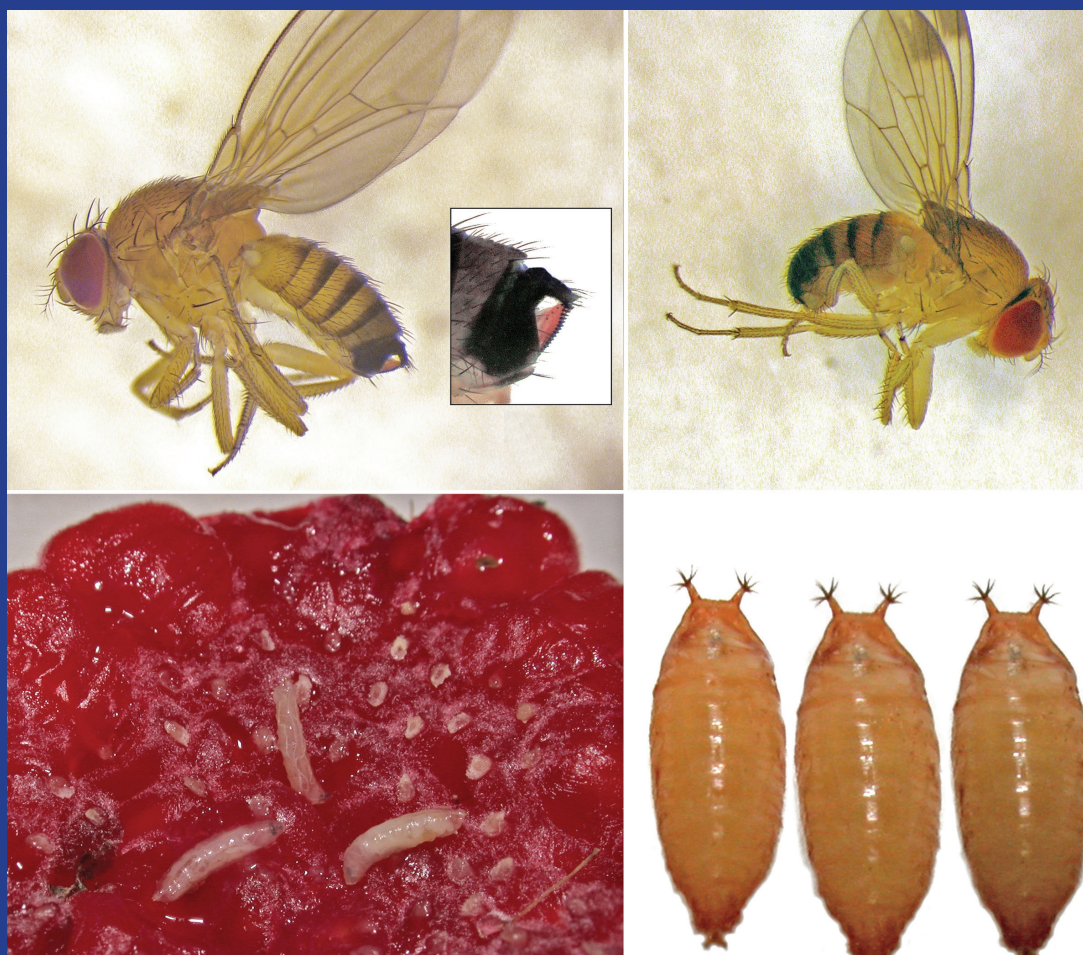


ZAŠTITA BILJA PLANT PROTECTION



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

ZAŠTITA BILJA PLANT PROTECTION

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

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

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

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

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

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

Uredništvo i administracija:
Editorial and Business staff:

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

Post office box 33-79

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

Fax: +381 11 2669-860



Drosophila suzukii - nova invazivna vrsta u Srbiji (I. Toševski)
Drosophila suzukii - a new invasive pest in Serbia (I. Toševski)

Glavni i odgovorni urednik – Editor in Chief

Dr Nenad Dolovac, Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu

Urednici – Editors

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

Redakcioni odbor – Editorial Board

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

SADRŽAJ

Naučni radovi

<i>Ivo Toševski, Slobodan Milenković, Oliver Krstić, Andrea Kosovac, Miljana Jakovljević, Milana Mitrović, Tatjana Cvrković, Jelena Jović</i> DROSOPHILA SUZUKII (MATSUMURA, 1931) (DIPTERA: DROSOPHILIDAE), A NEW INVASIVE PEST IN SERBIA.....	99-104
<i>Marina Lazarević, Nataša Duduk, Miljan Vasić, Ivana Vico</i> PENICILLIUM POLONICUM - PROUZROKOVAČ PROPADANJA LUKOVICA CRNOG LUKA U SKLADIŠTU.....	105-110
<i>Danijela Ristić, Snežana Pavlović, Nenad Trkulja, Erika Pfaf Dolovac, Nenad Dolovac, Mira Starović</i> FUSARIUM SPP. - PATOGENI SEMENA NEVENA (CALENDULA OFFICINALIS L.) U SRBIJI.....	111-116
<i>Veljko Gavrilović, Rade Stanisavljević, Stefan Stošić, Miloš Stevanović, Goran Aleksić, Milica Stajić, Nenad Dolovac</i> ISPITIVANJE OTPORNOSTI SORATA KRUŠKE PREMA ERWINIA AMYLOVORA METODOM INOKULACIJE NESAZRELIH PLODOVA.....	117-123
<i>Svetlana Živković, Saša Stojanović, Jelica Balaž</i> MORFOLOŠKE KARAKTERISTIKE IZOLATA COLLETOTRICHUM SPP. - PROUZROKOVAČA ANTRAKNOZE.....	124-136

CONTENTS

Scientific papers

- Ivo Toševski, Slobodan Milenković, Oliver Krstić, Andrea Kosovac,
Miljana Jakovljević, Milana Mitrović, Tatjana Cvrković, Jelena Jović*
DROSOPHILA SUZUKII (MATSUMURA, 1931) (DIPTERA: DROSOPHILIDAE),
NOVA INVAZIVNA VRSTA U SRBIJI.....99-104
- Marina Lazarević, Nataša Duduk, Miljan Vasić, Ivana Vico*
PENICILLIUM POLONICUM – CAUSAL AGENT
OF ONION BULB DECAY IN STORAGE.....105-110
- Danijela Ristić, Snežana Pavlović, Nenad Trkulja,
Erika Pfaf Dolovac, Nenad Dolovac, Mira Starović*
FUSARIUM SPP. – PATHOGENS OF CALENDULA SEED
(CALENDULA OFFICINALIS L.) IN SERBIA.....111-116
- Veljko Gavrilović, Rade Stanisavljević, Stefan Stošić,
Miloš Stevanović, Goran Aleksić, Milica Stajić, Nenad Dolovac*
ESTIMATION OF RESISTANCE PEAR CULTIVARS TO ERWINIA AMYLOVORA
USING ARTIFICIAL IMMATURE PEAR FRUITS METHOD.....117-123
- Svetlana Živković, Saša Stojanović, Jelica Balaž*
MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF ISOLATES OF
COLLETOTRICHUM SPP. – CAUSAL AGENTS OF ANTHRACNOSE.....124-136

Plant Protection
Vol. 65 (3), N°289, 99-104, 2014, Belgrade
Zaštita bilja
Vol. 65 (3), N°289, 99-104, 2014, Beograd

UDK: 595.772(497.11)"2014"

Scientific paper
Naučni rad

***DROSOPHILA SUZUKII* (MATSUMURA, 1931) (DIPTERA: DROSOPHILIDAE), A NEW INVASIVE PEST IN SERBIA**

IVO TOŠEVSKI¹, SLOBODAN MILENKOVIĆ², OLIVER KRSTIĆ¹,
ANDREA KOSOVAC¹, MILJANA JAKOVLJEVIĆ¹, MILANA MITROVIĆ¹,
TATJANA CVRKOVIĆ¹, JELENA JOVIĆ¹

¹Institute for Plant Protection and Environment, Department of Plant Pests, Zemun

²Megatrend University, Faculty of Biofarming, Bačka Topola,
e-mail:tosevski_ivo@yahoo.com

SUMMARY

During October and November 2014, a survey was conducted in order to establish the presence of the invasive pest *Drosophila suzukii* (Matsumura, 1931) on the territory of Serbia. Survey revealed the presence of this fly in four districts (Rasinski, Mačvanski, Raški and Pčinjski), in sampled raspberry and blackberry ripe fruits, as well as in common fig and grape. Collected fruits were used for the rearing of Drosophilid larvae to adults, which were subsequently subjected to morphological and molecular characterization. The presence of *D. suzukii* was confirmed in all surveyed districts, as well as in Zemun (City of Belgrade). This is the first report of the highly invasive fruit pest *D. suzukii* on the territory of Serbia.

Key words: *Drosophila suzukii*, new invasive pest, Serbia

INTRODUCTION

Spotted wing drosophila (SWD) or *Drosophila suzukii* (Matsumura, 1931) is a highly polyphagous invasive species originating from South East Asia. Expanding distribution in past several years undoubtedly confirmed a high potential of this species to disperse. The first record out of the native range is related with Hawaii islands where *D. suzukii* colonized both islands during 1980 (Hauser, 2011). For the first time, *D. suzukii* was recorded in North America at the beginning of autumn 2008 in California, with rapid spread during 2009 along the west coast of and deep penetration inside the mainland, while in 2010, *D. suzukii* adults were recorded along the east coast of United States, as well as in Canada (Hauser, 2011).

Parallel to the events in North America, *D. suzukii* was reported in 2008, first in Spain and in the late autumn in Italy and France. Over the following years, this species was reported in several countries in Europe, confirming once again an

extraordinary fast ability of long distance dispersal (Calabria et al., 2012; Mortelmans et al., 2012; Bau-feld et al., 2010; Burrack et al., 2012). Subsequent records of *D. suzukii* are related with Slovenia and Croatia (Milek et al., 2011), Bosnia and Herzegovina (Ostojić et al., 2014) and Montenegro in 2014 (Radonjić, 2014, personal communication). In the short period of time, *D. suzukii* became one of the worst pests, particularly on berry and cherry fruits, while the impact on vineyards is also of concern especially in the temperate regions (Saguez, 2013).

A total of three *Drosophila* species are ascribed within the *D. suzukii* species subgroup of Oriental distribution that phylogenetically belongs to the *Drosophila melanogaster* species group: *Drosophila suzukii* (Matsumura, 1931), *D. pulchrella* Tan, 1949 and *D. subpulchrella* Takamori and Watabe, 2006. All three species are characterized by the two black spots on male wings while female possesses a pronounced serrated ovipositor (Takamori et al., 2006). Thus far, *D. suzukii* is the only species of the *D. melanogaster* group in Europe characterized

by a serrated ovipositor present in females and spotted wings present in males.

During October 2014, we received samples of drosopholid larvae from surroundings of the village Vrdila (near Kraljevo, Raški district), with general concern of raspberry producers that these larvae may cause particular losses in raspberry and blackberry plantations. Molecular analysis of the larvae confirmed that larvae belong to the *Drosophila suzukii*. Having in mind that the presence of SWD was not reported for Serbia, a comprehensive survey was performed during October and November to locate distribution of the new pest in the main regions where cultivation of raspberry and blackberry is dominant agricultural activity. Thus, results in this paper represent preliminary knowledge about the presence of spotted wing drosophila *Drosophila suzukii* in Serbia with its confirmed and predicted distribution.

MATERIAL AND METHODS

Insects sampling

The survey was conducted from the beginning of October to the end of November 2014. We have primarily collected ripe fruits of raspberry, blackberries and grapevine from commercial plantations or individual plants from Central Serbia (village Latkovac, Rasinski district), north-west Serbia (Zavlaka, Mačanski district), south-west Serbia (village Vrdila, Raški district), while individual samples of raspberry and figs fruit (*Ficus carica*, Moraceae) were collected from south Serbia (Vranje, Pčinjski district) and Zemun (Territory of Belgrade) (Table 1). Taking into account that the period of sampling was conducted in late autumn and that outdoor temperature was too low to identify SWD presence, we have concentrated our sampling efforts on collecting ripe fruits that may contain *D. suzukii* larvae. Approximately 100 of ripe fruits per sample were collected and set inside well ventilated plastic box (17 x 11 x 6 cm). Subsequently the fruits were transferred into laboratory conditions for rearing at 24°C ±1 in day/night regime 16/8 hours. The emerged adults were kept inside a rearing box for the following 3 days, when collected by a mouth aspirator, and stored in 96% ethanol at 5–7 °C until morphological and molecular analysis.

Morphological and molecular identification of *Drosophila suzukii*

Morphological identifications were taken under a stereomicroscope Leica MS5, and confirmed by a molecular analysis by sequencing the barcoding region of the cytochrome oxidase subunit 1 gene (COI) of the emerged adults from the particular sampling locality (Table 1).

Individual adults were punctured between the 2nd and 3rd thoracic sternites, and total DNA was extracted using the QIAGEN Dneasy® Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. The barcoding region of the mitochondrial cytochrome oxidase subunit I gene (mtCOI) was amplified using the primers (Folmer *et al.*, 1994) LCO1490 (5'-GGT-CAACAAATCATAAAGATATTGG-3') and HCO2198 (5'-TAAACTTCAGGCTGACCAAAAAATCA-3').

Polymerase chain reaction (PCR) was performed in a 20 µL final volume containing Kapa Biosystems High Yield Reaction Buffer A with 1.5 mM MgCl₂ (1×), an additional 2.25 mM of MgCl₂, 0.6 mM of each dNTP, 0.5 µM of each primer, 1 U of KAPATaq DNA polymerase (Kapa Biosystems, Inc., Woburn, MA, USA) and 1 µL of DNA extract. PCR cycles were carried out in a Mastercycler ep gradient S (Eppendorf, Hamburg, Germany) applying the following thermal steps for amplification of the COI barcoding region: 95 °C for 5 min (initial denaturation), 35 cycles at 94 °C for 1 min, 54 °C for 1 min (annealing), 72 °C for 1.5 min and a final extension at 72 °C for 7 min. The amplified products of the mt-COI gene were sequenced with the forward primer only. The sequencing was performed on an ABI Prism 3700 automated sequencer using the commercial services of Macrogen Inc. (Seoul, South Korea). Sequence of COI gene was deposited in the GenBank database under accession number KP233882).

RESULTS

According to our preliminary study, the presence of the *D. suzukii* was confirmed in all sampled material from five districts in Serbia, i.e. from Rasinski, Raški, Mačvanski, Pčinjski and City of Belgrade (Fig 1.). Sequence analysis of the selected specimens from all districts where *D. suzukii* was recorded, confirmed 100% identity of Serbian *D. suzukii* with COI gene sequence HM636439 from Spain (Calabria *et al.*, 2012).

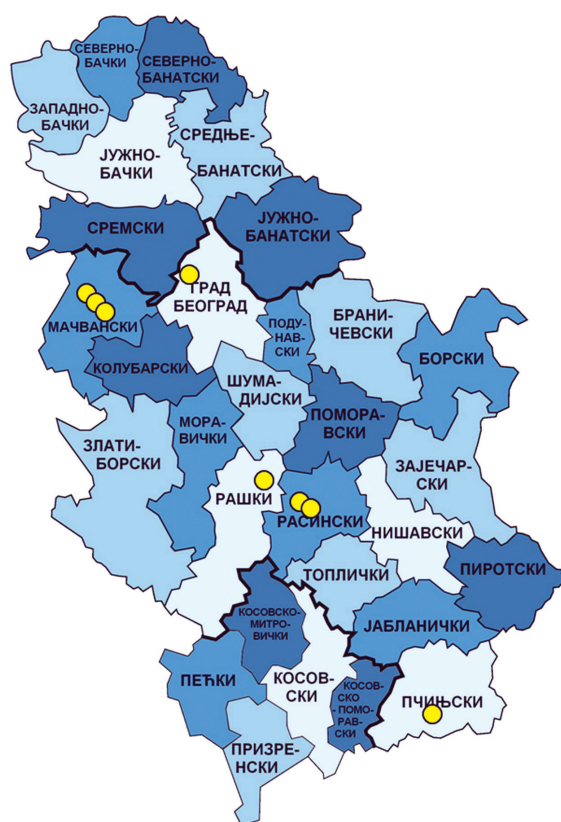


Figure 1. Confirmed distribution of *Drosophila suzukii* on the territory of Serbia in autumn 2014.
Slika 1. Potvrđeno rasprostranjenje *Drosophila suzukii* na teritoriji Srbije u jesen 2014. godine.

In morphological sense, specimens of *D. suzukii* do not differ from the specimens of this species recorded in other parts of Europe. Adults are approximately 2-3 mm in length with females slightly larger than males. The females of *D. suzukii* are habitually similar to *D. melanogaster* but comparing to latter, they possess a distinctly serrate ovipositor (Fig. 2 - A, B) which allows them to break the skin of healthy fruits. The males possessed pronounced black sub-apical spot on the forewing (Fig. 2 - C). These two morphological characters clearly distinguish *D. suzuki* from other *Drosophila* species distributed in Serbia.

The eggs of *D. suzukii* are white and glossy, on average 0.6 x 0.2 mm wide with two subapical dorsal appendages. There are three larval instars that range in size 0.7 – 9 mm white to cream in colour with visible internal organs and cephalopharyngeal skeleton (Fig. 2 - D). The pupae of *D. suzukii* are brown in color and about 3 mm long and by 1 mm wide with anterior spiracles on both sides of the head (Fig. 2 - E).

