serbia, representation of the total microflora, fungi, actinomycetes, ammonifiers, azotobacters and oligonitrofills has been examined as well as dehydrogenase activity of the stated type of soil. The samples were taken from soils used in three different ways: plough-fields, orchards and forests. The standard microbiological methods of introducing in certain decimal dilutions on the appropriate nutritive medium were used. The obtained results have shown the most prevalence of total microflora in the plough-fields. No correlation between other groups of microorganisms and the way of using of soil was determined. Small participation of azotobacters, as crop production indicators, was found in the forest regions. No correlation between dehydrogenase activity of tested samples and total microflora was determined.

**Key words:** biogenity, dystric cambisol, microflora

*(Received: 29. 03. 2013.)*

*(Accepted: 24. 04. 2013.)*

## UPUTSTVO AUTORIMA

Časopis "Zaštita bilja" objavljuje naučne radove, pregledne radove i prethodna saopštenja iz oblasti zaštite bilja. Radovi se štampaju na srpskom ili engleskom jeziku. Uz radove na engleskom jeziku štampa se i rezime na srpskom jeziku. Rukopis otkucan sa duplim proredom sadrži: zaglavlje, naslov, imena autora i adrese, rezime, ključne reči, tekst rada (sa poglavljima: uvod, materijal i metode, rezultati, diskusija, zahvalnica, literatura i rezime sa ključnim rečima), tabele i grafikone, fotografije i crteže.

**ZAGLAVLJE** – u gornjem, desnom uglu upisuje se kategorizacija rada. **NASLOV** – pisan velikim slovima (bold) treba da bude kratak, jasan, bez skraćenica. Ne navoditi istovremeno ime vrste na srpskom i na latinskom jeziku. **APSTRAKT** – treba da sadrži najviše 200 reči teksta. **KLJUČNE REČI** – treba navesti do 6 ključnih reči. **TEKST** – treba da sadrži poglavlja: UVOD, MATERIJAL I METODE, REZULTATI, DISKUSIJA, LITERATURA i REZIME ( na srpskom i engleskom jeziku istog sadržaja) sa ključnim rečima. LITERATURA se navodi na posebnoj stranici, po abecednom redu. Npr. Arsenijević, M., Draganić M., Knežević Tatjana (1996): Vrste nekadašnjeg roda *Helminthosporium* utvrđene u Jugoslaviji (1992-1995). Zaštita bilja, 216: 93-119. Citat iz knjige navesti prema primeru: Dhingra O. D., Sinclair, J. B. (1955): Basic Plant Pathology Methods. CCR Press Inc., Baco Raton, pp. 355-360. U tekstu, na kraju citata, navesti autore na sledeći način: (Matijević 1994; Stojanović i Borić, 1990; Manojlović i sar., 1998). REZIME sa ključnim rečima treba da je na engleskom i srpskom i daje se na posebnim stranicama na kraju teksta i treba da sadrži ime autora i naziv ustanove.

Naslov poglavlja u radu (prvi nivo naslova) pisati centrirano, velikim slovima, boldovano.

Podnaslov (drugi nivo naslova) pisati centrirano, prvo slovo veliko, ostala slova mala, boldovano, sa jednim redom razmaka od teksta na koji se odnosi.

Podnaslov (treći nivo naslova) pisati od početka reda, prvo slovo veliko, ostala slova mala. Pisati zakošeno (italik), sa jednim redom razmaka od teksta na koji se odnosi.

Podnaslov (četvrti nivo naslova) pisati na početku reda zakošenim slovima (italik), s tim da je sastavni deo teksta na početku reda i od njega odvojen crticom.

**TABELE I GRAFIKONI** – Tabele i grafikoni se daju na posebnim stranicama. U rukopisu označiti mesto za tabele i grafikone. Naslove tabela i grafikona obavezno dati prvo na srpskom, pa na engleskom jeziku, a ako je rukopis na engleskom, onda prvo navesti engleski, pa srpski tekst naslova.

**FOTOGRAFIJE I CRTEŽI** – Fotografije i crteži treba da su kontrastni i oštri. Na poledini fotografija i crteža grafitnom olovkom označiti njihov broj, ime autora i skraćeni naslov rada. Pri tome, na posebnim stranicama priložiti pune naslove na srpskom i engleskom jeziku, uz podatke o imenu autora i naslovu rada.

