

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



Alternaria petroselini: Nekrotične pege na veštački zaraženim biljkama peršuna (I. Stanković).

Alternaria petroselini: Necrotic spots on artificialy inoculated parsley plants (I. Stanković).

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
Dr Svetlana Živković, 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

- Ivana Stanković, Katarina Milojević, Ana Vučurović,
Dušan Nikolić, Branka Krstić, Aleksandra Bulajić*
PEGAVOST I SUŠENJE LISTA – ZNAČAJNA BOLEST PERŠUNA U SRBIJI.....146-154
- Ljiljana Radivojević, Jelena Gajić Umiljendić,
Dragana Marisavljević, Ana Anđelković, Danijela Pavlović*
PRIMENA MEZOTRIONA U KOMBINACIJI SA TERBUTILAZINOM,
NIKOSULFURONOM I S-METOLAHLOROM U KUKURUZU.....155-162
- Danijela Ristić, Milica Aćimović, Nenad Trkulja*
MOLEKULARNA IDENTIFIKACIJA IZOLATA *ALTERNARIA ALTERNATA*,
PATOGENA PLODOVA KIMA U SRBIJI.....163-169
- Hadi Waisi, Bogdan Nikolić, V. Jovanović, Sanja Đurović, Zoran Milićević*
UTICAJ DRUGIH ĐUBRIVA I SPECIJALNIH PROIZVODA NA HORTIKULTURNE BILJKE
2. PRINOS, POMOLOŠKE I BIOHEMIJSKE KARAKTERISTIKE PLODOVA JABUKA.....170-175
- ### Kratko saopštenje
- Veljko Gavrilović, Stefan Stošić, Miloš Stevanović*
PSEUDOMONAS SYRINGAE - PROUZROKOVAČ NEKROZE PLODOVA TREŠNJE.....176-180

CONTENTS

Scientific papers

- Ivana Stanković, Katarina Milojević, Ana Vučurović,
Dušan Nikolić, Branka Krstić, Aleksandra Bulajić*
BLACK LEAF SPOT – IMPORTANT DISEASE OF PARSLEY IN SERBIA.....146-154
- Ljiljana Radivojević, Jelena Gajić Umiljendić,
Dragana Marisavljević, Ana Anđelković, Danijela Pavlović*
THE APPLICATION OF MESOTRIONE IN COMBINATION WITH TERBUTHYLAZINE,
NICOSULFURON AND S-METOLACHLOR IN MAIZE.....155-162
- Danijela Ristić, Milica Aćimović, Nenad Trkulja*
MOLECULAR IDENTIFICATION OF *ALTERNARIA ALTERNATA*,
CARAWAY FRUITS PATHOGEN IN SERBIA.....163-169
- Hadi Waisi, Bogdan Nikolić, V. Jovanović, Sanja Đurović, Zoran Milićević*
THE IMPACT OF OTHER FERTILIZERS AND SPECIAL PRODUCTS
ON HORTYCULTURAL CROPS
2. YIELD, POMOLOGICAL AND BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS
OF APPLE FRUITS.....170-175
- ### Short communication
- Veljko Gavrilović, Stefan Stošić, Miloš Stevanović*
PSEUDOMONAS SYRINGAE - CAUSAL AGENT OF SWEET CHERRY FRUIT NECROSIS.....176-180

Zaštita bilja
Vol. 65 (4), N°290, 146-154, 2014, Beograd
Plant Protection
Vol. 65 (4), N°290, 146-154, 2014, Belgrade

UDK: 635.14-248.231(497.11)"2005/2014"
632.934:546.56
Naučni rad
Scientific paper

PEGAVOST I SUŠENJE LISTA – ZNAČAJNA BOLEST PERŠUNA U SRBIJI

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

Univerzitet u Beogradu-Poljoprivredni fakultet, Beograd
e-mail: aleksandrabulajic@yahoo.com

REZIME

U periodu od 2005. do 2014. godine, sakupljeno je 19 izolata *Alternaria petroselini* poreklom iz lista, korena i semena peršuna, kao i infestiranog zemljišta i analizirano na osnovu morfoloških, patogenih i molekularnih osobina. Svi izolati formirali su tamnosive kolonije na PDA i supstratno obrazovali mikrosklerocije, kao i obojene, elipsoidno okruglaste, feodiktiosporne konidije pojedinačno na kratkim konidioforama. Ispitujući patogenost i krug domaćina inokulacijom suspenzijom spora, svi ispitivani izolati ispoljili su patogenost za peršun, paštrnak, celer i korijander, slabu patogenost za mrkvu, morač i anis, a nisu bili infektivni za crni luk, kupus, papriku, paradajz i krastavac. Molekularna detekcija korišćenjem prajmera specifičnih za detekciju *A. radicina* nije uspela da napravi razliku između izolata dve srodne, ali različite vrste, *A. radicina* i *A. petroselini*. Dalja karakterizacija izolata *A. petroselini* poreklom iz Srbije, obavljena je sekvenciranjem različitih genskih segmenata uključujući ITS rDNK, kao i Alt a1 i EF1a gene. BLAST analiza pokazala je da su sekvence Alt a1 i EF1a gena najpouzdanije za razlikovanje *A. petroselini* od drugih blisko srodnih vrsta (25-27 odnosno 10-12 nukleotida razlike od izolata *A. radicina*). Sekvence ITS rDNK regiona bile su korisne, ali ne i potpuno informativne za identifikaciju izolata *A. petroselini*.

Ključne reči: *Alternaria petroselini*, morfološka identifikacija, sekvenciranje, ITS rDNK, Alt a1, EF1a

UVOD

Peršun (*Petroselinum crispum* (Mill.) Nym.) je dvogodišnja biljka iz familije Apiaceae koja se uglavnom gaji kao jednogodišnja zbog zadebljalog korena ili lišća i najčešće koristi kao začim, sveža ili osušena. Osim toga, osušeni koren, esencijalna ulja i ekstrakt peršuna imaju široku primenu u narodnoj medicini kao sredstvo protiv nadimanja, diuretik i za izlučivanje štetnih materija iz organizma.

Brojni patogeni kao što su *Septoria petroselini*, *Rhizoctonia solani*, *Erysiphe heraclei*, *Cercospora* spp., *Puccinia* spp. i drugi mogu da ugroze proizvodnju peršuna (Minchinton et al., 2006). Ipak, različite vrste iz roda *Alternaria*, među kojima su *A. petroselini* (Neergaard) E.G.Simmons, *A. smyrnii* (Crouan) E.G.Simmons i *A. selini* E.G.Sim-

mons, smatraju se najznačajnijim u proizvodnji peršuna u mnogim regionima gajenja. *A. petroselini* prouzrokuje pegavost i sušenja lista peršuna je najrasprostranjenija, i često ekonomski najznačajnija (Minchinton et al., 2006). Početni simptomi oboljenja uočavaju se u vidu sitnih, tamnih, nekrotičnih pega na listovima i lisnoj peteljci i to prvo na starijim, a kasnije na skoro svim listovima. Usled razvoja bolesti pege se šire i međusobno spajaju i mogu zahvatiti veći deo lista koji žuti i propada. U slučaju visokog intenziteta oboljenja može doći i do potpune defolijacije. Iako su mlade tek iznikle biljke i starije lišće osetljiviji, do infekcije može doći u svim fazama razvoja peršuna. Razvoju bolesti pogoduje toplo i kišovito vreme, dok se spore najefikasnije prenose vetrom.

A. petroselini održava se i širi zaraženim se-

menom (Pryor, 2002; Bulajić et al., 2009). Pored toga, može zadržati vitalnost duži vremenski period i u biljnim ostacima u zemljištu. *A. petroselini* ima uzak krug domaćina koji pored peršuna uključuje samo još nekoliko vrsta iz familije Apiaceae, kao što su pastrnak, celer i morač (Pryor, 2002). Njeno prisustvo zabeleženo je na peršunu u Australiji (Cunnington et al., 2006), Japanu (Nishikawa and Nakashima, 2013), Velikoj Britaniji (Jones and Baker, 2007) i Srbiji (Bulajić i sar., 2005), na moraču u Holandiji (Pryor and Asma, 2007), Italiji (Infantino et al., 2009) i Španiji (Bassimba et al., 2012) i na *Carya cathayensis* u Kini (Liu et al., 2013).

A. petroselini pripada *radicina* grupi roda *Alternaria* zajedno sa još nekoliko srodnih vrsta uključujući tipične predstavnike grupe *A. radicina* i *A. carotiincultae* patogene uglavnom za mrkvu. Velika sličnost i preklapanje morfoloških i patogenih karakteristika izolata različitih vrsta otežavaju pravilnu identifikaciju (Pryor and Gilbertson, 2002; Farrar et al., 2004). Za razlikovanje ovih vrsta upotrebljavaju se brojne molekularne osobine uključujući stepen sličnosti sekvenci određenih genskih segmenata (Pryor and Gilbertson, 2002; Park et al., 2008).

Nakon prve detekcije u Srbiji (Bulajić i sar., 2005) *A. petroselini* postala je jedan od najvažnijih patogena peršuna u našoj zemlji. Osnovni cilj ovih istraživanja bio je da se: (i) ispituju glavne morfološke karakteristike i njihova pogodnost da posluže kao taksonomski kriterijumi, (ii) utvrdi eksperimentalni krug domaćina izolata poreklom iz Srbije, (iii) ispita mogućnost molekularne detekcije specifične za vrstu i (iv) izvrši molekularna identifikacija izolata sekvenciranjem većeg broja genskih regiona uključujući ITS rDNK, Alt a1 i EF1a gene.

MATERIJAL I METODE

Izolacija patogena i dobijanje izolata

U periodu od 2005. do 2014. godine, prikupljeno je 76 uzoraka lista, korena i semena peršuna i infestiranog zemljišta i dobijeno je ukupno 19 izolata *A. petroselini*. Izolacija patogena obavljena je na podlogu od krompir-dekstroznog agara (potato dextrose agar, PDA) primenom standardnog fitopatološkog postupka nakon čega su izolati održavani na ravnoj ili kosoj PDA podlozi na temperaturi od 22°C odnosno 8°C.

Morfološke karakteristike

Preliminarna identifikacija svih dobijenih

izolata obavljena je na osnovu proučavanja morfoloških makroskopskih i mikroskopskih osobina monosporijalnih kultura starih 10 dana, odgajenih na PDA i podlozi od lista mrkve (carrot leaf agar, CLA) na temperaturi od 24°C. Proučavanje makroskopskih osobina obuhvatilo je praćenje brzine porasta, izgleda i boje kolonije, lučenja pigmenata, obrazovanja kristala i mikrosklerocija i drugih tvorevina. Od mikroskopskih osobina proučavane su oblik, boja i dimenzije konidija, izgled konidiofora i prostorni raspored formiranih konidija, prisustvo i dužina kljuna, kao i katenulacija, odnosno prostorni način sporulacije (Pryor and Gilbertson, 2002; Park et al., 2008). Prosekom obračunatim za najmanje 100 ponovljenih merenja, određivane su dimenzije svih tvorevina.

Provera patogenosti i određivanje kruga domaćina

Test provere patogenosti i određivanje kruga domaćina svih izolata uključenih u istraživanja obavljen je inokulacijom po pet biljaka peršuna (*Petroselinum crispum*), mrkve (*Daucus carota*), pastrnka (*Pastinaca sativa*), celera (*Apium graveolens*), morača (*Foeniculum vulgare*), anisa (*Pimpinella anisum*), korijandera (*Coriandrum sativum*), crnog luka (*Allium cepa*), kupusa (*Brassica oleracea*), paprike (*Capsicum annum*), paradajza (*Solanum lycopersicum*) i krastavca (*Cucumis sativus*). Sve biljke inokulisane su u fazi 2-4 prava lista prskanjem suspenzijom konidija pripremljenom od kultura starih 10 dana, odgajenih na PDA u mraku na temperaturi od 24°C. U razvijene kolonije nalivana je potrebna količina sterilne destilovane vode i konidije su odvajane od podloge staklenim štapićem, a koncentracija dobijene suspenzije podešena je hemocitometrom na 2×10^3 konidija/ml. Kao negativna kontrola korišćeni su sejanci istih biljaka, prskani sterilnom vodom. U cilju obezbeđivanja uslova povišene vlažnosti, biljke su po inokulaciji pokrivane plastičnim kesama koje su nakon dva dana uklonjene. Pojava simptoma praćena je svakodnevno do 14 dana posle inokulacije.

Molekularna detekcija

U cilju molekularne detekcije 19 izolata *A. petroselini* poreklom iz Srbije, kao i potvrde rezultata dobijenih konvencionalnim mikološkim metodama primenjena je metoda lančane reakcije polimeraze (polymerase chain reaction, PCR). Estrakcija ukupnih DNK obavljena je iz micelije čistih kultura patogena starih sedam dana odgajenih u tečnoj krompir-dekstroznoj čorbi (potato dextrose

broth, PDB) na temperaturi od 24°C, korišćenjem DNeasy Plant Mini Kit-a (Qiagen, Hilden, Germany), a prema uputstvu proizvođača. Molekularna detekcija obavljena je korišćenjem specifičnih prajmera za detekciju *A. radicina*, ARF2/ARR3 (Konstantinova et al., 2002) i Pa2071/Pa2072 (Pryor and Gilbertson, 2001).

Sve PCR reakcije obavljene su u radnoj zapremi od 25 µl, korišćenjem 12,5 µl 2X PCR Master miksa koji sadrži 2 mM MgCl₂ (Fermentas Life Sciences GmbH, Lithuania), 6,5 µl RNase-free vode, po 2,5 µl svakog prajmera (finalne koncentracije 0,6 µM) i 1 µl ekstrahovane ukupne DNK uzorka. Kao pozitivna kontrola korišćen je referentni izolat *A. petroselini* BMP139 (izolat iz kolekcije profesora B. M. Pryor, Univerzitet u Arizoni, Tucson, Arizona, USA), a kao negativna kontrola RNase-free voda koja je dodata u pripremljenu PCR smešu umesto ciljane DNK. Kao referentni izolati za vrste *A. radicina*, *A. dauci* i *A. alternata* korišćena su po dva izolata iz kolekcije Katedre za fitopatologiju, Instituta za fitomedicinu, Univerziteta u Beogradu-Poljoprivrednog Fakulteta, kao i referentni izolat *A. radicina* BMP79 (iz kolekcije profesora B. M. Pryor). Uslovi trostrukog koraka i očekivana veličina amplikona za svaki par korišćenih prajmera nalaze se u Tabeli 1.

Vizuelizacija dobijenih produkata izvršena je elektroforezom u 1% agaroznom gelu, bojenjem u rastvoru etidijum-bromida finalne koncentracije 0,5 µg/ml i posmatranjem pod UV transiluminatorom. Za određivanje veličine umnoženog amplikona korišćen je marker, MassRuler™ DNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences).

Molekularna identifikacija

Dalja molekularna identifikacija dva odabrana izolata Ap69 poreklom sa semena i Ap95 poreklom iz zemljišta i iznalaženje najpogodnijeg regiona genoma za razlikovanje *A. petroselini* i blisko srodnih vrsta obavljena je umnožavanjem i sekvenciranjem ITS regiona rDNK, korišćenjem prajmera ITS5/ITS4 (White et al., 1990), kao i Alt a1 i EF1a gena korišćenjem prajmera Alt-for/Alt-rev odnosno EF1-728F/EF1-986R (Park et al., 2008) prikazanih u Tabeli 1. Sve PCR reakcije obavljene su u 25 µl reakcione smeše na napred opisan način, a uslovi trostrukog koraka i očekivane veličine amplikona dobijene korišćenjem odgovarajućeg para prajmera prikazani su u Tabeli 1.

Umnoženi fragmenti ITS regiona rDNK, Alt a1 i EF1a gena ispitivanih izolata poslani su na uslužno sekvenciranje u oba pravca sa prajmerima korišćenim za amplifikaciju na ABI 3730XL auto-

matskom kapilarnom sekvencatoru u MACROGEN Inc. (<http://dna.macrogen.com>, Korea). Dobijene sekvence obrađene su u programu FinchTV Version 1.4.0. i međusobno upoređene pomoću CLUSTAL W programa (Thompson et al., 1994) integrisanog u MEGA5 softver (Tamura et al., 2011). Tako dobijene konsenzus sekvence podnete su u GenBank bazu podataka, gde su im dodeljeni pristupni brojevi (GenBank Accession Number) i analizirane upotrebom BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) algoritma, kao i proračunom nukleotidne sličnosti dobijenih sekvenci sa sekvencama odgovarajućeg regiona genoma izolata *Alternaria* sp. dostupnih u GenBank bazi podataka.

