

# ZAŠTITA BILJA PLANT PROTECTION





INSTITU 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 Dražzera 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

---



*Dictyophara europaea* – potencijalni vektor stolbur fitoplazme u vinogradima  
*Dictyophara europaea* – potential vector of stolbur phytoplasma in vineyards

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

Dr Nenad Dolovac, Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu

---

**Urednici – Editors**

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

---

**Redakcioni odbor – Editorial Board**

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

---

## SADRŽAJ

### Naučni radovi

- Katarina Gašić, Milan Ivanović, Anđelka Prokić,  
Nemanja Kuzmanović, Maja Ignjatov, Aleksa Obradović*  
IZOLACIJA BAKTERIOFAGA I NJIHOVA PRIMENA U DIFERENCIJACIJI  
SOJEVA XANTHOMONAS SPP..... 62-75
- Svetlana Živković, Veljko Gavrilović, Nenad Trkulja, Dušica Delić, Saša Stojanović*  
FIZIOLOŠKA ISPITIVANJA IZOLATA COLLETOTRICHUM SPP. ....76-92
- Dušica Delić, Olivera Stajković-Srbinović, Svetlana Živković,  
Nada Protić, Nataša Rasulić, Đorđe Kuzmanović, Aleksandar Simić*  
UNAPREĐENJE RASTA ITALIJANSKOG LJULJA  
(*LOLIUM MULTIFLORUM LAM.*) PRIMENOM PGP RIZOBAKTERIJA .....93-99
- Dragana Marisavljević, Danijela Pavlović, Petar Mitrović*  
EFIKASNOST NA KOROVE I MOGUĆA FITOTOKSIČNOST NA USEV OZIME  
ULJANE REPICE NAKON PRIMENE ZEMLJIŠNIH HERBICIDA .....100-107
- Oliver Krstić, Sanja Radonjić, Snježana Hrnčić, Tatjana Cvrković,  
Milana Mitrović, Andrea Kosovac, Ivo Toševski, Jelena Jović*  
DIVERZITET FAUNE AUCHENORRHYNCHA U VINOGRADIMA CRNE GORE .....108-113

## CONTENTS

### Scientific papers

- Katarina Gašić, Milan Ivanović, Anđelka Prokić,  
Nemanja Kuzmanović, Maja Ignjatov, Aleksa Obradović*  
ISOLATION OF BACTERIOPHAGES AND THEIR USE  
IN *XANTHOMONAS* SPP. DIFFERENTIATION .....62-75
- Svetlana Živković, Veljko Gavrilović, Nenad Trkulja, Dušica Delić, Saša Stojanović*  
PHYSIOLOGICAL STUDIES OF ISOLATES OF *COLLETOTRICHUM* SPP. ....76-92
- Dušica Delić, Olivera Stajković-Srbinović, Svetlana Živković,  
Nada Protić, Nataša Rasulić, Đorđe Kuzmanović, Aleksandar Simić*  
GROWTH PROMOTION OF ITALIAN RYEGRASS (*LOLIUM MULTIFLORUM* LAM.)  
BY APPLICATION OF PLANT GROWTH PROMOTING RHIZOBACTERIA .....93-99
- Dragana Marisavljević, Danijela Pavlović, Petar Mitrović*  
EFFICACY IN WEED CONTROL AND POSSIBLE PHYTOTOXICITY  
EFFECT OF HERBICIDES ON WINTER RAPESEED ..... 100-107
- Oliver Krstić, Sanja Radonjić, Snježana Hrnčić, Tatjana Cvrković,  
Milana Mitrović, Andrea Kosovac, Ivo Toševski, Jelena Jović*  
DIVERSITY OF THE AUCHENORRHYNCHA FAUN  
IN VINEYARDS OF MONTENEGRO .....108-113





Zaštita bilja

Vol. 63 (2), N<sup>o</sup> 280, 62-75, 2012, Beograd

UDK: 632.937.1;

57.063.9

Naučni rad

## IZOLACIJA BAKTERIOFAGA I NJIHOVA PRIMENA U DIFERENCIJACIJI SOJEVA *XANTHOMONAS* SPP.

KATARINA GAŠIĆ<sup>1</sup>, MILAN IVANOVIĆ<sup>2</sup>, ANĐELKA PROKIĆ<sup>2</sup>, NEMANJA KUZMANOVIĆ<sup>2</sup>,  
MAJA IGNJATOV<sup>3</sup>, ALEKSA OBRADOVIĆ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Beograd

<sup>2</sup>Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Beograd

<sup>3</sup>Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad

e-mail: gasickatarina@yahoo.com

### REZIME

Bakteriofagi predstavljaju posebnu grupu virusa čiji su domaćini bakterije. Usled nedostatka efikasnih baktericida i pojave rezistentnih sojeva bakterija prema većini do sada korišćenih antibiotika, primena faga kao bioloških agenasa u kontroli bolesti prouzrokovanih fitopatogenim bakterijama, dobija sve veći značaj. Zahvaljujući izraženoj specifičnosti, fagi se osim za suzbijanje koriste i za diferencijaciju srodnih vrsta fitopatogenih bakterija. U ovom radu izolovano je 25 faga specifičnih prema vrsti *Xanthomonas euvesicatoria*, prouzrokovaču bakteriozne pegavosti paprike. Fagi su izolovani iz uzoraka zemljišta, vode i semena paprike poreklom iz različitih lokaliteta u Srbiji. Pored faga izolovanih u Srbiji, proverena je specifičnost 53 soja dobijenih iz kolekcije Univerziteta u Floridi i izdvojen set faga koji se mogu koristiti u diferencijaciji vrsta *X. euvesicatoria*, *X. perforans*, *X. vesicatoria* i *X. gardneri*.

**Ključne reči:** bakteriofagi, *Xanthomonas euvesicatoria*, izolacija, paprika, diferencijacija

### UVOD

Bakteriofagi ili jednostavnije fagi predstavljaju posebnu grupu virusa koji inficiraju bakterijsku ćeliju. Oni spadaju u najbrojnije mikroorganizme na planeti, koji sa bakterijama koevoluiraju unazad 3 - 4 milijarde godina; procenjuje se da ih ima oko  $10^{32}$  (Hanlon, 2007). Bakteriofagi se mogu naći na svim mestima gde i bakterije, uključujući zemljište, vodu, bilj-

ke, životinje (Adams, 1959; Woods i sar., 1981; Obradović i sar., 2006; Gašić i sar., 2011) i čoveka (Osawa i sar., 1981).

Životni ciklus bakteriofaga može biti litički i lizogeni. Litički odnos karakteriše se brzim umnožavanjem faga u bakterijskoj ćeliji nakon ubacivanja nukleinskog materijala i oslobađanjem novih faga posle lizisa, odnosno raspadaanja bakterijske ćelije. Lizogeni odnos ostvaruje umereni fag, koji se u inficiranoj ćeliji zadržava

u obliku svoje nukleinske kiseline ugrađene u bakterijski hromozom (profag), i tako se prenosi deobom na potomstvo bakterije.

Iako su bakteriofagi najbrojniji biološki agensi na planeti, njihov opstanak u prirodi umnogome zavisi od uticaja različitih faktora spoljne sredine (Balogh i sar., 2007). Gill i Abedon (2003) su saopštili da rizosfera predstavlja povoljniju sredinu za opstanak faga u poređenju sa filosferom, s obzirom da su fagi češće izolovani iz te sredine i mogu duže vremena preživeti u zemljištu nego na lisnoj površini. Međutim, brzina širenja faga kroz neujednačeni sastav zemljišta je niska i promenljiva usled promene nivoa slobodne vode. Pored toga, fagi mogu biti imobilisani biofilmom u supstratu (Storey i Ashbolt, 2001) kao i adsorbovani od strane zemljišnih čestica, posebno gline (Williams i sar., 1987). Niska pH vrednost supstrata takođe može izazvati inaktivaciju faga (Sykes i sar., 1981). U filosferi, glavni ograničavajući faktori za opstanak faga su ultraljubičasto zračenje (UV zračenja) i isušivanje (Gill i Abedon, 2003). Takođe, visoka temperatura, visoka ili niska pH vrednost i osmotski pritisak utiču na inaktivaciju faga na površini listova biljke (Iriarte i sar., 2007).

Od otkrića, početkom dvadesetog veka, fagi su proučavani u cilju kontrole bolesti izazvanih bakterijama, uključujući i bolesti biljaka. Međutim, interesovanje za primenu faga kao bioloških agenasa posebno je intenzivirano poslednjih godina, s pojavom sojeva bakterija rezistentnih prema jedinjenjima bakra i antibiotcima (Marco i Stall, 1983; Minsavage i sar., 1990; Thayer i Stall, 1961). Od 1990-ih terapija fagima se pokazala efikasnom u suzbijanju različitih bolesti prouzrokovanih bakterijama roda *Xanthomonas*: bakteriozne pegavosti paradajza (Flaherty i sar., 2000; Balogh i sar., 2003; Obradović i sar., 2004a, 2005), bakteriozne pegavosti breskve (Civerolo i Keil, 1969; Saccardi i sar., 1993),

bakteriozne pegavosti muškate (Flaherty i sar., 2001), bakteriozne plamenjače oraha (McNeil i sar., 2001), lisne plamenjače crnog luka (Lang i sar., 2007) i bakterioznog raka i pegavosti citrusa (Balogh i sar., 2008).

Pored primene u suzbijanju bolesti izazvanih bakterijama, bakteriofagi su korišćeni i u drugim oblastima fitopatologije. Zahvaljujući visokoj specifičnosti odnosa virus – bakterija domaćin, fagi su omogućili razlikovanje srodnih vrsta fitopatogenih bakterija kao i rasa ili patogena varijeteta iste bakterijske vrste i tako značajno doprineli klasifikaciji i identifikaciji patogena bakterija (Klement i sar., 1990; Arsenijević, 1997). Identifikacija bakterija korišćenjem faga je jednostavna, brza i efikasna u poređenju sa drugim konvencionalnim metodama, s obzirom da je potreban relativno kratak period (18-24 h inkubacije) da bi se očitali rezultati, odnosno formirali plakovi kao znak pozitivne reakcije.

Bakteriozna pegavost prouzrokovana *Xanthomonas* vrstama, *X. euvesicatoria*, *X. vesicatoria*, *X. perforans* i *X. gardneri* (Jones i sar., 2004), spada u red ekonomski najznačajnijih bolesti paprike i paradajza u svetu, posebno u uslovima tropske i subtropske klime. Do sada je u svetu opisano 11 fizioloških rasa bakterije *Xanthomonas euvesicatoria*, od kojih je u našoj zemlji prisutno četiri (P1, P3, P7, P8), a rasa P8 je najzastupljenija (Ignjatov i sar., 2012). *X. euvesicatoria* nalazi se na A2 EPPO karantinskoj listi (European and Mediterranean Plant Protection Organization), kao i na A2 listi karantinskih štetnih organizama Republike Srbije. U agroekološkim uslovima Srbije prouzrokovatelj bakteriozne pegavosti paprike *X. euvesicatoria* redovno se pojavljuje i prouzrokuje značajne štete, naročito tokom vlažnog i toplog vremena (Balaž, 1994; Obradović i sar., 1997, 1999, 2000a, 2000b, 2001).

Imajući u vidu heterogenost populacije

*Xanthomonas* spp. patogena paprike i paradajza (Jones i sar., 2004) kao i njihovo prisustvo i štetnost, naročito u proizvodnji paprike u nas (Obrodović i sar., 2004b), utvrđivanje prisustva specifičnih bakteriofaga u rejonima gajenja paprike u Srbiji i proučavanje mogućnosti njihove primene u suzbijanju patogena imalo bi višestruk značaj. Stoga je cilj rada bio utvrđivanje prisustva i rasprostranjenosti bakteriofaga specifičnih prema vrsti *X. euvesicatoria*, izolacijom iz različitih supstrata, dok bi se proverom litičke aktivnosti i specifičnosti faga utvrdila mogućnost njihove primene u diferencijaciji vrsta roda *Xanthomonas*, parazita paprike i paradajza.

## MATERIJAL I METODE

U istraživanjima je korišćeno 3 soja bakterije *Xanthomonas euvesicatoria* KFB1, KFB13 i KFB189, zatim vrsta *Xanthomonas vesicatoria* soj KFB29, *Xanthomonas perforans* soj KFB061, *Xanthomonas gardneri* soj KFB0116. Sojevi bakterija čuvani su pri temperaturi  $-80^{\circ}\text{C}$  u podlozi od hranljivog bujona sa 30% glicerola. Bakterijske kulture su održavane periodičnim presejavanjem na standardnu bakteriološku podlogu hranljivi agar (HA, agar 18,0 g, hranljivi bujon 23,0 g, destilovana voda 1,0 l). Pri izvođenju oglada korišćene su kulture bakterija gajene 24 h na HA pri temperaturi  $27^{\circ}\text{C}$  u termostatu.

Za proučavanje aktivnosti faga u *in vitro* uslovima korišćena je polučvrsta hranljiva podloga sa kvašćevim ekstraktom (Nutrient agar yeast extract medium, NYA) (0,8% hranljivi bujon, 0,6% agar, 0,2% kvašćev ekstrakt) ili hranljivi bujon kao tečna podloga.

### Izolacija bakteriofaga iz različitih prirodnih supstrata

Tokom 2005, 2007. i 2008. godine prikupljeni su uzorci za izolaciju bakteriofaga sa više

lokaliteta u Srbiji. Kao materijal za izolaciju specifičnih faga korišćene su obolele biljke paprike sa izraženim simptomima bakteriozne pegavosti (3 uzorka), zatim zemljište uzeto neposredno ispod zaraženih biljaka (25 uzoraka), voda iz bunara (4 uzorka) kao i seme paprike za setvu (4 uzorka). Izolacija faga vršena je na dva načina: metodom direktne izolacije i metodom obogaćivanja supstrata.

Metodom direktne izolacije faga obrađeni su uzorci zemljišta iz zone korenovog sistema paprike. Oko 200 g zemljišta potopljeno je u 200 ml 0,01 M magnezijum-sulfatnog rastvora u laboratorijskoj čaši i nakon kraćeg mešanja na magnetnoj mešalici inkubirano preko noći pri sobnoj temperaturi. Sutradan, pažljivo je odlicena tečna faza i nakon centrifugiranja pri 12 000 g u trajanju 10 min, supernatant je pipetom prenet u sterilne staklene kolbe. Zatim je dodat hloroform (10:1 v/v) i nakon sat vremena tretiranja, u sterilne mikroeprove izdvojena je gornja faza suspenzije u kojoj se očekuje prisustvo faga i dalje čuvana u frižideru pri temperaturi  $4^{\circ}\text{C}$ , zaštićena od svetlosti.

Metoda obogaćivanja supstrata (Carlson, 2005; Balogh, lična komunikacija) omogućava selektivno umnožavanje bakteriofaga specifičnih prema bakteriji domaćinu koja se dodaje supstratu sa podlogom. Na taj način se, povećanjem koncentracije omogućava uspešnija detekcija i izolacija faga. Prilikom izolacije faga ovom metodom, za obogaćivanje supstrata korišćeni su sojevi *X. euvesicatoria* KFB1, KFB13 i KFB189, izolovani iz paprike poreklom iz Srbije. U prvoj fazi izolacije faga u kolbu koja sadrži 50 ml hranljivog bujona i 2,5 g  $\text{CaCO}_3$  dodato je 5 ml indikator bakterije suspendovane u sterilnoj česmenskoj vodi i odgovarajuća količina uzorka, 10 g zemljišta, 5 g biljnog tkiva ili 50 ml vode. Suspenzije su postavljene na rotacionu mešalicu u termostat pri  $27^{\circ}\text{C}$ , tokom 24 h. Nakon inkuba-

cije, vršena je ekstrakcija faga centrifugiranjem 1 ml obogaćene suspenzije 5 min na 16 000 g, kako bi se otklonili ostaci podloge i bakterijskih ćelija. Supernatant je prenet u nove sterilne mikroeprove i tretiran hloroformom (10:1 v/v) u trajanju 20 min, uz povremeno mešanje. Posle taloženja, gornja faza suspenzije izdvojena je u nove sterilne mikroeprove, koje su potom obeležene i čuvane pri temperaturi 4°C, zaštićene od svetlosti, do upotrebe.

#### **Provera prisustva bakteriofaga**

Prisustvo specifičnih faga u uzorcima provereno je na osnovu formiranja plakova u podlozi kao znak aktivnosti faga prema kompatibilnoj bakteriji domaćinu. U ogledu su kao domaćini korišćeni sojevi *X. euvesicatoria* KFB 1, KFB 13 i KFB 189. Na dno prazne Petri kutije naneto je po 100 µl bakterijske suspenzije pripremljene u 0,01 M magnezijum-sulfatnom rastvoru i dodata odgovarajuća količina NYA podloge, ohlađene do temperature 46 – 50°C, tako da prekrije dno. Bakterijska suspenzija i podloga izmešane su horizontalnim kružnim pokretima Petri kutije nekoliko puta. Po očvršćavanju podloge, naneto je po 10 µl suspenzije uzorka na površinu podloge i nakon 24 – 48 h inkubacije u termostatu, posmatrana je pojava plakova na mestu nanošenja kapi suspenzije.

#### **Prečišćavanje bakteriofaga**

Pri izolaciji faga iz prirodne sredine, mora se imati u vidu da se populacija faga može sastojati iz više sojeva specifičnih prema istom domaćinu (Mullan, 2001). Različiti fagi mogu se izdvojiti procesom prečišćavanja na osnovu izgleda plakova u podlozi.

Kako bi se dobili pojedinačni plakovi u podlozi, suspenzija faga je razređena u sterilnoj česmenskoj vodi u odnosu 1:10. Na dno prazne Petri kutije naneto je 100 µl suspenzije kompati-

bilnog soja *X. euvesicatoria* pripremljene u sterilnoj česmenskoj vodi i 100 µl suspenzije faga određenog razređenja. Zatim je dodata odgovarajuća količina prohlađene (48°C) NYA podloge tako da prekrije dno. Suspenzije i podloga su izmešane kružnim pokretima Petri kutije nekoliko puta, kako bi se postigla ravnomerna distribucija bakterija i faga u podlozi. Nakon očvršćavanja podloge, Petri kutije su postavljene u termostat pri 27°C i po isteku 24 h inkubacije posmatrana je pojava i izgled pojedinačnih plakova.

Prečišćavanje faga vršeno je kroz tri serije, iz pojedinačnih, morfološki identičnih plakova. Sterilnom čačalicom odvojen je deo plaka sa podlogom i resuspendovan u 100 µl sterilne destilovne vode u mikroeproveti. Nakon mešanja pomoću tresilice pri maksimalnom broju obrtaja u trajanju od nekoliko sekundi, napravljena su još dva razređenja u odnosu 1:10 u sterilnoj destilovanoj vodi. Po 100 µl suspenzije faga svakog razređenja i 100 µl suspenzije kompatibilnog soja bakterije u 0,01 M magnezijum-sulfatnom rastvoru, zasejano je u NYA podlozi na prethono opisan način. Nakon 24 h inkubacije u termostatu posmatrani su formirani plakovi. Postupak je ponovljen još dva puta izborom iste forme plakova.

Po završetku procesa prečišćavanja, kada su svi plakovi u Petri kutiji bili ujednačene forme, podloga iz kutije sa najvećom koncentracijom faga prenet je u sterilnu laboratorijsku čašu i usitnjena u 10 – 15 ml sterilne destilovane vode, kako bi usitnjeni agar poprimio tečnu formu. Čitav sadržaj je zatim centrifugiran 20 min na 8 000 g kako bi se uklonili ostaci ćelija i podloge, nakon čega je supernatant odliven u sterilnu staklenu posudu i tretiran hloroformom (10:1 v/v). Nakon taloženja tokom 1 h, sterilnom pipetom odvojena je gornja, bistra faza u kojoj se nalaze fagi u sterilnu posudu od tamnog stakla i nakon provere titra čuvana na 4°C. Očekivana

koncentracija faga u ovoj suspenziji iznosi oko  $10^9$  PFU/ml.

#### **Određivanje titra bakteriofaga**

U cilju određivanja titra prečišćene suspenzije faga, napravljeno je deset razređenja suspenzije faga u odnosu 1:10, u sterilnoj česmenskoj vodi. Na dno prazne Petri kutije naneto je 100  $\mu$ l suspenzije kompatibilnog soja *X. euvesicatoria*, pripremljene u sterilnoj česmenskoj vodi i 100  $\mu$ l suspenzije faga određenog razređenja. Zatim je dodata odgovarajuća količina NYA podloge ohlađene do 48°C, tako da prekrije dno. Suspenzije i podloga izmešane su kružnim pokretima Petri kutije nekoliko puta i nakon očvršćavanja podloge, postavljene su u termostat na 27°C. Nakon 24 h inkubacije, posmatrani su plakovi u podlozi. Na osnovu broja formiranih plakova u određenim razređenjima, vršeno je izračunavanje titra faga izraženog u broju formiranih plakova po ml suspenzije (plaque forming units/ml, PFU/ml) (Klement i sar., 1990).

#### **Umnožavanje i čuvanje bakteriofaga**

Kako bi se dobila suspenzija faga visokog titra i time omogućilo korišćenje faga u *in vitro* i *in vivo* eksperimentalnim uslovima, vršeno je njihovo umnožavanje. Fagi su umnoženi u kulturi bakterije domaćina gajenog u hranljivom bujonu. Kompatibilni soj *X. euvesicatoria* KFB 189 zasejan je u 100 ml hranljivog bujona. U eksponencijalnoj fazi porasta, pri koncentraciji  $10^8$  CFU/ml ( $OD_{600} = 0,3$ ), dodata je odgovarajuća količina faga tako da odnos broja čestica faga i ćelija bakterije bude oko 1:10 (multiplicity of infection, MOI = 0,1). Kolbe su zatim postavljene u laminarnu komoru tokom 5 min, a zatim na rotacionu mešalicu u termostat na 150 rpm pri temperaturi 27°C. Po isteku 19 h inkubacije dodato je 10 ml hloroforma (10:1 v/v) i uz postepeno mešanje vršeno je tretiranje tokom 0,5 – 1 h.

Zatim je pažljivo izdvojena gornja faza u zatamnjenu sterilnu bocu i nakon provere titra čuvana pri temperaturi 4°C. Ovom metodom se obezbeđuje titar faga oko  $10^{10}$  PFU/ml.

