

Zaštita bilja
vol. 59 (1-4), No 263-266, 5-14, 2008, Beograd

UDK 632.951.027
Review article

PESTICIDE EFFECTS: POSSIBLE ROLE OF ANTIOXIDATIVE DEFENCE ENZYMES IN INSECTS RESISTANCE

DUŠKO P. BLAGOJEVIĆ
Institute for Biological Research, Belgrade, Serbia
Mail: dblagoje@ibiss.bg.ac.yu

During the several decades many species of insects have acquired resistance to used insecticides. This resistance is inherited and has proved to be one of the biggest barrier to successful chemical control of insects. Enzymes involved in the insecticide resistance include target enzymes such as cholinesterase and detoxifying enzymes such as the mixed function oxidase and glutathione transferase. The reactive oxygen species are produced during the detoxification processes. They are eliminated by the action of antioxidant enzyme activities. The constitutive expression of the antioxidative enzyme activity of the pest insects are very important component of their susceptibility to insecticides. Changes in AO were found in development, aging, reproduction, metabolic disturbances, trophic regulation, host-plant adaptation and insecticide resistance.

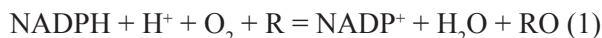
Insecticide resistance involves elevated AO enzymes. There are several reasons for that elevation: action of some insecticides and their detoxification in cells are accompanied by increased ROS production, and ROS are included in additional physiological disturbances caused by applied insecticides. Results suggest existence of a few common adaptive pathways for regulation of insecticide-induced changes and regulation of AO levels, and present basis for discussion about possible modulation of insecticide action and resistance by AO system.

Key words: insecticide, superoxide dismutase, catalase, glutathione S transferase

Reactive oxygen species (ROS) and antioxidant defense system (ADS)

Cytochrome P450 (P450) enzymes catalyze a variety of reactions and convert chemicals to potentially reactive products as well as make compounds less toxic.

Most of the P450 reactions are oxidations and can be rationalized in the context of high-valent iron-oxygen intermediates and Fe^{2+} reductions (Guengerich, 2001). General reaction catalyzed by P450s is one of mixed-function oxidation (1):



All xenobiotic chemicals, including drugs, pesticides, carcinogens, and any other chemical with potential toxicity (which would be all chemicals, whether xenobiotic or endobiotic) deals a common mechanisms involving cytP450 enzymes. If the administered chemical has a direct toxicity of its own (or acts directly on a receptor to produce toxicity), then metabolism of the compound may reduce toxicity, if the P450-generated product has less inherent toxicity.

P450 mono – and dioxygenases introduce oxygen atom(s) into xenobiotic molecule(s), but the above reaction is accompanied by the formation of reactive oxygen species (ROS) such as superoxide ($\text{O}_2^{\cdot-}$) and hydrogen peroxide (H_2O_2) (Fig.1):

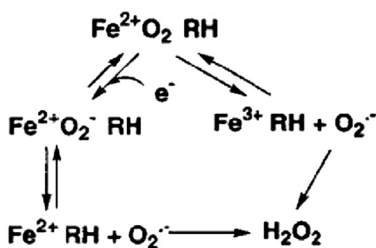


Fig. 1. – The production of superoxide ($\text{O}_2^{\cdot-}$) and hydrogen peroxide (H_2O_2) during P450 mono – and dioxygenases activities.

ROS are normally generated during mitochondrial respiration (3% of oxygen on mitochondria goes to superoxide and further converted to ROS). If there is Fe^{2+} in the surrounding media, superoxide dismutation occurs generating hydrogen peroxide (H_2O_2). H_2O_2 diffuses across cell membranes and in the presence of iron (Fe^{2+}) or copper (Cu^{2+}), it can be split into the hydroxyl radicals ($\text{OH}^{\cdot}$) and hydroxyl anions (OH^-). Hydroxyl radical immediately reacts with surrounding molecules causing their oxidation and damage. If a reaction occurs with lipids (LH) in the membrane environment a self-propagated lipid peroxidation chain reaction starts generating lipid peroxides resulting in the disturbance of membrane function (Fig. 2)

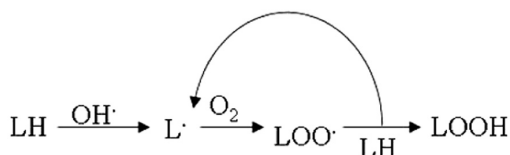


Fig. 2. – Lipid peroxidation in cells.

If ROS levels are enhanced they can react with different molecules inducing oxidative damage at the cellular level, oxidative stress and the generation of secondary products of oxidative stress (lipid peroxides, aldehydic products, reaction of intermediaries and protein carbonyls) (Halliwell and Gutteridge, 1999).

Organisms have developed an antioxidant defence system (ADS), represented by a functionally connected set of enzymes and low molecular mass components which have the physiological role of neutralizing and/or suppressing oxidative damage induced by primary ROS components and their impacts. Primary ADS in insects consists of enzymes: superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), the isoforms of glutathione S transferase (GST) with peroxidase activity (GPx), glutathione reductase (GR) and non-enzymatic cellular antioxidants: glutathione (GSH) and ascorbic acid (AsA) (Blagojević and Grubor-Lajšić, 2000). SOD converts $\text{O}_2^{\cdot -}$ to H_2O_2 ; CAT decomposes H_2O_2 to water. GPx converts LOOH to LOH, using GSH as reducing cofactor. GPxs are members of a large glutathione S transferases family and primary function as parts of GST based detoxifying system. In insects, peroxidase activity has been detected in insect GSTs from the Delta, Epsilon and Sigma classes (Ortelli et al., 2003). This point out that induction of GST during pesticide detoxification is accompanied with parallel elevation of GPx activity. These reactions expend cellular GSH and generating its oxidized form GSSG. However, GSSG can be reduced by GR, and this reaction uses NADPH as reducing cofactor. Antioxidant processes in cells are GSH and/or NADPH consuming. In herbivorous insects, the parts of ADS are ascorbate recycling enzymes, which decompose H_2O_2 using GSH as reducing agents (Jovanović-Galović et al., 2004).

The regulation of ADS in insects includes complex mechanisms of trophic regulation and adaptation, reproduction and development, ecological interactions and coevolution (Perić-Mataruga et al. 1997, 2000; Jovanović-Galović et al. 2004, 2007, Šešlija et al. 1999). Physiological mechanisms during insect development represent the consequence of long-lasting coevolution of insects and host plants, ecological factors and inherent developmental programme. The overall ADS is an integral part of the regulation of insect physiological homeostasis.

Pesticide resistance: the role for ADS

During the several decades many species of insects have acquired resistance to insecticides. This resistance is inherited and has proved to be one of the biggest barriers to successful chemical control of insects.

Insecticide resistant strains of insects often have greater detoxifying and antioxidative enzyme activities (Soderlund et al., 1990), and enzyme inducibility may be greater than in a susceptible strain (Ottea et al., 1984). Recently, there was a novel data that shows increased ADS activity by *Galleria mellonella* larvae to low doses of malathion (Buyukguzel, 2009). Elevated ADS can be linked to cytochrome P450 mediated metabolism, elevation of respiration, oxygen consumption and subsequent ROS generation, as well as physiological regulatory processes. Enzymes cytochrome P450-dependent oxygenases appears to be responsible for a number of cases of resistance to insecticides. High inducibility and constitutive activity of antioxidant enzymes activities in polyphagous pest insects (insecticide resistant) explain their abilities to detoxify the insecticides. It has long been known that feeding on certain host plants can alter the susceptibility of the herbivore to insecticides (Berry et al., 1980; Yu et al., 1979). This altered response to insecticides is often due to a direct induction of the insect's detoxification system by exposure to plant chemicals.

There is evidence that herbivorous insects metabolize and detoxify insecticides using the same enzymes that are involved in the metabolism of ingested plant allelochemicals (Ahmad et al., 1986; Brattsten 1979). Furthermore, induction of a detoxification and antioxidative enzyme system as a result of feeding on particular host plants can alter the susceptibility of insects to insecticides (Berry et al., 1980; Yu et al., 1979). Enzymes involved in the insecticide resistance include target detoxifying enzymes such as the P450mixed function oxidases and glutathione transferases. Species with an evolutionary history of feeding on plants rich in allelochemicals (some of them acts as prooxidants) have elevated levels of enzymes that detoxify insecticides, and therefore an enhanced ability to evolve resistance. Plant allelochemicals modify levels of detoxifying and antioxidative enzymes in herbivores and, therefore, their susceptibility to insecticides (Hodgson 1991). Insects induced by dietary allelochemicals or host plants apparently increase metabolism of several synthetic insecticides, as demonstrated by their increased tolerance to these compounds (Yu & Hsu 1993). There are many examples for the influence of allelochemicals toward pesticide resistance in insects. Monooxygenase activity appears to be partially responsible for *Colorado potato* beetle resistance to abamectin. In *Peridroma saucia* (Hubner), mint-fed larvae were more tolerant of the insecticide, carbaryl, than were bean-fed larvae (Yu et al., 1979).. Berry *et al.* (1980) found that cutworm tolerance to acephate,

methomyl, and malathion was greater when larvae were fed peppermint leaves than in those fed bean leaves. Diet affects the activities of insect esterases leading to different susceptibility to insecticides. Activities of microsomal epoxide hydrolase in northern corn rootworm, *Diabrotica barberi* were significantly increased by diet shifts from corn ear to squash blossom and sunflower inflorescence, while levels of these enzymes in the western corn rootworm, *D. virgifera virgifera* were unaffected (Siegfried & Mullin 1989). Activity of nonspecific esterases of resistant larvae fed blackberry was significantly lower than activities in resistant larvae fed artificial diet, gorse, apple, or broom, and not significantly different from nonspecific esterase activities of susceptible larvae reared on artificial diet, gorse, apple, blackberry, or broom (Robertson et al., 1990).

The evolution of resistance to insecticides is an example of the evolutionary process. The insecticides (selection pressure) creates a very strong fitness differential between susceptible and resistant genotypes. The survival and reproduction of resistant individuals leads to a change in the frequency (over time) of alleles conferring resistance. While selection pressure acts to change allele frequencies within pest insects populations, the phenotype upon which selection operates is a function of both the genotype and the environment. Relatively little research has focused on the influence of environmental factors on the evolution of insecticide resistance. In the case of insect pests, the chemical constituents of plants are a significant part of the environment, a part that has been shown to affect the action of many resistance mechanisms. Results of the 50-year adaptation of the gypsy moth population to unsuitable host plant—locust tree have resulted in high constitutive GST activity (Perić-Mataruga 1997). The main characteristic of locust tree is the presence of alkaloids and flavonoids. Elimination of flavonoids and alkaloids (as well as other allelochemicals) is carried out by cytochrome P450-dependent oxygenases and GST (Yu, 1996; Ahmad 1992). Metabolically activated flavonoids act prooxidatively to generate oxygen radicals (Hodnick et al., 1986). Alkaloids are susceptible to detoxifying metabolic modification through cytochrome P450-dependent oxygenases (Hodgson & Guthrie, 1980). Well-adapted caterpillars of the gypsy moth survive at higher quercetin concentrations in the artificial diet (1,5%) than those that were not adapted to flavonoids (Perić-Mataruga et al., 2001). One part of the survival is connected to elevated SOD activity in the midgut and recombination of ADS (Perić-Mataruga et al., 2003). The mechanisms of gypsy moth (*Lymantria dispar* L.) adaptation to novel food include induction of antioxidative defense mechanisms. Elimination of flavonoids and alkaloids from the plants is carried out by microsomal detoxification system that includes cytochrome P450-dependent oxygenases (Ahmad & Pardini 1990). The black locust diet (unsuitable host plant to *Lymantria dispar* L. alkaloids and flavonoids enriched) induced two SOD isozymes in the midgut tissue of the gyp-

sy moth caterpillars (Perić-Mataruga *et al.*, 1997; 2000). Population of the gypsy moth that was adapted to feeding locust tree leaves has higher constitutive SOD activity (Perić-Mataruga *et al.*, 1997).

Conclusion

Detoxification mechanisms are often very important for insecticide resistance. Because of the interaction of plant chemicals with detoxification mechanisms it is important to review the evidences that plant chemicals can change patterns of insecticide resistance. Thus, it is important to consider what factors influence the loss of insecticide susceptibility and to obtain a basic understanding of non-genetic influences (e.g., diet, age, development, temperature, nutrients) on the expression of insecticide resistance. For instance, plants can influence the toxicity of insecticides to herbivorous insects indirectly by inducing higher activities of insecticide-detoxifying enzymes or inhibiting these enzymes by limiting the energy available to the insects to perform detoxification reactions (Brattsten 1992). Furthermore, the diversity and variability in composition and concentration of plant allelochemicals (e.g., plant variety, growth condition, plant part, and season) may impose a corresponding phenotypic and genotypic diversity and flexibility on detoxifying capabilities of the insects (Brattsten 1992).

Acknowledgements

This work was supported by a research grant 143034B “The role of redox-active substances in the maintenance of homeostasis” from the Ministry for Science of Republic of Serbia.

REFERENCES

- Ahmad S, Brattsten LB, Mullin CA, Yu SJ (1986) Enzymes involved in the metabolism of plant allelochemicals. p. 73-151. In: L B.. Brattsten and S. Ahmad (eds.), Molecular Aspects of Insect-Plant Associations. Plenum Press, New York.
- Ahmad S, Pardini RS (1990): Mechanisms for regulating oxygen toxicity in phytofagous insects. Free Rad. Biol. Med. 8:401-413.
- Ahmad S. (1992): Biochemical defence of pro-oxidant allelochemicals by herbivorous insects. Biochem. Syst. Ecol. 20:269-296.
- Berry RE, Yu SJ, Terriere. LC (1980) Influence of host plants on insecticide metabolism and management of variegated cutworm. J. Econ. Entomol. 73: 771-774.
- Blagojević D, Grubor-Lajšić G (2000) Multifunctionality of antioxidant system in insects. Arch. Biol. Sci. Belgrade, 52 (4): 1-14.
- Brattsten LB (1979) Biochemical defense mechanisms in herbivores against plant allelochemicals. p. 199-270. In: G. A. Rosenthal and D. Janzen (eds.), Herbivores: Their Interaction with Secondary Plant Metabolites. Academic Press, New York.
- Buyukguzel E (2009) Evidence of Oxidative and Antioxidative Responses by *Galleria mellonella* Larvae to Malathion. J. Econ. Entomol. 102 (1):152-159.
- Guengerich PF (2001) Common and Uncommon Cytochrome P450 Reactions Related to Metabolism and Chemical Toxicity. Chem. Res. Toxicol. 14: 611-650.
- Halliwell B, Gutteridge JMC (2007) Free radicals in Biology and Medicine. Fourth Edition. Oxford University Press.
- Hodgson E, Guthrie F (eds) 1980: Introduction to biochemical toxicology. Elsevier, New York.
- Hodgson E, Silver IS, Butler LE, Lawton MP Levi PE (1991) Metabolism. pp. 107-167. In: W. J. Hays, Jr., and E. R. Laws, Jr. (eds.). Handbook of Pesticide Toxicology. Academic Press, New York.
- Hodnick WF, Kung FS, Roettger WJ, Bohmont CW, Pardini RS (1986) Inhibition of mitochondrial respiration and production of toxic oxygen radicals by flavonoids: A structure-activity study. Biochem. Pharmacol. 35:2345-2357.
- Jovanović-Galović A, Blagojević DP, Grubor-Lajšić G, Worland MR, Spasić MB (2007) Antioxidant defense in mitochondria during diapause and postdiapause development of European corn borer (*Ostrinia nubilalis*, Hubn.). Arch. Insect Biochem. Physiol. 64: 111-119.
- Jovanović-Galović A, Blagojević DP, Grubor-Lajšić G, Worland R & Spasić MB (2004) Role of antioxidant defense during different stages of preadult life cycle in european corn borer (*Ostrinia nubilalis*, Hubn.): diapause and metamorphosis. Arch. Insect Biochem. Physiol. 55: 79 – 89.
- Ortelli F, Rossiter LC, Vontas J, Ranson H & Hemingway J (2003) Heterologous expression of four glutathione transferase genes genetically linked to a major insecti-

- cide-resistance locus from the malaria vector *Anopheles gambiae* Biochem. J. 373: 957-963.
- Ottea JA, Plapp FW (1984) Induction of glutathione S-transferase in the house fly: Biochemical and genetic changes associated with induction and insecticide resistance. Pestic. Biochem. Physiol. 22:203-208.
- Perić – Mataruga V, Blagojević D, Spasić MB, Ivanović J, Janković-Hladni M (1997) Effect of the host plant on the antioxidative defence in the midgut of *Lymantria dispar* L. caterpillars of different population origins. J. Insect Physiol. 43:1: 101-106.
- Perić-Mataruga V, Blagojević D, Lazarević J, Spasić MB (2000): Host plant effects on the presence of superoxide dismutase isoforms in gypsy moth midgut. Biologia Bratislava 55: 527-533.
- Perić-Mataruga V, Lazarević J, Blagojević D, Pavlović S (2003) Response of the antioxidative defence to flavonoid quercetin in two populations of *Lymantria dispar* L. 3rd International Plant Protection Symposium (IPPS) at Debrecen University and 8th Trans-Tisza Plant Protection Forum, October 15-16 2003, Debrecen, Hungary. Proceedings Ed. György Kovach, pp 252-260.
- Perić-Mataruga V, Lazarević J, Nenadović V (2001) The effect of the allelochemical quercetin on the survival of *Lymantria dispar* L. Arch. Biol. Sci. 53:3-4.
- Robertson JL, Armstrong KF, Suckling DM, Preisler HK (1990) Effects of host plants on the toxicity of azinphosmethyl to susceptible and resistant light brown apple moth (Lepidoptera: Tortricidae). J. Econ. Entomol. 83: 2124-2129.
- Šešlija D, Blagojević D, Spasić M, Tucić N (1999) Activity of superoxide dismutase and catalase in the bean weevil (*Acanthoscelides obtectus*) selected for postponed senescence. Exp. Gerontol. 34: 185-195.
- Siegfried BD, Mullin CA (1989) Influence of alternative host plant feeding on aldrin susceptibility and detoxification enzymes in western and northern corn rootworms. Pest. Biochem. Physiol. 35: 155-164.
- Soderlund DM, Bloomquist. JR (1990) Molecular mechanisms of insecticide resistance. p. 58-96. In: R. T. Roush and B. E. Tabashnik (eds.). Pesticide Resistance in Arthropods. Chapman and Hall, New York.
- Yu SJ (1996): Insect glutathione-S-transferase. Zool. Stud. 35:9-19.
- Yu SJ, Berry RE, Terriere LC (1979) Host plant stimulation of detoxifying enzymes in a phytophagous insect. Pest. Biochem. Physiol. 12: 280-284.
- Yu SJ, Hsu EL (1993) Induction of detoxification enzymes in phytophagous insects: roles of insecticide synergists, larval age and species. Arch. Insect Biochem. Physiol. 24: 21-32.

(Primljeno: 25.03.2009.)
(Prihvaćeno: 31.03.2009.)

PESTICIDE EFFECTS: POSSIBLE ROLE OF ANTIOXIDATIVE DEFENCE ENZYMES IN INSECTS RESISTANCE

DUŠKO P. BLAGOJEVIĆ

Institut za biološka istraživanja, Beograd, Srbija

Mail: dblagoje@ibiss.bg.ac.yu

REZIME

Veliki broj insekticida se uglavnom metaboliše aktivnošću citohrom P450 familije oksidaza. Prilikom aktivnosti mono – i dioksigenaza u oko 1-3% slučajeva umesto uvođenja kiseonika u molekul insekticida, vrši se nepotpuna redukcija molekulskog kiseonika i produkuje se superoksid anjon radikal, koji predstavlja tzv. reaktivnu vrstu kiseonika (reactive oxygen species, eng, ROS, skr.). ROS usled svoje reaktivnosti propagira nastajanje oksidativnih ćelijskih oštećenja i oksidativnog stresa. Ukoliko oksidativna oštećenja prevaziđu kapacitet ćelijske odbrane i reparacije nastaje ćelijska smrt. Kod organizama, uključujući insekte, postoji set enzima koji sprečavaju propagaciju, neutrališu dejstvo i sprečavaju nastanak oksidativnih oštećenja posredovanih sa ROS (tzv. antioksidativni enzimi ili antioksidativna odbrana). Primarna antioksidativna odbrana kod insekata se sastoji od enzima superoksid dismutaze, katalaze, glutation reduktaze i izoformi enzima faze II detoksikacije: glutation S transferaze sa peroksidaznom aktivnošću. Njihovo združeno dejstvo obezbeđuje prevođenje ROS u vodu, uz utošak NADPH kao redukcionog ekvivalenta. Insekti su prilikom ekspozicije insekticidima dodatno izloženi upravo nastajanju oksidativnih oštećenja, propagacijom ROS, tako da uloga antioksidativnih enzima u odbrani od insekticida predstavlja dodatni faktor u nastanku i razvoju rezistentnosti insekata.

Rezultati proučavanja aktivnosti antioksidativnih enzima pokazuju da je njihova bazalna aktivnost kod insekata povezana sa razvojnim, reproduktivnim i trofičkim uticajima. U svim ovim slučajevima je jasno da oni mogu predstavljati posredni uticaj na razvoj rezistentnosti. Osim toga, koevolucija biljki domaćina i/ili adaptacija na nepovoljnog domaćina kod insekata su usloveli konstitutivno drugačije nivoe aktivnosti antioksidativnih enzima koji, za posledicu, mogu imati i drugačije posledice dejstva insekticida kod preživelih jedinki i dalji razvoj sekundarnih procesa adaptacije kako na biljke domaćine i tako i na rezistentnost. Zajednički imenitelj u ovim procesima je prisustvo alelohemikalija koje utiče na konstitutivne nivoe aktivnosti cytP450 oksigenaza, te i antioksidativnih enzima, tako da je trofička regulacija kod insekata povezana i sa aktivnošću antioksidativne odbrane, a time i na stepen rezistentnosti insekata. Uticaj kombinacije

prisustva alelohemikalija kod biljki domaćina i refleksija opštih trofičkih procesa na antioksidativnu odbranu insekata su dosta proučavani, ali stepen uticaja zavisi od hemijskih karakteristika alelohemikalija, njihovog broja i količine u ishrani, njihovog metaboličkog puta u organizmu insekata, ekspresije detoksifikacionih i antioksidativnih enzima i stanja životnog ciklusa insekata. Generalno, rezultati pokazuju da konstitutivno povišen nivo antioksidativnih enzima ima ulogu u nastajanju i razvoju rezistentnosti, ali da je uklupljen u metabolički milje insekta.

Ključne reči: insekticidi, superoksid dismutaza, katalaza, glutathion S transferaza

(Received: 25.03.2009.)

(Accepted: 31.03.2009.)

Plant Protection, vol. 59 (1-4), No 263-266, 5-14, 2008, Belgrade

Zaštita bilja
vol. 59 (1-4), No 263-266, 15-24, 2008, Beograd

UDK 632.4:634.22
Naučni rad

VEGETATIVNA INKOMPATIBILNOST IZOLATA *PHOMOPSIS* SPP. IZOLOVANIH SA STABLA ŠLJIVE*

SVETLANA ŽIVKOVIĆ, SAŠA STOJANOVIĆ, VELJKO GAVRILOVIĆ, ŽARKO IVANOVIĆ
Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Beograd

Izolati *Phomopsis* spp. dobijeni sa grana i stabla šljive (*Prunus domestica* L.) sa simptomima sušenja i izumiranja ispoljili su značajne razlike u morfolo-fiziološkim i patogenim karakteristikama. Primenom metode vegetativne kompatibilnosti potvrđena je genetska varijabilnost 12 izolata *Phomopsis* spp. i kontrolnog izolata *Phomopsis perniciosa*. Isečci ispitivanih kultura zasejavani su u Petri kutije po parovima i u svim mogućim unakrsnim kombinacijama, na podlozi KGA. Očitavanje rezultata je vršeno petog i desetog dana i podrazumevalo je praćenje izgleda linije međusobnog kontakta uparivanih izolata. Nakon perioda inkubacije između ispitivanih kultura dolazi do formiranja crne reakcione linije – barijere, a u pojedinim slučajevima i reproduktivnih organa – piknida (reakcija vegetativne inkompatibilnosti). Delovi hifa koje sačinjavaju crnu reakcionu liniju bili su nekrotirani. Vegetativna kompatibilnost konstatovana je samo u slučajevima kada su izolati uparivani sami sa sobom.

Ključne reči: *Phomopsis* spp., vegetativna kompatibilnost/inkompatibilnost, šljiva

UVOD

Sušenje biljaka u mladim zasadima šljive (starosti 3-5 god.) tokom poslednje decenije, uočeno je na više lokaliteta Zapadne Srbije. Prvi simptomi bolesti uočavaju se početkom vegetacije u vidu hloroze i prevremenog opadanja lišća. Na granama i stablu obrazuju se ulegnute nekrotične pege, koje se brzo šire i u okviru kojih kora uzdužno puca, formirajući rak-rane. Nekroza se širi na drvenasti deo gde bivaju zahvaćeni sprovodni sudovi, što dovodi do sušenja i izumiranja grana i stabala.

* Rezultat rada u okviru Projekta br. 20051, koji finansira Ministarstvo za nauku i tehnološki razvoj RS.

Iz obolelih uzoraka šljive, nakon obavljenih izolacija patogena na hranljivu podlogu dobijeno je mnoštvo izolata pripadnika raznih rodova gljiva: *Cytospora*, *Phomopsis*, *Sphaeropsis*, *Seimatosporium* i *Fusarium*. S obzirom da *Phomopsis* spp. predstavlja novu vrstu u mikoflori kore šljive u Srbiji i da učestvuje u genezi sušenja i propadanja ove ekonomski veoma značajne voćarske kulture, pristupilo se detaljnijem proučavanju ovog parazita. Dobijeni rezultati ukazuju na izrazite razlike u stepenu patogenosti i morfo-fizioloških karakteristika izolata *Phomopsis* spp (Živković, 2008). Varijabilnost i heterogenost patogena ovog roda, potvrđena je od strane mnogih istraživača (Brayford, 1990a, 1990b, Caley, 1923 loc.cyt. Harris, Smit et al., 1997; Uddin and Stevenson, 1998). S toga je radi potvrde genetske različitosti obavljeno je ispitivanje vegetativne kompatibilnosti izolata *Phomopsis* spp. poreklom sa stabla šljive.

MATERIJAL I METODE

Ispitivanje srodnosti izolata *Phomopsis* spp. poreklom sa stabla šljive, obavljeno je utvrđivanjem stepena kompatibilnosti njihovih kolonija, odnosno korišćenjem fenomena hifalne interferencije (Anagnostakis, 1982). Kulture gljiva odgajane su na krompir glukoznoj podlozi (KGA), a kao kontrolni izolat korišćen je *Phomopsis perniciosa* (Jp-3) poreklom sa ploda jabuke (kolekcija Instituta za zaštitu bilja i životnu sredinu). Isečki ispitivanih kultura, prečnika 2 i 5 mm zasejavani su u Petri kutije, (Ø 9 i 15 cm) na podlozi KGA. Prvi način uparivanja uključio je sve ispitivane izolate. Isečak jednog izolata je postavljen u centar, a oko njega je na međusobnom rastojanju od 2 cm zasejano po šest izolata, tako da predstavljaju temena pravilnog šestougla. Pri tome je svaki izolat zauzimao poziciju centralnog u dva ponavljanja. Izolati su kombinovani svaki sa svakim i svaki sa samim sobom, u dva ponavljanja. Drugim načinom uparivanja u jednu Petri kutiju zasejano je po tri isečka (jedan kontrolni i dva ispitivana izolata) na međusobnom rastojanju od 2 cm, a raspored isečaka je imao oblik jednakokraničnog trougla. Sve kombinacije zasejanih izolata su potom inkubirane na temperaturi od 25°C. Očitavanje rezultata je vršeno petog i desetog dana i podrazumevalo je praćenje izgleda linije kontakta, kao i prisustva piknida na mestu međusobnog spajanja dva ispitivana izolata. Ukršteni par je smatran vegetativno kompatibilnim ukoliko su se njihove kolonije spajale jedna sa drugom uniformno duž linije kontakta. Ukoliko je na liniji dodira dve kolonije došlo do pojave tamne linije, slične barijeri, izolati su smatrani vegetativno inkompatibilnim (Anagnostakis, 1982; Brayford, 1990b; Proffer and Hart, 1988; Smit et al., 1997).

REZULTATI I DISKUSIJA

Do kontakta ispitivanih izolata (uparivanih međusobno i sa kontrolnim Jp-3), došlo je pet dana nakon zasejavanja na podlozi KGA, dok je razvoj reakcionih linija nastupio nakon deset dana. Uočeno je nekoliko tipova reakcije prilikom susreta kolonija gljiva (tab. 1):

- prorastanje ispitivanih kultura
- pojava uske providne zone na mestu međusobnog kontakta dva izolata
- formiranje tamnomrkih demarkacionih linija – "barijera" duž mesta spajanja kolonija
- obrazovanje piknida na liniji kontakta dva izolata

Prorastanje kolonija bilo je samo u slučajevima kada su izolati uparivani sami sa sobom (sl. 1). U većini slučajeva sparivanjem izolata formirale su se tamnomrke do crne "barijere", duž linije međusobnog kontakta (sl. 2 i 3). Do obrazovanja reproduktivnih organa na površini tamnih demarkacionih linija došlo je u sledećim kombinacijama uparivanja izolata: SI-M sa SI-K-7 i SI-K-8; SI-T-1 sa SI-K-3, SI-K-4, SI-K-5, SI-K-8 i SI-U-4, kao i u kombinacijama SI-B-2 sa kulturama SI-Br-2, SI-K-1, SI-K-3, SI-K-4, SI-K-7, SI-K-8 i SI-U-4. Piknidi su bili prisutni i na mestu kontakta izolata SI-K-1 sa izolatima SI-K-7 i SI-K-8, zatim u kombinacijama kultura SI-K-3 i SI-K-8 i izolata SI-K-7 sa SI-K-8. Na mestu susreta izolata SI-K-8 i SI-U-4, takođe je konstatovano obrazovanje reproduktivnih organa. Pojava demarkacionih linija, sa ili bez prisustva formiranih piknida, ukazuje na inkompatibilan odgovor, odnosno na genetičku različitost ispitivanih izolata (Proffer and Hart, 1988).

Postojanje uske providne zone, bez prisustva micelije i međusobnog kontakta dva izolata, ispoljili su: SI-1 u kombinaciji SI-M, SI-K-3, SI-K-4 i SI-K-5; zatim SI-M sa izolatima SI-B-2, kao i izolat SI-Br-2 prilikom uparivanja sa kulturama SI-K-3 i SI-K-4. Providna zona je bila prisutna i na mestu susreta izolata SI-K-1 sa SI-K-3, SI-K-4 i SI-K-5, kao i izolata SI-K-3 prilikom kombinovanja sa kulturama SI-K-4 i SI-K-5. Izolat SI-K-4 je u eksperimentu ispoljio najveći stepen antagonizma prema ostalim ispitivanim izolatima (osim prilikom uparivanja sa SI-M, SI-T-1 i SI-B-2), obrazujući providnu zonu, širine 1 mm. Do međusobnog kontakta nije došlo ni prilikom kombinovanja izolata SI-K-5 sa izolatima SI-1, SI-K-1, SI-K-3, SI-K-4, SI-K-7 i SI-K-8.

Obrazovanje providnih zona na mestu spajanja kultura gljiva poreklom sa različitih lokaliteta, pripadnika različitih grupa vegetativne kompatibilnosti, konstatovano je i od strane drugih istraživača (Smit et al., 1997; Vico, 1997). Ovaj tip reakcije na liniji dodira kolonija po nekim podacima iz literature (Punja and Grogan, 1983), predstavlja oblik antagonizma dva ispitivana izolata.