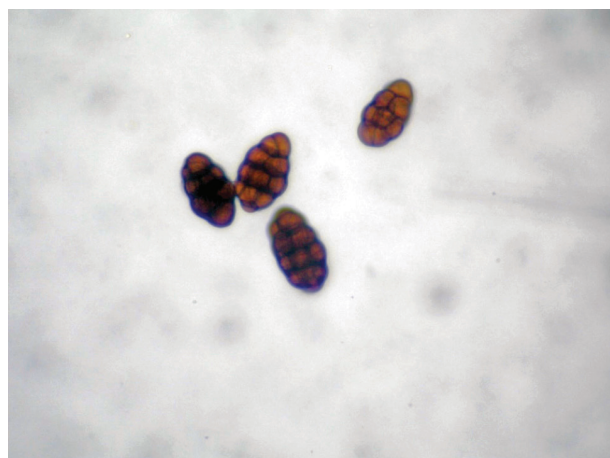
REZULTATI I DISKUSIJA

Simptomi bolesti i konvencionalna identifikacija

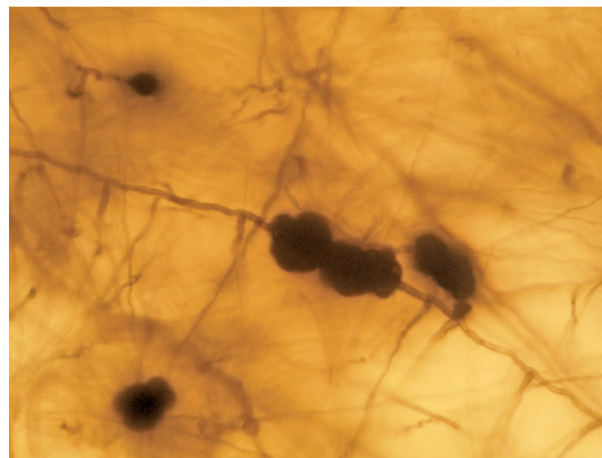
Pregledom useva peršuna u Srbiji u periodu 2005-2014. godina u skoro svim pregledanim usevima primećena je pojava pegavosti i sušenja lišća. U početnim fazama razvoja bolesti primećeni su simptomi u vidu sitnih, brojnih, tamnih pega na lišću. Kasnije, usled širenja i spajanja pega, nekrozom je bila zahvaćena veća površina listova koji su se sušili i propadali. Osim na listu, simptomi izduženih, nekrotičnih pega zabeleženi su i na lisnoj dršci. Iz lišća sa opisanim simptomima, dobijena su dva izolata gljive koje su na osnovu izgleda kolonije i konidija preliminarno identifikovane kao *A. petroselini*. Osim toga, iz komercijalno dostupnog semena peršuna izolovano je još 14 izolata, iz korena i korenovog vrata peršuna sa simptomima nekroze još dva izolata, a iz infestiranog zemljišta metodom mamaka jedan izolat. Od prve detekcije ovog patogena 2005. godine (Bulajić i sar., 2005), izdvojeno je ukupno 19 izolata *A. petroselini* poreklom iz lista, korena i semena peršuna, kao i infestiranog zemljišta, koji su međusobno upoređivani. Mada se peršun ubraja u grupu useva koji se gaje na manjim površinama, u Srbiji se tradicionalno gaji kao značajna začinska i povrtarska biljna vrsta i *A. petroselini* kao prourokovač pegavosti i sušenja lista svake godine nanosi štete u proizvodnji ove kulture (Bulajić i sar., 2005). Pegavost listova dovodi do značajnih ekonomskih gubitaka u proizvodnji peršuna u svetu, jer listovi biljaka koje se koriste kao začinske moraju biti besprekornog izgleda da bi bile iznete na tržište (Agnew, 2001; Raid and Roberts, 2004). Osim toga, usled oslabljene vitalnosti biljaka prisustvo *A. petroselini* obično je praćeno i visokim intezitetom zaraze drugim bolestima lista koje zajedno dovode do potpunog propadanja listova.

Tabela 1. Prajmeri korišćeni za detekciju i identifikaciju izolata *Alternaria petroselini*.
Table 1. Primers used for detection and identification isolates of *Alternaria petroselini*.

Genski region Genomic region	Prajmer Primer	Trostruki korak (temperatura/vreme) Cycling (temp./time)				Veličina amplikona (bp) Amplicon size (bp)	Literaturni izvor Reference
		Denaturacija Denaturation	Hibridizacija Annealing	Elongacija Extension	Broj ciklusa No. of cycles		
ITS <i>A. radicina</i>	ARF2 ARR3	94°C/60 s	57°C/40 s	72°C/60 s	35	~251	Konstantinova et al., 2002
ITS <i>A. radicina</i>	Pa2071 Pa2072	94°C/60 s	60°C/90 s	72°C/120 s	40	~900	Pryor and Gilbertson, 2001
ITS Eucariota	ITS5 ITS4	95°C/30 s	50°C/30 s	72°C/60 s	35	500-600	White et al., 1990
Alt a1	Alt-for Alt-rev	94°C/40 s	57°C/40 s	72°C/60 s	35	512-513	Park et al., 2008
EF1a	EF1-728F EF1-986R	94°C/40 s	55°C/40 s	72°C/60 s	35	279-280	Park et al., 2008



Slika 1. *Alternaria petroselini*: Pojedinačne, tamno smeđe, feodiktiosporne konidije.
Figure 1. *Alternaria petroselini*: Solitary, dark brown, feodictiosporic conidia.



Slika 2. *Alternaria petroselini*: Mikrosklerocije.
Figure 2. *Alternaria petroselini*: Microsclerotia.



Slika 3. *Alternaria petroselini*: Nekrotične pege na veštački zaraženim biljkama peršuna.
Figure 3. *Alternaria petroselini*: Necrotic spots on artificially inoculated parsley plants.

Svi izolati analizirani u ovom radu pokazali su uniformne morfološke osobine koje su po karakteristikama odgovarale opisu za vrstu *A. petroselini* (Pryor and Gilbertson, 2002; Pryor and Asma, 2007; Nishikawa and Nakashima, 2013). Na PDA podlozi, svi ispitivani izolati formirali su tamnosive, skoro crne kolonije sa ravnim ili blago talasastim ivicama i gustom somotastom vazdušastom micelijom. Kolonije svih izolata rasle su brzo na PDA, bez zaustavljanja i nakon sedam dana na temperaturi od 24°C dostizale su prečnik od oko 80 mm. Ni kod jednog ispitivanog izolata nije došlo do lučenja pigmenta.

Na CLA podlozi svi ispitivani izolati su obilno sporulisali nakon sedam dana pri temperaturi od 24°C i formirali su pojedinačne tamno smeđe, feodiktiosporne konidije elipsoidno okruglastog

Tabela 2. BLAST analiza dobijenih sekvenci izolata *Alternaria petroselini* poreklom iz Srbije sa sekvencama iz GenBank baze podataka.

Table 2. Comparison of sequences of Serbian *Alternaria petroselini* isolates to a sequence database using BLAST analysis.

Ciljna sekvenca Genomic region	Izolat Isolate	
	Ap69	Ap95
ITS rDNK Pokrivenost 100%	EU781948 BLAST: <i>A. petroselini</i> 100% <i>A. radicina</i> 99% (5-6 nt ^a)	EU807868 BLAST: <i>A. petroselini</i> 100% <i>A. radicina</i> 99% (5-6 nt)
Alt a1 Pokrivenost 100%	KM102530 BLAST: <i>A. petroselini</i> 100% <i>A. radicina</i> 95% (25 ili 27 nt)	KM102531 BLAST: <i>A. petroselini</i> 100% <i>A. radicina</i> 95% (25 ili 27 nt)
EF1a Pokrivenost 94%	KM102533 BLAST: <i>A. petroselini</i> i <i>A. selini</i> 100% <i>A. radicina</i> 94% (12 nt)	KM102532 BLAST: <i>A. petroselini</i> 100% <i>A. radicina</i> 95% (10 nt)

^a – razlika u broju nukleotida; ^a – number of nucleotide substitutions.

oblika bez kljuna (Slika 1), veličine 17,5–45 x 12,5–27,5 μm (u proseku 29,9 x 19,92 μm). Konidije su se najčešće formirale na kratkim i nerazgranatim konidioforama, dok se granjanje retko uočavalo. Svi izolati *A. petroselini* poreklom iz Srbije formirali su mikrosklerocije (Slika 2). Pryor and Gilbertson (2002) prvi su uočili da izolati *A. petroselini* mogu formirati mikrosklerocije što je kasnije potvrđeno od strane drugih autora (Pryor and Asma, 2007; Infantino et al., 2009), dok Nishikawa and Nakashima (2013) nisu precizirali da li njihovi izolati formiraju mikrosklerocije.

Provera patogenosti i određivanje kruga domaćina

Infektivnost i patogenost svih ispitivanih izolata *A. petroselini* bila je uniformna i usmerena samo na određene biljke iz familije Apiaceae. U uslovima postavljenog eksperimenta ispitivani izolati *A. petroselini* poreklom iz Srbije ispoljili su patogenost na peršunu, paštrnaku, celeru i korijanderu, slabu patogenost na mrkvi, moraču i anisu, a nisu bili infektivni za crni luk, kupus, papriku, paradajz i krastavac. Svih 19 izolata uključenih u ispitivanja izazvalo je reakciju u vidu brojnih pega na listovima inokulisanih biljaka peršuna (Slika 3), paštrnaka, celera i korijandera šest dana po inokulaciji, dok je 8-10 dana nakon inokulacije dolazilo do potpunog sušenja biljaka. Na inokulisanim biljkama mrkve, morača i anisa zabeležena je pojava malog broja pega, što je ocenjeno kao slaba patogenost i u saglasnosti je sa rezultatima drugih autora (Pryor and Gilbertson, 2002; Nishikawa and Nakashima, 2013). Kod biljaka koje ne pripadaju

familiji Apiaceae nije došlo do pojave simptoma 14 dana po inokulaciji što ukazuje da *A. petroselini* ima uzak krug domaćina ograničen samo na biljke iz jedne familije.

Molekularna detekcija i identifikacija

Primenom molekularnih metoda i korišćenjem dva para prajmera specifičnih za detekciju *A. radicina* ARF2/ARR3 i Pa2071/Pa207 (Pryor and Gilbertson, 2001; Konstantinova et al., 2002) uspešno su amplifikovani produkti odgovarajuće veličine od oko 251 bp, odnosno 900 bp kod svih 19 ispitivanih izolata *A. petroselini* poreklom iz Srbije, kao i kod referentnog izolata *A. petroselini* BMP139. Osim toga, oba para specifičnih prajmera amplifikovali su produkt odgovarajuće veličine i kod dva srpska izolata *A. radicina*, kao i kod referentnog izolata za ovu vrstu BMP79. Mada su oba para prajmera dizajnirana na osnovu ITS regiona rDNK *A. radicina* koji kod različitih vrsta gljiva može ispoljiti razlike u veličini, dobijeni amplikoni *A. petroselini* i *A. radicina* nisu se razlikovali, verovatno jer se radi o blisko srodnim vrstama (Pryor and Gilbertson, 2002). Iako su ovi prajmeri označeni kao specifični za vrstu *A. radicina*, činjenica da su amplifikovali sve izolate *A. petroselini* i *A. radicina* pokazuje da se njihovom primenom ne može izvršiti razlikovanje ove dve srodne vrste (Pryor and Gilbertson, 2002). U saglasnosti sa ovim istraživanjima su i rezultati Pryor and Gilbertson (2001) koji su sa specifičnim prajmerima Pa2071/Pa2072 detektovali izolate obe vrste, dok Infantino et al. (2009) navode da primenom ovih prajmera nisu uspeli da amplifikuju svoje izolate *A.*

petroselini. Primenom ovih prajmera nisu amplifikovani referetni izolati *A. dauci* i *A. alternata* poreklom sa mrkve iz kolekcije Katedre za fitopatologiju, što je ukazuje na delimičnu specifičnost korišćenih prajmera i mogućnost njihovog korišćenja u rutinskim istraživanjima.

Nakon sekvenciranja i obrade sekvenci ITS regiona rDNK i Alt a1 i EF1a gena dva odabrana izolata poreklom iz Srbije (Ap69 i Ap95), sekvence su deponovane u GenBank bazu podataka, a njihovi pristupni brojevi prikazani su u Tabeli 2. Poređenje sekvenci dva izolata *A. petroselini* poreklom iz Srbije pokazalo je da su oni međusobno potpuno identični u sekvenci ITS regiona rDNK i Alt a1 gena (100% nukleotidne identičnosti), dok se na osnovu sekvence EF1a gena razlikuju u dva nukleotida (99,3% nukleotidne sličnosti).

BLAST analiza sekvenci tri genska regiona odabranih izolata *A. petroselini* iz Srbije pokazala je najveću sličnost sa izolatima *A. petroselini*, ali i izolatima nekoliko srodnih vrsta: *A. smyrnii*, *A. selini*, *A. radicina* i *A. carotiincultae*, sa kojima dele od 93% do 100% nukleotidne identičnosti (Tabela 2). Sekvence ITS regiona rDNK odabranih izolata *A. petroselini* poreklom iz Srbije najveću nukleotidnu sličnost 99–100% pokazale su sa pet izolata *A. petroselini* iz Irana (AY154685), Italije (FJ623264), Holandije (EF636901), Japana (AB678216) i SAD (AF229454), kao i sa šest izolata *A. radicina* (EU781949, FJ958190, EU807870, AY154704, DQ394074 i DQ394073) poreklom iz različitih delova sveta.

Analiza sekvence Alt a1 gena, pokazala je da oba izolata *A. petroselini* poreklom iz Srbije najveću nukleotidnu sličnost od 100% dele sa dva izolata *A. petroselini*, poreklom iz SAD (AY563288) i Japana (AB744030). Nukleotidnu sličnost od 98% dele sa izolatom *A. smyrnii* iz SAD (AY563289), a sličnost od 94–95% sa 13 izolata *A. radicina* (AY563286, EU139330, EU139331, KJ733011, KJ733002, KJ732991, EU139346, KJ733004 i KJ732995) i *A. carotiincultae* (AY563287, EU139320, EU139321 i EU139329) poreklom iz različitih delova sveta (Tabela 2).

Poređenjem sekvence EF1a gena, dva izolata *A. petroselini* poreklom iz Srbije najveću nukleotidnu sličnost od 100% pokazala su sa izolatima *A. selini* (EU139352) i *A. petroselini* (AY563288) poreklom iz SAD, i 99% sličnosti sa izolatom *A. petroselini* nepoznatog porekla (KC584677). Nukleotidnu sličnost od 97% izolati poreklom iz Srbije pokazuju sa izolatom *A. smyrnii* (AY563289), a 93–95% sličnosti sa četiri izolata *A. radicina* (EU139398, EU139399) i *A. carotiincultae* (EU139388, EU139389) poreklom

iz različitih delova sveta (Tabela 2).

Dobijeni rezultati pokazuju da su Alt a1 i EF1a regiona najinformativniji za identifikaciju vrsta koje pripadaju *radicina* grupi roda *Alternaria*, dok su sekvence ITS rDNK regiona informativne, ali ne i dovoljne za razlikovanje srodnih vrsta. Do sličnih rezultata u svojim istraživanjima došli su i Pryor and Gilbertson (2002), Park et al. (2008) i Nishikawa and Nakashima (2013).

Morfološke karakteristike poput brzog porasta kolonije i formiranja mikrosklerocija, kao i analiza sekvenci Alt a1 i EF1a gena pokazale su se pouzdanim za identifikaciju i razdvajanje *A. petroselini* od srodnih vrsta u okviru roda *Alternaria*, naročito *radicina* grupe. Zbog velikog ekonomskog uticaja, pre svega na proizvodnju lista peršuna, dalja istraživanja bi trebalo usmeriti na razvijanje pouzdanih i brzih protokola detekcije ovog patogena u biljkama i semenu peršuna. Kako je primena hemijske zaštite otežana, testiranje različitih genotipova peršuna na otpornost pokazalo bi se korisnim u izboru početnog semenskog materijala i samim tim poboljšalo proizvodnju ove kulture. Osim toga, proučavanje kruga domaćina omogućava uspešnu primenu plodoreda koji takođe predstavlja jednu od osnovnih mera borbe od *A. petroselini*.

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, kao i EU Commission project AREA, No 316004 (Advancing Research in Agricultural and Food Sciences at Faculty of Agriculture, University of Belgrade).