Za čuvanje faga u kolekciji na duži vremenski period, 100  $\mu$ l suspenzije faga i 100  $\mu$ l suspenzije bakterije domaćina pomešano je u sterilnoj mikroepreveti. Nakon 5 min, tokom kojih je došlo do adsorpcije faga na površinu bakterijske ćelije, suspenzija je pipetom prenetna u krioeprevetu sa 2 ml podloge od hranljivog bujona i 30% glicerola i čuvana pri – 80°C.

#### **Diferencijacija sojeva *Xanthomonas* spp. bakteriofagima**

Zahvaljujući saradnji sa kolegama sa Univerziteta u Floridi (SAD), Laboratorije za fitobakteriologiju, Odseka za biljnu patologiju, dobijeno je 53 soja faga iz njihove kolekcije. Proučena je specifičnost ovih sojeva prema različitim vrstama roda *Xanthomonas*, patogena paradajza i paprike u cilju izdvajanja seta faga na osnovu kojih se može na brz i efikasan način izvršiti diferencijacija bakterija *X. euvesicatoria*, *X. vesicatoria*, *X. perforans* i *X. gardneri*.

Na dno prazne Petri kutije naneto je po 100  $\mu$ l suspenzije svakog soja bakterije u sterilnoj česmenskoj vodi i dodata prohlađena NYA podloga. Po očvršćavanju, pipetom je na površinu podloge naneto po 4  $\mu$ l suspenzije faga. Nakon 24 h inkubacije u termostatu pri temperaturi 27°C, posmatrana je pojava plakova. Test je urađen u tri ponavljanja.

## **REZULTATI**

#### **Izolacija bakteriofaga iz prirodnih supstrata**

U cilju izolacije specifičnih bakteriofaga prikupljeni su uzorci zemljišta, vode, semena paprike, kao i biljaka paprike sa izraženim simptomima bakteriozne pegavosti. Bakteriofagi

**Tabela 1.** Izolovani sojevi bakteriofaga.  
**Table 1.** Bacteriophage strains.

Šifra soja	Supstrat	Lokalitet	Godina izolacije
KΦ 1	Zemljište	Družetić	2005
KΦ 2	Seme paprike	Medveđa	2007
KΦ 3	Zemljište	Medveđa	2007
KΦ 4	Voda iz bunara	Medveđa	2007
KΦ 5	Zemljište	Brus	2007
KΦ 6	Seme paprike	Medveđa	2007
KΦ 7	Zemljište	Medveđa	2007
KΦ 8	Zemljište	Brus	2007
KΦ 9	Zemljište	Despotovo	2008
KΦ 10	Zemljište	Despotovo	2008
KΦ 11	Zemljište	Horgoš	2008
KΦ 12	Zemljište	Horgoš	2008
KΦ 13	Zemljište	Despotovo	2008
KΦ 14	Zemljište	Bačka Palanka	2008
KΦ 15	Zemljište	Tovariševo	2008
KΦ 16	Zemljište	Bašaid	2008
KΦ 17	Zemljište	Senta	2008
KΦ 18	Zemljište	Kikinda	2008
KΦ 19	Zemljište	Novi Kneževac	2008
KΦ 20	Zemljište	Gospođinci	2008
KΦ 21	Zemljište	Gospođinci	2008
KΦ 22	Zemljište	Gložan	2008
KΦ 23	Zemljište	Gložan	2008
KΦ 24	Zemljište	Pivnice	2008
KΦ 25	Zemljište	Silbaš	2008

specifični za *X. euvesicatoria*, izolovani su metodom direktne izolacije i metodom obogaćivanja supstrata, iz 25 od ukupno 36 testiranih uzoraka. Dvadeset dva soja faga potiču iz zemljišta, dva soja su poreklom iz semena paprike i jedan soj iz vode, dok iz biljaka paprike sa simptomima bakterijske pegavosti nisu izolovani fagi (Tabela 1). Uspešnost izolacije iznosila je oko 70%.

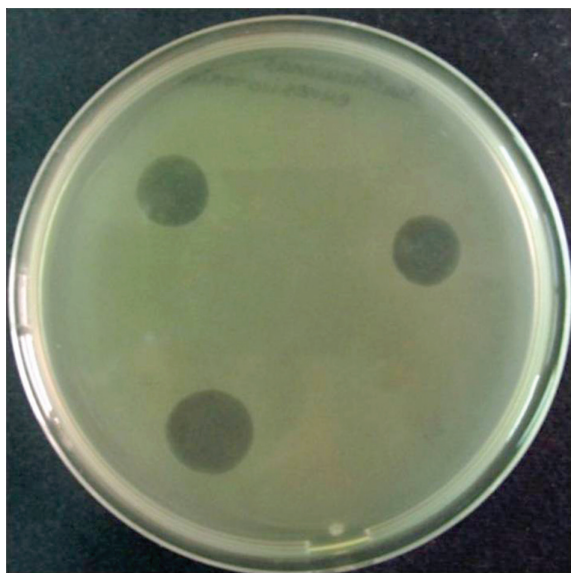
#### Provera prisustva i čuvanje bakteriofaga

Prisustvo faga u uzorcima utvrđeno je pojavom plakova, tj. prosvetljenih zona kružnog oblika nastalih usled lizisa bakterijskih ćelija, u hranljivoj podlozi nakon 24 – 48 h inkubacije u termostatu pri temperaturi 27°C (Slika 1). Svi izo-

lovani fagi ispoljili su litičku aktivnost prema sojevima *X. euvesicatoria* KFB1, KFB 13 i KFB 189. Nakon prečišćavanja faga kroz tri serije iz pojedinačnih, morfološki identičnih plakova, dobijena je identična forma plakova u podlozi (Slika 2). Koncentracija faga nakon prečišćavanja iznosila je oko  $10^9$  PFU/ml. Prečišćeni fagi umnoženi su do koncentracije oko  $10^{10}$  PFU/ml u kulturi bakterija u hranljivom bujonu i čuvani pri temperaturi 4°C, zaštićeni od svetlosti.

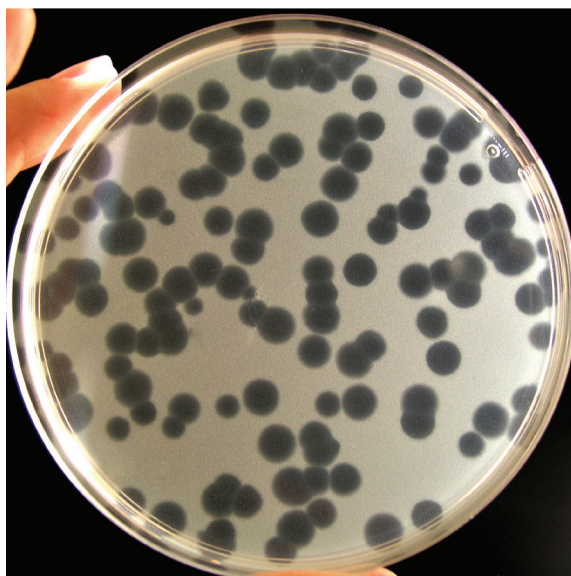
Vitalnost faga proverena je i nakon godinu dana čuvanja u podlozi od hranljivog bujona sa 30% glicerola, zajedno sa bakterijom domaćinom, pri temperaturi -80°C. Svi sojevi faga uspešno su revitalizovani.





**Slika 1.** Bakteriofagi specifični prema *X. euvesicatoria*. Formirani plakovi u NYA podlozi ukazuju na prisustvo bakteriofaga.

**Figure 1.** Bacteriophages specific to *X. euvesicatoria*. Plaques formation in NYA medium indicates the presence of bacteriophages.



**Slika 2.** Bakteriofagi specifični prema *X. euvesicatoria*. Ujednačena forma plakova nakon prečišćavanja bakteriofaga.

**Figure 2.** Bacteriophages specific to *X. euvesicatoria*. Uniformity of plaques obtained after procedure of phage purification.

### Diferencijacija sojeva *Xanthomonas* spp. bakteriofagima

Proučavanjem 53 soja faga dobijenih iz

kolekcije Univerziteta u Floridi, utvrđena je litička aktivnost 21 soja faga prema najmanje jednom soju *X. euvesicatoria* (Tabela 2). Dvanaest sojeva faga liziralo je sva tri soja *X. euvesicatoria* KFB 1, KFB 13 i KFB 189. Jedan soj (KØ 050) ispoljio je specifičnost prema P8 fiziološkoj rasi *X. euvesicatoria*, s obzirom da je lizirao samo sojeve KFB 1 i KFB 189. Fagi KØ 034 i KØ 037 ispoljili su specifičnost prema rasi P7, lizirajući *X. euvesicatoria* soj KFB 13. Sedam sojeva faga bilo je specifično prema *X. perforans* soju KFB 061. Među proučavanim fagima izdvojena su dva soja, KØ 018 i KFB 040, koji su ispoljili aktivnost prema vrstama *X. euvesicatoria* i *X. perforans*.

Na osnovu uočene specifičnosti, izdvojena su četiri soja faga koji se mogu koristiti za diferencijaciju sojeva *Xanthomonas* spp. (Tabela 3). Soj faga KØ 050 može se upotrebiti za diferencijaciju sojeva *X. euvesicatoria* rase P8 od ostalih *Xanthomonas* spp. Soj faga KØ 034 omogućava razlikovanje *X. euvesicatoria*, rase P7 od rase P8 istog patogena kao i od ostalih *Xanthomonas* spp. Za diferencijaciju *X. euvesicatoria* i *X. perforans* od ostalih *Xanthomonas* spp. može se upotrebiti fag KØ 040, dok se za diferencijaciju *X. perforans* može koristiti soj KØ 053. Ukoliko nijedan od izabranih faga nije ispoljio aktivnost prema testiranom soju bakterije, može se zaključiti da se radi o vrstama *X. vesicatoria* ili *X. gardneri*. Treba napomenuti da se umesto sojeva faga koji su navedeni u Tabeli 3, za diferencijaciju *Xanthomonas* spp. može koristiti bilo koji soj iz proučavane inostrane kolekcije faga sa istim spektrom domaćina (Tabela 2).

Za diferencijaciju sojeva *X. euvesicatoria* od ostalih *Xanthomonas* spp., mogu se koristiti i fagi izolovani u ovom radu, s obzirom da su svi sojevi ispoljili specifičnost prema vrsti *X. euvesicatoria*.

Tabela 2. Specifičnost bakteriofaga poreklom iz SAD prema *Xanthomonas* spp.  
 Table 2. Specificity of bacteriophages from USA to *Xanthomonas* spp.

KΦ	<i>X. euvesicatoria</i>	<i>X. euvesicatoria</i>	<i>X. euvesicatoria</i>	<i>X. vesicatoria</i>	<i>X. perforans</i>	<i>X. gardneri</i>
	KFB 1	KFB 13	KFB 189	KFB 29	KFB 061	KFB 0116
01	-	-	-	-	-	-
02	-	-	-	-	-	-
03	-	-	-	-	-	-
04	+	-	-	-	-	-
05	-	-	-	-	-	-
06	-	-	-	-	-	-
07	+	-	-	-	-	-
08	+	-	-	-	-	-
09	-	-	-	-	-	-
010	-	-	-	-	-	-
011	-	-	-	-	-	-
012	-	-	-	-	-	-
013	-	-	-	-	+	-
014	-	-	-	-	+	-
015	-	-	-	-	-	-
016	-	-	-	-	-	-
017	-	-	-	-	+	-
018	+	-	-	-	+	-
019	-	-	-	-	+	-
020	-	-	-	-	+	-
021	-	-	-	-	+	-
022	-	-	-	-	-	-
023	-	-	-	-	-	-
024	-	-	-	-	-	-
025	+	+	+	-	-	-
026	+	+	+	-	-	-
027	+	+	+	-	-	-
028	+	+	+	-	-	-
029	+	+	+	-	-	-
030	+	+	+	-	-	-
031	-	-	-	-	-	-
032	+	+	+	-	-	-
033	+	+	+	-	-	-
034	-	+	-	-	-	-
035	+	+	+	-	-	-
036	+	+	+	-	-	-
037	-	+	-	-	-	-
038	+	+	+	-	-	-
039	+	+	+	-	-	-
040	-	+	+	-	+	-
041	-	-	-	-	-	-
042	-	-	-	-	-	-
043	+	-	-	-	-	-
044	-	-	-	-	-	-
045	-	-	-	-	-	-
046	-	-	-	-	-	-
047	-	-	-	-	-	-
048	-	-	-	-	-	-
049	-	-	-	-	-	-



**Tabela 3.** Bakteriofagi kojima se mogu diferencirati *Xanthomonas* spp.  
**Table 3.** Bacteriophages that can be used in *Xanthomonas* spp. differentiation.

	<i>X. euvesicatoria</i>	<i>X. euvesicatoria</i>	<i>X. euvesicatoria</i>	<i>X. vesicatoria</i>	<i>X. perforans</i>	<i>X. gardneri</i>
KΦ	KFB 1	KFB 13	KFB 189	KFB 29	KFB 061	KFB 0116
050	+	-	+	-	-	-
034	-	+	-	-	-	-
040	-	+	+	-	+	-
053	-	-	-	-	+	-

**Legenda:** + formiranje plaka, - izostanak formiranja plaka  
**Legend:** + plaque formation, - no plaque formation

## DISKUSIJA

Poslednjih godina, proučavanje bakteriofaga sve više privlači pažnju istraživača. Eksperimentalno je pokazano da se fagi sa visokom efikasnošću mogu koristiti kao biološki agensi (Jones i sar., 2007). Činjenice da su opšte rasprostranjeni prirodni neprijatelji bakterija, jednostavni za gajenje i održavanje, specifični prema domaćinu, pogodni za integraciju sa drugim mehanizama zaštite, bezopasni po čoveka i druge činioce biosfere, daju im značajnu prednost nad drugim sredstvima baktericidnog dejstva. Osim toga, od ranije je poznato da se bakteriofagi mogu koristiti u detekciji, identifikaciji i klasifikaciji fitopatogenih bakterija, imajući u vidu njihovu visoku specifičnost prema pojedinim bakterijskim sojevima.

U ovom radu izolovano je 25 sojeva faga (Tabela 1) specifičnih prema vrsti *Xanthomonas euvesicatoria*, prouzrokovaču bakterijske pegavosti paprike. Bakteriofagi su, metodom direktne izolacije i metodom obogaćivanja supstrata, izolovani iz uzoraka zemljišta na kome je gajena paprika, kao i iz vode korišćene za zalivanje paprike i iz semena paprike za setvu. Uspešnost izolacije faga iznosila je oko 70%. Većina izolovanih faga potiče iz zemljišta u neposrednoj blizini korena zaraženih biljaka, dok izolacija iz nekoliko uzoraka obolelih biljaka paprike nije bila uspešna. Na probleme prilikom izolacije faga iz filozofere ukazali su i drugi autori (Okabe i Goto, 1963; Erskine, 1973; Flaherty i sar, 2001; Gill i

sar., 2003). Ova pojava može se objasniti činjenicom da zemljište, u poređenju sa nadzemnim delovima biljke, predstavlja povoljniju sredinu za opstanak faga. Fagi su u prirodi amfoterni, ispoljavaju negativno naelektrisanje pri pH vrednosti karakterističnoj za većinu zemljišta (Burge i Enkiri, 1978). U zemljištu se fagi štite od inaktivacije adsorbovanjem za naelektrisane zemljišne koloidne kao što je glina (Reaney i sar., 1983; Williams i sar., 1987). Takođe, zemljište obezbeđuje zaštitu od UV zračenja i isušivanja, dva glavna faktora koja utiču na vitalnost faga (Adams, 1959; Erskine, 1973; Iriarte i sar., 2007). Iako su češće izolovani iz zemljišta nego iz nadzemnih delova biljaka (Gill i Abedon, 2003), smatra se da bi fagi izolovani iz filozofere bili bolje prilagođeni za preživljavanje i umnožavanje na površini biljaka, pa samim tim i bolji kandidati za biološke agense. Ovoj konstataciji ide u prilog istraživanje Iriarte i sar. (2007) po kojima su fagi izolovani iz ove sredine bili otporni prema isušivanju.

S obzirom da je pri izolaciji faga korišćen hloroform za eliminaciju neliziranih bakterijskih ćelija, svi sojevi bili su rezistentni prema ovom jedinjenju. Moguće je da je upotreba hloroforma onemogućila izolaciju faga iz nekoliko uzorka, usled njihove osetljivosti prema ovom jedinjenju. Naime, u početku se mislilo da je ovo retka pojava (Adams, 1959), dok je u novije vreme pojava osetljivosti faga prema hloroformu postala široko prisutna (Ackermann i DuBow, 1987). S druge strane, fagi koji se teško održavaju nisu poželjni kao agensi u biološkoj kontroli,

s obzirom da jednostavna proizvodnja i čuvanje faga predstavljaju uslov za njihovu primenu u polju (Schisler i Slininger, 1997).

Specifičnost faga prema pojedinim vrstama ili sojevima bakterija često je korišćena u identifikaciji biljnih patogena (Thornberry i sar., 1949; Billing, 1963, 1970; Dye i sar., 1964; Stolp i Starr, 1964; Czes, 1984), s obzirom da je procedura detekcije plakova veoma brza i efikasna. Na osnovu različite specifičnosti 53 soja faga prema vrstama *X. euvesicatoria*, *X. vesicatoria*, *X. gardneri* i *X. perforans*, izdvojen je set od četiri faga kojima se mogu diferencirati ove vrste (Tabela 2 i 3). Ovaj set faga takođe omogućava diferencijaciju rasa P7 i P8 vrste *X. euvesicatoria*.

Rezultatima naših istraživanja potvrđeno je prisustvo bakteriofaga u neposrednom okru-

ženju obolelih biljaka paprike, sposobnih da izvrše infekciju bakterije domaćina i izazovu lizis ćelija. Time je uspešno izveden prvi korak ka potencijalnoj primeni ovih bioloških agensa u zaštiti paprike od bakteriozne pegavosti.

## ZAHVALNICA

Istraživanja su obavljena u okviru projekta III46008 „Razvoj integrisanih sistema upravljanja štetnim organizmima u biljnoj proizvodnji sa ciljem prevazilaženja rezistentnosti i unapređenja kvaliteta i bezbednosti hrane” i TR31030 „Stvaranje sorata i hibrida povrća za gajenje na otvorenom polju i zaštićenom prostoru“ koje finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

## LITERATURA

- Ackermann, H. W., DuBow, M. S. (1987): Viruses of Prokaryotes, vol. II. Natural groups of bacteriophages, CRC Press, Boca Raton, FL, 85–100.
- Adams, M. H. (1959). Bacteriophages. Interscience Publishers, New York.
- Arsenijević, M. (1997): Bakterioze biljaka. S-print, Novi Sad.
- Balaž, J. (1994): Leaf spot of pepper caused by bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Contemporary Agriculture, special edition, 42: 341–345.
- Balogh, B., Jones, J. B., Momol, M. T., Olson, S. M., Obradović, A., King, B., Jackson, L. E. (2003): Improved efficacy of newly formulated bacteriophages for management of bacterial spot of tomato. Plant Disease, 87: 949–954.
- Balogh, B., Iriarte, F.B., Obradović, A., Momol, M.T., Jones, J.B. (2007): Phages don't have it easy. Phytopathology, 97: S141.
- Balogh, B., Canteros, B. I., Stall, R. E., Jones J. B. (2008): Control of citrus canker and citrus bacterial spot with bacteriophages. Plant Disease, 92: 1048–1052.
- Billing, E. (1963): The value of phage sensitivity tests for the identification of phytopathogenic *Pseudomonas* spp. Journal of Applied Microbiology, 33: 478–491.
- Billing, E. (1970). Further studies on the phage sensitivity tests for the identification of phytopathogenic *Pseudomonas* spp. Journal of Applied Microbiology, 33: 478–491.
- Burge, W. D., Enkiri, N. K. (1978): Virus adsorption by five soils. Journal of Environmental Quality, 7: 73–76.
- Carlson, K. (2005): Appendix: Working with bacteriophages: Common techniques and methodological

- approaches. In: Bacteriophages: Biology and Applications. Eds. Kutter, E., Sulakvelidze, A. CRC Press, Boca Raton, FL, 437-494.
- Civerolo, E. L., Keil, H. L. (1969): Inhibition of bacterial spot of peach foliage by *Xanthomonas pruni* bacteriophage. *Phytopathology*, 12: 1966-1967.
- Cupples, D. A. (1984): The use of pathovar-indicative bacteriophage leaf and fruit lesions. *Phytopathology*, 74: 891-894.
- Dye, D. W., Starr, M. P., Stolp, H. (1964): Taxonomic clarification of *Xanthomonas vesicatoria* based upon host specificity, bacteriophage sensitivity and cultural characteristics. *Phytopathologische Zeitschrift*, 51: 394-407.
- Erskine, J. M. (1973): Characteristics of *Erwinia amylovora* bacteriophage and its possible role in the epidemiology of fire blight. *Canadian Journal of Microbiology*, 19: 837-845.
- Flaherty, J. E., Jones, J. B., Harbaugh, B. K., Somodi, G. C., Jackson, L. E. (2000): Control of bacterial spot on tomato in the greenhouse and field with h-mutant bacteriophages. *HortScience*, 35: 882-884.
- Flaherty, J. E., Harbaugh, B. K., Jones, J. B., Somodi, G. C., Jackson, L. E. (2001): H-mutant bacteriophages as a potential biocontrol of bacterial blight of geranium. *HortScience*, 36: 98-100.
- Gašić, K., Ivanović, M. M., Ignjatov, M., Čalić, A., Obradović A. (2011): Isolation and characterization of *Xanthomonas euvesicatoria* bacteriophages. *Journal of Plant Pathology*, 93 (2), 415-423.
- Gill J., Abedon, S. T. (2003): Bacteriophage ecology and plants. American Phytopathological Society. [aps@scisoc.org](mailto:aps@scisoc.org)
- Gill, J. J., Svircev, A. M., Smith, R., Castle, A. J. (2003): Bacteriophages of *Erwinia amylovora*. *Applied and Environmental Microbiology*. 69: 2133-2138.
- Hanlon, J. W. (2007): Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 30: 118-128.
- Ignjatov, M., Šević, M., Gašić, K., Jovičić, D., Nikolić, Z., Milošević, D., Obradović, A. (2012): Proučavanje osetljivosti odabranih genotipova paprike prema prouzročivaču bakterijske pegavosti. *Ratararstvo i povrtarstvo*, 49 (2): 177-182.
- Iriarte, B. F., Balogh, B., Momol, M. T., Smith, M. L., Wilson, M., Jones, J. B. (2007): Factors affecting survival of bacteriophage on tomato leaf surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 1704-1711.
- Jones, J. B., Lacy, G. H., Bouzar, H., Stall, R. E., Shaad, N. (2004): Reclassification of *Xanthomonads* associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. *Systematic and Applied Microbiology*, 27: 755-762.
- Jones, J. B., Jackson, L. E., Balogh, B., Obradović, A., Iriarte, F. B., Momol, M. T. (2007): Bacteriophages for plant disease control. *Annual Review of Phytopathology*, 45: 245-262.
- Klement, Z., Rudolf, K., Sands, D. C. (1990): Methods in phyto bacteriology. Akadémiai Kiadó, Budapest.
- Lang, J. M., Gent, D. H., Schwartz, H. F. (2007): Management of *Xanthomonas* leaf blight of onion with bacteriophages and a plant activator. *Plant Disease*, 91: 871-878.
- Marco, G. M., Stall, R. E. (1983): Control of bacterial spot of pepper initiated by strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that differ in sensitivity to copper. *Plant Disease*, 67: 779-781.
- McNeil, D. L., Romero, S., Kandula, J., Stark, C., Stewart, A., Larsen, S. (2001): Bacteriophages: a potential biocontrol agent against walnut blight (*Xanthomonas campestris* pv. *juglandis*). *New Zealand Plant Protection*, 54: 220-224.