Tabela 1 – Interakcije kolonija izolata *Phomopsis* spp.
Table 1 – Interaction between isolates of *Phomopsis* spp.

izolati	Sl-1	Sl-M	Sl-T-1	Sl-B-2	Sl-Br-2	Sl-K-1	Sl-K-3	Sl-K-4	Sl-K-5	Sl-K-7	Sl-K-8	Sl-U-4	JP-3
JP-3	Pz	Tb, Pk	Tb, Pk	Pz	Tb	Tb, Pk	Tb	Pz	Tb	Tb	Tb, Pk	Tb	P
Sl-U-4	Tb	Tb	Tb, Pk	Tb, Pk	Tb	Tb	Tb	Pz	Tb	Tb	Tb, Pk	P	
Sl-K-8	Tb	Tb, Pk	Tb, Pk	Tb, Pk	Tb	Tb, Pk	Tb, Pk	Pz	Pz	Tb, Pk	P		
Sl-K-7	Tb	Tb, Pk	Tb	Tb, Pk	Tb	Tb, Pk	Tb	Pz	Pz	P			
Sl-K-5	Pz	Tb	Tb, Pk	Tb	Tb	Pz	Pz	Pz	P				
Sl-K-4	Pz	Tb	Tb, Pk	Tb, Pk	Pz	Pz	Pz	P					
Sl-K-3	Pz	Tb	Tb, Pk	Tb, Pk	Pz	Pz	P						
Sl-K-1	Tb	Tb	Tb	Tb, Pk	Tb	P							
Sl-Br-2	Tb	Tb	Tb	Tb, Pk	P								
Sl-B-2	Tb	Pz	Tb	P									
Sl-T-1	Tb	Tb	P										
Sl-M	Pz	P											
Sl-1	P												

Legenda-Legend:

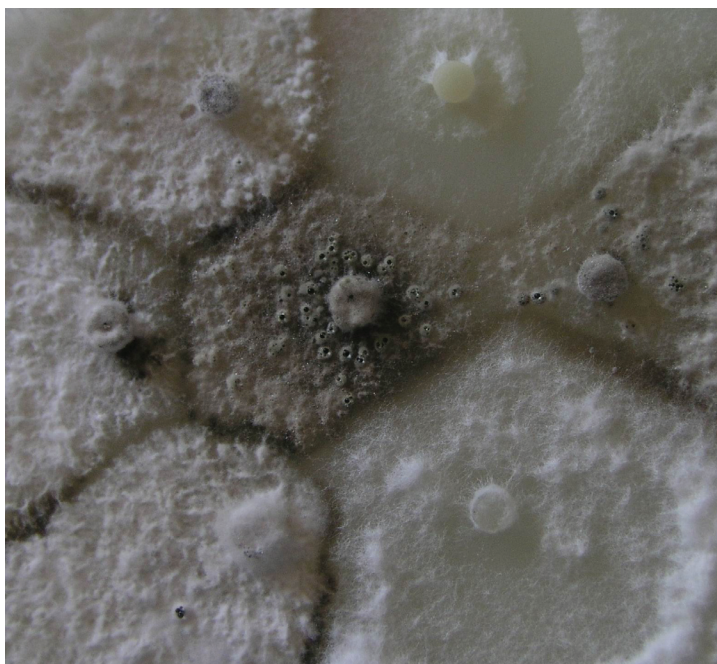
P – prorastanje micelija – overgrowth of micelium;

Pz – providna zona na mestu susreta kolonija (inhibiciona zona) – inhibition zone;

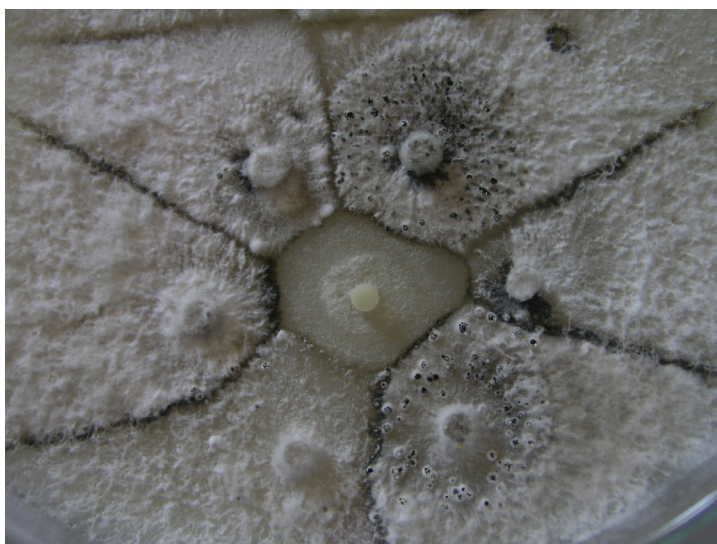
Tb – tamna barijera na liniji kontakta izolata – black barrage at the line of the contact between isolates;

Pk – formiranje piknida duž linije kontakta izolata – pycnidia formation along of contact line of isolates

U kontaktu sa kontrolnim izolatom Jp-3, većina ispitivanih kultura su formirale tamne demarkacione linije. Na mestu spajanja izolata Sl-M, Sl-T-1, Sl-K-1 i Sl-K-8 i kontrolnog Jp-3, došlo je do formiranja sitnih reproduktivnih organa (sl. 4). Ostale ispitivane kulture *Phomopsis* spp. na prisustvo kontrolnog izolata nisu reagovale obrazovanjem piknida. Izolati Sl-1 i Sl-K-3 su u međusobnom susretu



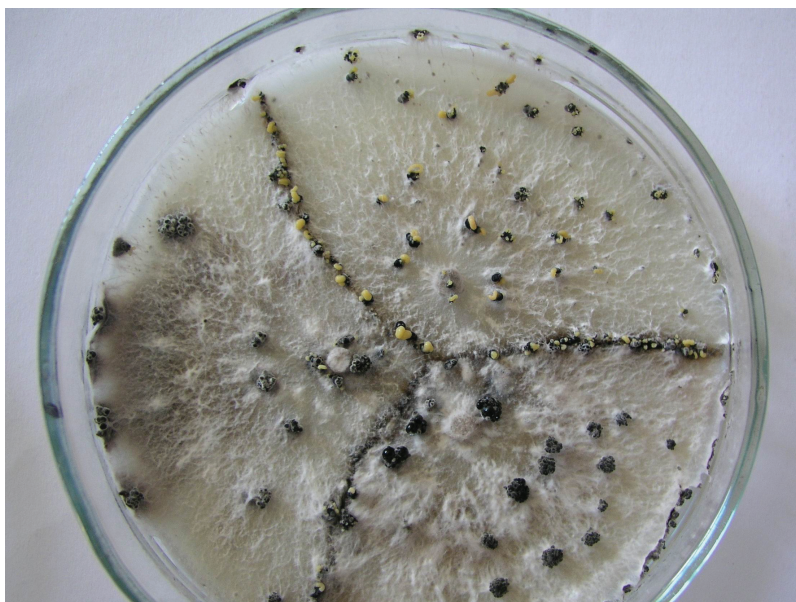
Sl. 1 – Prorastanje kolonija (izolat SI-T-1)
Fig. 1 – Overgrowth of colonies (isolat SI-T-1)



Sl. 2 – Formiranje demarkacionih linija
Fig. 2 – Formation of demarcation line



Sl. 3 – Tamne barijere između inkompatibilnih izolata (naličje)
Fig. 3 – Black barrage between incompatible isolates (back side)



Sl. 4 – Piknidi na demarkacionim linijama (izolati SI-K-8+JP-3+SI-U-4)
Fig. 4 – Pycnidia at demarcation line (isolates SI-K-8+JP-3+SI-U-4)

sa kontrolnim izolatom formirali usku providnu zonu, (bez međusobnog kontakta) širine oko 1 mm (sl. 5).

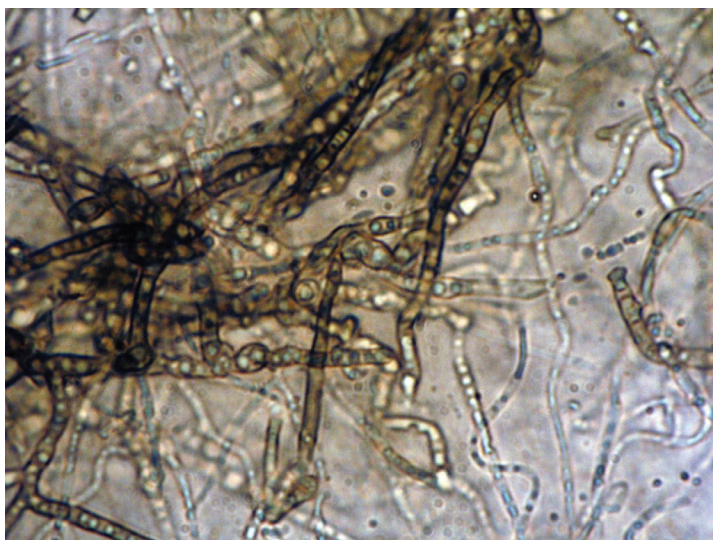
Mikroskopskim pregledom hifa ispitivanih izolata koje su sačinjavale reakcionu liniju, ustanovljeno je da su one zadebljele, ispunjene zrnastim sadržajem i melanizirane, odnosno tamne boje (sl. 6). Centralni region barijera, nastao fusijom hifa, sastoji se od nekrotiranih ili umirućih ćelija, sa slojem tamnog pigmenta (Newhouse and MacDonald, 1991). Hife izolata koje na mestu kontakta nisu formirale tamne demarkacione linije, bile su uobičajenog izgleda, isprepletane i bez vidljivih promena u širini, boji i sadržaju. Do sličnih rezultata u svojim ogledima su došli i drugi istraživači (Babović i sar., 1997; Punja and Grogan, 1983, Proffer and Hart, 1988). Formiranje tamnih demarkacionih linija u literaturi, objašnjava se antagonizmom ispoljenim međusobnim prorastanjem micelija dveju inkompatibilnih vrsta. Obrazovanje reproduktivnih organa gljiva na samoj demarkacionoj liniji, kao i u njenoj neposrednoj blizini, takođe je česta pojava prilikom uparivanja izolata genetski različitih vrsta gljiva (Leslie, 1993).

Sposobnost formiranja heterokariona, prilikom kontakta dva gljivična organizma, jedan je od najvažnijih komponenti njihovog životnog ciklusa i predstavlja prvi korak u ostvarivanju rekombinacija naslednih osobina i transmisije faktora virulencije. Gljive koje poseduju sposobnost obrazovanja stabilnih i genetski različitih jedara, smatraju se vegetativno kompatibilnim (Leslie, 1993). Vegetativna kompatibilnost upućuje na karakterističnu sposobnost dve gljive da se sliju, spoje i na tom mestu izmene citoplazmatski ili jedarni sadržaj (Kulman, 1982, loc.cit. Proffer, 1988). Kompatibilni izolati formiraju grupe vegetativne kompatibilnosti (VCG) (Proffer, 1988). Manji broj VCG grupa obično imaju aseksualne gljive. Gljive koje se polno razmnožavaju moraju imati visoki nivo genetske homolognosti da bi bile vegetativno kompatibilne (Jacobson and Gordon, 1988). Ovu osobinu ispoljavaju samo ako imaju iste alele u datom lokusu gena (Anagnostakis, 1982). Vrste koje su identične u istom setu lokusa, imaju sposobnost formiranja stabilnog heterokariona. Ovaj tip interakcije poznat je kao alelna kompatibilnost.

Fenomen vegetativne kompatibilnosti ili inkompatibilnosti koja se ocenjuje na osnovu interakcije kolonija dala je mnogo pozitivnih rezultata u taksonomiji različitih vrsta gljiva. Hifalna interakcija koja rezultuje formiranjem tamnih linija ili "barijera" navodi se kod različitih grupa gljiva. Pojava demarkacionih linija uočena je između izolata *Diaporthae/Phomopsis* vrsta, morfološki vrlo sličnih i izolovanih sa iste biljke (Franić-Mihajlović et al., 1996, loc. cit. Glamočlija et al., 2007). Njihovo formiranje može se tumačiti kao ispoljavanje inter ili intraspecifičnog, odnosno unutar i međuvrskog antagonizma (Brayford, 1990b). Vegetativna inkompatibilnost je opisana kao pogodan karakter za razlikovanje vrsta iz roda *Monilinia* (Babović i sar., 1997; Sonoda, 1982), zatim za utvrđivanje različitih taksonomskih kategorija (na nivou sojeva, podvrsta ili patotipova) u



Sl. 5 – Infibiciona zona (izolati SI-K-3+Jp-3)
Fig. 5 – Inhibition zone (isolates SI-K-3+Jp-3)



Sl. 6 – Zadebljale i melanizirane hife koje formiraju crnu demarkacionu zonu na mestu kontakta incompatibilnih izolata SI-K-8 i SI-U-4 (uvećanje 1000x)
Fig. 6 – Thickened and melanised hyphae which form the black barrage zone at the contact of incompatible isolates SI-K-8 and SI-U-4 (magnification 1000x)

okviru *Endothia parasitica* (Anagnostakis, 1977, loc cit. Anagnostakis, 1982), *Leucocytophora kunzei* (Proffer and Hart, 1988) i drugih.

Rezultati dobijeni u ovom radu pokazuju da postoji izražena genetska različitost izolata *Phomopsis* spp., poreklom sa stabla šljive. Ona se odražava kroz postojanje većeg broja grupa vegetativne kompatibilnosti. Između ispitivanih kultura se na mestu spajanja formira crna reakciona linija – "barijera", što ukazuje na različite vrste ili sojeve gljiva, koje mada pripadaju istom rodu, pokazuju visok nivo genetske heterogenosti.

LITERATURA

- Anagnostakis, S. L. (1982): Biological control of chestnut blight. *Science* 215: 465-471.
- Babović, M., Bulajić, A., Krnjaja, V. i Ivanović, M. (1997): Mogućnost razlikovanja *Monilinia* spp. na voću metodom vegetativne kompatibilnosti. *Jugoslovensko voćarstvo* 119-120: 245-251.
- Brayford, D. (1990a): Variation in *Phomopsis* isolates from *Ulmus* species in the British Isles and Italy. *Mycological Research* 94 (5): 691-697.
- Brayford, D. (1990b): Vegetative incompatibility in *Phomopsis* from elm. *Mycological Research* 94 (6): 745-752.
- Glamočlija, J., Soković, M., Grbić, M., Vukojević, J., Milenković, I. and Griensven, L.D. (2007): Morpho-physiological characteristics and interactions of *Mycogone perniciosa* (Magnus) Delacr. *Zbornik Matice Srpske za prirodne nauke*, N° 113: 235-241.
- Harris, D.C. (1988): *Diaporthe perniciosa* associated with plum dieback. *Plant Pathology* 37: 604-606.
- Jacobson, D.J. and Gordon, T.R. (1988): Vegetative compatibility and self-incompatibility within *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. *Phytopathology* 78: 668-672.
- Leslie, J.F. (1993): Fungal vegetative compatibility. *Annu. Rev. Phytopathol.* 31: 127-150.
- Newhouse, J.R. and MacDonald, W.L. (1991): The ultrastructure of hyphal anastomoses between vegetatively compatible and incompatible virulent and hypovirulent strains of *Cyphonectria parasitica*. *Can. J. Bot.* 69: 602-614.
- Punja, Z. K. and Grogan, R.G. (1983): Basidiocarp induction, nuclear condition, variability and heterokaryon incompatibility in *Althelia* (*Sclerotium*) *rolfsii*. *Phytopathology* 78: 256-260.
- Proffer, T. J. and Hart, J.H. (1988): Vegetative compatibility groups in *Leucocytophora kunzei*. *Phytopathology* 73: 256-260.
- Smit, W.A., Wingfield, B.D. and Wingfield, M.J. (1997): Vegetative incompatibility in *Diaporthe amiqua*. *Plant Pathology* 46:366-372.

- Sonoda, R.M. (1982): Use of interactions of cultures to distinguish *Monilinia laxa* from *M. fructicola*. Plant Disease 66: 325-326.
- Uddin, W. and Stevenson, K.L. (1998): Pathogenic and Molecular Characterization of Three *Phomopsis* Isolates from Peach, Plum and Pear. Plant Disease 82: 732-737.
- Vico, I. (1997): Prilog taksonomiji fitopatogenih gljiva roda *Rhizoctonia* DC.ex Fr. Doktorska disertacija. Poljoprivredni fakultet, Beograd.
- Živković S. (2008): Etiološka proučavanja sušenja stabala šljive. Magistarska teza. Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.

(Primljeno: 06.03.2009.)

(Prihvaćeno: 31.03.2009.)

VEGETATIVE INCOMPATIBILITY OF ISOLATES OF *PHOMOPSIS* SPP. FROM PLUM TREES

SVETLANA ŽIVKOVIĆ, SAŠA STOJANOVIĆ, VELJKO GAVRILOVIĆ, ŽARKO IVANOVIĆ
Institute for Plant Protection and Environment, Belgrade

SUMMARY

Isolates of *Phomopsis* spp. obtained from plum trees (*Prunus domestica* L.) with symptoms of die-back. There were significant morpho-physiological and pathogenic differences between the isolates. The genetic variability (12 isolates of *Phomopsis* spp. and isolate of *Phomopsis perniciosa*, which was used as control) was proved by study of vegetative compatibility. These isolates were inoculated in Petri dishes in pairs in all possible cross combinations, on potato dextrose agar. After 5 and 10 days the interaction between colonies were scored according to appearance of contact lines of paired cultures. On the contact line on two different isolates distinct barrage zones of inhibition – vegetative incompatibility reaction. The barrage zones generally became black and sometimes showed formation of pycnidia. Necrotic parts of hyphae that formed line of reaction were observed. A compatible reaction was observed only when cultures of the same isolate were paired.

Key words: *Phomopsis* spp., vegetative compatibility/incompatibility, plum

(Received: 06.03.2009.)

(Accepted: 31.03.2009.)

Zaštita bilja
vol. 59 (1-4), No 263-266, 25-57, 2008, Beograd

UDK 632.952:632.48
Naučni rad

EFIKASNOST NISKORIZIČNIH FUNGICIDA I MEHANIČKIH MERA U SUZBIJANJU *MONILINIA LAXA*

SANJA PERIĆ

Viša poljoprivredna škola, Prokuplje

Efikasnost 10 preparata primenjenih samostalno ili u kombinaciji i mehaničkih mera u suzbijanju *M.laxa* ispitivana je u dva lokaliteta (Donja Trnava i Slavnik) tokom 2004-2006. godine i *in vitro*. Korišćeni su fungicidi Perfit 25% (vodonik peroksid), Blauvit WP 50 (bakar-hidroksid), kombinacija Topsin 70 WGR + Ronilan DF WG (tiofanat-metil + vinklozolin), kombinacija Fundazol 50WP + Sumilex 50 FL SC ((benomil + prosimidon), Chorus 75 WG (ciprodinil), Sapro EC (triforin), Konker SC (vinklozolin + karbendazim) i KAN (krečni amonijum nitrat).

Najveću efikasnost ispoljile su kombinacije preparata Topsin+Ronilan u oba lokaliteta i u sve tri godine ispitivanja (u proseku 97.09 ± 0.142). Sličnu efikasnost imala je kombinacija Fundazol + Sumilex, osim u lokalitetu D.Trnava tokom 2005. godine (u proseku 95.68 ± 0.947). Srednju do visoku efikasnost ispoljio je Chorus, u zavisnosti od lokaliteta i godine ispitivanja. KAN je ispoljio nisku efikasnost (u proseku 52.07 ± 0.4149). Primenom mehaničkih mera postignuta je značajna efikasnost u oba lokaliteta i kretala se u granicama od (59-61 %).

Efikasnost fungicida u uslovima *in vitro* sa različitim koncentracijama je slična kao i efikasnost na oglednim poljima..

Ključne reči: višnja, *Monilinia laxa*, suzbijanje, niskorizični fungicidi, mehaničke mere

UVOD

Višnja (*Prunus cerasus*) se u strukturi voćarstva Srbije nalazi se na trećem mestu, iza šljive i jabuke (Gvozdenović, 1995). Godišnje se kod nas proizvede oko 90 000 t ili oko 8,2 kg po stanovniku, tako da se naša zemlja nalazi među četiri najveća proizvođača višnje u svetu (Blagojević, 2000). Na evropskom tržištu porasla je tražnja višnje ujednačene kalibraže, crvenog mesa i soka, pa

je oblačinska višnja zahvaljujući takvim osobinama postala dominantno tražena sorta kod nas i u svetu (Pavićević i Pavićević, 2003; Vasilev i Bačvarov, 1981).

Pored niza prednosti koje poseduje, kao što su ranostasnost, redovna i visoka rodnost, plodovi izvanrednih tehnoloških osobina (Bulatović, 1992), ona ima i jedan nedostatak – osetljivost prema *Monilinia laxa* (Garić *et al.*, 1979). Višnja je primarna biljka hraniteljka ovog patogena koji parazitira i šljivu, kajsiju, nektarine i dunju, a ređe jabuku i krušku Mordue (1979). U našim uslovima ova gljiva je najznačajnija na koštičavim vrstama voćaka (Stojanović i Kostić, 1957).

M. laxa je rasprostranjena širom sveta u uslovima umerene i suptropske klime. Široko je rasprostranjena u svim voćarskim regionima Evrope, sa izuzetkom krajnjeg severa. Znatne štete prouzrokuje u godinama kada je jako povoljan termo-higrometrijski faktor za patogena, tj. kada period cvetanja i dozrevanje plodova prati kišovito vreme i kada je period cvetanja produžen (Ivanović, 1992; Perić, *et al.*, 1996).

Patogen *Monilinia laxa* zbog svoje štetnosti (sušenje cvetova, grančica, grana i trulež plodova) može da predstavlja ograničavajući faktor u gajenju oblačinske višnje (Balaž *et al.*, 1999). Skoro svake godine zbog napada ovog patogena, prinosi višnje su znatno smanjeni, često prepolovljeni, a u godinama epidemija i potpuno uništeni. Na destruktivnost ovog patogena na gotovo svim koštičavim vrstama voćaka ukazuju mnogi autori (Kišpatić, 1985; Radman, 1979; Marić, 1991; Ivanović, 1992). Prouzrokovaoč monilioze je najdestruktivniji patogen koštičavih vrsta voćaka u SAD, Evropi, Australiji i Novom Zelendu (Archer, 1988).

Byrde i Willets (1997) navode da *M. laxa* pričinjava velike gubitke na koštičavim vrstama voćaka i da oni iznose oko 50%. U plantažnom zasadu breskve, 1975. i 1976. godine u okolini Rume, *M. laxa* je prouzrokovala gubitke oko 30% usled sušenja mladara (Ivanović, 1992). Procenat sasušanih cvetova i grančica iznosio je 70-100% u nekim zasadima u Toplici 1999. godine (Perić, 1999). Tokom 1999. godine, koja je bila izrazito kišna i povoljna za razvoj patogena, u većini zasađa višnje u Vojvodini, gde nije sprovedena adekvatna hemijska zaštita, zabeleženo je sušenje cvetova, grana i grančica i do 100% (Balaž, 2000). Velike ekonomske štete su konstantovane i usled truleži plodova breskve. Kod nekih sorti breskve, u plantažnim zasadima u Sremu, u vreme berbe konstantovana je trulež plodova do 50%, a kao prouzrokovaoč su identifikovane *M. laxa* i *M. fructigena* (Balaž, 2000). U Topličkom okrugu u 2006. godini *M. laxa* je na šljivi prouzrokovala sušenje cvetova, grana i grančica preko 90% (Perić *et al.*, 2005). U području C. Gore na višnji i kajsiji koje ispoljavaju izrazitu osetljivost, procenat sasušanih cvetova i letorasta ponekad može preći 70% (Vučinić, 1993). U Hercegovini *M. laxa* svake godine nanosi štetu preko 30% na šljivi (Radman, 1967). U Bugarskoj je u 1983. i 1984. godini došlo do masovnog sušenja cvetova i letorasta kajsije koje je u nekim zasadima iznosilo 95-100% (Nakov *et al.*, 1994, *loc. cit.* Stojanović, 2004). U Kini je

zabeležena pojava *M. laxa* na breskvi, a prvi izveštaj o pojavi *M. fructicola* na voću u Kini u 2004. godini dali su Zhu *et al.* (2005). U Kaliforniji *M. laxa* često nanosi štete na svim vrstama koštičavog voća, a najveću štetu nanosi trešnjama u oblasti velikih jezera, jer vladaju idealni klimatski uslovi za brz razvoj ovog patogena- vlažno vreme i temperatura od 24 do 25°C (Christensen 2003).

Do sada je više autora kod nas i u svetu istraživalo mogućnosti suzbijanja patogena *M. laxa* na cvetu višnje. Većina njih daje prednost hemijskim merama zaštite (Arsenijević i Rudinski, 1969; Arsenijević, 1982; Anreeva i Ahmetova, 1985; Vojvodić, 1975. i 1979; Perić, 1996; Garić, 1981).

Primeni mehaničkih mera (rezidba i skidanje mumificiranih plodova) u službi zaštite bilja na području istočne Srbije pridaje se mali značaj. U svetu i kod nas poznato je da se količina primarnog inokuluma može u velikoj meri smanjiti primenom raznih mehaničkih mera. Orezivanje suvih, obolelih grančica i grana sa rak ranama i skidanje i uklanjanje mumificiranih plodova sa voćaka predstavljaju osnovnu fitosanitetsku meru u voćarstvu (Marić, 1991).

Zadnjih godina u suzbijanju *M. laxa* poseban značaj pridaje se ekološkim merama zaštite sa savremenim shvatanjem očuvanja prirodnog ekosistema. Zato, prednost treba dati integralnoj zaštiti, koja podrazumeva primenu svih mera kojima se kontroliše nivo populacije patogena i koje obezbeđuju dobijanje visoke, stabilne i kvalitetne proizvodnje, uz minimalno zagađenje životne sredine. Mari i Guzzardi (1998) daju veliki značaj biološkim merama borbe uključujući jačanje prirodne odbrambene moći domaćina kao i primenu antagonističkih mikroorganizama. U konceptu integralne zaštite bilja, rezidba se, uglavnom, smatra jednom od dopunskih mera u suzbijanju brojnih patogena, ali u nekim slučajevima, kada druge mere nisu dostupne, može imati i prvorazredni značaj (Balaž *et al.*, 1999).

Mehaničke mere bile bi prvi korak u integralnoj zaštiti višnje od *M. laxa*, koje su ekonomski i ekološki opravdane (Marić, 1991). Mehaničkim merama se smanjuje inokulum, tako što se pristupa sakupljanju i uništavanju obolelih biljnih delova (Balaž, 1999a). Ne treba dozvoliti da mumificirani plodovi ostanu u krošnji tokom zime, već ih treba sakupiti i uništiti (Stojanović, 2004). U vreme mirovanja voćaka treba obaviti rezidbu i tada odstraniti zaražene sasušene grane, grančice i mladare i spaliti ih (Kišpatić i Maceljski, 1981; Perić i Perić, 2000). Od velikog značaja je i uništavanje samoniklih i zapuštenih stabala koštičavog voća, jer mogu biti izvor zaraze (Fillis, 1994). Gubler *et al.* (2006) ističu da dobro sprovedene mehaničke mere zaštite u voćnjacima, koje podrazumevaju orezivanje zaraženih osušenih grana, grančica i uklanjanje mumija, njihovo uništavanje ili zaoravanje, značajno smanjuju stvaranje inokuluma. Christensen (2003) pri izvođenju mehaničkih mera zaštite, akcenat stavlja na uklanjanje mumija i inficiranih grančica kako bi se smanjio početni inokulum u manjim voćnjacima, dok to nije praktično za plantaže na većim površinama. Prema rezultatima koje navodi

Perić (2002) efikasnost mehaničkih mera u 2000. iznosila je 66,7% a u 2001. godini 69,5%. Na ovaj način smanjuje se broj tretiranja, a samim tim i zagađenje životne sredine. Balaž (2000) ističe da suzbijanje *M. laxa* na koštičavim vrstama voćaka, treba sprovoditi kombinovanjem hemijskih i mehaničkih mera zaštite.

Na Kongresu održanom u Americi 1996. godine predložen je zakon o zaštiti kvaliteta hrane (FQPA – Food Quality Protection Act). Ovaj zakon je formulisao program primene pesticida sa smanjenim rizikom, tzv. niskorizični pesticidi. Važno je ukazati na prednost pesticida sa umanjenim rizikom: manja toksičnost za sisare, samim tim i niži rizik po zdravlje ljudi, manja toksičnost neciljnih organizama (pčele, ptice, ribe i biljke), smanjena mogućnost zagađenja podzemnih voda, manji broj tretiranja i sa njima je ostvariva integralna zaštita.

Niskorizični fungicidi su izuzetno efikasni u borbi protiv monilioze višnje i slobodno se može reći da su zamenili većinu ranije preporučivanih preparata (Adaskaveg *et al.*, 2005).

Rezistentnost gljiva je veliki problem prema većini sistemskih fungicida (Ogava *et al.*, 1983). U našim uslovima u suzbijanju prouzrokovaca monilioze visoku efikasnost ispoljio je preparat Topsin (Rajković *et al.*, 1998). Sibbett (2001), takođe, ukazuje na njegovu visoku efikasnost ali i upozorava na visoku rezistentnost patogena *M. laxa* na preparate Topsin i Benlejt, zbog čega preporučuje mešanje ili smenjivanje fungicida. Važno je napomenuti da se primena tiofanat-metila preporučuje jednom godišnje i uvek sa fungicidom drugačijeg hemijskog sastava (Gubler *et al.*, 2006). Često se radi izbegavanja pojave rezistentnosti kombinuju sistemski i protektivni fungicidi (Ivanović i Ivanović 2001). Rezistentnost gljiva na neke sistemske fungicide (benomil, tiofanat metil i karbendazim) predstavlja ozbiljan problem (Mitić, 2002; Marić, 1991; Grupa autora, 2003). U Kaliforniji u borbi protiv patogena *M. laxa* najbolje rezultate pokazali su fungicidi, benomil (Benlejt), tečni bakar (uključuje Bordovsku čorbu), iprodion (Rovral), propikonazol (Orbit), tiofanat-metil (Topsin M) i vinklozolin (Ronilan) (Christensen, 2003).

Jedan od najmanje štetnih fungicida je Bakarni hidroksid. On se pokazao kao efikasan u suzbijanju ovog patogena, a fitotoksičnost nije zabeležena na tretiranim biljkama. Najbolju efikasnost u suzbijanju parazita *M. laxa* ispoljio je sa dva tretiranja (kada su zatvoreni cvetovi i u punom cvetanju) ili tri tretiranja (zatvoreni cvetovi, puno cvetanje i precvetavanje) tokom cvetanja. Oba tretmana nisu tako efikasna kao komercijalna-standardna zaštita, ali je zabeležen visok prinos u poređenju sa kontrolnom varijantom (Holb *et al.*, 2005).

Fungicidi sa smanjenim rizikom ispoljili su istu pa i bolju efikasnost u odnosu na ranije primenjivane fungicide u zaštiti koštičavog voća. U bliskoj budućnosti fungicidi sa smanjenim rizikom neće kompletno zameniti ranije primenjivane fungicide, ali sa odgovarajućom strategijom i to se može postići (Adaskaveg *et al.*, 2005).

Osnovni cilj ovih ispitivanja je utvrđivanje stepena efikasnosti niskorizičnih preparata u suzbijanju patogena *M. laxa* na višnji i njihovo upoređenje sa preparatima koji ne spadaju u tu grupu. Osim toga cilj je i ocena efikasnosti različitih koncentracija ispitivanih fungicida na porast micelije *M. laxa in vitro*. Ispitivanje efikasnosti mehaničkih mera borbe, kao i njihov značaj u suzbijanju patogena *M. laxa*, takođe, je cilj ovih istraživanja. Naš krajnji cilj je podrška i razvijanje onih sistema zaštite koji vode računa i o zaštiti prirodne sredine.

MATERIJAL I METODE RADA

Izolacija patogena

Za ispitivanje uticaja fungicida na inhibiciju porasta micelije *M. laxa* u uslovima *in vitro*, patogen je izolovan iz sasušenih cvetova poreklom iz okoline Prokuplja (D. Trnava) i Bojnika (Slavnik). Uzorci su prikupljeni tokom maja i juna sa stabala na kojima nisu primenjivani fungicidi. Obolelo biljno tkivo sterilisano je 95% etil alkoholom i sterilnim sklapelom odsecani fragmenti tkiva veličine 5-10 mm², koji su ispirani sterilnom vodom i potom sušeni sterilnim filter papirom. Fragmenti su zasejavani na krompirdekstroznu podlogu sa agrom (KDA), kojoj je dodat hlorfenikol. Inkubacija patogena obavljena je na 20°C, pošto je optimalna temperatura za razvoj kolonija *M. laxa* 15-22°C (Perić, 2002).

Osnovne karakteristike kolonija

Za ispitivanje osnovnih karakteristike kolonija patogena odabrano je po pet izolata iz svakog lokaliteta. Morfologija i brzina porasta kolonija praćena je u kulturama gajenim na KGA pri 20°C u raku. Merenje prečnika kolonija vršeno je dnevno do desetog dana od zasejavanja.

Pojava patogena i efikasnosti primenjenih mera zaštite

Pojava patogena

Prisustvo *M.laxa* praćeno je u fazi cvetanja (tabela ?) na sorti oblačinska višnja u selima Donja Trnava (Toplički okrug) i Slavnik (Jablanički okrug). Starost zasada bio je 11, odnosno osam godina. Sistem gajenja je krošnja u obliku vaze, gustina sadnje 4 x 3 m, a ekspozicija jugoistočna. Ogledno polje u D. Trnavi nalazi se na 350 mnv, a u Slavniku na 300 mnv. Stepen zaraze određen je na osnovu procenta obolelih cvetova.

Efikasnost primenjenih mera zaštite

Efikasnost niskorizičnih, kao sistemskih fungicida i značaj mehaničkih mera u suzbijanju patogena *M. laxa* ispitivana je na spomenutim lokalitetima u periodu 2004. – 2006. godine. Istraživanja su bila usmerena u dva pravca: ispitivanje efikasnosti primenjenih mera u prirodnim uslovima na oglednim poljima i uticaj fungicida na inhibiciju rasta micelije gljive u laboratorijskim uslovima u *in vitro*.

Poljski ogledi – Ogledi su postavljeni po blok sistemu sa 10 varijanti (tabela 1) u četiri ponavljanja sa po pet stabala, tako da je obuhvaćeno ukupno 400 stabla, na oba ogledna polja. U prvih sedam varijanti primenjeni su fungicidi sa različitim aktivnim materijama i formulacijama i sa različitim mehanizmom delovanja. Varijante V1, V2 i V5 su sa niskorizičnim fungicidima, dok varijante V3, V4, V6 i V7 ne spadaju u tu grupu. U osmoj varijanti (V8) ispitivana je efikasnost mineralnog đubriva KAN-a (krečni amonijum nitrat). Pored prirodnog porekla i višestruke koristi za biljku postojala je pretpostavka da ima fungitoksično dejstvo, što je bio glavni razlog da se uvrsti u ispitivanja. U varijanti V9 primenjene su samo mehaničke mere zaštite višnje, rezidba svih obolelih grana i grančica, uklanjanje mumificiranih plodova i njihovo uništavanje. Deseta varijanta (V10) je kontrolna, bez primene hemijskih i mehaničkih mera zaštite.

U ogledima je korišćeno 10 preparata (tabela 1), uključujući i KAN, koji su primenjivani samostalno ili u kombinaciji. Korišćeni fungicidi pripadaju sledećim hemijskim grupama: peroksidi (vodonik peroksid), neorganska jedinjenja bakra (bakar-hidroksid), derivati tiouree (tiofanat-metil), dikarboksimidi (vinklozolin), benzimidazoli (benomil), anilinopirimidini (ciprodinil) i piperazini (triforin) (Kolektiv autora, 2003; Mitić, 2002).

Aplikacija fungicida obavljena leđnom prskalicom uz utrošak tečnosti 1000 l/ha. Tokom 2004. i 2005. godine obavljeno je po tri, odnosno četiri tretmana tokom 2006. godine u lokalitetu D. Trnava. U Lokalitetu Slavnik obavljeno je dva tretmana u 2004., odnosno tri tretmana u 2005. i 2006. godini. Sva tretiranja obavljena su od početka cvetanja do precvetavanja, koje su najosetljivije faze razvoja višnje prema *M. laxa* (tab. 2 i 3).

Ocena efikasnosti fungicida izvršena je na osnovu broja obolelih i zdravih od 1000 cvetova po stablu na četiri strane stabla u visini očiju. Efikasnost ispitivanih fungicida izračunavana je po formuli Abbott-a:

$$E = \frac{C - T}{C} \times 100$$

gde je E = efikasnost ispitivanog fungicida (u %), C = broj obolelih cvetova na netretiranoj varijanti i T = broj obolelih cvetova na tretiranoj varijanti

Ocena efikasnosti primenjenih preparata obavljena je 14., 20. i 10. maja u D. Trnavi, i 10., 17. i 15. maja u Slavniku u 2004., 2005. i 2006. godini.