LITERATURA

- Agnew, K. (2001): Alternaria leaf spot. Crop profile for Parsley in Arizona. <http://www.ipmcenters.org/cropprofiles/dics/AZparslez.html>.
- Bulajić, A., Đekić, I., Lakić, N., Krstić, B. (2009): The presence of *Alternaria* spp. on the seed of Apiaceae plants and their influence of seed emergence. Archives of Biological Science, 61: 871-881.
- Bulajić, A., Krstić, B., Vico, I., Dukić, N. (2005): Uperedna proučavanja izolata *Alternaria petroselini* patogena peršuna. Pesticidi i fitomedicina, 20: 43-50.
- Bassimba, D. D. M, Mira, J. L., Baixauli, C., Vicent, A. (2012): First report of *Alternaria petroselini* causing leaf blight of fennel in Spain. Plant Disease, 96: 907.
- Cunnington, J. H., Minchinton, E. J., Auer, D. P. F., Martin, H. L. (2006): First record of *Alternaria petroselini sensu lato* causing leaf blight on parsley in Australia. New Disease Reports, 14: 26.
- Farrar, J., Pryor, B. A., Davis, R. M. (2004): Alternaria disease of carrot. Plant Disease, 88: 776-784.
- Infantino, A., Di Giambattista, G., Pucci, N., Pallottini, L., Poletti, F., Bocconcelli, C. (2009): First report on *Alternaria petroselini* on fennel in Italy. New Disease Reports, 19: 26.
- Jones, D. R., Baker, R. H. A. (2007): Introduction of non-native plant pathogens in Great Britain, 1970-2004. Plant Pathology, 56: 891-910.
- Konstantinova, P., Bonants, P. J. M., van Gent-Pelzer, M. P. E., van der Zouwen, P., van den Bulk R. (2002): Development of specific primers for detection and identification of *Alternaria* spp. in carrot material by PCR and comparison with blotter and plating assays. Mycological Research, 106: 23-33.
- Liu, Y. H., Zhang, C. Q., Xu, B. C. (2013): First report of leaf blight in Chinese hickory (*Carya cathayensis*) caused by *Alternaria petroselini* in China. Plant Disease, 97: 1253.
- Minchinton, E., Auer, D., Martin, H., Tesoriero, L. (2006): Guide to Common Diseases and Disorders of Parsley. State of Victoria, Department of Primary Industries, National Library of Australia, 1-46.
- Nishikawa, J., Nakashima, C. (2013): Taxonomic characterization and experimental host ranges of four newly recorded species of *Alternaria* from Japan. Journal of Phytopathology, 161: 604-613.
- Park, M. S., Romanoski, C. E., Pryor, B. M. (2008): A re-examination of the phylogenetic relationship between the causal agents of carrot black rot, *Alternaria radicina* and *A. carotiincultae*. Mycologia, 100: 511-527.
- Pryor, B. M. (2002): *Alternaria* leaf blight of parsley. In Davis R. M. and Raid R. N. (eds.) Compendium of Umbelliferous Crop Diseases. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, 17.
- Pryor, B. M., Asma, M. (2007): First report of seedling damping-off of fennel caused by *Alternaria petroselini* in the Netherlands. Plant Disease, 91: 1688.
- Pryor, B. M., Gilbertson, R. L. (2001): A PCR-based assay for detection of *Alternaria radicina* on carrot seed. Plant Disease, 85: 18-23.
- Pryor, B. M., Gilbertson, R. L. (2002): Relationships and taxonomic status of *Alternaria radicina*, *A. carotiincultae*, and *A. petroselini* based upon morphological, biochemical, and molecular characteristics. Mycologia, 94: 49-61.

Raid, R., Roberts, P. (2004): Laternaria leaf spot (*Alternaria radicina*). Specific common diseases. In 2004 Florida Plant Disease Management Guide: Parsley. http://edis.ifas.ufl.edu/BODY_PG118.

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.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. (1990): Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, in Innis, M., Gelfand, D., Sninsky, J., White, T. (eds.) *PCR protocols: A guide to methods and applications*. Academic Press, Inc., San Diego, 315–322.

(Primljeno: 25.12.2014.)

(Prihvaćeno: 29.01.1015.)

BLACK LEAF SPOT – IMPORTANT DISEASE OF PARSLEY IN SERBIA

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

University of Belgrade-Faculty of Agriculture, Belgrade
e-mail: aleksandrabulajic@yahoo.com

SUMMARY

In the period 2005-2014, total of 19 isolates of *Alternaria petroselini* originating from parsley leaves, taproot and seed, as well as infested soil were collected and analyzed on the bases of morphological, pathogenic and molecular features. All isolates formed dark gray colonies on PDA and subsurface produced microsclerotia, as well as pigmented, broadly ellipsoidal, singly feodyctiosporic conidia. Pathogenicity and host range studies using spore suspension *spray inoculation*, revealed that isolates were pathogenic for parsley, parsnip, celery and coriander, weakly pathogenic for carrot, fennel and anise, and not pathogenic for onion, cabbage, pepper, tomato, and cucumber. Molecular detection utilizing *A. radicina* specific primers failed to demonstrate difference between two closely related but different species, *A. radicina* and *A. petroselini*. For further confirmation of identity of Serbian *A. petroselini* isolates, sequencing of selected genomic fragments including ITS rDNA, Alt a1 and EF1a protein coding genes was performed. BLAST search revealed that the most reliable molecular delineation between *A. petroselini* and closely related species could be achieved on the bases of sequence analysis of Alt a1 and EF1a genes (25-27, and 10-12 nucleotide differences from *A. radicina* isolates, respectively), while sequence of ITS rDNA were helpful, but not completely informative for identification of *A. petroselini* isolates.

Key words: *Alternaria petroselini*, morphological identification, sequencing, ITS rDNA, Alt a1, EF1a

(Received: 25.12.2014.)

(Accepted: 29.01.2015.)

PRIMENA MEZOTRIONA U KOMBINACIJI SA TERBUTILAZINOM, NIKOSULFURONOM I S-METOLAHLOROM U KUKURUZU

LJILJANA RADIVOJEVIĆ¹, JELENA GAJIĆ UMILJENDIĆ¹,
DRAGANA MARISAVLJEVIĆ², ANA ANĐELKOVIĆ^{2,3}, DANIJELA PAVLOVIĆ²

¹Institut za pesticide i zaštitu životne sredine, Beograd

²Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Beograd

³Stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije
e-mail: pavlovicdm@gmail.com

REZIME

U radu je praćena efikasnost i selektivnost mezotriona u kombinaciji sa terbutilazinom, nikosulfuronom i S-metolahlorom u usevu kukuruza. Ispitivanja su obavljena tokom 2014. godine, na dva lokaliteta, a primenjeni su herbicidi Mezotrion 100 g/L OD (mezotrion) u kolićini 1,0 i 1,2 L/ha; Egnit OD (mezotrion+nikosulfuron) u kolićini 1,0 i 1,2 L/ha; CA0914MT (mezotrion + terbutilazin) u kolićini 1,75, 2,0 i 2,3 L/ha; S metolahlor 375 g/L + Terbutilazin 125 g/L + Mezotrion 37,5 g/L (mezotrion+terbutilazin+S metolahlor) u kolićini 3,5 L/ha. Efikasnost herbicida ocenjena je 3 nedelje nakon primene herbicida.

Mezotrion je ispoljio visoku efikasnost u suzbijanju vrsta: *Amaranthus retroflexus*, *Chenopodium album*, *Chenopodium hybridum*, *Cirsium arvense*, *Datura stramonium*, *Solanum nigrum*, *Sinapis arvensis* i *Xanthium strumarium*. Za vrste *Abutilon theophrasti*, *Ambrosia artemisiifolia*, *Bilderdykia convolvulus*, *Lactuca serriola*, *Polygonum aviculare* i *Polygonum lapathifolium* visoka efikasnost utvrđena je samo kod veće kolićine primene (1,2 L/ha). U kombinaciji sa terbutilazinom i S metolahlorom znaćajno je povećana efikasnost za *Echinochloa crus-galli*, *Hibiscus trionum*, *Setaria glauca* i *Sorghum halepense* (s), dok se u kombinaciji sa nikosulfuronom efikasnost povećana i za rizomski sirak. Za vrste kao što su *Convolvulus arvensis* i *Cynodon dactylon* ni jedna od primenjenih kombinacija herbicida nije bila dovoljno efikasana. Istovremeno, mezotrion sam ili u kombinaciji sa terbutilazinom, nikosulfuronom i S metolahlorom, je pokazao dobru selektivnost prema kukuruzu.

ključne reći: mezotrion, terbutilazin, nikosulfuron, S metolahlor, efikasnost, selektivnost, kukuruz

UVOD

Usev kukuruza je veoma osetljiv na prisustvo korova, posebno u početnim fazama svoga razvoja, a što se kasnije može uočiti i kroz smanjenje prinosa (Gosheh i sar., 1996; Evans i sar., 2003). Zbog toga su herbicidi osnovni način rešavanja ovog problema. Kada se govori o suzbijanju korova u kukuruzu, poslednjih godina težište se prebaciju na folijarne herbicide, pri čemu se teži postizanju njihove maksimalne efikasnosti i to prvenstveno zbog: (1) umanjene efikasnosti zemljišnih herbicida u uslovima

nedovoljne kolićine padavina, (2) ogranićenja u korišćenju terbutilazina, (3) pojave rezistentnih populacija korova, kao i (4) uvođenja folijarnih herbicida koji su izuzetno efikasni u suzbijanju većeg broja korovskih vrsta.

Mezotrion je jedan od novijih herbicida, pripada inhibitorima enzima p-hidroksifenilpiruvat dioksigenaze (HPPD) koji omogućava biohemijsku konverziju tirozina u plastohinon i α -tokoferol (Lee i sar., 1998; Cornes, 2005). Mezotrion, u hemijskom smislu, spada u grupu benzoilcikloheksan-1,3-diona koji su hemijskim putem dobijeni iz biljke *Ca-*

llystemon citrinus (Mitchell i sar., 2001). Visoku efikasnost u suzbijanju korova mezotrion postiže i kao zemljišni i kao folijarni herbicid (Sutton i sar., 1999; Armel i sar., 2003b). Zbog svoje osobine da se izrazi to vezuje za čestice organske materije, u zemljištima koja su bogata organskom materijom, može ispoljiti slabiju efikasnost (Wichert i sar., 1999). Kao folijarni herbicid efikasno suzbija korove koji su razvili rezistentnost na atrazin (kao što su: *Chenopodium album*, *Amaranthus* spp., *Solanum nigrum* i dr.) i ALS inhibitore (kao što su: *Xanthium strumarium*, *Sonchus* spp. i dr.) (Skrzypczak i sar., 2011). Zbog dobre selektivnosti prema kukuruzu, koja je posledica umanjene apsorpcija i brzog metabolizma, mezotrion je našao široku primenu u praksi. Radi proširenja spektra delovanja često se primenjuje u kombinaciji sa preparatima na bazi nikosulfurona, terbutilazina, S metolahlora i dr. (James i sar., 2006; Sulewska i sar., 2005; Sulewska i Kozaira, 2006; Skrzypczak i sar., 2007, 2011; Schuster i sar., 2008).

Osobine mezotriona

Mezotrion se ponaša kao slaba kiselina dobro rastvotljiva u vodi 2,2 - 22 g/L (pH=4,8 odnosno pH=9). Zbog dobre rastvorljivosti biljke ga lako usvajaju i translociraju. Primena preko lista obezbeđuje visoki procenat usvajanja, i do 90% u zavisnosti od biljne vrste. Upravo na ovoj osobini zasniva se selektivnost mezotriona za biljke kukuruza, koje ga sporije usvajaju i brzo metabolišu do netoksičnih metabolita (Hawkes i sar., 2001; Senseman, 2007). Razgradnja mezotriona u korovskim biljkama je spora, a glavni metabolit je 2-amino-4-metilsulfonyl benzojeva kislina. U zemljištu vreme poluraspada je u proseku, 9 dana. Pokretljivost mezotriona u zemljištu raste sa porastom pH zemljišta, zbog slabije adsorpcije ovog herbicida u alkalnoj sredini (Senseman, 2007).

Rezistentnost

Generalno govoreći, 447 korovskih vrsta (227 dikotiledonih i 220 monokotiledonih vrsta) razvilo je rezistentnost na herbicide. Mezotrion spada u grupu triketona, herbicida koji inhibiraju enzim 4-hidroksifenilpiruvat dioksigenazu (HRAC grupa F2, 4-HPPD inhibitori), koji direktno utiče na biosintezu karotenoida (Senseman, 2007). Biosinteza karotenoida je dalje važna za biosintezu plastohinona, a inhibicija ovog procesa dovodi do pojave simptoma izbeljivanja (*bleaching*) na mladom biljnom tkivu (www.weedscience.org). Rezistentnost na mezotrion utvrđena je kod vrsta iz roda *Amaranthus* i to *A. tuberculatus*, *A. palmeri* (Hausman i

sar., 2011).

U ovom radu prikazane su osobine, kao i rezultati efikasnosti i selektivnosti mezotriona u kukuruzu, kada se primeni sam ili u kombinaciju sa nikosulfuronom, terbutilazinom i S metolahlorom.

MATERIJAL I METODE

Poljski ogledi u usevu kukuruza su izvedeni tokom 2014. godine na lokalitetima Surčin i Putinci, po slučajnom blok rasporedu u četiri ponavljanja. Veličina elementarne ogledne parcelice je bila 25 m². Herbicidi su primenjeni u različitim količinama (Tabela 1) pomoću leđne prskalice „Solo“ sa nastavkom za njivsko tretiranje sa četiri dizne tipa Tee Jet XR 110/03, uz utrošak vode 400 L/ha, nakon nicanja kukuruza, kada je usev bio u fazi 4-5 listova.

Efikasnost herbicida ocenjena je 3 nedelje nakon primene, brojanjem korova uz pomoć rama dimenzija 1x1m. Za svaku korovsku vrstu efikasnost je izračunata u odnosu na netretiranu kontrolu i izražena je u procentima. Vizuelna ocena fitotoksičnosti urađena 7, 21 i 42 dana nakon primene herbicida prema skali 0-10 (0 - nema oštećenja i 10 - potpuno propadanje biljaka).

REZULTATI I DISKUSIJA

Efikasnost

Na lokalitetima Surčin i Putinci, tokom 2014. godine, najzastupljenije korovske vrste bile su: *Abutilon theophrasti*, *Amaranthus retroflexus*, *Ambrosia artemisiifolia*, *Bilderdykia convolvulus*, *Chenopodium album*, *Chenopodium hybridum*, *Convolvulus arvensis*, *Cynodon dactylon*, *Cirsium arvense*, *Datura stramonium*, *Echinichloa crusgalli*, *Hibiscus trionum*, *Lactuca serriola*, *Polygonum aviculare*, *Polygonum lapathifolium*, *Solanum nigrum*, *Sinapis arvensis*, *Setaria glauca*, *Sorghum halepense* (iz rizoma i semena) i *Xanthium strumarium*.

Na lokalietu u Surčinu u obe količine primene mezotrion je ispoljio efikasnost koja je bila veća od 90% za vrste: *Chenopodium album*, *Cirsium arvense*, *Solanum nigrum* i *Xanthium strumarium*. Za vrste *Abutilon theophrasti*, *Ambrosia artemisiifolia*, ovako visoka efikasnost utvrđena je samo kod veće količine primene (varijanta 2). Mezotrion primenjen sam nije bio dovoljno efikasan za *Convolvulus arvensis*, *Cynodon dactylon*, *Setaria glauca*, *Sorghum halepense* (iz rizoma i semena). Dodavanjem terbutilazina (varijante 5-7) i S metolahlora (varijanta 8) značajno se povećala efikasnost za je-

Tabela 1. Herbicidi i količine primene.
Table 1. Herbicides and application doses.

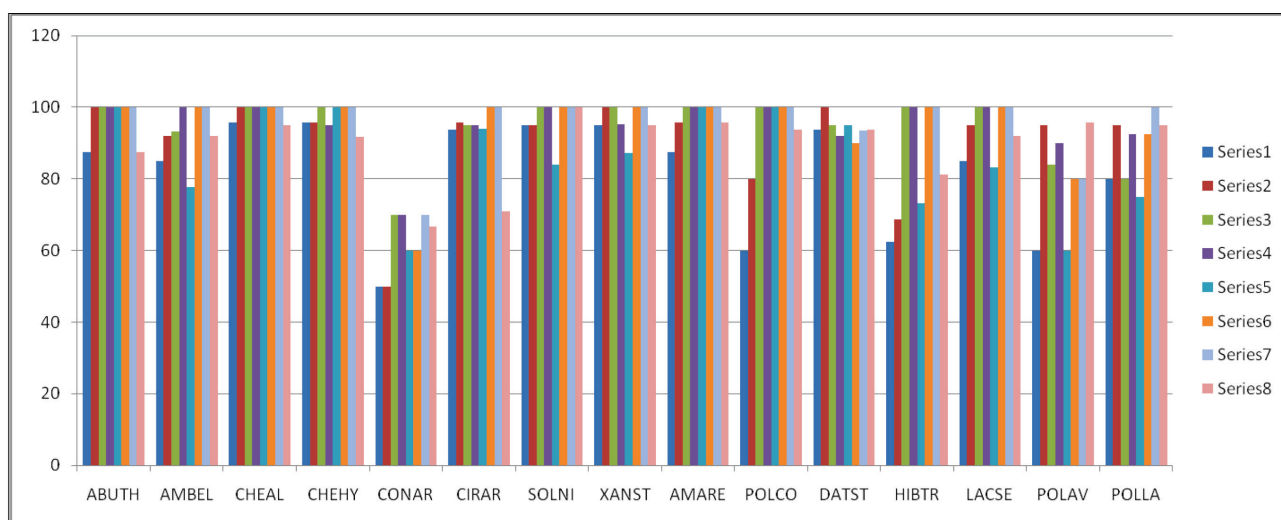
Varijante Treatments	Herbicidi Herbicides	Aktivne materije Active matters	Količina primene Application doses
1	Mezotrion 100 g/L OD	mezotrion	1,0 L/ha
2			1,2 L/ha
3	Egnit OD	mezotrion+nikosulfuron	1,0 L/ha
4			1,2 L/ha
5	CA0914MT	mezotrion + terbutilazin	1,75 L/ha
6			2,0 L/ha
7			2,3 L/ha
8	S metolahlor 375 g/L + Terbutilazin 125 g/L + Mezotrion 37,5 g/L	mezotrion+terbutilazin+S metolahlor	3,5 L/ha

Tabela 2. Efikasnost herbicida na lokalitetu Surčin.
Table 2. Efficacy of the herbicides in the locality Surčin.