- Minsavage, G. V., Canteros, B. I., Stall, R. E. (1990): Plasmid-mediated resistance to streptomycin in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Phytopathology*, 80: 719–723.
- Mullan, W. M. A. (2001): Isolation and purification of bacteriophages. ŠOn-lineĆ <http://www.dairyscience.info/isolation-and-purification-of-bacteriophages.html> .
- Obradović, A., Arsenijević, M., Mijatović, M. (1997): Bakterioze paprika. Treće jugoslovensko savetovanje o zaštiti bilja, Zlatibor. Zbornik rezimea, 33–34.
- Obradović, A., Mavridis, A., Rudolph, K., Arsenijević, M. (1999): Characterization of pathogenic bacteria isolated from pepper in Yugoslavia. *Phytopathologia*, 29: 40–41.
- Obradović, A., Arsenijević, M., Mavridis, A., Rudolph, K. (2000a): Patogene i biohemijsko-fiziološke karakteristike sojeva *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* patogena paprika u Srbiji. *Zaštita bilja*, 51: 157–175.
- Obradović, A., Mavridis, A., Rudolph, K., Arsenijević, M. (2000b): Bacterial spot of capsicum and tomato in Yugoslavia. *EPPO Bulletin* 30: 333–336.
- Obradović, A., Mavridis, A., Rudolph, K., Arsenijević, M., Mijatović, M. (2001): Bacterial diseases of pepper in Yugoslavia. In: *Plant Pathogenic Bacteria*. Ed. De Boer, S. H. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp. 255–258.
- Obradović, A., Jones, J. B., Momol, M. T., Balogh, B., Olson, S. M. (2004a): Management of tomato bacterial spot in the field by foliar applications of bacteriophages and SAR inducers. *Plant Disease*, 88: 736–740.
- Obradović, A., Mavridis, A., Rudolph, K., Janse, J. D., Arsenijević, M., Jones, J. B., Minsavage, G. V., Wang, J. F. (2004b): Characterization and PCR-based typing of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* from peppers and tomatoes in Serbia. *European Journal of Plant Pathology*, 110: 285–292.
- Obradović, A., Jones, J. B., Momol, M. T., Olson, S. M., Jackson, L. E., Balogh, B., Guven, K., Iriarte, F. B. (2005): Integration of biological control agents and systemic acquired resistance inducers against bacterial spot on tomato. *Plant Disease*, 89: 712–716.
- Obradović, A., Gašić, K., Ivanović, M. (2006): Izolacija bakteriofaga specifičnih prema sojevima *Xanthomonas euvesicatoria* patogenu paprike u Srbiji. VIII savetovanje o zaštiti bilja, Zlatibor. Zbornik rezimea, 74.
- Okabe, N., Goto, M., (1963): Bacteriophages of plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 1: 397–418.
- Osawa, S., Furuse, K., Watanabe, I. (1981): Distribution of ribonucleic acid coliphages in animals. *Applied and Environmental Microbiology*, 45: 164–166.
- Reaney, D. C., Gowland, P. C., Slater, J. H. (1983): Genetic interactions among microbial communities. In: *Microbes in their natural environments*. Ed. Slater, J. H. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom. pp. 379–422.
- Saccardi, A., Gambin, E., Zaccardelli, M., Barone, G., Mazzucchi, U. (1993): *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* control trials with phage treatments on peaches in the orchard. *Phytopathologia Mediterranea*, 32: 206–210.
- Schisler, D. A., Slininger, P. J. (1997): Microbial selection strategies that enhance the likelihood of developing commercial biological control products. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 19: 172 – 179.

- Stolp, H., Starr, M. P. (1964): Bacteriophage reaction and speciation of phytopathogenic *Xanthomonads*. *Phytopathologische Zeitschrift*, 51: 442-428.
- Storey, M. V., Ashbolt, N. J. (2001): Persistence of two model enteric viruses (B408 and MS-2 bacteriophages) in water distribution pipe biofilms. *Water Science and Technology*. 43: 133-38.
- Sykes, I. K., Lanning, S., Williams, S. T. (1981): The effect of pH on soil actinophage. *Journal of General Microbiology*, 122: 271-80.
- Thayer, P. L., Stall, R. E. (1961): A survey of *Xanthomonas vesicatoria* resistance to streptomycin. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, 75: 163-165.
- Thornberry, H. H., Braun, A. C., Elrod, R. P. (1949): Application of the bacteriophage-lysis technique for the identification of plant pathogenic bacteria. *Phytopathology*, 39: 152-155.
- Williams, S. T., Mortimer, A. M., Manchester, L. (1987): Ecology of soil bacteriophages. In: *Phage Ecology*. Eds. Goyal, S. M., Gerba, C. P., Bitton, G. New York: Wiley, 157-179.
- Woods, T. L., Israel, H. W., Sherf, A. F. (1981): Isolation and partial characterization of a bacteriophage of *Erwinia stewartii* from the corn flea beetle *Chaetocnema pulicaria*. *Protection Ecology*, 3: 229-36.

**(Primljeno: 27.08.2012.)**

**(Prihvaćeno: 21.09.2012.)**

## ISOLATION OF BACTERIOPHAGES AND THEIR USE IN *XANTHOMONAS* SPP. DIFFERENTIATION

KATARINA GAŠIĆ<sup>1</sup>, MILAN IVANOVIĆ<sup>2</sup>, ANDELKA PROKIĆ<sup>2</sup>, NEMANJA KUZMANOVIĆ<sup>2</sup>,  
MAJA IGNJATOV<sup>3</sup>, ALEKSA OBRADOVIĆ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute for Plant Protection and Environment, Belgrade

<sup>2</sup>University of Belgrade, Faculty of Agriculture, Belgrade

<sup>3</sup>Institute of Field and Vegetable Crops, Novi Sad

*e-mail: gasickatarina@yahoo.com*

### SUMMARY

Bacteriophages are viruses that infect bacteria. Due to poor efficacy of copper compounds and occurrence of antibiotic resistant bacterial strains, interest in phage therapy has increased in the recent years. In addition to being used for disease control, the high specificity of bacteriophages makes them useful in differentiation of closely related species of plant pathogenic bacteria. In this research, twenty five phages, specific to *Xanthomonas euvesicatoria*, causal agent of pepper bacterial spot, were isolated. Host specificity determination performed with 53 phages from University of Florida collection resulted in set of phages which could be used for differentiation of *X. euvesicatoria*, *X. perforans*, *X. vesicatoria* and *X. gardneri*.

**Key words:** bacteriophages, *Xanthomonas euvesicatoria*, isolation, pepper, differentiation

**(Received: 27.08.2012.)**

**(Accepted: 21.09.2012.)**

## FIZIOLOŠKA ISPITIVANJA IZOLATA *COLLETOTRICHUM* SPP.

SVETLANA ŽIVKOVIĆ<sup>1</sup>, VELJKO GAVRILOVIĆ<sup>1</sup>, NENAD TRKULJA<sup>1</sup>, DUŠICA DELIĆ<sup>2</sup>, SAŠA STOJANOVIĆ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Beograd

<sup>2</sup>Institut za zemljište, Beograd

e-mail: zivkovicsvetla@gmail.com

### REZIME

U fiziološka ispitivanja su uključena 20 izolata *Colletotrichum* spp. poreklom sa plodova kruške, jabuke, višnje i paradajza, kao i referentni sojevi *C. acutatum* (CBS 294.67) i *C. gloeosporioides* (CBS 516.97). Rezultati ukazuju da pet različitih hranljivih podloga (PDA, CA, OA, MEA, CDA) sedam različitih pH (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9) i temperatura (5<sup>o</sup>, 10<sup>o</sup>, 15<sup>o</sup>, 20<sup>o</sup>, 25<sup>o</sup>, 30<sup>o</sup>, 35<sup>o</sup>C) imaju značajan uticaj na razvoj i sporulaciju izolata *Colletotrichum* spp. Sve testirane podloge, izuzev CDA su pogodne za razvoj patogena. Na podlozi PDA moguće je razlikovati pet morfoloških grupa kolonija, što potvrđuje fenotipsku varijabilnost proučavanih kultura. Podloge pH 6 i 7 su najbolje za porast i sporulaciju patogena. Optimalna temperatura za razvoj ispitivanih kolonija je 25°C, a temperature od 20° i 25°C su najpovoljnije za sporulaciju izolata *Colletotrichum* spp.

**Ključne reči:** *Colletotrichum* spp., fiziologija, porast micelije, sporulacija

### UVOD

Gljive *Colletotrichum* spp. (teleomorf *Glomerella*), su polifagne i kosmopolitske vrste umerenog i tropskog klimatskog područja. U zavisnosti od uslova sredine, osetljivosti biljke domaćina i infekcionog potencijala, pripadnici ovog roda su epifiti, endofiti, saprobi ili patogeni (Liu et al., 2007; Promputtha et al., 2007). Kao biljni paraziti, *Colletotrichum* spp. prouzrokuju ekonomske gubitke na žitaricama, legumi-

nozama, povrtarskim i voćarskim kulturama, šumskom i ukrasnom bilju, kao i vrstama iz spontane flore. Simptomi antraknoze prouzrokovani gljivama *Colletotrichum* spp. se mogu manifestovati na svim podzemnim i nadzemnim biljnim organima: korenovom sistemu, krtolama, stablu, listovima, cvetu i plodu (Bailey et al., 1992).

Faktori životne sredine imaju važnu ulogu u ostvarivanju infekcije i razvoju antraknozno procesa na biljci domaćinu. Intenzitet i dužina



trajanja padavina, temperatura vazduha i disperzija patogena značajno utiču na stepen ispoljenih simptoma (Dodd et al., 1992). Ustanovljeno je da razvoju bolesti u poljskim uslovima pogoduju povišena temperatura (>27°C) i vlažnost vazduha (č80%), (Roberts et al., 2001).

Usled ostvarivanja latentnih infekcija do pojave antraknoze može doći i nakon berbe plodova (Freeman et al., 1998). Sposobnost izazivanja latentne infekcije je primarna karakteristika vrsta roda *Colletotrichum* (Sinclair, 1999). Do manifestacije simptoma dolazi prelaskom gljive na nekrotrofni oblik parazitiranja što je uslovljeno većim brojem faktora. Primarni činioci u procesu transformacije patogena iz biotrofne u nekrotrofnu fazu su povećana temperatura i vlažnost vazduha, kao i hemijske reakcije u tkivu biljke domaćina (Leandro et al., 2003; Peres et al., 2005).

S obzirom da je u našoj zemlji proteklih godina utvrđeno značajno prisustvo gljiva - prouzrokovala antraknoze plodova voća i povrća (Živković, 2011), kao i da su fiziološka proučavanja od velikog značaja za biologiju patogena, cilj ovog rada je ispitati uticaj hranljivih podloga, kiselosti podloge i temperatura na razvoj i sporulaciju izolata *Colletotrichum* spp., poreklom iz Srbije.

## MATERIJAL I METODE

Standardnim fitopatološkim metodama iz plodova sa karakterističnim simptomima antraknoze dobijen je veliki broj izolata *Colletotrichum* spp. U fiziološka ispitivanja su uključeni: izolati sa ploda kruške (KC-6, KC-9, KC-12, KC-21, KC-23, KC-82); jabuke (JC-4, JC-5, JC-6 i JC-7); višnje (VC-3, VC-5, VC-7 i VC-9), paradajza (PC-1, PC-2, PC-3, PC-4, PC-5 i PC-6), kao referentni sojevi *C. gloeosporioides* (CBS 516.97) i *C. acutatum* (CBS 294.67) iz kolekcije Centraalbu-

reau voor Schimmelcultures, Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, Holandija.

### Uticaj hranljivih podloga na porast i sporulaciju izolata *Colletotrichum* spp.

Ispitivanje uticaja hranljivih podloga na porast i sporulaciju izolata *Colletotrichum* spp., obavljeno je na: PDA (potato dextrose agar), CA (carrot agar), OA (oatmeal agar), MEA (malt extract agar) i CDA (Czapek-Dox agar) podlozi, (Dhingra and Sinclair, 1986).

U Petri kutije (Ø 90 mm) je razlivano po 20 ml odgovarajuće sterilne hranjive podloge. Zasejavanje podloga je izvršeno nanošenjem fragmenata micelije ispitivanih izolata (Ø 5 mm) iz kultura starih 7 dana, odgajanih na PDA podlozi. Diskovi micelija su postavljeni su u centar Petri kutija, a zasejane podloge su potom inkubirane u termostatu na temperaturi od 25°C. Porast izolata *Colletotrichum* spp. ocenjen je sedmog dana merenjem prečnika kolonije. Prema terminologiji Hawksworth et al. (1995) opisani su: izgled, boja i struktura micelije, ivice kolonije, naličje kulture i pojava zoniranosti.

Intenzitet sporulacije proučavanih izolata određen je dve nedelje nakon zasejavanja. Suspenzije konidija su pripremane od kultura gljiva odgajanih na temperaturi od 25°C. U razvijene kolonije nalivano je 10 ml sterilne vode, nakon čega je micelija odvajana od podloge blagim struganjem pomoću staklenog štapića u cilju oslobađanja formiranih konidija. Suspenzija gljiva je proceđena kroz dva sloja sterilne gaze, a koncentracija spora (10<sup>6</sup> konidija/ml) izmerna pomoću hemocitometra. Stepent sporulacije izolata *Colletotrichum* spp. prikazan je prema skali Quesada and Lopez (1980), gde je: + slaba sporulacija (<5.000 konidija/ml); ++ srednja sporulacija (5.000 – 10.000 konidija/ml); +++ obilna sporulacija (>10.000 konidija/ml).



### Uticaj kiselosti podloge na porast i sporulaciju izolata *Colletotrichum* spp.

Ispitivanje uticaja kiselosti podloge na porast i sporulaciju izolata *Colletotrichum* spp., obavljeno je na podlozi PDA. Kiselost podloge je podešena pre sterilizacije na pH-metru dodavanjem 1M HCl i 1M NaOH, na sledeće pH vrednosti: 3, 4, 5, 6, 7, 8 i 9. Po završetku sterilizacije pH je proverena u mlakoj, rastopljenoj podlozi pomoću indikator papira (Universalindikator pH 0-14, Merck). Izolati su zasejavani i inkubirani na 25°C tokom 7 dana, a potom je obavljeno merenje prečnika kolonija. Intenzitet sporulacije je određen nakon dve nedelje prema prethodno opisanoj metodi (Quesada and Lopez, 1980).

### Uticaj temperature na porast i sporulaciju izolata *Colletotrichum* spp.

Ispitivanje uticaja temperature na porast i sporulaciju izolata *Colletotrichum* spp. obavljeno je na sledećim temperaturama: 5°, 10°, 15°, 20°, 25°, 30° i 35°C. Ispitivani izolati su zasejavani na PDA podlogu, inkubirani u termostatu 7 dana, a nakon toga obavljeno je merenje prečnika kolonija. Po isteku dve nedelje, prema navedenoj metodi (Quesada and Lopez, 1980), određen je intenzitet sporulacije izolata *Colletotrichum* spp.

### Statistička obrada rezultata

Fiziološka ispitivanja izolata *Colletotrichum* spp. izvedena su u tri ponavljanja. Analiza uticaja dva faktora obavljena je primenom parametarskog modela analize varijanse (ANOVA/MANOVA), a provera adekvatnosti ovog modela za svaku konkretnu analizu sprovedena je na osnovu vrednosti Leveneovog testa za homogenost varijansi. Ispitivani izolati *Colletotrichum* spp. grupisani su modelom klaster analize, baziranoj na Euklidskoj distanci i kompletnom povezivanju. Statistička obrada rezultata obavljena

je upotrebom paketa STATISTICA v. 6 (StatSoft, Inc.).

## REZULTATI

### Uticaj hranljivih podloga na porast i sporulaciju izolata *Colletotrichum* spp.

Rezultati ispitivanja pokazuju da hranljive podloge značajano utiču na izgled i brzinu porasta micelije, kao i sporulaciju izolata *Colletotrichum* spp.

PDA podloga predstavlja generalno najpovoljniji supstrat za većinu ispitivanih izolata (Sl. 1.B). Na ovoj podlozi proučavane kulture formiraju pet jasno diferenciranih morfoloških grupa. Prvu grupu čine izolati *Colletotrichum* spp. poreklom sa ploda kruške i jabuke (KC-6, KC-9, KC-12, JC-5, JC-6, JC-7), koji su po fenotipskim karakteristikama micelije i brzini porasta najbližiji referentnom izolatu *C. gloeosporioides* (CBS 516.97). Starenjem kulture postaju tamno-sivo-maslinaste, a sa naličja se u većini slučajeva uočava formiranje koncentričnih prstenova svetlije i tamnije boje. Drugoj, izrazito specifičnoj grupi pripadaju izolati sa ploda kruške (KC-21, KC-23, KC-82), intenzivnog porasta i karakteristične ružičaste boje. Razvojem kolonija dolazi do pojave zoniranosti i formiranja koncentrično raspoređenih ili nepravilno razbacanih acervula iz kojih se u žutonarandžastom matriksu oslobađaju konidije. U okviru treće grupe je izolat sa jabuke (JC-4), koji po makroskopskim osobinama micelije najviše odgovara referentnom izolatu *C. acutatum* (CBS 294.67). Kolonije su sveto do tamno sive, umerenog porasta, nepravilnih ivica, a sa naličja je uočena pojava naranžastih i svetlomrkih koncentričnih zona. Četvrtu grupu čine isključivo izolati poreklom sa ploda višnje (VC-3, VC-5, VC-7, VC-9), koji su po obojenosti i strukturi micelije veoma slični prvoj grupi, ali su istovremeno i specifični po usporenom porastu. Starenjem kulture poprimaju karakterističan

zonirani izgled. Na osnovu morfoloških osobina izolati sa paradajza (PC-1, PC-2, PC-3, PC-4, PC-5, PC-6) su izdvojeni u posebnu, petu grupu. Kolonije su znatno svetlije boje, rastresite konzistencije, umerenog porasta i po ovom obeležju su bliski trećoj grupi izolata, kojoj pripada i referentni *C. acutatum* (CBC 294.67). Na PDA supstratu većina ispitivanih patogena izrazito dobro sporuliše (Tabela 1). Slabu fruktifikaciju na ovoj podlozi manifestuju samo izolati poreklom sa ploda višnje (VC-3, VC-5, VC-7, VC-9).

Na CA podlozi izolati *Colletotrichum* spp. najčešće formiraju supstratnu miceliju, u većini slučajeva karakterističnog izgleda. Hromogeni izolati sa kruške (KC-21, KC-23 i KC-82) su nešto intenzivnije, tamno ružičaste boje i svetlije centralne zone, a izolat JC-4 sa ploda jabuke, obrazuje kompaktnu tamnosivu koloniju sa jasno izdiferenciranim perifernim prstenom, svetlonarandžaste boje. Ivice kolonija svih proučavanih izolata su ravne, pravilne (osim izolata VC-9) i blago utonule u supstrat. Sa naličja kultura nije utvrđeno formiranje stromatičnih tvorevina. Na CA podlozi kod svih izolata je konstatovana umerena do obilna fruktifikacija (Tabela 1).

Na podlozi OA većina izolata *Colletotrichum* spp. obrazuje bujnu, vunastu miceliju, svetlijeg kolorita (hromogeni izolati su izrazito svetloružičasti, a ostali svetlosive do beličastosive boje), (Sl. 1.C). Izolat sa paradajza, PC-3 obrazuje koncentrične zone vazdušaste i supstratne micelije, a karakterističnu svetlonarandžastu koloniju na OA supstratu formira referentni soj *C. acutatum* (CBS 294.67). Ivice kultura su pravilne i cele, osim kod referentnog *C. gloeosporioides* (CBS 516.97) čije se periferna zona zrakasto širi. Sa naličja, zbog gustine supstrata obojenost kultura nije jasno izdiferencirana, a takođe nije uočeno obrazovanje stromatičnih struktura. Za većinu izolata ovo je izrazito pogodna sredina za sporulaciju (Tabela 1).

Izolati *Colletotrichum* spp. na MEA podlozi formiraju izrazito svetle, kompaktne kolonije, pravilnih ili blago talasastih ivica. Izolati KC-6, KC-9 i KC-12, kao i svi patogeni sa jabuke, višnje i paradajza su gotovo identične beličastosive boje i pamučaste teksture. Hromogeni izolati KC-21, KC-23 i KC-82 su blede ružičasti, a referentni soj *C. acutatum* svetlonarandžaste boje i supstratne micelije. Sa naličja sve kolonije zadržavaju svoj karakterističan izgled, a u većini slučajeva nakon dve nedelje dolazi do formiranja začetaka stromatičnim tvorevina. Isključujući izolate poreklom sa višnje, ostale kulture *Colletotrichum* spp. manifestuju umerenu sporulaciju na MEA podlozi (Tabela 1).

Na podlozi CDA svi ispitivani patogeni *Colletotrichum* spp. obrazuju miceliju slabe bujnosti i brašnaste teksture (Sl. 1.A). Izolati KC-6 i KC-9 su sive boje, a ostali (osim grupe hromogenih izolata sa kruške) prljavobeli do snežno beličasti. Izolati KC-21, KC-23 i KC-82 na CDA podlozi formiraju kolonije tamnonarandžasto boje. Periferna zona svih izolata je blago režnjevita ili nepravilna, a sa naličja nije uočeno obrazovanje stromatičnih struktura. CDA podloga je veoma nepovoljna za sporulaciju izolata *Colletotrichum* spp. (Tabela 1).