Dobijeni rezultati obrađeni su statistički metodom analize varijanse (Hadživuković, 1991), uz primenu statističkog programa Statistica for Windows v. 5.0 (StatsSoft, Inc., 1995).

Uticaj fungicida na inhibiciju porasta M. laxa u in vitro – Ova istraživanja su izvedena u laboratoriji za Fitopatologiju "Agrorazvoj" u Nišu. Fungicidi u tri koncentracije (tabela 4) su inkorporirani u tečnu prohladenu hranljivu podlogu KDA mikropipetom ili kašičicom (zavisno od formulacije fungicida) uz blago mešanje sterilnim staklenim štapićima. Nakon sterilizacije nanošeni su na očvrslu podlogu isecci (prečnika 5 mm) razvujene micelije *M. laxa* zajedno sa podlogom (KDA) u centar Petri kutija. Isecci su okretani naopako, tako da je micelija bila u direktnom kontaktu sa hranljivom podlogom u koju je neposredno inkorporiran fungicid. U kontrolnim Petri kutijama nije vršena inkorporacija fungicida. Zasejane podloge u Petri kutijama su inkubirane pri temperaturi od 20°C. Porast micelije (cm) meren je svakog dana do ispunjenja cele Petri kutije. Ogled je postavljen u tri ponavljanja.

REZULTATI

Analiza klimatskih uslova u okolini Prokuplja i Leskovca tokom 2004-2006. godine

Klimatske karakteristike

Meteorološki podaci dobijeni su od meteoroloških stanica u Prokuplju i Leskovcu i obuhvatili su srednje mesečne temperature, padavine, relativnu vlažnost vazduha, vazдушna strujanja

Temperatura – Srednje mesečne temperature vazduha su vidno odstupale od višegodišnjeg proseka (tabela 4) na području Prokuplja (D.Trnava) i Leskovca (Slavnik). U Prokuplju u 2004. godini odstupanja su bila izražena u maju mesecu, gde je višegodišnji prosek viši za 1,8°C. Najmanja odstupanja su zabeležena u junu i u ovom mesecu srednja mesečna temperatura je bila 18,9°C i za 0,2°C je bila viša od višegodišnjeg proseka. I za područje Leskovca, u istoj godini, najveća odstupanja srednjih mesečnih temperatura od višegodišnjeg proseka zabeležena su u aprilu i ona su iznosila 2,2°C.

Tabela 1 – Ispitivani fungicidi i primenjene koncentracije u uslovima *in vivo* i *in vitro*?

Table 1 – Preparations and its concentrations applied *in vivo* and *in vitro*?

Tre- tman Treat- ments	Aktivna materija Active ingredient	Preparat Preparation	Koncentracija – Concentration (%)		
			Lokalitet– Locality ^a		in vitro
			A	B	
V1	vodonik peroksid– hydrogen peroxide	Perfit 25%	0.4	0.5	0.04 0.4 4
V2	bakar-hidroksid – cuper hydroxid	Blauvit WP 50	0.5	0.7	0.05 0.5 5
V3	tiofanat-metil + vinklozolin	Topsin 70 WGR + Ronilan DF WG	0.07 0.15	0.08 0.17	0.007+0.015 0.07+0.15 0.7+0.15
V4	benomil + prosimidon	Fundazol 50WP + Sumilex 50 FL SC	0.1 0.15	0.12 0.18	0.01+0.015 0.1+0.15 1.0+1.5
V5	ciprodinil	Chorus 75 WG	0.02	0.025	0.002 0.02 0.2
V6	triforin	Saprol EC	0.1	0.125	0.01 0.1 1.0
V7	vinklozolin + karbendazim	Konker SC	0.1	0.15	0.01 0.1 1.0
V8	krečni amonijum nitrat carbonate amonium nitrate	KAN	0.5	0.6	0.05 0.5 5.0
V9	Mehaničke mere Mechanical measures	Uklanjanje obolel- ih grana i plodova Descharge of dise- ased branches and fruits	-	-	-
V10	Kontrola Check	Ne tretirano Not treated	-	-	-

^a Lokalitet – Locality: A = Donja Trnava (Prokuplje), B= Slavnik (Bojnik)

Tabela 2 – Dinamika cvetanja višnje, broj i vreme tretiranja u lokalitetu Donja Trnava**Table 2** – The dynamic of sour cherry blossoming, number and date of treatments in locality Donja Trnava

Godina Year	Faza Razvoja cveta Flower development stage						
	“Bele kokice” White buds	Početak cvetanja Start of blossoming	Puno cvetanje Full blossoming	Precvetavanje Post blossoming	Dužina cvetanja (dani) Days of blossoming	Broj tretiranja No of treatments	Datum tretiranja Date of treatments
2004	16/04	21/04	21/04	29/04	13	3	17/04 23/04 30/04
2005	15/04	22/04	26/04	29/04	19	4	16/04 22/04 27/04 03/05
2006	12/04	15/04	20/04	28/04	16	3	12/04 18/04 25/04

Tabela 3. – Dinamika cvetanja višnje, broj i vreme tretiranja u lokalitetu Slavnik**Table 3.** – The dynamic of sour cherry blossoming, number and date of treatments in locality Slavnik

Godina Year	Faza Razvoja cveta Flower development stage						
	“Bele kokice” White buds	Početak cvetanja Start of blossoming	Puno cvetanje Full blossoming	Precvetavanje Post blossoming	Dužina cvetanja (dani) Days of blossoming	Broj tretiranja No of treatments	Datum tretiranja Date of treatments
2004	14/04	18/04	22/04	26/04	12	2	17/04 24/04
2005	16/04	21/04	27/04	03/05	17	3	20/04 26/04 02/05
2006	13/04	16/04	20/04	27/04	14	3	14/04 21/04 27/04

Tabela 4. – Srednje mesečne prolećne temperature vazduha (°C)
u Prokuplju i Leskovcu u toku istraživanja

Table 4. – The average month temperatures (°C)
in Prokuplje and Leskovac vicinity in 2004-2006.

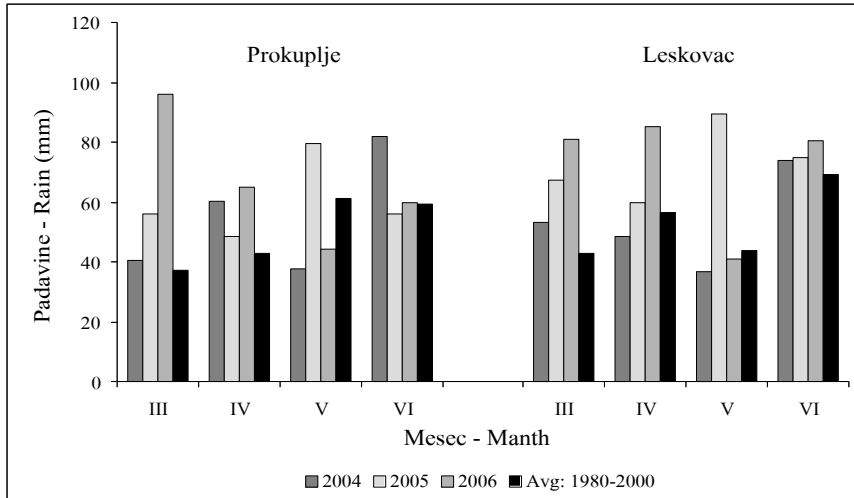
	Godina Year	Mesec – Month				Prosek Average
		III	IV	V	VI	
Prokuplje	2004.	6.8	12.2	14.0	18.9	12.97
	2005.	4.8	10.7	16.0	17.9	12.35
	2006.	5.3	12.1	15.7	18.9	13.00
	Prosek-Average: 1980-2000	6.0	11.1	15.8	18.7	12.90
Leskovac	2004.	6.8	12.4	14.3	19.5	13.25
	2005.	4.9	10.9	16.4	18.5	12.67
	2006.	5.7	12.2	16.1	19.3	13.32
	Prosek-Average: 1980-2000	6.3	10.2	15.8	19.1	12.85

Kolebanja srednje mesečnih temperatura za Prokuplje bila su i u 2005. godini. U martu (4,8°C), aprilu (10,7°C) i junu (17,9°C) temperature su bile niže u odnosu na višegodišnji prosek (6,0°C mart, 11,1°C april i 18,7°C jun). U maju srednja mesečna temperatura je za 0,2°C bila viša od višegodišnjeg proseka. Na području Leskovca u martu i junu temperature su bile niže, a u aprilu i maju više od višegodišnjeg proseka. Ova razlika je iznosila za mart 0,6°C, april 0,7°C, maj 0,6°C i jun 0,6°C.

Padavine – Nedostatak vlage u toku vegetacije onemogućava uspešnu proizvodnju višnje i pored toga što je ona otporna na sušu. Smatra se da višnja ima manje zahteve za vodom u poređenju sa drugim voćnim vrstama koje se kod nas gaje, a razlog je ranije sazrevanje njenih plodova koji su veliki potrošači vode. U većini regiona Srbije u toku vegetacije, najveće količine padavina beleže se u periodu april-jun, što posebno odgovara ritmu razvoja Oblačinske višnje, jer ona kreće sa vegetacijom u aprilu, a krajem juna sledi berba plodova. Zato se Oblačinska višnja uspešno gaji u jugoistočnim regionima Srbije, koji imaju znatno manje padavina u drugom delu vegetacije.

Na oba područja i u svim godinama istraživanja u pogledu srednje mesečne sume padavina zabeležena su odstupanja od višegodišnjeg proseka (grafikon 1). U Prokuplju u 2004. godini najveća odstupanja su bila u maju mesecu kada je višegodišnji prosek bio viši za 23,5 mm. Najmanja odstupanja su zabeležena u

martu kada je suma padavina iznosila 40,4 mm i za 3,0 mm je veća od višegodišnjeg proseka. Na području Leskovca najveće odstupanje od višegodišnjeg proseka zabeleženo je u martu i to 10,5 mm.



Graf. 1 – Suma mesečnih padavina u proleće u okolini Prokuplja i Leskovca tokom 2004–2006. godine

U 2005. godini u oba lokaliteta tokom vegetacionog perioda srednja mesečna suma padavina je bila iznad, osim u junu u Prokuplju kada je bila za 3,1 mm manja od višegodišnjeg proseka. U Prokuplju je najveće odstupanje zabeleženo u martu 18,6 mm, a u Leskovcu u maju, što je za 45,5 mm iznad višegodišnjeg proseka. Najveće srednje mesečne sume padavina u toku istraživanja zabeležene su u 2006. godini u oba lokaliteta. Najveća odstupanja od višegodišnjeg proseka zabeležena su u martu i to u Prokuplju 28,4 mm, a u Leskovcu 38,3 mm.

Relativna vlažnost vazduha – Relativna vlažnost vazduha na području Topličkog i Jablaničkog okruga u toku perioda cvetanja višnje kreće se od 60% do 75% (Perić, 1980; Perić *et al.*, 1996) što je znatno niže od optimalne relativne vlažnosti vazduha za razvoj patogena *M. laxa* (85%) (Ivanović, 1992). U uslovima dužeg kišnog perioda i visoke relativne vlažnosti vazduha (85%), patogen ispoljava visok stepen patogenosti i može direktno da prodire u nepovređene biljne organe, kao što su plod i list (Byrde, 1988).

U oba lokaliteta i u svim godinama istraživanja prosečna relativna vlažnost vazduha nije imala većih odstupanja (tabela 5). Najniži procenat prosečne relativne vlažnosti zabeležen je 2006. godine u Prokuplju (72,75%), a u Leskovcu 2004. godine (74,00%). Najveća prosečna relativna vlažnost zabeležena je 2005. godine u Prokuplju i iznosila je 76,25%, a u Leskovcu 80,00%.

Tabela 5. – Srednja mesečna relativna vlažnost vazduha (%) za vegetacioni period u u Prokuplju i Leskovcu tokom istraživanja

Table 5. – The average month RH (%) during vegetation in Prokuplje and Leskovac vicinity in 2004-2006.

	Godina Year	Mesec – Month				Prosek Average
		III	IV	V	VI	
Prokuplje	2004.	70	75	75	79	74.75
	2005.	76	72	80	77	76.25
	2006.	75	72	71	73	72.75
	Prosek-Average: 1980-2000	73	70	72	73	72.00
Leskovac	2004.	72	72	75	77	74.00
	2005.	77	74	86	83	80.00
	2006.	71	78	70	80	74.75
	Prosek-Average: 1980-2000	74	71	74	73	73.00

Na osnovu ovih vrednosti može se zaključiti da je klimaski uslovi bili povoljni za razvoj patogena u sve tri godine istraživanja, što je obezbeđivalo dobijanje pouzdanih rezultata istraživanja.

Vazдушna strujanja – Na području Topličkog i Jablaničkog okruga se najčešće javljaju severni i severnoistočni vetrovi. Najači vetrovi duvaju u martu a najslabiji u septembru i oktobru. Srednje vrednosti brzine vetra u prolećnom periodu iznose 1,4 m/sek. To je vetar "razvigorac" (topao prolećni vetar) koji ubrzava kretanje vegetacije, ali je i značajan vektor širenja reproduktivnih organa patogena *M. laxa*.

Pojava *M. laxa* na višnji na području Prokuplja i Bojnika

Patogen *M. laxa* se redovno javlja na višnji u različitom intenzitetu, u zavisnosti od pogodnosti klimatskih uslova, u Topličkom i Jablaničkom okrugu. Tokom 2003. godine nije zabeležena pojava *M. laxa*, jer u cvetanju nije bilo padavina, ali u sve tri godine (2004-2006) istraživanja, bili su ispunjeni svi uslovi za pojavu ovog patogena, tako da su simptomi bili lako vidljivi na svim delovima višnje.

Prve infekcije 2004. godine ostvarene u oba lokaliteta u fazi početka cvetanja. Cvetanje je počelo dva dana ranije u lokalitetu Slavnik (Bojnik). Razlika u vremenu cvetanja može nastati iz više razloga, kao što je južna ekspozicija terena u Jablaničkom okrugu gde su postavljeni ogledi i zbog razlike u temperaturi koja je u Jablaničkom okrugu bila nešto viša nego u Topličkom.

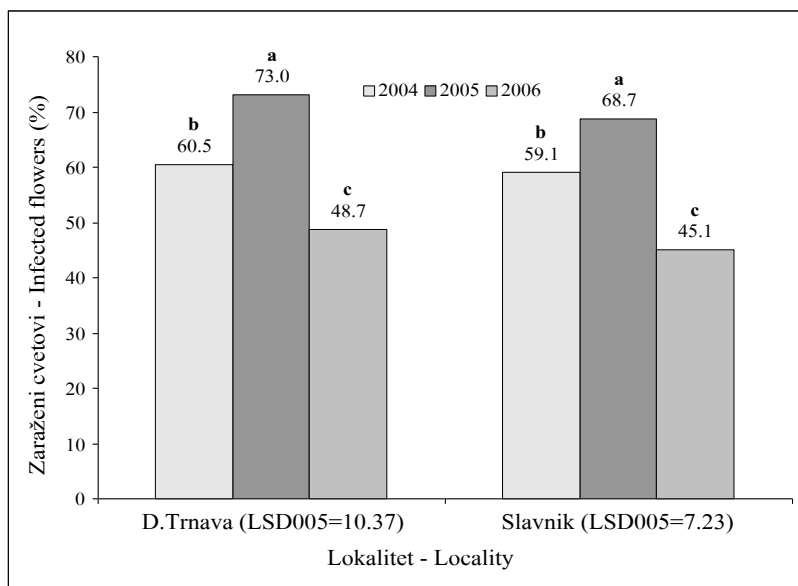
Sušenje cvetnih kitica zapaženo je 23. aprila u Prokuplju i Bojniku. U Bojniku posle izvršene infekcije bilo je više sunčanih intervala, sa srednjom mesečnom temperaturom 12,4°C tako da su se brže sušili vlažni delovi višnje pa se i infekcija sporije širila u odnosu na ispitivana stabla u Prokuplju. Cvetni delovi su se lepili za grane i grančice, dobijali mrkocrvenu boju sa sivom a kasnije pepeljastom prevlakom koju čine vegetativni i reproduktivni organi patogena-sporodohije. U daljem posmatranju simptomi su ukazivali da je patogen iz obolelih cvetnih delova prelazio u grančice i letoraste koji su se iznad mesta infekcije sušili. Termohigrometrijski faktor u 2004. godini bio je naklonjen patogenu *M. laxa*, ali zahvaljujući kraćem periodu cvetanja koje je u Prokuplju iznosilo 13, a u Bojniku 12 dana, sprečene su dalje infekcije (tabela 2 i 3).

Procenat onolelih cvetova višnje u oba lokaliteta značajno se razlikovao u zavisnosti od godine, ali između lokaliteta nije bilo razlike (tabela 6). Najjača infekcija patogenom na kontrolnim stablima zabeležena je u 2005. godini, 73,0% u Prokuplju, a 68,7% u Bojniku (graf 2). Kišni period se u potpunosti poklapao sa fenofazom cvetanja što je uslovalo masovne infekcije. Infekcija cveta koja je izazvana većom količinom padavina, zabeležena je početkom druge dekade aprila u Prokuplju i Bojniku. U ovoj godini zabeleženo je najduže trajanje cvetanja, u Prokuplju 19, a u Bojniku 17 dana. Infekcija je obavljena preko žiga tučka. Patogen je brzo zahvatio i ostale cvetne delove. Redovnim praćenjem, prvi vidljivi simptomi zabeleženi su na tučku i prašnicima u Prokuplju 22. aprila, a u Bojniku 21. aprila. Sušenje cvetnih kitica zapaženo je posle pet dana. Sasušeni cvetovi u kiticama na vršnim grančicama i letorastima najčešće su opadali, a na njima nije zabeleženo formiranje pepeljaste navlake. Ovaj tip simptoma poznat je i kao plamenjača cveta "blossom blight" višnje.

Tabela 6 – Analiza varijanse procenta obolelih cvetova višnje u kontrolnim varijantama u lokalitetima D.Trnava i Slavnik tokom 2004-2006. godine

Table 6 – Analise of variance of diseased sour cherry flowers (%) in untreated plots in localities D.Trnava and Slavnik in 2004-2006.

Izvori varijacije Source of variation	Stepeni slobode Degree of freedom	Suma kvadrata Sum of squares	Sredina kvadrata Mean square	F test	Fisher
Blokovi -Blocks	3	156.00	52.00	1.82	0.00
Tretmani -Treatments	5	2365.77	473.15		
Godina – Year (A)	2	2298.96	1149.48	40.34 **	6.40
Lokalitet– Locality (B)	1	57.64	57.64	2.02	0.00
Interakcija – Interaction AB	2	9.17	4.59	0.16	0.00
Greška -Error	15	427.47	28.50		
Ukupno – Total	23	2949.25			



Graf. 2 – Procenat obolelih cvetova višnje u D. Trnavi i Slivniku tokom 2004–2006. godine

Vegetacioni period u 2006. godini u oba lokaliteta je bio sa najvećom prosečnom količinom padavina (66,20 mm u Prokuplju i 71,80 mm u Leskovcu). Ova suma padavina usledila je u prvoj dekadi aprila, dok se faza cvetanja odvijala u druge dve dekade. Zahvaljujući ovakvom rasporedu padavina, u ovoj godini je zabeležena najniža infekcija *M. laxa*. Ovi povoljni uslovi za patogena omogućili su ostvarenje infekcije krajem aprila u oba lokaliteta. Prvi vidljivi simptomi na tučku i prašnicima zabeleženi su 01. maja u Prokuplju, a 04. maja u Bojniku. Sušenje cvetnih kitica zabeleženo je samo na pojedinim kontrolnim stablima u Prokuplju i nešto slabije u Bojniku.

Redovnim praćenjem simptoma koje prouzrokuje gljiva *M. laxa* na višnji zapaženo je da je patogen prodirao u grančice, grane i letoraste najčešće preko sasušenih cvetova, a ređe preko ozleda na kori (povrede od grada, insekata i rezidbe). Infekcija grančica zabeležena je u kontrolnoj varijanti u sve tri godine ispitivanja u oba lokaliteta. Uočena je slabija infekcija grana i grančica u 2005. godini u varijantama tretiranim KAN-om i Perfitom. Na samo dve grančice u Prokuplju u kontroli gde je izvršena infekcija pojavile su se ulegnute, eliptične pege mrke boje, tkivo oko njih je crnelo i pucalo. U nastalim udubljenjima stvarale su se rak-ranice koje su idealno mesto za održavanje patogena do proleća naredne godine. Znaci oboljenja na grančicama uočeni su nakon 8 – 14 dana posle uvenuća cvetova. Stablo na kome su zabeleženi ovi simptomi bilo je zasanjeno, tako da se voda duže zadržavala na tim granama.

Na ostalim stablima na obe ogledne parcele nije bilo zabeleženo formiranje rak-rana na debljim granama ni u jednoj godini ispitivanja, što se i očekivalo s obzirom da su ogledna stabla mlada (8 i 11 godina), a ova pojava je češća u starijim zasadima. Na grančicama i letorastima primećena je smolotočina samo u 2005. godini kada je gljiva ispoljila visok stepen patogenosti, a klimatski uslovi pogodovali razvoju bolesti.

U istraživanjima u oba lokaliteta i u sve tri godine, zabeležena je sporadična pojava monilioze na plodovima višnje. U uslovima povećane vlažnosti u junu 2004. godine u Prokuplju (81,9 mm), 2005. u Leskovcu (74,6 mm), kao i 2006. godine (80,3 mm) mrka trulež se na pojedinim kontrolnim stablima razvijala veoma brzo, tako da je ceo plod bio zahvaćen za 4 do 7 dana. Prvi simptomi na pokožici ploda ispoljili su se u obliku okruglaste mrke pege oko mesta infekcije. Pega se širila koncentrično i zahvatala deo ploda. Zapaženo je da je brzina širenja pega zavisila od temperature i vlage, kao i od stepena zrelosti ploda. Pošto su uslovi bili optimalni za razvoj patogena *M. laxa* u 2004. i 2006. godini (povoljna vlažnost i temperatura), uočeno je da se mrka trulež brzo širila, a ceo plod je trulio, smežuravao se i sušio. Mrka pega je u početku bila glatka, pokožica ploda je pucala a na njoj su se obrazovale sivkaste, jastučaste gomilice od konidiofora i konidija. Te nakupine poznate su pod imenom sporodohije.

Na plodu su se jasno videle difuzno razbacane sporodohije sive boje, koje su karakterističan simptomatološki znak za *M. laxa*, za razliku od drugih vrsta *Monilinia* čije su sporodohije poredane u koncentričnim krugovima oko mesta infekcije. Primećeno je da se veličina sporodohija i do dva puta povećala u jako kišnim uslovima i kretala se oko 1,0 mm (2006. godine u Bojniku). Inficirani plodovi su se brzo sušili i ostajali da vise na granama, a neki su padali na zemlju. U 2006. godini procenat mumificiranih plodova kretao se oko 0,3% i to su uglavnom bili plodovi oštećeni od insekata ili drugih povreda.

Praćenje biologije i epidemiologije patogena na području Prokuplja i Bojnika

U Južnoj Srbiji konidije su osnovni izvor inokuluma kako za primarne tako i za sekundarne infekcije. U sve tri godine istraživanja bili su povoljni uslovi u proleće za formiranje primarnog inokuluma koji može poticati od konidija, obrazovanih od mumificiranih plodova što je i najčešći slučaj. Zapažene su i ozlede plodova od insekata (*Rhagoletis cerasi* L.) preko kojih je moguće ostvarenje infekcije. U 2005. godini bili su izuzetno povoljni uslovi (duži kišni period i visoka relativna vlažnost vazduha) za razvoj patogena u vreme zrenja višnje kada je zapaženo da je infekcija zrelih plodova bila ostvarena i bez mehaničkih povreda. Na području Prokuplja i Bojnika česti su prolećni vetrovi, što ukazuje da su konidije najčešće anemohorno, a ređe hidrohorno dospevale na cvetne delove višnje i ostvarivale infekciju preko žiga. Zapaženo je da su dugotrajne i obilne padavine prethodile ostvarenju zaraze cveta višnje.

Cvet je osetljiv od početka cvetanja do precvetavanja. Dužina perioda cvetanja višnje je u korelaciji sa dužinom perioda za infekciju. Visoka relativna vlažnost vazduha oko 80% i temperatura 22 – 28°C povoljno su uticali na ostvarenje infekcije i brz razvoj bolesti u oba lokaliteta tokom istraživanja. Primećeno je obrazovanje konidiofora i konidija u gomilicama-sporodohijama na svim obolelim organima višnje. Konidije stvorene u proleće na osušenim cvetovima, granama i mumificiranim plodovima, bile su izvor inokuluma za plodove koji dozrevaju. *M. laxa* stvara i mikrokonidije, sitne, okrugle koje se obrazuju masovno u nizovima. U prirodnim uslovima mogu se naći na stromama u vidu lepljive žućkastomrke mase kao i u kulturama gljive gajenoj na hranljivoj podlozi. U oba područja istraživanja tokom 2005. godine, u vreme punog cvetanja, patogen *M. laxa* je bio aktivan i na nižim temperaturama (5-7°C). U tom periodu srednja mesečna temperatura iznosila je 10,7°C u Prokuplju i 10,9°C u Bojniku.

Intezitet zaraze *M. laxa* i efikasnost primenjenih mera zaštite

U Južnoj Srbiji konidije su osnovni izvor inokuluma kako za primarne tako i za sekundarne infekcije. U sve tri godine istraživanja bili su povoljni uslovi u proleće za formiranje primarnog inokuluma, koji može poticati od konidija, obrazovanih od mumificiranih plodova što je i najčešći slučaj. Zapažene su i ozlede plodova od insekata (*Rhagoletis cerasi* L.) preko kojih je moguće ostvarenje infekcije. U 2005. godini bili su izuzetno povoljni uslovi (duži kišni period i visoka relativna vlažnost vazduha) za razvoj patogena u vreme zrenja višnje kada je zapaženo da je infekcija zrelih plodova bila ostvarena i bez mehaničkih povreda. Na području Prokuplja i Bojnika česti su prolećni vetrovi, što ukazuje da su konidije najčešće anemohorno, a ređe hidrohorno dospevale na cvetne delove višnje i ostvarivale infekciju preko žiga. Zapaženo je da su dugotrajne i obilne padavine prethodile ostvarenju zaraze cveta višnje.

Cvet je osetljiv od početka cvetanja do precvetavanja. Dužina perioda cvetanja višnje je u korelaciji sa dužinom perioda za infekciju. Visoka relativna vlažnost vazduha oko 80% i temperatura 22 – 28°C povoljno su uticali na ostvarenje infekcije i brz razvoj bolesti u oba lokaliteta tokom istraživanja. Primećeno je obrazovanje konidiofora i konidija u gomilicama-sporodohijama na svim obolelim organima višnje. Konidije stvorene u proleće na osušenim cvetovima, granama i mumificiranim plodovima, bile su izvor inokuluma za plodove koji dozrevaju. *M. laxa* stvara i mikrokonidije, sitne, okrugle koje se obrazuju masovno u nizovima. U oba područja istraživanja tokom 2005. godine, u vreme punog cvetanja, patogen *M. laxa* je bio aktivan i na nižim temperaturama (5-7°C). U tom periodu srednja mesečna temperatura iznosila je 10,7°C u Prokuplju i 10,9°C u Bojniku.

Povoljni klimatski uslovi tokom sve tri godine ispitivanja usloveli su da se bolest ispolji u vrlo visokom procenatu na kontrolnim, ne trtiranim parcelama. Postojale su vrlo značajne razlike u procentu obolelih cvetova između ispitivanih godina, ali nema razlike između lokaliteta (tabela 6, grafikon 2). Intenzitet oboljenja bio je 48.7 – 60.5 % (60.7 ± 7.016) u lokalitetu D.Trnava, odnosno 45.1 – 68.7 % (57.6 ± 6.852) u lokalitetu Slavnik. Takođe, zapažen je veći broj zaraženih cvetova na severnoj u odnosu na južnu ekspoziciju. Najpovoljniji uslovi za razvoj patogena u oba lokaliteta bili su tokom 2005. godine a najnepovoljniji tokom 2006. godine (grafikon 2). Procenat zaraženih cvetova u 2005. godini je u kontrolnoj varijanti je značajno niži nego u prethodne dve godine ispitivanja. Razlog tome je nepovoljan raspored padavina za razvoj patogena *M. laxa*. Najviše padavina je zabeleženo u prvoj dekadi marta, pre početka cvetanja višnje.

Primenjene mere suzbijanja *M.laxa* vrlo zanačajno su se razlikovale u pogledu smanjenja procenta obolelih cvetova. To smanjenje zanačajno je zavisilo i od godine ispitivanja, ali ne od lokaliteta u kome su mere primenjene (tabela 7 i 8).

Tabela 7 – Analiza varijanse procenta obolelih svetova višnje nakon primene različitih varijanti zaštite u lokalitetima D.Trnava i Slavnik tokom 2004-2006. godine

Table 7 – Analise of variance of diseased sour cherry flowers (%) after aplaing treatmans in localities D.Trnava and Slavnik in 2004-2006.

Izvori varijacije Source of variation	Stepeni slobode Degree of fidom	Suma kvadrata Sum of squares	Sredina kvadrata Mean square	F test	Fisher
Blokovi -Blocks	3	340.47	113.49	1.46	0.00
Varijanta –Variants (A)	8	14633.70	1829.21	23.55 **	3.50
Godina – Year (B)	2	694.49	347.24	4.47 *	3.30
Lokalitet– Locality (C)	1	117.00	117.00	1.51	0.00
Interakcija – Interaction AB	16	1096.12	68.51	0.88	0.00
Interakcija – Interaction AC	8	45.53	5.69	0.07	0.00
Interakcija – Interaction BC	2	1.82	0.91	0.01	0.00
Interakcija–Interaction ABC	16	850.18	53.14	0.68	0.00
Greška -Error	159	12350.72	77.68		
Ukupno – Total	215	30130.02			

Tabela 8 – Procenat obolelih cvetova višnje po varijantama u D.Trnava i Slavnik tokom 2004-2006. godine

Table 8 – The percentage of infected sour cherry flowers in treated plots in D.Trnava and in 2004-2006.

Varijanta ^a Variants	Lokalitet – Locality					
	Donja Trnava			Slavnik		
	2004	2005	2006	2004	2005	206
V ₁	28.40 f ^b	33.70 e	22.30 e	27.10 e	31.70 e	20.30 f
V ₂	23.40 e	29.30 d	16.80 d	22.70 d	26.80 d	15.50 d
V ₃	1.70 a	2.60 a	1.40 a	1.50 a	2.20 a	1.20 a
V ₄	4.50 b	4.50 a	2.50 ab	1.00 a	2.00 a	1.10 a
V ₅	7.10 c	7.70 b	4.50 b	6.70 b	6.60 b	3.90 b
V ₆	11.40 d	12.00 c	8.00 c	10.10 c	11.70 c	7.00 c
V ₇	10.60 d	12.70 c	7.60 c	9.80 c	10.40 c	6.60 c
V ₈	29.30 f	34.20 e	23.10 e	29.20 e	33.30 e	21.10 f
V ₉	24.80 e	31.40 de	19.30 d	23.40 d	51.90 f	17.40 e

a Vidi tabelu 1 – See table 1

b Vrednosti u kolonama obolele istom slovom nisu statistički značajne na osnovu Dulkanovog testa (P005)
– Data marked with the same letter are not statistically diiferent according to Duncan's multiple range test (P005)

Najveće smanjene procenta obolelih cvetova, u odnosu na kontrolu, bilo je u varijantama V3, V4 i V5 (Topsin + Ronilan, Fundazol + Sumilex i Chorus) u oba lokaliteta i tom sve tri godine ispitivanja. To smanjenje bilo je za 41.2 % (V5, u Slavniku 2006. godine) – 70.4 % (V3, D.Trnava u 2005. godini). Najmanje smanjenje procenta obolelih cvetova bilo je u varijanti sa primenom KAN-a (za 24.0% u Slavniku 2006. godine, odnosno 38.8 % u D.Trnavi 2005. godine). Primena mehaničkih mera zaštite (V9) smanjila je procenata zaraženih cvetova za 16.8 % (Slavnik), odnosno za 41.6 % (D.Trnava) tokom 2005. godine.

Efikasnost primenjenih mera zaštite vrlo značajno je zavisila od vrste preparata (varijante), godine ispitivanja, ali ne i od lokaliteta, pri čemu je njihova interakcija bila vrlo značajna (tabela 9 i 10).

Tabela 9 – Analiza varijanse efikasnosti primenjenih mera suzbijanja *M.laxa* u lokalitetima D.Trnava i Slavnik tokom 2004-2006. godine

Table 9 – Analisa of varians of efficiency of applied measures in kontrol of *M.laxa* in localities D.Trnava and Slavnik in 2004-2006.

Izvori varijacije Source of variation	Stepeni slobode Degree of fidom	Suma kvadrata Sum of squares	Sredina kvadrata Mean square	F test	Fisher
Blokovi -Blocks	3	35.42	11.81	2.13	0.00
Varijanta –Variants (A)	8	68775.79	8596.97	1549.44 **	3.50
Godina – Year (B)	2	455.13	227.56	41.01 **	5.40
Lokalitet– Locality (C)	1	4.53	4.53	0.82	0.00
Interakcija – Interaction AB	16	1799.71	112.48	20.27 **	3.50
Interakcija – Interaction AC	8	710.22	88.78	16.00 **	3.50
Interakcija – Interaction BC	2	177.69	88.84	16.01 **	5.40
Interakcija–Interaction ABC	16	1343.43	83.96	15.13 **	3.50
Greška -Error	159	882.20	5.55		
Ukupno – Total	215	74184.13			

Ispitivani preparati bi se mogli grupisati u četiri grupe na osnovu procenta efikasnosti: 1 = vrlo niska (< 55 %), 2 = niska (56% – 70%), 3 = srednja (71– 89 %) i 4 = visoka efikasnost (> 90 %).

Najveću efikasnost u oba lokaliteta i u sve tri godine ispitivanja ispoljila kombinacija Topsin+Ronilan (V3), koja se kretala od 96.57 (D.Trnava, 2005.)

do 97.50 (Slavnik, 2004.), u proseku 97.09 ± 0.142 (tabela 10). Sličnu efikasnost imala je kombinacija Fundazol + Sumilex (V4), osim u lokalitetu D.Trnava tokom 2005. godine. Ova kombinacija fungicida imala je efikasnost od 94.95 (D.Trnava, 2005.) do 98.30 (Slavnik, 2004.), u proseku 95.68 ± 0.947 . Srednju do visoku efikasnost ispoljio je Chorus (V5) u zavisnosti od lokaliteta i godine ispitivanja. Visoka efikasnost je bila u Slavniku 2005. i u oba lokaliteta 2006. godine (tabela 10).