In our collected material, *D. suzukii* was the

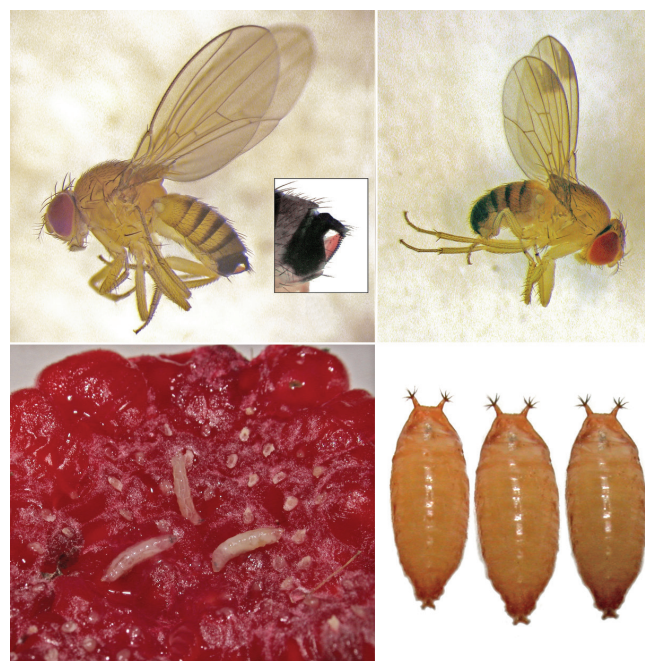


Figure 2. *Drosophila suzukii*, collected from the village Latkovac, Aleksandrovac region (Rasinski district): A – female; B – serrate ovipositor (detail); C – male with typical black spots subapically; D – L3 larvae inside raspberry fruit; E – pupae.
Slika 2. *Drosophila suzukii*, sakupljena u selu Latkovac, okolina Aleksandrovca (Rasinski okrug): A – ženka, B – nazubljena legalica; C – mužjak sa tipičnim crnim tačkama na krilima; D – larve L3 stadijuma u plodu maline; E – lutke.

most abundant in Mačvanski district (Zavlaka) where 87 adults emerged from 100 raspberry fruits and in Raški district (Vrdila, Kraljevo) with 65 adults from blackberry sample (Table 1). Taken together, *D. suzukii* was a dominant species in our sampled material from all surveyed districts, while presence of other *Drosophila* species (*D. melanogaster* and *D. phalerata*), especially in raspberry and blackberry fruit samples was negligible (Table 1). In addition, we frequently recorded presence of *D. suzukii* in common fig fruits, where this species co-occurred with *D. simulans*, *D. melanogaster*, *D. immigrans*, *D. phalerata* and *D. repleta* (Table 1).

DISCUSSION

The preliminary distribution of the drosophilid species sampled in the Serbian districts is given in Table 1. It is worth noting that sampling period for *D. suzukii* was not optimal for collection of more precise data in regard to its frequency in the attacked fruit. Consequently, obtained results led to conclusion that this new pest is widely distributed in Ser-

Table 1. Abundance of *Drosophila* species reared from the collected fruit samples on the territory of Serbia during autumn 2014.**Tabela 1.** Prisutnost vrsta *Drosophila* odgajenih na uzorcima voća na teritoriji Srbije u jesen 2014. godine.

Locality (district)	GPS coordinate	Total number of samples	host fruit	Emergence	
				total number	<i>Drosophila</i> species (frequency)
Latkovac (Rasinski)	N43 30.127 E20 58.737, 748M	6	raspberry	36	<i>D. suzukii</i> (31)
					<i>D. melanogaster</i> (2)
					<i>D. phalerata</i> (3)
			raspberry	28	<i>D. suzukii</i> (25)
					<i>D. melanogaster</i> (1)
			<i>D. phalerata</i> (2)		
Aleksandrovac (Rasinski)	N43 27.595 E21 02.280, 378M	1	common fig	68	<i>D. suzukii</i> (15)
					<i>D. melanogaster</i> (1)
					<i>D. phalerata</i> (1)
					<i>D. repleta</i> (1)
					<i>D. suzukii</i> (15)
					<i>D. melanogaster</i> (1)
Latkovac (Rasinski)	N43 30.127 E20 58.737, 748M	8	raspberry	16	<i>D. suzukii</i> (14)
				14	<i>D. suzukii</i> (21)
				21	<i>D. suzukii</i> (12)
				12	<i>D. suzukii</i> (25)
			blackberry	25	<i>D. suzukii</i> (15)
				15	<i>D. suzukii</i> (10)
Zavlaka (Mačvanski)	N44 28.474 E19 28.994, 239M	3	raspberry	8	<i>D. suzukii</i> (8)
				25	<i>D. suzukii</i> (25)
				87	<i>D. suzukii</i> (87)
				42	<i>D. suzukii</i> (42)
Maovi (Mačvanski)	N44 41.882 E19 37.034, 103M	1	common fig	2	<i>D. suzukii</i> (2)
Varna (Mačvanski)	N44 39.555 E19 39.275, 140M	1	common fig	3	<i>D. suzukii</i> (3)
Kraljevo (Raški)	N43 42.520 E20 33.360, 256M	2	blackberry	65	<i>D. suzukii</i> (61)
			blackberry	2	<i>D. melanogaster</i> (4)
Zemun (City of Beograd)	N44 51.320 E20 22.630, 92M	2	common fig	6	<i>D. suzukii</i> (2)
				32	<i>D. suzukii</i> (6)
					<i>D. suzukii</i> (8)
Vranje (Pčinjski)	N42 33.150 E21 54.030, 467M	1	common fig	75	<i>D. immigrans</i> (24)
					<i>D. suzukii</i> (18)
					<i>D. melanogaster</i> (22)
					<i>D. simulans</i> (35)

bia, with populations established at altitude from 70–800m. Therefore, we expect that *D. suzukii* is already present in several other important districts in Serbia with predominant agricultural production of raspberry and blackberry. Recorded widespread of this invasive organism in Serbia is in concordance with the fast spread across Western Europe and it is

of objective concern for further production of fruits in regions where *D. suzukii* is established. Taking into account the experience of other European countries (Cini et al., 2012, EPPO), the presence of *D. suzukii* consequently leads to serious changes in the strategy of cultivation of the most targeted fruit cultures, in the first place cherry, raspberry and black-

berry. The territory of Serbia is especially suitable for bio-ecological demands of *D. suzukii* because of the temperate climate. In addition, cultivation of raspberry and blackberry are main activities in hilly regions in central and western part of Serbia. Therefore, we expect that the new invasive *Drosophila* species will substantially change the production strategy of fruits in further period.

ACKNOWLEDGEMENTS

Results of this research were funded by Plant Protection Directorate, Ministry of Agriculture, Forestry and Water Management of Republic of Serbia, contract number 321-01-134/2014-11 and by research grant from the Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia, No. III43001 and TR31043.

REFERENCES

- Baufeld, P., Schrader, G., Unger, J. G. (2010): Die Kirschessigfliege: *Drosophila suzukii*-Ein neues Risiko für den Obst-und Weinbau. Journal für Kulturpflanzen, 62(5): 183-186.
- Burrack, H. J., Smith, J. P., Pfeiffer, D. G., Koeher, G., Laforest, J. (2012): Using volunteer-based networks to track *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) an invasive pest of fruit crops. Journal of Integrated Pest Management, 3(4), B1-B5.
- Bulletin OEPP/EPPO Bulletin (2013) 43 (3), 417-424. http://www.eppo.int/QUARANTINE/Alert_List/insects/Drosophila_suzukii_factsheet_12-2010.pdf
- Calabria, G., Máca, J., Bächli, G., Serra, L., Pascual, M. (2012): First records of the potential pest species *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) in Europe. Journal of Applied entomology, 136(1-2): 139-147.
- Cini, A., Ioriatti, C., Anfora, G. (2012): A review of the invasion of *Drosophila suzukii* in Europe and a draft research agenda for integrated pest management. Bulletin of insectology, 65(1): 149-160.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R. (1994): DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Molecular marine biology and biotechnology, 3: 294-299.
- Hauser, M. (2011): A historic account of the invasion of *Drosophila suzukii* (Matsumura)(Diptera: Drosophilidae) in the continental United States, with remarks on their identification. Pest management science, 67(11): 1352-1357.
- Milek, T. M., Seljak, G., Šimala, M., Bjeliš, M. (2011): First record of *Drosophila suzukii* (Matsumura, 1931)(Diptera: Drosophilidae) in Croatia. Glasilo Biljne Zaštite, 11(5): 377-382.
- Mortelmans, J., Casteels, H., Beliën, T. (2012): *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae): A pest species new to Belgium. Belgian Journal of Zoology, 142(2): 143-146.
- Ostojić I., Bulić P., Zovko M., Petrović D., Dogan V. (2014): Ocatana mušica ploda (*Drosophila suzukii* Matsumura, 1931) – Novi član entomofaune u Bosni i Hercegovini. XI Simpozijum o zaštiti bilja u Bosni i Hercegovini, Teslić, 2014.
- Saguez, J., Lasnier, J., & Vincent, C. (2013): First record of *Drosophila suzukii* in Quebec vineyards. Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin, 47(1): 69-72.
- Takamori, H., Watabe, H. A., Fuyama, Y., Zhang, Y. P., Aotsuka, T. (2006): *Drosophila subpulchrella*, a new species of the *Drosophila suzukii* species subgroup from Japan and China (Diptera: Drosophilidae). Entomological science, 9(1): 121-128.

(Received: 28.11.2014.)

(Accepted: 18.12.2014.)

***DROSOPHILA SUZUKII* (MATSUMURA, 1931) (DIPTERA: DROSOPHILIDAE), NOVA INVAZIVNA VRSTA U SRBIJI**

IVO TOŠEVSKI¹, SLOBODAN MILENKOVIĆ², OLIVER KRSTIĆ¹,
ANDREA KOSOVAC¹, MILJANA JAKOVLJEVIĆ¹, MILANA MITROVIĆ¹,
TATJANA CVRKOVIĆ¹, JELENA JOVIĆ¹

¹Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Odsek za štetočine bilja, Zemun

²Univerzitet Megatrend, Fakultet za Biofarming, Bačka Topola
e-mail:tosevski_ivo@yahoo.com

REZIME

Tokom oktobra i novembra 2014. godine, sprovedena su istraživanja u cilju utvrđivanja prisustva i rasprostranjenja invazivne štetočine *Drosophila suzukii* (Matsumura, 1931) na teritoriji Srbije. Prisustvo ove mušice je utvrđeno u okviru četiri okruga (Rasinski, Mačvanski, Raški, Pčinjski), u uzorkovanim plodovima maline, kupine, smokve i grožđa. Iz plodova su odgajene Drozofilidne larve do adulta koji su zatim analizirani morfološki i molekularno. Prisustvo *D. suzukii* je utvrđeno na svim lokalitetima u okviru četiri okruga, kao i na teritoriji grada Beograda (Zemun). Ovo je prvi nalaz invazivne štetočine voća *D. suzukii* na teritoriji Srbije.

Ključne reči: *Drosophila suzukii*, nova vrsta štetočine, Srbija

(Primljeno: 28.11.2014.)

(Prihvaćeno: 18.12.2014.)

Zaštita bilja
Vol. 65 (3), N°289, 105-110, 2014, Beograd
Plant Protection
Vol. 65 (3), N°289, 105-110, 2014, Belgrade

UDK: 631.563:635.25
632.482.123.1
Naučni rad
Scientific paper

PENICILLIUM POLONICUM - PROUZROKOVAČ PROPADANJA LUKOVICA CRNOG LUKA U SKLADIŠTU

MARINA LAZAREVIĆ¹, NATAŠA DUDUK², MILJAN VASIĆ², IVANA VICO²

¹PSS Institut Tamiš d.o.o., Pančevo

²Univerzitet u Beogradu - Poljoprivredni fakultet, Beograd

e-mail: natasadukic@yahoo.com

REZIME

Penicillium polonicum je ekonomski važna gljiva sa širokim krugom domaćina, uključujući žitarice, kikiriki, lukove, sušeno meso, citrusne, jabuke i krtule jama. U januaru 2013. godine, u skladištu na teritoriji Stare Pazove prikupljeni su uzorci lukovica crnog luka cv. Meranto sa karakterističnim simptomima plave truleži. Iz obolelih lukovica dobijeni su izolati gljive čija je patogenost potvrđena inokulacijom zdravih lukovica. Na diferencijalnim podlogama izolati su formirali dobro razvijene, guste kolonije, plavozelene boje sa belim obodom, karakterističnog mirisa. Izolati nisu rasli na 37°C, dok je porast zabeležen na 5°C. Utvrđeno je da su izolati stvarali ciklopiazonsku kiselinu i druge alkaloidne. Konidiofore izolata su bile terverticilate, stipe septirane, tankih i glatkih zidova, a fialide cilindrične. Konidije su bile loptaste do elipsoidne, glatke i formirale su se u dugim lancima. Sekvence dobijenih amplikona veličine oko 800 bp dela gena za β -tubulin su u MegaBLAST analizi pokazali najvišu sličnost od 99% sa sekvencama istog regiona vrste *P. polonicum*. Na osnovu morfoloških i molekularnih osobina kao prouzrokovatelj propadanja lukovica crnog luka u skladištu identifikovana je gljiva *P. polonicum*.

Ključne reči: plava trulež, *Allium cepa*, identifikacija

UVOD

Crni luk (*Allium cepa* L.) je dvogodišnja biljka iz familije *Alliaceae*, koja je zahvaljujući svojim povoljnim osobinama odavno našla mesto u ljudskoj ishrani (Miladinović i sar., 1997; Đević i sar., 2004). Prema svetskoj godišnjoj proizvodnji od 47 miliona tona, proizvodnja crnog luka je na trećem mestu, odmah iza paradajza i kupusa (Đević i sar., 2004). U našoj zemlji je proizvodnja crnog luka široko rasprostranjena i glavni proizvodni centri su severni Banat i Bačka, Podrinje, okolina Prizrena, Pirota i Beograda (Miladinović i sar., 1997).

Kao najčešći prouzrokovatelj propadanja i truljenja lukovica u skladištu, navode se sledeće vrste fitopatogenih gljiva: *Aspergillus niger*, *A. alliaceus*, *Fusarium solani*, *F. oxysporum*, *Botrytis allii*, *B. cinerea*, *Rhizopus microsporus*, *R. stolonifer*, *Colletotrichum circinans*, *C. dematium* f. sp. *circinans* i *Penicillium* spp. (Schwartz and Mohan, 2008; Pitt and Hocking, 2009). Više vrsta iz roda

Penicillium mogu prouzrokovati plavu trulež ili plesnivost crnog luka, uključujući *P. aurantiogriseum*, *P. citrinum*, *P. digitatum*, *P. expansum*, *P. hirsutum*, *P. funiculosum* i *P. oxalicum* (Schwartz and Mohan, 2008).

Penicillium polonicum K. Zaleski je ekonomski važna aerobna gljiva sa širokim krugom domaćina, uključujući žitarice, kikiriki, lukove, sušeno meso, citrusne, jabuke i krtule jama (Frisvad and Samson, 2004; Andersen and Thrane, 2006; Kim et al., 2008). Ova vrsta stvara sekundarne metabolite, među kojima su štetni mikotoksini: penicilinska kiselina, verukozidin i nefrotoksični glikopeptidi (Frisvad and Samson, 2004).

S obzirom da su u Srbiji, zabeležene lukovice sa simptomima plave truleži, koje su izazvale ekonomske gubitke (Duduk et al., 2014), cilj ovog rada bio je identifikacija uzročnika propadanja luka u skladištu na osnovu morfoloških i molekularnih osobina u cilju potvrde njegovog prisustva u Srbiji.

MATERIJAL I METODE

Uzorkovanje i izolacija

U januaru 2013. godine, lukovice crnog luka (cv. Meranto) sa simptomima truleži prikupljene su iz skladišta u Staroj Pazovi. Izolacija je urađena prenošenjem isečaka tkiva iz unutrašnjosti trulih lukovica ili direktnim nanošenjem spora u Petri kutuje sa krompir dekstroznim agarom (KDA). Nakon 7 dana inkubacije na sobnoj temperaturi, razvijene kolonije su presejane u čiste kulture iz kojih su metodom iscrpljivanja dobijene monosporijalne kulture.

Provera patogenosti

Patogenost dobijenih izolata proverena je veštačkom inokulacijom po deset zdravih lukovica crnog luka sorte Meranto. Lukovice su oprane deterdžentom, isprane sterilnom vodom i zatim površinski sterilisane alkoholom. Pripremljene lukovice su postavljene u sterilisane posude u kojima je bio navlaženi filter papir. Na lukovicama su napravljene povrede (5x10 mm) u koje je uneto po 50 μ l suspenzije konidija, koncentracije 10^5 konidija/ml, dobijenih iz 10 dana starih kultura odgajanih na KDA. U povrede na kontrolnim lukovicama unešeno je 50 μ l sterilne destilovane vode. Inokulisane i kontrolne lukovice su inkubirane pri visokoj relativnoj vlažnosti i temperaturi od 22°C. Iz simptomatičnih lukovica reizolovana je gljiva radi potvrđivanja Kohovih postulata.

Morfološke karakteristike

Kod odabranih izolata iz lukovica crnog luka (L1a i L4p) ispitivane su makroskopske i mikroskopske morfološke odlike. Makroskopske odlike kolonije su praćene na KDA podlozi i na tri diferencijalne podloge: Čapekov agar sa kvaščevim ekstraktom (CYA), sladni agar (MEA) i kvaščev agar sa saharozom (YES). Podloge su zasejavane suspenzijom spora iz 10 dana starih kultura. Suspenzija spora je dobijena nalivanjem kultura sterilnom vodom u koju je dodat Tween 20 (Sigma) do koncentracije 0,01%. Po 5 μ l suspenzije konidija je naneto na tri mesta na podlozi. Inokulisane podloge su inkubirane 7 dana na 25°C. Na CYA podlozi porast i izgled kolonija praćen je i na temperaturama 5°C i 37°C. Eksperiment je izveden u 3 ponavljanja za svaku podlogu i temperaturu.

Mikroskopske odlike (izgled penicilla, stipa i fialida, oblik, veličina i način formiranja konidija) su posmatrane u kulturama starim 10 dana odgajenim na KDA podlozi. Mikroskopski preparati pravljani su po metodi Pitt and Hocking (2009) i posmatrani

pod svetlosnim mikroskopom (Leica DMLS). Mereno je po 50 konidija po izolatu.

Ehrlich-ov test

Ehrlich-ovim testom, korišćenjem filter papir metode (Lund, 1995) ispitivana je proizvodnja ciklopiazonske kiseline i drugih alkaloida dobijenih izolata. Iz izolata gajenih 7 dana na CYA podlozi isečeni su fragmenti kolonije prečnika 10 mm na koje je postavljen filter papir natopljen Ehrlich-ovim reagensom (2g 4-dimetil aminobenzaldehid + 85 ml 96% etanola + 15ml 10 NHCl). Nakon 2 minuta praćena je promena boje na filter papiru.

DNA ekstrakcija, amplifikacija gena za β -tubulin i sekvenciranje

Ekstrakcija nukleinskih kiselina dobijenih izolata urađena je po CTAB metodi koju su opisali Day and Shattock (1997) iz kultura starih 10 dana, odgajenih na KDA podlozi. Molekularna identifikacija je izvršena na osnovu gena za β -tubulin, korišćenjem prajmera Bt-LEV-Up4 i Bt-LEV-Lo1 (De Jong et al., 2001) metodom lančane reakcije polimeraze (PCR). Uslovi izvođenja PCR metode obuhvatili su početnu denaturaciju na 94°C 3 min, 30 ciklusa (94°C 60 s, 60°C 60 s, 72°C 60 s) i završno izduživanje na 72°C 10 min.