Pored morfoloških osobina i različitog stepena sporulacije, izolati *Colletotrichum* spp. manifestuju i različitu brzinu porasta na ispitivanim hranljivim podlogama (Sl. 2). U proseku, najpovoljnija podloga za porast proučavanih izolata je PDA. Na ovom supstratu slab porast ispoljavaju samo patogeni poreklom sa višnje i izolat JC-4. Na podlogama CA i OA najveći prečnik kolonije, sedam dana nakon zasejavanja formirali su izolati KC-9, KC-12, KC-21, KC-23 i KC-82, sa ploda kruške. Od svih testiranih hranljivih podloga OA se pokazala najpovoljnijom za porast patogena VC-3, VC-5, VC-7 i VC-9. Na MEA ispitivani izolati su ispoljili gotovo ujednačen porast. Ovaj

supstrat je najnepovoljniji za razvoj referentnog soja *C. acutatum* (CBS 294.67). Najslabiji porast svih proučavanih kultura *Colletotrichum* spp. je zabeležen na CDA podlozi. Referentni soj *C. gloeosporioides* (CBS 516.97) u poređenju sa ostalim izolatima, manifestuje izrazito brz porast na svih hranljivim supstratima.

Na osnovu Leveneovog testa konstatovana je nehomogenost varijansi patogenih kultura *Colletotrichum* spp. ( $F=4,919$ ;  $p=0,000$ ). Dobijeni rezultati su obrađeni analizom varijanse (MANOVA), kao dvofaktorijalni ogled. Vrednosti MANOVE ukazuju da između izolata, hranljivih podloga i njihovih interakcija postoje statistički veoma značajne razlike (Tabela 2).

Na osnovu ispoljenih sličnosti/razlika u pogledu porasta izolata *Colletotrichum* spp. na pet hranljivih podloga, urađen je dendogram baziran na Euklidskoj distanci i kompletnom povezivanju (Sl. 3). Svi ispitivani izolati su svrstani u tri klastera. Najveću razliku u pogledu porasta na različitim hranljivim supstratima ispoljava referentni soj *C. gloeosporioides* (CBS 516.97) i on formira prvi klaster. Drugi klaster je obrazovan od dva subklastera. Izolati poreklom sa ploda paradajza su svrstani u prvi subklaster, a patogeni poreklom sa višnje i izolat JC-4 pripadaju drugom subklasteru. U okviru trećeg klastera se nalaze dva subklastera. Prvi subklaster čine izolati KC-82, KC-21, KC-12, KC-23, a drugi referentni *C. acutatum*, patogene kulture sa jabuke i izolat KC-6. Klaster analiza je potvrdila heterogenost ispitivanih populacija *Colletotrichum* spp. Najmanje razlike u porastu na različitim hranljivim podlogama u većini slučajeva manifestuju izolati poreklom sa istog domaćina.

#### **Uticaj kiselosti podloge na porast i sporulaciju izolata *Colletotrichum* spp.**

Većina izolata nije značajno varirala u morfološkim osobinama kolonija koje su formi-

rane na različitim pH vrednostima. Na podlozi pH 3, svi izolati obrazuju kompaktnu sivo beličastu miceliju, izrazito slabe bujnosti (Sl. 4.A). Ivične zone su pravilne ili blago talasaste, a sa naličja kultura nisu konstatovani začeci formiranja stromatičnih tvorevina. Sporulacija izolata *Colletotrichum* spp. na podlozi ove kiselosti je izrazito slaba (Tabela 3).

PDA podloga kiselosti pH 4 je znatno povoljnija za razvoj ispitivanih izolata. Sve kulture (uključujući i hromogene izolate sa ploda kruške) su u centralnoj zoni svetlo do tamno sive boje, a micelija je kompaktna i brašnastog izgleda. Ivice kolonija su ravne, pravilne i blago uto-nule u supstrat. Sa naličja kultura nije utvrđeno formiranje stromatičnih struktura. Na pH 4 svi izolati *Colletotrichum* spp. manifestuju fruktifikaciju slabog ili umerenog intenziteta (Tabela 3).

Na podlogama pH 5, 6, 7 i 8 svi proučavani izolati obrazuju kolonije karakterističnog izgleda: svetlo do tamnosive (izolati poreklom sa jabuke, višnje, paradajza i nehromogeni izolati sa ploda kruške) i ružičaste boje (hromogeni izolati sa ploda kruške), (Sl. 4.B). U centralnom delu micelija je homogena, vunasta, a u perifernoj zoni vazdušasta i rastrestita. Na PDA pH 5, 6 i 7 kulture su intenzivne bujnosti i ujednačenih fenotipskih karakteristika, a sa naličja je zabeležena pojava stromatičnih tvorevina. Sporulacija izolata je umerena ili obilna. Podloga sa pH vrednošću 8 je nešto nepovoljnija za razvoj ispitivanih kultura *Colletotrichum* spp. Na naličju nisu konstatovane stromatične tvorevine, a fruktifikacija najvećeg broja izolata je umerena (Tabela 3).

Na podlozi pH 9 sve formirane kolonije *Colletotrichum* spp. su slabije bujnosti, sa svetlo obojenom micelijom, pamučaste strukture (Sl. 4.C). Ivična zona je cela ili blago nepravilna. Sa naličja nije uočeno obrazovanje stroma. Bazna sredina nije pogodovala za sporulaciju, pa većina

ispitivanih izolata (osim KC-21, KC-23 i KC-82), fruktificira veoma slabo (Tabela 3).

Osim morfoloških karakteristika i različitog stepena sporulacije, izolati *Colletotrichum* spp. manifestuju i neujednačen porast na PDA podlozi različite kiselosti (Sl. 5). Za većinu izolata najpovoljnija pH vrednost hranljivog supstrata je 6. Na podlozi ove kiselosti najveći prečnik kolonije formiraju patogeni KC-6, KC-9, KC-12, svi izolati sa ploda jabuke i paradajza, kao i referentni soj *C. acutatum* CBS 294.67. PDA kiselosti 7 je najpovoljniji za porast hromogenih izolata sa kruške (KC-21, KC-23 i KC-82), za razliku od kultura poreklom sa antraknoznih plodova višnje (VC-3, VC-5, VC-7 i VC-9) kojima više pogoduje kiselija sredina, vrednosti pH 5. Na podlozi pH 8 gotovo svi izolati znatno brže obrazuju kolonije, nego na PDA kiselosti 4. Takođe, ekstremno bazna sredina, pH 9 je znatno povoljnija za porast svih ispitivanih kultura od podloge pH vrednosti 3. Za razvoj referentnog soja *C. gloeosporioides* CBS 516.97 podjednako su dobri hranljivi supstrati čija je pH 5, 6 i 7.

Leveneovim testom utvrđena je nehomogenost varijansi kultura *Colletotrichum* spp. ( $F=5,395$ ;  $p=0,000$ ). Rezultati obrađeni analizom varijanse (MANOVA) kao dvofaktorijalni ogled ukazuju da između izolata, pH vrednosti podloge i njihovih interakcija postoje statistički veoma značajne razlike (Tabela 4).

Na osnovu ispoljenih sličnosti/razlika u pogledu porasta izolata *Colletotrichum* spp. na sedam različitih pH vrednosti PDA podloge, urađen je dendrogram baziran na Euklidskoj distanci i kompletnom povezivanju (Sl. 6). Svi ispitivani izolati su svrstani u tri klastera. Najveću razliku u pogledu porasta na različitim pH vrednostima ispoljava referentni soj *C. gloeosporioides* (CBS 516.97) i on formira prvi klaster. Drugi klaster sačinjavaju dva subklastera sa po 11 izolata

*Colletotrichum* spp. Patogeni poreklom sa ploda paradajza i izolat JC-4 sa ploda jabuke svrstani su u prvi, a patogeni poreklom sa višnje u drugi subklaster. Treći klaster takođe grade dva subklastera, od kojih prvi čine izolati poreklom sa ploda kruške (KC-82, KC-23, KC-21, KC-12, KC-9 i KC-6) i referentni soj *C. acutatum* (CBS 294.67), a drugi patogene kulture sa jabuke (JC-5, JC-6 i JC-7). Klaster analiza urađena na osnovu porasta kultura na PDA podlozi različite kiselosti je potvrdila heterogenost ispitivanih populacija *Colletotrichum* spp.

#### Uticaj temperature na porast i sporulaciju izolata *Colletotrichum* spp.

Rezultati ispitivanja pokazuju da sve temperature značajno utiču na morfološke karakteristike, brzinu porasta micelije i sporulaciju izolata *Colletotrichum* spp.

Temperatura od 5°C je najpovoljnija za razvoj svih ispitivanih izolata. Sedam dana nakon zasejavanja, oko nanetih fragmenata gljive formiraju se nežni, prozračni začeci hifa (Sl. 7A). Na ovoj temperaturi nivo sporulacije je izrazito nizak, a kod pojedinih izolata *Colletotrichum* spp. fruktifikacija nije konstatovana (KC-6, KC-9, KC-12, CBS 294.67 i CBS 516.97), (Tabela 5).

Ograničavajući faktor rasta većine proučavanih izolata je i temperatura od 10°C. Svi izolati na ovoj temperaturi obrazuju miceliju beličast-sive boje, vazdušastu i prozračnu, bez jasnih granica između centralne i periferne zone. Kulture *Colletotrichum* spp. poreklom sa ploda kruške, izolati sa jabuke, kao i referentni soj *C. gloeosporioides* (CBS 516.97) manifestuju nešto veći porast na ovoj temperaturi. Na 10°C sporulacija svih izolata je slaba (Tabela 5), a na naličju nije uočeno formiranje stromatičnih struktura.

Na temperaturama od 15°, 20° i 25°C, proučavani patogeni obrazuju kolonije karakterističnog izgleda, (Sl. 7B). Hromogeni izolati sa ploda

kruške (KC-21, KC-23 i KC-82) su ružičaste boje i bujne micelije, pravilnih ivica, a sa naličja je konstatovano formiranje stromatičnih struktura. Kolonije ostalih izolata su bečičastosive do sivo-maslinaste, pamučaste ili vunaste strukture i u većini slučajeva sa jasno izdiferenciranim svetlo obojenim perifernim prstenom. Na ovim temperaturama sporulacija izolata *Colletotrichum* spp. je umerena do obilna (Tabela 5).

Temperatura od 30°C je znatno nepovoljnija za porast i formiranje kolonija proučavanih patogeni. Micelija je slabe bujnosti, pamučasta i kompaktna, sa ivicama koje su blago utonule u supstrat. Svi izolati zadržavaju karakterističnu obojenost, ali sa naličja kultura nije konstatovano formiranje stromatičnih tvorevina. Referentni sojevi *C. acutatum* (CBS 294.67) i *C. gloeosporioides* (CBS 516.97) su dobre bujnosti i za razliku od ostalih ispitivanih patogeni manifestuju visok stepen sporulacije (Tabela 5).

Na temperaturi od 35°C gotovo svi izolati obrazuju kolonije izrazito slabe bujnosti, tamnomrke boje, kompaktne, brašnaste teksture, sa prozračnom perifernom zonom, potpuno utonulom u supstrat (Sl. 7C). Na ovoj temperaturi micelija referentnog soja *C. gloeosporioides* (CBS 516.97) je bujna, karakterističnog izgleda i kolorita i umerenog nivoa sporulacije. Svi ostali izolati *Colletotrichum* spp. na 35°C fruktificiraju izrazito slabo (Tabela 5).

Pored morfoloških osobina i različitog stepena sporulacije, izolati *Colletotrichum* spp. ispoljavaju i različitu brzinu porasta na ispitivanim temperaturama (Sl. 8). Osim izolata JC-4 koji najveći porast manifestuje na 20°C, svi ostali patogeni najveći prečnik kolonija formiraju na temperaturi od 25°C. Eksperimentom je utvrđeno da su minimalne i maksimalne vrednosti temperatura za porast proučavanih izolata *Colletotrichum* spp., ispod 5°C, odnosno preko 35°C. Niske temperature su pogodnije za većinu pa-

togena, osim za referentne sojeve *C. acutatum* (CBS 294.67) i *C. gloeosporioides* (CBS 516.97). S obzirom da su u pitanju izolati poreklom iz Australije i Novog Zelanda, porast ovih kultura je intenzivniji na višim temperaturama.

Leveneovim testom je utvrđena nehomogenost varijansi patogenih kultura *Colletotrichum* spp. ( $F=2,221$ ;  $p=0,000$ ), a rezultati su obrađeni analizom varijanse (MANOVA) kao dvofaktorijalni ogled. Utvrđeno je da između izolata, temperatura i njihovih interakcija postoje statistički veoma značajne razlike (Tabela 6).

Na osnovu ispoljenih sličnosti/razlika u pogledu porasta izolata *Colletotrichum* spp. na sedam različitih temperatura, urađen je dendrogram baziran na Euklidskoj distanci i kompletnom povezivanju (Sl. 9). Svi ispitivani izolati su svrstani u tri klastera. Najveću razliku u pogledu porasta na različitim temperaturnim vrednostima manifestuje referentni soj *C. gloeosporioides* (CBS 516.97), koji formira prvi zasebni klaster. Drugom klasteru pripada referentni soj *C. acutatum* (CBS 294.67). Treći klaster obrazuju dva subklastera sa preostalih 20 izolata *Colletotrichum* spp. U okviru prvog subklastera izdvaja se izolat JC-4 sa ploda jabuke, a patogeni poreklom sa ploda paradajza i višnje grupisani su i formiraju dva zasebna podklastera. Drugi subklaster u okviru trećeg klastera takođe grade dva manja podklastera, od kojih prvi čine hromogeni izolati poreklom sa ploda kruške (KC-82, KC-23, KC-21), a drugi patogene kulture sa jabuke (JC-5, JC-6 i JC-7) i nehromogeni izolati sa kruške (KC-12, KC-9 i KC-6). Klaster analiza urađena na osnovu porasta kultura na različitim temperaturama, ukazuje na izrazitu varijabilnost i heterogenost ispitivanih populacija *Colletotrichum* spp.

**Tabela 1.** Sporulacija izolata *Colletotrichum* spp. na različitim hranljivim podlogama.  
**Table 1.** Sporulation of isolates of *Colletotrichum* spp. on different culture media.

Izolat Isolate	Hranljiva podloga Culture medium				
	PDA	CA	OA	MEA	CDA
KC-6	+++	++	+++	++	+
KC-9	+++	++	+++	++	+
KC-12	+++	++	+++	++	+
KC-21	+++	+++	+++	++	+
KC-23	+++	+++	+++	++	+
KC-82	+++	+++	+++	++	+
JC-4	+++	++	+++	++	+
JC-5	+++	++	++	++	+
JC-6	+++	++	++	++	+
JC-7	+++	++	++	++	+
PC-1	+++	++	+++	++	+
PC-2	+++	++	+++	++	+
PC-3	+++	++	+++	++	+
PC-4	+++	++	+++	++	+
PC-5	+++	++	+++	++	+
PC-6	+++	++	+++	++	+
VC-3	+	++	++	+	+
VC-5	+	++	++	+	+
VC-7	+	++	++	+	+
VC-9	+	++	++	+	+
CBS 294.67	+++	++	+++	++	+
CBS 516.97	+++	++	+++	++	+

**Tabela 2.** Analiza varijanse porasta micelije izolata *Colletotrichum* spp. na različitim podlogama.  
**Table 2.** Analysis of variance of mycelial growth of isolates of *Colletotrichum* spp. on different media.

Izvori varijacije Sources of variation	Stepeni slobode	Sredine kvadrata	Količnik	Nivo značajnosti
	df	MS	F	p
Izolati Isolates	21	746,201	1366,139	0,000**
Podloge Media	4	3267,485	5982,081	0,000**
Izolati x podloge Isolates x media	84	47,888	87,674	0,000**
Greška Error	220	0,546	-	-

\*\* Statistički veoma značajna razlika,  $p < 0,01$ ;

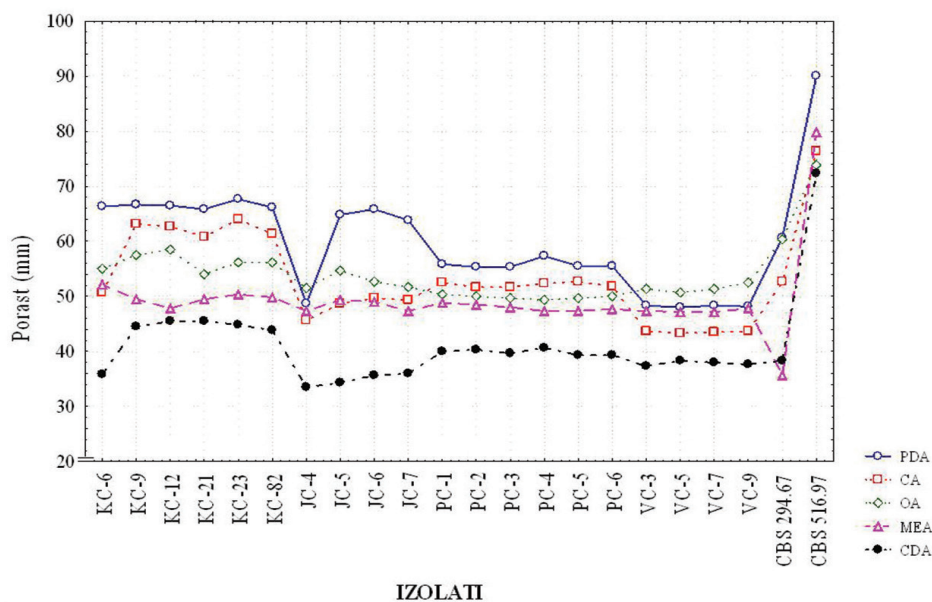
\*\* Statistically very significant difference,  $p < 0.01$ .





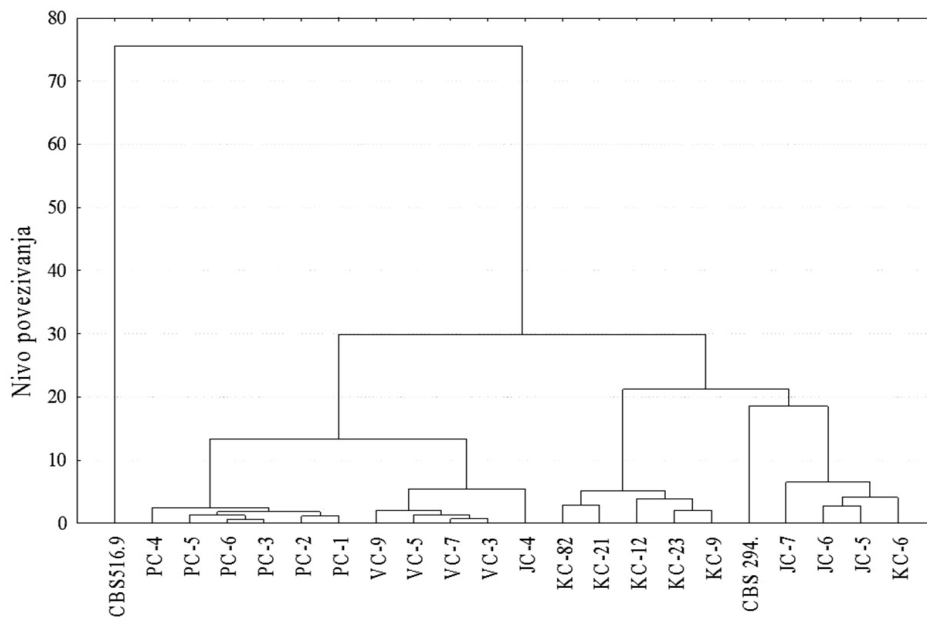
Sl. 1. Izolati *Colletotrichum* spp. na hranljivim podlogama: A. CDA; B. PDA; C. OA; (s leva na desno gornji red: KC-9, KC-12, KC-21, KC-23; sredina: KC-82, JC-4, J-7, PC-3; donji red: VC-7, VC-9, CBS 294.67, CBS 516.97).

Fig. 1. Isolates of *Colletotrichum* spp. on culture media: A. CDA; B. PDA; C. OA; (from left to right top row: KC-9, KC-12, KC-21, KC-23; middle: KC-82, JC-4, J-7, PC-3; bottom row: VC-7, VC-9, CBS 294.67, CBS 516.97).



Sl. 2. Porast micelije izolata *Colletotrichum* spp. na različitim hranljivim podlogama.

Fig. 2. Mycelial growth of isolates *Colletotrichum* spp. on different culture media.



Sl. 3. Dendrogram izolata *Colletotrichum* spp. na osnovu porasta micelije na različitim hranljivim podlogama.

Fig. 3. Dendrogram of isolates of *Colletotrichum* spp. based of mycelial growth on different culture media.

**Tabela 3.** Sporulacija izolata *Colletotrichum* spp. na različitim pH podloge.  
**Table 3.** Sporulation of isolates of *Colletotrichum* spp. on different medium pH.

Izolat Isolate	pH						
	3	4	5	6	7	8	9
KC-6	+	+	++	+++	+++	++	+
KC-9	+	+	++	+++	+++	++	+
KC-12	+	+	++	+++	+++	++	+
KC-21	+	++	+++	+++	+++	++	++
KC-23	+	++	+++	+++	+++	++	++
KC-82	+	++	+++	+++	+++	++	++
JC-4	+	++	+++	+++	+++	++	+
JC-5	+	+	+++	+++	+++	++	+
JC-6	+	+	+++	+++	+++	++	+
JC-7	+	+	+++	+++	+++	++	+
PC-1	+	++	+++	+++	+++	++	+
PC-2	+	++	+++	+++	+++	++	+
PC-3	+	++	+++	+++	+++	++	+
PC-4	+	++	+++	+++	+++	++	+
PC-5	+	++	+++	+++	+++	++	+
PC-6	+	++	+++	+++	+++	++	+
VC-3	+	+	++	++	++	++	+
VC-5	+	+	++	++	++	++	+
VC-7	+	+	++	++	++	++	+
VC-9	+	+	++	++	++	++	+
CBS 294.67	+	++	+++	+++	+++	++	+
CBS 516.97	+	++	+++	+++	+++	++	+

**Tabela 4.** Analiza varijanse porasta micelije izolata *Colletotrichum* spp. na podlozi različite pH.  
**Table 4.** Analysis of variance of mycelial growth of isolates of *Colletotrichum* spp. on different medium pH.