Tabela 10 – Efikasnost primenjenih mera suzbijanja *M.laxa* u lokalitetima D.Trnava i Slavnik tokom 2004-2006. godine

Table 10 – The efficiency of applied measures in control of *M.laxa* in localities D.Trnava and Slavnik in 2004-2006.

Varijanta ^g Variants	Lokalitet – Locality					
	Donja Trnava			Slavnik		
	2004 ^a	2005 ^b	2006 ^c	2004 ^d	2005 ^e	2006 ^f
V ₁	52.78 e ^h	53.47 e	54.10 g	54.10 e	53.72 e	54.95 f
V ₂	61.25 d	59.40 d	65.57 e	61.42 d	60.83 d	65.55 d
V ₃	97.20 a	96.57 a	97.18 a	97.50 a	96.78 a	97.32 a
V ₄	92.55 ab	93.63 a	94.95 b	98.30 a	97.10 a	97.55 a
V ₅	88.20 b	89.45 b	90.80 c	88.60 b	90.35 b	91.32 b
V ₆	81.15 c	83.32 c	83.93 d	82.68 c	82.97 c	84.45 c
V ₇	82.47 c	82.70 c	84.35 d	83.32 c	84.88 c	85.32 c
V ₈	51.58 e	53.00 e	52.63 g	50.58 e	51.47 e	53.15 g
V ₉	58.85 d	56.15 de	60.33 f	60.13 d	24.50 f	61.35 e

a vreme tretiranja-date of treatment: 17/04, 23/04, 30/04; vreme primene mehaničkih mera– date of applying mechanical measures: 16/03; ocena-estimation: 14/05.

b vreme tretiranja-date of treatment: 16/04, 22/04, 27/04, 03/05; vreme primene mehaničkih mera– date of applying mechanical measures: 21/03; ocena-estimation: 20/05.

c vreme tretiranja-date of treatment: 12/04, 18/04, 25/04; vreme primene mehaničkih mera– date of applying mechanical measures: 02/04; ocena-estimation: 10/05.

d vreme tretiranja-date of treatment: 17/04, 24/04; vreme primene mehaničkih mera– date of applying mechanical measures: 17/03; ocena-estimation: 10/05.

e vreme tretiranja-date of treatment: 20/04, 26/04, 02/05; vreme primene mehaničkih mera– date of applying mechanical measures: 28/03; ocena-estimation: 17/05.

f vreme tretiranja-date of treatment: 14/04, 21/04, 27/04; vreme primene mehaničkih mera– date of applying mechanical measures: 15/05; ocena-estimation: 15/05.

g Vidi tabelu 1 – See table 1

h Vrednosti u kolonama obeležene istim slovom nisu statistički značajne na osnovu Duncanovog testa (P005) – Data marked with the same letter are not statistically different according to Duncan's multiple range test (P005)

Efikasnost Sapro-a (V6) i Konker-a (V7) bila približno ista (81.15 – 84.45 %, odnosno 82.47 – 85.32 %) i oni bi pripadali grupi srednje efikasnih preparata. Nisku efikasnost ispoljio je Blauvit (59.4 – 65.57%), a vrlo nisku Perfit (52.78-54.95 %) i KAN (50.58-53.15 %).

Efikasnost primene mehaničkih mera zaštite postignuta je vrlo niska efikasnost u Slavniku 2005. godine (24.50 %). Razlog za to treba tražiti u nepovoljnim klimatskim uslovima u vreme cvetanja višnje i jačem strujanju vazduha, zbog čega je u ovoj godini došlo do izražaja anemohorno širenje patogena *M. laxa*. U ostalim slučajevima efikasnost je bila niska (56.15 – 61-35 %). U vreme cvetanja višnje tokom aprila 2006. godine nije bilo vetra, a samim tim ni uslova za anemohorno širenje patogena, pa je efikasnost mehaničkih mera bila znatno viša u odnosu na rezultate iz prethodne godine. Slični uslovi u vreme cvetanja bili su i tokom 2004. godine.

Ispitivanje efikasnosti preparata na porast kolonija *M. laxa* *in vitro*

Dobijeni rezultati pokazuju da u prvoj varijanti sa preparatom Perfit (tabela 11) vidljivo dolazi do pada toksičnosti pri nižim koncentracijama (0,04% i 0,4%) u poređenju sa toksičnošću pri visokoj koncentraciji od 4%. Pri deset puta manjoj koncentraciji (0,04%) micelija je dostigla 8,4 cm, a sa propisanom 0,4%, 8,1 cm. Pri upoređenju sa kontrolom nema značajnije razlike, osim što je početni rast micelije blago usporen. Pri koncentraciji od 4% postignuta je visoka efikasnost, jer je micelija na isečku prestala potpuno da se razvija.

Efikasnost preparata sa preventivnim delovanjem je bila znatno izraženija. Preparat Blauvit je ispoljio sličnu efikasnost kao u polju. Posle tretiranja ovim fungicidom u koncentraciji 0,05% i 0,5%, micelija pokazuje sporiji porast (3,2-4,5 cm), dok pri koncentraciji od 5%, micelija se razvija usporeno samo prva četiri dana sa prečnikom do 0,9 cm.

Kombinacija Topsina+Ronilana ispoljila je visoku efikasnosti u uslovima *in vitro* i pri minimalnim koncentracijama 0,007%+0,015%. Micelijaja je krenula da se razvija prva tri dana i dostigla samo 0,5 cm u prečniku, što je zanemarujuće pri upoređenju sa kontrolom gde micelija prvi dan dostiže isti prečnik.

Kod složene formulacije Fundazol+Sumilex pri minimalnoj primenjenoj koncentraciji (0,01%+0,015%), takođe je postignuta visoka efikasnost, a prečnik micelije je iznosio 1,0 cm. Pri koncentraciji 0,1%+0,15%, prečnik micelije je iznosio 0,4 cm. Pri maksimalnoj koncentraciji 1,0+1,5%, zabeležena je visoka toksičnost za miceliju gljive *M. laxa*, jer je u potpunosti sprečen njen rast.

Najjaču toksičnost prema miceliji gljive *M. laxa* staroj 10 dana pokazao je sistemični preparat Chorus, koji pri minimalnoj ispitivanoj koncentraciji od 0,002% usporava i prekida rast micelije na zanemarljivih 0,5 cm u prečniku, dok ostale ispitivane koncentracije potpuno onemogućavaju rast micelije *M. laxa*.

Pojedinačni preparat Saprool pri minimalnoj koncentraciji 0,01% u uslovima *in vitro* usporio je razvoj micelije koja je dostigla 1,5 cm, a pri koncentraciji 0,1%

samo 0,3 cm. U potpunosti je inhibiran rast micelije na podlozi u koju je dodata najveća koncentracija (1%).

Tabela 11 – Uticaj različitih koncentracija ispitivanih preparata na porast i reukciju porasta kolonija *Monilinia laxa* u odnosu na kontrolu posle 3, 5, 7 i 10 dana

Table 11 – Effect of different concentrations of applied preparates on colony growth of *Monilinia laxa* and colony growth reduction in comparison with untreated varijant after 3, 5, 7 and 10 days

Varijanta ^a Treatment	Koncentracija Concentration (%)	Porast kolonija (cm) nakon dana Colony growth after days				Redukcija porasta kolonija (%) Colony growth decreasing (%)			
		3	5	7	10	3	5	7	10
V1	0,04	1,4	2,4	6,5	8,4	30.0	20.0	13.3	1.2
	0,4	0,9	1,8	5,9	8,1	55.0	40.0	21.3	4.7
	4,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100.0	100.0	100.0	100.0
V2	0,05	1.3	2.2	3.9	4.5	35.0	26.7	48.0	47.1
	0,5	1.2	1.9	3.2	3.2	40.0	36.7	57.3	62.4
	5,0	0.8	0.9	0.9	0.9	60.0	70.0	88.0	89.4
V3	0,007+0,015	0,5	0,5	0,5	0,5	75.0	83.3	93.3	94.1
	0,07+0,15	0,1	0,1	0,1	0,1	95.0	96.7	98.7	98.8
	0,7+1,5	0,0	0,0	0,0	0,0	100.0	100.0	100.0	100.0
V4	0,01+0,015	0,8	1,0	1,0	1,0	60.0	66.7	86.7	88.2
	0,1+0,15	0,4	0,4	0,4	0,4	80.0	86.7	94.7	95.3
	1,0+1,5	0,0	0,0	0,0	0,0	100.0	100.0	100.0	100.0
V5	0,002	0,4	0,5	0,5	0,5	80.0	83.3	93.3	94.1
	0,02	0,0	0,0	0,0	0,0	100.0	100.0	100.0	100.0
	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	100.0	100.0	100.0	100.0
V6	0,01	0,7	1,0	1,5	1,5	65.0	66.7	80.0	82.4
	0,1	0,3	0,3	0,3	0,3	85.0	90.0	96.0	96.5
	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100.0	100.0	100.0	100.0
V7	0,01	1,0	1,8	2,0	2,0	50.0	40.0	73.3	76.5
	0,1	0,6	0,7	0,7	0,7	70.0	76.7	90.7	91.8
	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100.0	100.0	100.0	100.0
V8	0,05	1,5	2,7	4,5	8,0	25.0	10.0	40.0	5.9
	0,5	1,2	2,0	3,0	6,4	40.0	33.3	60.0	24.7
	5,0	1,2	2,0	2,8	5,3	40.0	33.3	62.7	37.6
V10	-	2.0	3.0	7.5	8.5	-	-	-	-

c Vidi tabelu 1 – See table 1

Fabrička kombinacija fungicidnog preparata Konker u uslovima *in vitro* dala je slične rezultate kao i u polju. Pri minimalnoj koncentraciji 0,01%, micelija se usporeno razvijala i dostigla u prečniku 2,0 cm, pri većoj koncentraciji od 0,1%, samo 0,7 cm, dok pri najvećoj (1%) je u potpunosti inhibiran razvoj micelije.

Najnižu efikasnost u uslovima *in vitro* ispoljio je KAN. Pri najnižoj koncentraciji (0,05%) micelija se razvijala skoro kao u kontroli (8,0 cm) u prečniku, dok je pri 0,5%, zabeležen nešto sporiji porast (6,4 cm). Ni pri najvećoj koncentraciji nije zaustavljen porast micelije, već je samo blago usporen i u prečniku je izmerno 5,3 cm.

Karakteristike kolonije *Monilinia laxa*

Kolonije izolata *M. laxa* nisu se bitnije razlikovali po izgledu i morfologiji. Gljiva na KDA je u početku obrazovala kolonije prljavo bele, a kasnije tamnije nijanse sivomaslinaste boje, kružnog oblika sa režnjastim obodom. Micelija je razgranata, a konidiofore su kratke i nerazgranate sa mikro i makrokonidijama poređanim u nizovima.

Razlike u porastu kolonija po pet izolata iz oba lokaliteta pri 20°C bile su zanemarljive (graf 3). Najbrži porast od 8,5 cm zabeležen je kod izolata PK-3 (D. Trnave) i 8,3 cm kod izolata BO-4 (Slavnik) nakon 10 dana pri temperaturi od 20°C.

DISKUSIJA

Monilinia laxa, prouzrokovatelj sušenja cvetova, grančica i mrke truleži plodova, je jedan od najznačajnijih patogena koštičavih voćaka, posebno višnje. Njegovom razvoju doprinosi kišovito vreme u periodu cvetanja. U Južnoj Srbiji na višnji redovno se javlja monilioza, a jačina inteziteta isključivo zavisi od termohigrometrijskog faktora, dužine cvetanja i inokulum potencijala patogena.

Srednja mesečna temperatura u martu u godinama istraživanja u oba lokaliteta kretala se od 5,9°C do 6,8°C. Na ovim temperaturama prezimela micelija *M. laxa* u rak ranama u kori zaraženih grana, grančica i mumificiranim plodovima može da fruktificira. Pri povoljnim uslovima vlažnosti, *Monilinia* vrste obrazuju konidije na mumificiranim plodovima i obolelim granama već pri temperaturi od 5°C (Ogawa *et al.*, 1995). Step en oštećenja od niskih temperatura zavisi od fenofaze razvoja višnje. Gledano u celini Oblačinska višnja na području Južne Srbije pokazala se otpornom na niske zimske temperature, kao i na sušu. Višnji ne odgovaraju temperaturna kolebanja tokom zime (mogu da dovedu do oštećenja pupoljaka nekad i samog drveta), kao i niske letnje temperature, koje usporavaju sazrevanje plodova.

U sve tri godine ispitivanja srednja mesečna temperatura u aprilu bila je od 10,7°C do 12,2°C u Prokuplju, a od 10,9°C do 12,4°C u Leskovcu. Pri temperaturama od 10°C dolazi do redovne i značajne sporulacije patogena *M. laxa* (Perić, 1980).

Srednje mesečne temperature vazduha u junu nisu odstupale od višegodišnjeg proseka na području Prokuplja (18,7°C) i Leskovca (19,1°C). Višnja uspeva pri širokom temperaturnom intervalu od -25° do +35°C. Najkvalitetniji plodovi dobijaju se pri srednje dnevnim temperaturama oko 20°C (Gvozdenović, 1995; Mišić, 1989).

U periodu izvođenja oglada u oba lokaliteta najveća prosečna suma padavina za vegetacioni period u 2006. godini zabeležena je u Prokuplju (66,20 mm) i 2005. godini u Leskovcu (72,75 mm). Srednja mesečna relativna vlažnost vazduha za vegetacioni period u toku istraživanja u oba lokaliteta je bila najveća u 2005. godini, u Prokuplju (76,2%) i Leskovcu (80,0%). Termohigrometrijski faktor i dužina cvetanja su u direktnoj korelaciji sa intezitetom razvoja patogena *M. laxa*, što je ovim ogledima potvrđeno, jer najduže cvetanje (19 dana) i najveća relativna vlažnost u vegetacionom periodu bila je 2005. godine, kada je zabeležena najača infekcija. U toj godini vršena su četiri tretiranja u D. Trnavi, a tri u Slavniku, jer je cvetanje trajalo kraće (17 dana), tako da je interval između dva tretmana iznosio 4-6 dana. Najmanji broj tretiranja (dva) bio je u 2004. godini kada je cvetanje trajalo najkraće (12 dana) na oglednom polju u Bojniku (Slavnik). Postignuti rezultati su bili izuzetno dobri, kada je interval između dva

tretiranja iznosio 6-8 dana. Ovi rezultati ispitivanja slažu se sa rezultatima drugih istraživača, jer po Bolay *et al.* (1972) i Vojvodiću (1975) za uspešno suzbijanje patogena *M. laxa* potrebno je sprovesti 3-4 tretiranja i to u razmacima 6-8 dana, u periodu otvaranja cvetnih pupoljaka do precvetavanja. To znači da u osetljivoj fazi cvetanja, fungicidi mogu da zaštite cvet višnje od infekcije najviše osam dana (Jones, 1975).

Srednje mesečne temperature, padavine i vlažnost vazduha u vegetacionom periodu (od marta do juna) u godinama istraživanja i oba lokaliteta, ukazuju da je termohigrometrijski faktor bio stimulativan za patogena.

Vidljivi simptomi na parazitiranim organima višnje ispoljili su se u kratkom vremenskom intervalu. Dužina tog perioda zavisi od stepena osetljivosti samih organa, njihove razvijenosti, agresivnosti patogena i klimatskih uslova. Najraniji simptomi bolesti zabeleženi su 2005. godine na osetljivim cvetnim delovima (tučku i prašnicima) u oba lokaliteta. Uvenuće i sušenje lastara i grančica je bilo u zavisnosti od njihove debljine i dužine i kretalo se od 8 do 14 dana, posle sušenja cvetova. Mrka trulež na plodovima višnje u direktnoj je zavisnosti od količine padavina i relativne vlažnosti vazduha. U 2004. i 2006. godini inficirani plodovi su na kontrolnim stablima potpuno trunuli za 4 do 7 dana nakon infekcije. Period vremena za ispoljavanje prvih simptoma oboljenja na višnji od patogena *M. laxa* je nešto kraći za područje Crne Gore (Vučinić, 1993).

Svi ispitivani preparati imaju izraženo jedno ili dva delovanja (protektivno i/ili sistemično). Poznavanje efikasnosti fungicida u uslovima *in vivo* i *in vitro* predstavljalo bi osnovu za iznalaženje najboljih preparata i njihovih odgovarajućih koncentracija za hemijsko suzbijanje gljive *M. laxa* (Marić, 1991).

Kombinacija Topsin+Ronilan je po efikasnosti bila na prvom mestu u Prokuplju (prosečna efikasnost 96,91%). Tiofanat-metil spada u grupu dozvoljenih fungicida od strane EU, s tim što se mora obratiti pažnja na ograničeni broj tretiranja. Vojvodić (1979) i Chitzaridis (1971) su tretiranjem inficiranih letorasta sistemičnim fungicidom na bazi tiofanat-metila ustanovili kurativno dejstvo istih.

Važno je napomenuti da je kombinacija preventivnih i sistemičnih fungicida dala bolje rezultate od pojedinačnih. U Bojniku je visoku efikasnost ispoljila kombinacija Fundazol+Sumilex (97,46%). Postojanost sinergističkog delovanja kod kombinacije dva preparata, potvrđuju i drugi autori. Tako Waard (1987) ukazuje da je mešavina dve aktivne materije toksičnija od pojedinačnih, što se može tumačiti sinergističkim delovanjem.

Različitu efikasnost kombinacije Topsin+Ronilan i Fundazol+Sumilex u lokalitetima D. Trnava (Prokuplje) i Slavnik (Bojnik) prouzrokovala je pojava rezistentnosti *M. laxa* na fungicid benomil. Preparati na bazi ove aktivne materije primenjivani su u lokalitetu Prokuplja godinama, dok je u Bojniku prvi put

fungicid benomil upotrebljen 2004. godine za ova istraživanja. Leroux (1984) je utvrdio visok nivo rezistentnosti na benzimidazole, što potvrđuju i ovi rezultati. Pojavu rezistentnosti *M. laxa* na Benomil u Srbiji utvrdili su Stević i Vukša (2005). Rezistentnost gljiva je veliki problem prema većini sistemskih fungicida (Ogava *et al.*, 1983).

U našim uslovima u suzbijanju monilioze višnje visoku efikasnost ispoljio je preparat Topsin (Rajković *et al.*, 1998). Sibbett (2001), takođe, ukazuje na njegovu visoku efikasnosti ali i upozorava na visoku rezistentnost patogena *M. laxa* na preparate Topsin i Benlejt, zbog čega se preporučuje mešanje ili smenjivanje fungicida. Preparati Topsin i Benlate ispitivani su pojedinačno u Kaliforniji za suzbijanje patogena *M. laxa*. Oba preparata dala su identične rezultate (Sibbett, 2001).

Pojedinačni preparat Chorus je ispoljio visoku efikasnost u sve tri godine istraživanja u lokalitetu D. Trnava (prosečno 89,48%) i u lokalitetu Slavnik (prosečno 90,13%). Slične rezultate (82,58%) isti preparat ispoljio je u 2006. godini u suzbijanju patogena *M. laxa* na šljivi (Perić *et al.*, 2006). Za suzbijanje patogena *M. laxa* u Italiji kao najefikasnija kombinacija preporučuje se ciprodinil+fludioksil (Switch), uz napomenu da je maksimalan broj tretiranja, tri (Fornaciari, 2004). Niskorizični fungicid ciprodinil je ispoljio visoku efikasnost u suzbijanju *M. laxa* na koštičavom voću u Kaliforniji. U kontrolnoj varijanti prosečna zaraza je prelazila 90%, dok je u varijanti sa ciprodinilom zabeleženo nepunih 10% (Adaskaveg *et al.*, 2005), što se u potpunosti podudara sa dobijenim rezultatima u ovim istraživanjima.

Srednju efikasnost ispoljio je fabrički kombinovani preparat Konker, u lokalitetu D. Trnava (prosečno 83,15%) i lokalitetu Slavnik (prosečno 84,54%). Isti preparat primenjen je u suzbijanju patogena *M. laxa* na višnji 2000. godine i ispoljio efikasnost 81,1% i 2001. godine 93,7% (Perić, 2002). U suzbijanju patogena *M. laxa* na šljivi preparat Konker je 2006. godine ispoljio efikasnost 87,55% (Perić *et al.*, 2006).

Pojedinačni preparat Saprool ispoljio je srednju efikasnost u Prokuplju (prosečno 82,89%) i u Bojniku (prosečno 83,44%). Isti preparat je 2000. godine ispoljio nešto nižu efikasnost (79,7%), a 2001. godine (88,3%) u suzbijanju patogena *M. laxa* na višnji (Perić, 2002). Vojvodić (1979) je ispitivao efikasnost Saprola u suzbijanju *M. laxa* na višnji 1975. godine, kada su zabeleženi rezultati od 66,7%, a 1977. godine 90,40%. Isti autor napominje da je do slabijeg efekta suzbijanja u 1975. godini došlo zbog toga što su intervali između pojedinih prskanja bili dosta široki i kretali su se od 8 do 14 dana, dok su intervali između prskanja u 1977. godini svedeni na 6 do 8 dana.

Fungicid sa smanjenim rizikom Blauvit koji se nalazi na zelenoj listi, ispoljio je nisku efikasnoet u svim godinama istraživanja u Prokuplju (prosečno 62,22%) i

u Bojniku (prosečno 62,68%). Jedan od najmanje štetnih fungicida je Bakarni hidroksid. On se pokazao kao efikasan u suzbijanju ovog patogena, a fitotoksičnost nije zabeležena na tretiranim biljkama. Najbolju efikasnost u suzbijanju patogena *M. laxa* ispoljio je sa dva tretiranja (kada su zatvoreni cvetovi i u punom cvetanju) ili tri tretiranja (zatvoreni cvetovi, puno cvetanje i opali krunični listići) tokom cvetanja. Oba tretmana nisu tako efikasna kao komercijalna-standardna zaštita, ali je zabeležen visok prinos u poređenju sa kontrolnom varijantom (Holb *et al.*, 2005). Po EPPO standardima za suzbijanje *M. laxa* podrazumeva se primena bakar-oksihlorida. U Kaliforniji je ispitivana efikasnost bakarnih preparata u suzbijanju patogena *M. laxa*, a zabeležena efikasnost je bila +/- što znači minimalna sa čestim infekcijama i niske rezistentnosti (Sibbett, 2001).

Tokom ovih istraživanja ispitivana je i efikasnost Perfita. Dobijeni rezultati pokazuju da je njegova efikasnost u lokalitetu D. Trnava (Prokuplje) bila prosečno 53,69% i lokalitetu Slavnik (Bojnik) prosečno 54,94% što je vrlo niska efikasnost. Imajući u vidu njegove karakteristike može se preporučiti u praksi u organskoj proizvodnji zdrave hrane, ali je neophodno povećanje broja tretiranja.

U cilju iznalaženja rešenja očuvanja prirodne sredine i zaštite zdravlja čoveka ispitivana je efikasnost niskih koncentracija mineralnog đubriva KAN-a (krečni amonijum nitrat). U lokalitetu D. Trnava (Prokuplje) je zabeležena njegova prosečna efikasnost 52,42%, a u Slavniku (Bojnik) 51,77%. Prema definiciji integralna proizvodnja voća predstavlja ekonomski opravdanu proizvodnju izuzetnog kvaliteta, pri čemu u proizvodnom procesu prednost imaju ekološki sigurne metode proizvodnje, čime se sporedno dejstvo agrohemikalija smanjuje na minimum, što nadalje ima za cilj zaštitu zdravlja čoveka i očuvanje prirodne sredine (tekst preveo Bagi Ferenc u časopisu Biljni lekar 188-191, br.2, 2001).

Analizirajući rezultate efikasnosti ispitivanih fungicida u lokalitetima D. Trnava (Prokuplje) i Slavnik (Bojnik) u ispitivanom periodu (2004-2006), dobijeni rezultati idu u prilog primeni sistemskih fungicida u kombinaciji sa preventivnim. Način primene preparata, kao što je kombinovanje ili smenjivanje sa drugim preparatima može osigurati trajnu efikasnost niskorizičnih fungicida (Adaskaveg *et al.*, 2005).

Pored hemijskih mera koje su najefikasnije u suzbijanju patogena *M. laxa* veliki značaj pridaje se i mehaničkim merama. Osnovna uloga rezidbe u službi zaštite bilja odnosi se na odstranjivanje svih zaraženih grana, grančica i mladara. Tako se znatno umanjuje potencijal patogena i izvor primarnog inokuluma. Dobro orezana voćka ima više svetlosti i vazduha. Što je reda krošnja to je strujanje vazduha veće i dolazi do smanjenja relativne vlažnosti vazduha u krošnji i kraćem zadržavanju kapi vode. Mehaničke mere se smatraju jednim od dopunskih mera u suzbijanju patogena *M. laxa*, a kada se druge mere ne sprovedu one mogu imati prvorazredni značaj (Marić, 1991; Balaž, 1999. i 2000).

U Južnoj Srbij mehaničkim merama se ne pridaje veći značaj u suzbijanju patogena *M. laxa*. Čak nema ni saznanja kod proizvođača koliki je njihov uticaj na razvoj *M. laxa*. Zbog toga su one uvršćene u ovo istraživanje, kako bi se utvrdio njihov značaj i dala uputstva proizvođačima. Primenom mehaničkih mera postignuta je značajna efikasnost od 56,98 do 63,36% u Prokuplju, a u Bojniku se kretala od 24,45% do 61,41%, što u potpunosti opravdava njihovu primenu. Vrlo niska efikasnost mehaničkih mera borbe (24,45%) zabeležena je 2005. godine u Slavniku. Jedan od razloga za ovako nisku efikasnost je idealan termohigrometrijski faktor za patogena *M. laxa* u vreme cvetanja, kao i vetar koji je omogućio anemohorno širenje patogena. Iz ovog je zaključeno da je efikasnost mehaničkih mera znatno veća u godinama kada nema jačeg strujanja vazduha i kada je onemogućeno anemohorno širenje patogena. Rezidba i uklanjanje plodova "mumija", čini osnovnu fitosanitetsku meru u zaštiti višnje od patogena *M. laxa* (Marić, 1991). Količina primarnog inokuluma može se u velikoj meri smanjiti primenom ovih mehaničkih mera u službi zaštite bilja (Balaž, 1999. i 2000).

Ova istraživanja jasno ukazuju na značajnu efikasnost mehaničkih mera borbe i zato bi ih trebalo uvrstiti u redovne preventivne mere sa ciljem smanjenja broja tretiranja, a samim tim i očuvanja prirodne celine.

U uslovima *in vitro* *M. laxa* na hranljivoj podlozi sporije raste od *M. fructicola* i formira reznjast obod kolonije. Iste rezultate dobili su Sholberg *et al* (2003) u Kanadi, navodeći da je rast kolonije *M. fructicola* na agaru bio brz u koncentričnim krugovima za razliku od spororastuće *M. laxa* sa ivicama kolonije u obliku reznja.

Analizirajući rezultate ispitivanja u uslovima *in vitro* uočljivo je da je raspon minimalnih doza ispitivanih fungicida koje sprečavaju rast micelije *Monilinia laxa* na hranljivoj podlozi KDA veoma širok i kreće se od 0,007% za Topsin pa do 4% Perfit i 5% za Blauvit.

Ispitivani preparati najbolje su delovali prva tri dana, a potom je njihovo dejstvo slabilo, što se može tumačiti da sa starošću zidovi micelije zadebljavaju i tako povećavaju otpornost na fungicide.

Važno je ukazati na značaj pojedinačnog preparata Chorus koji je ispoljio najvišu toksičnost u uslovima *in vitro* i u potpunosti inhibirao rast micelije pri koncentracijama 0,02 i 0,2%, za razliku od kombinovanih preparata koji su, takođe, ispoljili visoku toksičnost, ali nisu u potpunosti inhibirali rast micelije pri propisanim koncentracijama.

Rezultati ispitivanja pokazuju da svi preparati sa sistemčnim delovanjem ispoljavaju visoku efikasnost, delujući inhibitorno na razvoj svih ispitivanih izolata pri ispitivanim koncentracijama.

Interesantan podatak je da je preparat Perfit pri najvećoj ispitivanoj koncentraciji (4%) ispoljio visoku efikasnost *in vitro*, što ukazuje na potrebu daljeg ispitivanja povećanih koncentracija ovog preparata u prirodnim uslovima.

Rezultati efikasnosti fungicida uz primenu niskorizičnih preparata u uslovima *in vivo* i *in vitro* ukazuju da niskorizičnim preparatima treba dati prednost, kako zbog njihove efikasnosti tako i zbog očuvanja prirodnog ekosistema. Niskorizični fungicidi su izuzetno efikasni u borbi protiv monilioze višnje i slobodno se može reći da su zamenili većinu ranije preporučivanih preparata (Adaskaveg *et al.*, 2005).

LITERATURA

- Adaskaveg, J. E., Forster, H., Gubler, W. D., Teviotdale, B. L., Thompson, D. F. (2005): Reduced-risk fungicides help manage brown rot and other fungal diseases of stone fruit. *California Agriculture*, 59,2.
- Anreeva, E. I., Ahmetova, N. I. (1985): *Mehanizam dejstva fungicidov. Mikologija i fitopatologija*, tom 19, vpusk 3, Moskva.
- Archer, S. A. (1988): *Monilinia fructigena* (Aderhold & Ruhl.) Honey ex Whetzel. *European Handbook of Plant Diseases*, 439-440, (eds. I . M. Smith *et al.*), Backwell Scientific Publication, London.
- Arsenijević, M. (1982): *Monilinia – Sclerotinia* spp. kao paraziti voćaka i mogućnosti njihovog suzbijanja. *Glasnik zaštite bilja* br. 5. 162. Zagreb.
- Arsenijević, M., Rudinski, I. (1969): Fungicidna vrednost bakarnog kreča 25 i Cineba S-65 u suzbijanju *Monilia spp.* na višnjama. *Agrohemija*, br. 5-6, Beograd.
- Balaž, J. (1999a): Rezidba u službi zaštite bilja. *Biljni lekar* 1, 59-62, Novi Sad.
- Balaž, J. (2000): *Monilia spp.* kao parazit voćaka. *Biljni lekar* br. 2-3. 155-162, Novi Sad.
- Balaž, J., Horvat, G., Stamenov, M., (1999): Zaštita koštičavih vrsta voćaka od ekonomski značajnih parazita. *Zbornik rezimea sa četvrtog jugoslovenskog savetovanja o zaštiti bilja*. 26-27, Zlatibor.
- Blagojević, R. (2000): *Voćarstvo*. Univerzitet u Prištini, Poljoprivredni fakultet-Kruševac.
- Bulatović, S. (1992): *Savremeno voćarstvo*. Beograd.
- Byrde, R. J. W., Willets, H. J. (1997): *The Brown Rot Fungi of Fruit: their Biology and Control*. Perg. Press, Oxford.
- Chitzaridis, A. (1971): Test of eradicator fungicides against *Sclerotinia laxa* on Sour cherry trees. *Annal. de L'institut Ph Beancaci*, vol.10, No2.
- Christensen, J. (2003): *Brown Rot of Stone Fruits*. Department of Plant Pathology. University of Nebraska. Lincoln.

- Fillis, M. A. (1994): Brown Rot of Stone Fruits Ohio State Universiti Extension Fact Sheet. Plant pathology hyg 3009-94.
- Fornaciari, M. (2004): Bolletino agrometeorologico e di Produzione integrata Servizi Sviluppo Agricolo, Italy.
- Garić, R. (1981): *Monilia laxa* (Aderh. et Ruhl.) na višnjata i merki za zaštita. Magistarski rad odbranjen na zemljodjelskom fakultetu u Skoplju.
- Garić, R., Feratović, Š., Hadrović, H. (1979): Osetljivost cvetova nekih sorata višnje prema *Monilia* spp. Glasnik zaštite bilja br. 9. 278-291, Zagreb.
- Grupa autora. (2003): Pesticidi u prometu u Srbiji i Crnoj gori. Biljni lekar, 2-3/2003. Novi Sad.
- Gubler, W. D., Adaskaveg, J. E., Pickel, C., Niederholzer, F. J. A., Teviotdale, B. L. (2006): Brown Rot Blossom and Twig Blight. Statewidw IPM Program, Agriculture and Natural Resources, University of California.
- Gvozdenović, D. (1995): Višnja. Nolit. Beograd.
- Holb, I. J. (2005): Effect of Fungicide Tretmans and Sanitation Practices on Brown Rot Blossom Blight Incidence, Phytotoxicity, and Yeld for Organic Sour Cherry Production. Department of Plant Protection, University of Debrecen, Hungary.
- Ivanović, M. (1992): Mikoze biljaka. Nauka, Beograd.
- Ivanović, M., Ivanović, D. (2001): Mikoze i pseudomikoze biljaka. De-Em-Ve. Beograd.
- Jones, A. I. (1975): Control of brown rot of cherry with new hyndation fungicides and with selected fungicides mixtures. Plant Diseaces Reporter, 59,2, 127-130.
- Kišpatic, J. (1985): Opšta fitopatologija, Zagreb.
- Kišpatic, J., Maceljiski, M. (1981): Zaštita voćaka i vinove loze. Znanje, Zagreb.
- Kolektiv autora (2003): Pesticidi u prometu u Srbiji i Crnoj Gori u 2003. godini. Biljni lekar, br. 2-3, Novi Sad.
- Leroux, P. (1984): Phenomens de resistance des champignons phytopathogenes aux fungicide. Bulletin technique d'information, 390: 303-319.
- Mari, M., Guzzardi, M. (1998): The Postharvest Phase: Emerging Technologies for the Control of Fungal Diseases. Phytoparasitica 26 (1): 59-66
- Marić, A. (1991): Opšta fitopatologija, Novi Sad.
- Mišić, P. (1989): Nove sorte voćaka. Nolit, Beograd.
- Mitić, N. (2002): Pesticidi u poljoprivredi i šumarstvu u Jugoslaviji. Savezno ministarstvo za poljoprivredu, Beograd.
- Mordue, E. M. (1979): *Sclerotinia laxa* C. M. A. Description of Pathogenic Fungi and Bacteria, no. 619, Kew, England.
- Ogava, J. M., Manji, B. T., Heston, C. R., Petrie, J., Sonoda, R. M. (1983): Metods for detecting and monitoring the resistance of plant pathogens to hemicals. In pests resistance to pesticides, Planum Press, New York, 117, 163.