Po 5 μ l amplifikovanog produkta ispitivanih izolata i kontrole vizuelizovano je u 1,5% agaroznom gelu. Korišćen je GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Fermentas). Gel je obojen vodenim rastvorom etidijumbromida (0,5 μ g/ml) i posmatran na transiluminatoru. Pozitivnom reakcijom smatrana je pojava amplikona veličine oko 800 bp.

Dobijeni Bt-LEV-Up4/Bt-LEV-Lo1 amplikoni su direktno sekvencirani u oba smera pomoću prajmera korišćenih u amplifikaciji. Sekvence su spojene korišćenjem kompjuterskog programa Pregap4 u okviru Staden paketa (Staden et al., 2000). Nukleotidne sekvence dela gena za β -tubulin su deponovane u GenBank bazu podataka. Poređenje sličnosti dobijenih sekvenci sa sekvencama u NCBI bazi podataka urađena je korišćenjem MegaBlast algoritma.

REZULTATI

Simptomi bolesti

Na prikupljenim lukovicama crnog luka sorte Meranto su se ispoljavali simptomi truleži. Tkivo je bilo mekano, svetlo smeđe do sive boje. Prisustvo sporulacije plavozelene boje uočavalo se na površini zaraženih lukovica, posebno u predelu stabla, kao i u unutrašnjosti lukovica, između razmekšalih listova (Slika 1).



Slika 1. Plavozelena trulež lukovica crnog luka cv. Meranto.

Figure 1. Onion bulb cv. Meranto with blue mold symptoms.

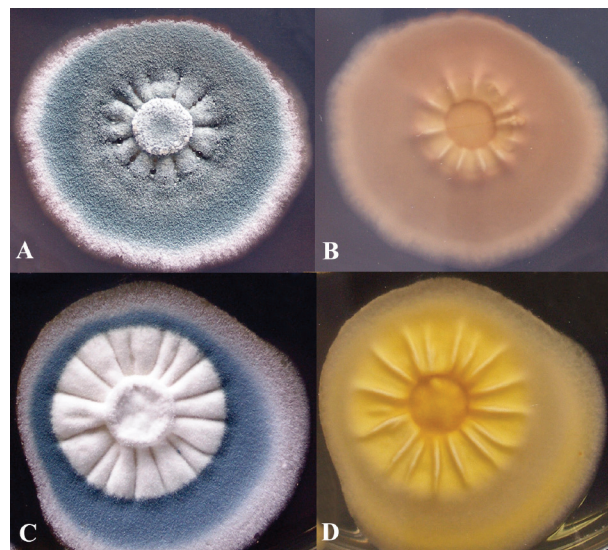


Slika 2. Plavozelena trulež na veštački inokulisanim lukovicama crnog luka cv. Meranto.

Figure 2. Blue mold on artificially inoculated onion bulbs cv. Meranto.

Provera patogenosti

Na inokulisanim lukovicama, nakon 30 dana inkubacije, razvili su se tipični simptomi plave truleži, dok su kontrolne lukovice ostale bez simptoma. Oko mesta inokulacije uočena je sporulacija gljive karakteri-



Slika 3. Makroskopske osobine izolata na CYA (A lice, B naličje kolonije) i YES podlozi (C lice, D naličje kolonije) posle 7 dana inkubacije na 25°C.

Figure 3. Colony morphology on CYA (A front, B reverse) and YES (C front, D reverse) medium after 7 day of incubation at 25°C.



Slika 4. Izgled konidiofora i konidija ispitivanih izolata.

Figure 4. Conidiophores and conidia of tested isolates.

stične plavozelene boje. Tkivo lukovica ispod spoljašnjih ljuspi je bilo meko, vodenasto i svetlo smeđe do sive boje na poprečnom preseku (Slika 2). Reizolacijom iz inokulisanih lukovica dobijene su kulture koje su po svojim morfološkim osobinama bile iste kao i izolovana gljiva, čime su zadovoljeni Kohovi postulati.

Morfološke i biohemijske karakteristike

Izolati L1a i L4p su na podlogama formirali belu miceliju, u okviru koje je došlo do obilne sporulacije plavozelene boje. Nakon 7 dana inkubacije na 25°C, kolonije izolata su na KDA, CYA, MEA, kao i YES podlozi bile dobro razvijene, guste, plavozele- ne boje sa belim obodom, karakterističnog mirisa. Na KDA i MEA podlozi izolati su formirali somotaste kolonije, dok su na CYA i YES podlozi kolonije bile radijalno naborane. Na CYA podlozi je uočeno formiranje providnog eksudata u kulturi. Naličje kolonija na CYA i YES podlozi je bilo krem do žuto-braon boje (Slika 3). Prečnik kolonije na KDA podlozi je iznosio $29,89 \pm 0,96$ mm za izolat L1a, a $26 \pm 0,37$ mm za izolat L4p; na CYA podlozi $32,56 \pm 0,53$ mm za izolat L1a i $30,11 \pm 2,42$ mm za izolat L4p; i na KDA podlozi $33,86 \pm 1,59$ mm za izolat L1a i $31,17 \pm 1,83$ mm za izolat L4p. Primećeno je da izolati na CYA podlozi ne rastu na 37°C, dok je porast zabeležen na 5°C.

Konidiofore izolata su bile terverticilate, stipe septirane, tankih i glatkih zidova, a fialide cilindrične. Konidije su loptaste do elipsoidne, glatke i formirale su se u dugim lancima. Dimenzije konidija izolata L1a su iznosile $2,87$ – $(3,58)$ – $4,39 \times 2,53$ – $(3,16)$ – $3,79$ μm , a izolata L4p $2,72$ – $(3,26)$ – $3,82 \times 2,36$ – $(2,95)$ – $3,42$ μm .

Utvrđeno je da izolati iz lukovica crnog luka u Ehrlich-ovom testu na filter papiru daju pozitivnu reakciju, pojavom ljubičastog prstena, što govori da stvaraju ciklopiazonsku kiselinu i druge alkaloidne.

Molekularna analiza

PCR produkti veličine oko 800 bp dobijeni su u oba analizirana izolata korišćenjem Bt-LEV-Up4 i Bt-LEV-Lo1 prajmera. Kod negativne kontrole nije došlo do amplifikacije. Nakon sekvenciranja PCR produkata izolata L1a i L4p, dobijene nukleotidne sekvence su deponovane u NCBI bazu podataka pod pristupnim brojevima KJ570971 za izolat L1a i KJ570972 za izolat L4p. MegaBLAST analizom utvrđeno je da su dobijene sekvence dela gena za β -tubulin ispoljile najveću sličnost od 99% sa sekvencama istog regiona vrste *P. polonicum*.

DISKUSIJA

Crni luk se odlikuje izrazitom nutritivnom vrednošću i vrlo je značajna povrtarska kultura, kako u svetu tako i kod nas. Koristi se u svežem stanju kao salata, kivan ili u smeši sa suvim povrćem

kao začinski dodatak jelima. Lukovice crnog luka se mogu čuvati posle vađenja i mnogi faktori mogu da utiču na dužinu njihovog čuvanja. Uspešnost skladištenja lukovica crnog luka zavisi od osobina sorte, temperature i relativne vlažnosti vazduha u skladišnom prostoru, kao i od zdravstvenog stanja i mehaničkih oštećenja (Đević i sar., 2004). Biljne bolesti mogu smanjiti prinose lukovica crnog luka u toku vegetacije, ali je njihov značaj mnogo veći za vreme čuvanja (Pitt and Hocking, 2009).

Tokom 2013. godine, zabeleženi su učestali simptomi truleži lukovica crnog luka u skladištu u Staroj Pazovi, odakle su sakupljene simptomatične lukovice u cilju utvrđivanja etiologije propadanja. Dobijeni patogeni izolati gljive su okarakterisani na različitim podlogama. Na osnovu izgleda i boje kolonija, prisustva plodonosnih tela, eksudacije, mirisa i odlika naličja kolonija, kao i mikroskopskih odlika reproduktivnih organa, izgleda penicilla, stipa i oblika i veličine konidija, a poređenjem sa literturnim podacima izolati su identifikovani kao *P. polonicum* (Frisvad and Samson, 2004). Utvrđeno je da izolati stvaraju ciklopiazonsku kiselinu i druge alkaloidne, što je takođe karakteristika *P. polonicum* (Frisvad and Samson, 2004). Molekularna analiza izolata zasnovana na delu gena za β -tubulin, potvrdila je pripadnost izolata iz crnog luka vrsti *P. polonicum*.

P. polonicum je na luku opisan u Danskoj (Frisvad and Samson, 2004), ali nema podataka o njegovoj zastupljenosti i ekonomskom značaju u toku čuvanja lukovica crnog luka. Istraživanja sprovedena u našoj zemlji potvrdila su destruktivne simptome koje *P. polonicum* izaziva na lukovicama crnog luka. Pored toga, *P. polonicum* spada u grupu mikotoksigenih gljiva i zabeleženo je da više od 91% izolata stvara potencijalno neurotoksični verukozidin (Lund and Frisvad, 1994). Nefrotoksini koje luči *P. polonicum* dovode se u vezu i sa balkanskom endemskom nefropatijom (Mantle, 2002; Frisvad and Samson, 2004). Prisustvo ove gljive upućuje na značajnost ispitivanja zastupljenosti ove vrste, kao i drugih toksigenih vrsta roda *Penicillium* u uslovima skladištenja lukovica crnog luka. Širok krug domaćina, koji obuhvata različite biljne i animalne proizvode (Nunez et al., 2000; Frisvad and Samson, 2004; Andersen and Thrane, 2006; Kim et al., 2008), govori o potencijalnoj opasnosti od kontaminacije mikotoksinima koje *P. polonicum* stvara.

ZAHVALNICA

Ovaj rad je rezultat projekta III46008 finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja, Republike Srbije.

LITERATURA

- Andersen, B. and Thrane, U. (2006): Food-borne fungi in fruit and cereals and their production of mycotoxins. *Advances in Food Mycology*, 571: 137-152.
- Day, J. P. and Shattock, R. C. (1997): Aggressiveness and other factors relating to displacement of populations of *Phytophthora infestans* in England and Wales. *European Journal of Plant Pathology*, 103: 379-391.
- De Jong S. N., Lévesque C. A., Verkley G. J. M., Abeln E. C. A., Rahe J. E., Braun P. G. (2001): Phylogenetic relationships among *Neofabraea* species causing tree cankers and bull's-eye rot of apple based on DNA sequencing of ITS nuclear rDNA, mitochondrial rDNA, and the β -tubulin gene. *Mycol. Res.*, 105: 658-669.
- Dević, M., Kosi, F., Dimitrijević, A. (2004): *Uslovi i značaj skladištenja crnog luka*. Časopis za procesnu tehniku i energetiku u poljoprivredi, 8: 35-38.
- Duduk, N., Vasić, M., Vico, I. (2014): First report of *Penicillium polonicum* causing blue mold on stored onion (*Allium cepa*) in Serbia. *Plant Disease*, 98: 1440.
- Frisvad, J. C. and Samson, R. A. (2004): Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. *Stud. Mycol.*, 49: 1-173.
- Kim, W. K., Hwang, Y. S. and Yu, S. H. (2008): Two species of *Penicillium* associated with blue mold of yam in Korea. *Mycobiology*, 36: 217-221.
- Lund, F. and Frisvad, J. C. (1994): Chemotaxonomy of *Penicillium aurantiogriseum* and related species. *Mycol. Res.*, 98: 481-492.
- Lund, F. (1995): Differentiating *Penicillium* species by detection of indole metabolites using a filter paper method. *Letters in Applied Microbiology*, 20: 228-231.
- Mantle P. G. (2002): Experimental mycotoxic nephropathies and Balkan endemic nephropathy. *Facta Univ. Ser. Medicine and Biology*, 9: 64-65.
- Miladinović, Ž., Damjanović, M., Brkić, S., Marković, Ž., Stevanović, D., Sretenović-Rajičić, T., Zečević, B., Đorđević, R., Čorokalo, D., Stanković, Lj., Zdravković, M., Zdravković, J., Marinković, N., Mijatović, M., Obradović, A., Starčević, M., Milić, B., Todorović, V. (1997): *Gajenje povrća*, Školska knjiga, Beograd, 345-347.
- Nunez, F., Diaz, M. C., Rodriguez, M., Aranda, E., Martin, A., Asensio, M. A. (2000): Effects of substrate, water activity, and temperature on growth and verrucosidin production by *Penicillium polonicum* isolated from dry-cured ham. *Journal of Food Protection*, 63: 231-236.
- Pitt, J. I. and Hocking, A. D. (2009): *Fungi and Food Spoilage*. Springer, New York.
- Schwartz, H. F. and Mohan, K. S. (2008): *Compendium of Onion and Garlic Diseases and Pests*. Second Edition, APS Press, USA 47-55.
- Staden, R., Beal, K. F., Bonfield, J. K. (2000): The Staden package, 1998. *Methods in Molecular Biology*, 132: 115-130.

(Primljeno: 01.10.2014.)
(Prihvaćeno: 29.10.2014.)

PENICILLIUM POLONICUM – CAUSAL AGENT OF ONION BULB DECAY IN STORAGE

MARINA LAZAREVIĆ¹, NATAŠA DUDUK², MILJAN VASIĆ², IVANA VICO²¹

¹PSS Institute Tamiš d.o.o., Pančevo

²University of Belgrade – Faculty of Agriculture, Belgrade
e-mail: natasadukic@yahoo.com

SUMMARY

Penicillium polonicum is an economically important fungal species with a wide host range which includes cereals, peanuts, onions, dried meats, citrus, apple, and yam tubers. Onion bulbs cv. Meranto with blue mold symptoms have been collected, in a storage facility in Stara Pazova during 2013. Fungal isolates were obtained from decayed bulbs and their pathogenicity was proven after wound inoculation of healthy onion bulbs. On differential media the isolates formed velutinous, green blue colonies with a white margin and a characteristic odor. The isolates grew at 5 °C while no growth was observed at 37 °C. Isolates produced cyclopiazonic acid and other alkaloids. Conidiophores of isolates were terverticillate, stipes were septate with smooth to finely roughened walls, and phialides were ampulliform. Conidia were globose to subglobose, smooth-walled, and borne in columns. The nucleotide sequences of amplified products (800 bp) for partial β -tubulin gene showed in MegaBLAST search analysis a 99% similarity with several sequences of *P. polonicum*. Based on morphological and molecular features isolates obtained from stored onion were identified as *P. polonicum*.

Key words: blue mold, *Allium cepa*, identification

(Received: 01.10.2014.)

(Accepted: 29.10.2014.)

Zaštita bilja
Vol. 65 (3), N°289, 111-116, 2014, Beograd
Plant Protection
Vol. 65 (3), N°289, 111-116, 2014, Belgrade

UDK: 633.887-153
632.482.31
Naučni rad
Scientific paper

FUSARIUM SPP. - PATOGENI SEMENA NEVENA (*Calendula officinalis* L.) U SRBIJI

DANIJELA RISTIĆ, SNEŽANA PAVLOVIĆ, NENAD TRKULJA,
ERIKA PFAF DOLOVAC, NENAD DOLOVAC, MIRA STAROVIĆ

Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Beograd
e-mail: risticdaca@yahoo.com

REZIME

Tokom 2013. godine, na dva lokaliteta komercijalne proizvodnje nevena u Pančevu i Plandištu, prikupljeno je 14 uzoraka zaraženog semena gajenog nevena i analizirano na prisustvo fitopatogenih gljiva. U svim uzorcima semena, ustanovljena je slabija klijavost i značajan stepen zaraze fitopatogenim gljivama iz roda *Fusarium*, 2-8%. Iz zaraženog semena izolovane su monosporijalne kulture, čija je patogenost potvrđena pojavom simptoma na veštački inokulisanim klijancima nevena, a na osnovu morfoloških svojstava identifikovane su kao *Fusarium verticillioides* i *Fusarium* cf. *incarnatum*. Molekularna detekcija obavljena je primenom PCR i amplifikacije proteinskog gena TEF-1 α . Dalja istraživanja obuhvatiće primenu molekularne identifikacije, do nivoa vrste uz određivanje tačnog taksonomskog mesta izolata iz Srbije patogenih za neven poređenjem sa drugim izolatima i vrstama roda *Fusarium* spp. u svetu.

Ključne reči: *Fusarium* spp., molekularna detekcija, morfološke osobine, test patogenosti, neven

UVOD

Neven (*Calendula officinalis* L., fam. Asteraceae) je poznata lekovita biljka mediteranskog područja koja se, kao ukrasna biljka, često gaji i širom Evrope. Neven od davnina ima višestruku upotrebu u narodnoj medicini gde se koristi kao lekovito sredstvo, ispoljavajući značajno antibakterijsko i antivirusno dejstvo. Upotreba biljnih ekstrakata nevena u biološkoj kontroli mnogih biljnih patogena intenzivno se ispituje i pokazuje obećavajuće rezultate. Iako se neven koristi kao lekovito sredstvo, kao i svaka biljna vrsta, osetljiv je na više prouzrokovaca biljnih bolesti. Mnoge biljne bolesti mogu značajno smanjiti kvalitet i prinos cvetova nevena, ali najznačajnije su fitopatogene gljive iz rodova: *Alternaria*, *Fusarium*, *Sphaerotheca*, *Botryotinia*, *Peronospora* i *Phytophthora*. Mikopopulacija semena lekovitih biljaka je brojna, a vrste iz rodova *Alternaria* i *Fusarium* uglavnom preovlađuju (Pavlović i Dražić, 2000; Pavlović i sar., 2000; Pavlović, 2001; Pavlović i sar., 2006; Pavlović i sar., 2007; Starović i sar., 2012). Međutim, za razliku od široko gajenih poljoprivrednih, ukrasnih i drugih biljaka, o bolestima nevena ima malo podataka u literaturi. Na nevenu u Srbiji ustanovljeno je prisustvo

Alternaria alternata (Ristić i sar., 2011) i *Fusarium* cf. *incarnatum* (Ristić i sar., 2011a).