Izvori varijacije Sources of variation	Stepeni slobode df	Sredine kvadrata MS	Količnik F	Nivo značajnosti p
Izolati Isolates	21	1168,71	2221,99	0,000**
pH	6	13324,46	25332,92	0,000**
Izolati x pH Isolates x pH	126	61,11	116,18	0,000**
Greška Error	308	0,52	-	-

\*\* Statistički veoma značajna razlika p<0,01;

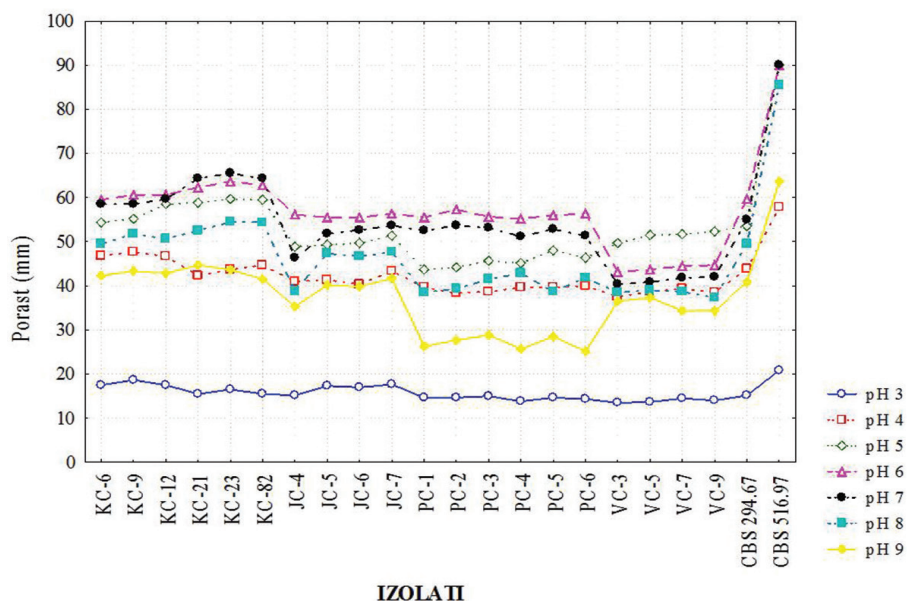
\*\* Statistically very significant difference, p<0.01.





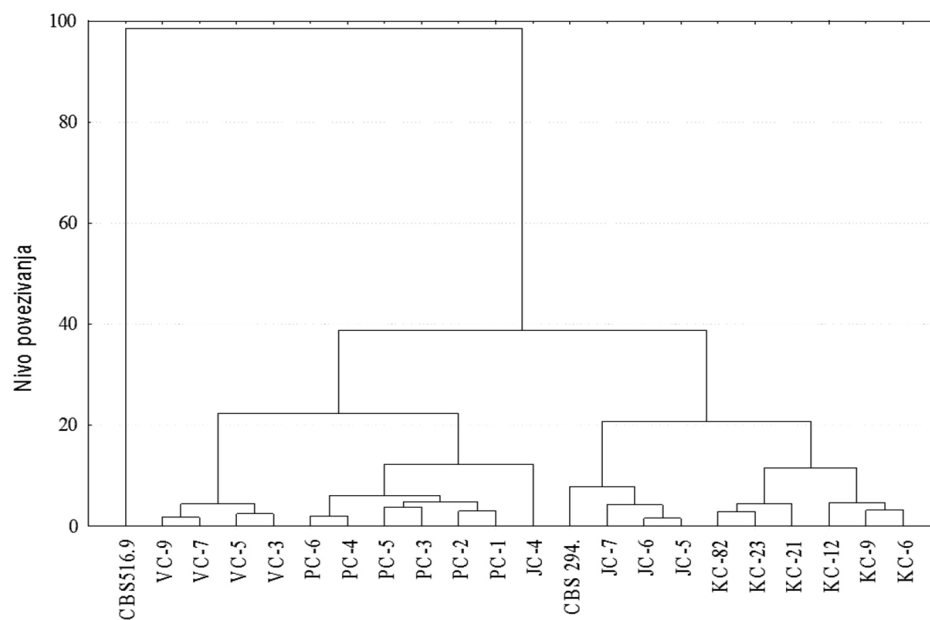
Sl. 4. Izolati *Colletotrichum* spp. na: A. pH3; B. pH6; C. pH9. (s leva na desno gornji red: KC-9, KC-12, KC-21, KC-23; sredina: KC-82, JC-4, J-7, PC-3; donji red: VC-7, VC-9, CBS 294.67, CBS 516.97).

Fig. 4. Isolates of *Colletotrichum* spp. on: A. pH3; B. pH6; C. pH9. (from left to right top row: KC-9, KC-12, KC-21, KC-23; middle: KC-82, JC-4, J-7, PC-3; bottom row: VC-7, VC-9, CBS 294.67, CBS 516.97).



Sl. 5. Porast micelije izolata *Colletotrichum* spp. na različitim pH.

Fig. 5. Mycelial growth of isolates *Colletotrichum* spp. on different pH.



Sl. 6. Dendrogram izolata *Colletotrichum* spp. na osnovu porasta micelije na različitim pH.

Fig. 6. Dendrogram of isolates of *Colletotrichum* spp. based of mycelial growth on different pH.

**Tabela 5.** Sporulacija izolata *Colletotrichum* spp. na različitim temperaturama.  
**Table 5.** Sporulation of isolates of *Colletotrichum* spp. on different temperatures.

Izolat Isolate	Temperatura Temperature						
	5°	10°	15°	20°	25°	30°	35°
KC-6	-	+	++	+++	+++	+	+
KC-9	-	+	++	+++	+++	+	+
KC-12	-	+	++	+++	+++	+	+
KC-21	+	+	+++	+++	+++	++	+
KC-23	+	+	+++	+++	+++	++	+
KC-82	+	+	+++	+++	+++	++	+
JC-4	+	+	++	+++	+++	+	+
JC-5	+	+	++	+++	+++	+	+
JC-6	+	+	++	+++	+++	+	+
JC-7	+	+	++	+++	+++	+	+
PC-1	+	+	++	+++	+++	+	+
PC-2	+	+	++	+++	+++	+	+
PC-3	+	+	++	+++	+++	+	+
PC-4	+	+	++	+++	+++	+	+
PC-5	+	+	++	+++	+++	+	+
PC-6	+	+	++	+++	+++	+	+
VC-3	+	+	++	++	++	+	+
VC-5	+	+	++	++	++	+	+
VC-7	+	+	++	++	++	+	+
VC-9	+	+	++	++	++	+	+
CBS 294.67	-	+	++	+++	+++	+++	+
CBS 516.97	-	+	++	+++	+++	+++	++

**Tabela 6.** Analiza varijanse porasta micelije izolata *Colletotrichum* spp. na različitim temperaturama.  
**Table 6.** Analysis of variance of mycelial growth of isolates of *Colletotrichum* spp. on different temperatures.

Izvori varijacije Sources of variation	Stepeni slobode	Sredine kvadrata	Količnik	Nivo značajnosti
	df	MS	F	p
Izolati Isolates	21	704,11	2133,12	0,000**
Temperature Temperatures	6	31800,54	96340,01	0,000**
Izolati x temperature Isolates x temperatures	126	107,14	324,58	0,000**
Greška Error	308	0,33	-	-

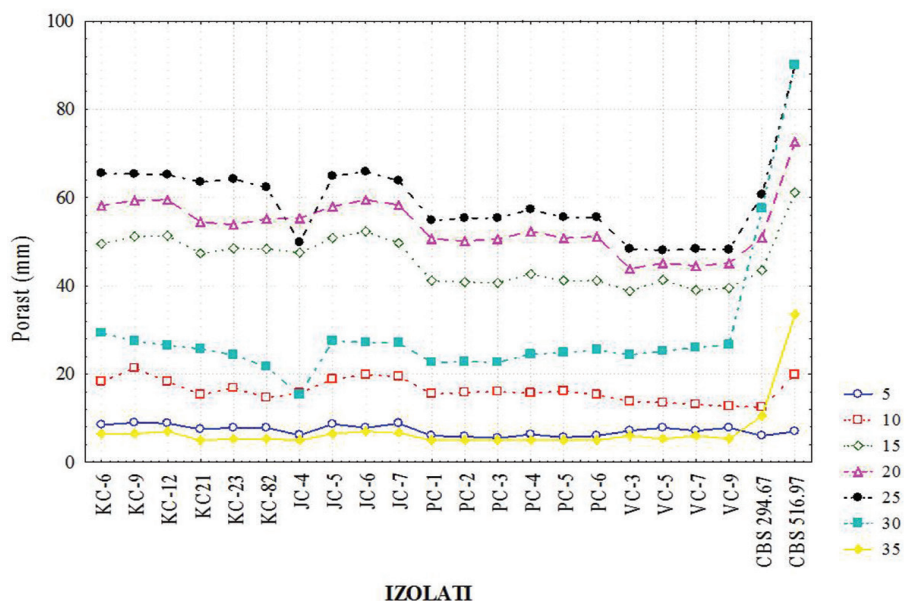
\*\* Statistički veoma značajna razlika,  $p < 0,01$ ;

\*\* Statistically very significant difference,  $p < 0.01$ .



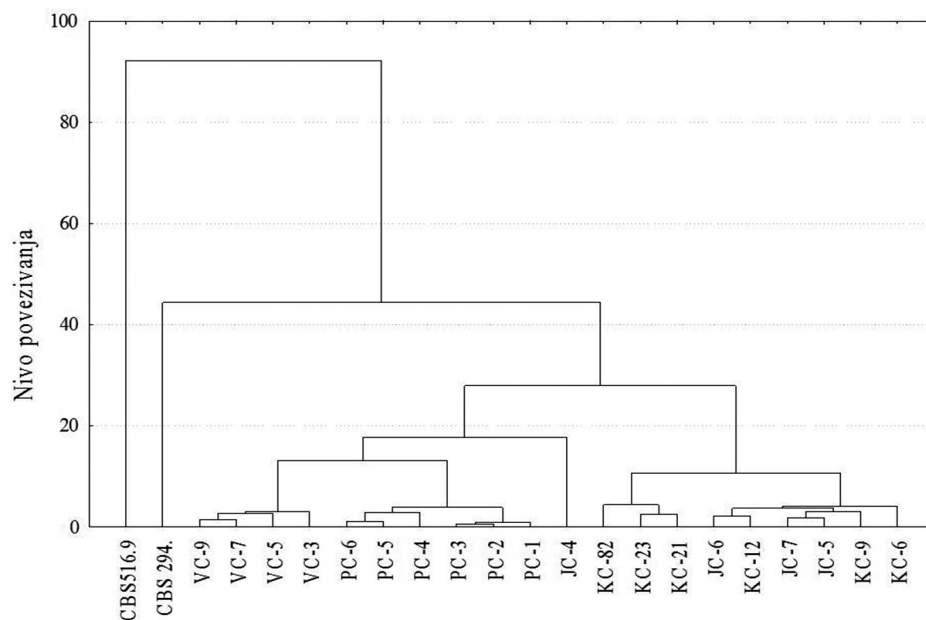
Sl. 7. Izolati *Colletotrichum* spp. na temperaturama: A. 5°C; B. 25°C; C. 35°C; (s leva na desno gornji red: KC-9, KC-12, KC-21, KC-23; sredina: KC-82, JC-4, J-7, PC-3; donji red: VC-7, VC-9, CBS 294.67, CBS 516.97).

Fig. 7. Isolates of *Colletotrichum* spp. on temperatures: A. 5°C; B. 25°C; C. 35°C; (from left to right top row: KC-9, KC-12, KC-21, KC-23; middle: KC-82, JC-4, J-7, PC-3; bottom row: VC-7, VC-9, CBS 294.67, CBS 516.97).



Sl. 8. Porast micelije izolata *Colletotrichum* spp. na različitim temperaturama.

Fig. 8. Mycelial growth of isolates *Colletotrichum* spp. on different temperatures.



Sl. 9. Dendrogram izolata *Colletotrichum* spp. na osnovu porasta micelije na različitim temperaturama.

Fig. 9. Dendrogram of isolates of *Colletotrichum* spp. based of mycelial growth on different temperatures.

## DISKUSIJA

Izolati *Colletotrichum* spp. poreklom sa plodova kruške, jabuke, višnje i paradajza, formiraju kolonije i sporulišu gotovo na svim hranljivim podlogama, pH vrednostima i temperaturama koje su bile uključene u ispitivanja.

Dobijeni rezultati pokazuju da se kolonije dobro razvijaju na većini ispitivanih supstrata. Svi izolati najveći porast ostvaruju na PDA podlozi, zatim na OA, CA i MEA, a najnepovoljniji podloga je CDA. U mnogobrojnim istraživanjima, PDA podloga se pokazala najboljom za razvoj patogena *Colletotrichum* spp., poreklom sa antraknoznih plodova voća (Stretch and Cappellini, 1963; Ivanović i Ivanović, 1992; Stojanović, 1997; Trkulja, 2004). Na PDA i OA supstratu većina ispitivanih patogena izrazito dobro sporuliše, na CA i MEA podlozi fruktifikacija je umerenog intenziteta, a na CDA sve proučavane kulture izrazito slabo sporulišu. Za razliku od naših rezultata, Miller and Baxter (1970) i Stojanović (1997) najveći stepen fruktifikacije izolata *Colletotrichum* spp., konstatuju na CA, OA i CDA podlozi. Pojedinačni izolati *Colletotrichum* spp. na različitim hranljivim podlogama obrazuju crne, stromatične tvorevine bez izdiferenciranog sadržaja, što ukazuje na homotaličnu prirodu ovih gljiva. Varijabilnost u kulturi je dobro poznata karakteristika vrste *C. gloeosporioides* (Vermeulen et al., 1984).

Podloga pH 7 je najpovoljnija za porast hromogenih izolata sa kruške, za razliku od kultura poreklom sa ploda višnje kojima više pogoduje kisela sredina, vrednosti pH 5. Za sve ostale kulture *Colletotrichum* spp. optimalna pH je 6. Ekstremno kisela sredina, pH 3 je izrazito nepovoljna za razvoj svih ispitivanih izolata. Sporulacija svih proučavanih izolata na podlogama kiselosti 5, 6 i 7 je umerena do obilna, a na pH 3 i pH 9 izrazito slabog intenziteta. Dobijeni

rezultati ne odstupaju značajno od podataka koji se odnose na uticaj pH podloge na porast izolata *Colletotrichum* spp. poreklom sa različitih domaćina. Ivanović i Ivanović (1992), konstatuju da izolati sa višnje dobro rastu na pH 5-8, a Miller and Baxter (1970) i Quesada and Lopez (1980) tvrde da su za porast i sporulaciju gljiva roda *Colletotrichum* povoljniji kiseliji supstrati, pH vrednosti 5-6. Prema Trkulji (2004) optimalan pH za razvoj izolata *C. acutatum* i *C. gloeosporioides* je pH 6.

Minimalne i maksimalne temperature za porast proučavanih kultura *Colletotrichum* spp., su ispod 5°C, odnosno preko 35°C. Osim izolata JC-4, sa ploda jabuke koji najveći porast manifestuje na 20°C, za ostale ispitivane kulture najpovoljnija je temperatura od 25°C. Najobilnija sporulacija svih izolata utvrđena je na temperaturama od 20 i 25°C. Prema brojnim literaturnim navodima temperature od 25° do 28°C su optimalne za razvoj kultura *C. gloeosporioides* sa borovnice i jabuke (Stretch and Cappellini, 1963), višnje (Ivanović i Ivanović, 1992), avokada i manga (Swart, 1999; Sangeetha and Rawal, 2007), jabuke (Trkulja, 2004) i paprike (Kim et al., 2008). Istovremeno, ovaj temperaturni opseg je najpovoljniji i za porast izolata *C. acutatum* poreklom sa različitih domaćina (Baxter et al., 1983; Smith and Black, 1990; Adaskaveg and Hartin, 1997; Trkulja, 2004). Proučavajući izolate *C. acutatum* sa ploda jagode, Wilson et al. (1990) su utvrdili da je optimalan razvoj kultura *in vitro* na temperaturama od 10°-25°C, a da su vrednosti od 5° i 35°C ograničavajući faktor razvoja. U skladu sa našim rezultatima su i istraživanja Mello et al. (2004), koji konstatuju da gljive roda *Colletotrichum* najobilniju sporulaciju postižu na 20°-24°C, dok temperature od >30°C imaju inhibitorni efekat na process fruktifikacije.

Ispitivanja fizioloških osobina izolata *Colletotrichum* spp., prouzrokovala antraknoze



plodova kruške, jabuke, višnje i paradajza, pokazala su da patogeni ovog roda osim varijabilnosti, manifestuju i visok stepen adaptibilnosti prema različitim uslovima sredine, što je osnovni preduslov njihovog opstanka i diverziteta u prirodi.

## ZAHVALNICA

Rad je realizovan u okviru Projekta TR 31018 Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

## LITERATURA

- Adaskaveg, J.E., and Hartin, R.J. (1997): Characterization of *Colletotrichum acutatum* isolates causing anthracnose of almond and peach in California. *Phytopathology*, 87: 979-987.
- Baxter A.P., van der Westhuizen, G.C.A., Eicker, A. (1983): Morphology and taxonomy of South African isolates of *Colletotrichum*. *South African. J. Bot.*, 2: 259-289.
- Bailey J.A., O Connell, R.J., Pring, R.J., Nash, C. (1992): *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. J.A. Bailey and M.J. Jeger, eds. CAB Int., Wallingford, UK.
- Dhingra, O., and Sinclair, J. (1986): *Basic Plant Pathology Methods* (second edition). CRS Press. Inc. Lewis Publishers.
- Dodd, J.C., Estrada, A., Jeger, M.J. (1992): Epidemiology of *Colletotrichum gloeosporioides* in the tropics. In: *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control* (eds. J.A. Bailey and M.J. Jeger), pp. 308-325. CAB Internacional, Wallingford, UK.
- Hawksworth, D.L., Kirk, P.M., Sutton, B.C., Pegler, D.N. (1995): *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi*. CAB International, Wallingford, Oxon, UK.
- Freeman, S., Katan, T., Shabi, E. (1998): Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose disease of various fruits. *Plant Disease*, 82: 596-605.
- Ivanović, M. i Ivanović, D. (1992): Proučavanje *Colletotrichum gloeosporioides*, prouzrokovala antraknoze višnje i delovanje nekih fungicida na gljivu *in vitro*. *Zaštita bilja*, 201: 211-218.
- Kim, T.J., Park, S.Y., Choi, W., Lee, Y.H., Kim, H.T. (2008): Characterization of *Colletotrichum* isolates causing anthracnose of pepper in Korea. *Plant Pathol. J.*, 24: 17-23.
- Leandro, L.F.S., Gleason, M.L., Nutter, F.W., Wegulo, S.N., Dixon, P.M. (2003): Influence of temperature and wetness duration on conidia and appresoria of *Colletotrichum acutatum* on symptomless strawberry leaves. *Phytopathology*, 95: 513-520.
- Liu, X.Y., Duan, J.X., Xie, X.M. (2007): *Colletotrichum yunnanense* sp. nov., a new endophytic species from *Buxus* sp. *Mycotaxon*, 100: 137-144.
- Mello, S.F.A., Machado, Z.C.A., Bedendo, P.I. (2004): Development of *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from green pepper in different culture media, temperatures and light regimes. *Sci. Agric. (Piracicaba Braz.)*, 5: 542-544.
- Miller, L.W., and Baxter, S.C.J. (1970): Some factors influencing asexual sporulation in a strain of *Glomerella cingulata* pathogenic to camellias. *Phytopathology*, 60: 743-744.
- Peres, N.A., Timmer, L.W., Adaskaveg, J.E., Correll, J.C. (2005): Lifestyles of *Colletotrichum acutatum*. *Plant Disease*, 89: 784-796.

- Promptutha, I., Lumyong, S., Dhanasekaren, V., McKenzie, E.H.C., Hyde, K.D., Jeewon, R. (2007): A phylogenetic evaluation of whether endophytes become saprotrophs at host senescence. *Microbial Ecology*, 53: 579-590.
- Roberts, P.D., Pernezny, K., Kucharek, T.A. (2001): Anthracnose caused by *Colletotrichum* sp. on pepper. *Journal of University of Florida, Institute of Food and Agricultural Sciences*, PP-178. <http://edis.ifas.ufl.edu/PP104>.
- Sangeetha, C.G., and Rawal, R.D. (2007): Nutritional studies of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. The incitant of mango anthracnose. *American-Eurasian of Sustainable Agriculture*, 1: 37-41.
- Sinclair, J.B. (1999): Latent infection of soybean plants and seeds by fungi. *Plant Disease*, 75: 220-224.
- Smith, B.J., and Black, L.L. (1990): Morphological, cultural and pathogenic variation among *Colletotrichum* species isolated from strawberry. *Plant Disease*, 74: 69-76.
- Stojanović, S. (1997): Epidemiološka i ekološka proučavanja *Colletotrichum gloeosporioides*, superparazita stroma *Polystigma rubrum*. Doktorska disertacija, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.
- Stretch, A.W., and Cappellini, R.A. (1963): Effect of various factors on the growth and sporulation of *Glomerella cingulata*. *Phytopathology*, 53: 352.
- Swart, M.G. (1999): Comparative study of *Colletotrichum gloeosporioides* from avocado and mango. Thesis Ph.D., University of Pretoria, South Africa. <http://www.scielo.org>.
- Trkulja, V. (2004): Patogene, morfološke i odgajivačke odlike *Colletotrichum* spp. prouzrokovala gorke truleži ploda jabuke. Doktorska disertacija, Poljoprivredni fakultet, Beograd.
- Quesada, G.L., and Lopez, H.E. (1980): Forma sexually medios de cultivo para *Colletotrichum gloeosporioides*, patogeno del mango en Cuba. *Ciencias de la Agricultura*, 7: 11-17.
- Vermeulen, H., De Ferrante, B., Gielink, A.J. (1984): Genetic and morphological diversity of monospore isolates of *Glomerella cingulata* with coffee berry disease. *Neth.J. Pl. Path.*, 90: 213-223.
- Wilson, L.L., Madden, L.V., Ellis, M.A. (1990): Influence of temperature and wetness duration on infection of immature and mature strawberry fruit by *Colletotrichum acutatum*. *Phytopathology*, 80: 111-116.
- Živković S. (2011): Usporedna proučavanja izolata *Colletotrichum* spp. prouzrokovala antraknoze. Doktorska disertacija, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.