Korovske vrste Weed species	1	2	3	4	5	6	7	8
	Efik./ Effic. %	Efik./ Effic. %	Efik./ Effic. %	Efik./ Effic. %	Efik./ Effic. %	Efik./ Effic. %	Efik./ Effic. %	Efik./ Effic. %
<i>Abutilon theophrasti</i>	87	100	100	100	100	100	100	87
<i>Ambrosia artemisiifolia</i>	85	92	93	100	77	100	100	92
<i>Chenopodium album</i>	95	100	100	100	100	100	100	95
<i>Convolvulus arvensis</i>	50	50	70	70	60	60	70	66
<i>Cynodon dactylon</i>	0	0	0	56	33	50	0	45
<i>Cirsium arvense</i>	93	95	95	95	94	100	100	70
<i>Solanum nigrum</i>	95	95	100	100	84	100	100	100
<i>Setaria glauca</i>	56	56	92	95	85	94	55	95
<i>Sorghum halepense (s)</i>	50	60	87	100	87	94	90	93
<i>Sorghum halepense (r)</i>	50	60	90	90	39	48	42	70
<i>Xanthium strumarium</i>	95	100	100	95	87	100	100	95

Tabela 3. Efikasnost herbicida na lokalitetu Putinci.
Table 3. Efficacy of the herbicides on the locality Putinci.

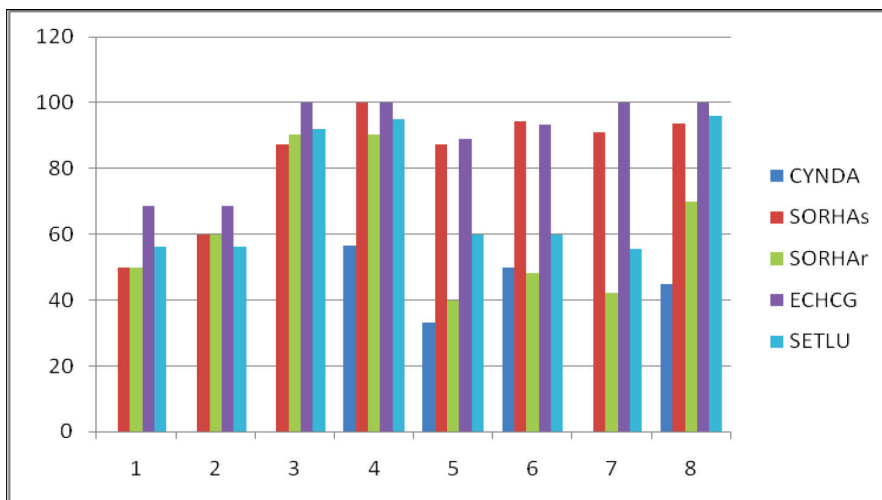
Korovske vrste Weed species	1	2	3	4	5	6	7	8
	Efik./ Effic. %	Efik./ Effic. %	Efik./ Effic. %	Efik./ Effic. %	Efik./ Effic. %	Efik./ Effic. %	Efik./ Effic. %	Efik./ Effic. %
<i>Amaranthus retroflexus</i>	87	95	100	100	100	100	100	95
<i>Bilderdykia convolvulus</i>	60	80	100	100	100	100	100	93
<i>Chenopodium album</i>	91	95	93	95	93	100	95	100
<i>Chenopodium hybridum</i>	95	95	100	95	100	100	100	91
<i>Datura stramonium</i>	93	100	95	92	95	90	93	93
<i>Echinochloa crus-galli</i>	68	68	100	100	88	93	100	100
<i>Hibiscus trionum</i>	62	68	100	100	73	100	100	81
<i>Lactuca serriola</i>	85	95	100	100	83	100	100	92
<i>Polygonum aviculare</i>	60	95	84	90	60	80	80	95
<i>Polygonum lapathifolium</i>	80	95	80	92	75	92	100	95
<i>Solanum nigrum</i>	95	100	100	100	100	100	100	100
<i>Sinapis arvensis</i>	100	100	100	100	100	100	100	95
<i>Sorghum halepense (s)</i>	0	0	81	94	84	94	100	95
<i>Sorghum halepense (r)</i>	0	0	77	93	55	33	55	71



Slika 1. Procenat efikasnosti herbicida (1 i 2- Meotrion 100 g/L OD; 3 i 4 - Egnit OD; 5, 6 i 7- CA0914MT; 8- S metolahlor 375 g/L + Terbutilazin 125 g/L + Meotrion 37,5 g/L) na širokolisne korove.

Figure 1. The percentage of herbicide efficacy (1 i 2- Meotrion 100 g/L OD; 3 i 4 - Egnit OD; 5, 6 i 7- CA0914MT; 8- S metolahlor 375 g/L + Terbutilazin 125 g/L + Meotrion 37,5 g/L) on broadleaf weeds.

ABUTH - *Abutilon theophrasti*; **AMBEL** - *Ambrosia artemisiifolia*; **CHEAL** - *Chenopodium album*; **CHEHY** - *Chenopodium hybridum*; **CONAR** - *Convolvulus arvensis*; **CIRAR** - *Cirsium arvense*; **SOLNI** - *Solanum nigrum*; **XANST** - *Xanthium strumarium*; **AMARE** - *Amaranthus retroflexus*; **POLCO** - *Polygonum convolvulus*; **DATST** - *Datura stramonium*; **HIBTR** - *Hibiscus trionum*; **LACSE** - *Lactuca serriola*; **POLAV** - *Polygonum aviculare*; **POLLA** - *Polygonum lapathifolium*



Slika 2. Procenat efikasnosti herbicida (1 i 2- Meotrion 100 g/L OD; 3 i 4 - Egnit OD; 5, 6 i 7- CA0914MT; 8- S metolahlor 375 g/L + Terbutilazin 125 g/L + Meotrion 37,5 g/L) na travne korove.

Figure 2. The percentage of herbicide efficacy (1 i 2- Meotrion 100 g/L OD; 3 i 4 - Egnit OD; 5, 6 i 7- CA0914MT; 8- S metolahlor 375 g/L + Terbutilazin 125 g/L + Meotrion 37,5 g/L) on grass weeds.

CYNDA - *Cynodon dactylon*; **SORHA** - *Sorghum halepense*; **ECHCG** - *Echinochloa crus-galli*; **SETLU** - *Setaria glauca*

Tabela 4. Fitotoksičnost posle primene herbicida (skala 0-10).
Table 4. Phytotoxicity after herbicide application (scale 0-10).

Herbicidi Herbicides	Količine primene Application dosage	Količina mesotriona Mesotrione quantity	Fitotoksičnost Phytotoxicity					
			Surčin			Putinci		
Mezotrion 100 g/L OD	1,0 L/ha	100 g am /L	7	21	42	7	21	42
	1,2 L/ha		1	0,3	0	1	0,4	0
Egnit OD	1,0 L/ha	110 g am/L	1,5	0,5	0	1,5	0,5	0
	1,2 L/ha		1	0,4	0	1	0,3	0
CA0914MT	1,75 L/ha	50 g am/L	1,5	0,5	0	1,5	0,7	0
	2,0 L/ha		0,5	0	0	0,3	0	0
	2,3 L/ha		0,7	0	0	0,5	0	0
S metolahlor 375 g/L + Terbutilazin 125 g/L + Mezotrion 37,5 g/L	2,3 L/ha	37,5 g am/L	1	0,3	0	0,7	0	0
	3,5 L/ha		0,3	0	0	0,3	0	0

Ocena - 7, 21 i 42 dana posle primene herbicida
 Assessment - 7, 21 and 42 days after herbicide application

nogodišnje travne vrste *Setaria glauca* i *Sorghum halepense* (s), dok se dodavanjem nikosulfurona efikasnost povećala i za rizomski sirak (varijante 3 i 4). Za vrste kao što su *Convolvulus arvensis* i *Cynodon dactylon* ni jedan od primenjenih herbicida, bez obzira na količinu i vreme primene, nije bio dovoljno efikasan (Tabela 2, Slika 1).

Na lokalietu u Surčinu u obe količine primene mezotrion je ispoljio efikasnost koja je bila veća od 90% za vrste: *Amaranthus retroflexus*, *Chenopodium album*, *Chenopodium hybridum*, *Datura stramonium*, *Solanum nigrum* i *Sinapis arvensis*. Za vrste *Bilderdykia convolvulus*, *Lactuca serriola*, *Polygonum aviculare* i *Polygonum lapathifolium* veća efikasnost utvrđena je samo kod veće količine primene (varijanta 2). Mezotrion primenjen sam nije bio dovoljno efikasan za *Echinochloa crus-galli*, *Hibiscus trionum*, *Setaria glauca*, *Sorghum halepense* (iz rizoma i semena). Dodavanjem terbutilazina (varijante 5-7) i S metolahlora (varijanta 8) značajno se povećala efikasnost za vrste kao što su: *Echinochloa crus-galli*, *Hibiscus trionum*, *Sorghum halepense* (iz semena), dok se dodavanjem nikosulfurona efikasnost povećala i za rizomski sirak (varijante 3 i 4) (Tabela 3, Slika 2).

Naši rezultati u saglasnosti su sa rezultatima drugih autora (James i sar., 2006; Armel i sar., 2003a, 2003b, 2003c) koji navode da mezotrion ne može efikasno da suzbija travne korove, ali da u kombinaciji sa drugim herbicidima kao što su primisulfuron, acetohlor ili S metolahlor ispoljava bolju efikasnost u suzbijanju i travnih i širokolisnih vrsta. Kombinacija mezotriona i atrazina, prema rezultatima Skrzypczak i sar. (2007, 2011) veoma je efikasna za *Echinochloa dichotomiflorum*, *Digita-*

ria sanguinalis i *Eleusine indica*. Kod kombinovanja mezotriona i sulfonilurea u „tank-mixu“ treba biti obazriv, smatraju Schuster i sar. (2008), pošto povećanje količine mezotriona sa 53 g/ha na 105 g/ha može da značajno da smanji efikasnost sulfonilurea u suzbijanju travnih korova.

Prema rezultatima naših istraživanja, kada se mezotrion primeni samostalno, posle nicanja kukuruza, on pokazuje visoku efikasnost (>90%) u suzbijanju *Amaranthus retroflexus*, *Chenopodium album*, *Chenopodium hybridum*, *Cirsium arvense*, *Datura stramonium*, *Solanum nigrum*, *Sinapis arvensis* i *Xanthium strumarium*, dok je za vrste *Abutilon theophrasti*, *Ambrosia artemisiifolia*, *Bilderdykia convolvulus*, *Lactuca serriola*, *Polygonum aviculare* i *Polygonum lapathifolium* ovako visoka efikasnost moguća samo kod veće količine primene od 1,2 L/ha. James i sar. (2006) su saglasni da se većina ekonomski značajnih korovskih vrsta može efikasno suzbiti mezotrionom izuzev vrste *Portulaca oleracea*, koja se efikasno suzbija samo uz pomoć atrazina, dikambe ili nikosulfurona. Za razliku od njih, Sulewska i sar. (2005) i Sulewska i Kozaira (2006) smatraju da mezotrionu neophodan „herbicid partner“ za efikasno suzbijanje vrsta iz roda *Polygonum*, kao i *Ambrosia artemisiifolia*.

Fitotoksičnost

Pored efikasnosti, u ogleđima je praćena i selektivnost mezotriona, koji je primenjen sam ili u kombinaciji sa terbutilazinom, nikosulfuronom i S metolahlorom, prema kukuruзу i to 7, 21 i 42 dana nakon primene herbicida. U prvih nedelju dana nakon primene zabeleđena je pojava fitotoksičnosti,

koja je bila intenzivnija u varijantama sa većim količinama primene (Tabela 4). Međutim, svi konstatovani simptomi fitotoksičnosti su bili privremenog i prolaznog karaktera i nestali su 21, odnosno 42 dana nakon primene. Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima Panacci i Covarelli (2009), koji su, takođe utvrdili da prolazna fitotoksičnost mezotriona, kasnije ne utiče na prinos kukuruза. James i sar. (2006) su takođe potvrdili visoku selektivnost mezotriona prema kukuruзу kada se primeni samostalno ili u kombinaciji sa nikosulfuronom. Međutim, primena mezotriona u kombinaciji sa atrazinom, zbog sinergizma, dovodi do ozbiljnijih oštećenja useva kukuruза (Waligóra i Duhr, 2004).

Dobijeni rezultati pokazuju da je mezotrion efikasan herbicid za folijarno suzbijanje korova u kukuruзу, posebno širokolisnih korovskih vrsta i

da pokazuju dobru selektivnost prema ovom usevu. Za efikasno suzbijanje svih korova koji su prisutni u polju mezotrion bi trebalo primenjivati u kombinaciji sa herbicidima koji su efikasni u suzbijanju travnih korova. Izbor herbicida sa kojim će se mezotrion kombinovati, prvenstveno zavisi od prisutnog spektra korova. Primena herbicida u kombinaciji dve ili više aktivnih materija omogućava prevazilaženje potencijalnih problema, a istovremeno obezbeđuje dobru antirezistentnu strategiju.

ZAHVALNICA

Rad je rezultat projekata TR 31043 i TR 31018 koje finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

LITERATURA

- Armel, G. R., Wilson, H. P., Richardson, R. J., Hines, T.E. (2003a): Mesotrione combinations in no-till corn (*Zea mays*). *Weed Technology*, 17: 111-116.
- Armel, G. R., Wilson, H. P., Richardson, R. J., Hines, T. E. (2003b): Mesotrione, acetochlor and atrazine for weed management in corn (*Zea mays*). *Weed Technology*, 17: 284-290.
- Armel, G. R., Wilson, H. P., Richardson, R. J., Hines, T. E. (2003c): Mesotrione alone and in mixtures with glyphosate in glyphosate-resistant corn (*Zea mays*). *Weed Technology*, 17: 680-685.
- Cornes, D. (2005): Callisto: a very successful maize herbicide inspired by allelochemistry. http://www.regional.org.au/au/allelopathy/2005/2/7/2636_cornesd.htm. Accessed: February 09, 2015.
- Gosheh, H. Z., Holshouser, D. L., Chandler, J. M. (1996): The critical period of johnsongrass (*Sorghum halepense*) control in field corn (*Zea mays*). *Weed Science*, 44: 944-947.
- Evans, S. P., Knezevic, S. Z., Lindquist, J. L., Shapiro, C. A., Blankenship, E. E. (2003): Nitrogen application influences the critical period for weed control in corn. *Weed Science*, 51: 48-417.
- Hawkes, T. R., Holt, D. C., Andrews, C. J., Thomas, P. G., Langford, M. P., Hollingworth, S., Mitchell, G. (2001): Mesotrione: mechanism of herbicidal activity and selectivity in corn. *The BCPC Conference - Weeds*, 2: 563-568.
- Hausman, E. N., Singh, S., Tranel, J. P., Riechers, D., Kaundun, S., Polge, D. N., Thomas, A. D., Hager, A. G. (2011): Resistance to HPPD herbicides in a population of waterhemp (*Amaranthus tuberculatus*) from Illinois, United States. *Pest Management Science*, 67(3): 258-261.
- James, T. K., Rahman, A., Hicking, J. (2006): Mesotrione - a new herbicide for weed control in maize. *NZ Plant Protection*, 59: 242-249.
- Lee, D. L., Knudsen, C. G., Michaelay, W. J., Chin, H., Nguyen, N. H., Carter, C. G., Cromartie, T. J., Lake, B. H., Shribbs, J. M., Fraser, T. (1998): The structure-activity relationships of the triketone class of HPPD herbicides. *Pest Management Science*, 54(4): 377-384.