Osnovni cilj sprovedenih istraživanja bio je da se izolati iz semena nevena identifikuju primenom konvencionalnih metoda, proučavanjem morfoloških svojstava, kao i primenom molekularnih metoda detekcije, amplifikacijom kodirajućeg proteinskog gena TEF-1 α , što predstavlja uvođenje novih perspektiva u proučavanje fitopatogenih gljiva iz semena nevena u Srbiji.

MATERIJAL I METODE

Sakupljanje uzoraka semena nevena i izolacija patogena

Tokom 2013. godine, na dva lokaliteta komercijalne proizvodnje nevena u Vojvodini, Pančevu i Plandištu (Južno Banatski okrug), prikupljeno je 14 uzoraka zaraženog semena gajenog nevena. Seme svakog uzorka (100 semena x četiri ponavljanja) ispirano je 2 h pod mlazom česmenske vode, površinski sterilisano u 2% rastvoru natrijum-hipohlorita (NaOCl, komercijalna varikina) u trajanju od 2 min i ispirano dva puta u sterilnoj vodi (Singh et al. 1991). Površinski sterilisa-

no seme nanošeno je na podlogu krompir-dekstrozni agar (potato dextrose agar, PDA) i inkubirano sedam dana pri 25°C i fotoperiodu od 12 h. Kolonije koje su se razvile oko semena nakon inkubacije preliminarno su identifikovane do nivoa roda na osnovu makroskopskih i mikroskopskih svojstava, što je poslužilo za određivanje nivoa zaraze i učestalosti njihovog prisustva. U cilju dobijanja čistih kultura, nakon sedam dana razvoja inicijalnih kolonija izvršena je monosporijalna izolacija gljiva na novu PDA podlogu.

Provera patogenosti

Test provere patogenosti svih dobijenih monosporijalnih izolata obavljen je u uslovima staklenika na klijancima nevena u fazi nicanja. Inokulacija biljaka obavljena je zalivanjem suspenzijom konidija (1×10^6 konidija/ml) pripremljene od kultura odabranih izolata starih sedam dana, koje su odgajane na PDA podlozi pri temperaturi od 25°C i fotoperiodu od 12 h. Sa 10 ml tako pripremljene supenzije od svakog izolata inokulisano je po 5 biljaka, a kao negativna kontrola korišćeni su klijanci nevena u sterilnom zemljištu bez supenzije spora. U cilju obezbeđenja uslova povišene vlažnosti, biljke su po inokulaciji pokrivane PVC folijom koja je nakon dva dana uklonjena. Pojava simptoma praćena je svakodnevno do 14 dana posle inokulacije.

Morfološke karakteristike

Identifikacija na osnovu morfoloških makroskopskih i mikroskopskih svojstava obavljena je na hranljivim podlogama prema kriterijumima Summerell et al. (2003). Proučavanje makroskopskih svojstava obuhvatilo je praćenje brzine rasta, izgleda kolonije, lučenje pigmenata na PDA podlozi i formiranje plodonosnih tela. Ispitivanje mikroskopskih svojstava reproduktivnih organa obuhvatilo je utvrđivanje tipa konidiofora ili fialida, oblika i dimenzija makrokonidija, kao i prisustva ili odsustva mikrokonidija i hlamidospora prema metodi Burgess et al. (1994). Kulture izolata starosti 10-14 dana, odgajene na selektivnu podlogu sa sterilnim fragmentima lista karanfila (carnation leaf piece agar, CLA) pri 25°C i fotoperiodu od 12 h direktno su mikroskopirane i prosekom obračunatim za najmanje 100 ponovljenih merenja, određivana je dužina i širina konidija.

Molekularna detekcija

Metoda lančane reakcije polimeraze (polymerase chain reaction, PCR) primenjena je u cilju molekularne detekcije i identifikacije *Fusarium* spp. poreklom iz semena nevena i potvrde rezultata dobi-

jenih konvencionalnim metodama. Za ova ispitivanja odabrana su dva izolata N1 (Pančevo) i N2 (Plandište) dobijena iz zaraženog semena nevena kojima je potvrđena patogenost, a koja su prethodno okarakterisana na morfološkom nivou. Ekstrakcija ukupne DNK obavljena je iz micelije čiste kulture patogena odgađenog na tečnoj PB (potato broth) podlozi, korišćenjem komercijalnog kita DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany), po uputstvu proizvođača. PCR reakcija obavljena je sa parom prajmera EF1/EF2 (Geiser et al. 2004) koji omogućavaju selektivno umnožavanje kodirajućeg proteinskog gena TEF-1 α . PCR reakcija obavljena je u radnoj zapremini od 25 μ l, korišćenjem 12,5 μ l 2X PCR Master miksa (Fermentas, Lithuania), 9 μ l RNase-free vode, po 1,25 μ l svakog prajmera (100 pmol/ μ l) i 1 μ l ekstrahovane ukupne DNK. Kao negativna kontrola korišćena je RNase-free voda koja je dodata u pripremljenu PCR smešu umesto ciljane DNK. PCR reakcija je izvedena pri sledećim uslovima: inicijalna denaturacija nukleinskih kiselina 2 min na 94°C; 35 ciklusa koji se sastoje od denaturacije 1 min na 94°C, hibridizacije 1 min na 55°C, elongacije 2 min na 72°C, praćeno finalnom elongacijom na 72°C u trajanju od 10 min.

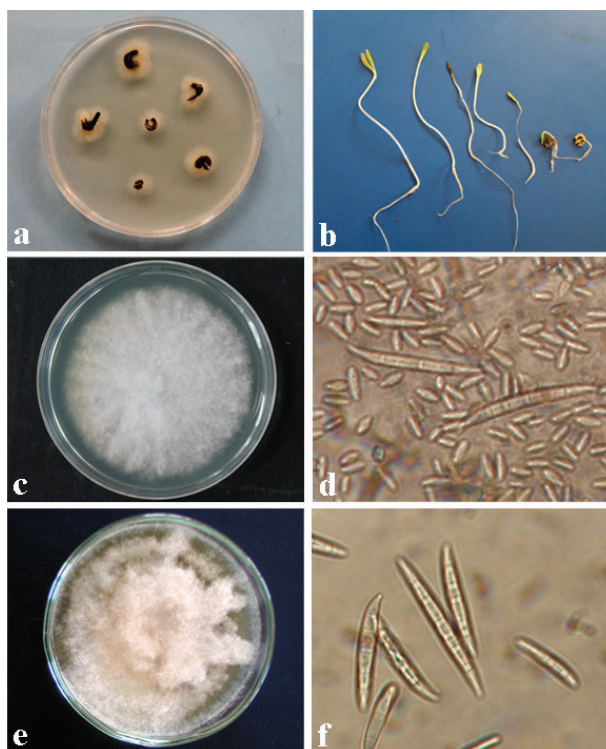
Vizuelizacija umnoženih produkata PCR reakcija obavljena je elektroforetskim razdvajanjem nukleinskih kiselina u 1% agaroznom gelu u 1 x TBE puferu, bojenjem Midori Green DNA Stain (Nippon Genetics) i posmatranjem pod UV-transiluminatorom. Za određivanje veličine umnoženog amplikona korišćen je marker MassRuler™ DNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences GmbH, Lithuania). Pozitivnom reakcijom smatrana je pojava traka produkta očekivane veličine oko 700 bp.

REZULTATI I DISKUSIJA

Izolacija patogena, provera patogenosti i konvencionalna identifikacija

Tokom pregleda 14 uzoraka semena poreklom iz komercijalnih useva nevena u Pančevu i Plandištu 2013. godine, ustanovljen je značajan stepen zaraze fitopatogenim gljivama iz roda *Fusarium*, 2-8%. Sličan nivo zaraze semena nevena sa *Fusarium* (2-6%) zabeležen je od strane Ristić i sar. (2011b). Prilikom izolacije, na osnovu morfoloških karakteristika izdvojeno je 19 monosporijalnih izolata (Slika 1a), poreklom iz svih 14 uzoraka semena, a koji su po morfološkim karakteristikama odgovarali vrstama roda *Fusarium*.

U uslovima veštačke inokulacije klijanaca nevena reprodukovani su simptomi prirodne infekcije. U početku razvoja simptoma uočene su jasno vidljive promene boje vaskularnog tkiva i primarnog kore-

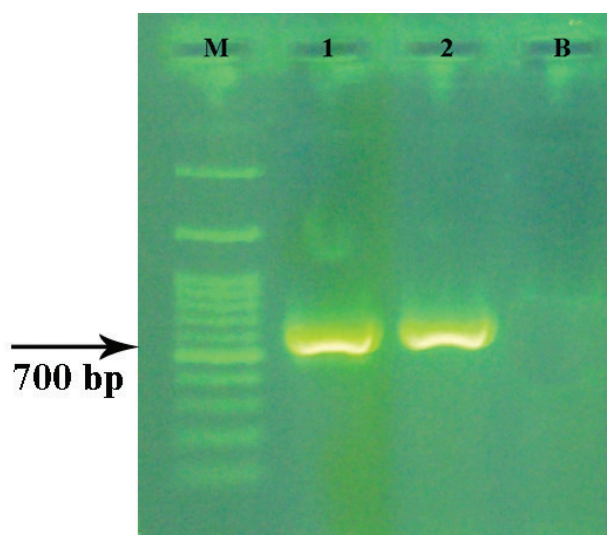


Slika 1. *Fusarium* spp: a) izolacija patogena iz semena na PDA; b) veštački zaraženi klijanci nevena; c) Izolat N1: izgled kolonije; d) makro- i mikrokonidije; e) Izolat N2: izgled kolonije; f) makrokonidije.

Figure 1. *Fusarium* sp p: a) isolation of the pathogen from seed on PDA media; b) artificially inoculated calendula seedlings; c) isolate N1: appearance of colonies; d) macro- and microconidia; e) isolate N2: appearance of colonies; f) macroconidia.

na i to 3-5 dana nakon inokulacije. Već nakon pet dana od inokulacije došlo je do sušenja kotiledona, usporenog rasta i zakržljavanja klijanaca (Slika 1b). Iz svih inokulisanih biljaka nevena sa simptomima, uspešno je izvršena reizolacija patogena primenom istih metoda kao i pri izolaciji. Na biljkama koje su kao negativna kontrola tretirane sterilnom vodom umesto suspenzijom konidija, nije došlo do pojave simptoma, niti bilo kakvih promena.

Nakon provere patogenosti, pristupilo se preliminarnoj morfološkoj karakterizaciji svih monosporijalnih izolata koji su ispoljili različita svojstva. Proučavana morfološka svojstva izolata *Fusarium* spp. izolovanih iz semena nevena u Srbiji, pružila su stabilnu mogućnost za njihovo razlikovanje. Kako vrste roda *Fusarium* variraju u morfološkim svojstvima, naročito po obliku i veličini makrokonidija, načinu obrazovanja mikrokonidija, obrazovanju hlamidospora ili boji kolonija, u istraživanja su uključene dve hranljive podloge u cilju proučavanja njihove promenljivosti. Za detaljno proučavanje morfoloških svojstava odabrana su dva reprezentativna



Slika 2. Elektroforetska analiza PCR proizvoda dobijenih korišćenjem para prajmera EF1/EF2. Kolone: M - MassRuler™DNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences GmgH, Lithuania); 1 - izolat N1; 2 - izolat N2; B - negativna kontrola (PCR smeša sa Rnase-free vodom).

Figure 2. Electrophoretic analysis of PCR products obtained using primer pair EF1/EF2. Lanes: M - Mass-Ruler™DNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences GmgH, Lithuania); 1 - isolate N1; 2 - isolate N2; 3 - negative control (PCR mix with Rnase-free water).

izolata N1 i N2 čije kolonije odgovaraju opisu fitopatogenih gljiva roda *Fusarium*. Kolonije reprezentativnog izolata N1 koji je ukazao na sličnost sa vrstom *F. verticillioides*, ispoljile su brz i ravnomeran porast na PDA podlozi dostižući prečnik od 8 cm nakon sedam dana inkubacije pri 25°C. Vazdušna micelija je gusta, pamučasta, bele ili sivkastoljubičaste boje (Slika 1c). Na CLA podlozi makrokonidije su prave do umereno srpaste, tankih zidova, duge i uske sa 3-5 poprečnih pregrada, veličine 21,5-77,0 x 4,0-4,5 µm. Vršne ćelije su neznatno sužene i savijene, dok su bazalne karakterističnog oblika stopala. Mikrokonidije su obrazovane iz monofijalida u vidu dužih ili kraćih nizova, ređe lažnih glavica. Mikrokonidije su obično jednoćelijske, hijalinske, oblika palice, najčešće neseptirane, ili sa 1-2 poprečne pregrade, veličine 11,0-17,5 x 3,7-3,8 (Slika 1d). Prisustvo hlamidospora nije ustanovljeno. Prisustvo vrste *F. verticillioides*, do sada, je utvrđeno na belom slezu, kantarionu, žutoj lincuri, žalfiji i bosiljku u Srbiji (Pavlović i sar., 2007a; Pavlović i sar., 2010; Starović i sar., 2012).

Kolonije reprezentativnog izolata N2 koji je morfološki sličan sa vrstom *F. cf. incarnatum*, ispoljile su brz i ravnomeran porast na PDA podlozi, prečnika 7 cm nakon sedam dana inkubacije pri 25°C. Vazдушna micelija je obilna, pamučasta, bela, žutosmeđa do narandžasta, blago talasastih ivica (Slika 1e). Kulture izolata su nakon pet dana razvoja na CLA podlozi formirale makrokonidije, vretenasto-kopljaste, blago savijene postepeno sužene prema krajevima sa 3-5 poprečnih pregrada, dimenzija 20,5-62,0 x 3,5-4,1 µm. Makrokonidije se formiraju na polifijalidama u narandžastim sporodohijama i na micelliji nakon četiri dana inkubacije (Slika 1f). Sve morfološke makroskopske i mikroskopske osobine u potpunosti su saglasnosti sa rezultatima navedenim u literaturi (Aoki & O'Donnell, 1999; Schmale et al., 2005, 2006; Lević, 2008).

Molekularna detekcija

Molekularna metoda PCR uspešno je primenjena za detekciju ispitivanih izolata *Fusarium* spp. uz korišćenje prajmera EF1/EF2. Kod odabranih izolata N1 i N2 uspešno je došlo do amplifikacije proteinskog gena za TEF-1α uz prisustvo trake procenjene veličine oko 700 bp (Slika 2). U svim reakcijama do amplifikacije nije došlo kod negativne kontrole (PCR smeša sa RNase free vodom).

Zbog visoke osetljivosti i specifičnosti, molekularne metode predstavljaju značajno poboljšanje u dijagnostici oboljenja koje prouzrokuju fitopatoge-

ne gljive. PCR metoda koju odlikuje jednostavnost i velika pouzdanost postala je jedna od vodećih i najčešće korišćenih metoda u detekciji fitopatogenih gljiva. Univerzalni prajmeri EF1/EF2 koji amplifikuju barkoding region TEF-1α gena kod svih poznatih vrsta roda *Fusarium* (Summerell et al., 2003; Geiser et al., 2004; Kristensen et al., 2005), pokazali su se pogodnim za identifikaciju ispitivanih izolata, kao i kod mnogih drugih rodova fitopatogenih gljiva.

Bez obzira što je u literaturi opisano da biljke nevena ispoljavaju negativno delovanje na razvoj brojnih rodova gljiva, uključujući i neke vrste iz roda *Fusarium*, rezultati dobijeni u ovom radu pokazuju da postoje genotipovi u populaciji ovih gljiva koji mogu da ugroze semensku proizvodnju nevena. Brz razvoj simptoma na inokulisanim klijancima i propadanje biljaka ukazuju da je potrebno obratiti pažnju na zdravstveno stanje semena nevena. Mada su navodi o bolestima nevena uopšte, pa i onim izazvanim gljivama iz roda *Fusarium* malobrojni, naročito u Srbiji (Ristić i sar., 2011a,b), ipak se ove gljive nalaze na vrhu liste značajnih prouzrokovaca bolesti nevena i identifikovane su u prirodnim zaražama u svetu (Dogra et al., 1978; Narayanappa and Soli, 1985; Popenoe, 1989).

ZAHVALNICA

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

LITERATURA

- Aoki, T., O'Donnell, K. (1999): Morphological characterization of *Gibberella coronicola* sp. nov., obtained through mating experiments of *Fusarium pseudograminearum*. *Mycoscience*, 40: 443-453.
- Burgess, L. W., Summerell, B. A., Bullock, S., Gott, K. P., Backhouse, D. (1994): *Laboratory Manual for Fusarium Research*, 3rd ed. University of Sydney/Royal Botanic Gardens, Sydney, Australia.
- Dogra, J. V. V., Singh, P. L., Shrivastava, A. I. C. (1978): Wilt disease of *Calendula officinalis* - a new record from India. *Current Science*, 48: 120.
- Geiser, D. M., Jimenez Gasco, M. M., Kang, S., Mkalowska, I., Veeraraghavan, N., Ward, T. J., Zhang, N., Kulda, G. A., O'Donnell, K. (2004): FUSARIUM-IDv1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *European Journal of Plant Pathology*, 110: 473-479.
- Kristensen, R., Torp, M., Kosiak, B., Holst-Jensen, A. (2005): Phylogeny and toxigenic potential is correlated in *Fusarium* species as revealed by partial translation elongation factor 1 alpha gene sequences. *Mycological Research*, 109: 173-186.
- Lević, J. (2008): Vrste roda *Fusarium* u oblasti poljoprivrede, veterinarske i humane medicine. Cicero, Beograd, 1226.