**(Primljeno: 07.09.2012.)**

**(Prihvaćeno: 28.09.2012.)**

## PHYSIOLOGICAL STUDIES OF ISOLATES OF *COLLETOTRICHUM* SPP.

SVETLANA ŽIVKOVIĆ<sup>1</sup>, VELJKO GAVRILOVIĆ<sup>1</sup>, NENAD TRKULJA<sup>1</sup>, DUŠICA DELIĆ<sup>2</sup>, SAŠA STOJANOVIĆ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute for Plant Protection and Environment, Belgrade

<sup>2</sup>Institute of Soil Science, Belgrade

e-mail: zivkovicsvetla@gmail.com

### SUMMARY

In the physiological studies were included 20 isolates of *Colletotrichum* spp. originating from pear, apple, sour cherry and tomato fruits, as well as reference strains of *C. acutatum* (CBS 294.67) and *C. gloeosporioides* (CBS 516.97). The results indicated that five different culture media (PDA, CA, OA, MEA, CDA), seven different pH (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9), and temperatures (5°, 10°, 15°, 20°, 25°, 30°, 35°C) have significant influence on growth and sporulation of isolates of *Colletotrichum* spp. All tested media, except CDA, were suitable for pathogens development. Five morphological groups of colonies on PDA were observed, confirming the great phenotypic variability of isolates. The best media pH for pathogens growth and sporulation were pH 6 and 7. The optimum temperature for colonies development was 25°C, and temperatures of 20° and 25°C were the most favorable for sporulation of isolates of *Colletotrichum* spp.

**Key words:** *Colletotrichum* spp., physiology, mycelial growth, sporulation

(Received: 07.09.2012.)

(Accepted: 28.09.2012.)

## GROWTH PROMOTION OF ITALIAN RYEGRASS (*LOLIUM MULTIFLORUM* LAM.) BY APPLICATION OF PLANT GROWTH PROMOTING RHIZOBACTERIA

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

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

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

3EKO-LAB, Padinska Skela, Belgrade

<sup>4</sup>University of Belgrade, Faculty of Agriculture, Belgrade

e-mail: vukmirdusica@yahoo.com

### SUMMARY

The object of this study was to evaluate the possible PGPR effects of ryegrass inoculation with *Pseudomonas* sp. strains as well as its co-inoculation with *Rhizobium trifolii* on the yield and quality of Italian ryegrass, with the aim to select effective strains as biofertilizer. The inoculation effects of PGPR on the yield of Italian Ryegrass cultivar K-29t were examined in pot experiment under greenhouse conditions. The experiment was designed with 3 inoculated treatments with 3 replications in completely randomised system. Inoculation of ryegrass with two *Pseudomonas* sp. strains LG and L1K alone as well as strain co-inoculation with strains L1K and *Rhizobium trifolii* 459 represented treatments which were compared with control uninoculated treatment-Ø. The response of plant to the inoculation and co-inoculation was positive in comparison to uninoculated plants. Results showed a significant positive influence of co-inoculation with strains *R. trifolii* 459 and *Pseudomonas* sp. LG as well as *Pseudomonas* sp. L1K alone on shoot yield, N and P contents of Italian ryegrass. Results indicated that *Pseudomonas* sp. strains L1K and LG alone and in co-inoculation with rhizobial strains can be investigated in further researches as potential agent of biofertilizer for plant growth promotion of Italian ryegrass.

**Key words:** PGPR, Italian ryegrass, *Pseudomonas*, *Rhizobium trifolii*



## INTRODUCTION

Italian ryegrass, *Lolium multiflorum* Lam. is high yielding forage grass, one of the best in Serbia. It is grown all over the world as key forage grass. Its leaf-rich yields in spring and autumn are highly valued as they contain high levels of digestible energy and sugar. Owing to these traits Italian ryegrass is among the most palatable and highly digestible grasses for livestock. It establishes quickly and produces a lot of forage in a short period of time. Ryegrass plant was selected as a test plant due to its good growth in different soil types, diseases and insects resistance, rapid emergence and ability for cutting more than once and finally for its high depletion of the nutrients from soil (Sharma et al., 2004; Simic et al. 2009). The major essential macronutrients for plant growth and development are nitrogen (N) and phosphorus (P).

Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) represent bacteria that colonize the rhizosphere and plant roots and have ability to enhance plant growth by different mechanisms; i.e. increasing N uptake (biological N fixation-BNF), phytohormone production (auxin, cytokinin), minerals solubilisation, nutrients mobility, production of siderophores that chelate iron and make it available to the plant root, controlling pathogens and stress alleviation can enhance plant growth (Zahir et al., 2004; Glick et al. 2007; Jalili et al. 2009; Abbas-Zadeh et al. 2010; Antoun and Prévost 2005; Mehboob et al. 2009; Egamberdiyeva et al. 2004). Due to ability of plant growth promotion, PGPR appeared as a promising alternative for mineral and organic fertilization (Halil er al., 2011). Therefore, in recent years there has been a growing interest in using bacterial inoculants as biofertilizers. The effect of PGPR belongs to lot of bacterial genera including *Pseudomonas* and rhizobial bacteria.

*Pseudomonas* is a genus of Gram-negative aerobic gammaproteobacteria, belonging to the family *Pseudomonadaceae* containing 191 validly described species including human and plant pathogen as well as the plant growth promoting strains. *Pseudomonas* is one of the most widely reported PGPR and it has been intensively studied with regard to their potential application in industrial biotechnology (Minorsky, 2008; Hayat et al., 2010).

*Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* is soil Gram-negative aerobic bacteria (fam. *Rhizobiaceae*) well known to induces and colonizes nodules elicited on roots of clover (*Trifolium* spp.) in the process of symbiotic N fixation. *Rhizobium* previously well known as a symbiotic N fixer is reported as asymbiotic PGPR (associative and endophytic) microorganism in recent years and it can also solubilise organic and inorganic phosphate (Chabot et al., 1996; Biswas et al., 2000a, b; Hilali et al., 2001).

The object of this study was to evaluate the possible effects of ryegrass inoculation with *Pseudomonas* strains as well as its co-inoculation with *Rhizobium trifolii* on the yield and quality of ryegrass with the aim to select effective strains as biofertilizer.

## MATERIAL AND METHODS

*Rhizobium trfolii* strain 459 and two *Pseudomonas* sp. strains LG and L1K, from Collection of Institute of Soil Science were used for inoculation of Italian Ryegrass. The inoculation effects of PGPR on the yield of Italian Ryegrass cultivar K-29t were examined in pot experiment under greenhouse conditions. The pots were filled with 1.9 kg of non-sterile soil with following characteristics: pH (in H<sub>2</sub>O) 6.9, NH<sub>4</sub>-N 5.25 mg kg<sup>-1</sup>, NO<sub>3</sub>-N 5.5 mg kg<sup>-1</sup>, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 6.34 mg 100g<sup>-1</sup>, K<sub>2</sub>O 8.25 mg 100g<sup>-1</sup>. The experiment was designed

with 3 inoculated treatments with 3 replications in completely randomised system. Treatments were compared with one control treatment without inoculation-Ø. *Rhizobium trfolii* strain in yeast manitol broth (YMB) and *Pseudomonas* sp. strains in King B medium were cultivated for 48 and 24h, respectively. Italian Ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) seeds were surfaced-sterilized with 0.1% Hg Cl<sub>2</sub> solution (Vincent, 1970) and inoculated (2 ml plant<sup>-1</sup> of liquid culture) with *Pseudomonas* sp. single strains LG and L1K or with co-inoculated with LG and *Rhizobium trfolii* strain 459 in a ratio 1:1. Liquid culture of single strain contained >10<sup>9</sup> cells ml<sup>-1</sup>. Ten seeds per plot were planted and after 2 weeks seedlings were thinned to 5 plants pot<sup>-1</sup>. The pots were kept in greenhouse conditions for eight weeks in the first cut and for sixth weeks in the second cut.

Plant shoots were separated from roots and dried in an oven at 70 °C to constant weight and the average dry weight per plant was calculated. The percentage of shoot N was determined from dried and ground plant samples using the CNS analyser (Vario model EL III (ELEMENTAR Analysensysteme GmbH, Hanua, Germany) and it was used to calculate total N content in mg per pot. Plant P was determined by ammonium vanadate-molybdate method after drying at 550EC and wet digestion. The data were statistically processed by the LSD and Duncan test using the statistical program SPSS 10.0. All references to significance in the text imply statistical significance at P<0.05, unless otherwise stated.

## RESULTS

Influence of ryegrass inoculation with two *Pseudomonas* sp. strains (L1K and LG) and

co-inoculation with strains LG and *R. trfolii* 459 was presented through plant performances (SDW, total N content and P content in plant shoot) in the first and second cuts of Italian ryegrass (Table 1). In the first cut ryegrass SDW was significantly higher in all inoculated treatments (3105-3554 mg pot<sup>-1</sup>) as well as shoot N content (149-176 mg pot<sup>-1</sup>) compared with the uninoculated control (2590 mg pot<sup>-1</sup> and 127 mg pot<sup>-1</sup>). The results indicated that co-inoculation and inoculation of ryegrass with applied PGPR strains positively influenced quantity of plant yield and also, shoot N content. Results showed that the greatest shoot P content was recorded in co-inoculation (11.63 mg pot<sup>-1</sup>) and inoculation with strain L1K (11.46 mg pot<sup>-1</sup>). The best shoot N and P content in co-inoculated plants highlighted significant PGPR potential of *R. trifilii* 459 applied in presented research. In addition, significantly greater shoot N content in plants inoculated with single strains in respect to control plants-Ø pointed at PGPR ability of strains L1K and LG.

In the second cut co-inoculation with LG and *R. trfolii* 459 and inoculation with L1K and LG alone showed their significant influence on SDW (290-331 mg pot<sup>-1</sup>) and shoot P content (1.01-1.14 mg pot<sup>-1</sup>) in comparison to control and there were no significant differences between inoculated treatments based on these parameters. However, based on shoot N content in this cut there were significant differences among treatments; significantly the highest total N content (about 16.4 mg pot<sup>-1</sup>) had co-inoculated plants and plant inoculated with strain L1K alone.

The percentage of N was very high in the both cuts (4-6.5%) because shoot yield of ryegrass growing in the pots was consisted mainly of leaves.

**Table 1.** Average shoot dry weight, shoot N and P content from inoculated Italian ryegrass, *Lolium multiflorum* Lam. indicating PGPR of strains.

**Tabela 1.** Prosečne vrednosti težine suve nadzemne mase, sadržaja N i P u nadzemnoj masi italijanskog ljuļa, *Lolium multiflorum* Lam. koje ukazuju na PGPR sojeva.

Treatments of PGPR	The first cut of Italian raygrass				The second cut of Italian raygrass					
	Shoot dry weight (mg)	Shoot N (%)	Shoot total N content (mg pot <sup>-1</sup> )	Shoot P (%)	Shoot total P content (mg pot <sup>-1</sup> )	Shoot dry weight (mg)	Shoot N (%)	Shoot total N content (mg pot <sup>-1</sup> )	Shoot P (%)	Shoot total P content (mg pot <sup>-1</sup> )
L1K	3183 a	4.669	149 b	0.36	11.46 a	331 a	4.96	16..44 a	0.34	1.13 a
LG	3105 a	4.836	151 b	0.27	8.39 b	290 a	5.02	14.61 ab	0.35	1.01 a
LG+Rhizobium	3554 a	4.980	176 a	0.33	11.63 a	300 a	5.49	16.47 a	0.38	1.14 a
∅	2590 b	4.606	127 c	0.34	9.38 b	162 b	6.48	10.47 b	0.37	0.6 b
LSD 0.05	423.52		16.91		1.15	99.02		5.41		0.35

## DISCUSSION

Our results indicated that effect of co-inoculation with strains LG and *R. trifolii* 459 was dominant in the first while in the subsequent cut effect of this co-inoculation was equalized with effect of *Pseudomonas* strains alone. It can be assumed that *R. trifolii* 459 reduced his influence on plant performances in second cut due to some unexpected abiotic factors. It is known that *R. trifolii* strains behave like PGPR since significant increase was observed in wheat SDW and grain yield (Hilali et al., 2001; Yanni et al., 1995). In presented pot experiment, performed in semi-controlled conditions, plant co-inoculation with LG and *R. trifolii* 459 increased SDW by 37% in the first cuts which is in agreement with results by Zahir et al. (2004) in more controlled conditions. According to some authors in field conditions it has been obtained significant SDW increase (7-8%) by inoculating maize, wheat and barley with *R. trifolii* (Höflich et al., 1994). In addition, co-inoculation in presented research increased shoot N and P content highly; by 39% and 24% in the first cut, respectively. The ability of rhizobia to solubilise both inorganic and organic phosphate has been the subject of many investigations. These bacteria may also have one or several of the characters attributed

to PGPR, such as secondary metabolite production, siderophore, cyanide and antibiotic production. The rhizobia influence crop growth and development by changing the physiological status of inoculated roots which favours improved nutrient uptake (Afzal and Bano, 2008).

*Pseudomonas* spp. showed many plant growth promotion activities, among them the most important are: production of ACC deaminase, IAA like products as well as P solubilization. PGPR *Pseudomonas* spp. strains have been shown to colonize the roots of various plants and increase the height and plant yield (Minorsky, 2008; Zabihi et al., 2010). Presented results also confirmed that two *Pseudomonas* strains L1K and LG increased SDW in the first cut by 37 and 23 %, respectively while shoot N content by about 18%. These strains applied did not significantly differ in their ability to enhance plant yield. However, strain LG behaved differently in the cuts. In the first cut strain LG did not influenced P elevation in plant shoot but did elevation of shoot N content, while in the second cut there was inversed situation with these parameters suggesting further investigation to LG as PGPR of ryegrass.

The presented study showed a significant positive influence of co-inoculation with strains *R. trifolii* 459 and *Pseudomonas* sp. LG as well

as *Pseudomonas* sp. L1K alone on shoot yield, N and P contents of Italian ryegrass. Results indicated that *Pseudomonas* sp. strains L1K and LG alone and in co-inoculation with rhizobial strains can be investigated in further researches as potential agent of biofertilizer for plant growth promotion of Italian ryerass.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by Ministry of Education and Science of Republic of Serbia, Project, No TR-37006.

## REFERENCES

- Abbas-Zadeh, P., Saleh-Rastin, N., Asadi-Rahmani, H., Khavazi, K., Soltani, A., Shoary-Nejati A.R., Miransari, M., (2010): Plant growth-promoting activities of fluorescent pseudomonads, isolated from the Iranian soils. *Acta Physiol Plant.*, 32: 281–288.
- Antoun, H., and Prévost, D., (2005): Ecology of plant growth promoting rhizobacteria. In: Siddiqui ZA (ed.) *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*. Springer, Dordrecht.
- Afzal, A., Bano, A. (2008): Rhizobium and Phosphate Solubilizing Bacteria Improve the Yield and phosphorous uptake in Wheat (*Triticum aestivum*). *Int. J. Agri. Biol.*, 10: 85–88.
- Biswas, J.C., Ladha, J.K., and Dazzo, F.B. (2000a): Rhizobia inoculation improves nutrient uptake and growth of lowland rice. *Soil Sci. Soc. America J.*, 64: 1644–50.
- Chabot, R., Antoun, H., and Cescas, M. (1996): Growth promotion of maize and lettuce by phosphate-solubilizing Rhizobium leguminosarum biovar, phaseoli. *Plant and Soil*, 184: 311–321.
- Egamberdiyeva, D, Juraeva, D, Poberejskaya, S, Myachina, O, Teryuhova, P, Seydalieva, L, Aliev, A. (2004): Improvement of wheat and cotton growth and nutrient uptake by phosphate solubilizing bacteria. In: Jordan DL and Caldwell DF (eds.) *Proceedings of the 26th Southern Conservation Tillage Conference for Sustainable Agriculture*. June 8–9, Raleigh, North Carolina.
- Glick, B.R., and Bashan, Y. (1997): Genetic manipulation of plant growth-promoting bacteria to enhance biocontrol of phytopathogens. *Biotechnol. Adv.*, 15: 353–378.
- Jalili, F., Khavazi K., Pazira E., Nejati A., Rahmani H.A., Sadaghiani H.R., Miransari M. (2009): Isolation and characterization of ACC deaminase producing fluorescent pseudomonads, to alleviate salinity stress on canola (*Brassica napus* L.) growth. *J. Plant Physiol.*, 166: 667–674.
- Hayat R., Ali, S., Amara, U., Khalid, R., Ahmed, I. (2010) Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Ann Microbiol.*, 60(4):579–598.
- Höflich, G., Wiehe W., Kohn G. (1994): Plant growth stimulation by inoculation with symbiotic and associative rhizosphere microorganisms. *Experientia*, 50: 897–905.
- Hoflich, G., Wiehe W., Hecht-Buchholz C. (1995): Rhizosphere colonization of different crops with growth promoting *Pseudomonas* and *Rhizobium* bacteria. *Microbiol. Res.*, 150: 139–147.
- Mehboob, I., Muhammad, N., Ahmad, Z.Z. (2009): Rhizobial Association with Non-Legumes: Mechanisms and Applications. *Crit Rev Plant Sci.*, 28:432–456.
- Minorsky, P.V. (2008). On the inside. *Plant Physiol.*, 146: 323–324.
- Hilali A., Prévost D., Broughton WJ., Antoun H. (2001): Effects of inoculation with *Rhizobium legumi-*

- nosarum* biovar *trifolii* on wheat cultivated in clover crop rotation agricultural soil in Morocco. *Can J Microbiol.*, 47(6): 590-3.
- Sharma. C.N., Sahi. V.S., Jain. C.J., Raghothama. G.K. (2004): Enhanced accumulation of phosphate by *Lolium multiflorum* cultivars grown in phosphate-enriched medium. *Environ. Sci. Technol.*, 38: 2443-2448.
- Simić. A., Vučković. S., Maletić. R., Sokolović. D., Đorđević. N. (2009): Impact of Seeding rate and Interrow Spacing on Italian Ryegrass for Seed in the First Harvest Year. *Turk .J. Agr. Forest*, 33: 425-433.
- Vincent, M.J. (1970): Manual for the practical study of root-nodule bacteria. In: *IBP Handbook*, vol. 15. Blackwell. Oxford.
- Yanni. Y.G., Rizk. R.Y., Corich. V., Squartini. A., Dazzo. F.B. (1995): Endorhizosphere colonization and growth promotion of indica and japonica rice varieties by *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*, In *Proceedings of the 15<sup>th</sup> Symbiotic Nitrogen Fixation Conference*, North Carolina State University, Raleigh, NC, USA. Abst. 017.
- Yolcu, H., Turan M., Lithourgidis A., Cakmakci, R., Koc A. (2011): Effects of plant growth-promoting rhizobacteria and manure on yield and quality characteristics of Italian ryegrass under semi arid conditions. *Australian Journal of Crop Science*, Vol. 5 (13): 1730-1736.
- Zabihi, H.R., Savaghebi, G.R., Khavazi, K., Ganjali, A., Miransari, M. (2010): *Pseudomonas* bacteria and phosphorous fertilization, affecting wheat (*Triticum aestivum* L.) yield and P uptake under greenhouse and field conditions. *Acta Physiologiae Plantarum*, <http://rd.springer.com/article/10.1007/s11738-010-0531-9#page-1>.
- Zahir, Z.A., Arshad M., Frankenberger W.T. (2004): Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Applications and Perspectives in Agriculture. *Adv. Agron.*, 81: 97-168.

**(Received: 03.09.2012.)**

**(Accepted: 25.09.2012.)**

## UNAPREĐENJE RASTA ITALIJANSKOG LJULJA (*LOLIUM MULTIFLORUM* LAM.) PRIMENOM PGP RIZOBAKTERIJA

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

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

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

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

<sup>4</sup>Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Beograd

e-mail: *vukmirdusica@yahoo.com*

### REZIME

U eksperimentu u sudovima ispitivan je PGPR efekat sojeva *Pseudomonas* sp. kao i koinokulacija sa *Rhizobium trifolii* 459 na prinos i kvalitet italijanskog ljulja, *Lolium multiflorum* Lam. kroz prvi i drugi otkos a u cilju selekcije efikasnih sojeva kao biofertilizatora. Kao biljka domaćin, korišćena je sorta italijanskog ljulja K-29. Ekspeiment se sastojao od tri tretmana sa inokulacijom i jednim kontrolnim neinokuliranim tretmanom u 3 ponavljanja u kompletno randomiziranom sistemu. Uticaj inokulacije italijanskog ljulja sa pojedinačnim sojevima LG i L1K kao i ko-inokulacije sa L1K i *Rhizobium trifolii* 459 ocenjen je kroz analizu određenih parametara (suva nadzemna masa, ukupni sadržaj N i P u suvoj nadzemnoj masi) koji su poređeni sa kontrolnim neinokuliranim tretmanom. Odgovor biljaka na inokulaciju i koinokulaciju je bio pozitivan u poređenju sa kontrolom. Prema rezultatima, koinokulacija ljulja sojevima *R. trifolii* 459 and *Pseudomonas* sp. LG kao i inokulacija pojedinačnim sojevima LG i L1K su uticali na značajno povećanje prinosa suve nadzemne mase u oba otkosa ali i sadržaja N i P u nadzemnom delu biljke. Rezultati su ukazali da sojevi *Pseudomonas* samostalno ili u inokulaciji sa sojem *R. trifolii* imaju potencijal za unapređenje rasta italijanskog ljulja i da predstavljaju potencijalne agense biofertilizatora.

**Ključne reči:** PGPR, *Italian ryegrass*, *Pseudomonas*, *Rhizobium trifolii*

(Primljeno: 03.09.2012.)

(Prihvaćeno: 25.09.2012.)

## EFIKASNOST NA KOROVE I MOGUĆA FITOTOKSIČNOST NA USEV OZIME ULJANE REPICE NAKON PRIMENE ZEMLJIŠNIH HERBICIDA

DRAGANA MARISAVLJEVIĆ<sup>1</sup>, DANIJELA PAVLOVIĆ<sup>1</sup>, PETAR MITROVIĆ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Beograd

<sup>2</sup>Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad

e-mail: marisavljevicd@yahoo.com

### REZIME

U radu su prikazani rezultati delovanja zemljišnih herbicida na suzbijanje korova i pojavu fitotoksičnosti u ozimom usevu uljane repice. Ogled je postavljen na dva lokaliteta u Beogradu i u Novom Sadu. Ispitivano je delovanje pet aktivnih materija: metazahlor, kvinmerak, klomazon, acetohlor i linuron, primenjivanih samostalno ili u kombinaciji – zajednička primena više preparata ili primena preparata formulisanih na bazi dve aktivne materije u ukupno 14 varijanti primene. Svi ispitivani herbicidi ispoljavaju dobro delovanje na prisutne korove. Dobijeni rezultati pokazuju da u godinama kada su nepovoljni uslovi za nicanje i razvoj uljane repice može doći do pojave izražene fitotoksičnosti koja može izazvati i potpuno propadanje useva. Pojava fitotoksičnosti se ispoljila u većem broju ispitivanih varijanti. Najizraženiju fitotoksičnost je pokazala zajednička primena preparata na bazi a.m. klomazon i acetohlor i preparata na bazi a.m. klomazon i linuron gde je doslo do potpunog propadanja biljaka.