- Ogawa, J. M., Zehr, E. I., Biggs, A. R. (1995): Brown rot: in Compendium of Stone Fruit Diseases (ed. Ogawa *et al.*), APS Press.
- Pavićević, B., Pavićević, B. (2003): Oblačinska višnja. JPG grafička agencija, Beograd.
- Perić, R. (1980): Epifitotična pojava monilioze na višnji u Toplici u periodu od 1976-1980. Savetovanje o zaštiti bilja, Poreč.
- Perić, R. (1999): *Monilinia i Cocomices* na višnji, epidemične pojave i mogućnosti za njihovo suzbijanje. Savetovanje o zaštiti višnje od bolesti, štetočina i korova, Knjaževac.
- Perić, R., Perić, S. (2000): Najopasniji parazit višnje *Monilinia laxa*, u Toplici i mogućnosti njihovog suzbijanja. Savetovanje «Dani višnje» saopšteni rezultati. Prokuplje.
- Perić, R., Todorović, D., Blagojević, R. (1996): Prilog proučavanju uzroka propadanja cvetova i grana Oblačinske višnje u Toplici i mogućnosti suzbijanja uzročnika. Zbornik naučnih radova. Prvi naučni skup, Viša poljoprivredno– prehrambena škola u Prokuplju, 219-224, Prokuplje.
- Perić, S. (2002): Ispitivanje efikasnosti fungicida u suzbijanju parazita *Monilinia laxa* (Ader. i Ruhl.) na višnji. Magistarska teza, Poljoprivredni fakultet Univerziteta u Prištini, Kruševac.
- Perić, S., Gudžić, S., Stojičić, I., Perić, R. (2005): Efikasnost fungicida u suzbijanju *Monilini laxa* na šljivi u Toplici. Zbornik rezimea sa VIII savetovanja o zaštiti bilja, 99, Zlatibor.
- Perišić, M., Marković, S., Babović, M. (1976): Prilog proučavanja uzroka sušenja mladara bresaka i višanja u rejonu Fruške Gore. Zaštita bilja 136:141-148, Beograd.
- Radman, L.J. (1967): *Monilinia laxa* (Ehram.) Aderh. Et Ruhl., kao značajan faktor smanjenja prinosa nekih sorti šljiva. Zaštita bilja (93-95), 85-91, Beograd.
- Radman, L.J. (1979): Fitopatologija, bolesti voćaka i vinove loze, Zadrugar, Sarajevo.
- Rajković, S., Matijević, D., Todorović, D., Veljković, I. (1998): *Monilinia laxa*-najčešći uzročnik propadanja oblačinske višnje na jugu Srbije i mogućnosti njihovog suzbijanja. Zbornik rezimea radova sa IV Jugoslovenskog Kongresa o zaštiti bilja, 149, Vrnjačka Banja.
- Sholberg, P. L., Haag, P. D., Hambleton, S., Boulay, H. (2003): First Report of Brown Rot in Wine Grapes in Canada. Canada.
- Sibbett, S. (2001): 2001 Almond Springtime Disease Control. Cooperative Extension. University of California.
- Stojanović, D., Kostić, B. (1957): Intezitet napada *Monilia fructigena* i *M. laxa* na šljivama i jabukama. Zaštita bilja 39-40:81-86, Beograd.
- Stojanović, S. (2004): Poljoprivredna fitopatologija. Srpsko biološko društvo «Stevan Jakovljević», Kragujevac.
- Vasilev, V., Bačvarov, D. (1981): Oblačinska višnja, Sofija.
- Vojvodić, Đ. (1975): Monilija na višnji i hemijske mere suzbijanja. Zbornik radova saopštenih na IV seminaru za zaštitu bilja, 324-328, Poreč.

- Vojvodić, Đ. (1979): Prilog proučavanju suzbijanja *Monilinia laxa* (Enhr.) Sacc. na višnji. Zaštita bilja (147), 71-76, Beograd.
- Vučinić, Z. (1993): Proučavanje ciklusa razvoja i rasprostranjenosti *Monilinia spp.* na koštičavim vrstama voćaka u Crnoj Gori. Poljoprivreda i šumarstvo. 3-4. Podgorica.
- Waard, M. A. (1987): Sinergism and antagonism in fungicides. In Modern selektive fungicides (Lyr. H.) LIS, New York, 355-366.
- Zhu, X. Q., Chen, X. Y., Luo, Y., Guo, L. Y. (2005): First report of *Monilinia fructicola* on peach and nectarine in China. Department of Plant Pathology, China Agricultural University, Beijing, China.

(Primljeno: 10.03.2009.)

(Prihvaćeno: 31.03.2009.)

THE EFFICINENCY OF LOW RISK FUNGICIDES AND MECHANICAL MEASURES IN CONTROL OF *MONILINIA LAXA* ON SOUR CHERRY

SANJA PERIĆ

High Agricultural Scool, Prokuplje

SUMMARY

The efficienci of 10 preparations, applied alone or in combinationsa, and mechanical measures in control of *M.laxa* on sour cherry was study in two localities (Donja Trnava and Slavnik) during 2004-2006. and *in vitro*. Perfit 25% (hydrogen peroxide), Blauvit WP 50 (cuper -hydroxid), combination of Topsin 70 WGR + Ronilan DF WG (tiophanat-methyl + vinklosoline), combination of Fundazol 50WP + Sumilex 50 FL SC (benomil + prosimidone), Chorus 75 WG (ciprodinil), Saprol EC (triphorin), Konker SC (vinklozoline + karbendazim) i KAN (carbonate amonium nitrate) were used.

The best control was scored by applaing combination Topsin+Ronilan in both localities and in all three years (in average 97.09 ± 0.142). Combination Fundazol + Sumilex had similar efficiency (in average 95.68 ± 0.947), except in D.Trnava during 2005. Chorus demonstrated medium to high efficiency, depending of locality and year. Minera fertilizer KAN showed low efficiency (in average 52.07 ± 0.4149). The efficiency of mechanical measures was 59-61 %.

These fungicides showed the effec *in vitro* on colony growth of *M.laxa*.

Ključne reči: sour cherry, *Monilinia laxa*, control, low risk fungicides, mechanical measures

(Received: 10.03.2009.)

(Accepted: 31.03.2009.)

Zaštita bilja
vol. 59 (1-4), No 263-266, 59-67, 2008, Beograd

UDK 632.35:635.655
Naučni rad

RACE IDENTIFICATION OF *PSEUDOMONAS SYRINGAE* PV. *GLYCINEA* ON COMMERCIAL SOYBEAN VARIETIES IN SERBIA

MAJA IGNJATOV¹, MILOŠ VIDIĆ¹, MIRJANA MILOŠEVIĆ², JELICA BALAZŽ³, PETROVIĆ DRAGANA¹, ZORICA NIKOLIĆ¹, MILKA VUJAKOVIĆ¹

¹Institute of field and vegetable crops, Novi Sad

²Ministry of Agriculture, Forestry and Water Management
of Republic of Serbia, Belgrade

³Faculty of Agriculture, Novi Sad

Bacterial blight is important and frequent disease of soybean in Vojvodina province. Isolation of the pathogen was carried out from infected soybean leaves of several cultivar grown in Vojvodina province using beef extract and the medium enriched with 5% sucrose.

Only the representative isolates were chosen for further investigation. Pathogenicity of the obtained isolates including referent strain (National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, United Kingdom-NCPPB 3318) was proved by inoculating soybean plants in cotyledon stage (Balkan variety), by spraying with bacterial suspension (conc.10⁸CFU/ml). Pathogenicity of studied isolates was also confirmed by infiltration on tobacco leaves.

Cultural and biochemical-physiological characteristics were tested.

Differential soybean cultivars: Acme, Chippewa, Flambeau, Harosoy, Lindarin, Merit and Norchief were used to determine physiological race of the bacterium. Young plants were inoculated in two ways: by leaves rubbing with sterile cotton swab dipped into the bacterial suspension, and by spraying leaves under the pressure. Based on the results obtained it was shown that strains which cause bacterial blight of soybeans in Vojvodina, belong to *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* race 4.

Key words: Soyabean, *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*, reses, identification

INTRODUCTION

Bacterial blight caused by *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* is the most common disease of soybean. The pathogen has a worldwide distribution and occurs wherever soybeans are grown. Disease development is favoured by cool and wet weather. Infected seed and plant debris are the main source of inoculum. Pathogen populations on seedlings, originating from infected seeds, are probably formed by injury cotyledons with abrasive soil particles. These populations become a significant inoculum source for leaves that later develop (Daft & Leben, 1972).

During the years with rainy spring the bacterial blight appears with high intensity (Balaž *et al.* 1995), and cause great damage especially in early maturing cultivars (Vidić & Balaž, 1997).

Seven physiological races of *P. s.* pv. *glycinea* have previously been distinguished by inoculation of leaves of seven differential cultivars of soybean (Cross *et al.* 1966). So, there is a need for further characterization of strains of *P. s.* pv. *glycinea* in agroecological conditions of Vojvodina province.

MATERIAL AND METHODS

Isolation procedure

Leaves showing characteristic bacterial blight symptoms were collected from 23 soybean fields located in the nine major soybean-producing localities in Vojvodina region. Leaves were placed in paper bags and transported to the laboratory.

Isolations of the pathogen was carried out from diseased soybean leaves, using standard procedure of smearing macerated tissues across the nutritive surface (Shaad, 1980; Lelliot & Stead, 1987; Arsenijević, 1997). Diseased samples were collected from several localities and different soybean varieties in Vojvodina. Morphological, biochemical and physiological characteristic of investigated isolates was done using conventional methods given by Lelliot *et al.* (1966).

PATHOGENICITY TEST

Hypersensitive reaction (HR) on tobacco leaves

Pathogenicity of obtained isolates were tested on tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L.). Susspension (10^6 CFU/ml) was injected into the intact tobacco leaf with a hypodermic needle (Klement *et al.*, 1990). The referent strain (National

Collection of Plant Pathogenic Bacteria, United Kingdom-NCPPB 3318) was also included.

Pathogenicity on soybean

Soybean seeds (Balkan variety) were sown in plastic boxes with wet and sterile sand covered with plastic lids. After five days, soybean seedlings (cotyledon stage) was used for pathogenicity test. Pathogenicity was done on fully expanded soybean cotyledons by dipping and spraying with suspension of the investigated isolates.

Wounded cotyledons were inoculated by spraying aqueous bacterial suspension (10^8 CFU/ml). The plants were incubated for 48h in the moisture chamber at 25°C, than transferred to the laboratory conditions and observed daily during 15 days.

During the experiments plants were watered regularly and wetted with hand sprayer. Check plants were sprayed with distilled water.

Physiological race determination

Reactions of differential soybean cultivars (Acme, Chippewa, Flambeau, Harosoy, Lindarin, Merit and Norchief) were used for race determination of *P. s. pv. glycinea* according to Cross et al. (1966). The strains were applied onto leaves (in stage of 1/3 -1/2 of fully developed leaf area) of differential cultivars on two ways: a) by rubbing leaves with a sterile cotton swab soaked in an aqueous suspension (Alvarez et al. 1995); b) by spraying leaves with chosen strains under the pressure (Cross et al., 1966; Balaž et al., 1990; Prom & Venette, 1997).

Begging 3 days after inoculation, plants were examined daily for five days and rated by the system of Cross et al. (1966), in wich leaves with water soaked lesions were considered susceptible and leaves with no hydrosis were designated resistant. Seven separate pathogenic races were distiguished by the reactions of the seven differential varieties (tab. 1).

RESULTS

Isolation of the bacterium

Three days after isolation the colonies on nutrient agar were circular, smooth, shiny and white. Ten isolates were chosen for further investigations (tab. 2). On the basis of this investigation using LOPAT test, it was concluded that all isolates belonged to a Ia fluorescent group.

Table 1 – Reaction of seven pathogenic races of *P. s. pv. glycinea* on differential soybean varieties (Cross et al. 1966)**Tabela 1** – Reakcija sedam patogenih rasa bakterije *P. s. pv. glycinea* na diferencijalnim sortama soje (Cross et al. 1966)

Race- Rasa No	Differential varieties – Diferencijalne sorte						
	Acme	Chippewa	Flambeau	Harosoy	Lindarin	Merit	Norchief
1	S	R	S	R	R	R	R
2	S	R	S	S	S	I	I
3	S	R	R	S	S	I	I
4	S	I	S	S	S	S	S
5	R	R	R	S	R	S	R
6	R	R	S	R	R	R	S
7	S	R	R	S	R	R	R

R-resistant (otporno), I-intermediate (intermedijarno), S-susceptible (osetljivo)

Table 2 – Bacterial strains obtained from soybean plants**Tabela 2** – Izolati bakterija sa različitih sorti soje

Isolate code Šifra izolata	Variety Sorta	Locality Lokalitet
B2/4	Balkan	Srbobran
B8/2	Balkan	Laćarak
B11/1	Balkan	Čalma
B13/2	Balkan	Begeč
S5/3	Sava	Tovariševo
R9/1	Ravnica	Njegoševo
R9/3	Ravnica	Bačka Topola
R10/6	Rita	Bačka Topola
P15/2	Proteinka	Bijeljina
R12/2	Rita	Subotica

There were no morphological, biochemical and physiological differences between the characters of investigated isolates with original description of *Pseudomonas fluorescens* group given by Lelliot et al. (1966) i Fahy & Hayward (1983).

Pathogenicity tests

Hypersensitive reaction (HR) on tobacco plants

Pathogenicity test on tobacco leaves showed that all tested isolates injected into tobacco leaves caused hypersensitive reaction after 24 h, as the consequence of incompatible between pathogen-host relationship. The rapid death of plant cells leading to necrosis of inoculated tissue with no appearance of usual water-soaked spots.

Pathogenicity on soybean plants

Pathogenicity test of investigated strains showed that all isolates caused greasy and individual spots in all applied method. The first symptoms appeared, three days after inoculation. Investigated strains show different virulence. Later tissue reaction was characteristic for R9/3 isolate inoculated (5 days after inoculation) pointing out to its lower pathogenicity. No differences were detected between isolates B2/5 and R12/2 in their pathogenicity.

Identification of physiological races of the pathogen

The investigated strains caused susceptible reactions in all inoculated soybean differential varieties. Appearance of characteristic water-soaked spots with yellow halo, was observed on plants inoculated by rubbing leaves, 3 days after inoculation (fig. 1).



Fig. 1 – Symptoms on leaves (Acme variety)
Sl. 1 – Simptomi na listovima (sorta Acme)

Symptoms on plants inoculated by spraying appeared after 48 to 72 h (fig. 2). Daily observation of symptoms show tendency of increasing number and size of spots on soybean plants. According to table 1. all investigated strains were compatible with the seven soybean cultivars and were designated race 4.

DISCUSSION

After spray inoculation, all investigated isolates caused typical bacterial blight symptoms (with yellow halo), which confirmed their pathogenicity. Appearance of hyper sensible reaction on tobacco leaves also pointed out to pathogenic characteristics of tested bacterial isolates. Klement (1963) mentioned that pathogenicity of obtained bacterial isolates can be most reliably checked on host plant, as well as on the basis of hypersensitive reaction of tobacco plants.

The susceptible reaction of different soybean cultivar showed that all investigated strains from Vojvodina province were race 4. These results was expected because Balaž et al. (1990) noted the dominance of *P. syringae* pv. *glycinea* race 4 in soybeans grown in Vojvodina province.

First data about investigation of physiological races of *P. s. pv. glycinea* strains, were obtained by Cross et al. (1966). Fett and Sequeira and Basu also reported the predominance of race 4 in Winsconsin, Iowa and eastern Ontario. Races 3 and 5 were found in limited numbers in North Dakota. AboMoch et al. (1995), loc. cit. Balaž & Vidić (2001)., concluded by testing population of bacterium *P. s. pv. glycinea* in Europe, (isolates collected in France, Germany, Hungary, Poland, Italy, Ukraine and former Yugoslavia) that race 4 was the most dominant. Prom and Venette (1997) testing 164 isolates originating from 170 most cultivated soybean from North Dakota pointed out that race 4 was prevalent (63%) in relation to other (race 6 – 22%; race 2 – 7%; race 3 – 0.3%, and race 5 – 0.1%). The pathogenicity of 199 isolates of *P. s. pv. glycinea* obtained from five provinces in China was studied on 7 soybean varieties, during 1990-94. Eight separate pathogenic races (1, 2, 4, 5, 9, 10, 11, 12) were distinguished by the reactions of the 7 different soybean varieties. Race 4 was also dominant (56%) in China (Gao Jie, 1998). According to Sinclair (1999), there are four dominant genes controlling resistance to *P. s. pv. glycinea* (Rpg1, Rpg2, Rpg3 and Rpg4). The resistance of soybean to this pathogen is also affected by a host of other factors within the plants, one being an increased production of ethylene that reduces the virulence of the bacterium.

Based on this findings, it can be concluded that the bacterial blight of soybean must be continuously monitored and studied in the future and that cultivars with reduced susceptibility to *P. s. pv. glycinea* should be developed in order to improve soybean production in this regard.

LITERATURE

- Abo-Moch F., Mavridis A., Rudolph K. (1995): Determination of races of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* occurring in Europe. *Journal of Phytopathology*, Vol. 143, No. 1. pp. 1-5.
- Alvarez E., Braun E. J., McGee D. C. (1995): New Assays for Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* in Soybean Seed. *Plant Diseases*, vol. 79, No.1.
- Arsenijević, M. (1997): *Bakterioze biljaka*. S print. Novi Sad.
- Balaž J., Arsenijević M., Vidić M. (1990): Bakteriološke karakteristike i fiziološke rase *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* (Coerper) Young, Dye et Wilkie parazita soje. *Zaštita bilja*, vol. 41 (4), br. 194: 423-429. Beograd.
- Balaž F., Tošić M., Balaž J. (1995): *Zaštita biljaka-bolesti ratarskih i povrtarskih biljaka*. Novi Sad.
- Balaž J., Vidić, M. (2001): Iznalaženje otpornijih genotipova soje prema dominantnim rasama *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*, 219-239. In: *Primena sistema gen za gen*. Ed. Bošković J., Bošković M. Veterinik.
- Cross J. E., Kennedy B. W., Lambert J. W., Cooper R. L. (1966): Pathogenic races of the bacterial blight pathogen of soybeans, *Pseudomonas glycinea*. *Plant Dis. Rep.* 50:557-560.
- Daft G.C., Leben C. (1972): Bacterial blight of soybeans: seedling infection during and after emergence. *Phytopathology*, 62 (10):1167-1170. View Abstract.
- Fahy P. C., Hayward A. C. (1983): *Media and Methods for Isolation and Diagnostic Test* (in: *Plant Bacterial Diseases. A Diagnostic Guide*. Ed. by Fahy, P. C., Persley, G. J.) Academic Press.
- Fett W. F., Sequeira L. (1981): Further characterization of the physiological races of *Pseudomonas glycinea*. *Can. J. Bot.* 59:283-287.
- Gao Jie (1998): Physiological specialization of the bacterial blight pathogen of soybeans *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. *Journal of Jiling Agricultural University* 20: 10-12.
- Klement, Z. (1963): Rapid detection of the pathogenicity of phytopathogenic *Pseudomonads*. *Nature*, 199-300.
- Klement Z., Rudolph K., Sands D. C. (1990): *Methods in Phytobacteriology*. Akademiai Kiado. Budapest.
- Lelliott, R. A., Billing, E., Hayward, A. C. (1966): A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic *Pseudomonads*. *Journal of Applied Bacteriology*, 29, 470-489.
- Lelliott R. A., Stead D. E. (1987): *Methods for the Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants*. British Society for Plant Pathology Blackwell Scientific Publications, Oxford, London. UK.

- Prom L. K., Venette J. R. (1997): Races of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* on commercial soybeans in eastern North Dakota. *Plant Disease* 81: 541-544.
- Schaad N. (1980): Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA.
- Sinclair, J. B. (1999): Bacterial Diseases, p. 5-10. In: Compendium of soybean diseases. Ed. Hartman, G. L., Sinclair, J. B., Rupe, J. C. APS Press. USA.
- Vidić M., Balaž J. (1997): Reakcija genotipova soje prema *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. *Zaštita bilja*, 220: 119-125, Beograd.

(Primljeno: 03.12.2008.)

(Prihvaćeno: 31.03.2009.)

IDENTIFIKACIJA RASA *PSEUDOMONAS SYRINGAE* PV. *GLYCINEA* NA KOMERCIJALNIM SORTAMA SOJE U SRBIJI

MAJA IGNJATOV¹, MILOŠ VIDIĆ¹, MIRJANA MILOŠEVIĆ², JELICA BALAŽ³,
PETROVIĆ DRAGANA¹, ZORICA NIKOLIĆ¹, MILKA VUJAKOVIĆ¹

¹Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad

²Ministrastvo poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede Republike Srbije, Beograd

³Poljoprivredni fakultet, Novi Sad

REZIME

Bakteriozna pegavost soje čiji je prouzrokovatelj *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* (Coerper) Young, u Srbiji se javlja redovno i to često u jakom intenzitetu. Izolacija patogena vršena je sa obolelih delova lista soje različitih sorti. Izolacije su vršene na podlogu od mesnog ekstrakta (MPA) i podlogu obogaćenu saharozom (NSA). Patogenost izolata je dokazana pozitivnom hipersenzitivnom reakcijom (HR) na duvanu. Provera patogenosti dobijenih izolata, kao i referentnog izolata ove bakterije (NCPPB 3318), dokazana je i inokulacijom mladih biljaka soje u fazi kotiledona (sorta Balkan), prskanjem i potapanjem u suspenziju bakterija.

Odgajivačke i biohemijsko-fiziološke odlike ispitane su standardnim bakteriološkim metodama.

Pripadnost dobijenih izolata fiziološkim rasama određena je korišćenjem diferencijalnog sortimenta soje: Acme, Chippewa, Flambeau, Harosoy, Lindarin, Merit i Norchief. Mlade biljke su inokulisane na dva načina: prskanjem pod pritiskom i povredom listova sušenom natopljenim suspenzijom bakterija. Zaključeno je da izolati bakterije *P. s. pv. glycinea*, sa soje u Vojvodini, pripadaju rasi 4.

Ključne reči: Soja, *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*, rase, identifikacija

(Received: 03.12.2008.)

(Accepted: 31.03.2009.)

Zaštita bilja
vol. 58 (1-4), No 259-262, 69-79, 2007, Beograd

UDK 632.35:634.1/.5]:632.95
Naučni rad

***SORBUS DOMESTICA* I *S. TORMINALIS* NOVI DOMAĆINI *ERWINIA AMYLOVORA* U SRBIJI**

VELJKO GAVRILOVIĆ¹, SVETLANA ŽIVKOVIĆ¹, ŽARKO IVANOVIĆ¹, MILIĆ VOJINOVIĆ²

¹Institu za zaštitu bilja i životnu sredinu, Beograd

²Agrorazvoj, Niš

U radu su prikazani rezultati proučavanja izolovanih sojeva bakterije iz plamenjačom zahvaćenih mladara ukrasnih biljaka *Sorbus domestica* i *Sorbus torminalis*. Proučavani sojevi su Gram negativni, ne stvaraju fluorescentni pigment na King-ovoj podlozi B, a glukozu metabolišu i oksidativno i fermentativno. Prouzrokuju HR duvana i nekrozu nesazrelih, inokulisanih plodova kruške (viljamova) praćenu obilnom produkcijom bakterijskog eksudata..

Prvi simptomi na inokulisanim mladrima biljaka domaćina u očavaju se posle 2-3 dana, ispoljavaju se u vidu vlažnih pega koje se vremenom šire zhatujući ga u celosti

Na osnovu patogenih, biohemijskih i seroloških odlika (ELISA) proučavanih izolata zaključeno je da patološke promene na ukrasnim biljkama *Sorbus domestica* i *Sorbus torminalis* prouzrokuje *Erwinia amylovora*. To je potvrđeno i primenom molekularne metode (PCR) korišćenjem specifičnog prajmera za bakteriju *E. amylovora*.

Ovo je prvi nalaz *E. amylovora* na ukrsnim biljkama roda *Sorbus* u Srbiji

Ključne reči: *Erwinia amylovora*, *Sorbus domestica*, *Sorbus torminalis*., patogenost, detekcija ELISA, PCR

UVOD

Erwinia amylovora (Burr)Winslow et al. Spada u najrasprostranjenije i ekonomski najznačajnije patogene jabučastih voćaka. Pri povoljnim ekološkim uslovima prouzrokuje sušenje cvetova i tek zametnutih plodova, plamenjaču mladara, nekrozu i sušenje višegodišnjih grana pa i čitavih stabala voćaka. Kao posledica njene pojave ponekad dolazi do krčenja čitavih zasada, što je poslednjih godina zabeleženo i u nas (Arsenijević i Gavrilović, 2007; Gavrilović et al., 2001a).

E. amylovora je u Srbiji najpre registrovana kao patogen kruške, dunje, mušmule i gloga početkom 90-ih godina prošlog veka (Panić i Arsenijević, 1996;

* Rezultat rada u okviru Projekta br. 20051, koji finansira Ministarstvo za nauku i tehnološki razvoj RS.

Jovanović, 1999). Međutim od sredine 90-ih godina *E. amylovora* je sve prisutnija i kao parazit ukrasnih biljaka porodice *Rosacea* koje se takođe ubrajaju u veoma osjetljive domaćine bakterije i čije gajenje ona ozbiljno može ugroziti (Arsenijević i Panić, 1996; Arsenijević et al., 2001; van der Zwet i Keil, 1979). Tako je ova bakterija najpre utvrđena kao parazit vatrenog trna (*Pyracantha coccinea* L.) (Gavrilović i Arsenijević, 1997).

Tokom 2000. godine, koja se odlikovala izuzetno povoljnim uslovima za razvoj i širenje bakterije, *E. amylovora* je eksperimentalno potvrđena u obolelim uzorcima polegle dunjarice (*Cotoneaster horizontalis* L.) i japanske dunje (*Chaenomeles japonica* L.) (Balaž et al., 2004a, 2004b).

U periodu 2005-2006 godine simptomi bakterijske plamenjače primećeni su na ukrasnoj biljci *Sorbus domestica* (fam. *Rosaceae*) na području Niša. U 2007. godini karakteristični simptomi bolesti su zapaženi na ukrasnoj biljci *Sorbus torminalis* i to u blizini zasada jabuke u kojem je zabeležen visok intenzitet pojave bakterijske plamenjače.

Cilj ovog rada je da se primenom laboratorijskih metoda utvrdi da li pomenute simptome bolesti na ukrasnim biljkama roda *Sorbus* prouzrokuje *E. amylovora* i u slučaju pozitivnog nalaza proučiti karakteristike izolovanih sojeva i uporediti ih sa odlikama izolata poreklom sa jabučastih voćaka.

MATERIJAL I METODE

Uzorci sa karakterističnim simptomima na mladima *Sorbus domestica* prikupljeni su u Nišu 2005 godine, a uzorci obolelih mladara *Sorbus torminalis* na području Požege 2007. godine. Biljni materijal je dopreman u Laboratoriju za fitopatologiju Instituta za zaštitu bilja i životnu sredinu, gde se pristupilo izolovanju patogena.

Izolovanje bakterija i dobijanje čistih kultura

Izolovanje bakterije je vršeno standardnim metodom razmaza na mesopeptonsku podlogu obogaćenu s 5 % saharoze (NAS) i King-ovoj podlozi B. Posle 2-3 dana razvoja pri 25°C pojedinačne kolonije bakterije su prihvatane na mesopeptonsku podlogu sa glicerolom (NAG) radi održavanja u kolekciji (Klement, 1990). Ukupno je prihvaćeno 12 izolata bakterije: 7 sa *S. domestica* i 5 poreklom sa *S. torminalis*.

Identifikovani sojevi *E. amylovora* (CFBP 1430 poreklom iz Nacionalne kolekcije fitopatogenih organizama Francuske i J-5 poreklom iz jabuke (Srbija)), korišćeni su kao kontrolni sojevi u ovim istraživanjima.

Provera patogenosti

Patogene odlike proučavanih sojeva su proverene veštačkim inokulacijama nesazrelih plodova kruške i infiltracijom lista duvana sa ciljem da se utvrdi da li dobijeni izolati prouzrokuju HR duvana. Mladi plodovi kruške inokulisani su metodom uboda pomoću bakteriološke igle prethodno uronjene u suspenziju bakterije koncentracije 10^7 cfu. Na njima je u naredna 2-3 dana praćena pojava nekroza i pojava kapi bakterijskog eksudata, što je karakterističan znak *E. amylovora*. Ovaj test se obavezno preporučuje pri detekciji ove bakterije (Lelliot i Stead, 1987; Arsenijević, 1997; Gavrilović, 1998).

Izolatima poreklom sa *S. domestica* inokulisani su i listovi i mladara biljke domaćina, takođe pomoću bakteriološke igle, ubodom u lisne peteljke i mladare, pri čemu je takođe korišćena suspenzija bakterija pomenute koncentracije.

Biohemijsko fiziološke

Proučene su biohemijsko fiziološke odlike značajne za identifikaciju *E. amylovora*: hidroliza želatina i eskulina, aktivnost oksidaze ; razvoj pri 34 i 36 °C i u podlozi sa 5 i 7% Na Cl i metabolizam ugljenih hidrata. (Sands, 1990; Mitrev, 1993; Gavrilović, 1998) (tab.1).

DAS – ELISA test

Za identifikaciju izolovanih sojeva bakterija korišćena je DAS – ELISA metoda (Hampton i sar., 1990), primenom komercijalnog antiseruma specifičnog za detekciju *E. amylovora* (Loewe Biochemica GmbH, Germany). Od čistih kultura bakterije, starosti 24 časa pripremljena je bakterijska suspenzija koncentracije 10^6 ćel/ml. Uzorci su pripremljeni zagrevanjem po 100 µl bakterijske suspenzije na 100°C 10 minuta i potom razređeni u odnosu 1:20 u odgovarajućem puferu. Intenzitet reakcije očitavan je spektrofotometrijski dva časa nakon dodavanja supstrata p-nitrofenilfosfata, merenjem apsorpcije na talasnoj dužini od 405 nm. Pozitivnom reakcijom su smatrane vrednosti apsorpcije dva i više puta veće od vrednosti apsorpcije negativne kontrole.

Lančana reakcija polimeraze (PCR)

U cilju potvrde identiteta izolovanih sojeva urađen je PCR izolovanih sojeva prema protokolu Bereswill i sar. (1992). Bakterijske kulture su gajene na KB podlozi tokom 24 časa, nakon čega je pripremljena suspenzija bakterija u koncentraciji 10^6 ćel/ml. Mikrotube sa bakterijskom suspenzijom su zagrevane na

95°C 10 minuta, a zatim su prebačene na led. PCR reakcija je izvedena sa A (5'-CGGTTTTTAACGCTGG-3') i B (5'-GGGCAAATACTCGGATT-3') prajmerima i prema protokolu koji su opisali Bereswill i sar. (1992). Elektroforetsko razdvajanje produkata amplifikacije urađeno je na 1.5 % agaroznom gelu.

REZULTATI

Simptomi bolesti

Početni simptomi bolesti se ispoljavaju u vidu plamenjače mladara i lišća *S. domestica*. Lišće postaje mrkocrvene a mladari mrko ljubičaste boje. (sl.1). Na višegodišnjim granama se uočava pucanje kore u graničnoj zoni obolelog i zdravog tkiva, što je praćeno obrazovanjem rana, što se manifestuje mrkosivom bojom obolelog tkiva (sl.2). Uklanjanjem površinskog sloja kore, jasno se uočavaju patološke promene na sprovodnim sudovima ispoljena u vidu mrke boje i vlažne konzistencije obolelog tkiva grana oskoruše.

Simptomi bolesti ispoljeni u vidu plamenjače mladara *S. torminalis* su uočeni polovinom juna, pri čemu nisu zapaženi simptomi na višegodišnjim granama i plodovima ove ukrasne biljke. Oboleli listovi su crne boje ne opadaju i ostaju pričvršćeni za mladare zahvaćene bolešću.

Izolacija patogena i provera patogenosti

Bledo sive kolonije, izrazito ispučene, sluzastog izgleda (levan tip) prečnika 2-3 mm, uočavaju se posle 2-3 dana razvoja na hranljivoj podlozi obogaćenoj saharozom (NAS). Bele kolonije, sjajne glatke, prečnika 1-1,5 mm formiraju se na King-ovoj podlozi B, na kojoj ne formiraju fluorescentni pigment.

Proučavani izolati poreklom sa *S. domestica* i *S. torminalis* prouzrokuju HR duvana i nekrozu inokulisanih, nesazrelih plodova kruške uz obilnu produkciju kapiljica bakterijskog eksudata, što je karakterističan znak infekcije *E. amylovora*.

Početni simptomi na veštački inokulisanim mladarima *S. domestica* uočavaju se posle 3 dana od inokulacije, a ispoljavaju se u vidu vlažnih pega, elipsastog oblika, koje se vremenom šire zahvatajući mladara u celosti. Mladar u potpunosti nekrotira posle 5-7 dana od inokulacije. Nekroze vremenom postaju mrkoljubičaste i identične su onim zapaženim pri prirodnim infekcijama. Inokulisane lisne drške nekrotiraju i zajedno sa lišćem venu i postaju mrke boje. Kontrolni sojevi CFBP 1430 i J-5 na inokulisanim mladarima prouzrokuju identične simptome.