- Narayanappa, M., Sohi, H.S. (1985): Seed mycoflora of marigold and its control. *Indian Journal of Mycology and Plant Pathology*, 15: 283-286.
- Pavlović, S. (2001): Paraziti prouzrokovajući bolesti semena matičnjaka (*Melissa officinalis* L.). *Lekovite sirovine*, 20: 51-56.
- Pavlović, S., Dražić, S. (2000): Microflora of chamomile seeds *ŠChamomila recutita* (L.) Rausch.Ć, Proceedings from the First Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries, Arandelovac, pp. 269-274.
- Pavlović, S., Dražić, S., Ivanović, M. (2000): Microflora of St. John's wort seeds. Proceedings from the First Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries, Arandelovac, pp. 339-346.
- Pavlović, S., Dražić, S., Jevdović, R., Poštić, D. (2006): Fungi on Sage seed in Serbia and their effect to seed germination. Proceedings of 4th Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries, Jasi-Romania, pp. 210-213.
- Pavlović, S., Stojšin, V., Stojanović, S. (2007): Vrste iz roda *Fusarium* na lekovitom bilju. IX Simpozijum o flori jugoistočne Srbije i susednih područja. Niš, Zbornik rezimea, str.16.
- Pavlović, S., Stojšin, V., Stojanović, S. (2007a): Mycopopulation of marshmallow (*Althaea officinalis* L.). *Zbornik Matice srpske za prirodne nauke*, 113: 193-202.
- Pavlović, S., Vuković, G., Stojanović, S., Stević, T., Starović, M. (2010): *Fusarium verticillioides* on medicinal plants in Serbia. Abstracts Book of 6th CMAPSEEC in Pharmacognosy Magazine, 6: S41-S42.
- Popenoe, J. (1989): Key Plants/Key Pests. Commercial Horticulture – Woody Ornamentals, County Extension Service.
- Ristić, D., Stanković, I., Vučurović, A., Berenji, J., Miličević, T., Krstić, B., Bulajić, A. (2011): Flower necrosis of *Calendula officinalis* L. caused by *Alternaria alternata*. Abstracts book of Symposium Power of Fungi and Mycotoxins in Health and Disease, Primošten, Croatia, pp. 52.
- Ristić, D., Stanković, I., Vučurović, A., Berenji, J., Miličević, T., Krstić, B., Bulajić, A. (2011a): Seed-borne infection of *Calendula officinalis* L. with *Fusarium* cf. *incarnatum*. Abstracts book of 7th Balkan Congress for Microbiology, Beograd.
- Ristić, D., Stanković, I., Vučurović, A., Nikolić, D., Miličević, T., Krstić, B., Bulajić, A. (2011b): Gljive iz roda *Fusarium* kao patogeni nevena (*Calendula officinalis* L.). Zbornik rezimea XI Savetovanja o zaštiti bilja, Zlatibor, str. 62-63.
- Schmale, D. G., III, Leslie, J. F., Zeller, K. A., Saleh, A. A., Shields, E. J., Bergstrom, G. C. (2006): Genetic structure of Atmospheric populations of *Gibberella zeae*. *Phytopathology* 96: 1021-1026.
- Schmale, D. G., Shah, A. A., Bergstrom, G. C. (2005): Spatial patterns of viable spore depositions of *Gibberella zeae* in wheat fields. *Phytopathology*, 95: 472-479.
- Singh K, Frisvad JC, Thrane U, Mather SB (1991): An Illustrated Manual on Identification of Some Seed-borne *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* and their mycotoxins. Jordbugsforlaget Frederiksberg, Denmark, pp. 133.
- Starović, M., Pavlović, S., Stojanović, S., Stević, T., Kuzmanović, S., Popović, T., Jošić, D. (2012): Mycopopulation of basil seeds. Proceedings of 7th Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries (7th CMAPSEEC), Subotica, Serbia, pp. 303-308.
- Summerell, B. A., Salleh, B., Leslie, J. F. (2003): A utilitarian approach to *Fusarium* identification. *Plant Disease*, 87: 117-128.

(Primljeno: 17.11.2014.)
(Prihvaćeno: 15.12.2014.)

FUSARIUM SPP. - PATHOGENS OF CALENDULA SEED (*Calendula officinalis* L.) IN SERBIA

DANIJELA RISTIĆ, SNEŽANA PAVLOVIĆ, NENAD TRKULJA,
ERIKA PFAF DOLOVAC, NENAD DOLOVAC, MIRA STAROVIĆ

*Institute for Plant Protection and Environment, Belgrade
e-mail: risticdaca@yahoo.com*

SUMMARY

During 2013, 14 samples of infected seed grown calendula were collected from two commercially grown crops in the localities in Pančevo and Plandište and analyzed for the presence of plant pathogenic fungi. In all samples of seeds, weaker germination and a significant seed infection ranging from 2-8%, with phytopathogenic fungi of the genus *Fusarium*, was found. From the infected calendula seed, monosporial cultures, based on morphology, were identified as *Fusarium verticillioides* and *Fusarium* cf. *incarnatum*, and their pathogenicity proved on artificially inoculated calendula seedlings. Molecular detection was performed by PCR and amplification of the TEF-1 α protein gene. Further studies will include molecular identification of this isolate to the species level, a definitive taxonomic determination of the Serbian isolate and a comparison with other isolates and species of *Fusarium* genus infecting calendula worldwide.

Key words: *Fusarium* spp., molecular detection, morphological properties, pathogenicity test, calendula

(Received: 17.11.2014.)

(Accepted: 15.12.2014.)

Zaštita bilja
Vol. 65 (3), N°289, 117-123, 2014, Beograd
Plant Protection
Vol. 65 (3), N°289, 117-123, 2014, Belgrade

UDK: 634.13-235

Naučni rad
Scientific paper

ISPITIVANJE OTPORNOSTI SORATA KRUŠKE PREMA *ERWINIA AMYLOVORA* METODOM INOKULACIJE NESAZRELIH PLODOVA

VELJKO GAVRILOVIĆ¹, RADE STANISAVLJEVIĆ¹, STEFAN STOŠIĆ²,
MILOŠ STEVANOVIĆ¹, GORAN ALEKSIĆ¹, MILICA STAJIĆ, NENAD DOLOVAC¹

¹Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Beograd

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

REZIME

U radu je prikazana reakcija plodova različitih sorata kruške prema *Erwinia amylovora* metodom inokulacije nesazrelih plodova. Utvrđeno je da postoje značajne razlike u osetljivosti raznih sorata kruške prema patogenu i one se mogu podeliti u četiri grupe prema korišćenoj skali. Najosetljivijom se pokazala sorta Santa Marija. Nešto manju osetljivost ispoljile su sorte Vilijamova, Moretini, Karmen i Hardenpont; najotpornijim su se pokazale Magnes, Turandot, Junska Lepotica, Karamanka i nepoznata autohtona sorta. Prema dosadašnjim saznanjima ovi rezultati su u saglasnosti sa podacima iz literature i zapažanjima o otpornosti sorti kruške prema *E. amylovora*, primenom metode inokulacije plodova. Istraživanja su pokazala da se ovakav metod utvrđivanja otpornosti kruške prema *E. amylovora* sa relativnom pouzdanošću može koristiti u ove svrhe.

Ključne reči: *Erwinia amylovora*, kruška, otpornost, inokulacija plodova

UVOD

Fitopatogena bakterija *Erwinia amylovora* (Burr) Winslow et al., prouzrokovatelj bakterijske plamenjače, ubraja se u najrasprostranjenije i najštetnije patogene jabučastih voćaka. U Srbiji je rasprostranjena u svim reonima gde se jabučaste voćke intenzivno gaje, a naročito osetljivim su se pokazale dunja i kruška, na kojima se u zavisnosti od sorte, bolest pojavljuje svake godine ali u različitom intenzitetu. Simptomi bolesti na krušci variraju, od plamenjače cvasti, sušenja mladara tokom njihovog intenzivnog porasta, ali i nekroze višegodišnjih grana na kojima se obrazuju rak rane (Panić i Arsenijević, 1996; Arsenijević i Gavrilović, 2007).

Iako se kruška smatra veoma osetljivim domaćinom bakterije, u zasadima je utvrđena značajna razlika u pogledu intenziteta pojave bolesti i ispoljavanja simptoma bakterijske plamenjače u zavisnosti od sorte (van der Zwet and Keil, 1979; van der Zwet and Beer, 1995; Spotts and Mielike, 1999). To ukazuje da postoji razlika u osetljivosti među sortama kruške prema bakteriji, što je zapaženo još sredinom prošlog veka (van der Zwet and Keil, 1979; Spotts and Mielike, 1999).

Za ispitivanje otpornosti sorata kruške prema *E. amylovora* postoji više metoda: inokulacija jednogodišnjih mladara na stablima i sadnicama kruške, inokulacija cvasti, i inokulacija nesazrelih plodova (Paulin et al., 1990; Hevesi et al., 2004).

Cilj ovog rada je da se metodom veštačke inokulacije plodova u laboratorijskim uslovima utvrdi osetljivost različitih sorata kruške prema *E. amylovora*. Takođe, da se steknu saznanja da li potencijalne razlike pri reakciji inokulisanih plodova sorata kruške odgovaraju zapažanjima u pogledu osetljivosti sorata ove vrste voćaka pri prirodnim infekcijama ovom bakterijom.

MATERIJAL I METODE

Veštačkom inokulacijom proverena je reakcija nesazrelih plodova 20 sorata kruške prema *E. amylovora*. Istraživanjem su obuhvaćene trenutno najkomercijalnije sorte, zatim perspektivne sorte, autohtone, ali i one koje su nekada bile široko zastupljene a čiji se udeo u ukupnoj proizvodnji kruške značajno smanjuje. Lista sorata čiji su plodovi inokulisani, kao i lokalitet sa kog potiču prikazana je u Tabeli 1.

Tabela 1. Spisak inokuliranih sorata kruške.**Table 1.** List of inoculated pear cultivars.

Redni broj/No	Sorta/Cultivar	Podloga/Rootstock	Lokalitet/Locality
1	Santa Marija	Dunja BA 29	Šabac
2.	Vilijamova	Dunja BA 29	Ruma
3.	Nepoznata sorta (BCX)	Dunja BA 29	Bela Crkva
4.	Karamanka	Divlja kruška	Šabac
5.	Hardenpont	Dunja MA	Ruma
6.	Fetel	Divlja kruška	Ruma
7.	Moretini	Dunja BA 29	Šabac
8.	Turandot	Dunja BA 29	Bela Crkva
9.	Karmen	Dunja BA 29	Bela Crkva
10	Boskova bočica	Dunja BA 29	Šabac
11.	Krasanka	Dunja BA 29	Šabac
12.	Komis	Dunja BA 29	Šabac
13.	Nepoznata sorta (autohtona)	Divlja kruška	Šabac
14.	Kifer	Divlja kruška	Topola
15.	Kaluderka	Dunja BA 29	Topola
16.	Magnes	Dunja BA 29	Šabac
17.	Kleržo	Divlja kruška	Šabac
18.	Junska lepotica	Dunja BA 29	Loznica
19.	Ženeral lekler	Dunja BA 29	Šabac
20.	Kajzer	Dunja BA 29	Šabac

Tabela 2. Metoda ocene nekroze inokuliranih plodova.**Table 2.** Method of estimation necrosis of inoculated pear fruits.

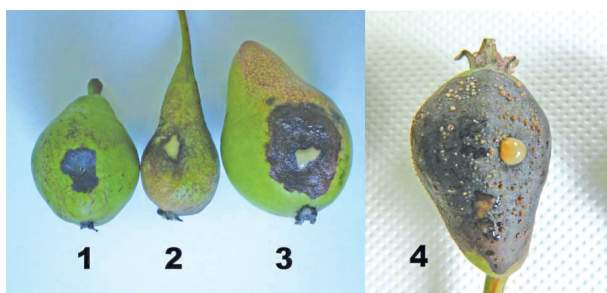
Ocena	Opis simptoma, intenzitet infekcije Symptoms, infection intensity
0	Bez nekroze i pojave bakterijskog eksudata No necrosis and bacterial exudate
1	Nekrotične pege oko mesta inokulacije, prečnika 0,2 cm, bez eksudata Necrosis around inoculation point, 0,2 in diameter, no bacterial exudate
2	Nekroze prečnika 0,2-0,5, uz pojavu eksudata Necroses 0,2-0,5 mm in diameter with bacterial exudate
3	Nekroze prečnika 0,5-1 cm uz obilnu pojavu eksudata Necroses 0,5-1 cm in diameter with abundance bacterial exudate
4	Nekrotira ceo plod, kapi eksudata prisutne na čitavoj površini ploda Necroses of whole inoculated fruits, drops of exudates present on whole surface of inoculated fruits

Od svake sorte inokulisano je 40 plodova. Oni su najpre površinski sterilisani 70% etilalkoholom, a posle ispirani pod mlazom destilovane vode, nakon čega su postavljeni na filter papir radi sušenja. Osušeni plodovi su odlagani u Petri kutije koje su postavljene u plastične posude obložene vlažnim filter papirom, radi stvaranja optimalne vlažnosti koja je neophodna za proces infekcije i stvaranja eksudata.

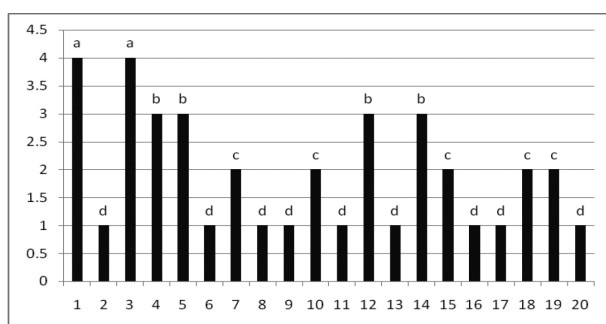
Za inokulaciju je korišćen soj *E. amylovora* (IZB 203) izolovan sa kruške, koji ispoljava sve karakteristike ove bakterije, a koji je pri prethodnim istraživanjima ispoljio izrazitu patogenost. Kultura bakterije stara 24 časa je odlagana u sterilnu plastičnu tubu (Eppendorf) sa 2 ml sterilne vode. Zatim

je postavljena u tresilicu u trajanju od 30 sekundi radi uspešnije resuspenzije ćelija bakterije. Plodovi su inokulisani nanošenjem kapi suspenzije bakterije pomoću bakteriološke igle na prethodno napravljenu povredu ploda. Kontrolni plodovi su tretirani sterilnom vodom (Hevesi et al., 2004). Ocena intenziteta infekcije vršena je posle 5 dana od inokulacije prema skali od 0-4 (Paulin et al., 1990). (Tabela 2, Slika 1).

Statistička analiza dobijenih podataka je urađena u STATISTIKA 8 (software package StatSoft, Inc.) primenom analize varijanse (ANOVA). Za detektovanje značajnosti razlika ($P > 0.05$) između tretmana primenjen je Tukey test. Multivarijacionom



Slika 1. Intenzitet infekcije veštački inokulisanih plodova različitih sorata kruške prema skali od 0-4.
Figure 1. Intensity of infection on artificially inoculated pear fruit cultivars according scale 0-4.



Tukey test $p \geq 0,05$

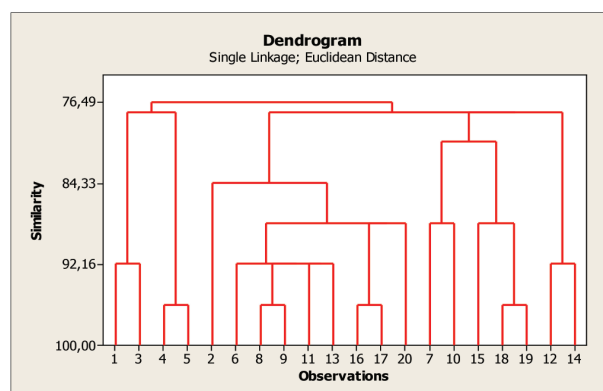
Slika 3. Različita otpornost ispitivanih sorti kruške.
Figure 3. Different resistance of investigated pear cultivars.

statističkom analizom (klaster) grupisane su sorte kruške po sličnosti prema otpornosti prema *E. amylovora*.

REZULTATI

Prilikom ovih istraživanja utvrđene su značajne razlike u pogledu osetljivosti sorata kruške prema *E. amylovora*, primenom metode inokulacije nesazrelih plodova. Sve inokulisane sorte možemo podeliti u nekoliko grupa (Slika 2 i 3).

Prema tolerantnosti na *E. amylovora* sorte Santa Marija i Vilijamova (1 i 3, Tabela 2) su značajno ($P > 0.05$) osetljivije od sorata Karmen, Moretini, Hardenpont i Kifer (4, 5, 12 i 14), koje su pak imale značajno nižu tolerantnost od sorata – Krasanka, Komis, Boskova bočica, Kleržo i Kajzer (7, 10, 15, 18 i 19). Najveću otpornost su pokazale sorte Turandot, Junska lepotica, Magnes, Kaluđerka, Abate Fetel, Ženeral Lekler, Karamanka, nepoznata autohtona sorta (Šabac), kao i nepoznata sorta (BCX 1, Tabela 1) iz zasada u Beloj Crkvi (2, 6, 8, 9, 11, 13, 16, 17 i 20) što je i statistički značajno više ($P > 0.05$), (Slika 1). Mul-



Slika 2. Rezultati klaster analize za ocenu plodova ispitivanih sorata kruške prema *E. amylovora*.
Figure 2. Results of cluster analysis for evaluation of resistance investigated pear cultivars to *E. amylovora*.

tivarijaciona statistička analiza – klaster je potvrdila rezultate primenom Tukey testa, (Slika 2 i 3).

Na osnovu podataka iz grafikona i dendrograma nastalog klaster analizom može se uočiti da najveću osetljivost ispoljavaju sorte Santa Marija i Vilijamovka koje su veoma raspostranjene u plantažnim zasadima kruške u Srbiji. Sledeću grupu sorata sa ocenom tri čine Karmen, Kifer, Butira, Hardenpont, pri čemu bi smo istakli da se na ovoj sorti nekroza ispoljava u vidu vlažnih tamno zelenih pega sa mnogobrojnim kapima eksudata.

Ocenom 2 se karakterišu sorte Boskova Bočica, Komis, Kajzer i Krasanka. Na sortama Karamanka, Magnes, Junska lepotica, Turandot, Abate Fetel, Kaluđerka i Ženeral Lekler. Na inokulisanim plodovima ovih sorata se pojavljuju mrke nekrotične pege, bez pojave bakterijskog eksudata, prečnika oko 0,3-0,5 cm i oni su ocenjenim brojem 1, što znači da ispoljavaju najveći stepen otpornosti. Ovak o su ocenjene i autohtona sorta nepoznatog imena (kalemljena na divljoj krušci, Šabac), kao i sorta takođe nepoznatog imena (BCX, Bela Crkva, kalemljena na podlozi dunja M29). Istraživanja su definitivno potvrdila razliku osetljivosti sorata kruške prema *E. amylovora*.

Pri prirodnim infekcijama je najviši intenzitet zaraze zabeležen na sortama Santa Marija i Vilijamova, a na ostalim ispitivanim sortama se pojavljuje u značajno manjem intenzitetu. Uočene razlike ukazuju da primenjeni metod ocene otpornosti sorata kruške prema ovoj bakteriji može poslužiti kao prvi korak za dalju primenu pouzdanih metoda, koje podrazumevaju inokulaciju mladara ili sejanača kruške.