Mitchell, G., Bartlett, D., Fraser, E.M.T., Hawkes, R. T, Holt, C. D., Townson, K. J., Wichert, A. R. (2001): Mesotrione: a new selective herbicide for use in maize. *Pest Management Science*, 57(2): 120-128.

Pannacci, E., Covarelli, G. (2009). Efficacy of mesotrione used at reduced doses for post-emergence weed control in maize (*Zea mays* L.). *Crop Protection*, 28(1): 57-61.

Schuster, C. L., Al-Khatib, K., Dille, J. A. (2008). Efficacy of sulfonylurea herbicides when tank mixed with mesotrione. *Weed Technology*, 22(2): 222-230.

Skrzypczak, A. G., Pudelko, A. J., Waniorek, W. (2007): Assessment of the tank mixture of mesotrione and pethoxamid plus terbuthylazine efficacy for weed control in maize (*Zea mays* L.). *Journal of Plant Protection Research*, 47: 375-381.

Skrzypczak, G. A., Sobiech, L., Waniorek, W. (2011): Evaluation of the efficacy of mesotrione plus nicosulfuron with additives as tank mixtures used for weed control in Maize (*Zea mays* L.) *Journal of Plant Protection Research*, 51: 300-305.

Senseman, S.A. (2007): *Herbicide Handbook, Ninth Edition*, WSSA.

Sulewska, H., Ptaszynska, G., Jazic, P., Waligora, H. (2005): Ocena zachwaszczenia kukurydzy po powschodowym uzyciu wybranych herbicydow. *Prog. Plant Protection*, 45: 1120-1122.

Sulewska, H. and Kozaira, W. (2006): Skuteczność wybranych herbicydow stosowanych powschodowo w kukurydzy. *Prog. Plant Protection*, 46: 1120-1122.

Sutton, P. B., Foxon, G. A., Beraud, J. M., Anderdon, J., Wichert, R. (1999): Integrated weed management systems for maize using mesotrione, nicosulfuron and acetochlor. *The BCPC Conference - Weeds*, 1: 225-230.

Wichert, R., Townson, J. K., Bartlett, D.W., Foxon, G. A. (1999): Technical review of mesotrione, a new maize herbicide. *The BCPC Conference - Weeds*, 1: 105-110.

Waligóra, H. and Duhr, E. (2004): Skuteczność chwastobójcza preparatów Callisto 100 SC, Titus Plus DF i Emblem 20 WP w kukurydzy cukrowej. *Prog. Plant Protection/Post. Ochr. Roślin*, 44: 1183-1186.

www.weedscience.org

(Primljeno: 23.12.2014.)
(Prihvaćeno: 26.01.2015.)

THE APPLICATION OF MESOTRIONE IN COMBINATION WITH TERBUTHYLAZINE, NICOSULFURON AND S-METOLACHLOR IN MAIZE

LJILJANA RADIVOJEVIĆ¹, JELENA GAJIĆ UMILJENDIĆ¹,
DRAGANA MARISAVLJEVIĆ², ANA ANĐELKOVIĆ^{2,3}, DANIJELA PAVLOVIĆ²

¹*Institute of Pesticides and Environmental Protection, Belgrade, Serbia*

²*Institute for Plant Protection and Environment, Belgrade, Serbia*

³*Scholar of the Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia*
e-mail: pavlovicdm@gmail.com

SUMMARY

The paper examines the efficacy and selectivity of mesotrione in combination with terbuthylazine, nicosulfuron and S-metolachlor in maize crops. The studies were conducted during 2014, in two localities, and the following herbicides were applied: Mezotrion 100 g/L OD (mesotrione) in quantities of 1.0 and 1.2 L/ha; Egnit OD (mesotrione + nicosulfuron) in quantities of 1.0 and 1.2 L/ha; CA0914MT (mesotrione + terbuthylazine) in quantities of 1.75, 2.0 and 2.3 L/ha; S metolahlor 375 g/L + Terbutilazin 125 g/L + Mezotrion 37.5 g/L (mesotrione + terbuthylazine + S-metolachlor) in quantity of 3.5 L/ha. The efficacy of the herbicides applied was assessed 3 weeks after the application.

Mesotrione has shown high efficacy in the control of the following species: *Amaranthus retroflexus*, *Chenopodium album*, *Chenopodium hybridum*, *Cirsium arvense*, *Datura stramonium*, *Solanum nigrum*, *Sinapis arvensis* and *Xanthium strumarium*. For *Abutilon theophrasti*, *Ambrosia artemisiifolia*, *Bilderdykia convolvulus*, *Lactuca serriola*, *Polygonum aviculare* and *Polygonum lapathifolium* high efficacy was confirmed only in higher quantities of application (1.2 L/ha). In combination with terbuthylazine and S-metolachlor the efficacy was significantly improved for *Echinochloa crus-galli*, *Hibiscus trionum*, *Setaria glauca* and *Sorghum halepense* (s), while in the combination with nicosulfuron the efficacy was also increased for the Johnsongrass developed from rhizome. For the species like *Convolvulus arvensis* and *Cynodon dactylon* none of the applied herbicide combinations was efficient enough. At the same time, mesotrione alone, or in combination with terbuthylazine, nicosulfuron and S-metolachlor, has shown good selectivity towards maize.

Key words: mesotrione, terbuthylazine, nicosulfuron, S-metolachlor, efficacy, selectivity, maize

(Received: 23.12.2014.)
(Accepted: 26.01.2015.).

MORFOLOŠKA I MOLEKULARNA IDENTIFIKACIJA IZOLATA *ALTERNARIA ALTERNATA* - PATOGENA PLODOVA KIMA U SRBIJI

DANIJELA RISTIĆ¹, MILICA AĆIMOVIĆ², NENAD TRKULJA¹

¹Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Beograd

²Univerzitet u Beogradu - Poljoprivredni fakultet, Beograd
e-mail: ristidaca@yahoo.com

REZIME

Tokom 2013. godine, na oglednom polju u Mošorinu, prikupljeni su uzorci zaraženog semena gajenog kima i analizirani na prisustvo fitopatogenih gljiva. U svim uzorcima semena, ustanovljena je slabija klijavost i visok stepen zaraze fitopatogenim gljivama iz roda *Alternaria*, 100%. Iz zaraženog semena izolovane su monosporijalne kulture, čija je patogenost potvrđena pojavom simptoma na veštački inokulisanim klijancima kima i peršuna, a na osnovu morfoloških svojstava identifikovane su kao *Alternaria alternata*. Molekularna identifikacija obavljena je primenom lančane reakcije polimeraze (PCR, Polymerase Chain Reaction) uz korišćenje prajmera ITS1/ITS4 i amplifikaciju ITS regiona ribozomalne DNK. Sekvence gena odabranih izolata CC1 (KP822948), CC2 (KP822949) i CC3 (KP822950) pokazale su 100% nukleotidne identičnosti sa sekvencama 31 izolata *A. alternata* deponovanih u GenBank bazi podataka. Prisustvo većeg broja vrsta gljiva na semenu kima, zahteva dalja ispitivanja njihovih međusobnih odnosa i relativnog značaja.

Cljučne reči: kim, *Alternaria alternata*, molekularna identifikacija, morfološka svojstva, test patogenosti

UVOD

Kim (*Carum carvi* L., fam. Apiaceae Lindl.) je poznata jestiva, začinska i lekovita biljka koja se gaji širom Zapadne Azije, Evrope i Severne Afrike (Bercu and Broască, 2012). Plodovi kima sadrže etarska ulja (karvon, limonen) i zato predstavljaju značajan potencijal za farmaceutsku i kozmetičku industriju (Mačkinité, 2010). Utvrđeno je da ekstrakti plodova kima imaju jaku antibakterijsku i antifungalnu aktivnost i zato se koriste za razvoj biljnih antimikrobnih formulacija (Gupta et al., 2011).

Brojne fitopatogene gljive ugrožavaju gajenje i proizvodnju biljaka iz familije Apiaceae, a među njima poseban značaj imaju gljive iz roda *Alternaria* (Bulajić, 2006). Promene načina gajenja, uvođenje plantažne proizvodnje lekovitih biljaka dodatno su uticale na intenzivniju pojavu

postojećih patogenih (Gamliel and Yarden, 1998), posebno onih sa širokim spektrom domaćina, kao što su vrste roda *Alternaria*, koje parazitiraju preko 4000 različitih biljnih vrsta (Pryor, 2003). Prisustvo različitih patogenih gljiva na semenu lekovitog bilja, može biti značajno sa stanovišta smanjenja prinosa i kvaliteta semena, u pogledu kontaminacije štetnim mikotoksinima (Singh and Dubey, 2012). Bolesti kima intenzivno se proučavaju u mnogim zemljama (Bugarska, Češka, Poljska, Nemačka, Holandija) (Evenhius et al., 1995; Gabler, 2001; Mazur and Nawrocki, 2004; Rodeva and Gabler, 2004; Odstričilová, 2007; Machowicz-Stefaniak, 2009), dok su u Srbiji literaturni podaci o patogenima kima relativno oskudni i pored značajnih šteta koje prouzrokuju.

Tokom ispitivanja zdravstvenog stanja semena kima 2013. godine, ustanovljeno je prisustvo izolata gljiva, preliminarno identifikovanih

kao *Alternaria* spp., koji su ispoljili patogenost na sejancima peršuna. Osnovni cilj sprovedenih istraživanja bio je da se detektovani izolati iz semena kima identifikuju primenom konvencionalnih i molekularnih metoda, amplifikacijom ITS regiona ribozomalne DNK, što predstavlja uvođenje novih perspektiva u proučavanje fitopatogenih gljiva iz semena kima u Srbiji.

MATERIJAL I METODE

Sakupljanje uzoraka plodova kima i izolacija patogena

U okviru istraživanja tokom 2013. godine na oglednom polju u Mošorinu (Južno-Bački okrug, 45°18' N, 20°09' E, nadmorska visina 111m), izvršen je pregled semena kima u fazi pune zrelosti, radi utvrđivanja prisustva fitopatogenih gljiva iz roda *Alternaria*. Ukupno 400 semena (100 semena x četiri ponavljanja) ispirano je 2 h pod mlazom česmenske vode, površinski sterilisano u 2% rastvoru natrijum-hipohlorita (NaOCl, komercijalna varikina) u trajanju od 2 min i ispirano dva puta u sterilnoj vodi (Singh et al., 1991). Površinski sterilisano seme nanošeno je na vlažan filter papir, inkubirano u mraku pri 25°C, a pojava pojedinačnih kolonija praćena je tokom naredna tri dana. U cilju dobijanja uniformih i čistih kultura, nakon tri do pet dana razvoja inicijalnih kolonija izvršena je monosporijalna izolacija gljive na podlogu krompir-dekstrozni agar (potato dextrose agar, PDA).

Provera patogenosti

Test provere patogenosti svih dobijenih monosporijalnih izolata *Alternaria* spp. obavljen je veštačkom inokulacijom biljaka kima i peršuna u fazi razvoja 5-6 listova. Inokulacija je obavljena prskanjem suspenzije konidija pripremljene od kultura odabranih izolata starih 10 dana, koje su odgajane na PDA podlozi u mraku, pri temperaturi od 25°C (Strandberg, 1987; Pryor and Gilbertson, 2002). Koncentracija dobijene suspenzije podešena je na 1×10^3 konidija/ml pomoću hemocitometra (Muntanola-Cvetković, 1987). Sa 10 ml tako pripremljene supenzije od svakog izolata inokulisano je po 5 biljaka, a ogled je ponovljen dva puta. Inokulisane biljke su potom održavane u uslovima staklenika. U cilju obezbeđenja uslova povišene vlažnosti, biljke su po inokulaciji pokrивane PVC folijom koja je nakon dva dana uklonjena. Kao negativna kontrola korišćene su bil-

jke kima i peršuna inokulisane sterilnom vodom. Pojava simptoma posmatrana je do dve nedelje po inokulaciji. Sa listova na kojima su se razvili simptomi izvršena je reizolacija korišćenjem istih metoda kao pri izolaciji.

Morfološka svojstva

Morfološka identifikacija obavljena je na osnovu proučavanja makroskopskih i mikroskopskih svojstava odabranih monosporijalnih izolata *Alternaria* spp. prema kriterijumima Muntanola-Cvetković (1987). Proučavanje makroskopskih svojstava obuhvatilo je praćenje intenziteta rasta i izgleda kolonije, boju i lućenje pigmenta. Ispitivanje mikroskopskih svojstava obuhvatilo je utvrđivanje oblika i dimenzija konidija na kulturama starim sedam dana, odgajenim na PDA podlozi u mraku pri 25°C. Sve dimenzije su merene na slučajno odabranim, potpuno formiranim i zrelim konidijama koje su bile odgovarajuće obojenosti, kako to preporučuju Pryor and Gilbertson (2002). Prosekom obračunatim za najmanje 100 ponovljenih merenja, određivana je dužina i širina konidija.

Molekularna detekcija i identifikacija

Metoda lančane reakcije polimeraze (polymerase chain reaction, PCR) primenjena je u cilju molekularne detekcije i identifikacije *A. alternata* poreklom iz semena kima, kao potvrda identifikacije na osnovu konvencionalnih metoda. Za ova ispitivanja odabrani su izolati CC1, CC2 i CC3 dobijeni iz zaraženog semena kima. Ekstrakcija ukupne DNK obavljena je iz vazdušne micelije sakupljene direktno iz sedam dana starih kolonija odgajenih na PDA podlozi, korišćenjem komercijalnog kita DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany), po uputstvu proizvođača. PCR reakcija obavljena je sa parom univerzalnih prajmera ITS1/ITS4 (Konstantinova et al., 2002) koji omogućavaju amplifikaciju i kasnije sekvencioniranje ITS regiona (Internal transcribed spacer) ribozomalne DNK Eukariota. PCR reakcija obavljena je u radnoj zapremini od 25 µl, korišćenjem 12,5 µl 2X PCR Master miksa (Fermentas, Lithuania), 9 µl RNase-free vode, po 1,25 µl svakog prajmera (100 pmol/µl) i 1 µl ekstrahovane ukupne DNK. Kao negativna kontrola korišćena je RNase-free voda koja je dodata u pripremljenu PCR smešu umesto ciljane DNK. PCR reakcija je izvedena pri sledećim uslovima: inicijalna denaturacija nukleinskih kiselina 2 min na 94°C; 35 ciklusa koji se sastoje

od denaturacije 2 min na 94°C, hibridizacije 30 s na 57°C, elongacije 1 min na 72°C, praćeno finalnom elongacijom na 72°C u trajanju od 10 min.

Vizuelizacija umnoženih produkata PCR reakcija obavljena je elektroforetskim razdvajanjem nukleinskih kiselina u 1% agaroznom gelu u 1 x TBE puferu, bojenjem Midori Green DNA Stain (Nippon Genetics) i posmatranjem pod UV-transiluminatorom. Za određivanje veličine umnoženog amplikona korišćen je marker MassRuler™ DNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences GmbH, Lithuania). Pozitivnom reakcijom smatrana je pojava traka produkta očekivane veličine 500-600 bp.

Umnoženi fragmenti izolata CC1, CC2 i CC3, poslani su na prečišćavanje i uslužno sekvencioniranje u oba smera na ABI 3730XL Automatic Sequencer u Macrogen, Inc (<http://dna.macrogen.com>, Korea). Dobijene sekvence obrađene su u programu FinchTV Version 1.4.0., a konsenzus nukleotidne sekvence podnete su u GenBank bazu podataka, gde im je dodeljen pristupni broj (GenBank Accession Number).

BLAST analizom i višestrukim poređenjem sa dostupnim sekvencama u GenBank bazi podataka (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) pomoću CLUSTAL W programa (Thompson et al. 1994), obavljena je potvrda identifikacije. Za proračun genetičke udaljenosti i najviši stepen nukleotidne sličnosti, nakon trimovanja sekvenci na dužinu najkraće sekvence upotrebljen je softverski paket MEGA verzija 5.0. (Tamura et al., 2011).