Vremenski uslovi u vreme setve su veoma važni za razvoj useva uljane repice. U suprotnom usev trpi posledice nepovoljnih uslova, posebno ako ima i dodatan negativan – fitotoksičan efekat herbicida. Usev u jesenjem periodu prolazi kroz značajne faze razvoja i organogeneze i primena herbicida može dovesti do pojave izraženih oštećenja što dovodi u pitanje opravdanost primene herbicida.

**Ključne reči:** uljana repica, herbicidi, fitotoksičnost

### UVOD

Uljana repica (*Brassica napus* L.) je najvažnija uljana biljka umerenog klimata i može se gajiti kao ozimi i jari usev. Ozime forme uljane repce gaje se u svim područjima umerenog

klimata izuzev tamo gde su zime veoma hladne (Kanada, Švedska), a u Evropskim zemljama dominira kao ozimi usev (Kondić i sar., 2008).

Ozima uljana repica u svom razvoju prolazi kroz četiri perioda: stvaranje listova, stvaranje generativnih organa, cvetanje i sazrevanje.



Tokom ova četiri perioda odvija se 20 fenofaza i 12 etapa faza, od faze klijanja i nicanja do faze produženja stvaranja rozete (pojava 12 - 16 listova). Brojni faktori utiču na razvoj korena uljane repice čime se može poremetiti normalan ulazak u period zime (kasna setva, loši zemljišni i klimatskim uslovima i dr.) što može dovesti do potpunog propadanja biljaka (Marinković i sar., 2007). Da bi se biljke dobro razvijale i ušle dobro razvijene u period zime jedan od veoma važnih faktora je odsustvo korova na parceli. Istraživanja Konstantinović i Malidža (1996) potvrđuju da nisu sve korovske vrste jednako problematične za usev uljane repice. Vrste pepeljuga (*Chenopodium album* L.), štir (*Amaranthus retroflexus* L.), veliki muhar (*Echinochloa crus-gall* L.), mali muhar (*Setaria viridis* L.) i dvornici (*Polygonum* spp.) su vrste koje su veoma česte u ovom usevu i po brojnosti mogu biti dominantne. Međutim, tokom tokom zime izmrzavaju i u proleće nisu konkurentne usevu. S druge strane u jesen se javljaju vrste koje su konkurenti samom usevu i u jesen i u proleće, jer preživljavaju hladne uslove zime. Među ovim vrstama su gorušica (*Sinapis arvensis* L.), mišijakinja (*Stellaria media*), broć (*Galium aparine*), kamilica (*Matricaria chamomilla*), tarčužak (*Capsella bursa-pastoris*), broć (*Galium aparine*), mrtva kopriva (*Lamium purpureum*), samonikle ozime žitarice (koje su veom čest predusev uljanoj repici) i posebno teška za suzbijanje palamida (*Cirsium arvensis*). Pored kompeticijskog uticaja, korovi u uljanoj repici izazivaju i druge probleme kao što su kontaminacija semena uljane repice svojim prisustvom, posebno ako su to vrste *Galium aparine* i *Sinapis arvensis*. Takođe korovi su domaćini fitopatogena (pepelnica, botritisa, alternarija, sklerocinije i dr.), insekata (lisne vaši, mineri, cvetojedi i dr.) i hrana za puževe i druge štetočine. Pored navedenih direktnih šteta oseća se efekat na prinosa i kvaliteta ulja (Primot i sar.,

2006).

U svetu nije registrovan veliki broj herbicida za suzbijanje korova u uljanoj repici, a u našoj zemlji je ovaj broj izuzetno mali. Registrovani herbicidi za suzbijanje jednogodišnjih travnih i širokolisnih korova preko zemljišta su na bazi a. m.: alahlor, klomazon, metazahlor i trifluralin i za folijarnu (korektivnu) primenu na bazi a. m. klopilarid. Za suzbijanje jednogodišnjih i višegodišnjih travnih korova registrovani su herbicidi na bazi a. m. fluaziflop-p-buti i kvizalofop (Janjić i Elezović, 2010). Primena herbicida preko zemljišta je osnov suzbijanja korova u uljanoj repici, jer je izbor folijarnih (korektivnih) herbicida ograničen. Primena folijarnih herbicida u proleće često zavisi od stanja useva i vremenskih prilika. Međutim, herbicidi koji se primenjuju preko zemljišta takođe imaju specifične zahteve. Standardno za sve zemljišne herbicide je prisustvo vlage u zemljištu (kiše) da bi došlo do njihove aktivacije. Za pojedine herbicide npr. na bazi a.m trifluralin postoje i posebni načini primene – inkorporacija. Takođe, primena pojedinih zemljišnih herbicida i njihovih kombinacija može izazvati fitotoksične simptome na usevu. Ova pojava je poznata kod primene herbicida na bazi a. m. klomazon (Adamczewski, 2000). Ovi simptomi se ispoljavaju u vidu izbeljivanja listova, što često bude prolaznog karaktera, mada nekada može izazvati i značajan gubitak u prinosu ili čak potpuno propadanje biljaka (Franek, 2000).

## MATERIJAL I METODE

U radu su prikazani rezultati ogleđa izvedenih u toku 2010. godine na dva lokaliteta: Novi Sad (eksperimentalno polje Instituta za ratarstvo i povrtarstvo (Ogled I)) i Beograd (imanje Poljoprivredne korporacije Beograd-Padinska Skela (Ogled II)).

U oba ogleđa su primenjeni herbicidi na bazi a. m. klomazon, metazahlor, acetohlor

**Tabela 1.** Varijante primenjenih herbicida i simptomi fitotoksičnosti  
**Table 1.** Applied herbicides and phytotoxicity symptoms

Varijante primenjenih herbicida	Količina primene	Simptom fitotoksičnosti	Broj biljka koje su se osušile (%)	
			Novi Sad	Beograd
1. ADQ 125/375 SC (kvinmerak 125 g/l + metazahlor 375 g/l)	1,75 l/ha	Bez simptoma	-	-
2. ADQ 125/375 SC (kvinmerak 125 g/l + metazahlor 375 g/l)	2,0 l/ha	Bez simptoma	-	-
3. AG CM1 283 CS1 (klomazon 33 g/l + metazahlor 250 g/l)	2,0 l/ha	Bez simptoma	-	-
4. AG CM1 283 CS1 (klomazon 33 g/l + metazahlor 250 g/l)	2,5 l/ha	Bez simptoma	-	-
5. AG CM1 283 CS1 (klomazon 33 g/l + metazahlor 250 g/l)	3,0 l/ha	Izbeljivanje kotiledonih listova i zaostajanje u porastu	5	-
6. AG C2 360 CS1 (klomazon 360 g/l)	0,25 l/ha	Izbeljivanje kotiledonih listova	5	-
7. AG C2 360 CS1 (klomazon 360 g/l) + SULTAN 50 SC (metazahlor 500g/l)	0,2 l/ha+1,5 l/ha	Izbeljivanje kotiledonih listova	30	20
8. AG C2 360 CS1 (klomazon 360 g/l) + SULTAN 50 SC (metazahlor 500g/l)	0,25 l/ha + 1,5 l/ha	Izbeljivanje kotiledonih listova	30	20
9. GAMIT 4-EC (klomazon 480 g/l)	0,5 l/ha	Izbeljivanje kotiledonih listova	20	30
10. GAMIT 4-EC (klomazon 480 g/l)	0,75 l/ha	Izbeljivanje kotiledonih listova	20	40
11. GAMIT 4-EC (klomazon 480 g/l) + ACENIT 900 EC (acetohlor)	0,2 l/ha+2 l/ha	Izbeljivanje kotiledonih listova i sušenje biljaka	90	100
12. GAMIT 4-EC (klomazon 480 g/l) + AFALON TEČNI (linuron 500g/l)	0,2 l/ha+2 l/ha	Izbeljivanje kotiledonih listova	90	100
13. SULTAN 50 SC (metazahlor 500g/l)	2,0 l/ha	Sušenje biljaka	20	10
14. SULTAN 50 SC (metazahlor 500g/l)	2,5 l/ha	Sušenje biljaka	20	10

i linuron i kombinacija a. m. metazahlor i kvinmerak koja nije registrovana za primenu u usevu uljane repice u našoj zemlji ali je za ove namene registrovana u zemljama Evropske unije.

Na oba lokaliteta setva uljane repice (sorta Banačanka) je obavljena 28. septembra, a primena herbicida (Tabela 1.) 30. septembra (ogled I) i 1. oktobra (ogled II).

## REZULTATI I DISKUSIJA

### Rezultati ogleđa u Novom Sadu

Na ogleđu u Novom Sadu - prvo nicanje biljaka uljane repice bilo je 7. i 8. oktobra 2010. god. U ovom periodu nicanje je bilo slabo, odnosno nikao je mali broj biljaka zbog nedostatka

vlage u površinskom sloju zemljišta. Za vreme nicanja nisu se pojavili simptomi fitotoksičnosti na klijancima uljane repice. Kišovito vreme polovinom meseca oktobra je prouzrokovalo naknadno nicanje biljaka uljane repice (od 25. oktobra. do 1. novembra. 2010. god.) i vizuelnom ocenom konstatovano je da su biljke postigle optimalni sklop po jedinici površine. U periodu drugog nicanja uočeni su simptomi izbeljivanja na listovima (kotiledoni, prvi i drugi pravi list) nekih biljaka. Sledeća vizuelna ocena useva obavljena je u prvoj dekadi novembra i tom prilikom je konstatovana pojava izbeljivanja na kotiledonim listovima kod varijanti: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 i 14 (Tabela 1). Zbog uočene pojave fitotoksičnih simptoma vizuelna ocena, u narednom period, vršena je svakih 7 dana sve do

10. decembra (pojava prvog mraza koji je uticao na sve izynikle biljke). Izbeljivanje prolaznog karaktera konstatovan je na biljkama uljane repice u varijantama 5 i 6, kao zaostajanje u porastu manjeg broja biljaka (do 5%) koje su usled pojave mraza propale.

Pojava izbeljivanja listova uočena je i u varijantama 7 i 8, međutim konstatovan je veći broj biljaka koje su zaostale u porastu (do 30%) i propale usled niskih temperature. U varijantama

11 i 12 u kojima je preparat Gamit 4-EC (a. m. kloramazon) primenjen u kombinaciji sa preparatima Acenit 900 EC (a. m. acetohlor) odnosno Afalon tečni (a. m. linuron) propadanje biljaka u fazi kotiledona je bilo veoma izraženo odmah posle nicanja biljaka. Na mladim biljkama došlo je do pojave izbeljivanja i sušenja tako da propalo skoro 100% biljaka. U samostalnoj primeni preparat na bazi a.m. metazahlor u količini 2,0 i 2,5 L/ha (varijante 13 i 14) takođe je došlo do oštećenje

**Tabela 2.** Broj korova i efikasnost ispitivanih herbicida na ogledu u N. Sadu (ocena 12.11.2010. god.)  
**Table 2.** Weed number and efficiency of applied herbicides on trial Novi Sad – assessment 12.11.2010.

korovi		<i>Capsella</i>	<i>Chenopodium</i>	<i>Convolvulus</i>	<i>Datura</i>	<i>Lamium</i>	<i>Stellaria</i>
varijante		<i>bursa-pastoris</i>	<i>album</i>	<i>arvensis</i>	<i>stramonium</i>	<i>purpureum</i>	<i>media</i>
K	Br./m <sup>2</sup>	4	3	3	3	6	6
1	Br./m <sup>2</sup>	1	6	3	0	3	0
	Efik. %	75	0	0	100	50	100
2	Br./m <sup>2</sup>	0	1	2**	0	2	0
	Efik. %	100	66	33	100	33	100
3	Br./m <sup>2</sup>	0	3	0	0	0	0
	Efik. %	100	0	100	100	100	100
4	Br./m <sup>2</sup>	0	2	0	0	0	0
	Efik. %	100	33	100	100	100	100
5	Br./m <sup>2</sup>	0	2	1**	0	0	0
	Efik. %	100	33	66	100	100	100
6	Br./m <sup>2</sup>	0	4	3**	0	0	0
	Efik. %	100	0	0	100	100	100
7	Br./m <sup>2</sup>	0	1	1**	0	0	0
	Efik. %	100	66	66	100	100	100
8	Br./m <sup>2</sup>	0	2	1**	0	0	0
	Efik. %	100	33	66	100	100	100
9	Br./m <sup>2</sup>	0	0	0	0	0	0
	Efik. %	100	100	100	100	100	100
10	Br./m <sup>2</sup>	0	0	0	0	0	0
	Efik. %	100	100	100	100	100	100
11	Br./m <sup>2</sup>	0	0	0	0	0	0
	Efik. %	100	100	100	100	100	100
12	Br./m <sup>2</sup>	0	0	0	0	0	0
	Efik. %	100	100	100	100	100	100
13	Br./m <sup>2</sup>	0	2	2**	0	2	0
	Efik. %	100	83	33	100	83	100
14	Br./m <sup>2</sup>	0	3	2**	0	0	0
	Efik. %	100	0	33	100	100	100

Br. - broj biljaka/m<sup>2</sup>; Efik. % - procenat efikasnosti ispitivanih herbicida; \* varijante nose oznake kao u Tabeli 1.; \*\* biljke hlortične ali se nisu osušile

**Tabela 3.** Broj korova i efikasnost ispitivanih herbicida na ogledu u Beogradu (ocena 08.11.2010. god.)  
**Table 3.** Weed number and efficiency of applied herbicides on trial Belgrade (assessment 8.11.2010.)

korovi		<i>Capsella</i>	<i>Convolvulus</i>	<i>Datura</i>	<i>Stellaria</i>
varijante		<i>bursa-pastoris</i>	<i>arvensis</i>	<i>stramonium</i>	<i>media</i>
K Br./m2		4	1	2	5
1	Br./m2	1	3**	0	0
	Efik. %	75	0	100	100
2	Br./m2	0	2**	0	0
	Efik. %	100	0	100	100
3	Br./m2	0	0	0	0
	Efik. %	100	100	100	100
4	Br./m2	0	0	0	0
	Efik. %	100	100	100	100
5	Br./m2	0	1**	0	0
	Efik. %	100	0	100	100
6	Br./m2	0	3**	0	0
	Efik. %	100	0	100	100
7	Br./m2	0	1**	0	0
	Efik. %	100	0	100	100
8	Br./m2	0	1**	0	0
	Efik. %	100	0	100	100
9	Br./m2	0	0	0	0
	Efik. %	100	100	100	100
10	Br./m2	0	0	0	0
	Efik. %	100	100	100	100
11	Br./m2	0	0	0	0
	Efik. %	100	100	100	100
12	Br./m2	0	0	0	0
	Efik. %	100	100	100	100
13	Br./m2	0	2**	0	0
	Efik. %	100	0	100	100
14	Br./m2	0	2**	0	0
	Efik. %	100	0	100	100

Br.-broj biljaka /m2; Efik. % - procenat efikasnosti ispitivanih herbicida; \* varijante nose oznake kao u Tabeli 1.; \*\* biljke hlorotične ali se nisu osušile

biljaka uljane repice i procenat propalih biljaka usled niskih temperatura je bio oko 15-20% tj. zapaženo je da je primenjeni herbicid u sadejstvu sa temperaturama prouzrokovao proređivanje useva u odnosu na kontrolnu varijantu.

Rezultati efikasnosti ispitivanih herbicida na prisutne korove (Tabela 2, ogled I) ukazuju da je spektar korovskih vrsta (ukupno 7) i njihova brojnost bila mala. Veći broj biljaka po m<sup>2</sup> konstatovan je kod vrsta *L. purpureum* (6/m<sup>2</sup>) i *S.*

*media* (6/m<sup>2</sup>) dok je kod ostalih vrsta ta brojnost bila u interval 2-4 biljke po metru kvadratnom.

Efikasnost svih ispitivanih herbicida na vrstu *C. album* je bila slaba (osim u varijantama 9, 10, 11 i 12) dok su na vrstu *L. purpureum* slabu efikasnost ispoljili herbicidi ADQ 125/375 SC i Sultan 50 SC (u količini 2,5 l/ha). Na vrste *Datura stramonium*, *S. media* i *C. bursa-pastoris* svi primenjeni herbicidi su ispoljili dobru efikasnost, a na vrstu *Convolvulus arvensis* slabu.

Biljke su ispoljile slabu hlorotičnost i blago sušenje, ali su sve preživele tretman.

### Rezultati ogleda u Beogradu

Na ogledu II (lok. Beograd) prvo nicanje biljaka uljane repice je zabeleženo krajem prve nedelje oktobra. Nicanje je bilo dobro i ujednačeno tako da je postignut optimalni sklop biljaka po jedinici površine. Prvi simptomi fitotoksičnosti pojavili su se odmah nakon nicanja biljaka, a kišoviti period koji je nastupio izazvao je izraženiju pojavu simptoma.

Na biljkama uljane repice (ogled I i II) simptomi fitotoksičnosti su se ispoljili u vidu izbeljivanja i sušenja biljaka (varijante 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 i 14). Nakon primene ispitivanih herbicida u varijantama 7 i 8 pojava izbeljivanja kotiledonih listova na biljkama uljane repice ispoljila se odmah po nicanju. Biljke koje su nikle na vreme (početkom oktobra) imale su fitotoksične simptome prolaznog karaktera. Kod biljaka koje su kasnije nicale simptomi su bili izraženiji i te biljke su nakon prvih mrazeva (početkom decembra) propale (oko 20 % biljaka). U varijanti gde je primenjen samostalno a. m. klomazon 480 g/l u količini 0,5 i 0,75 l/ha propadanje biljaka u fazi kotiledona je zapaženo u svakom terminu vizuelne ocene (sve one biljke koje su bile bez hlorofila, a nisu propale tokom oktobra izmrzle su nakon pojave prvih mrazeva). Procenat promrzlih biljaka je bio nešto niži nakon primene manje količine (0, 5 l/ha), a nakon primene veće količine herbicida uočeno je propadanje biljaka i do 40% u odnosu na kontrolu. Kod varijante 11 i 12 došlo je do iste pojave simptoma kao i u varijantama u ogledu I. Propadanje biljaka u fazi kotiledona izazvano dejstvom herbicida je bilo veoma izraženo od samog početka (odmah posle nicanja) i kretao se u interval 80-100%. Kod samostalne primene preparata na bazi a.m. metazahlor

(500 g/l) u obe primenjene količine (2,0 i 2,5 l/ha) konstatovano je sušenje biljaka uljane repice. Procenat propalih biljaka usled niskih temperatura početkom decembra bio je manji nego kod biljaka u ogledu I. Primena herbicida u kombinaciji sa niskim temperaturama na oba lokaliteta je izazvala proređivanje useva (oko 10%) u odnosu na kontrolu.

U Tabeli 3. prikazani su rezultati efikasnosti primenjenih herbicida na ogledu II (lok. Beograd). Na oglednoj parceli bilo je malo vrsta korova. Vrste *S. media* i *C. bursa-pastoris* bile su prisutne u brojnosti 4-5 biljke/m<sup>2</sup>, a vrste *D. stramonium* i *C. arvensis* sa 1-2 biljke/m<sup>2</sup>. Svi primenjeni herbicidi ispoljili su dobro delovanje na vrste *S. media*, *C. bursa-pastoris* i *D. stramonium*, dok je delovanje na vrstu *C. arvensis* bilo slabo. Biljke su ispoljile simptom hloroze/sušenja, ali su preživele tretman.

## ZAKLJUČAK

Na osnovu rezultata obavljenih istraživanja o pojavi fitotoksičnih simptoma nakon primene herbicida u usevu uljane repice, može se zaključiti da je preparat ADQ 125/375 SC (kvinmerak 125 g/l + metazahlor 375 g/l) ispoljio potpunu selektivnost na usev uljane repice. Preparat AG CM1 283 CS1 (klomazon 33 g/l + metazahlor 250 g/l) primenjen u količinama 2,0 i 2,5 l/ha je ispoljio potpunu selektivnost, a primenjen u količini 3,0 l/ha izazvao je slaba oštećenja na biljkama. Nizak procenat osušenih biljaka konstatovano je nakon primene preparata AG CM1 283 CS1 (klomazon 360 g/l) u količini 0, 25 l/ha. Sve ostale varijante primenjenih herbicida pokazale su značajnu fitotoksičnost i procenat propalih biljaka nakon njihove primene kretao se od 10% do 100%. Opšte stanje zakorovljenosti na oba ogleda je bilo veoma slabo (mali broj vrsta i njihova brojnost po metru

kvadratnom) i zbog toga razlike u efikasnosti ispitivanih herbicida nisu bile jako izražene. Statistička analiza podataka je ipak pokazala da su na oba lokaliteta najbolju efikasnost ispoljili preparat na bazi a. m. klomazon primenjen samostalno i u kombinaciji sa preparatima na bazi a. m. acetohloro i linurona. Međutim ove varijante ispitivanih herbicida su pokazale i najizraženije fitotoksično delovanje na usev uljane repice.

Na osnovu prikazanih rezultata može se zaključiti da usev uljane repice može da pretrpi velika oštećenja od primene zemljišnih herbicida. Oštećenja se posebno ispoljavaju kada je primena herbicida praćena nepovoljnim klimatskim uslovima za nicanje i razvoj useva. Takođe, do oštećenja može doći i u slučaju kada biljke nakon optimalnih uslova za nicanje uđu

u period visoke vlažnosti i niskih temperatura. Imajući u vidu sve ove činjenice i cilj da se postigne dobar razvoj uljane repice u jesen, kako bi ona nastavila razvoj u proleć, primena herbicida se mora uraditi pažljivo. I pored činjenice da primena herbicida može dovesti do pojave fitotoksičnih simptoma, ona se mora uraditi jer prisustvo korova može uticati na kvalitet i sam prinos. Zato je veoma važno za gajenje ovog useva birati što je moguće manje zakorovljene parcele, a pre donošenja odluke o primeni herbicida sagledati sve pozitivne efekte i rizik od potencijalne fitotoksičnosti.