Korišćeni soj Ea 203 je izolovan 2012. godine u zasadu kruške (Santa Marija), gde je zabeležena

pojava bakteriozne plamenjače izuzetno visokog intenziteta. Pojava bolesti je uzrokovala krčenje pojedinih stabala. Soj prouzrokuje HR duvana, izraženu nekrozu inokuliranih plodova osetljivih sorata kruške (Santa Marija, Vilijamovka), praćenu obilnom produkcijom bakterijskog eksudata. Pri biokemijskim testovima (korišćenje ugljenih hidrata, metabolizam makromolekula, izgled kolonija na specifičnim podlogama (CG i CCT) soj ispoljava sve odlike karakteristične za *E. amylovora*.

DISKUSIJA

Suzbijanje *E. amylovora* je otežano nedostatkom odgovarajućih baktericida koji bi sprečili njeno širenje. Preparati na bazi bakra ispoljavaju određenu efikasnost, ali mogu delovati fitotoksično u fenofazama kada je opasnost od infekcije najveća (Arsenijević i Gavrilović, 2007). Visoku efikasnost ispoljavaju antibiotici (streptomycin i oksitettraciklin), ali njihovom dugotrajnom primenom dolazi do razvoja rezistencije, što je zabeleženo još 70 ih godina prošlog veka u SAD (Van der Zwet and Keil, 1979; van der Zwet and Beer, 1999; McManus and Jones, 1994). Osim toga, antibiotici nisu registrovani za primenu u zaštiti bilja u mnogim zemljama Evrope, ali i u Srbiji.

Zbog svega toga su poslednjih decenija u mnogim državama sprovedena intenzivna istraživanja sa ciljem selekcionisanja otpornih sorata kruške i jabuka prema *E. amylovora*. Dobri rezultati su postignuti naročito pri selekciji jabuke. U Nemačkoj su selekcionisane sorte jabuke Revena, Reanda, Rene, otporne prema *E. amylovora*, ali i prema prouzrokovateljima čađave krastavosti i pepelnice (Fischer and Fischer, 1996). Intenzivna istraživanja na selekciji otpornih sorata jabuke se sprovode i u Švajcarskoj (Sobiczewski et al., 1997; Sobiczewski et al., 2010; Kellerhals et al., 2010). U SAD su stvorene otporne podloge jabuke prema *E. amylovora* (Norelli et al., 2003).

Kao rezultat selekcionih programa, u Kanadi je stvoreno više sorata kruške otpornih prema *E. amylovora*, ali se po svom značaju izdvajaju Harrow Delight, Harrow Quen, Harrow Sweet (Hunter, 1993). Istraživanja na selekciji otpornijih sorata kruške prema *E. amylovora* sprovede se i u Češkoj i Mađarskoj (Sillerova et al., 2010; Hevesi, et al., 2004). Navedeni podaci ukazuju na veliki značaj stvaranja otpornih sorata jabučastih voćaka prema *E. amylovora*. Smatra se da je to u budućnosti jedan od najpouzdanijih metoda sprečavanja širenja ove bakterije.

Naša istraživanja pokazuju da su sorte Santa

Marija i Vilijamova veoma osetljive prema *E. amylovora*. Na stablima ovih sorata u agroekološkim uslovima u Srbiji se često ispoljavaju simptomi bakteriozne plamenjače pri prirodnim infekcijama i ovi rezultati su u punoj saglasnosti sa literaturnim podacima (Paulin et al., 1990; Sobiczewski et al., 1997; Spotts and Mielike, 1999; Ristevski, 2003; Hevesi et al., 2004).

Široko rasprostranjena sorta Morettini pri našim ispitivanjima pokazuje manju osetljivost, uzimajući u obzir nekrozu inokuliranih plodova. Ova sorta je manje osetljiva prema *E. amylovora* od prethodno dve spomenute sorte što se slaže sa podacima iz literature (Sobiczewski et al., 1997). U našim agroekološkim uslovima bakteriozna plamenjača se sporadično pojavljuje na ovoj sorti kruške. S druge strane, istraživanja ponašanja različitih sorata kruške pri prirodnim infekcijama u Rumuniji su pokazala da su sorte Moretini i Hardenpont veoma osetljive prema patogenu (Sestras et al., 2008). Sorta Hardenpont se smatra umereno osetljivom (van der Zwet and Beer, 1995; Sobiczewski, 1997; Hevesi et al., 2004). Ovakva raznolikost rezultata, ukazuje da otpornost sorata kruške prema *E. amylovora* zavisi od brojnih faktora, ali da verovatno i agroekološki uslovi imaju veoma važnu ulogu u ostvarenju infekcija različitih sorata ove vrste voćaka.

Ranije rasprostranjene sorte kruške, Krasanka, Kleržo, Boskova bočica, Kajzer, Komis, ispoljavaju značajnu otpornost prema *E. amylovora* pri testovima inokulacije plodova. Međutim pri prirodnim infekcijama i na osnovu inokulacije mladara zapažena je osetljivost sorte Krasanka prema bakteriji dok su sorte Komis i Kajzer značajno otpornije (van der Zwet and Beer, 1995; Panić i Arsenijević, 1996; Spotts and Mielike, 1999; Sestras et al., 2008).

Iznanadjenje prilikom naših istraživanja predstavlja ponašanje sorata Abate Fetel, Kaluđerka i Ženeral Lekler. Sve tri su prema primenjenoj skali dobili ocenu 1, ali se one prema literaturnim podacima ubrajaju u osetljive odnosno manje otporne sorte (van der Zwet and Beer, 1995; Sobiczewski, et al., 1997; Spotts and Mielike, 1999; Ristevski et al., 2003). U Srbiji su takođe primećene zaraze jakog intenziteta na sortama Abate Fetel i Kaluđerka (Arsenijević i Gavrilović, 2007).

Prilikom ovih istraživanja najveću otpornost su pokazale sorte Junska Lepotica, Turandot i nepoznata sorta (Bela Crkva). Visoku otpornost je pokazala i sorta Magnes, na kojoj se nekroza bez produkcije bakterijskog eksudata ispoljava samo oko mesta inokulacije, ali se i u literaturi ona spominje kao veoma otporna prema *E. amylovora* (van der Zwet and Keil, 1979; van der Zwet and Beer, 1995). Po-

menuti autori ističu i izrazitu otpornost sorte Kifer, ali se ona pri našim testovima pokazala osetljivom (ocena 3). Prirodne infekcije na ovoj sorti nisu zapažene u nas, ali ova sorta u Srbiji nije od ekonomskog značaja.

Od ranije je poznato da lokalne (autohtone) sorte kruške na području Balkana ispoljavaju značajnu otpornost prema ovoj bakteriji. Zato je bilo za očekivati da inokulisane sorte Karamanka i nepoznata autohtona sorta i pri našim istraživanjima ispolje visok stepen otpornosti. Početkom osamdesetih godina prošlog veka realizovan je projekat proučavanja otpornosti autohtonih sorata kruške prema *E. amylovora* u tadašnjoj Jugoslaviji i najviši nivo otpornosti su upravo i pokazale sorte sa područja Srbije i Makedonije. To ukazuje da bi te sorte mogle biti značajan izvor gena otpornosti za selekcionisanje sorata otpornih prema *E. amylovora*, tim pre što one ispoljavaju otpornost i prema patogenim gljivama i kruškinim buvama (*Psylla* spp.), koje imaju izvesnu ulogu u prenošenju bakterije (van der Zwet et al, 1987; Stančević et al., 1984; van der Zwet and Bell, 1990; van der Zwet and Bell, 1995).

Pojava simptoma bakteriozne plamenjače na

sortama Kaluđerka (Cure) i Abate Fetel pri prirodnim infekcijama, uz odsustvo pojave bakterijskog eksudata na inokulisanim plodovima ovih sorata, mogla bi se objasniti povećanom otpornošću ploda prema bakteriji. Ovaj podatak bi mogao biti od značaja, jer *E. amylovora* često može inficirati plodove nekih sorata kruške (Santa Marija Vilijamova), što može rezultirati velikim štetama, ispoljenim u vidu truleži ploda (Arsenijević i Gavrilović, 1997).

Ova istraživanja su pokazala da se test veštačke inokulacije plodova kruške sa izvesnom pouzdanošću može iskoristiti za početne informacije o otpornosti sorata. Takođe, da se rezultati uz određena odstupanja, podudaraju sa intenzitetom infekcija ostvarenih pri prirodnim u uslovima. Međutim, najrelevantni podaci se dobijaju inokulacijom mladara voćaka razvijenih na sadnicama ili mladim stablima voćaka (van der Zwet and Beer, 1995; Hevesi et al., 2004).

ZAHVALNICA

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

LITERATURA

- Arsenijević, M., Gavrilović, V. (2007): Praktični priručnik o bakterioznoj plamenjači jabučastih voćaka. Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Beograd, pp 1-80.
- Fisher, C., Fisher, K. (1996): Breeding for resistance within a multiple resistance program in apples. Acta. Hort, 411: 375-381.
- Hevesi, M., Göndör, M., Kása, K., Honty, K., Tóth, M.G. (2004): Traditional and commercial apple and pear cultivars as sources of resistance to fireblight. Bulletin OEPP, 34: 377-380.
- Hunter, D.M. (1993): Pear breeding for the 21st century-program and progress at Harrow. Acta Hort., 338: 377-383.
- Kellerhals, M., Franck, L., Baumgartner I., Patoocchi A., Frey, J. (2010): Breeding for fire blight resistance in apple. 12th International Workshop on Fire Blight, Warsaw, Poland, August 16-20, 2010. Book of Abstract: 57.
- McManus, P.S., Jones A.L. (1994): Epidemiology and Genetic Analysis of Streptomycin Resistance *Erwinia amylovora* from Michigan and Evaluation Oxytetracycline for Control. Phytopathology, 84: 627-623.
- Norelli, J.L., Holleran H.T., Johnson W.C., Robinson, T.L., Aldwinckle, H.S. (2003): Resistance of Geneva and Other Apple Rootstock to *Erwinia amylovora*. Plant Disease, 87 (1): 26-32.
- Panić, M., Arsenijević, M. (1996): Bakteriozna plamenača jabučastih voćaka i ukrasnih biljaka (*Erwinia amylovora*). Monografska studija. Poljoprivredni fakultet, Novi Sad, Zajednica za voće i povrće AD, Beograd.

- Paulin J.P., Keck, M., Shartier, R., Zislavski, W. (1990): Trials on Estimation on the Fire Blight Susceptibility by Inoculation of Immature Pome Fruits (in German). *Pflanzenschutzberichte*, 51(2): 91-98.
- Ristevski, B., Pejčinovski, F., Kolečevski, P., Kiprijanovski, M. (2003): Otpornost nekih sorata kruške na bakterijsku plamenjaču *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al.,. *Zbornik naučnih radova*, Vol.1, br.1, 153-158. PKB Institut Agroekonomik, Beograd.
- Sillerova, J., Korba J., Paprstein, F., Sedlak, J. (2010): Testing of resistance of pear cultivars after artificial inoculation with *Erwinia amylovora* in field conditions. 12th International Workshop on Fire Blight, Warsaw, Poland, August 16-20, 2010. *Book of Abstract*: 114.
- Sestras, A., Sestras, R., Barbos A., Militaru, M. (2008): The Differences among Pear Genotypes to Fire Blight (*Erwinia amylovora*) Attack, Based on Observations of Natural Infection. *Not. ot. Hort.Agrobot. Cluj*, 36 (2): 98-103.
- Sobiczewski P., Deckers, T., Pulawska, J. (1997): Fire Blight (*Erwinia amylovora*). Some aspects of epidemiology and control. *Phare Partnership and Institution Building programme*.
- Sobiczewski P., Peil, A., Berczyński, S., Lewandowski M., Richter, K., Zurawicz E., Kellerhals, M (2010): Selection for fire blight resistance of apple genotypes originating from european genetic resources and breeding programs. 12th International Workshop on Fire Blight, Warsaw, Poland, August 16-20, 2010. *Book of Abstract*: 61.
- Spotts, R.A., Mielke E.A. (1999): Resistance of pear cultivars in Oregon to natural fire blight infection. *Fruit Varieties Journal* 53 (2): 110-115.
- Stančević, A. Gavrilović, J., Stanković, D., Zwet, T. van der (1984): „*Pitoma Slanopadja*“, a Natural Pear Hybrid Between *Pyrus amygdaliformis* and *Pyrus communis*. *Hort Science*, 19(2): 254-255.
- STATISTIKA 8. (software package StatSoft, Inc.).
- Zwet, T. van der, Keil, H.L. (1979): Fire Blight – A Bacterial Disease of Rosaceous plants. U.S. Department of Agriculture, *Agriculturae Handbook* 510, Washington, D.C., pp., 200.
- Zwet, T., van der, Stanković, D., Ristevski, B. (1987): Collecting *Pyrus* Germplasm in Yugoslavia. *Hort Science*, 22 (1): 15-21.
- Zwet, T. van der, Bell, R. (1990): Fire Blight Susceptibility in *Pyrus* Germplasm from Eastern Europe. *Hort Science*, 25(5): 566-568.
- Zwet, T. van der, Bell, R. (1995): Response of Central European *Pyrus* Germplasm to Natural Fire Blight Infection and Natural Inoculation. *Hort Science*, 30 (6): 1287- 1291.
- Zwet, T. van der, Beer, S.V. (1995): Fire Blight-its Nature, Prevention and Control. A Practical guide to Integrated Diseases Management. U.S. Department of Agriculture. *Agricultural Bulletin* No 631, pp., 97.

(Primljeno: 06.10.2014.)

(Prihvaćeno: 10.11.2014.)

ESTIMATION OF RESISTANCE PEAR CULTIVARS TO *ERWINIA AMYLOVORA* USING ARTIFICIAL IMMATURE PEAR FRUITS METHOD

VELJKO GAVRILOVIĆ¹, RADE STANISAVLJEVIĆ¹, STEFAN STOŠIĆ²,
MILOŠ STEVANOVIĆ¹, GORAN ALEKSIĆ¹, MILICA STAJIĆ, NENAD DOLOVAC¹

¹Institute for Plant Protection and Environment, Belgrade

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

SUMMARY

Susceptability of different pear cultivars to *Erwinia amylovora* by artificial inoculated immature pear fruits are shown in this article. According obtained results significant differences among cultivars are confirmed and they could be divided in four groups. Most susceptible cultivars were Santa Marija. Second group includes Williams, Morettini, Carmen, Hardenpont. As most resistant shown to be Magness, Turandot and two local varieties Karamanka, as well as another unknown local cultivar. This results are compatible with literature data, but also confirmed observations about susceptibility of various pear cultivars to *E. amylovora* under natural infections. Artificial inoculation immature pear fruit could be considered as relatively reliable method for estimation of pear fruit trees resistance to this bacteria.

Key words: *Erwinia amylovora*, pear, resistance, immature fruits, artificial inoculation

(Received: 06.10.2014.)

(Accepted: 10.11.2014.)

MORFOLOŠKE KARAKTERISTIKE IZOLATA *COLLETOTRICHUM* SPP. - PROUZROKOVAČA ANTRAKNOZE

SVETLANA ŽIVKOVIĆ¹, SAŠA STOJANOVIĆ¹, JELICA BALAZŽ²

¹Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Beograd

²Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad
e-mail: zivkovicsvetla@gmail.com

REZIME

U morfološka ispitivanja su uključeni izolati *Colletotrichum* spp. poreklom sa plodova kruške, jabuke i višnje, kao i referentni sojevi *C. acutatum* (CBS 294.67) i *C. gloeosporioides* (CBS 516.97). Proučavanjem njihovih morfoloških karakteristika, dobijeni su podaci o izgledu ispitivanih kolonija, odlikama plodonosnog tela, apresorija, veličini i obliku konidija. Na podlozi KDA moguće je razlikovati četiri morfološke grupe kolonija, što potvrđuje fenotipsku varijabilnost proučavanih izolata *Colletotrichum* spp. Većina izolata sa ploda kruške i jabuke (KC-6, KC-9, KC-12, JC-5, JC-7, JC-9) obrazuje prvu morfološku grupu. Izolati sa ploda višnje (VC-3, VC-5, VC-7, VC-9), su izdvojeni u četvrtu morfološku grupu. Veličina i oblik konidija ovih izolata odgovara opisu vrste *C. gloeosporioides*. Hromogeni izolati sa kruške (KC-21, KC-23, KC-82), obrazuju drugu morfološku grupu, a u trećoj morfološkoj grupi je izolat sa ploda jabuke (JC-4). Morfologija konidija ovih izolata odgovara opisu vrste *C. acutatum*. Tokom ovih istraživanja je utvrđeno da svi izolati obrazuju plodonosna tela – acervule. Testirane kulture *Colletotrichum* spp. ne formiraju teleomorfni stadijum. Zbog izražene varijabilnosti, većina ispitanih osobina ne mogu se primeniti kao samostalni taksonomski kriterijum. Na osnovu dobijenih rezultata, za klasifikaciju vrsta roda *Colletotrichum*, potrebno je koristiti najmanje dva taksonomska kriterijuma: morfološke karakteristike uporedo sa molekularnom identifikacijom.

Cljučne reči: morfologija, antraknoza, *Colletotrichum acutatum*, *Colletotrichum gloeosporioides*

UVOD

Gljive roda *Colletotrichum* – prouzrokovajući antraknoze, su kosmopolitske i izrazito agresivne vrste. U zemljama subtropske i tropske klimatske zone mogu prouzrokovati značajne gubitke na velikom broju poljoprivrednih kultura u toku vegetacije, dok su u umerenom klimatskom području pre svega uzročnici truleži i propadanja uskladištenih plodova voća i povrća (Freeman et al., 1998).

Dve ekonomski najznačajnije, i u literaturi svakako najzastupljenije vrste ovog roda su *Colletotrichum gloeosporioides* i *Colletotrichum acutatum*. Do polovine XX veka za vrstu *C. gloeosporioides* je postojao veliki broj sinonima (von Arx, 1957). Varijabilnost *C. gloeosporioides* je uočio i Simmonds (1965), pa je na osnovu izgleda i biometričkih vred-

nosti konidija izvršio prvu podelu na: *C. gloeosporioides* var. *gloeosporioides* i *C. gloeosporioides* var. *minor*. Zbog postojanja velikog broja populacija i raznolikosti morfoloških karaktera, Sutton (1980) je *C. gloeosporioides* označio kao zbirnu vrstu. Ekstremna varijabilnost *C. gloeosporioides* uočena je i od strane drugih autora (Mordue, 1971; Baxter et al., 1983), po kojima se specijalizovane forme mogu razlikovati isključivo kombinovanjem morfoloških, patogenih i odgajivačkih osobina. Analiza DNA sekvenci (rDNA-ITS regiona, β -tubulin gena i gliceraldehid-3fosfat-dehidrogenaza – GPDH gena) omogućila je razdvajanje mnogobrojnih biotipova, varijeteta i forma *specialis* u okviru heterogene vrste (Cannon et al., 2008).