REZULTATI I DISKUSIJA

Izolacija patogena, provera patogenosti i konvencionalna identifikacija

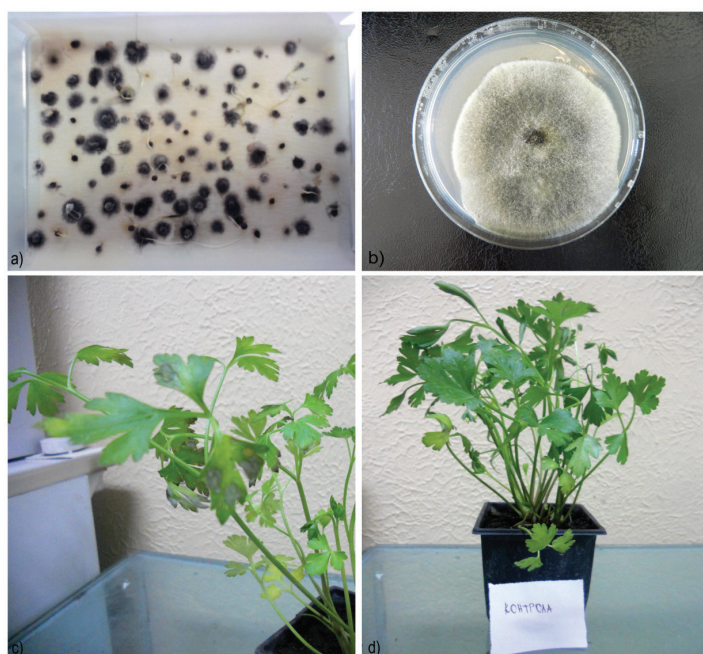
Ispitivanjem zdravstvenog stanja semena kima, prikupljenog sa oglednog polja u Mošorinu 2013. godine, utvrđen je visok stepen zaraze (100%) fitopatogenim gljivama iz roda *Alternaria*. Zaraza semena začinskih biljaka iz familije Apiaceae sa *Alternaria* spp. je jedan od osnovnih načina održavanja i prenošenja ovih gljiva u prirodi (Kwasna, 1992; Agrios, 2005) i o tome postoji dosta literaturnih navoda. Mikropopulacija semena kima je brojna i raznovrsna. U Litvaniji na semenu gajenog kima ukupno je identifikovano 55 vrsta, 2 varijeteta i 39 rodova koji pripadaju razdelu *Ascomycota*, *Basidiomycota* i *Zygomycota* (Mačkinaite, 2011). Tako, Mačkinaite (2010) navodi da je *A. alter-*

nata najzastupljenija vrsta iz roda *Alternaria*, koja je uvek prisutna na semenu kima u visokom procentu, a pojedinih godina i preko 92%. U istraživanjima Bulajić (2006) navodi da seme povrća i začinskog bilja iz familije Apiaceae ispoljava različit stepen zaraze sa fitopatogenim gljivama roda *Alternaria*, i da je svaka zaraza semena veoma značajna. Primenom standardnih metoda iz semena kima izdvojeno je osam monosporijalnih izolata (Slika 1a), koji su po morfološkim svojstvima odgovarali *A. alternata*. U uslovima veštačke inokulacije klijanaca kima i peršuna reprodukovani su simptomi prirodne infekcije. Ispitivani izolati izazvali su pojavu brojnih nekrotičih pega na inokulisanim sejancima. Simptomi su se najčešće pojavljivali 5-7 dana od inokulacije u vidu tamno braon do crnih pega nepravilnih oblika na obodu listova (Slika 1c). Kasnije je došlo do sušenja listova i potpunog propadanja biljaka. Iz svih inokulisanih biljaka kima i peršuna sa simptomima, uspešno je izvršena reizolacija patogena primenom istih metoda kao i pri izolaciji. Na biljkama koje su inokulisane kao negativna kontrola, nije došlo do pojave simptoma (Slika 1d).

Svi ispitivani izolati iz semena kima ispoljavali su zajednička morfološka svojstva koja odgovaraju opisu zbirne vrste *A. alternata*. Za detaljno proučavanje morfoloških svojstava odabrana su tri reprezentativna izolata CC1, CC2 i CC3. Ispitivani izolati formirali su bujne sivomaslinaste kolonije, sa ravnom do blago talasastom ivicom bele boje (Slika 1b), dok se prosečni dnevni porast kretao od 9.5 do 13.8 mm. Ovi izolati nisu lučili pigmente u podlozi. Ovakvi rezultati su u saglasnosti sa opisom kolonije koji Yu (1992) navodi za *A. alternata*. Pojedinačne konidije su različitog oblika pravilno elipsoidne, okruglaste ili izdužene sa kratkim koničnim kljunom. Konidije sva tri izolata bile su prosečnih dimenzija 22.55-28.15 x 9.55-10.75 µm, čija je katenuklacija bila u vidu razgranatih nizova, što u potpunosti odgovara navodima Yu (1992) i Pryor (2003) za vrstu *A. alternata*.

Molekularna detekcija i identifikacija

Molekularna metoda lančane reakcije polimeraze (PCR) i sekvencioniranje umnoženih fragmenata DNK, uspešno su primenjeni za detekciju i identifikaciju ispitivanih izolata *A. alternata*. Primenom para univerzalnih prajmera ITS1/ITS4 koji omogućavaju amplifikaciju ITS regiona ribo-



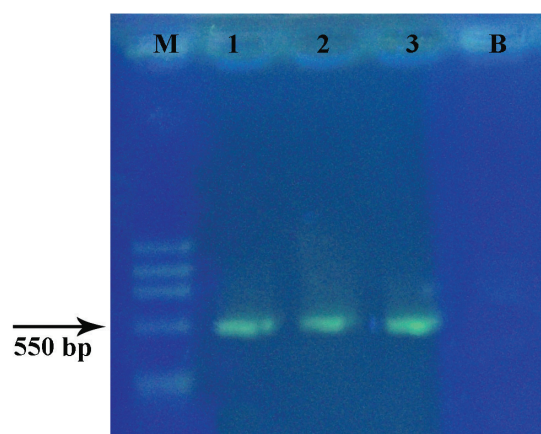
Slika 1. *Alternaria alternata*: a) izolacija patogena iz semena na filter papir; b) izgled kolonije na PDA podlozi; c) veštački zaraženi klijanci peršuna; d) negativna kontrola.

Figure 1. *Alternaria alternata*: a) isolation of the pathogen from seed on filter paper; b) colony appearance on PDA media; c) artificially inoculated parsley seedlings; d) negative control.

zomalne DNK Eukariota i poređenjem amplifikovanih fragmenata odabranih izolata (CC1, CC2 i CC3), sa korišćenim markerom (M), ustanovljeno je prisustvo fragmenata očekivane veličine oko 550 bp (Slika 2). Do amplifikacije nije došlo kod uzorka koji je predstavljao negativnu kontrolu (PCR smeša sa RNase-free vodom).

Nakon sekvencioniranja PCR produkata dobijenih amplifikacijom iz micelije uzorka CC1, CC2 i CC3, korišćenjem para prajmera ITS1/ITS4, konsenzus nukleotidne sekvence deponovane su u GenBank bazu podataka i dodeljeni su im pristupni brojevi KP822948, KP822949 i KP822950. BLAST analiza sekvenci fragmenata dužine 510 bp, pokazala je 100% nukleotidne identičnosti sa ITS rDNK sekvencama 31 izolata vrste *A. alternata* deponovanih u GenBank bazi podataka, među kojima su sekvence pod pristupnim brojevima KF293886, KF293963, KF293964 poreklom iz Kine i KJ526174, KJ526175 poreklom iz Turske.

Molekularne metode kao savremen pristup u identifikaciji biljnih patogena imaju veliku prednost u primeni za preciznu identifikaciju, karakterizaciju, utvrđivanje strukture populacije, određivanje puteva introdukcije i drugih brojnih



Slika 2. Elektroforetska analiza PCR proizvoda dobijenih korišćenjem para prajmera ITS1/ITS4. Kolone: M- MassRulerTMDNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences GmgH, Lithuania); 1- izolat CC1; 2- izolat CC2; 3- izolat CC3; B- negativna kontrola (PCR smeša sa RNase-free vodom).

Figure 2. Electrophoretic analysis of PCR products obtained using primer pair ITS1/ITS4. Lanes: M- Mass-Ruler™DNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences GmgH, Lithuania); 1- isolate CC1; 2- isolate CC2; 3- isolate CC3; B- negative control (PCR mix with RNase-free water).

aspekata filogeografije i epidemiologije različitih patogena. Zbog visoke osetljivosti i specifičnosti, ove metode predstavljaju značajno poboljšanje u dijagnostici oboljenja koje prouzrokuju fitopatogene gljive. Sekvencioniranje većeg broja izolata i uključivanje dodatnih delova genoma doprineće boljem poznavanju strukture populacije *A. alternata*, a takođe predstaviće uvod u bližu genetičku karakterizaciju i služiće za brzo i lako razlikovanje morfološki sličnih vrsta unutar roda *Alternaria* patogena za kim u Srbiji.

U cilju smanjenja šteta od fitopatogenih gljiva roda *Alternaria* i toksičnih metabolita koje luče, moraju se preduzeti naporu u očuvanju zdravstvenog stanja semena kima, najpre poboljšanjem uslova gajenja, skladištenja i transporta. Stalne mikološke i toksikološke kontrole sve više su neophodne kako bi se smanjio rizik od upotrebe zaraženog semena kima, kao setvenog materijala ili ploda korišćenog za ishranu.

ZAHVALNICA

Ova istraživanja finansirana su u okviru Projekta TR 31018 Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

LITERATURA

- Agrios, G. N. (2005): Plant pathology. Fifth edition. Elsevier Academic Press, Burlington, San Diego, London, pp. 1-922.
- Bercu, R. and Broască, L. (2013): Comparative histoanatomical aspects of the fruit of some Apiaceae Lindl. Fruit used for therapeutic purposes. *Annals of RSCB*, 17: 265-270.
- Bulajić, A. (2006): Identifikacija i taksonomski međuodnos vrsta roda *Alternaria* Ness patogenih za povrtarske i začinske biljke familije Apiaceae u Srbiji. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Beograd, str. 1-134.
- Evenhuijs, A., Verdam, B., Gerlagh, M., et al. (1995): Studies on major diseases of caraway (*Carum carvi*) in the Netherlands. *Industrial Crops and Products*, 4: 53-61.
- Gabler, J. (2001): Approaches to resistance breeding of annual caraway (*Carum carvi* L. var. *annum*) to umbel browning. *Beitrag zur Zuchtungs-forschung der BAZ*, 1: 21-25.
- Gamliel, A., Yarden, O. (1998): Diversification of Diseases Affecting Herb Crops in Israel. Accompanies the Increase in Herb Crop Production. *Phytoparasitica*, 26: 53-58.
- Gupta, A., Dubey, M., Parmar, M., Mahajan, S., Sharma, R. (2011): Evaluation of Antimicrobial activity of *Carum Carvi* (Seeds) extract against *E. coli* and *Aspergillus niger*. *Drug Invention Today*, 3: 211-213.
- Konstantinova, P., Bonants, P. J. M., van Gent-Pelzer, M. P. E., van der Zouwen, P., van den Bulk, R. (2002): Development of specific primers for detection and identification of *Alternaria* spp. in carrot material by PCR and comparison with blotter and plating assays. *Mycological Research*, 106: 23-33.
- Kwasna, H. (1992): Occurrence of *Alternaria* Species in Poland. In *Alternaria Biology, Plant Diseases and Metabolites, Topics in Secondary Metabolism - Volume 3*, ed. by Chelkowski, J. and Visconti, A., Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, pp. 301-336.
- Machowicz-Stefaniak, Z. (2009): The occurrence and biotic activity of *Phomopsis diachenii* Sacc. *Acta Agrobotanica*, 62: 125-135.
- Mačkinaitė, R. (2010): Fungy diversity on wild and cultivated common caraway (*Carum carvi* L.) seeds. *Žemdirbystė=Agriculture*, 97: 73-84.
- Mačkinaitė, R. (2011): Internal mycobiota of wild and cultivated common caraway (*Carum carvi* L.) seeds. *Žemdirbystė Agriculture*, 98: 183-194.
- Mazur, S. and Nawrocki, J. (2004): Fungal diseases threat on caraway plantations in the south region of Poland. *Acta Fytotechnica et Zootechnica*, 7: 201-203.
- Muntanola-Cvetković, M. (1987): Opšta mikologija, Niro Književne novine, Beograd, pp. 13-320.
- Odstričilová, L. (2007): Changes in the occurrence of mycoflora on caraway seeds after fungicide application. *Plant Protection Science*, 43: 146-150.
- Pryor, B. (2003): *Alternaria* online. University of Arizona. <http://ag.arizona.edu/PLP/alternaria/online/>
- Pryor, B. M., Gilbertson, R. L. (2002): Relationships and taxonomic status of *Alternaria radicina*, *A. carotiincultae* and *A. petroselini* based upon morphological, biochemical and molecular characteristics. *Mycologia*, 94: 49-61.

Rodeva, R. and Gabler, J. (2004): First report of *Phomopsis diachenii* in Bulgaria. *Mycologia Balcanica*, 1: 153-159.

Singh, A., Dubey, N. K. (2012): An ethnobotanical study of medicinal plants in Sonebhadra District of Uttar Pradesh, India with reference to their infection by foliar fungi. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6: 2727-2746.

Singh, K., Frisvad, J. C., Thrane, U., Mather, S. B. (1991): An Illustrated Manual on Identification of Some Seed-borne *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* and their mycotoxins. Jordbugsforlaget Frederiksberg, Denmark, pp. 133.

Strandberg, J. O. (1987): Isolation, storage and inoculum production methods for *A. dauci*. *Phytopathology*, 77: 1008-1012.

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.

Yu, H. S. (1992): Occurrence of *Alternaria* species in Counties of the Far East and Their Taxonomy. In *Alternaria Biology, Plant Diseases and Metabolites, Topics in Secondary Metabolism - Volume 3*, ed. by Chelkowski, J. and Visconti, A., Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, pp. 37-62.

(Primljeno: 19.11.2014.)
(Prihvaćeno: 16.12.2014.)

MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR IDENTIFICATION OF *ALTERNARIA ALTERNATA* - CARAWAY FRUITS PATHOGEN IN SERBIA

DANIJELA RISTIĆ¹, MILICA AĆIMOVIĆ², NENAD TRKULJA¹

¹*Institute for Plant Protection and Environment, Belgrade*

²*University of Belgrade - Faculty of Agriculture, Belgrade*
e-mail: ristidaca@yahoo.com

SUMMARY

During 2013, samples of infected seed grown caraway were collected from commercial-ly grown crops in the experimental field in Mošorin and analyzed for the presence of plant pathogenic fungi. In all samples of seeds, weaker germination and a high seed infection 100%, with phytopathogenic fungi of the genus *Alternaria*, was found. From the infected caraway seed, monosporial cultures, based on morphology, were identified as *Alternaria alternata*, and their pathogenicity proved on artificially inoculated caraway and parsley seedlings. Molecular identification was performed utilizing polymerase chain reaction (PCR) with primer pair ITS1/ITS4 and by amplification of the ITS region of ribosomal DNA. Gene sequences of selected isolates CC1 (KP822948), CC2 (KP822949) i CC3 (KP822950) exhibited 100% nucleotide identity with the sequences of 31 isolates of *A. alternata* deposited in the GenBank. The presence of a large number of phytopathogenic fungi on caraway seed should be further investigated in order to clarify their relationships and relative significance.

Key words: caraway, *Alternaria alternata*, molecular identification, morphological features, pathogenicity test

(Received: 19.11.2014.)

(Accepted: 16.12.2014.)

UTICAJ DRUGIH ĐUBRIVA I SPECIJALNIH PROIZVODA NA HORTIKULTURNE BILJKE 2. PRINOS, POMOLOŠKE I BIOHEMIJSKE KARAKTERISTIKE PLODOVA JABUKA

HADI WAISI¹, BOGDAN NIKOLIĆ², VLADAN JOVANOVIĆ³,
SANJA ĐUROVIĆ², ZORAN MILIĆEVIĆ²

¹Institut za vodoprivredu "Jaroslav Černi", Beograd

²Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Beograd

³Institut za pesticide i zaštitu životne sredine, Beograd
e-mail: bogdannik@mail2world.com

REZIME

Ogled je zasnovan 19.05.2014. u voćnjaku sa 18 godina starim stablima jabuke (*Malus domestica* L.; cv. „Idared“), po blok sistemu i pri gustini od 1300 stabala/ ha. Tretmani po blokovima su bili: Kontrola (bez tretmana), „Eco-Fus“ (đubrivo na bazi ekstrakta algi), „Vegard“, „Calbit-C“, „Zircon“, „Cropmax“, (sva đubriva na bazi biljnih ekstrakata), „Chitosan“ (homeopatski proizvod na bazi ekstrakta morskih školjki), pri čemu su đubriva rastvarana u vodi. Uzorci za biohemijsku analizu (određivanje pH vrednosti i koeficijenta refrakcije ekstrakta pulpe ploda jabuke) uzimani su četiri puta, sve do procene prinosa. Prinos je procenjivan brojanjem plodova na stablima u svakom blok-tretmanu, posle čega je sledilo uzorkovanje većeg broja plodova po blok-tretmanu, merenje težina plodova i multiplikacija težine sa brojem plodova po stablu, radi procene prinosa po stablu i po standardnoj površini (ha). Sva testirana đubriva u datim agroekološkim uslovima značajno su uvećala prinos jabuka odnosno kontrole (od +28.93% („Calbit-C“), do +253.26% („Chitosan“) po stablu, tj. (od +26.52% („Calbit-C“), do +253.27% („Chitosan“) po standardnoj površini (ha). Srednja masa plodova nije značajnije varirala između tretmana, ali broj plodova po stablu jeste, zavisi od tretmana, posebno u slučaju đubriva „Chitosan“. Vidno je da tip đubriva utiče na koeficijent refrakcije ekstrakta pulpe plodova, posebno u slučaju đubriva „Eco-Fus“.