Sl. 1 – Simptomi bakteriozne plamenjače na *Sorbus domestica*: Plamenjača i mrka boja lišća (a), karakteristične mrko ljubičaste nekroze na mladima (b) i rak rane na granama (c)

Fig. 1 – Fireblight symptoms on *Sorbus domestica*: leaves blight appeared as brown color (a), characteristic purple-brown necrosis on shoots (b) and canker on branch (c)

Tabela 1 – Biohemijske odlike proučavanih izolata
Table. 1 – Biochemical properties of investigated strains

Test Tests	Izolati – Isolates			
	<i>S. domestica</i>	<i>S. torminalis</i>	CFBP 1430 ^a	J-5 ^b
Levan -Levan Fluorescence	+ ^c	+	+	+
Fluorescentnost	– ^d	-	-	-
O/F test				
Aerobno – aerobic	+	+	+	+
Anaerobno-anaerobic	+	+	+	+
Aktivnost oksidaze				
Activity of oxidase	-	-	-	-
Hidroliza želatina				
Liquefaction of gelatin	+	+	+	+
Hidroliza eskulina				
Hydrolysis of aesculin	-			
Razvoj pri 5%NaCl				
Growth at %% Na Cl	+	+	+	+
Razvoj pri 7 % NaCl				
Growth at 7 % Na Cl	-	-	-	-
Razvoj pri 34°C				
Growth at 34 °C	+	+	+	+
Razvoj pri 36 °C				
Growth at 36 °C	-	-	-	-
Korišćenje: Utilization				
Glukoza – Glucose	+	+	+	+
Fruktoza – Fructose	+	+	+	+
Saharoza – Sucrose	+	+	+	+
Riboza – Ribose	+	+	+	+
Rafinoza – Rafinose	-	-	-	-
Melesitoza – Melesitose	-	-	-	-
Lactoza– Lactose	-	-	-	-
Maltoze– Maltoze	-	-	-	-
Manitol– Manitle	+	+	+	+
Sorbitol– Sorbitole	+	+	+	+
Dulcitol – Dulcitol	-	-	-	-

a kontrolni soj *E. Amylovora* – check strains of *E. amylovora*

b kontrolni soj *E. Amylovora* – check strains of *E. amylovora*

c pozitivan rezultat – positive result

d negativan rezultat – negative result

Bakteriološke odlike

Proučavani izolati su gramnegativni i ne stvaraju fluorescentni pigment na King-ovoj podlozi B; glukozu metabolišu i oksidativno i fermentativno, ne stvaraju oksidazu. Izolati se razvijaju pri 34°C i u podlozi s % 5 NaCl; negativan rezultat je zabeležen pri testovima razvoja u podlozi s 7 % NaCl i pri temperaturi od 36 °C; kiseline stvaraju iz glukoze, fruktoze, riboze, saharoze, trehaloze, galaktoze, sorbitola, manitola i glicerola; ne metabolišu inozitol, dulcitol, laktozu i maltozu, rafinozu i melezitozu (tab 1) .

ELISA i PCR

Primenom imunoenzijske metode na ploči utvrđeno je da proučavani izolati poreklom sa *S. domestica* i *S. torminalis* poseduju iste antigenske karakteristike kao i kontrolni sojevi CFBP 1430 i J-5 (*Erwinia amylovora*).

Kao rezultat lančane reakcije polimeraze (PCR), korišćenjem odgovarajućih prajmera, amplifikovani su fragmenti nukleinske kiseline odgovarajuće veličine od 900 baznih parova. Iste karakteristike ispoljavaju i kontrolni sojevi korišćeni u ovim istraživanjima.

DISKUSIJA

Erwinia amylovora je rasprostranjena u svim područjima u Srbiji, kako u onim sa intenzivnom voćarskom proizvodnjom, tako i u regionima gde voćstvo nije dominantna grana poljoprivrede, a prisutni su domaćini bakterije. To se pre svega odnosi na pojavu bakterijske plamenjače na stablima jabučastih voćaka na okućnicama kao i pojedinim stablima na nepoljoprivrednim površinama, utrinama, međama oko njiva i dr.. Ovo ukazuje da je *E. amylovora* široko rasprostranjena u Srbiji, što može biti jedan od razloga sve češćih epifitocija bakterijske plamenjače. Tako su masovne pojave ove bolesti zabeležene 2000 godine na svim vrstama jabučastih voćaka (Balaž et al, 2000), na dunji 2003. godine (Obradović, et al., 2003), na jabuci u okolini Čačka 2005. godine (Gavrilović, neobjavljeno) i tokom 2007 godine na jabuci (Gavrilović et al., 2007a). Štete koje bakterija nanosi zavise od osetljivosti biljke domaćina i sorte, meteoroloških uslova naročito tokom perioda cvetanja kada su voćke i ukrasne biljke i najosetljivije prema bakteriji. Poslednjih godina je sve uočljivija i pojava bakterijske plamenjače na ukrasnim biljkama fam. *Rosaceae* (Gavrilović i Arsenijević, 1997; Balaž et al., 2004; Gavrilović, et al., 2007 b).

Ovi podaci ukazuju na obilje inokuluma bakterije prisutnog u prirodi, tako da se može očekivati njeno dalje širenje i pojava na novim domaćinima. Upravo u ovim činjenicama treba tražiti uzroke sve masovnijeg širenja *E. amylovora* na ukrasnim biljkama domaćinima bakterije.

Tako su 2005. godine simptomi bakterijske plamenjače na ukrasnoj biljci *Sorbus domestica*, primećeni na okućnici u Nišu, a laboratorijskom analizom je dokazano prisustvo *E. amylovora* (Vojinović, 2006). S obzirom da simptomi bolesti nisu zapaženi na ostalim stablima jabučastih voćaka, pojava bolesti bi se mogla objasniti sadnjom zaraženih sadnica *S. domestica*.

Prisustvo *E. amylovora* je eksperimentalno potvrđeno 2007. godine na *S. torminalis* u okolini Požege, u neposrednoj blizini zasada jabuke u kome je zabeležen izuzetno visok intenzitet pojave bakterijske plamenjače. Pretpostavljamo da su ova obolela stabla jabuke predstavljala značajan izvor inokuluma za ostvarenje infekcije *S. torminalis*.

Izolati poreklom sa ukrasnih biljaka roda *Sorbus* se u pogledu patogenih i bohemijskih odlika ne razlikuju od kontrolnih sojeva J-5 i CFBP 1430, što potvrđuje ranije dobijene rezultate o homogenosti populacije *E. amylovora* u Srbiji (Gavrilović, 1998; Gavrilović et al., 2001b). Homogenost je potvrđena i primenom PCR metoda, primenjenog po standardnoj proceduri (Bereswill et al., 1992; Gavrilović et al., 2008).

Ipak, daljem proučavanju izolata *E. amylovora* se mora posvetiti dalja pažnja jer su u nekim područjima u svetu izolovani sojevi koji se u genetskom pogledu značajno razlikuju od do sada proučavanih. To se pre svega odnosi u one koji sadrže novi tip plazmida, označenog kao PI170, koji je utvrđen u populaciji bakterije u nekim evropskim zemljama (Llop et al., 2008). Potencijalno prisutna heterogenost populacije *E. amylovora* možda je uslovlila njenu masovniju pojavu na novim domaćinima (Rossello et al., 2008).

Pojava *E. amylovora* na ukrasnim biljkama fam. *Rosaceae* ima i naučni i praktični značaj. Širenjem ukrasnih biljaka domaćina bakterije, postoje uslovi za dalje rasprostranjenje *E. amylovora*. One, ukoliko su obbolele predstavljaju značajan izvor inokuluma za ostvarenje infekcija jabučastih voćaka kako u zasadima, tako i na pojedinačnim stablimaa, što sve doprinosi održavanju bakterije u prirodi i povećanju inokulacionog potencijala.

Stoga je neophodno posvetiti veću pažnju prilikom uvoza ukrasnih biljaka domaćina *E. amylovora*, ali i sprovesti rigorozniju kontrolu rasadnika koji se bave njihovom proizvodnjom.

U cilju suzbijanja obolelih ukrasnih biljaka za preporuku je uklanjanje obolelih biljnih delova, a u slučaju jače zaraze krčenje čitavih biljaka. Ne raspolazemo podacima o efikasnosti i ekonomskoj opravdanosti primene baktericida u ove svrhe. S obzirom da se ukrasne biljke ne koriste u ishrani stanovništva, možda bi

primena antibiotika dala značajne rezultate u sprečavanju pojave bolesti u registrovanim rasadnicima, čime bi se doprinelo i sprečavanju širenja bakterije. Ali, tada treba imati u vidu opasnost od pojave rezistentnih sojeva *E. amylovora*, koja se može pojaviti u slučaju nekontrolisane primene antibiotika.

LITERATURA

- Arsenijević, M., Jovanović, G., Gavrilović, V. 2001. Occurrence and spread of fire blight pathogen (*Erwinia amylovora*) on spontaneous and ornamental plants in Yugoslavia. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*. 36: 55-59.
- Balaž, J., Knežević, T., Smiljanić, A., Stojšin V. (2004a). *Chaenomeles japonica* and *Cotoneaster horisontalis*, new hosts of *Erwinia amylovora* in Serbia. 10th International Workshop on Fire Blight, Bologna, 5-9 July, 2004, Book of Abstracts pp.22.
- Balaž, J., Smiljanić, A. (2004b): *Chaenomeles japonica* i *Cotoneaster horisontalis* novi domaćini *Erwinia amylovora* u Srbiji. *Zaštita bilja*, 247-250: 87-96.
- Bereswill, S., Pahl, A., Bellemann, P., Zeller, W. and Geider, K. 1992. Sensitive and species-specific detection of *Erwinia amylovora* by polymerase chain reaction analyses. *Applied and Environmental Microbiology*, 58: 3522-3526.
- Hampton, R., Ball, E., de Boer, S. (1990): Serological methods for detection and identifications of viral and bacterial pathogens, a laboratory manual. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA, 1990.
- Gavrilović, V., Arsenijević, M. (1998): Vatretni trn – novi domaćin bakterije *Erwinia amylovora* za našu zemlju. *Biljni lekar* 1: 52-55, Novi Sad.
- Gavrilović, V., Arsenijević, M., Panić, M., Jovanović, Gordana (2001a): Rasprostranjenost *Erwinia amylovora* u SR Jugoslaviji i mere suzbijanja. *Zaštita bilja*, 237:141-158.
- Gavrilović, V., Jovanović, G., Arsenijević, M. (2001b): Characterization of Yugoslavian *Erwinia amylovora* Isolates Originating from apple Trees Comparing with other Strains of the Pathogen. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica* 36 (1-2) : 49-54.
- Gavrilović, V., Obradović, A., Milijašević, S., Arsenijević, M., Vojinović, M. (2007b): *Sorbus* spp. – a new host of *Erwinia amylovora* in Serbia. 11th International Workshop on Fire Blight, Portland, USA, 12-17 august 2007. Book of abstract : pp 69.
- Gavrilović, V., Arsenijević, M., Živković, S., Vojinović, M., (2007a): Epifitotična pojava bakterijske plamenjače na plodovima jabuke u toku 2007. godine. XIII Simpozijum sa savetovanjem o zaštiti bilja. Zlatibor, 26-30. 11. 2007 godine. Zbornik rezimea, 45-46.

- Gavrilović, V., Milijašević, Svetlana., Todorović, Biljana, Živković, Svetlana, Trkulja, N. (2008): *Erwinia amylovora*-prouzrokovatelj nekroze korenovog vrata stabla jabuke. Pesticidi i fitomedicina, 23: 17-23.
- Jovanović Gordana (1999): Rasprostranjenost, značaj i biljke domaćini bakterije *Erwinia amylovora* na teritoriji južne Srbije. Zaštita bilja 228: 115-149, Beograd
- Klement, Z. (1990): Inoculation plant tissues. Canker and dieback disease. In: Methods in Phytobacteriology. Klement, Z., Rudolph, K., Sands, D. (eds). Akademiai Kiado, Budapest, pp. 105-106.
- Lelliott, R.A., Stead, D.E. (1987): Methods for the diagnosis of bacterial disease of plants. British Society for Plant Pathology. Blackwell Scientific Publications. Oxford, London, Edinburgh. pp. 200
- Llop, P., Gonzales, R., Pulawska, Joanna, Bultrejs, A., Cabrefiga, J. Lopez, M. Maria (2008) The new plasmid pE170 is present in *E. amylovora* European strains. Acta Horticulturae, 793:
- Mitrev, V. (1993): Proučavanje bakterije *Erwinia amylovora* (Burrill 1882) Winslow et al. 1920 kao parazita voćaka u Makedoniji. Magistarska teza. Poljoprivredni fakultet, Novi Sad, pp. 1-77
- Obradović, A., Vučinić Zora, Gavrilović, V (2003): Epifitotična pojava bakterijske plamenjače dunje u Srbiji i Crnoj Gori. VI savetovanje o zaštiti bilja, Zlatibor, 24-28. Novembra 2003. godine. Društvo za zaštitu bilja Srbije. Zbornik rezimea (48): 84
- Panić, M., Arsenijević, M. (1996): Bakterijska plamenjača voćaka i ukrasnih biljaka – *Erwinia amylovora*-. Monografska studija. Zajednica za voće i povrće Beograd D.D i Poljoprivredni fakultet, Novi Sad. S-Print, Novi Sad, pp. 419.
- Rosello, M., Ferrer, S., Llop, P., Lopez, M. M., Christen, R., Gardan, L., (2008): Description of *Erwinia amylovora* sp. nov., casual Agent of Pear Blossom Necrosis. Proceedings of the eleventh International Workshop on Fire Blight, Acta Horticulture 793, 137-141.
- Sands, D.C. (1990): Physiological criteria determinative tests. In: Methods in Phytobacteriology. eds. Klement, Z., Rudolph, K., Sands, D. Akademiai Kiado, Budapest, pp. 134-143.
- Vojinović, M. (2006): domaćini i rasprostranjenost *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al. u nišavskom okrugu. Magistrska teza. Poljoprivredni fakultet, Priština (Lešak)
- Zwet, T. van der Keil, H.L. (1979): Fire Blight – A Bacterial Disease of Rosaceous plants. U.S. Department of Agriculture, Agriculture Handbook 510, Washington, D.C., pp. 200.

(Primljeno: 19.03.2009.)

(Prihvaćeno: 31.03.2009.)

***SORBUS DOMESTICA* AND *S. TORMINALIS* – NEW HOSTS OF
ERWINIA AMYLOVORA IN SERBIA**

VELJKO GAVRILOVIĆ¹, SVETLANA ŽIVKOVIĆ¹, ŽARKO IVANOVIĆ¹ MILIĆ VOJINOVIĆ²

¹Institute for Plant Protection and Environment, Belgrade

²Agriculture Center, Niš, Serbia

SUMMARY

Fireblight symptoms were observed on ornamental plants *Sorbus domestica* (region of Niš, 2005) and *S. torminalis* (Požega, 2007). Symptoms appeared as leaves and shoots blight followed with cancer forming on branches of *S. domestica* and shoot blight on *S. torminalis*. Levan type single colony were collected after three days growth on nutrient agar enriched with sucrose (SNA). Investigated strains produced HR in tobacco and necrosis of artificially inoculated unripened pear fruits followed by oozing of bacterial exudate. Symptoms similar to those registered in natural infections, were recorded on artificial inoculated *S. domestica* leaves and shoots. Based on the results of pathogenicity tests, biochemical characteristics, ELISA test and PCR analysis it was confirmed that the investigated strains belonged to *E. amylovora*, widespread pathogen of pome fruit trees and ornamental plants in Serbia. This is the first report of *E. amylovora* as pathogen of *Sorbus* plant in Serbia.

Key words: *Sorbus domestica*, *Sorbus torminalis*, *Erwinia amylovora*, pathogenicity, detection, ELISA, PCR

(Received: 19.03.2009.)

(Accepted: 31.03.2009.)

Zaštita bilja
vol. 59 (1-4), No 263-266, 81-92, 2008, Beograd

UDK 634.8.05:632.38](497.11)
Naučni rad

VIRUSI UVIJENOSTI LIŠĆA VINOVE LOZE U CENTRALNOJ SRBIJI

MIRA STAROVIĆ, SLOBODAN KUZMANOVIĆ, ŽARKO IVANOVIĆ, NENAD TRKULJA,
GORAN ALEKSIĆ, NENAD DOLOVAC, SAŠA STOJANOVIĆ
Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu

Uvijenost lišća vinove loze (Grapevine Leafroll Disease = GLD) je najznačajnije virusno oboljenje vinove loze. Do danas je u svetu utvrđeno ukupno devet različitih izduženih čestica, nazvanih "grapevine leafroll-associated viruses" (GLRaV-1-9), u biljkama obolelim od uvijenosti lista. U pet značajnijih vinogorja u Srbiji u periodu od 2002 do 2007 godine testirano je ukupno 18 sorti vinove loze na prisustvo GLRaV1,2,3,5 i 7 primenom ELISA testa. U Srbiji je identifikovano prisustva tri soja, i to GLRaV-1,2 i 3, GLRaV-1, je dokazan u svih pet ispitivanih vinogorja, a GLRaV-3, nije konstatovan samo u Trsteničkom vinogorju. U ispitivanim vinogorjima u Srbiji, najmanje je zastupljen GLRaV-2. Sve sorte kod kojih je bilo dokazano prisustvo GLRaVs bile zaražene u svim slučajevima GLRaV-3.

Ključne reči: vinova loza, GLRaVs, ELISA test

UVOD

Vinova loza je domaćin velikog broja virusa. Do sada je sa vinove loze izolovano i okarakterisano ukupno 58 vrsta virusa. Virusne bolesti vinove loze su grupisane u tri celine: (1) degeneracija vinove loze uzrokovana "fenlife" nepovirusima, drugim Evropskim nepovirusima i Američkim nepovirusima, (2) sindrom uvijenosti lišća i (3) sindrom plutavosti kore vinove loze (Martelli and Boudon-Padieu, 2006).

Od navedenih virusnih bolesti, sindrom virusa uvijenosti lišća je najrasprostranjeniji širom sveta, u svim značajnijim vinogradarskim regionima. Uvijenost lišća vinove loze (Grapevine Leafroll Disease = GLD) je najznačajnije virusno oboljenje vinove loze. Ova bolest može napasti sve *Vitis vinifera* sorte, hibride i

* Rezultat rada u okviru Projekta br. 20051, koji finansira Ministarstvo za nauku i tehnološki razvoj RS.

podloge, opisana je prvi put u Evropi početkom 19 veka, po podacima Goheen-a (1970), 1979 godine utvrđeno je prisustvo specifičnog tipa virusnih čestica (closterovirus) u oboleloj lozi, a 1983 godine su otkrivene vaši prenosioci, vektori nekih virusa iz ove grupe (Martelli, 2003, Martelli and Boudon-Padieu, 2006). Sve do dokazivanja prenošenja kalemljenjem, koji je prvi uspešno primenio Sheu (1935) etiologija ovog virusa je bila pod sumnjom. Nekoliko tipova virusnih čestica bilo je izolovano iz loze obolele od uvijenosti lišća, uključujući potyvirusne čestice, izometrijske (Castellano, 1983, Namba et al., 1979) i klosterovirusne veličine od 1,400 to 2,200 nm, koje su bile najčeće (Faoro et al., 1981, Castellano, 1983, Gugerli et al., 1984 Zee 1987, Zimmermann 1990).

Do danas je utvrđeno devet različitih izduženih čestica, nazvanih "grapevine leafroll-associated viruses" (GLRaV-1-9), u biljkama obolelim od uvijenosti lista. Svi GLRaVs pripadaju familiji Closteriviridae, GLRaV-2 rodu Closterovirus, a GLRaV-1, 3, 4, 5, 6, 8 i 9 novoutvrđenom rodu Ampelovirus, dok GLRaV-7 trenutno nije svrstan. Rosciglione and Gugerli (1986) prvi pominju sojeve GLRaV-1, 2 i 3, Hu et al., (1990) GLRaV-4, Walter and Zimmermann (1991) GLRaV-5, Boscia et al., (1995) GLRaV-6, Choueiri et al., (1996) GLRaV-7, Monis (2000) GLRaV-8, Cornuet et al., (2003) GLRaV-10, koji je kasnije identifikovan kao molekularni varijetet GLRaV-4 i Alkowni et al., (2004) GLRaV-9.

Virusne čestice GLRaVs su izduženog oblika (filamentozne), dužina varira od 1400 do 2200nm, a širina oko 12nm, u zavisnosti od virusa.

GLRaVs se prenosi kalemljenjem, reproduktivnim materijalom (kalemokca, podloge) kojim se inače obavlja prenošenje ovog virusa na velike distance i vektorima. Do sada su poznati i identifikovani vektori samo za GLRaV-1, 3, 5 i 9. U prirodi se GLRaV-1 prenosi *Pseudococcid mealybugs*, *Heliococcus bohemicus* i *Pahenaecoccus aceris*, kao i u manjoj meri insekt *Pulvinaria vitis*, *Parthenolecanium corni* i *Neopulvinaria innumerabilis*. Vektori GLRaV-3 su *Planococcus ficus*, *Pl. citri*, i *Pseudococcus longispinus* (Martelli and Boudon-Padieu, 2006).

GLD je kompleksno oboljenje, a zavisnost simptoma od sorte, okoline i vremenskog perioda je vrlo visoka, pa je teško identifikovati ovu bolest isključivo na osnovu vizuelne ocene. U načelu, simptomi su ozbiljniji na obojenim sortama vinove loze. Zaražena loza ne ispoljava tipične simptome krajem jula ili početkom avgusta meseca. Jedna od ranih vizuelnih signala prisustva GLD na obojenim sortama loze su pojave tipičnog uvijanja liske na naličje i crvene i purpurno crvene obojenosti međunervalnog prostora starijeg lišća bližeg bažalnom deli biljke. Kako vegetacija odmiče simptomi se šire na vršne listove, pa lisno međunervalno crvenilo postaje opšti simptom biljke, dok lisno tkivo neposredno oko lisnog nerva, kao i lisni nerv ostaje zelen (Rayapati et al., 2008). Simptomi na belim sortama ispoljavaju se različito. Na nekim sortama, kao što

je Chardone, inficirano lišće može ispoljiti opšte žućenje ili hlorozno šarenilo pri kraju vegetacije i u nekim slučajevima lisna ivica može biti uvijena ka naličju. Neke bele sorte ne moraju ispoljavati nikakve simptome (Rayapati et al., 2008), kao i neke inficirane podloge. U tim slučajevima, bolest se može dijagnostifikovati na drvenastim indikatorima kalemljenjem.

U vrlo tesnoj sprezi sa opisanim simptomima su i štete koje nastaju usled prisustva ovih virusa. U prvom redu, kvalitet zrna vinove loze je ugrožen, jer lisna diskoloracija direktno utiče na smanjenje karbohidrata i šećera u njima. Siromašnija ishrana lastara dovodi do ranijeg kratanja u sledećoj vegetaciji, što direktno utiče na smanjenje broja i veličine zrna i odlaganje sazrevanja za 3-4 nedelje (Rayapati et al. 2008). Ovako nedozrela zrna, sa manjim procentom šećera daju nekvalitetnija vina. Velike štete od ovi virusi nanose i rasadničkoj proizvodnji, jer zaraženi material ne može biti polazni material u umnožavanju.

Sveobuhvatna analiza prisustva različitih sojeva GLRaV na teritoriji Srbije, do sada nije radjena. Prvi nalaz prisustva GLRaV na našim prostorima dao je Dimitrijević (1970). U domaćoj literaturi postoje podaci o prisustvu virusa vinove loze u zasadima, kao i primeni biotesta i ELISA testa u dokazivanju ovih virusa (Kuzmanović i Gavran, 1988, 1989, 1992; Delibašić, 1991; Kuzmanović, 1995; Delibašić i sar., 2000; Kuzmanović i sar., 2002, 2003, Starović i sar., 2007), o prisustvu virusa vinove loze u prporištima (Paunović i sar., 2007), ali i o utvrđivanju novih virusa na vinovoj lozi, kao što je virus žbunaste kržljivosti maline na vinovoj lozi (Jevremović i Paunović, 2007). Za sada ostaju usamljeni primeri Dimitrijevića (1970) i Delibašića i sar. (1992) o proučavanju GLRaV. Problematici proučavanja ovog virusa, nije posvećena adekvatna pažnja u Srbiji, utoliko više što je u našem okruženju postoje podaci o sanitarnom statusu vinove loze (Martelli and Boudon-Padieu, 2006). Cilj ovog rada je bio da se, u prvom redu, utvrdi koji sojevi GLRaV su prisutni na teritoriji Srbije, kakva je njihova rasprostranjenost po vinogorjima, i da li postoji pravilnost njihove rasprostranjenosti. U ovom radu predstavljeni su rezultati istraživanja prisustva virusa uvijenosti lišća vinove loze u 5 vinogorja u Srbiji u periodu 2002 – 2007 godine.

MATERIJAL I METOD RADA

Materijal

Tokom avgusta meseca 2002, 2005, 2006 i 2007 godine vršeno je uzorkovanje biljnog materijala za serološke analize u pet vinogorja u Srbiji: Župskom, Trsteničkom, Venčačkom, Podgorskom i Rajačkom. Biljni material uzorkovan je sa 18 sorti vinove loze koje su najzastupljenije u ispitivanim lokalitetima: ka-

darka, plovčina, prokupač, smederevka, župski bojadiser, bagrina, otelo, tamnjanka bela, začinak, game bojadiser, rajnski rizling, zimsko belo, italijanski rizling, jagodinka, beli burgundac, frankovka, vranac i zametna crnina.

U ispitivanim vinogorjima pregledano je po 10 do 12 vinograda i uzorkovano je lišće koje je ispoljavalo prisustvo simptoma tipičnih za virus uvijenosti lišća vinove loze. Uzorci su spakovani u plastične kese, obeleženi i u ručnom frižideru transportovani u laboratoriju.

ELISA test

Za serološku analizu (ELISA test) korišćene su lisne peteljke (Giorgio and Gribaudo, 2006). ELISA test je obavljen po metodi Clark and Adams (1977), koja je već ranije detaljno opisana (Ivanović i sar., 2006). Uzorci su testirani DAS (GLRaV1, 3, 5 i 7) i TAS (GLRaV2) ELISA metodom, primenom poliklonskih komercijalnih antiseruma (Sediag).

REZULTATI

SIMPTOMI

Četvorogodišnje praćenje simptoma u odabranih pet vinogorja Srbije potvrdila su navedene tvrdnje inostranih autora o uticaju sorte, ali i doba godine na ispoljavanje simptoma. Pojava simptoma u vidu promene oblika, prvo, donjih, najstarijih listova, uvijanjem na naličje (slika 1), se u našem geografskom području manifestuje tokom avgusta meseca. Ovu promenu prati, prvo blaga, a kasnije intenzivna promena boje. Kod crvenih i crnih sorti pojavljuje se prvo blago crvenjenje međunervanlnog prostora, da bi kasnije ovo crvenilo postalo vrlo intenzivno (slika 2). Bele sorte vinove loze na prisustvo ovih virusa reaguju pojavom blage hloroze lisnog tkiva, koje prelazi u intenzivno prevremeno žućenje (slika 3). Osnovna dijagnostička razlika u tipu simptoma koje izazivanju fitoplazme vinove loze odnosi se na boju lisnih nerava. Lisni nervi biljaka obolelih od GLRVs ostaju zeleni (slika 4), za razliku od fitoplazmoznih koji obavezno požute.

Rezultati ELISA testa

U testiranim uzorcima vinove loze nije dokazano prisustvo GLRaV 5 i 7. Rezultati ELISA testa na prisustvo GLRaV1,2 i 3 u uzorcima vinove loze u pet važnijih vinogorja u Srbiji tokom 2002; 2005; 2006 i 2007 godine prikazani su u tabeli 1 i slici 5. Iz tabele jasno se može zaključiti da je najmanje zastupljen GLRaV-2 u ispitivanim vinogorjima Srbije. Prisustvo ovog soja dokazano je samo



Sl. 1-4 – Simptomi GLRVs. Uvijenost liske ka naličju (Sl. 1), crvenilo međunervanlnog prostora liske (Sl. 2), blaga hloroza lisnog tkiva kod belih sorata (Sl. 3), Zeleni lisni nervi lišća obolelih biljaka (Sl. 4).

Fig. 1-4 – Symptoms of GLRVs. Banding of leaves (Fig. 1), reddnes of leaves between the vains (Fig. 2), chlorosis of leaves of white cvs (Sl. 3), the green vains of diseased leaves (Sl. 4).

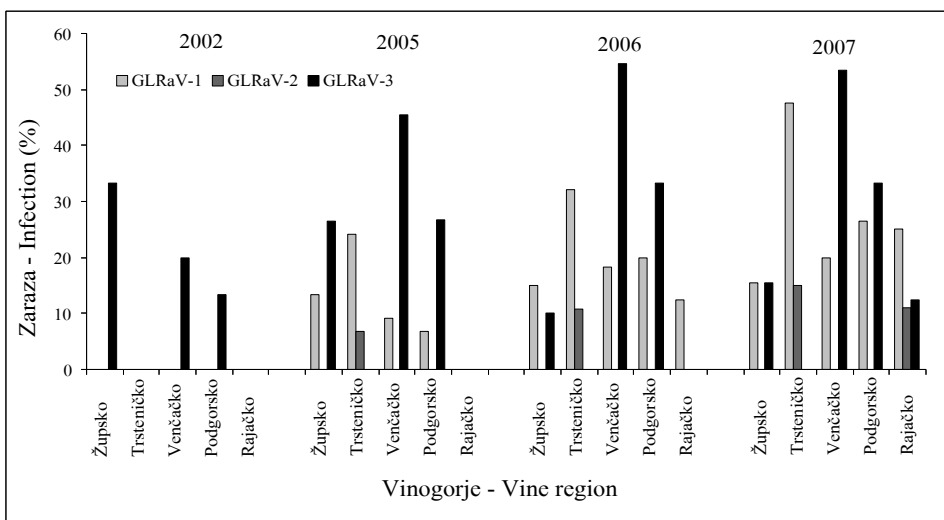
u Trsteničkom i Rajačkom vinogorju, dok u Župskom, Venčačkom i Podgorskom nije dokazano njegovo prisustvo. GLRaV-1 i 3 su daleko raspostranjeniji u vinogorjima Srbije. Prisustvo GLRaV-1, je dokazano u svih pet ispitivanih vinogorja. Prisustvo GLRaV-3, jedino nije konstatovano u Trsteničkom vinogorju.

Rezultati procentualnog prisustvo ispitivanih sojeva GLRaV– 1, 2 i 3, po vinogorjima i godinama prikazani su u grafikonu 1. Tokom 2002 godine, nije bilo dokazano prisustvo ni jednog od isptivana tri soja GLRaVs u Trsteničkom

Tabela 1 – Rezultati ELISA testa na prisustvo GLRaV-1, 2 i 3 uzoraka vinove loze u 5 ispitivanih vinogorja Srbije tokom 2002, 2005, 2006 i 2007 godine

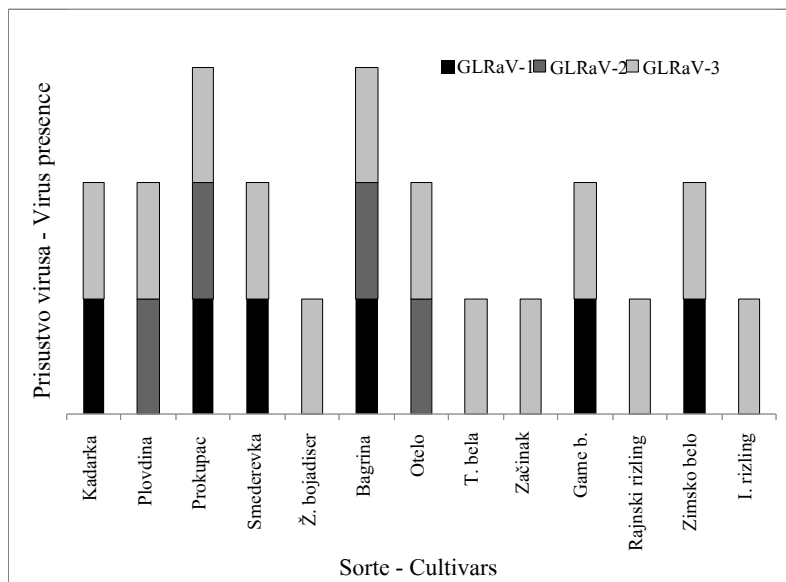
Table 1 – Results of ELISA detections GLRaV-1, 2 and 3 in grapevine samples from the 5 investigated regions in Serbia during 2002, 2005, 2006 and 2007

Vinogorje/ Region	Virusi/Viruses											
	GLRaV-1				GLRaV-2				GLRaV-3			
	2002	2005	2006	2007	2002	2005	2006	2007	2002	2005	2006	2007
Župsko	3/18	2/15	3/20	2/13	0/18	0/15	0/20	0/13	6/18	4/15	2/20	2/13
Trsteničko	0	7/29	9/28	10/21	0	2/29	3/28	3/20	0	0/29	0	0
Venčačko	0	1/11	2/11	3/15	0	0/11	0	0	3/15	5/11	6/11	8/15
Podgorsko	0	1/15	3/15	4/15	0	0/15	0	0	2/15	4/15	5/15	5/15
Rajačko	0	0	1/8	2/8	0	0	0	2/8	0	0	0	1/8



Graf. 1 – Zastupljenost i rasprostranjenost GLRaV-1,2 i 3 u 5 ispitivanih vinogorja Srbije tokom 2002, 2005, 2006 i 2007. godine

Graph. 1 – Presence and spread GLRaV-1,2 and 3 in the 5 investigated regions in Serbia during 2002, 2005, 2006 and 2007



Graf. 2 – Prisustvo GLRaV-1,2 i 3 na različitim sortama vinove loze u Srbiji u periodu 2002 i 2005-2007. godina

Graph. 2 – Presence of GLRaV-1,2 and 3 in the different grapevine variety in Serbia in 2002 and 2005-2007.

i Rajačkom vinogorju, dok je preostala tri vinogorja utvrđeno prisustvo samo GLRaV-3. U 2005 godini u Rajačkom vinogorju nije konstatovano prisustvo ispitivanih virusa, u sva preostala četiri vinogorja dokazano je prisustvo GLRaV-1, GLRaV-3 u Župskom Venčačkom i Podgorskom, a GLRaV-2 samo u Trsteničkom vinogorju. Rezultati testiranja u 2006 godini ukazuju da je prisustvo virusa bilo identično kao i 2005, stim što je u Rajačkom vinogorju utvrđeno prisustvo i GLRaV-1. Tokom 2007 godine u Rajačkom lokalitetu dokazano je prisustvo sva tri soja GLRaV, GLRaV-1 i 3 u Župskom, Venčačkom i Podgorskom, dok su u Trsteničkom kao i prethodne dve godine zastupljeni GLRaV-1 i 2.

Prisustvo GLRaV-1, 2 i 3 na različitim sortama vinove loze u Srbiji prikazano je u grafikonu 2. Analiza prisustva virusa obuhvatila je uzorak od ukupno 18 različitih sorti vinove loze. beli burgundac, frankovka, jagodina, vranac i zametna crnina su sorte kod kojih nije dokazano prisustvo ispitivanih sojeva GLRaVs. U najvećem broju slučajeva ispitivane sorte su bile zaražene samo GLRaV-3 sojem (župski bojadiser, tamnjanika bela, začinak i italijanski rizling), dok su četiri sorte domaćini GLRaV-1 i 3 (kadarka, smederevka, game bojadiser i zimsko belo), a dve su bile zaražene sa sva tri ispitivana soja (prokupac i bagrina). Interesanto je

istaći i podatak da su sve sorte kod kojih je bilo dokazano prisustvo GLRaVs bile zaražene u svim slučajevima GLRaV-3.