C. acutatum, drugu široko rasprostranjenu i izuzetno značajnu vrstu roda *Colletotrichum*, prvi je

pod ovim nazivom opisao Simmonds (1965). Međutim, prema literaturnim podacima najstariji validni naziv vrste *C. acutatum* je *C. fructigenum* (Berk.) Vassilj. Veći broj autora (Southwort, 1891; Stoneman, 1898; Wollenweber and Hochapfel, 1949; Bohni, 1949; *loc. cit.* Baxter et al., 1983) su krajem XIX i u prvoj polovini XX veka ustanovili postojanje gljiva – prouzrokovaca truleži ploda, za koje je kasnije utvrđeno da pripadaju ovoj vrsti. Gorter je opisao *C. fructigenum* f. sp. *chromogenum* odvajajući je od *C. gloeosporioides* na osnovu vretenastih i na vrhovima zašiljenih konidija, ružičasto obojene kulture, i činjenice da ova vrsta ne formira teleomorfni stadijum (Gorter, 1962; *loc. cit.* Baxter et al., 1983). Zbog izrazite heterogenosti i oučenih specifičnosti obavljena je diferencijacija *C. acutatum*. Izdvojene su dve specijalizovane forme patogena: *C. acutatum* f. sp. *chromogenum*, na osnovu produkcije karakterističnog crveno-ružičastog pigmeta u kulturi (Baxter et al., 1983) i *C. acutatum* f. sp. *pineum*, zbog ispoljene patogenosti prema biljkama roda *Pinus* (Dingley and Gilmour, 1972; *log. cit.* Sutton, 1992). Morfološka varijabilnost i genetički diverzitet ove vrste su potvrđeni i molekularnim analizama (ap PCR, RFLP). U okviru *C. acutatum* je ustanovljen veliki broj podgrupa i sojeva, pa se ona u literaturnim navodima definiše "u širem smislu" kao zbirna – *C. acutatum sensu lato* (Guerber et al., 2003).

S obzirom na ekonomski značaj roda *Colletotrichum* i činjenice da u našoj zemlji nema podataka o komparativnim ispitivanjima ovih patogena poreklom sa različitih domaćina, cilj istraživanja je morfološka karakterizacija izolata sa antraknoznih plodova kruške, jabuke i višnje. Uporednim proučavanjem morfoloških osobina dobiće se uvid u taksonomsku pripadnost gljiva *Colletotrichum* spp. i postojeću mikofloru antraknoznih plodova voća.

MATERIJAL I METODE

Standardnim fitopatološkim metodama iz plodova voća sa karakterističnim simptomima antraknoze dobijen je veliki broj izolata *Colletotrichum* spp. U morfološka ispitivanja su uključeni: izolati sa ploda kruške (KC-6, KC-9, KC-12, KC-21, KC-23 i KC-82); jabuke (JC-4, JC-5, JC-6 i JC-7); višnje (VC-3, VC-5, VC-7 i VC-9), kao referentni sojevi *C. gloeosporioides* (CBS 516.97) i *C. acutatum* (CBS 294.67) iz kolekcije Centraalbureau voor Schimmelfcultures, Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, Holandija.

Morfološke karakteristike vegetativnih i reproduktivnih organa reprezentativnih izolata *Colletotrichum* spp., proučavane su u uslovima *in vivo* i

in vitro, prema kriterijumima Baxter et al. (1983). Merenja i fotografisanja reproduktivnih organa gljiva obavljena su na scanning elektronskom mikroskopu i mikroskopu Olympus BX51 (uvećanja x40 i x100).

Morfologija vegetativnih organa

Proučavanje morfologije vegetativnih organa obuhvatilo je praćenje razvoja i ocenu fenotipskih karakteristika *Colletotrichum* spp. (izgled, boja, zoniranost lica i naličja kulture) na krompir dekstroznoj agaru (KDA), kao i ispitivanje mikroskopskih osobina micelije pravljenjem privremenih preparata.

Morfologija reproduktivnih organa

Ispitivanje morfoloških osobina reproduktivnih organa podrazumevalo je: praćenje formiranja plodonosnog tela gljive; prisustvo/odsustvo seta; način obrazovanja i veličinu konidiofora i konidiogenih ćelija; boju, oblik, dimenzije i morfologiju klijanja konidija; oblik, strukturu i veličinu apresorija i obrazovanje teleomornog stadijuma gljive.

Morfologija plodonosnog tela i prisustvo/odsustvo seta

Od morfoloških karakteristika plodonosnog tela, proučavani su izgled, dimenzije i način njihovog formiranja na prirodnom supstratu (veštački inokulisanim plodovima), kao i na kulturama gajenim na KDA, sintetičkoj hranljivoj podlozi sa filter papirom (SNA), podlozi sa fragmentima kore jabuke (JKA) i podlozi sa fragmentima kore pomorandže (PMA), (Baxter et al., 1983). Biometrijske vrednosti konidiomate su dobijene merenjem njihovog prečnika (po 20 acervula sa plodova i hranljivih podloga).

Prisustvo/odsustvo seta je određeno prema metodi Smith and Black (1990), mikroskopiranjem kultura odabranih izolata starosti 15 dana, odgajenih na KDA, u termostatu na temperaturi od 25°C. Obrazovanje seta na veštački inokulisanom biljnom materijalu obavljeno je mikroskopskim pregledom epidermalne površine nekrotičnih pega.

Morfologija konidiofora i konidiogenih ćelija

Mikroskopskim pregledom privremenih preparata utvrđena je morfologija konidiofora i konidiogenih ćelija: oblik, veličina, boja i način njihovog formiranja.

Morfologija konidija

Konidije su uzete sa kultura starosti 15 dana, odgajenih na KDA i temperaturi od 25°C. Na osnovu kriterijuma Smith and Black (1990) ispitivani su: boja konidija je određena posmatranjem mase konidija na beloj keramičkoj podlozi; oblik konidija je utvrđen mikroskopskim pregledom preparata. Konidije su svrstane u dve kategorije: (1) vretenaste (fusiformne), zaoštrene na oba kraja; i (2) cilindrične, zaoštrene na jednom kraju i zaobljene na drugom kraju; ili cilindrične, zaobljene na oba kraja. Veličina konidija je određena merenjem dužine i širine po 100 slučajno odabranih konidija svakog izolata. Dimenzije su date kao minimalne – (prosečne) – maksimalne vrednosti, a izračunat je i odnos dužina/širina. Morfologija klijanja je određena naklijavanjem konidija u kapi destilovane vode. Nakon 24 h obavljena su merenja dužine inicijalnih hifa i formiranih sekundarnih konidija, a dobijene vrednosti predstavljene su kao minimalne – (prosečne) – maksimalne vrednosti 50 merenja.

Morfologija apresorija

Proučavanje morfologije apresorija izolata *Colletotrichum* spp. je obavljeno prema metodi Johnston and Jones (1997). U prazne Petri kutije su stavljeni isečci KDA podloge (10 mm²), a potom je na površinu agara dodata jedna kap suspenzije konidija. Inokulisani isečci KDA su pokriveni sterilnom pokrovnom ljušpicom i ostavljeni u termostatu na temperaturi od 25°C. Nakon 5 dana mikroskopskim pregledom pokrovnih ljušpica, proučeni su oblik, veličina, boja i struktura 50 formiranih apresorija. Dimenzije apresorija su prikazane u obliku minimalnih – (prosečnih) – maksimalnih vrednosti.

Obrazovanje teleomornog stadijuma

Sposobnost obrazovanja teleomornog stadijuma je praćena na svim hranljivim podlogama korišćenim za ispitivanje odgajivačkih karakteristika i utvrđivanje morfologije reproduktivnih organa izolata *Colletotrichum* spp. Kulture gljiva su gajene u termostatu na temperaturi od 25°C, a formiranje peritecija je posmatrano nakon mesec dana. Pojava savršenog stadijuma gljive praćena je i na veštački inokulisanim plodovima.

REZULTATI

Morfologija vegetativnih organa

Svi izolati *Colletotrichum* spp. na KDA podlo-

zi, 24 h nakon zasejavanja, obrazuju začetak micelije, bele boje, vazdušastog izgleda, prečnika 2 mm. Nakon par dana dolazi do promena u konzistenciji i obojenosti kultura, a primetan je i neujednačen porast ispitivanih izolata. Na osnovu ispoljenih karakteristika, kolonije gljiva *Colletotrichum* spp. se mogu svrstati u 4 morfološke grupe.

Prvu grupu čine izolati poreklom sa ploda kruške i jabuke (KC-6, KC-9, KC-12, JC-5, JC-6, JC-7), koji su po fenotipskim karakteristikama micelije i brzini porasta najbliži referentnom izolatu *C. gloeosporioides* (CBS 516.97). Kolonije ovih izolata su ispoljile brz i ravnomeran porast na podlozi KDA. Starenjem kulture postaju tamnosivo-maslinaste (Slika 1), a sa naličja se u većini slučajeva uočava formiranje koncentričnih prstenova svetlije i tamnije boje.

Drugoj, izrazito specifičnoj grupi pripadaju izolati sa ploda kruške (KC-21, KC-23, KC-82). Kulture ovih gljiva su intenzivnog porasta i karakteristične ružičaste boje. Razvojem kolonija dolazi do pojave zoniranosti i formiranja koncentrično raspoređenih ili nepravilno razbacanih acervula iz kojih se u žutonaranđastom matriksu oslobađaju konidije. Obilna sporulacija u kulturi je svojstvena ovoj grupi izolata (Slika 2).

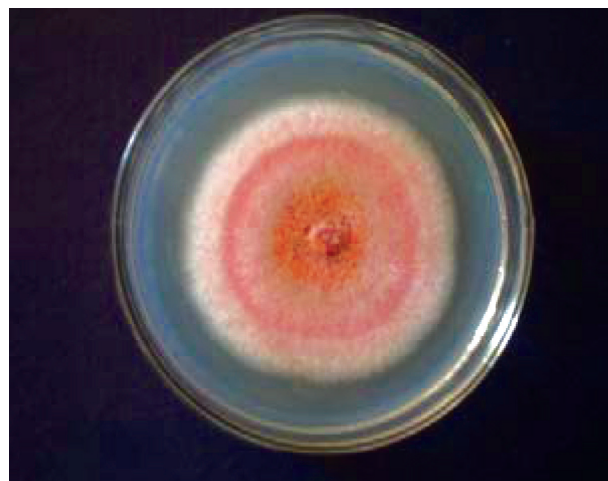
U okviru treće grupe je izolat sa jabuke (JC-4), koji po makroskopskim osobinama micelije najviše odgovara referentnom izolatu *C. acutatum* (CBS 294.67). Kolonije su svetlo do tamno sive, umerenog porasta, nepravilnih ivica (Slika 3), a sa naličja je uočljiva pojava naranžastih i svetlomrkih kružnih zona. Starenjem na površini kultura dolazi do sporulacije i oslobađanja konidija.

Četvrtu grupu čine isključivo izolati poreklom sa ploda višnje (VC-3, VC-5, VC-7, VC-9), koji su po obojenosti i strukturi micelije veoma slični prvoj grupi, ali su istovremeno i specifični po usporenom porastu na KDA podlozi (Slika 4). Razvojem, kulture poprimaju karakterističan zonirani izgled.

Mikroskopskim pregledom kolonija izolata *Colletotrichum* spp., gajenih na KDA podlozi i temperaturi od 25°C tokom 7 dana, uočeno je da ne postoje značajne razlike u morfološkim osobinama micelije. Mlade hife su razgranate, hijalinske i granuliranog ćelijskog sadržaja. Zidovi hifa su tanki, a vrhovi zaobljeni. Starije hife u centru kolonije su šire, debljih zidova i tamnije boje, često sa proširenim vrhovima i sa izraženim poprečnim pregradama. Prečnik hifa većine izolata iznosi 2,5 – 3,5 µm. Starenjem kultura, dolazi do grupisanja hifa i stvaranja tamnih stromatičnih zadebljanja. U zavisnosti od izolata ove strukture su evoluirale u acervule ili ostale sterilne.



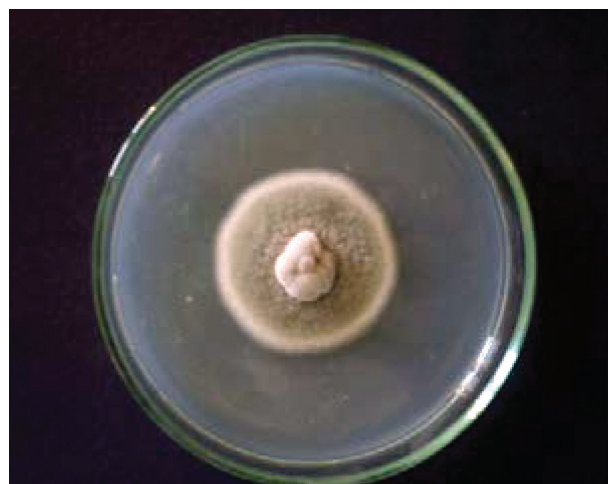
Slika 1. Izolat JC-7 na KDA (I morfološka grupa).
Figure 1. Isolate JC-7 on PDA (I morphological group).



Slika 2. Izolat KC-82 na KDA (II morfološka grupa).
Figure 2. Isolate KC-82 on PDA (II morphological group).



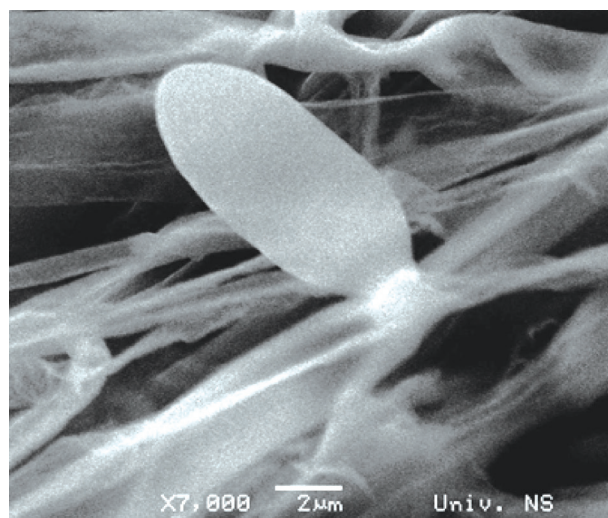
Slika 3. Izolat JC-4 na KDA (III morfološka grupa).
Figure 3. Isolate JC-4 on PDA (III morphological group).



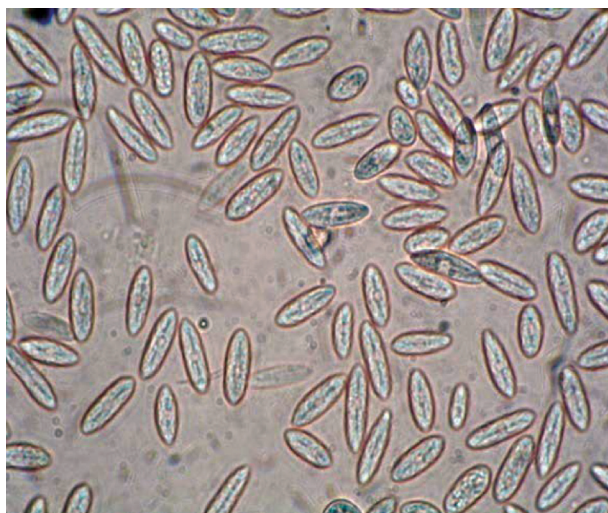
Slika 4. Izolat VC-9 na KDA (IV morfološka grupa).
Figure 4. Isolate VC-9 on PDA (IV morphological group).



Slika 5. Acervuli na KDA u koncentričnim prstevima sa narandžastim konidijskim eksudatom (izolati KC-21, KC-23, KC-82).
Figure 5. Acervuli on PDA in concentric rings with orange conidial exudate (isolates KC-21, KC-23, KC-82).



Slika 6. Konidija formirana na miceliji (scanning electron micrograph, izolat KC-23).
Figure 6. Conidium formed on mycelium (scanning electron micrograph, isolate KC-23).



Slika 7. Morfologija konidija, izolat KC-23 (vretenaste).
Figure 7. Morphology of conidia, isolate KC-23 (fusi-form).



Slika 8. Morfologija konidija, izolat KC-12 (cilindrične).
Figure 8. Morphology of conidia, isolate KC-12 (cylindrical).



Slika 9. Klijanje konidija (izolat JC-4)
Figure 9. Germination of conidia (isolate JC-4).



Slika 10. Apresorije u nizu (izolat JC-7)
Figure 10. Appressoria in a series (isolate JC-7).

Morfologija reproduktivnih organa

Morfologija plodonosnog tela i prisustvo/odsustvo seta

Na obolelim plodovima acervule se formiraju 7-10 dana nakon obavljenih inokulacija i mogu biti raspoređene u vidu koncentričnih prstenova ili razbacane po centralnoj i perifernoj zoni antraknoznih površina. Plodonosna tela svih proučavanih izolata *Colletotrichum* spp. su morfološki veoma slična: kružnog ili nepravilnog oblika, crne ili tamnomrke boje i najčešće bez seta. Acervuli se obrazuju subepidermalno, na stromi sastavljenoj od gustog sloja ćelija. Bazalni deo acervule je pokriven fialidičnim konidioforama, na kojima se formiraju konidije. Porastom plodonosnog tela epidermis puca, vršni deo acervule izbija na površinu ploda i u uslovima povećane vlage dolazi do oslobađanja konidija u žutonarandžastoj želatinoznoj masi – matriksu.

Na svim ispitivanim hranljivim podlogama, *Colletotrichum* spp. obrazuju acervule crne ili mrke boje, 10-15 dana nakon zasejavanja izolata. Plodonosna tela mogu biti grupisana u centru kulture, nepravilno razbacana ili koncentrično raspoređena. Starenjem kultura iz acervula dolazi do oslobađanja konidijskog eksudata, karakteristične žutonarandžaste boje (Slika 5). Kod jedne grupe izolata (KC-9, KC-12, JC-7, VC-3, VC-5, VC-7 i VC-9) konidiomate su često prisutne u stromatičnim strukturama i utonule u podlogu.