Ključne reči: jabuka, nestandardna đubriva (biljni ekstrakti, homeopatske materije), prinos, komponente prinosa (kvalitativne i kvantitativne)

UVOD

Jedan od najbržijih i najefektivnijih načina uvećanja kvalitativnih i kvantitativnih karakteristika prinosa jabuka je folijarna prihrana. Tako plodovi brzo dobijaju slabo pokretne sekundarne i mikroelemente, pri čemu se biljke takođe štite od sredinskih stresova u osetljivim razvojnim stadijumima. Pored klasičnih đubriva sa osnovnim, sekundarnim u mikroelementima u srpskom voćarstvu primenjuju se odskora i tzv. druga đubriva i specijalni proizvodi (Anonymus, 2009). Pored poznatih đubriva tog tipa

na bazi aminokiselina i huminskih kiselina, u našoj praksi započeto je sa korišćenjem i nestandardnih proizvoda na bazi biljnih ekstrakata i homeopatskih materija. Ova đubriva, iako standardizovana, nemaju neki uniformisan sastav, niti način dejstva, pa pri njihovoj primeni valja prići posle proveravanja. No, dosadašnja iskustva ukazuju ona mogu pomoći biljkama tokom proleća, kada su variranja agroekoloških prilika znatna, a voće se nalazi u osetljivim razvojnim fazama. U tom smislu proveravan je uticaj nekih od ovih đubriva na kvalitativne i kvantitativne karakteristike prinosa jabuka tokom drugog dela sezone u

2014 g., pri čemu je u prvom delu sezone bilo obilatih padavina.

MATERIJAL I METODE

Ogled je zasnovan 19.05. 2014. u voćnjaku preduzeća "PKB-Agroekonomik", Padinska Skela (okolina Beograda, Srbija), na 18 godina starim stablima jabuke (*Malus domestica* L.; cv. „Idared“), po blok sistemu (10-12 stabala po tretmanu) (Slika 1.), pri gustini od 1300 stabala/ ha. Folijarni tretmani (19.05. i 03.06. 2014) po blokovima su bili: Kontrola (bez tretmana), "Eco-Fus" (45 ml/ bloku; ekstrakt alge *Fucus vesiculosus*: N - 1,8%; P₂O₅ - 1,0%; K₂O - 2,0%), "Vegard" (48 ml/ bloku; ekstrakt biljke *Camellia japonica*: N- neorganski - 0,40%; P₂O₅ - 0,60%; K₂O - 1,0%; aminokiseline - 1-2%; huminske i fulvo kiseline - 20%; ostale organske materije - do 20%), "Calbit-C" (20 ml/ bloku; kiseli ekstrakt piljevine iz drvne industrije: CaO kompleksovan sa amonijum lignin sulfonatom (LSA) - 15%; Corg - 4,5%), "Circon" (2,4 ml/ bloku; ekstrakt lekovite biljke *Echinacea purpurea*: 0,1 g/ l polifenolnih (kafeična, hlorogena, cinamična) kiselina), "Cropmax" (40 ml/ bloku; ekstrakt melase šećerne trske: Ntot - 1,7%; aminokiseline - 2,0%; Corg - 2,0%) (sva đubriva su na bazi biljnih ekstrakata), "Chitosan" (8 ml/ bloku; homeopatski proizvod na bazi ekstrakta morskih školjki: hitosan - 0,5%; Corg - 3-4%; Norg - 2-5%; aminokiseline - 5%; huminske kiseline - 10%), svi tretmani rastvarani su u 8 l vode/ bloku. Uzorci za biohemijsku analizu (određivanje pH vrednosti (pH-metar "WTW", Germany) i koeficijenta refrakcije (refraktometar "Atago", Japan) ekstrakta pulpe ploda jabuke) uzimani su 19.05., 03.06., 02.07. i 09.09. 2014., kada je procenjivan prinos. Uzorci su pripremani tako što je pravljen srednji uzorak od 125 g pulpe ploda jabuke, koji je uravnotežavan sa 75 g vode, posle čega je tkivo macerirano u mašinskom blenderu. U tako dobijenom ekstraktu direktno je određivana nekorigovana pH vrednost na sobnoj temperaturi. Za određivanje koeficijenta refrakcije (stepeni po Brix-u; %) uzimani su iz ekstrakta 2-3 kapi i nanošene na refraktometar (prethodno baždaren), posle čega je direktno očitavana nekorigovana vrednost koeficijenta refrakcije. Korigovana (na 25°C) vrednost koeficijenta refrakcije dobija se korigovanjem ishodne vrednosti putem temperaturnih korekcionih faktora iz tablica proizvođača refraktometra. Prinos je procenjivan brojanjem plodova na stablima u svakom blok-tretmanu, posle čega je sledilo uzorkovanje većeg broja plodova (2 ploda po stablu, tj. 20 i više po blok-tretmanu) po blok-tretmanu, merenje težina plodova i njihova

multiplikacija sa brojem plodova, po odgovarajućem stablu i blok-tretmanu, radi procene prinosa po stablu i po standardnoj površini (ha).

REZULTATI I DISKUSIJA

U Tabeli 1. dati su prosečni prinosi stablu (kg) i po standardnoj površini (t/ ha) u apsolutnim i relativnim (odnosno kontrole) vrednostima. Zapažamo da su svi primenjeni tretmani znatno i značajno uvećali prinos, od +28,93% (đubrivo "Calbit-C"), do +253,26% (đubrivo "Chitosan") po stablu, tj. (od +26.52% (đubrivo "Calbit-C"), do +253.27% (đubrivo "Chitosan") po standardnoj površini (ha) u datim agroekološkim uslovima. Posebno objašnjenje za dobijene rezultate nemamo, sem da biljke tokom sezone nisu bile limitirane vodom, jer su padavine u prvom delu sezone bile obilne, a u blizini voćnjaka se nalazio kanal koji je višak vode u vlažnom delu sezone odvodnjavao, dok je tokom leta voćnjak bio dobro snabdeven vodom iz njega.

U Tabeli 2. date su apsolutne i relativne vrednosti prosečne težine uzorkovanih plodova, kao i broj plodova po stablu u blok-tretmanu. Intencija uzorkovanja je bila da se biraju reprezentativni plodovi (2 po drvetu), sa srednje visine stabla (2-2,5 m) i sa svakog stabla u blok tretmanu. Takav pristup doveo je do toga da prosečna težina ploda jabuka u ovom ogledu ne varira značajno, tako da se ta pomološka osobina ne može uzeti kao presudna u zapaženim razlikama u veličini prinosa (Tabela 1). Evidentiranjem broja plodova po stablu u blok-tretmanu, utvrđene su veoma značajne razlike između različitih tretmana (Tabela 2).

Zapažano je, da je broj plodova po stablu u blok-tretmanu varira od +24,90% (đubrivo "Calbit-C"), do +262,72% (đubrivo "Chitosan") više odnosno kontrole. Broj plodova po stablu zavisi od niza faktora, od kojih ističemo uspešnost oplodjenja cvetova, zatim apscizija cvetova i nezrelih plodova. Na osnovu praćenih parametara ne može se izvući konkluzivan zaključak, sem da uspešnost oplodjenja cvetova veoma zavisi od ishrane nekim mikroelementima (B pre svega: Blevins and Lukaszewski, 1998; Wojcik et al., 2003), dok nalivanje plodova veoma zavisi od ishrane sa K (Kastori, 1983; Marschner, 1995; Nešković i sar., 2003), a kvalitet plodova od ishrane sa Ca i Zn (Kastori, 1983; Marschner, 1995). Može se pretpostaviti da korišćena đubriva uvećavaju efikasnost usvajanja navedenih elemenata, ali su za konačan dokaz potrebni dodatni ogledi.

U Tabeli 3. date su nekorigovane pH vrednosti ekstrakta pulpe ploda jabuke od dana prvog

Slika 1. Shema ogleđa u jabuci (*Malus domestica* L., cv. „Idared“).
Figure 1. Scheme of trial in apple orchard (*Malus domestica* L., cv. „Idared“).

7: 11 stabala/ trees		6: 12 stabala/ trees		5: 4 stabla	
Prazan prostor / empty space		4: 11 stabala/ trees		5: 8 stabala/ trees	
3: 4 stabla/ trees		3: 8 stabala/ trees		2: 12 stabala/ trees	
Prazan prostor/ empty space		1/K: 6 stabala/ trees		Međupolje/ interfield	
1/K: 4 stabla/ trees					

Tretmani po blokovima: 1/1-3: Kontrola; 2/1-3: „Vegard“ (48 ml đubriva/ 8 l vode); 3/1-3: „Eko-Fus“ (45 ml đubriva/ 8 l vode); 4/1-3: „Calbit-C“ (20 ml đubriva/ 8 l vode); 5/1-3: „CHITOSAN“ (8 ml đubriva/ 8 l vode); 6/1-3: „Cirkon“ (2,4 ml đubriva/ 8 l vode); 7/1-3: Cropmax (40 ml đubriva/ 8 l vode).

Tabela 1. Prinos po stablu (kg) i po standardnoj površini (t/ ha).
Table 1. Yield on a tree (kg) and on standard plot (t/ ha).

Ogledna kombinacija/ Trial combination (treatment)	Procenjeni srednji prinos po stablu (kg)/ Assesed medium yield (kg) on a tree	Relativni prinos (%) po stablu/ Relative yield (%) on a tree	Procenjeni prinos (t/ ha) po standardnoj površini/ Assesed yield (t/ ha) on standard plot	Relativni prinos (%) po standardnoj površini / Relative yield (%) on standard plot
1	15,984±5,978	100	20,779	100
2	27,789±9,476	173,86	33,959	163,43
3	37,568±4,854	235,04	48,839	235,04
4	20,222±2,235	128,93	26,289	126,52
5	56,465±13,161	353,26	73,405	353,27
6	34,833±6,363	217,92	45,391	218,45
7	30,527±9,813	190,98	39,685	190,99

Tabela 2. Prosečna težina (g) i broj plodova po stablu u blok-tretmanu.
Table 2. Medium weight (g) and number of apple fruit on a trees in the blocks.

Ogledna kombi- nacija/ Trial combination (treatment)	prosečna težina ploda u bloku (g)/ Medium fruit weight (g) in the block	Relativna vrednost (%) prosečne težine ploda u bloku odnosno kontrole/ Relative fruit weight (%) in the block	Broj plodova po stablu u bloku/ Numbers of fruits on a apple trees in the block	Relativni (%) broj plodova po stablu u bloku odnosno kontrole/ Relative (%) numbers of fruits on a apple trees in the block
1	217,44±31,33	100	73,5±27,5	100
2	222,61±39,46	102,38	124,8±42,6	169,80
3	228,96±26,05	105,30	164,1±21,2	223,27
4	220,24±42,82	101,29	91,8±10,1	124,90
5	211,81±32,93	97,41	266,6±62,1	362,72
6	202,81±42,37	93,27	171,8±31,4	233,74
7	217,91±37,98	100,22	140,1±45,0	190,61

Tabela 3. Nekorigovane pH vrednosti ekstrakta pulpe ploda jabuke.
Table 3. Non-corrected pH values of the extracts of a apple fruit pulp.

Ogledna kombinacija/ Trial combination (treatment)	Uzorkovano dana/ Days of picking of fruits from a apple trees			
	19.05.2014.	03.06.2014.	02.07.2014.	09.09.2014.
1	3,29	3,09	3,13	3,28
2	-	3,10	3,14	3,33
3	-	3,12	3,13	3,23
4	-	3,90	3,18	3,29
5	-	3,11	3,11	3,26
6	-	3,05	3,12	3,17
7	-	3,10	3,11	3,25

Tabela 4. Korigovane vrednosti (u odnosu na t=25°C) koeficijenta refrakcije (stepeni po Brix-u; %) ekstrakta pulpe ploda jabuke.

Table 4. Corrected values (related to t=25°C) of refraction coefficient (% of Brix) of the extracts of a apple fruit pulp.

Ogledna kombinacija/ Trial combination (treatment)	Uzorkovano dana/ Days of picking of fruits from a apple trees			
	19.05.2014.	03.06.2014.	02.07.2014.	09.09.2014.
1	5,01	4,75	4,42	6,94
2	-	5,07	5,02	5,34
3	-	4,88	5,02	7,94
4	-	5,07	5,02	6,54
5	-	5,00	4,55	5,34
6	-	5,07	4,35	6,74
7	-	4,87	4,55	6,54

tretmana, pa tokom oglada u odgovarajućim intervalima. U tabeli 4 date su korigovane vrednosti (u odnosu na t=25°C) koeficijenta refrakcije (stepeni po Brix-u; %) ekstrakta pulpe ploda jabuke. Ono što se može zapaziti iz ovih rezultata jeste da je po prvom tretmanu ishodna pH vrednost ekstrakta pulpe ploda jabuke pala za oko 0,1-0,2 pH jedinice pri praktično svim tretmanima (sem za tretman 4, pri uzorkovanju 03.06. 2014. g.), da bi se na približno ishodnu pH vrednost vratilo tek na kraju oglada kad su plodovi brani (Tabela 3). Pošto pH vrednost pulpe jabuke uglavnom potiče od organskih kiselina kao prekursora u sintezi voćnih šećera, može se pretpostaviti da dati tretmani utiču na biohemijske procese u pulpi plodova jabuke, a time i na njihov kvalitet. No, radi potpune potvrde ove pretpostavke potrebni su dodatni ogledi u kojima bi bili praćeni i drugi parametri biohemijskih procesa u pulpi ploda jabuke. Zaključak je da navedeni tretmani nestandardnim folijarnim đubrivima u primetnoj meri menjaju biohemijske procese u pulpi ploda jabu-

ke, pri datim agroekološkim uslovima, posebno tokom početnih faza nalivanja plodova.

Sa ovim uveliko korespondiraju rezultati korigovanih vrednosti koeficijenta refrakcije (stepeni po Brix-u na 25°C; %) ekstrakta pulpe ploda jabuke (Tabela 4), što dodatno potvrđuje goreiznesene navode. Ukoliko ove nalaze uporedimo sa drugim našim rezultatima delovanja tzv. drugih đubriva i specijalnih proizvoda (Nikolić et al., 2010; Nikolić and Waisi, 2012; Stevanović et al., 2012) primetićemo takođe da su ova nestandardna đubriva pozitivno uticala na prinos, pa i zaštitu useva jabuka. U tom smislu pomenuta đubriva zavređuju znatno veću pažnju i proučavanje mehanizama i načina njihovog dejstva, da bi optimizovali njihovu primenu u proizvodnji bilja.

ZAHVALNICA

Istraživanja vezana za ovaj rad finansirana su sredstvima iz Projekta TR 31018 Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

LITERATURA

Anonymus (2009): "Pravilnik o uslovima za razvrstavanje i utvrđivanje kvaliteta sredstava za ishranu bilja, odstupanjima sadržaja hranljivih materija i o sadržini deklaracije i načinu obeležavanja sredstava za ishranu bilja", („Službeni Glasnik R Srbije“, 78/2009).

Blevins, D.G., and Krystina M. Lukaszewski (1998): Boron in Plant Structure and Function. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 49: 481-500.

Kastori, R. (1983): Uloga elemenata u ishrani biljaka. Matica srpska, Novi Sad, str. 350.

Marschner, H. (1995): Mineral Nutrition of Higher Plants. Second Edition, Academic Press, London, pp. 889.

Nešković, M., Konjević, R., Čulafić, Lj. (2003): Fiziologija biljaka. NNK Internacional, Beograd, Srbija i Crna Gora, str. 586.

Nikolić B., Ugrinović, M., Đurović, S., Zdravković, J., Milićević, Z. (2010): Uticaj drugih đubriva i specijalnih proizvoda na hortikulturene biljke. 1. Prinos i komponente prinosa jabuke i paradajza. Zaštita bilja, 61 (4): 301-313.

Nikolić, B., and Waisi, H. (2012): Effect of simultaneous application brassinosteroids and reduced doses of fungicides on pomological characteristics and yield of apple (*Malus domestica* L.). Proceedings of abstracts of 1st International Brassinosteroid Conference, Barcelona June 27 – 29., 2012, ed. AOPC/Brassinosteroid 2012, CSIC, Centre de Recerca en Agrigenòmica, Barcelona Spain, (USB device), pp. 44.

Stevanović, M., Trkulja, N., Nikolić, B., Dolovac, N., Ivanović, Ž. (2012): Effect of simultaneous application of brassinosteroids and reduced doses of fungicides on *Venturia inaequalis* in: Proceedings of International Symposium: Current Trends in Plant Protection, Belgrade 25-28. September 2012, pp. 379-384.