### Ostale napomene

Radovi se recenziraju. Na zahtev urednika, redakciji časopisa dostaviti rad na disketi sa upisanim imenom autora i naziv fajla. Radovi se mogu dostaviti poštom na adresu Teodora Dražera 9, 11040 Beograd, ili putem e-mail adrese glavnog urednika časopisa: ndolovac@yahoo.com. Rukopis pripremiti u MS Word for Windows (.doc) ili Rich Text Formatu (.rtf). Pored toga, dostaviti dva primerka rukopisa. Merne jedinice izražavati u Internacionalnom sistemu jedinica (SI). Stranice u tekstu obavezno obeležiti brojevima, a rukopis, ovako pripremljen za štampu, slati Redakciji časopisa, uz propratno pismo autora. Treba napisati i skraćenu verziju naslova rada radi njegovog upisivanja na neparnim stranicama. Poštujući gore navedena pravila ubrzate objavljivanje svog rada i doprineti kvalitetu časopisa.

## INSTRUCTION TO AUTHORS

The "Plant Protection" publishes scientific papers, review papers and scientific notes from plant protection field. The papers are printed in Serbian or English.

A manuscript, double-spaced printed, contains: chapter, title, the name of an author and addresses, abstract, key words, text (including the chapters: introduction, material and methods, results, discussion, acknowledgements, references and summary followed by key words), tables and graphs, photographs and drawings.

**CHAPTER** – the top, right-hand corner is reserved for categorization of the paper.

**TITLE** – in capital letters (bold) ought to be short, clear, without abbreviations. It is desirable to use the name of species either in Serbian or in Latin.

**ABSTRACT** – should contain most 200 words of the text. **KEY WORDS** – there must be up to 6 key words. **TEXT** – ought to be divided into the following chapters: INTRODUCTION, MATERIAL AND METHODS, RESULTS, DISCUSSION, REFERENCES and SUMMARY (in English and Serbian of the same contents) followed by key words. **REFERENCES** – is quoted on the separate sheet of paper in alphabetical order. Follow the example bellow: Arsenijević, M., Draganić, M., Knežević Tatjana (1996): Cultivars of the former gender *Helminthosporium* determined in Yugoslavia (1922-1955). *Plant Protection*, 216: 93 – 119. A quotation originated from a book should follow the example bellow: Dhingra, O. D., Sinclair, J. B. (1955): *Basic Plant Pathology Methods*, CCR. Press Inc, Baco Raton, pp. 335 -360. In text, at the end of the quotation, the authors are to be quoted such as the example bellow: (Matijević, 1994; Stojanović and Borić, 1990; Manojlović et al., 1998). **SUMMARY**, followed by key words, should be in English and Serbian and given on the separate sheets of paper at the end of the text, containing the author's name and the name of the institution.

The title of chapter in paper (the first rank of title) should be centred and written in capital letters (bold).

Subchapter (the second rank of title) should be centered and written in first capital letter (bold), single-spaced from the text it refers to.

Subchapter (the third rank of title) should be written at the beginning of the line in first capital letter (italic), single-spaced from the text it refers to.

Subchapter (the fourth rank of title) should be written at the beginning of the line (italic), separated from the rest of the text by a hyphen.

**TABLES AND GRAPHS** – Tables and graphs should be given on the separate pages. In manuscript, a space for tables and graphs should be marked. The titles of the tables and graphs ought to be first in Serbian then in English, and if the script is in English, then English version comes first followed by Serbian name of the titles.

**PHOTOGRAPHS AND DRAWINGS** – Photographs and drawings should be clear and sharp. At the back of the photos and drawings, their number, the name of an author and shorten version of the paper should be marked by pencil. On the separate sheet of papers, full titles in Serbian and English should be added along with information about the author's name, and the title of the paper.

### **Additional notes**

The papers are reviewed. On the editor's request, the paper should be addressed to the Board on a diskette labeled with the name of the author and a file to Teodora Drajzera 9, 11040 Belgrade, or by e-mail: ndolovac@yahoo.com. A manuscript should be prepared in MS Word for Windows (.doc) or Rich Text Format (.rtf). In addition, two copies of the printed text should be sent to the Board. International System of Units (SI) is required. Pages of the text must be marked in numbers and the manuscript prepared for printing in this way should be sent to the Board with accompanying author's letter. The shorten version of the title of the paper is also required to be printed on odd pages.

Following the aforementioned rules, you will make publishing of your paper quicker and contribute to better quality of the journal.

*EDITORIAL Board for "Plant Protection"*

CIP – Katalogizacija u publikaciji  
Narodna biblioteka Srbije, Beograd

632.9

ZAŠTITA bilja = Plant protection / Institut za zaštitu bilja i  
životnu sredinu; glavni i odgovorni urednik Nenad Dolovac,  
God. 1, br. 1 (1950) – Beograd: Institut za zaštitu bilja i  
životnu sredinu, 1950 – (Beograd: Press d.o.o.). – 28 cm.

Tromesečno  
ISSN 0372-7866 = Zaštita bilja  
COBISS.SR-ID 870660