### ZAHVALNICA

Rad je rezultat projekta TR 31043 i TR 31018 Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

### LITERATURA

- Adamczewski, K., Grzbiela, M., Genot, B. (2000): A biological evaluation of the new Command CS formulation in Poland, Proceedings 20th German conference on weed biology and weed control, Stuttgart-Hohenheim, Germany, 14-16 March, 2000, 671-676.
- Franek, M. (2000): Reaction of oilseed rape varieties to herbicides. Progress in Plant Protection 40, 1, 401-407.
- Janjić, V., Elezović, I. (2010): Pesticidi u poljoprivredi i šumarstvu u Srbiji, Društvo za zaštitu bilja Srbije.
- Kondić J., Marinković, R., Mijanović, K. (2008): Monografija: Uljana repica. Poljoprivredni institut Republike Srpske-Banja Luka.
- Konstantinović, B., Malidža, G. (1996): Suzbijanje korova u uljanoj repici, Biljni lekar, 6, 511-513.
- Marinković, R., Marijanović-Jeromela, A., Mitrović, P. (2007): Privredni značaj, osobine i tehnologija proizvodnje uljane repice, Biljni Lekar, 4, 377-393.
- Primot, S., Valantin-Morison, M., Makowski, D. (2006): Predicting the risk of weed infestation in winter oilseed rape crops. Weed research, 46, 22-33.

**(Primljeno: 14.05.2012.)**

**(Prihvaćeno: 7.08.2012.)**

## EFFICACY IN WEED CONTROL AND POSSIBLE PHYTOTOXICITY EFFECT OF HERBICIDES ON WINTER RAPESEED

DRAGANA MARISAVLJEVIĆ<sup>1</sup>, DANIJELA PAVLOVIĆ<sup>1</sup>, PETAR MITROVIĆ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute for Plant Protection and Environment, Belgrade

<sup>2</sup>Institute of Field and Vegetable Crops, Novi Sad

*e-mail: marisavljevicd@yahoo.com*

### REZIME

The paper shows the results of the study on effect of herbicides on weed control and occurrence of phytotoxicity in winter rapeseed. Experimental plots were set up on two locations, in Belgrade and in Novi Sad. Effects of five active ingredients were investigated: metazachlor, quinmerac, clomazone, acetochlor, and linuron, applied alone or combined – joint application of several products based on the above ingredients, or application of a product based on two active ingredients – 14 variants in total. All of the tested herbicides were found to be effective against the present weeds. But, the results indicated that in years characterised by weather conditions which are unfavourable for sprouting and growth of rapeseed, the occurrence of high-level phytotoxicity that can even lead to plant death, is possible. Phytotoxicity was detected in large number of tested variants. The highest level of phytotoxicity was noticed when clomazone-based product was used together with the product containing acetochlor, as well as when clomazone and linuron-based products were applied together; both resulted in the total plant damage.

Favourable weather conditions during the seeding period are very important for the growth of rapeseed crops. In their absence – crops suffer, especially if there is an additional adverse effect of herbicide-caused phytotoxicity. Rapeseed crops go through important development and organogenesis stages in autumn, so use of herbicides can result in significant plant damages, which raises doubts whether their application is justified at all.

**Key words:** rapeseed, herbicides, metazachlor, quinmerac, clomazone, acetochlor, linuron, phytotoxicity

**(Received: 14.05.2012.)**

**(Accepted: 7.08.2012.)**



## DIVERZITET FAUNE AUCHENORRHYNCHA U VINOGRADIMA CRNE GORE

OLIVER KRSTIĆ<sup>1</sup>, SANJA RADONJIĆ<sup>2</sup>, SNJEŽANA HRNČIĆ<sup>2</sup>, TATJANA CVRKOVIĆ<sup>1</sup>,  
MILANA MITROVIĆ<sup>1</sup>, ANDREA KOSOVAC<sup>1</sup>, IVO TOŠEVSKI<sup>1</sup>, JELENA JOVIĆ\*

<sup>1</sup>Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Beograd

<sup>2</sup>Biotehnički fakultet, Univerzitet Crne Gore, Podgorica, Crna Gora

e-mail: jovic\_biolab@yahoo.com

### REZIME

Istraživanje diverziteta faune Auchenorrhyncha u Crnoj Gori sprovedeno je u vinogradima na 6 lokaliteta. Cikade su sakupljane metodom košenja tokom 2010. i 2011. godine u vinogradima na lokalitetima Martinići, Beri, Drušići, Šušunja, Godinje i Nudo. Ukupno je sakupljeno 3579 primeraka među kojima je identifikovano 39 vrsta iz 32 roda i 10 familja. Familija Cicadellidae je bila zastupljena sa najvećim brojem vrsta (22), fam. Cixiidae sa 4 vrste, a fam. Issidae sa 3 vrste. Sa po 2 vrste bile su zastupljene fam. Cercopidae, Aphrophoridae i Tettigometridae, dok su fam. Delphacidae, Dictyopharidae, Flatidae i Membracidae bile zastupljene sa po jednom vrstom. U najvećoj brojnosti prisutne su vrste iz familija Cercopidae, Cicadellidae, Dictyopharidae i Cixiidae. Od potvrđenih vektora *Bois noir* fitoplazme u visokoj brojnosti prisutna je vrsta *Hyalesthes obsoletus*, dok je od potencijalnih vektora utvrđeno prisustvo vrste *Dictyophara europaea*.

**Gljučne reči:** diverzitet, Auchenorrhyncha, fitoplazma, vektor

### UVOD

Vrste podreda Auchenorrhyncha značajne su po tome što imaju vektorsku ulogu u prenošenju patogena koji izazivaju različita oboljenja gajenih biljaka, i kao takvi nanose indirektnu štetu biljci domaćinu i značajne ekonomske štete. Najznačajniji patogen koji pojedine vrste cikada prenose na vinovu lozu je stolbur fitoplazma koja uzrokuje *Bois noir* (BN) oboljenje vinove

loze. Iako je do sada jedini potvrđeni vektor BN fitoplazme vrsta *Hyalesthes obsoletus* (Maixner, 1994), postoje literaturni podaci o prisustvu BN fitoplazme i u drugim vrstama cikada koje se mogu naći u vinogradu i njegovoj okolini, kao što su *Reptalus panzeri*, *R. quinquecostatus* i *Dictyophara europaea* (Pelermo et al., 2004; Trivellone et al., 2005; Cvrković et al., 2011). Istraživanja prisustva fitoplazmi u vinogradima Crne Gore pokazala su prisustvo BN stolbur fito-

plazme u glavnim vinogorjima (Radonjić et al., 2009). Obzirom na to da nema podataka o diverzitetu cikada na teritoriji Crne Gore, a naročito o potencijalnim vektorima BN fitoplazme, sprovedena su dvogodišnja istraživanja u cilju utvrđivanja kvalitativnog i kvantitativnog sastava faune *Auchenorrhyncha*.

## MATERIJAL I METODE

Istraživanje diverziteta faune cikada sprovedeno je u pet vinograda u Crnogorsko primorskom regionu i regionu Crnogorski basen Skadarskog jezera. Vinogradi u kojima je praćen sastav i brojnost cikada nalazili su se na lokalitetima: Beri, Šušunja, Godinje, Drušići, Martinići (subregioni: Podgorički, Crmnički, Riječki i Bjelopavlički) i Nudo (Grahovsko-Nudolski subregion). Sakupljanje cikada za kvalitativnu i kvantitativnu analizu vršeno je od 1. juna do 31. jula, tokom 2010. i 2011. godine. Za sakupljanje insekata korišćen je metod košenja u transektu koji polazi od jednog ugla vinograda, a završava dijagonalno, na suprotnom uglu, kao i metod obostranog košenja biljaka vinove loze, pravolinijski, entomološkom mrežom. Brojnost populacija vrsta cikada prisutnih u istraživanim vinogradima, vršena je ocenom sakupljenog insekatskog materijala na sledeći način: od 1-10 primeraka – populacija niske brojnosti (+); od 10-100 – populacija srednje brojnosti (++); 100-200 – populacija visoke brojnosti (+++) i >200 – populacija izuzetno visoke brojnosti (++++). Ove vrednosti odnose se na broj sakupljenih jedinki u svim vinogradima u toku jedne istraživačke godine. Determinacija cikada sakupljenih u vinogradima

izvršena je na osnovu spoljnih morfoloških karakteristika i građe genitalija prema postojećim ključevima (Holzinger et al., 2003; Biedermann & Niedringhaus, 2004).

## REZULTATI

Kvalitativnom analizom sakupljenog materijala sa šest lokaliteta, identifikovano je 39 vrsta cikada iz 32 roda i 10 familija. Familija *Cicadellidae* je bila zastupljena sa najvećim brojem vrsta (22), odnosno sa više od 56% od ukupnog broja registrovanih. U okviru ove familije najzastupljenija je podfamilija *Deltocephalinae* sa 11 registrovanih vrsta, dok su podfamilije *Cicadellinae*, *Aphrodinae*, *Dorycephalinae*, *Idiocerinae*, *Agalinae* i *Macropsinae*, bile zastupljene sa 1-4 vrste. Ukupno je registrovano 4 vrste fam. *Cixiidae*, 3 vrste fam. *Issidae*, sa po dve vrste bile su zastupljene fam. *Cercopidae*, *Aphrophoridae* i *Tettigometridae*, dok su fam. *Delphacidae*, *Dictyopharidae*, *Flatidae* i *Membracidae* bile zastupljene sa po jednom vrstom (Tabela 1).

Kvantitativnom analizom faune *Auchenorrhyncha* utvrđena je najveća brojnost familija iz podreda *Cicadomorpha* u okviru kojeg se po brojnosti ističu fam. *Cercopidae* i *Cicadellidae*. U okviru podreda *Fulgoromorpha*, vrste iz familija *Dictyopharidae* i *Cixiidae* prisutne su u najvećoj brojnosti (Tabela 2). Vrste čije su populacije, u obe istraživačke godine, prisutne u izuzetno visokoj brojnosti su *Lepironia coleoprata* i *Dictyophara europaea*, dok su populacije vrsta *Hyalesthes obsoletus*, *Artianus manderstjernii* i *Euscelis incisus* bile prisutne u visokoj brojnosti (Tabela 1).

**Tabela 1.** - Kvalitativna i kvantitativna analiza faune cikada sakupljenih u vinogradima Crne Gore na 6 lokaliteta tokom 2010. i 2011. godine.  
**Table 1.** - Qualitative and quantitative analysis of planthopper and leafhopper fauna in vineyards of Montenegro on six localities during 2010 and 2011.

Familija Family	Subfamilija Subfamily	Vrsta Species	uk. zastupljenost vrsta overall species representation		prisutnost po lokalitetima presence per locality	
			2010	2011	2010	2011
Cixiidae	Cixiinae	<i>Cixius pallipes</i> Fieber, 1876	++	+	DR, MA, ŠU	/
		<i>Hyalesthes obsoletus</i> Signoret, 1865	+++	+++	GO, DR, MA, BE, ŠU, NU	GO, DR, MA, BE, ŠU, NU
		<i>Reptalus cuspidatus</i> (Fieber, 1876)	+	+	/	MA
		<i>Reptalus melanochaetus</i> (Fieber, 1876)	++	++	GO, ŠU	GO, ŠU
Delphacidae	Delphacinae	<i>Laodelphax striatella</i> (Fallén, 1826)	+	+	GO	/
Dictyopharidae	Dictyopharinae	<i>Dictyophara europaea</i> (Linnaeus, 1767)	++++	++++	GO, DR, MA, BE, ŠU, NU	GO, DR, MA, BE, ŠU, NU
Tettigometridae	Tettigometrinae	<i>Tettigometra laeta</i> Herrich-Schäffer, 1835	+	+	DR, MA	
		<i>Tettigometra leucophaea</i> (Preysslér, 1792)	+	+	ŠU	/
Issidae	Issinae	<i>Agalmatium bilobum</i> (Fieber, 1877)	++	++	GO, DR, BE, ŠU	GO, DR, MA, BE, ŠU
		<i>Issus coleoptratus</i> (Fabricius, 1781)	+	+	MA, ŠU	/
		<i>Mycterodus</i> sp.	++	+	ŠU	/
Flatidae	Flatinae	<i>Metcalfa pruinosa</i> (Say, 1830)	+	+	/	ŠU
Cercopidae	Cercopinae	<i>Aphrophora alni</i> (Fallén, 1805)	++	++	GO, MA, BE, ŠU	GO, MA, ŠU
		<i>Lepyronia coleoptrata</i> (Linnaeus, 1758)	++++	++++	GO, DR, MA, BE, ŠU	GO, DR, MA, BE, ŠU
Aphrophoridae	Aphrophorinae	<i>Neophilaenus campestris</i> (Fallén, 1805)	++	+	DR, MA, BE, ŠU	MA
		<i>Philaenus spumarius</i> (Linnaeus, 1758)	+++	++	GO, DR, MA, BE, ŠU	GO, MA, BE, ŠU
Membracidae	Smiliinae	<i>Stictocephala bisonia</i> Koop & Yonke, 1977	+	++	GO, DR, BE, ŠU	GO, DR, MA, ŠU
Cicadellidae	Macropsinae	<i>Oncopsis</i> sp.	+	+	GO	/
		<i>Oncopsis alni</i> (Schrank, 1801)	+	+	ŠU	/
	Agalliinae	<i>Dryodurgades reticulatus</i> (Herrich-Schäffer, 1834)	+	+	/	BE, ŠU
		Idiocerinae	<i>Idiocerus</i> sp.	++	++	GO, DR, MA, BE, ŠU
	<i>Populicerus cf. confusus</i> (Flor, 1861)		+	+	/	NU
	<i>Dorycephalinae</i>		<i>Eupelix cuspidata</i> (Fabricius, 1794)	+	+	ŠU
	Aphrodinae	<i>Anoscopus histrionicus</i> (Fabricius, 1794)	+	+	GO, ŠU	/
		<i>Aphrodes bicincta</i> (Schrank 1776)	++	+	GO, DR, MA, BE, ŠU	DR
		<i>Aphrodes diminuta</i> Ribaut, 1952	++	+	GO, DR, MA, ŠU	GO
		<i>Aphrodes makarovi</i> Zachvatkin, 1948	++	+	GO, MA, BE, ŠU	/
		<i>Cicadellinae</i>	<i>Cicadella viridis</i> (Linnaeus, 1758)	+	+	GO, ŠU
	Deltoccephalinae	<i>Allygus mixstus</i> (Fabricius 1794)	+	+	MA	GO, BE, ŠU
		<i>Artianus menderstjernii</i> (Kirschbaum, 1868)	+++	++++	GO, DR, MA, BE, ŠU	GO, DR, MA, BE, ŠU
		<i>Doratura exilis</i> Horvath, 1903	+	+	ŠU	BE, ŠU
		<i>Ederranus discolor</i> (Sahlberg, 1871)	+	+	MA	/
		<i>Euscelis incisus</i> (Kirschbaum, 1858)	+++	++++	GO, DR, MA, BE, ŠU	GO, DR, MA, BE, ŠU
		<i>Euscelis ohausi</i> Wagner, 1939	+	+	MA, BE	/
		<i>Jasargus obtusivalvis</i> (Kirschbaum, 1868)	++	+	DR, MA, ŠU	DR
		<i>Psammotettix alienus</i> (Dahlbom, 1850)	++	++	GO, DR, BE, ŠU	GO, ŠU
<i>Psammotettix notatus</i> (Melichar, 1896)		++	+	MA, ŠU	/	
<i>Recilia schmidtgeni</i> (Wagner, 1939)		+	+	DR, MA	MA	
<i>Scaphoideus titanus</i> Ball, 1932		+	++	/	GO, MA, ŠU	

**Tabela 2** – Broj sakupljenih primeraka po familijama na šest lokaliteta u toku 2010. i 2011. godine.  
**Table 2** – Number of collected specimens per family at six localities during 2010 and 2011.

red order	podred suborder	familija family	broj sakupljenih primeraka number of collected specimens	
			2010	2011
Auchenorrhyncha	Fulgoromorpha	Cixiidae	233	203
		Delphacidae	1	0
		Dictyopharidae	245	242
		Tettigometridae	3	0
		Issidae	30	27
		Flatidae	0	1
	Cicadomorpha	Cercopidae	433	744
		Aphrophoridae	132	91
		Membracidae	6	18
		Cicadellidae	560	610

## DISKUSIJA

Na izražen diverzitet faune Auchenorrhyncha ukazuje podatak da je na osnovu spoljašnjih morfoloških karakteristika i građe genitalija determinisano 39 vrsta cikada iz 10 familija. Sa najvećim brojem vrsta registrovana je familija Cicadellidae (22), koja je uz fam. Cercopidae bila prisutna i u najvećoj brojnosti. Među identifikovanim cikadama, prisustvo dokazanog vektora BN fitoplazme *H. obsoletus* utvrđeno je u visokoj brojnosti, i to u obe istraživačke godine i na svim obrađenim lokalitetima. *Dictyophara europaea*, vrsta u kojoj je registrovana stolbur fitoplazma, ali bez dokazane vektorske uloge, prisutna je u visokoj brojnosti na svim obrađenim lokalitetima. Od vrsta roda *Reptalus* u istraživanim vinogradima detektovano je prisustvo jedino vrste *R. cuspidatus*. Iako je za druge dve vrste ovog roda *R. panzeri* i *R. quinquecostatus* dokazana vek-

torska uloga u prenošenju stolbur fitoplazme (Jović et al., 2007; Pinazauti et al., 2008), u *R. cuspidatus* do sada nije utvrđeno prisustvo fitoplazmi, zbog čega se smatra da ova vrsta nema značajnu ulogu u epidemiologiji BN.

Prisustvo i visoka brojnost potvrđenog i potencijalnog vektora BN fitoplazme, *H. obsoletus* i *Dictyophara europaea*, ukazuju na potrebu i značaj daljih istraživanja diverziteta cikada, kao i njihovih interakcija sa fitoplazmama u cilju utvrđivanja epidemioloških ciklusa fitoplazmatičnih obolenja u vinogradima Crne Gore.

## ZAHVALNICA

Istraživanja u ovom radu realizovana su kao deo projekta 01-550 koji finansira Ministarstvo nauke Crne Gore i projekta III-43001 koji finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

## LITERATURA

- Biedermann, R., Niedringhaus, R. (2004) Die Zikaden Deutschlands - Bestimmungstabellen für alle Arten. Scheessel: WABV, str. 409
- Cvrković T., Jović J., Mitrović M., Krstić O., Krnjajić S., Toševski I. (2011): Potential new Hemipteran vectors of stolbur phytoplasma in Serbian vineyards. *Bulletin of Insectology* 64, S129-S130.
- Holzinger, W. E., Kammerlander, I. and Nickel, H. (2003): The Auchenorrhyncha of Central Europe, Fulgoromorpha, Cicadomorpha Excl. Cicadellidae. Leiden: Brill Academic Publishers, p. 673.
- Jović J., Cvrković T., Mitrović M., Krnjajić S., Redinbaugh M. G., Pratt R. C., Gingery R. E., Hogenhout S. A., Toševski I. (2007): Roles of stolbur phytoplasma and *Reptalus panzeri* (Cixiinae, Auchenorrhyncha) in the epidemiology of Maize redness in Serbia. *European Journal of Plant Pathology*, 118: 85-89.
- Maixner, M. (1994): Transmission of German grapevine yellows (Vergilbungskrankheit) by the planthopper *Hyalesthes obsoletus* (Auchenorrhyncha: Cixiidae). *Vitis* 33, 103-104.
- Palermo S., Elekes M., Botti S., Ember I., Alma A., Orosz A., Bertaccini A., Kölber M. (2004): Presence of stolbur phytoplasma in Cixiidae in Hungarian vineyards. *Vitis* 43(4), 201-203.
- Pinzauti F., Trivellone V., Bagnoli B. (2008): Ability of *Reptalus quinquecostatus* (Hemiptera: Cixiidae) to inoculate stolbur phytoplasma to artificial feeding medium. *Annals of Applied Biology* 153(3), 299-305.
- Radonjić S., Hrnčić S., Jović J., Cvrković T., Krstić O., Krnjajić S., Toševski I. (2009): Occurrence and Distribution of Grapevine Yellows Caused by Stolbur Phytoplasma in Montenegro. *Journal of Phytopathology* 157, 682-685.
- Trivellone V., Pinzauti F., Bagnoli B. (2005): *Reptalus quinquecostatus* (Dufour) (Auchenorrhyncha Cixiidae) as a possible vector of stolbur-phytoplasma in a vineyard in Tuscany. *Redia* LXXXVIII, 103-108.

**(Primljeno: 18.06.2012.)**

**(Prihvaćeno: 24.08.2012.)**

## DIVERSITY OF THE AUCHENORRHYNCHA FAUNA IN VINEYARDS OF MONTENEGRO

OLIVER KRSTIĆ<sup>1</sup>, SANJA RADONJIĆ<sup>2</sup>, SNJEŽANA HRNČIĆ<sup>2</sup>, TATJANA CVRKOVIĆ<sup>1</sup>,  
MILANA MITROVIĆ<sup>1</sup>, ANDREA KOŠOVAC<sup>1</sup>, IVO TOŠEVSKI<sup>1</sup>, JELENA JOVIĆ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute for Plant Protection and Environment, Belgrade

<sup>2</sup>University of Montenegro, Biotechnical Faculty,

Centre for Plant Protection, Podgorica, Montenegro

*e-mail: jovic\_biolab@yahoo.com*

### REZIME

The investigation of faunal diversity of Auchenorrhyncha of Montenegro was conducted in vineyards at six localities. Insects were collected using sweep nets and mouth-aspirators from grapevine at localities Martinići, Beri, Drušići, Šušunja, Godinje and Nudo. A total number of collected specimens was 3579, belonging to 10 families, 32 genera and 39 species. The most numerous was family Cicadellidae with 22 species, followed by Cixidae (4), Issidae (3), Cercopidae, Aphrophoridae and Tettigometridae with two species and Delphacidae, Dictyopharidae, Flatidae and Membracidae with one species recorded. The most abundant were species belonging to the families Cercopidae, Cicadellidae, Dictyopharidae and Cixiidae. Confirmed vector of BN phytoplasma, *H. obsoletus* was highly abundant, while the presence of potential vector, *D. europaea* was also recorded.

**Key words:** diversity, Auchenorrhyncha, phytoplasma, vector

**(Received: 18.06.2012.)**

**(Accepted: 24.08.2012.)**





## UPUTSTVO AUTORIMA

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

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

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

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

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

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

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

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

### Ostale napomene

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

REDAKCIJA ČASOPISA "ZAŠTITA BILJA"

## INSTRUCTION TO AUTHORS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

### **Additional notes**

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

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

*EDITORIAL Board for "Plant Protection"*

CIP – Katalogizacija u publikaciji  
Narodna biblioteka Srbije, Beograd

632.9

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

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