Wojcik P., Wojcik M., Treder, W. (2003): Boron absorption and traslocation in applerootstocks under conditions of low medium boron. Journal of Plant Nutrition, 26 (5): 961-968.

(Priljeno: 02.12.2014.)
(Prihvaćeno: 30.12.2014.)

THE IMPACT OF OTHER FERTILIZERS AND SPECIAL PRODUCTS ON HORTYCULTURAL CROPS

2. YIELD, POMOLOGICAL AND BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF APPLE FRUITS

HADI WAISI¹, BOGDAN NIKOLIĆ², VLADAN JOVANOVIĆ³,
SANJA ĐUROVIĆ², ZORAN MILIĆEVIĆ²

¹*Institute for the Development of Water Resources "Jaroslav Černi", Belgrade, Serbia*

²*Institute of Plant Protection and Environment, Belgrade, Serbia*

³*Institute of Pesticides and Environmental Protection, Belgrade, Serbia*

e-mail: bogdannik@mail2world.com

SUMMARY

One way of fast and effective impact on yield, pomological and biochemical properties of apple fruits is foliar fertilization. Thus, the fruit efficiently recharge poorly mobile secondary and micronutrients, and so the plant protects against environmental stress in sensitive developmental stages. The last hypothesis we checked during the second part of the growing seasons of 2014, which were characteristic of abundant precipitation during the first part of the season. The experiment was set in 19th May 2014, in the 18 years old apple (*Malus domestica* L. cv. „Idared“) orchard by a block system (10-12 trees per treatment), at a density of 1300 trees per ha. Treatments (19th May and 3rd Jun of 2014) per blocks were: control, “Eco-Fus” (45 ml; based on algae extract), “Vegard” (48 ml), “Calbit-C” (20 ml), “Zircon” (2,4 ml), “Cropmax” (40 ml), (all based on plant extracts), “Chitosan” (8 ml; based on shellfish extract), all dissolved in 8 l of water. The samples for biochemical analysis (determination the pH value and coefficient of refraction of the fruit extracts) were taken on 19th May, 3rd June, 2nd July, and on 9th September, when estimated yield. The yield was estimated by counting fruits on the tree in each block-treatment, followed by sampling a large number of fruits (20 and over), measuring their weight and multiplication, in order to estimate the yield per tree and per ha. All of the tested fertilizers in the given conditions are significantly higher estimated yield than in the control plants. Estimated yield of treated plants increased from +28.93% (“Calbit-C” fertilizer) to +253.26% (“Chitosan” fertilizer) per tree, ie. from +26.52% (“Calbit-C” fertilizer) to +253.27% (“Chitosan” fertilizer) per hectare, all relative to control. The average fruit weight was not significantly varied between treatments (200-230 g), but the number of fruits per tree is very influenced by the type of fertilizer, particularly in the case of “Chitosan” fertilizer. It should be noted that the type of fertilizer affects the coefficient of refraction of the fruit extracts, particularly in the case of “Eco-Fus” fertilizer.

Key words: apple, non-standard fertilizers (plant extracts, homeopathic compounds), yield, yield components (qualitative and quantitative)

(Received: 02.12.2014.)

(Accepted: 30.12.2014.)

Zaštita bilja
Vol. 65 (4), N°290, 176-180, 2014, Beograd
Plant Protection
Vol. 65 (4), N°290, 176-180, 2014, Belgrade

UDK: 634.232-235

Kratko saopštenje
Short communication

***PSEUDOMONAS SYRINGAE* - PROUZROKOVAČ NEKROZE PLODOVA TREŠNJE**

VELJKO GAVRILOVIĆ¹, STEFAN STOŠIĆ², MILOŠ STEVANOVIĆ¹

¹Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Beograd

²Stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije
e-mail: vgavrilo@yahoo.com

REZIME

U radu su prikazani rezultati proučavanja sojeva bakterija izolovanih iz nekrotičnih plodova trešnje sorte Samit (područje Šapca). Nekroza zahvata u proseku oko 1/3 ploda koji potpuno gubi tržišnu vrednost. Bolešću biva zahvaćeno oko 30% plodova. Primenom standardnih bakterioloških metoda (izolacijom na hranljivim podlogama), proverom patogenosti i proučavanjem bakterioloških karakteristika, zaključeno je da pomenute simptome prouzrokuje fitopatogena bakterija *Pseudomonas syringae*, široko rasprostranjen patogen naročito koštičavih voćaka.

Cljučne reči: trešnja, nekroza ploda, *Pseudomonas syringae*, patogenost, bakteriološke odlike

Simptomi nekroze plodova trešnje (sorta Samit), zapaženi su posle perioda obilnih padavina tokom 2014. godine. Procenat obolelih plodova je bio oko 30%. Simptomi se ispoljavaju u vidu mrkih nekrotičnih, naboranih pega, koje zahvataju 1/3 ploda. (Slika 1). Slične simptome na plodovima trešnje može prouzrokovati i fitopatogena gljiva *Monilinia* spp., ali je zapaženo odsustvo fruktifikacije na obolelim plodovima, što ukazuje da bi prouzrokovalac bolesti mogao biti i druge prirode. S obzirom da i fitopatogene bakterije roda *Pseudomonas* mogu prouzrokovati slične simptome (Sutton and Jones, 1996), cilj rada je bio da se utvrdi prouzrokovalac ove bolesti, koji na osnovu zapažanja u zasadu trešnje može naneti velike štete.

Oboleli plodovi trešnje prikupljeni su polovinom maja, a izolovanje patogena je izvršeno na podlozi King B i hranljivoj podlozi (hranljivi agar, Torlak) obogaćen sa 5% saharoze (NAS). Patogenost dobijenih sojeva je proverena inokulacijom plodova trešnje i inokulacijom listova duvana (HR), (Lelliott and Stead, 1987; Arsenijević, 1997). Plodovi trešnje su inokulisani injektiranjem suspenzije bakterije (10^7 cfu), medicinskim špricom neposredno ispod epidermisa ploda. Inokulisani su plodovi sorte

Samit, na kojoj su i primećeni simptomi bolesti i sorte Sambarst koja sazrava polovinom juna i čiji su plodovi u vreme inokulacije bili potpuno zeleni. Inokulisano je po tri ploda svakim sojem. Plodovi su posle inokulacije odlagani u plastične kutije obložene vlažnim filter papirom, radi održavanja optimalne vlažnosti neophodne za razvoj patogena.

Od bakterioloških odlika proučene su: reakcija po Gramu, O/F test, aktivnost oksidaze, arginin-dehidrolaze i aktivnosti pektolitičkih enzima inokulisanim kriškama krompira (LOPAT test), (Lelliott et al., 1966; Arsenijević, 1997). Kao kontrolni soj pri ovim ispitivanjima korišćen je *P.syringae* - CFBP 11, poreklom iz Nacionalne kolekcije fitopatogenih bakterija u Francuskoj.

Posle tri dana razvoja na King B podlozi se pojavljuju bakterijske kolonije bele boje, ravnih ivica, blago ispupčene, koje stvaraju fluorescentni pigment. Na podlozi obogaćen saharozom (NAS) nakon tri dana patogen formira izrazito ispupčene kolonije, prečnika oko 3 mm, sluzaste, (levan tipa).

Nekroza mrke boje i naborane površine, pojavljuje se na inokulisanim plodovima posle 3 dana i po izgledu odgovara nekrozi primećenim pri prirodnim infekcijama. Identični simptomi su zabeleženi

Tabela 1. Patogene i bakteriološke odlike proučavanih sojeva.
Tabela.1. Pathogenic and bacteriological investigated strains.

Test Tests	Proučavani izolati Investigated strains	Kontrolni soj CFBP 11 Check Strain CFBP 11
Patogenost-Pathogenicity	+	+
Plodovi trešnje-Cherry fruits		
Razlikovanje po Gramu Gram differentiation	-	-
O/F	O	O
Levan	+	+
Oksidaza-Oxidase	-	-
Pektinaza- Pectinase	-	-
Arginindehidrolaza Arginin dehidrolase	-	-
HR duvana – HR in tobacco	+	+
Furescentnost- Fluorescence	+	+

*+ pozitivno; positive , - negativno; negative; o oksidativni metabolizam glukoze; oxidative



Slika 1. Nekroza plodova trešnje - prirodna infekcija.
Figure 1. Sweet cherry fruit necrosis - natural infection.



Slika 2. Veštačka inokulacija plodova trešnje: kontrola (levo), nekroza na plodu sorte Samit (sredina), nekroza na plodu sorte Sambarst (desno).
Figure 2. Artificial inoculation sweet cherry fruits: check (left), necrosis on fruit cv. Summit (middle), necrosis on fruit cv. Sumberst (right).

na obe inokulisane sorte trešnje (Slika 2).

Proučavani izolati su Gram negativni, fluoresciraju na King-ovoj podlozi B i odlikuju se aerobnim (oksidativnim) metabolizmom glukoze; stvaraju levan ali ne i oksidazu, arginin dehidrolazu i pektolitičke fermente; prouzrokuju HR duvana (cv. Samsun). Pri svim navedenim testovima se ponaša i kontrolni soj *Pseudomonas syringae* (CFBP 11). Na osnovu ovih rezultata zaključeno je da pomenute patološke promene na plodovima trešnje prouzrokuju pomenuta bakterija (Tabela 1).

Fitopatogena bakterija *Pseudomonas syringae* parazitira koštičave i jabučaste voćke, ali je zabeležena i kao patogen maline. U Srbiji je eksperimentalno potvrđena kao patogen kajsijske trešnje, višnje, šljive breskve, kruške, jabuke i maline. Simptomi bolesti se ispoljavaju u vidu sušenja grana (kajsijska i šljiva), nekroze pupoljaka (trešnja, breskva i šljiva), nekroze cvasti (kruška), plamenjača mladara (malina), (Gavrilović et al., 2004; Gavrilović, 2009; Ivanović, 2011; Gavrilović et al., 2012). Međutim i pored tako širokog kruga domaćina, ekonomske štete variraju u zavisnosti od vrste voćke i meteoroloških uslova. Najveće štete u Srbiji do sada su zabeležene na kajsijski, što je rezultiralo sušenjem čitavih stabala, potom na plodovima nekih sorata višnje (Hajmanov rubin i Keleris). Simptomi nekroze ploda nisu primećeni na sorti višnje Oblačinska (Arsenijević, 1980; Gavrilović, 2009).

Nekroza plodova trešnje se tokom 2014. godine pojavila posle izuzetno kišnog perioda, koji je praćen neobičajeno niskim temperaturama za ovaj period godine (prva dekada maja). Smatramo da je infekcija nastala usled visoke vlažnosti i nižih temperatura. Ova bakterija poseduje svojstvo da se pri

nižim temperaturama uspešnije razvija i širi, nego pri uobičajenim vremenskim uslovima za ovo doba godine (Klement, 1977; Spots and Cervantes, 1996; Arsenijević, 1997). Izvor inokuluma može biti epifitna populacija bakterije koja se razvija na listovima i cvetovima voćaka bez ispoljavanja simptoma bolesti (Lattore and Jones, 1979).

Proučeni izolati ispoljavaju uobičajene karakteristike *P. syringae*. Izolacija je podjednako uspešna na obe korišćene podloge (King B i NAS) i one se preporučuju za izolovanje bakterija roda *Pseudomonas* (Gavrilović, 2009). Rezultati LOPAT testova takođe ukazuju da proučavani izolati ispoljavaju tipične karakteristike ove bakterije, tako da, iako davno ustanovljeni (Lelliot et al., 1966) i dalje se, pored savremenih molekularnih metoda, koriste pri detekciji ove bakterije, (Bultreys and Kaluzna, 2010; Brown-Kiewnicki and Sands, 2011).

Dalja proučavanja izolovanih sojeva poreklom iz ploda trešnje obuhvatiće primenu diferencijalnih testova, na osnovu kojih se oni mogu detektovati do nivoa patogenih varijeteta *P. syringae* (*syringae* i *mors-prunorum*). Ova istraživanja uključuju inokulacione testove, biohemijske karakteristike (GATT), korišćenje REP-PCR i BOX prajmera, kao i onih za detekciju gena za produkciju siringomicina i koronatina (Bultreys and Kaluzna, 2010; Ivanović, 2011; Ivanović et al., 2012).

ZAHVALNICA

Istraživanja čiji su rezultati prikazani u ovom radu su realizovana zahvaljujući projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, TR 31018.

LITERATURA

- Arsenijević, M. (1980): Bakteriozno izumiranje kajsijske. Zaštita bilja 154 : 393-404.
- Arsenijević, M. (1997): Bakterioze biljaka. III izmenjeno i dopunjeno izdanje. S-Print, Novi Sad, 576 p.
- Bultreys A., Kaluzna M. (2010): Bacterial cankers caused by *Pseudomonas syringae* on stone fruit species with special emphasis on the pathovars *syringae* and *morsprunosrum* race 1 and race 2. Journal of Plant Pathology 92: (1, Supplement): 21-33.
- Brown-Kiewnick, A. and Sands D.C. (2001): *Pseudomonas*. In: Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. (Eds. N. Schaad, J. B. Jones, and W.Chun), 84-117. APS PRESS The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota.
- Gavrilović, V. (2009): *Pseudomonas syringae* – patogen voćaka u Srbiji. Pestic. Phytomed. 24(3): 153-163.
- Gavrilović, V., Milijašević, S. Arsenijević, M. (2004): *Pseudomonas syringae* parazit maline u Srbiji. Jugoslov-

ensko Voćarstvo, Vol. 38, 147-148: 183-190.

Gavrilović, V., Živković, S., Dolovac, N., Trkulja, N., Pfaf-Dolovac, E., Popović, T., Ivanović, Ž. (2012): *Pseudomonas syringae*- pathogen of sweet cherry in Serbia. Pestic. Phytomed, 27(2), 141-149.

Ivanović, Ž. (2011): Molekularna karakterizacija prirodnih izolata bakterije *Pseudomonas syringae* i identifikacija agenasa za njihovu biološku kontrolu. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu . Biološki fakultet, pp.105.

Ivanović, Ž., Stanković, S., Živković, S., Gavrilović, V., Kojić, M., Fira, Đ. (2012): Molecular characterization of *Pseudomonas syringae* isolates from fruit trees and raspberry in Serbia. Eur.J. Plant. Pathology, 134: 191-203.

Jones, A.L., Sutton, T.B. (1996): Diseases of Tree Fruits in the East. Michigan State University.

Klement, Z. (1977): Bacterial Canker and Dieback Disease of Apricots (*Pseudomonas syringae* Van Hall). EPPO Bulletin Vol.7, No.1: 57-69.

Latorre, B., A., Jones A.L. (1979) : *Pseudomonas morsprunorum*, the cause of bacterial canker of sour cherry in Michigan, and its epiphytic association with *P. syringae*. Phytopathology. 69, 335-339.

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

Lelliott, R.A., Billing, Eve, Hayward, A.C.: (1966): A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic Pseudomonads. J.Appl. Bact., 29: 470-489.

Spotts, R.A., Cervantes, L.A. (1996): Factor affecting the severity of bacterial canker of pear caused by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. Plant Pathology, 44: 325-331.

(Primljeno: 17.11.2014.)
(Prihvaćeno: 12.12.2014.)

PSEUDOMONAS SYRINGAE - CAUSAL AGENT OF SWEET CHERRY FRUIT NECROSIS

VELJKO GAVRILOVIĆ¹, STEFAN STOŠIĆ², MILOŠ STEVANOVIĆ¹

¹Institute for Plant Protection and Environment, Belgrade, Serbia

²Scholar of Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia
e-mail: vgavrilo@yahoo.com

SUMMARY

Severe symptoms of necrosis sweet cherry fruits was recorded during 2014. in region of Šabac. About 30 % of fruits (cv. Summit) were affected and necrosis cover 1/3 of fruit surface in average. Gram negative, fluorescent, oxidative bacterial strains were isolated from diseased tissues. Symptoms similar to those, observed in natural infection were recorded on artificial inoculated cherry fruits (cv. Summit and cv. Summbarst). Isolated strains were HR positive, oxidase, pectinase, arginin dehidrolase negative and levan positive (LOPAT +---+). Same characteristics also own check strains *Pseudomonas syringae* (CFBP 11). According obtained results it was concluded that necrosis of sweet cherry fruits is caused by *Pseudomonas syringae*. Further characteristic in order proper detection of pathogens, including molecular methods are underway.

Key words: sweet cherry, fruit necrosis, *Pseudomonas syringae*, pathogenicity, bacteriological characteristics

(Received: 17.11.2014.)

(Accepted: 12.12.2014.)

UPUTSTVO AUTORIMA

Časopis "Zaštita bilja" objavljuje naučne radove, pregledne radove i kratka 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 (1)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 ubrzavate objavljivanje svog rada i doprineti kvalitetu časopisa.

INSTRUCTION TO AUTHORS

The "Plant Protection" publishes scientific papers, review papers and short communications 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