DISKUSIJA

Prikazani rezultati ukazuju na podatak da je u Srbiji prisutno od ukupno devet samo tri soja GLRaV. Ovaj rezultat je u skladu sa već poznatim činjenicama o prisustvu ovih virusa u zemljama našeg okruženja, a u kojima je poznat zdravstveni status vinove loze (Martelli, 2003, Pourrahim et al., 2004, Martelli and Boudon-Padieu 2006.), a koji ukazuju na činjenicu da je u zemljama južnije od Mediterana, od svih GLRaVs, najzastupljeniji GLRaV-3, dok je severnije prisutniji GLRaV-1.

Rezultati testiranja vinove loze i važnijim vinogorjima u Srbiji koja su obavljena u periodu 2002 do 2007 godina potvrđuju napred navedene tvrdnje, pa je tako dokazano prisustvo GLRaV-3 u svim ispitivanim vinogorjima, sem u Trsteničkom.

Martelli and Boudon-Padieu (2006) ističu činjenicu da je severnije od Mediterana zastupljeniji GLRaV-1, Tomažič i sar. (2005, 2008) da su u Sloveniji prisutni GLRaV-1 i 2, a Saldarelli et al., (2005) o prisustvu GLRaV-1 u Škotskoj. Imajući u vidu geografski položaj Srbije, navedeni rezultati su u skladu sa dobijenim rezultatima o prisustvu tri soja GLRaV u Srbiji. Interesantna je činjenica da je u Srbiji najmanje prisutan soj 2 GLRaV. Njegovo prisustvo nije dokazano čak u tri vinogorja. Tumačenje uzroka njegovog odsustva, baš u ta tri lokaliteta, vrlo je teško, obzirom, da njegov vektor nije poznat. Slično stanje zaraženosti vinove loze u Hrvatskoj navode Poljuha i saradnici, (2004) Rasprostranjenost GLRaV– 1 i 3, verovatno je u skladu sa rasprostranjenošću i brojnošću njihovih vektora, što, na žalost nije bio predmet ovih istraživanja.

Interesanto bi bilo raspolagati podacima o prisustvu ovih virusa u severnijim vinogorjima u Srbiji, što će sigurno i biti predmet budućih istraživanja.

LITERATURA

- Alkowni, R., Rowhani, A., Daubert, S., Golino, D.A. (2004): Partial characteriozation of a new ampelovirus associated with grapevine leafroll disease. *Journal of Plant Pathology*, 86, 123-133.
- Boscia, D., Greif, C., Gugerli, Pl, Martelli, G.P., Walter, B., Gonsalves, D. (1995): Nomenclature of Grapevine Leafroll-associated Putative Closteroviruses. *Vitis*, 34:171-175.
- Castellano, M.A., Martelli, G.P., Savino, V. (1983): Virus-like particles and ultrastructural modifications in the phloem of leafroll-affected grapevines. *Vitis*, 22:23-39.
- Choueiri, E., Boscia, D., Digiario, M., Castellano, M.A., Martelli, G.P. (1996): Some properties of a hithertounderscribed filamentous virus of the grapevine. *Vitis*, 35: 91-93.
- Clark, R.G., Adams, A.N. (1977): Characteristics of the Microplate Method of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Plant Viruses. *J. Of Gen. Virol.*, 34: 475-483.
- Cornuet, P., Andret, P., Vigne, E., Fuchs, M. (2003): Identification and characterization of a tentative new ampelovirus specifically associated to grapevine leafroll. *Extended Abstracts 14th Meeting of ICVG, Locorotondo*, 34.
- Delibašić, G. (1991): Proučavanje pojave i rasporstranjenosti virusa vinove loze u rejonu Kraljeva i pogodnost nekih metoda njihovog otkrivanja. Magistarski rad. Poljoprivredni fakultet, Beograd-Zemun, 1-71.
- Delibašić, G., Babović, M., Jakovljević, D. (2000): The appearance and distribution of grapevine fanleaf virus and arabis mosaic virus in Yugoslavia, p 72-73. In R.H. Symons (ed), *Extended abstracts 13th Meeting ICVG, Adelaide, Australia*, 12-17 March 2000. University of Adelaide, Australia.
- Delibašić, G., Petrović, D., Babović, M. (1992): Ispitivanje molekulske težine protein-skog omotača virusa lepezavosti lišća vinove loze primenom polinomijalne regresije. IX simpozijum o zaštiti bilja, Vrnjačka Banja, 1-5.12.1992. Zbornik rezimea:52.
- Dimitrijević, B. (1970): The occurrence of leafroll of grapevine in Yugoslavia. *Zaštita bilja*, 21: 373-378.
- Faoro, F., Tornaghi, R., Belli, G. (1981): Association of a Possible Closterovirus with Grapevine Leafroll in Northern Italy," *Riv. Patol. Veg.*, Ser IV, 17:183-189.
- Goheen, A.C (1970): Grape Leafroll. In Frazier et al., eds., *Virus Diseases of Small Fruits and Grapevines*. University of California, Division of Agricultural Sciences, Berkeley, Calif., USA, pp. 209-212.
- Gugerli, P., Brugger, J.J., Bovey, R. (1984): L'enroulement de la vigne: mise en evidence de particules virales et developpement d'une methode immuno-enzymatique pour le diagnostic rapide(Grapevine Leafroll: Presence of Virus Particles and Development

- of an Immuno-enzyme method for Diagnosis and Detection). *Rev. Suisse Viticult. Arboricult. Hort.*, 16:299-304 (1984).
- Hu, J.S., Gonsalves, D., Boscia, D., Nabra (1990): Use of monoclonal antibodies to characterize grapevine leafroll associated closteroviruses. *Phytopathology*, 80, 920-925.
- Ivanović, Ž., Kuzmanović, S., D., Trkulja, N., Živković, S., Stojanović, S., Starović, M. (2006): DTBA and ELISA methods in detection of grapevine leafroll-1 virus. *Zaštita bilja*, 57, 2006, (u štampi).
- Jevremović, D., Paunović, S. (2007): Detekcija virusa žbunavoste krljžljivosti maline na vinovoj lozi. XIII Simpozijum sa savetovanjem o zaštiti bilja, Zlatibor, 26-30 novembar, 2007. *Zbornik rezimea*, 59-60.
- Kuzmanović, S. (1995): Proučavanja bugarskog latentnog virusa vinove loze. Magistarska teza. Poljoprivredni fakultet, Beograd-Zemun: 1-59.
- Kuzmanović, S., Dovas, C.I., Katis, N.I., Starović Mira, Tošić, M., Rajković Snežana (2003): Contribution to the study of grapevine virus diseases in Serbia. Extended Abstracts of 14th Meeting of the ICVG, Locorotondo (Bari), Italy, 12-17. September, 2003.:, 180-182.
- Kuzmanović, S., Gavran Mira (1988): Prvi rezultati testiranja nekih klonova vinove loze na prisustvo virusa. VII jugoslovenski simpozijum o zaštiti bilja. Opatija. *Glasnik zaštite bilja* 8-9/88: 302.
- Kuzmanović, S., Gavran Mira (1989): Problem viroza u vinogradarstvu. *Jugoslovensko vinogradarstvo i vinarstvo*, 3-4: 29-32.
- Kuzmanović, S., Gavran Mira (1992): Metodi i rezultati dobijanja klonskog virusno ispitnog loznog sadnog materijala. VI vinogradarsko-vinarski Kongres Jugoslavije, Vrnjačka Banja. *Zbornik naučnih radova*: 147-153.
- Kuzmanović, S., Starović Mira, Tomić Tatjana (2002): Rešavanje problema viroza u vinogradarstvu. *Zbornik naučnih i preglednih radova sa XIV savetovanja vinogradara i vinara Srbije, sa međunarodnim učešćem*, Vršac, 14-16.11.2002., *Poljoprivreda*, 390-393: 160-166.
- Martelli, G.P. (1993) Graft Transmissible Diseases of Grapevines. In Martelli ed.: *Handbook for Detection and Diagnosis*, FAO, UN, Rome, Italy: 37-44.
- Martelli, G.P. (2003): Grapevine virology highlights 2000-2003. Extended abstracts 14th Meeting of ICVG, Locorotondo, 2003, 3-10.
- Martelli, G.P., Boudon-Padieu, E. (2006): Grapevine yellows: General properties. In: *Options méditerranéennes. Serie B: Studies and Research*, N. 55.
- Monis, J. (2000): Developement of monoclonal antibodies reactive to a new grapevine leafroll-associated closterovirus. *Plant Disease*, 84: 858-862.
- Namba, S., Yamashita, S., Doi, Y., Yora, K., Terai, Y., Yano, R. (1979): Grapevine leafroll virus, a possible member of closteroviruses. *Annals of Phytopathol. Soc. Japan*, 45:70-73 (1979)

- Paunović, S., Jevremović, D., Sretenović, D., Ristić, M., Sivčev, B., (2007): Utvrđivanje prisustva virusa vinove loze u zasadima i priporištima. XIII simpozijum sa savetovanjem o zaštiti bilja sa međunarodnim učešćem, Zlatibor, 26-30.11.2007., Zbornik rezimea: 58-59.
- Poljuha, D., Sladonja, B., Peršurić, Đ. (2004): Survey of Five Indigenous Cultivars for the Presence of Six Grape Viruses. *Am. J. Enol. Vitic.*, 55:3:286-287.
- Pourrahim, R., Ahoonmanesh, A., Farzadfar, Sh., Rkhshadehro, F., Golnraghi, A. R. (2004): Occurrence of Arabis mosaic virus and Grapevine leafroll-associated virus 3 in Iran. *Plant Dis.* 88:424.
- Rayapati, N., O'Neal, S., Walsh, D. (2008): Grapevine leafroll disease. <http://pubs.wsu.edu/cgi-bin/pubs/index.html>.
- Rosciglione, B., Gugerli, P. (1989): Transmission of grapevine leafroll disease and an associated closterovirus to healthy grapevine by the mealybug *Planococcus ficus* Signoret. *Proceedings 9th Meeting of ICVG, Kiryat Anavim*, 67-69.
- Saldarelli, P., Castellano, M.A., Harrison, B.D., Martelli, G.P. (2005): Two grapevine viruses in an ornamental *Vitis* species from Scotland. *J. Plant Pathol.* 87: 76.
- Scheu, G. (1935): Die Rollkrankheit des Rebstockes. (Leafroll of grapevine). *D. D. Weinbau* 14:222-358.
- Starović, M., Kuzmanović, S., Ivanović, Ž., Aleksić, G., Stojanović, S. (2007): Viruses of the local grapevine cultivars in Serbia. . 5th Balkan Congress for Microbiology, 24-27. October, 2007, Budva. Abstracts book: 132.
- Tomažič, I., Mavrič Pleško, I., Petrović, N., Ravnikar, M., Korošec-Koruza, Z. (2008): Introduction of Grapevine virus B and Grapevine leafroll-associated virus 2 testing in sanitary selection of grapevine. *Acta agriculturae Sloveica*, 91: 75-85.
- Tomažič, I., Petrović, N., Korošec-Koruza, Z. (2005): Effects of rugose wood and GLRaV-1 on yield of cv. "Refošk" grapevines. *Acta agriculturae Slovenica*, 85: 91-96.
- Walter, B., Zimmermann, D. (1991): Further characterization of closterovirus-like particles associated with the grapevine leafroll disease. *Proceedings 10th Meeting of ICVG, Volos*, 62-66.
- Zee, F., Gonsalves, D., Goheen, A., Kim, K.S., Pool, R., Lee, R.F. (1987): Cytopathology of Leafroll-diseased Grapevines and the Purification and Serology of Associated Closteroviruslike Particles, *Phytopathology*, 77:1427-1434.
- Zimmermann, D., Sommermeyer, G., Walter, B., Van Regenmortel, M.H.V. (1990): Characterization and Serological Detection of Four Closterovirus-like Particles Associated with Leafroll Disease on Grapevine. *J. Phytopathol.*, 130:205-218.

(Primljeno: 11.03.2009.)

(Prihvaćeno: 31.03.2009.)

GRAPEVINE LEAFROLL DISEASE IN CENTRAL SERBIA

MIRA STAROVIĆ, SLOBODAN KUZMANOVIĆ, ŽARKO IVANOVIĆ, NENAD TRKULJA,
GORAN ALEKSIĆ, NENAD DOLOVAC, SAŠA STOJANOVIĆ
Institute for Plant Protection and Environment

SUMMARY

Leafroll is one of the most important virus disease (Grapevine Leafroll Disease = GLD) of grapevines. It occurs in all of the major grape-growing regions of the world. GLD are a group of nine viruses called “grapevine leafroll-associated viruses” (GLRaV-1-9), that cause similar symptoms in infected grapevines. Samples were collected from 5 regions in Serbia, and from 18 grapevine cultivars during 2002, 2005, 2006 and 2007 and tested using ELISA test for detection GLRaV-1,2,3,5 and 7. Only GLRaV-1,2 and 3 were detected in investigated regions. GLRaV-1 was detected in all five regions, and GLRaV-3 wasn't detected only in Trstenik's vineyards. GLRaV-2 was the uncommon in Serbia. All investigated cultivars were infected by GLRaV-3.

Key words: grapevine, GLRaVs, ELISA

(Received: 06.03.2009.)

(Accepted: 31.03.2009.)

Plant Protection, vol. 59 (1-4), No 263-266, 81-92, 2008, Belgrade

Zaštita bilja
vol. 59 (1-4), No 263-266, 93-99, 2008, Beograd

UDK 631.527.5:632.651
Naučni rad

RESPONSE OF F₁ HYBRIDS AND THEIR PARENTAL FORMS OF *LYCOPERSICON* GENUS TO *MELOIDOGYNE INCOGNITA* AND *M. HAPLA*.

ZLATKA TRIFONOVA¹, YLATKA VOULKOVA²

¹ Plant Protection Institute BG – Kostinbrod, Bulgaria

² Institute of Genetics, BAS, Sofia, Bulgaria

The reactions of F₁ hybrids and their parental clones of *Lycopersicon* genus to *Meloidogyne incognita* and *M. hapla* were studied in glasshouse. Groups of five plants of each species were planted in plastic pots containing 12 dm³ of steam sterilized sandy soil and artificially infested with 10000 eggs and juveniles of each nematode population per plant. The species *Lycopersicon hirsutum* f. *glabratum* and f. *typicum* were resistant to *Meloidogyne* populations tested. *L. peruvianum* and *L. chilense* were resistant to *M. incognita* and susceptible to *M. hapla*. Among the F₁ hybrids only Bulgarian-Dutch hybrid № 965 was resistant to *M. incognita* and susceptible to *M. hapla*. The remaining hybrids and cultivars were susceptible to nematode populations tested. *Mi*- gene activity is not completely transferred from parents to hybrids.

Keywords: root-knot nematode, resistance.

INTRODUCTION

Tomato (*Lycopersicon lycopersicum* L Karsten & Farw) is the most important vegetable crop in Bulgaria. The sedentary endoparasitic nematodes *Meloidogyne* spp. known as root-knot nematodes (RKN) are widely distributed and cause severe damage to *Lycopersicon esculentum* both outdoors and glasshouses. From an economical point of view 4 species are the most important – *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitw., *M. arenaria* (Neal) Chitw., *M. hapla* Chitw. and *M. javanica* (Treub). (Choleva, 1973,1978., Gateva et al., 1984., Stoyanov, 1980).

The control of root-knot nematodes by crop rotation is rather difficult because of their wide host range. Nematicides are expensive and may cause pollution. The development of cultivars of tomato resistant to the nematode is a one alternative. The resistant cultivars often not universal i.e. not directed to all *Meloidogyne* species present in an area or by the occurrence of virulent field populations. (Dautova & Gommers, 2000; Chen & Robert, 2003). The resistance factor that has been used so far is the dominant Mi-gene which was introduced from the wild species (Hadisoeganda & Sasser, 1982) and confers resistance to *M. incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria* but several novel genes from wild species have been described (Liharska & Williamson, 1997). There are many data for the resistance to *M. incognita* and *M. arenaria* but very little to *M. hapla* and *M. javanica* (Chen & Roberts, 2003; Sasser, 1979).

The information about the reaction of wild species and varieties to *M. hapla*, *M. incognita* is extremely insufficient. Several resistance-breaking *Meloidogyne* populations have already been isolated from the field in different countries (Kaloshian et al. 1996; Ornat et al., 2001). In order to tackle this problem a breeding programmes was recently started in Bulgaria. Preliminary results on the introgression of resistance in to Bulgarian tomato main types from wild species were very encouraging (Choleva, 1988; Gateva et al., 1984).

Therefore the aim of this study was to screen wild species of tomato to identify sources of resistance to Bulgarian populations of *M. hapla* and *M. incognita* to be used in future breeding programmes.

MATERIALS AND METHODS

The experiments were conducted at the Institute of Plant Protection Kostinbrod. The nematode populations of *M. hapla* and *M. incognita* were collected from infested tomato plants at Petrich province of Southern Bulgaria and reared on *Lycopersicum esculentum* Mill. cv. Ideal in a glasshouse at 26° C. When large egg masses were formed the eggs were extracted from the roots using the sodium hypochlorite method (Hussey & Barker, 1973). Juveniles were hatched in water and stored at 4° C until required. Prior to inoculation nematodes were allowed to pass through a cotton filter and viable juveniles were collected after one day. The suspension was pipetted with an automatic syringe onto the soil surface around the test plant seedlings followed by light watering. Forty five days after inoculation the plants were uprooted and the roots gently washed free of the adhering soil.

The wild species, F₁ hybrids and cultivars of the *Lycopersicon* genus was obtained from Institute of Genetics BAS– Sofia. Groups of pregerminated seed of each types of tomato were sown in 12 dm³ clay pots filled with a steam sterili-

zed sandy soil. Seven days later 5 seedlings of each species were inoculated with 10000 eggs and juveniles per plant of each root-knot nematode population. Then the gall index (G.I) and egg-mass of the root systems were assessed according to a 0-5 scala (Taylor & Sasser, 1978). The tomato plants was consider resistant when the gall index (G.I) was < 2 . Tomato *L.esculentum* cv. Ideal was used a susceptible control.

Species composition was determined using the morphological criteria of perineal pattern of adult females and morphometrics of males and juveniles. (Jepson, 1987).

The data were statistically analyzed by ANOVA and compared by using Duncan's Multiple Range Test (Little & Hills, 1978).

RESULTS AND DISCUSSION

The reactions of the tomato hybrids and parental species to *M. hapla* and *M. incognita* are given in table 1. In general the nematode populations collected from root of the parental clones showed significant differences. The wild species *L. peruvianum* and *L. chilense* react differently to both nematode populations. *L. peruvianum* and *L. chilense* were completely free of *M. incognita* and many galls were found on the roots inoculated with *M. hapla*. They manifest a resistant type of reaction to *M. incognita* and a susceptible on to *M. hapla*.

No galls were found on the roots of the *L. hirsutum* f. *glabratum* and f. *typicum* inoculated with *M. incognita* and *M. hapla*. Many galls were found on the roots of the *L. pimpinellifolium* and *L. esculentum* inoculated with both nematode populations.

All populations tested reproduced well on susceptible cultivars – Rali, Torpedo, Toni, Bele and Lambada. They showed gall index from 3,5 to 5,0.

The F₁ hybrids from the parental clones – *L. peruvianum* and *L. chilense* were considered susceptible to root-knot nematodes tested as the same parental clones were resistant to *M. incognita*. The results showed that resistance in parent clones was not equal to that of its hybrids. The hybrids derived from *L. esculentum*, *L. pimpinellifolium*, *L. peruvianum* and *L. chilense* had high nematode population than the resistant parents when they were inoculated with *M. incognita*. The F₁ hybrid № 965 cross between Bulgarian lines (from *L. peruvianum* or *L. chilense*) and Dutch hybrid (from Institute for Horticultural Plant Breeding, The Netherlands) was resistant to *M. incognita* and susceptible to *M. hapla*. The hybrid № 965 and the parental clones *L. peruvianum* and *L. chilense* were considered resistant to *M. incognita* as the GI of the nematode was 0. The rest hybrids were susceptible to the nematode populations tested.

Table 1 – Response of F₁ hybrids and its parental forms of *Lycopersicon* genus to *M. incognita* and *M. hapla*.

Tabela 1 – Response of F₁ hybrids and its parental forms of *Lycopersicon* genus to *M. incognita* and *M. hapla*.

	root gall index 0-5		numb.of egg masses		reaction type	
	<i>M.h.</i> ^a	<i>M.i.</i> ^b	<i>M.h</i>	<i>M.i</i>	<i>M.h</i>	<i>M.i</i>
Parents						
<i>L. esculentum</i>	4.0 c ^c	4.0 c	45.2	46.2	S ^d	S
<i>L. pimpinelli</i>	4.6 d	5.5 cd	52.2	54.3	S	S
<i>L.peruvianum</i>	4.4 c	0.0 a	42.2	2.0	S	R ^e
<i>L.chilense</i>	4.7 d	0.0 a	40.0	3.8	S	R
<i>L.hirsutum</i> f. <i>glabratum</i>	0.0 a	0.0 a	0.0 a	0.0 a	R	R
<i>L.hirsutum</i> f. <i>typicum</i>	0.0 a	0.0 a	0.0 a	0.0 a	R	R
F1 hybrids						
<i>L. esculentum</i> x <i>L. pimpinelli</i>	4.3 c	4.2 cd	54.3	65.3	S	S
<i>L. esculentum</i> x <i>L. peruvianum</i>	4.5 cd	4.0 c	42.2	50.0	S	S
<i>L. esculentum</i> x <i>L. chilense</i>	3.0 b	3.4 b	25.2	20.0	S	S
Hybrid № 965	4.0 c	0 a	64.2	0	S	R
Cultivars						
Rali	4.5 cd	4.4 cd	34.6	33.6	S	S
Torpedo	4.7 d	4.3 cd	44.6	54.7	S	S
Toni	3.5 b	4.0 c	26.7	66.8	S	S
Bele	4.5 cd	4.0 c	56.7	56.4	S	S
Lambada	3.7 bc	4.3 cd	35.6	45.8	S	S
Controla	4.0 c	4.8 d	56.7	56.8	S	S

a *M. hapla*

b *M. incognita*

c Columns with the same letters are not significantly ($P < 0,005$) different according to Duncan's Multiple Range Test.

d resistant

e susceptible

Development of a few *M.incognita* juveniles to adult females in F1 hybrids from *L. esculentum*, *L. peruvianum* or *L. chilense* and complete absence of the development of nematode in its parents indicates that the *Mi*-gene activity was not completely transferred from parents to the hybrids.

The results of these studies confirmed the occurrence of resistance in wild tomato species – *L. peruvianum*, *L. chilense* and *L. hirsutum* to the major root-knot nematode. However, there are some discrepancies in the resistant response if we compare our results with these obtained by other authors (Choleva et al.,

1978). In our tests the *L. peruvianum* and *L. pimpinelifolium* were susceptible to *M. hapla*, while Choleva et al. (1978) found them resistant. These discrepancies in resistance response could be linked with different pathogenicity, occurrence of races and virulence of the nematode populations used. All the more that many authors reported on variability in virulence of field populations of *M. hapla*, *M. arenaria* and *M. javanica* from different parts of the world (Robers et al., 1990; Castagnone-Sereno et al., 1993; Kaloshiam et al., 1996; Dautova & Gommers, 2000; Chen & Roberts, 2003). Virulent populations may occur naturally or arise from populations after repeated selection pressure by *Mi*-carrying cultivars. (Castagnone-Sereno et al., 1994).

These results provide a basis for starting a breeding programmes to introduce resistance to root-knot nematodes into some Bulgarian tomato types.

The results obtained from the research allows us to make the following conclusions:

- The wild species of *Licopersicum hirsutum* f. *glabratum* and f. *typicum* are resistant to *M. hapla* and *M. incognita*. They could be used in plant breeding programmes for synthesis of new hybrids.
- *L. peruvianum* and *L. chilense* are resistance to *M. incognita* and not perspective to *M. hapla*.
- The hybrid № 965 (with Bulgarian-Dutch origin) is very perspective to *M. incognita*.

REFERENCES

- Ammati, M., Thomason, I. J. & Roberts, P. A. (1985). Screening *Lycopersicon* spp. for few new genes importing resistance to root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). Plant Disease, 69, 112-115.
- Castagnone-Sereno, P., Bongiovanni, M. & Dalmasso, A. (1994). Reproduction of virulent isolates of *Meloidogyne incognita* on susceptible and *Mi*-resistant tomato. Journal of Nematology, 26, 324-328.
- Chen, P. & Roberts, P. A. (2003). Virulence in *Meloidogyne hapla* differentiated by resistance in common bean (*Phaseolus vulgaris*). Nematologica, 5, 39-47.
- Choleva, B. (1973). Plant protection, 11, 30-31.
- Choleva, B., Georgiev, Ch. & Bojanova, D. (1978). Investigation on resistance of tomatoes to root-knot nematodes in Bulgaria. Agricultural behind boundary, 3, 30-31.
- Choleva, B., Sotirova, V. & Georgiev, Ch. (1987). Study on the resistance of lines and hybrids tomato to root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) and golden nematode *Globodera rostochiensis* (Woll. 1923, Mulvey Stone, 1976). Biotechnology and Bioindustry, 1, 30-33.

- Dautova, M. & Gommers, F.J. (2000). *Meloidogyne spp.* in Macedonia. Distribution and virulence for Mi resistance in tomato. *Nematologia mediterranea*, 28, 121-128.
- Gateva, Sh., Choleva, B. & Georgiev, Ch. (1984). Resistance to tomatoes of different origin against root-knot nematodes. *Helmintology*, 17, 16-22.
- Hadisoeganda, W. W. & Sasser, J. N. (1982). Resistance of tomato, bean, southern pea and garden pea cultivars to root-knot nematodes based on host suitability. *Plant Disease*, 66, 145-150.
- Hussey, R. S. & Barker, K. R. (1973). A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne spp.* including a new technique. *Plant Disease Report*, 56, 1025-1028.
- Jepson, S. B. (1987). Identification of root-knot nematodes (*Meloidogyne spp.*). Wallingford, Cab International, UK, 252pp.
- Kaloshia, N. I., Williamson, V.M., Miyao, G., Lawn, D. A. & Westerdahl, B. B. (1996). Resistance-breaking nematodes in California tomatoes. *California Agriculture*, 50, 18-19.
- Liharaska, T. B. & Williamson, V. M. (1997). Resistance to root-knot nematodes in tomato. Pp. 191-200. In: Fenoll, C., Grundler, F. M. W. Ohe, S. A. Cellular and molecular aspects of plant-nematode interactions. Kluwer Academic Publishers, the Netherlands.
- Little, T.M. & Hills, F.J. (1978). *Agricultural experimentation design and analysis*, John Wiley and Sons, New York, 350 pp.
- Ornat, C., Verdejo-Lucas, S. & Sorribas, F. J. (2001). A population of *Meloidogyne javanica* in Spain virulent to the *Mi*-resistance gene in tomato. *Plant Disease*, 85, 271-276.
- Roberts, P. A., Dalmaso, A., Cap, G. B. & Castagnone-Sereno, P. (1990). Resistance in *Lycopersicon peruvianum* to isolates of *Mi*-gene compatible *Meloidogyne* populations. *Journal of Nematology*, 22, 585-589.
- Sasser, J. N. (1977). World wide dissemination and importance of the root-knot nematode *Meloidogyne spp.* *Journal of Nematology*, 9, 26-29.
- Stoyanov, D. (1980). *Plant Parasitic Nematodes and their Control*. Zemizdat, 193pp.
- Taylor, A. L. & Sasser, J. N. (1978). *Biology, identification and control of root-knot nematodes (Meloidogyne species)* , North Carolina State University Graphics, Raleigh NC, USA, 111 pp.

(Primljeno: 15.02.2009.)
(Prihvaćeno: 31.03.2009.)

**REAKCIJA F₁ HIBRIDA I NJIHOVIH RODITELJSKIH
FORMI RODA LYCOPERSICON PREMA
MELOIDOGYNE INCOGNITA AND M. HAPLA.**

ZLATKA TRIFONOVA¹, YLATKA VOULKOVA²

¹ Plant Protection Institute BG – Kostinbrod, Bulgaria

² Institute of Genetics, BAS, Sofia, Bulgaria

REZIME

Reakcije F₁ hibrida roda *Lycopersicon* i njihovih roditeljskih clonova prema *Meloidogyne incognita* i *M. hapla* ispitivane su u staklari. Po pet biljaka od svake vrste posađeno je u plastične posude sa 12 dm³ peska, koji je sterilisan vodenom parom. Biljke su veštački infestirane sa po 10000 jaja i larvi obe populacije nematode. Vrste *Lycopersicum hirsutum* f. *glabratum* i f. *typicum* bile su rezistentne prema testiranim populacijama *Meloidogyne*. *L. peruvianum* i *L. chilense* bile su rezistentne na *M. incognita* a osetljive na *M. hapla*. Među F₁ hibridima samo bugarsko-danski hybrid № 965 bio rezistentan na *M. incognita* a osetljiv na *M. hapla*. Ostali hibridi i sorte su bili osetljive na testirane populacije nematode. Aktivnost *Mi*- gena activity nije potpuno preneti sa roditelja na hibride.

Keywords: root-knot nematode, resistance.

(Received: 15.02.2009.)

(Accepted: 31.03.2009.)

IN MEMORIAM

Dr MOMČILO ARESENIJEVIĆ

red. prof. Poljoprivrednog fakulteta
u Novom Sadu u penziji
1930. – 2008.

Dana 20.07. 2008. godine oprostili smo se od Prof. dr Momčila Arsenijevića, našeg cenjenog i poštovanog profesora. Napustio nas je naš učitelj, izuzetan naučnik i pedagog.. Oprostili smo se sa profesorom sa tugom u našim srcima, ali i ponosom što smo imali tu čast da ga poznamo i sa njim sarađujemo.

Rođen je u selu Dobrača kod Kragujevca 7. aprila 1930. godine. Osnovnu školu je završio u rodnom mestu, gimnaziju u Kragujevcu (1949), a Poljoprivredni fakultet u Zemunu (1954). U periodu 1954-1956 provodi na usvršavanju iz oblasti entomologije u Laboratoriji za biološku borbu Instituta za zaštitu bilja u Beogradu. Po završetku vojnog roka 1957. godine zasniva radni odnos u Institutu za poljoprivredna istraživanja (sadašnji Centar za strna žita), a od septembra 1960 godine profesor radi kao asistent na predmetu Fitopatologija, Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu, gde stiče zvanje docenta (1965), vandrednog (1971) i redovnog profesora (1977) i provodi 35 godina plodnog pedagoškog i naučnog rada sve do odlaska u penziju 1995. godine.

Profesor Arsenijević je imao tu retku čast da, na početku svoje profesionalne karijere obavi specijalizaciju iz oblasti entomologije, kod, u to vreme najvećeg autoriteta iz te oblasti, prof. Gvide Novieliera, a kasnije kod akademika Mladena Josifovića iz oblasti fitopatologije, koji su bili i ostali doajeni nauke u zaštiti bilja u Srbiji i Jugoslaviji. Zahvaljujući toj privilegiji, koja se pruža malom broju mladih istraživača, prof. Arsenijević je od tih velikana prihvatio i usvojio kao svoje mnoge osobine, koje su ga kasnije krasile kao predavača, učitelja i pobornika lepe pisane i govorne reči. Kao patrijahalno vaspitavan Profesor Arsenijević je bio odan i iskreni poštovalac i sledbenik autoriteta svetskog kalibra, koji su na njega ostavili neizbrisiv pečat pregalaštva, upornosti i ljubav prema naučno-istraživačkom radu. Ova dvojica profesora i prvih učitelja ostavili su neizbrisiv trag u daljem pedagoškom i naučnom razvojnom putu prof. Arsenijevića, što je on sa ponosom isticao. Većinu atributa koji su krasili prof. Arsenijevića kao nastavnika i naučnika: upornost, entuzijazam, sistematičnost, organizovanost u poslu i najvažnije – ljubav prema struci, punim srcem preuzeo je od svojih ve-

likih učitelja, što je bila čast i privilegija malog broja kolega. Od starijih velikana naučio je i usvojio ljubav prema jeziku, pisanoj i govornoj reči, vodeći se premisom, da se kao pravi i iskreni rodoljub, otadžbina brani, ne samo oružjem, već mnogo više i češće i «pesmom», odnosno jezikom, kao što reče pesnik.

Sudbina je htela da njegovo prvo profesionalno angažovanje bude u njegovoj Šumadiji, u Kragujevcu i to u Institutu za poljoiprivredna istraživanja (danas Centar za strna žita), gde je po prirodi posla počeo da se bavi bolestima bilja, što ga je opredelio da on, kao potencijalni entomolog, krene drugim pravcem. Tada je zavoleo fitopatologiju, kojoj je ostao veran do kraja svog života. Fitopatologija nije bila samo predmet profesionalnog rada profesora Arsenijevića, već i nepresušni izvor njegovih zadovoljstava. Sa velikim divljenjem je opisivao simptome bolesti i posmatrao kolonije fitopatogenih organizama koje je proučavao (bakterija i gljiva) i , čini nam se, tako nalazio nepresušni izvor ideja za svoj i istraživački opus svojih brojnih saradnika. On je bio zaljubljenik struke kojoj je posvetio svo svoje znanje, iskustvo, i svoje slobodni veme. On je bio jedan od retkih kolega koji je intenzivno radio, to voleo iznad svega i u isto vreme u tome uživao.

Profesor Arsenijević je bio vrstan predavač, govorio je tečno i jasno da ga je svako mogao razumeti, ali je mnogo više bio i teoretičar koji je svo svoje znanje i iskustvo pretočio u eksperimentalni rad. Bio i ostao je vrsni istraživač u našim i svetskim okvirima. Njegov eksperimentalni rad krasila je organizovanost i sistematičnost, pri čemu ga je, kao i svakog iskrenog naučnog radnika, krasila profesionalna radoznalost i istrajnost. Za njega nije bilo radnog vremena; popodneva, praznike i neradne dane koristio je da u miru i tišini obrađuje rezultate svojih istraživanja. Čak je i njegov dom postao svojevrсна naučnička kancelarija sa stručnom bibliotekom na kojoj bi mu mnogi zavideli.

Profesora nije interesovala dnevna politika i nije podlegao politikanstvu, jer je vreme u kojem je proveo većinu svog profesionalnog života, zahtevalo i od naučnika da budu «podobni». Kao mnogi intelektualci toga vremena, okrenuo se onome što mu ne može niko oduzeti i osporiti, a to je ljubav prema struci i poslu. U tom svom stavu nije bio usamljen, jer mnoge vrsne kolege u to vreme delile su njegovo mišljenje.

Kao vrsni profesionalac, pedagog i naučnik, a u isto vreme veliki entuzijasta i zaljubljenik u posao koji je radio, prof. Arsenijević nije očekovao priznanja, plakete i pohvalnice niti rukovodeći položaj, što je u to vreme bila privilegija «svesnih», odnosno «pogodnih» intelektualaca. Njegov svet nije bila politika, njegov svet su bila predavanja na fakultetu, njegov svet je bio edukacija studenata zaštite bilja, njihovo uvođenje u laboratorijski eksperimenti rad, edukacija naučnih radnika i publikovanje radova. Posebno je voleo eksperimentalni rad s mladim, talentovanim istraživačima i njihov naučni uspon i usavršavanje u nauci i struci.

Profesor je bio skroman čovek, pravi šumadijski domaćin, ali je zahvaljujući harizmi koju je posedovao, Bogom danom, svojom pojavom plenio, a svojim ponašanjem i elokvencijom pokaziva da je bio pravi gospodin čovek, što je retko u našoj struci. Zahvaljujući domaćem patrijahalnom vaspitanju koje poneo iz rodne Dobrače kod Kragujevca, zahvaljujući uticaju vrsnih učitelja, zahvaljujući svom prirodnom daru u komuciranju sa kolegama, profesor Arsenijević je ostvario kontakte sa brojnim kolegama u inostranstvu, stekao je i brojne prijatelje među eminentnim svetskim imenima. Ono što najviše krasi našeg učitelja je to, da ta svoja poznavanja i prijateljstva nije zadržava za sebe, već ih je nesebično prenosio i na druge, pre svega na mlađe kolege, koji su mu za to iskreno zahvalni.

Naučni opus prof. Arsenijevića zaista je impresivan. Publikovao preko 200 naučnih i oko 100 stručnih radova, objavljenih u našim i časopisima u inostranstvu, kao i oko 400 stručno popularnih članaka namenjenih širem krugu čitalaca i proizvođačima u praksi. Poseban njegov doprinos obrazovanju studenata zaštite bilja predstavlja tri izdanja univerzitetskog udžbenika «Bakterioze bilja», jedinog takvog na prostroima bivše Jugoslavije. Mada je rezultate mnogih svojih istraživanja saopštavao u vodećim inostranim časopisima, posebno mu je bilo drago kad su u renomiranom časopisu J. Phytopathology (144:337-346), bili štampani rezultati istraživanja kojima je opisana nova vrsta gljive prouzrokovala oboljena na suncokretu – *Septoria helianthina* Petrov and Arsenijević. U to vreme, kada je rad oštampao, prof. Arsenijević je bio angažovan u Institutu za zaštitu bilja u Topčideru. Tada je imao veću grupu poslediplomaca i doktoranata sa kojima je intezivno sarađivao. Svojim radom nas je uverio da zadovoljstvo, ako znamo i hoćemo, možemo doživeti baveći se profesionalno i s ljubavlju našom strukom. U tom pogledu profesor je bio u potpunosti u pravu.

Osim dugogodišnjeg naučnog i pedagoškog rada, Prof. Arsenijević je u periodu 1999-2000. godine dodao još jednu dimenziju svom stvaralačkom opusu, kao pisac rodoljubive i lirske poezije, kojima je uglavnom opisivao život i običaje u svojoj rodnoj Šumadiji. Nažalost, zbog profesorove skromnosti i odsustva želje za publicitetom, ova dela su ostala nepoznata široj javnosti.

Važan segment naučnoistraživačkog i pedagoškog rada profesora Arsenijevića bio je vezan, direktno ili indirektno, i za Institut u Topčideru. Posle diplomiranja na Poljoprivrednom fakultetu u Beogradu, profesor Arsenijević je obavio svoju prvu specijalizaciju iz oblasti zaštite bilja u našem Institutu. I pored želje da ostane u Institutu, tadašnja personalna politika kao odredište mu je opredilila Zavod za strna žita u Kragujevcu, gde je, i pored specijalizacije iz oblasti entomologije, počeo da radi na problemima mikologije bolesti biljkaka, tako da je već tada zavoleo fitopatologiju, pa je i mikologija bilja, pored bakterologije bila i ostala njegova ljubav. I pre definitivog prelaska na Poljoprivredni fakultet u Novom Sadu, vođeni su pregovori o njegovom dolasku u naš Institut, ali je

prevagnuo Novi Sad. Time nije bila prekinuta veza između prof. Aresinjevića i Instituta, koja je bila značajna i obostrano korisna, naročito za mlade istraživače i njihovo napredovanje, jer je Profesor bio mentor brojnim magistrskim tezama i doktorskim disertacijama koje su odbranjene na Poljoprivrednom fakultetu u Novom Sadu i Beogradu.

Profesor je bio rado viđen gost u našem Institutu. U razgovorima koje smo vodili uvek je isticao da mu je velika želja bila da radi u Topčideru. Ta mu se želja ostvarila nakon penzionisanja, kada je zanovao radni odnos u Institutu na obostrano zadovoljstvo. Ta intenzivna saradnja trajala je više godina u toku kojih je izdašno pomagao i prenosio svoja znanja i iskustvo na mlade saradnike Instituta. Malo je poznato, a za Institut vrlo značajno, da je Profesor bio osnivač laboratorije za bakteriologiju pri našem Institutu i da je oformio ekipu mladih istraživača kojima je bio iskreni učitelj i prijatelj.

Više godina prof. Arsenijević je bio glavni i odgovorni urednik časopisa «Zaštita bilja» i svojim znanjem i iskustvom doprineo afirmaciji, a svojim radovima kvalitetu časopisa.

Dokle god mu je teška bolest to dozvoljavala, Profesor je sarađivao sa kolegama u Institutu. Njegovi prilozi časopisu «Zaštita bilja» u mnogome su doprineli da časopis polako izlazi iz izdavačke krize. Nije doživeo da u jednom od poslednjih brojeva časopisa pročita dva rada koje napisao u vreme teške bolesti i na koje je bio posebno ponosan s obzirom na problematiku i aktuelnost njihovog sadržaja. Zbog njegovog preglaštva, antuzijazma i iskrenog zalaganja da naš časopis bude ono što zaslužuje, Redakcija časopisa mu je duboko zahvalna.

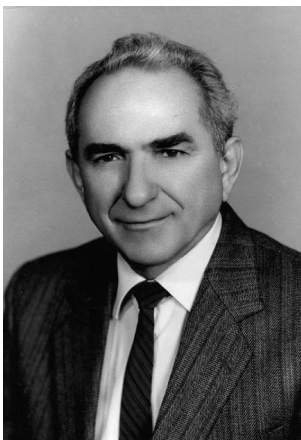
Isticanjem vrlina i doprinosa našeg Profesora gotovo da nema kraja. Ipak, ovo znači mnogo za sve nas, posebno za njegovu suprugu Milicu, sina Marka, mnogobrojnu rodbinu i prijatelje, koji mogu biti ponosni što su ga voleli i cenili a sada tužni što su ga izgubili. Profesor Arsenijević ostaće sa nama i u našim mislima, jer je bio veliki u svemu, a posebno kao čovek, što zaborav ne može pokriti.

Hvala prof. Arsenijevuću za sve što je učinio za struku, za sav naučni i obrazovni rad koji je od neprocenjive vrednosti za zaštitu bilja. Hvala mu što smo imali tu čast da budemo njegovi studenti i učenici, kolege i prijatelji.

Neka mu je slava i hvala, laka zemlja i Bog da mu dušu prosti!

Prof dr. Aleksa Obradović
Dr Veljko Gavrilović

IN MEMORIAM

**DR DRAGOLJUB ŠUTIĆ**

Redovni profesor u penziji
Poljoprivredni fakultet, Beograd,
(1919-2008)

Fitopatološka nauka i struka je smrću dr Dragoljuba Šutića, 27. septembra 2008., izgubila čuvenog profesora i učitelja brojnih generacija studenata i istraživača, naučnika poznatog i cenjenog širom sveta, autora brojnih naučnih radova i bogate udžbeničke literature.

Dragoljub D. Šutić je rođen 3. novembra 1919. godine u seoskoj porodici u Gornjoj Mutnici kod Paraćina, Srbija. Gimnaziju je završio u Čupriji, a potom Vojnu akademiju 1940. godine u Beogradu. Od 1941. do 1945. godine bio je vojni zarobljenik u Nemačkoj. Po povratku u otadžbinu završio je najpre Poljoprivredni (1949), a potom i Prirodno-matematički fakultet (Biologija) (1954) Univerziteta u Beogradu. Doktorsku disertaciju pod naslovom „Bakterioze crvenog patlidžana” odbranio je 1955. godine na Poljoprivrednom fakultetu u Beogradu. Postdoktorske studije iz oblasti biljne virologije obavio je 1957/58. godine u Institutu za poljoprivredna istraživanja (I.N.R.A.) u Versaju, Francuska. U istom institutu bio je i 1967. godine na dvomesečnom studijskom boravku. Studijska putovanja obavljao je širom Evrope (Francuska, Nemačka, Italija, Belgija, Holandija, Švedska, Norveška, Velika Britanija, Mađarska, Čehoslovačka, Bugarska, Grčka i SSSR), kao i u SAD. Studijski boravci i putovanja omogućili su mu da poseti brojne univerzitete i naučne institute na kojima se upoznao sa nastavom i naučnoistraživačkim radom u oblasti fitopatologije. Prilikom tih poseta ostvario je i brojne lične kontakte, koji su dalje doprineli međunarodnoj saradnji D.

Šutića, a posebno zajedničkim istraživanjima sa brojnim profesorima i naučnim radnicima širom sveta.

Tortura, a pre svega gladovanje u zarobljeničkim logorima u Nemačkoj pre-sudno je delovalo na dalje obrazovanje i profesionalnu orijentaciju D. Šutića. Neprestana glad u logorima, koja je odnosila brojne živote, izazvala je u njemu osećaj da je glad najveća bolest koja može zadesiti čoveka i da je proizvodnja hrane najplemenitiji poziv. To ga je opredelilo da studira agronomске nauke, koje je potom proširio studijama biologije.

Tokom studija skrenuo je na sebe pažnju svojim izraženim sposobnostima i izvanrednim rezultatima. Zbog toga je izabran za demonstratora, najpre na predmetu Botanika, a potom i na predmetu Fitopatologija. Postavljen je i za rukovodioca Sekcije demonstratora na Poljoprivrednom fakultetu u Beogradu. Vrlo aktivno je učestvovao i u radu Studentske naučne grupe Katedre za fitopatologiju Poljoprivrednog fakulteta. Značajno je doprineo i osnivanju *Zbornika studentskih naučnih radova* Poljoprivrednog fakulteta. U Zborniku je publikovao i svoj prvi naučni rad. Kao takav bio je veoma cenjen među studentima i zapažen od profesora, među kojima su bili dr Ljubiša Glišić, profesor botanike i dr Mladen Josifović, profesor fitopatologije. Pomenuti profesori uticali su, pre svih, da se kod D. Šutića javi ljubav prema biljnom svetu, a pre svega prema biljnim bolestima. Ta ljubav i njegova nadarenost predstavljali su osnovu za dalji razvoj i karijeru D. Šutića. Zbog povezanosti, uslovljenosti i jedinstva nastave i nauke na univerzitetu, univerzitetska karijera bila je pravi izazov za D. Šutića. Opredelio se za fitopatologiju (nauka o biljnim bolestima), koja je blisko povezana sa botanikom. Njegova karijera i njegov razvoj, najsazetije rečeno, predstavljaju put – „od demonstratora do svetski poznatog univerzitetskog profesora i naučnika”.

Na predmetu Fitopatologija na Poljoprivrednom fakultetu Univerziteta u Beogradu biran je u zvanje asistenta (1949), docenta (1959), vanrednog profesora (1961), i redovnog profesora (1969). Izabran je i za dopisnog člana Francuske poljoprivredne akademije (1976) u Parizu. Univerzitetska karijera, koja objedinjuje nastavu i nauku, omogućila je D. Šutiću da razvije sve svoje potencijale i sposobnosti.

Nastavi je posvećivao izuzetnu i stalnu pažnju. Nastavni rad smatrao je vrlo odgovornim i važnim. Često je isticao: „Nastava, to je nešto sveto”. Za svaki čas se iznova i vrlo detaljno pripremao. I najkomplikovanije probleme predstavljao je jednostavno i razumljivo. Predavanja su mu bila i jasna i interesantna. Nastojao je ne samo da privuče pažnju već da kod slušalaca pokrene i kreativno razmišljanje, odnosno proces saznavanja i rasuđivanja. Nastavu je smatrao jedinstvenim procesom, koji obuhvata predavanja i vežbanja. Stoga je vežbama, odnosno eksperimentalnom radu studenata posvećivao uvek potrebnu pažnju. Za njegovo prenošenje znanja drugima odgovara izreka „Znanje nije – znanje znati,

već je znanje – znanje dati”. Svoja predavanja potkrepljivao je najnovijim podacima iz literature, i tako širio saznanja o nivou svetske nauke o biljnim bolestima. Na redovnim i poslediplomskim studijama predavao je više predmeta, kao što su Fitopatologija, Mikoze biljaka, Bakterioze biljaka, Viroze biljaka, Anatomija i fiziologija bolesnih biljaka, Viša fitopatologija i Metode istraživanja u fitopatologiji. Bio je prvi predavač predmeta Bakterioze biljaka, Viroze biljaka i Anatomija i fiziologija bolesnih biljaka, koji su kao novi uvedeni u nastavne planove i za njih je postavio osnove univerzitetske nastave kod nas. Za većinu predmeta na kojima je izvodio nastavu napisao je i udžbenike i priručnike. Te udžbenike i danas koriste ne samo studenti na bivšim jugoslovenskim prostorima već i istraživači i stručnjaci u proizvodnji. Ti udžbenici su: *Biljni virusi* (izdanja 1980. i 1994), *Viroze biljaka* (1983. i 1995), *Anatomija i fiziologija bolesnih biljaka* (1987. i 1995), *Fitopatologija – bakterioze biljaka* (skripta, 1965), *Metode proučavanja fitopatogenih bakterija* (praktikum, 1969), *Patofiziologija* (praktikum, 1980), *Viroze bilja* (praktikum, 1977. i 1984), *Bolesti povrća i njihovo suzbijanje* (1980. i 1990), *Bolesti i štetočine lucerke i crvene deteline* (1958) i *Mikrobiologija – mikroorganizmi u životu biljaka* (2001). D. Šutić je autor/koautor i dva udžbenika publikovana u inostranstvu, to su *Anatomy and Physiology of Diseased Plants* (SAD, 1991) i *Handbook of Plant Virus Diseases* (SAD, 1999). Saradnik/koautor je i udžbenika *European Handbook of Plant Diseases* (koautor teksta Plum Pox Virus (UK, 1988) i Bull. OEPP: *Progrès réalisés dans la connaissance de la sharka* (Francuska, 1974).

Poseban doprinos obrazovanju i formiranju mladih istraživača prof. Šutić je dao rukovođenjem studentskim istraživačkim radovima i aktivnim pomaganjem Studentske naučne grupe, zatim mentorstvom brojnih diplomskih radova, magistarskih teza i desetak doktorskih disertacija, kao i učešćem u komisijama za njihove ocene i odbrane. Magistarske teze i doktorske disertacije kojima je rukovodio prof. D. Šutić su prepoznatljive kako po sadržaju tako i po primenjenim metodama, po načinu obrade i prikazivanju rezultata. Može se, stoga, slobodno reći da je prof. Šutić doprineo formiranju jedne posebne fitopatološke škole kod nas, škole koja se bazira na ideji i eksperimentu.

Iz svega izloženog može se videti da je dr D. Šutić bio izuzetan i veoma cenjen profesor. Cenili su ga kako studenti tako i kolege – drugi profesori. Koliko je bio cenjen među kolegama govori jedna izjava dr Dušana Stankovića – čuvenog profesora voćarstva. Prof. Stanković je jednom prilikom (1968) rekao: „Šule, čini mi čast da smo jednaki, jer znam da si Ti kao nastavnik nedostižan”.

I naučnoistraživačkom radu prof. D. Šutić je posvetio punu pažnju. Još kao student zainteresovao se za istraživački rad. Bio je jedan od osnivača i aktivni član Studentske naučne grupe Katedre za fitopatologiju. U *Zborniku studentskih naučnih radova Poljoprivrednog fakulteta* objavio je i svoj prvi naučni

rad o osetljivosti krompira na plamenjaču. Naučnom radu D. Šutić je prilazio angažovano i odgovorno. Njegova odgovornost se ispoljavala u prihvatanju da istražuje najznačajnije fitopatološke probleme u poljoprivredi naše zemlje. I drugima je isto preporučivao. Držao se i pravila da ideje u nauci treba eksperimentalno proveravati. Isticao je da rezultati dobijeni u eksperimentu omogućavaju nova saznanja, da otkrivaju nove vidike i rađaju nove ideje. Nastojao je, koliko god je to bilo moguće, da u svoj istraživački rad i istraživanja u oblasti fitopatologije kod nas uopšte, uvede nove, savremene metode. U tim nastojanjima bio je vrlo efikasan zahvaljujući znanju više svetskih jezika (francuski, engleski, nemački i ruski) i praćenju literature, kao i ličnim kontaktima sa brojnim profesorima i naučnim pregaocima širom sveta.

Široka je lepeza fitopatoloških problema koje je istraživao prof. D. Šutić. Proučavao je viroze voćaka i vinove loze, a posebno šarku šljive i drugog koštićavog voća, zatim bolesti ratarskih i povrtarskih biljaka, kao i bolesti industrijskog bilja, a pre svega šećerne repe i suncokreta. Posebno su ga privlačile one biljne bolesti koje su kod nas bile manje poznate, kao i one čija je etiologija bila neizvesnija. Ispitivao je biljne bolesti različite etiologije, od mikoznih i bakterijskih do viroznih i fitoplazmarnih oboljenja; kao i one za koje se pretpostavlja da ih izazivaju patogeni slični rikacijama ili, kako ih danas nazivaju, fastidijozne bakterije. Može se reći da se prof. D. Šutić u svojim istraživanjima držao sledećih pravila: (a) primeniti odgovarajuću metodu, i (b) rezultate proveriti Koch-ovim postulatima. Određene probleme je proučavao i u saradnji sa istraživačima iz zemlje i inostranstva. Tako je šarku šljive delom ispitivao sa stručnjacima Instituta za voćarstvo u Čačku, bolesti povrća sa istraživačima iz Instituta za povrtarstvo u Smederevskoj Palanci, viroze šećerne repe sa saradnicima Zavoda za selekciju šećerne repe u Aleksincu i stručnjacima Instituta za poljoprivredna istraživanja „dr Petar Drezgić” u Sremskoj Mitrovici, itd. Neprestano učenje, razvijanje i usvajanje novih metoda naučnoistraživačkog rada, prihvatanje i rešavanje novouočenih problema, formiranje radnih grupa i sinhronizacija različitih polaznih tačaka i principa rada je jedna od karakteristika naučnoistraživačkog rada prof. D.Šutića.

Naučnoistraživački rad na Katedri za fitopatologiju razvijao je kroz višestruku saradnju. Razvoj i napredovanje saradnika pratio je stalnim prisustvom njihovim istraživanjima, kao i tokom redovnih konsultacija. Veoma često je išao i na proizvodna polja i u zasade gde je sa stručnjacima iz proizvodnje razmatrao prirodno uočene biljne bolesti, kao i mere zaštite.

Obimna je lista fitopatoloških problema čijem je rešavanju prof. D. Šutić dao odlučujuće doprinose. Ovde se, između ostalih, navode:

- Plamenjača paprike, mikozno oboljenje, koje se u pustošućim razmerama pojavilo u nas sedamdesetih godina XX veka,

- Stolbur paprike, paradajza i dr. *Solanaceae*, fitoplazmozno oboljenje,
- Bakterioze paradajza,
- Bakterioze koštičavog voća,
- Virusne bolesti kukuruza, pšenice i ječma, koje su, kod nas i u svetu, privukle pažnju šezdesetih godina XX veka,
- Rizomanija, virusno oboljenje, koje je sedamdesetih i osamdesetih godina XX veka kod nas i u nekim drugim zemljama ugrozilo gajenje šećerne repe,
- Šarka šljive, virusno oboljenje, koje je i danas u progresiji i koje ugrožava gajenje šljive, breskve i kajsije u jugoistočnoj Evropi,
- Crvenilo kukuruza, bolest koja kada se javi u epifitotičnim razmerama kompromituje proizvodnju kukuruza, itd.

Prof. D. Šutić je i u nauci ostvario izuzetne rezultate. Brojna su njegova otkrića, među kojima su najznačajnija:

- Nove vrste i sojevi fitopatogenih bakterija, koji ranije nisu bili poznati,
- Postojanje sojeva kod virusa šarke šljive (opisao je tri soja – žuti, intermedijarni i nekrotični soj tog virusa),
- Brojni novi domaćini virusa šarke šljive,
- Novi vektori virusa šarke šljive,
- Izazivanje promena kod virusa mozaika duvana zamenom baza u nukleinskoj kiselini virusne čestice,
- Novi, ranije nepoznati soj virusa mozaika duvana,
- Prenošnje virusa mozaika lucerke i virusa mozaika duvana semenom paprike,
- Mogućnost oporavka, odnosno prizdravljenja šljive i drugih biljaka zaraženih virusom šarke šljive,
- Postojanje generativne otpornosti, odnosno genotipova šljive manje osetljivih i otpornih prema virusu šarke,
- Manje osetljivi i delimično tolerantni genotipovi šećerne repe na rizomaniju,
- Vegetativna otpornost, koja se može koristiti u suzbijanju šarke šljive. To je jedno od najznačajnijih otkrića prof. D. Šutića. To je otkriće značajno ne samo za nas već i šire, za sve rejone u kojima se šljiva gaji. Tu otpornost prof. Šutić je otkrio kod nekih formi iz roda *Prunus*. Dalje, otkrio je i utvrdio da se ta otpornost prenosi kalemljenjem na šljivu, i zbog tog načina prenošenja nazvao je vegetativnom otpornošću. Najnovija istraživanja su potvrdila otkrića prof. Šutića. S obzirom na prirodu te otpornosti i način prenošenja, može se očekivati da će taj fenomen biti detaljnije proučavan i da će naći značajniju primenu u zaštiti šljive i drugog koštičavog voća od virusa šarke šljive. Dakle, pored veoma vrednih rezultata, prof. D.

Šutić je u nasleđe ostavio i ideje, odnosno nadahnuća za sledeće generacije fitopatologa.

Marljivim i sistematskim radom, baziranom na ličnim i izuzetnim mogućnostima, izgradio je sebe u naučnog radnika, odnosno istraživača od nacionalnog i međunarodnog značaja.

Sam ili u saradnji publikovao je oko 170 naučnih radova. Trećinu tih radova objavio je u vodećim svetskim časopisima, među kojima su *Nature*, *Phytopathologische Zeitschrift* (Journal of Phytopathology), *Phytopathology*, *Ann. Phytopathol.*, *Phytopath. Medit.*, *Agronomie*, *Acta Horticulturae* i dr. Presudno je uticao da naša fitopatološka nauka dobije svoj duh prepoznatljiv i u međunarodnim naučnim krugovima.

I međunarodna saradnja prof. D. Šutića bila je raznovrsna i plodna, odnosno vrlo uspešna. Rukovodio je i/ili bio glavni istraživač u nekoliko međunarodnih naučnoistraživačkih projekata. Ovde se posebno mogu navesti tzv. „kontrapart projekti”, koji su postojali između SAD i tadašnje Jugoslavije. U okviru tih projekata i van njih sarađivao je sa brojnim međunarodnim pregaocima u nauci. Sa vrlo dugačke liste, koja sadrži oko hiljadu imena najpoznatijih fitopatologa iz čitavog sveta, mogu se izdvojiti: Lelliot R.A., Posnette A.F. i Cropley R., iz Engleske; Rademacher B., Kunze I., Marwitz R. i Klinkowski M. iz Nemačke; Canova A., i Graniti A., iz Italije, Nemeth M. i Klement Z., iz Mađarske; Bovey R. iz Švajcarske; Parmentier G. iz Belgije; Bos L. iz Holandije; Byrgianidis G. iz Grčke; Vukovitz G. iz Austrije; Kristenscen R. iz Danske; Blattny O. iz Čehoslovačke; Atanasoff D., Hristov A. i Kovačevski I. iz Bugarske; Dunin M. O. iz Rusije; Verderevskaja T.D. iz Ukrajine; Miličić D. i Juretić N. iz Hrvatske, Goodman R. i Fulton R. iz SAD.

Posebno uspešnu saradnju ostvario je sa W.J. Dowson-om i B. Kassanis-om iz Engleske, sa J. Dunez-om, J. Souty-em, G. Viennot-Bourgin-om, G. Morrivan-om i A. Vuittenez-om iz Francuske, sa A. Macovei-em i Alice Savulescu iz Rumunije, kao i sa R.E. Ford-om, J.B., Sinclair-om, T. Pine-om i K. Maramorosch-om iz SAD.

Učestvovao je u radu brojnih međunarodnih i nacionalnih naučnih skupova. Pored prikazivanja svojih rezultata predsedavao je i radom brojnih sekcija. Za neke od tih skupova bio je i inicijator i organizator prvog okupljanja. Predavao je po pozivu na nekoliko univerziteta u Evropi i SAD.

Bio je član radakcionih odbora međunarodnih časopisa:

- *Phytopathologische Zeitschrift* (Journal of Phytopathology) (Blackwell Wissenschaft – Verlag GmbH, Berlin, Nemačka),
 - *Phytopathologica Mediterranea* (Firenza, Italija).
- Pored članstva u Francuskoj poljoprivrednoj akademiji bio je i član:
- Saveta Mediteranske fitopatološke unije (Firenca, Italija),

- Međunarodnog komiteta za taksonomiju virusa (I.C.T.V.),
- Međunarodnog komiteta za saradnju u proučavanju viroza voćaka (I.C.H.V.),
- Predsedništva za proučavanje viroza voćaka u Evropi,
- Evropske radne grupe za proučavanje šarke šljive (koordinator) i
- Jedan od osnivača i utemeljivača Evropske radne grupe za proučavanje viroza *Gramineae*-a, čiji je prvi sastanak održan u Beogradu.

Članstvo u brojnim međunarodnim naučnim institucijama i forumima su svojevrsno priznanje D. Šutiću za naučnoistraživački rad i ostvarene rezultate. Koliko je bio cenjen i uvažavan od strane fitopatologa a posebno od strane biljnih virologa širom sveta pokazuje i jedna pesma o šarki šljive. Prof. D. Šutić je bio jedan od najpoznatijih istraživača tog opasnog i veoma štetnog oboljenja. Za Osmi međunarodni simpozijum o virozama voćaka, koji je održan 1970. godine u Bordou, Francuska, R. Kristensen, poznati istraživač iz Danske, napisao je jednu pesmu o šarki šljive. Evo dela iz te pesme:

... „After many years of travelling
you are known by several men,
Šutić, Schmid, van Osten, Kunze
just to mention few of them”.

Tu su pesmu pevali učesnici pomenutog skupa na završnoj večeri. Veliko priznanje i za šarku šljive i za prof. Šutića. Tako je, može se reći, D. Šutić, od seoskog deteta preko gimnazijalca iz Čuprije, vojne akademije i zarobljenika u Nemačkoj, završavanja dva fakulteta, sa univerzitetskom karijerom i brojnim otkrićima stigao do svetski poznatog i priznatog naučnika, ili, kako je on sam često isticao „od seljačeta do člana Francuske poljoprivredne akademije”.

Prof. D. Šutić je bio i društveno aktivan. Bio je šef Katedre za fitopatologiju, član Saveta i raznih komisija na Poljoprivrednom fakultetu, član Kolegijuma za elektronsku mikroskopiju Univerziteta u Beogradu, član Saveta Instituta za zaštitu bilja i životnu sredinu u Beogradu, potpredsednik Društva za zaštitu bilja Srbije, predsednik Upravnog odbora Poslovne zajednice za zaštitu bilja u Beogradu, potpredsednik Jugoslovenskog fitopatološkog društva, predsednik Društva mikrobiologa Srbije, predsednik Saveza društava mikrobiologa Jugoslavije, itd. Bio je član izdavačkih odbora više časopisa kod nas, među kojima su: *Arhiv za poljoprivredne nauke* (Beograd), *Zbornik radova Poljoprivrednog fakulteta* (Beograd), *Savremena poljoprivreda* (Novi Sad), *Biljni lekar* (Beograd, sada Novi Sad), itd.

Prof. D. Šutić je posedovao i veoma pozitivne ljudske osobine. Bio je visokomoralan i častan, ponosan i dostojanstven, skroman i nenametljiv. Živeo je i

radio sa verom u ljude. Kako studentima tako i saradnicima je posvećivao punu, odnosno potrebnu pažnju. Nesebično je doprinosaio obrazovanju i usavršavanju, odnosno razvoju mladih istraživača. Zahvaljujući njegovim međunarodnim kontaktima desetine mladih fitopatologa iz naše zemlje bilo je na usavršavanju, magistarskim, doktorskim i postdoktorskim studijama na najpoznatijim univerzitetima širom sveta. Uvek je bio spreman da pomogne svakom saradniku, kako na razvojnem putu tako i u ličnom životu. Pratio je razvoj saradnika i radovao se uspesima. Razvoj naučne oblasti poistovećivao je sa formiranjem istraživačkog kadra, odnosno sa razvojem i usavršavanjem mladih istraživača.

Prof. D. Šutić je dobitnik brojnih priznanja, kako u zemlji tako i u inostranstvu. Između ostalih mogu se navesti Počasna plaketa Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Beogradu, Povelja Saveza društava za zaštitu bilja Jugoslavije, Povelja Poslovne zajednice za zaštitu bilja iz Beograda, Plaketa Instituta za voćarstvo iz Čačka, Orden Republike sa srebrnim vencem, itd. Dobio je velika priznanja i od svojih kolega iz sveta. P. Boxus (Belgija) je za otkrivanje vegetativne otpornosti rekao da je „revolucionarno otkriće”. Rezultati prof. D. Šutića citirani su u dvadesetak najpoznatijih u svetu udžbenika biljne virologije. L. Bos (Holandija) napisao je sledeću ocenu o prof. D. Šutiću: „You are not only a master in the field of Plant Virology, as shown by your earlier two books on Plant virology and Plant Virus Diseases, but also in Plant Pathology as a whole”. Evo i izvoda iz jedne ocene o knjizi *Anatomy and Physiology of Diseased Plants* (Phytopathology news, July, 1991): „... It is to serve a wide variety of plant scientists and to stimulate further research in plant pathology with the ultimate goal of developing new and inovative methods for the control of plant diseases”. Evo i dela izvoda iz recenzije iste knjige, koju je dao prof. M. Džamić „... na osnovu svog velikog i vremenski dugog i posebno uspešnog naučnog i stručnog iskustva, sa svojim originalnim pristupom... svojim originalnim tekstom pisac često otkriva nove probleme u domenu ove materije i čini ih dovoljno provokativnim i privlačnim za dalja istraživanja”. Profesor D. Šutić je, kako je to već izneto, rešavao najznačajnije fitopatološke probleme a njegovi naučni i stručni tekstovi sadrže brojne ideje i sugestije za dalja istraživanja. Zbog toga će u istraživačkom žaru novih generacija fitopatologa, kako kod nas tako i šire, biti prisutne i iskre koje potiču iz rada i ideja D. Šutića.

Osvajanjem nauke i sveta D. Šutić nije izgubio sebe. Ostao je veran ljudskim vrednostima koje su u njegovu ličnost ugradili poreklo, roditelji, roditeljski dom i vaspitanje, zatim škola i posleškolski razvoj. Veoma je cenio svoje profesore i iz gimnazije i sa univerziteta, koji su u njemu prepoznali, otkrili i razvijali njegove velike mogućnosti kojima je raspolagao. U svakom pojedinačnom trenutku svog života i rada ispoljavao je odgovornost i osećaj za budućnost.

Sledio je svoj put – put učenja i sticanja novih znanja. Time je doprineo hodu – razvoju nauke. Nije bilo ni razloga niti uslova zbog kojih bi skrenuo sa tog svog životnog puta.

U privatnom životu D. Šutić je, takođe, bio primer. Svoje ljudske, odnosno vrlo pozitivne osobine, koje je delio sa suprugom Marijom, takođe profesorom univerziteta, prenosio je i ugradio u njihove potomke, sina Miroslava, kćerke Branislavu i Dragoslavu. Neizmerno je bio pažljiv i prema veoma cenjenim i nadasve voljenim unucima Ani, Ivanu, Sonji i Nikoli. Roditeljski odnos imao je i prema snahi Milini i zetovima Srećku i Pavlu. Svoju porodicu smatrao je najvećim darom njemu i Mariji koji priroda može dati. Njihov dom je uvek bio otvoren za prijatelje, kolege i poznanike, kako iz zemlje tako i iz inostranstva. Bili su veoma gostoljubivi i ljude su primali ljubazno i otvorenog srca. Posete i topli prijemi u domu porodice Šutić uvek su začinjali nova i trajna prijateljstva.

Smrt prof. dr Dragoljuba Šutića predstavlja nenadoknativ gubitak pre svega za njegovu porodicu, zatim za nauku i struku kojom se bavio, za kolege i saradnike, kao i za sve one koji su ga poznavali. Može se isto tako reći da je prof. D. Šutić prešao u legendu, koja će inspirisati i nadahnjivati sve one koji se nađu na putu daljeg razvoja fitopatologije, odnosno one koji nastave njegovo delo. Ta legenda će doprinositi u značajnoj meri osvetljavanju i usmeravanju daljeg razvoja fitopatološke nauke kod nas. Čin i delo prof. Šutića je ideal kojem treba težiti. Svi mi koji smo ga poznavali i sa njim radili ostajemo mu večno zahvalni.

„Phytopatological News”, SAD, javljajući o smrti Prof. Šutića pisale su: „International plant pathology lost a master of our science, Dragoljub Sutic, ...”

Neka mu je večna slava i hvala!

Prof. dr Mališa Tošić