Dimenzije acervula *Colletotrichum* spp. variraju u zavisnosti od supstrata. Konidiomate formirane na inokulisanim plodovima su nešto većeg prečnika, od 250 do 550 µm, dok su na ispitivanim podlogama sitnije i kreću se u granicama od 100 do 450 µm. S obzirom na preklapanja biometričkih vrednosti, dimenzije acervula ne mogu biti korišćene kao pouzdan taksonomski kriterijum za diferencijaciju izolata *Colletotrichum* spp.

Prilikom ispitivanja morfoloških karakteristika

Tabela 1. Morfologija konidija *Colletotrichum* spp. – izolata sa voća.
Table 1. Morphology of conidia of *Colletotrichum* spp. – isolates from fruits.

Izolat Isolate	Oblik Shape	Dužina (μm) Length (μm) min-(mean)-max	Širina (μm) Width (μm) min-(mean)-max	Dužina/Širina Length/Width
KC-6	C*	12,8-(16,8)-19,5	3,2-(4,2)-4,8	4,00
KC-9	C	13,8-(17,6)-20,8	3,2-(4,4)-4,8	4,00
KC-12	C	13,8-(17,5)-19,5	2,4-(4,2)-4,8	4,17
KC-21	F	12,8-(13,9)-16,6	2,4-(3,5)-4,0	3,97
KC-23	F	12,8-(14,2)-16,0	3,2-(3,6)-4,0	3,94
KC-82	F	12,8-(14,0)-16,6	2,4-(3,7)-4,0	3,78
JC-4	F	12,8-(13,7)-16,6	3,2-(3,6)-4,0	3,81
JC-5	C	12,8-(17,2)-19,5	3,2-(4,2)-4,8	4,09
JC-6	C	13,0-(17,3)-19,5	3,2-(4,3)-4,8	4,02
JC-7	C	12,8-(17,5)-19,6	3,2-(4,1)-4,8	4,16
VC-3	C	12,8-(17,4)-19,5	3,2-(4,3)-4,8	4,04
VC-5	C	13,8-(17,6)-20,8	3,2-(4,3)-4,8	4,09
VC-7	C	13,8-(17,2)-19,5	3,2-(4,1)-4,8	4,20
VC-9	C	13,8-(17,6)-20,8	3,2-(4,2)-4,8	4,19
CBS 294.67	F	11,2-(13,9)-15,2	3,2-(3,5)-4,8	3,97
CBS 516.97	C	12,8-(17,9)-19,2	3,2-(4,3)-4,8	4,16

*C – cilindričan/cylindrical; F – vretenast/fusiform.

Tabela 2. Morfologija inicijalnih hifa, apresorija i sek. konidija izolata *Colletotrichum* spp.
Table 2. Morphology of g. tube, appressoria, and sec. conidia of isolates of *Colletotrichum* spp.

Izolat Isolate	Dužina i.hifa (μm) Length (μm) min-(mean)-max	Apresorije Appressoria		Sekundarne konidije Sec. conidia
		O* Sh*	dužina x širina (μm) length x width (μm) min-(mean)-max	dužina x širina (μm) length x width (μm) min-(mean)-max
KC-6	112-(124,5)-160	I	9,6-(11,5)-14,4 x 6,4-(6,8)-7,2	10,5-(16,8)-15,5 x 2,8-(3,1)-3,2
KC-9	112-(135,8)-160	C	8,0-(12,3)-12,4 x 6,4-(7,5)-8,8	10,8-(11,6)-13,5 x 2,8-(3,1)-3,2
KC-12	112-(127,6)-152	C	9,6-(11,7)-12,4 x 6,4-(7,9)-8,8	10,5-(11,6)-13,5 x 1,6-(3,1)-3,2
KC-21	48-(73,5)-120	O	8,0-(8,9)-9,6 x 4,8-(5,5)-7,2	–
KC-23	64-(75,5)-120	O	8,0-(9,2)-10,4 x 4,8-(5,5)-7,2	–
KC-82	48-(77,3)-112	O	6,4-(7,5)-9,6 x 5,6-(6,5)-7,2	–
JC-4	64-(104)-120	O	8,0-(8,8)-9,6 x 5,6-(6,7)-7,2	–
JC-5	80-(105,5)-152	I	9,6-(12,3)-14,4 x 6,4-(7,8)-8,8	10,8-(13,5)-13,5 x 1,6-(2,6)-3,2
JC-6	96-(122,5)-160	C	8,0-(11,5)-12,4 x 6,4-(7,8)-8,8	9,8-(12,5)-14,5 x 1,6-(2,8)-3,2
JC-7	112-(125,5)-152	C	8,0-(12,5)-14,4 x 6,4-(7,8)-8,8	10,8-(13,5)-15,5 x 1,6-(2,9)-3,2
VC-3	96-(136,8)-176	C	8,0-(9,5)-10,4 x 5,6-(6,7)-7,2	10,8-(14,4)-16,5 x 2,8-(2,9)-3,2
VC-5	112-(133,5)-160	C	8,0-(9,8)-12,4 x 6,4-(7,2)-8,8	9,8-(13,7)-17,5 x 1,6-(2,7)-3,2
VC-7	96-(136,8)-160	C	8,0-(8,5)-10,4 x 5,6-(6,5)-7,2	10,8-(12,5)-15,5 x 2,8-(3,0)-3,2
VC-9	96-(130,3)-176	I	6,4-(12,3)-14,4 x 6,4-(7,9)-8,8	10,8-(13,4)-16,5 x 2,8-(2,9)-3,2
CBS 294.67	48-(71,5)-112	O	6,4-(8,1)-9,6 x 5,6-(5,8)-6,4	–
CBS 516.97	112-(127,2)-160	I	9,6-(12,3)-14,4 x 6,4-(7,9)-8,8	12,8-(14,5)-16,5 x 2,8-(3,0)-3,2

*O/Sh-oblik/shape: C – oblik palice/clavate; O – okruglast/ovate; I – nepravilan/irregular.

konidiomata u kulturi, nije utvrđeno prisustvo seta ni kod jednog izolata *Colletotrichum* spp., kao ni kod referentnih sojeva *C. acutatum* (CBS 294.67) i *C. gloeosporioides* (CBS 516.97). Mikroskopskim pregledom epidermalnih površina inokulisanih plodova, konstatovano je formiranje seta kod dva izolata poreklom sa jabuke, JC-7 i JC-9. Obrazovane sete su u osnovi proširene, smeđe boje, prave ili blago povijene, sa svetlim vrhovima i mogu biti septirane (1-3). Dimenzije seta su neujednačene i iznose 65 – 130 x 3,2 – 4,8 µm. Kod oba izolata na vrhovima seta je zabeleženo formiranje konidija (1-4).

Morfologija konidiofora i konidiogenih ćelija

U bazalnom delu konidiomata obrazovanih na KDA podlozi, svi proučavani izolati *Colletotrichum* spp., kao i referentni *C. acutatum* (CBS 294.67) i *C. gloeosporioides* (CBS 516.97) obrazuju konidiofore koje su izduženo cilindričnog oblika, hijalinske ili svetlosmeđe, blago povijene, veličine 20,8 – 32 x 3,2 – 4,8 µm. Konidiogene ćelije su glatke, cilindrične, hijalinske i formiraju se u konidiomatama, ali se mogu javiti i na miceliji i tada se teško razlikuju od sterilnih hifa. Dimenzije konidiogenih ćelija ispitivanih izolata su skoro uniformne i iznose 6,4 – 40 x 1,6 – 4,8 µm.

Morfologija konidija

Izolati *Colletotrichum* spp., poreklom sa antraknoznih plodova kruške, jabuke i višnje obilno formiraju konidije na konidiogenim ćelijama u konidiomati. Iz acervula na veštački inokulisanim plodovima i u kulturi, konidije se oslobađaju u vidu sluzastog želatinoznog matriksa. Osim u konidiomati, konidije se mogu formirati i na fialidičnim konidiogenim ćelijama lociranim na bočnim granama micelije (Slika 6).

Boja konidija svih ispitivanih izolata u masi je narandžasta do svetloružičasta i ne može biti korišćena kao kriterijum za diferencijaciju vrsta roda *Colletotrichum*.

Oblik konidija je određen na osnovu navedenih kriterijuma, a konidije izolata gajenih na KDA tokom 15 dana svrstane su u fusiformne, zaoštrene na oba kraja (Slika 7); cilindrične, zaoštrene na jednom kraju i zaobljene na drugom kraju; i cilindrične, zaobljene na oba kraja (Slika 8).

Izgled konidija nehromogenih izolata (KC-6, KC-9, KC-12, JC-5, JC-6, JC-7, VC-3, VC-5, VC-7 i VC-9) poreklom sa plodova jabuke, kruške i višnje, odgovaraju opisu konidija referentnog soja *C. gloeosporioides* (CBS 516.97). U pitanju su jednoćelijske, hijalinske, glatke, konidije sa sitnim granuliranim sadržajem, prave ili blago povijene, cilindrične, i u preko 90% slu-

čajeva zaobljene na oba kraja. Preostale konidije ove grupe izolata (č10%) su prelaznih formi, uglavnom sa jednim zaoštrenim vrhom ili elipsoidne. Konidije hromogenih izolata (KC-21, KC-23, KC-82 i JC-4), dobijenih sa antraknoznih plodova kruške i jabuke, uklapaju se u opis konidija referentnog soja *C. acutatum* (CBS 294.67). One su jednoćelijske, hijalinske, glatke, prave, sitno granuliranog sadržaja i dominantno fusiformnog oblika.

Veličina konidija i njihovo međusobno poređenje ukazuju da između ispitivanih izolata *Colletotrichum* spp. postoje izvesna variranja, naročito kada su u pitanju ekstremne vrednosti dužine konidija (Tabela 1). Prosečne dužine konidija izolata KC-6, KC-9, KC-12, JC-5, JC-6, JC-7, VC-3, VC-5, VC-7 i VC-9, iznose 17,4 µm i poklapaju se sa biometričkom vrednošću ove dimenzije referentnog soja *C. gloeosporioides* (CBS 516.97). Dužine konidija izolata KC-21, KC-23, KC-82 i JC-4, su prilično uniformne, u proseku 13,9 µm i u potpunosti odgovaraju prosečnoj dužini konidija referentnog soja *C. acutatum* (CBS 294.67).

Ekstremne vrednosti širine konidija svih proučavanih kultura gljiva su ujednačene (Tabela 1). Međusobnim poređenjem izolata mogu se konstatovati razlike u prosečnim vrednostima širine konidija. Kao i u prethodnom slučaju, rezultati dobijeni merenjem širine konidija ukazuju na grupisanje izolata u dve osnovne kategorije. Prvu grupu čine KC-6, KC-9, KC-12, JC-5, JC-6, JC-7, VC-3, VC-5, VC-7 i VC-9, kod kojih prosečna širina konidija iznosi 4,23 µm, što odgovara vrsti *C. gloeosporioides* (CBS 516.97). U okviru druge grupe su izolati KC-21, KC-23, KC-82 i JC-4, sa prosečnom širinom konidija od 3,69 µm. Dobijena vrednost se skoro podudara sa prosečnom širinom konidija referentnog soja *C. acutatum* (CBS 294.67).

Rezultati dobijeni izračunavanjem količnika, tj. odnosa dužine/širine konidija su takođe ukazali na postojanje dve grupe izolata (Tabela 1). Kod kultura koje se na osnovu oblika i veličine konidija mogu smatrati pripadnicima vrste *C. gloeosporioides*, odnos dužine i širine konidija iznosi od 3,60 do 3,97. Izolati koji morfološki odgovaraju vrsti *C. acutatum* poseduju konidije kod kojih je odnos dužina/širina u intervalu od 4,0 do 4,19. U oba slučaja i referentni sojevi *C. gloeosporioides* i *C. acutatum* imaju konidije sa istim odnosom ovih dimenzija. Na osnovu navedenog, može se konstatovati da granice numeričkih vrednosti dužine i širine konidija i njihovog količnika nisu jasno izdiferencirane, kao i da u pojedinačnim slučajevima postoje izvesna preklapanja u dimenzijama i obliku ispitivanih izolata. Međutim, ova dva morfološka kriterijuma uz izvesna ograničenja mogu poslužiti u diferencijaciji gljiva *Colletotrichum* spp. do nivoa vrste.

Morfologija klijanja konidija ispitivanih izolata

je prosek koji bez obzira na vrstu, započinje na identičan način. Prvi korak je bubrenje konidija, koje vremenom gube granulirani sadržaj i postaju prozračne. U ekvatorijalnom delu konidija izolata KC-21, KC-23, KC-82, JC-5, JC-6 i JC-7 dolazi do obrazovanje jedne, ili ređe 2-3 septe (Slika 9). Produkti klijanja konidija su inicijalne hife, apresorije i sekundarne konidije. U zavisnosti od izolata konidije formiraju jednu ili dve, a ponekad i do 4 inicijalne hife. Do klijanja najčešće dolazi na jednom ili oba vrha konidije - temeno klijanje. Znatno ređe konidije kličaju temeno-bočno ili bočno i to u slučajevima kada se obrazuju više od dve inicijalne hife. U procesu klijanja konidija ispitivanih izolata bez obzira na poreklo i vrstu, često dolazi do anastomoze inicijalnih hifa. Ovo je naročito izraženo u situacijama kada su konidije blizu jedna drugoj ili su inicijalne hife u paralelnoj poziciji. Kod izolata JC-4, kraća inicijalna hifa iz jedne konidije se može spojiti sa susednom konidijom koja je u fazi bubrenja. Uočena je takođe i pojava anastomoze dve klijuće konidije koje su u neposrednoj blizini. Na vrhovima iskljicalih inicijalnih hifa ili njihovih ogranaka, u zavisnosti od izolata dolazi do obrazovanja sekundarnih konidija i/ili apresorija. Sekundarne konidije su po obliku slične primarnim, ali su tanjih zidova i nešto manjih dimenzija. Kod izolata poreklom sa ploda višnje (VC-3, VC-5, VC-7 i VC-9) do obrazovanja sekundarnih konidija dolazi direktno na vrhovima majčinskih konidija, za razliku od izolata sa ploda kruške (KC-6, KC-9 i KC-12) kod kojih se sekundarne konidije formiraju na krajevima inicijalnih hifa.

Rezultati merenja dužine inicijalnih hifa i biometričke vrednosti sekundarnih konidija, 24 h nakon naklijavanja, ukazuju na postojanje dve vrste roda *Colletotrichum* (Tabela 2). Izolati KC-6, KC-9, KC-12, JC-5, JC-6, JC-7, VC-3, VC-5, VC-7 i VC-9, koji su uslovno determinisani kao *C. gloeosporioides* mogu se izdvojiti u posebnu grupu, po nešto dužim inicijalnim hifama i obilnom formiranju sekundarnih konidija. Konidije izolata KC-21, KC-23, KC-82, JC-4 i referentni soj *C. acutatum* u procesu klijanja ne obrazuju sekundarne spore, a prosečna dužina inicijalnih hifa u odnosu na prethodnu grupu je nešto manja.

Morfologija apresorija

Apresorije se formiraju na krajevima inicijalnih hifa kod izolata KC-21, KC-23, KC-82 i JC-4 i bočno na kratkim hifama izolata JC-5, JC-6 i JC-7. Svi izolati poreklom sa ploda višnje, kao i izolati KC-6, KC-9 i KC-12 retko formiraju apresorije. U većini slučajeva do njihovog obrazovanja dolazi direktno na konidijama. Najčešće, spora produkuje jednu ili dve apresorije, ali je kod JC-5, JC-7 i JC-9 konstatovano formiranje ovih struk-

tura u nizu (Slika 10). Mlade apresorije su kod svih izolata hijalinske ili svetlo pigmetirane. Sazrevanjem dolazi do razvoja višeslojnog ćelijskog zida i produkcije melanina, pa apresorije poprimaju tamnomrku ili crnu boju. Izgled i veličina obrazovanih apresorija je prilično varijabilan. Kod većine izolata koji su na osnovu morfologije i veličine konidija okarakterisani kao pripadnici vrste *C. gloeosporioides* (KC-6, KC-9, KC-12, JC-5, JC-6, JC-7, VC-3, VC-5, VC-7 i VC-9) apresorije su sferičnog, ovalnog ili nepravilnog oblika, zadebljelih zidova i izrazito melanizirane. Izolati koji po opisu odgovaraju vrsti *C. acutatum* (KC-21, KC-23, KC-82 i JC-4) formiraju apresorije sferičnog, ovalnog ili okruglastog izgleda, tamnomrke boje i manje naboranih ivica. Biometrijske vrednosti apresorija su neujednačene i kod većine ispitivanih izolata se preklapaju, pa stoga ovaj morfološki kriterijum nije pouzdan u identifikaciji i diferencijaciji vrsta *C. gloeosporioides* i *C. acutatum* (Tabela 2).

Obrazovanje teleomornog stadijuma

Izolati *Colletotrichum* spp. poreklom sa antraknoznih plodova kruške, jabuke, višnje i paradajza, kao i referentni sojevi *C. acutatum* (CBS 294.67) i *C. gloeosporioides* (CBS 516.67) ne formiraju teleomorni stadijum *Glomerella* spp. Obrazovanje peritecija je izostalo na svim veštački inokulisanim plodovima, kao i u kulturama koje su u tu svrhu čuvane do potpunog iscrpljivanja.

DISKUSIJA

Na osnovu fenotipskih odlika može se zaključiti da nijedan od izolata identifikovanih kao *C. gloeosporioides* (KC-6, KC-9, KC-12, JC-5, JC-6, JC-7, VC-3, VC-5, VC-7, VC-9), ne formira kolonije sa crvenom pigmentacijom. Kolonije KC-21, KC-23 i KC-82, sa antraknoznih plodova kruške su karakteristične ružičaste do rumenocrvene boje, na osnovu čega se svrstavaju u grupu hromogenih izolata. Mada se boja kolonije ne može koristiti kao zaseban i pouzdan taksonomski kriterijum za diferencijaciju vrsta *C. acutatum* i *C. gloeosporioides*, naši rezultati, kao i rezultati drugih istraživača (Shi et al., 1996; Freeman et al., 1998; Trkulja, 2004; Gonzales and Sutton, 2004; Peres et al., 2005; Whitewal-Weckert et al., 2007) ukazuju da hromogeni tipovi pripadaju vrsti *C. acutatum*. Baxter et al. (1983) su prema ovoj fenotipskoj karakteristici sve hromogene izolate izdvojili u zasebnu formu *specialis* i imenovali kao *C. acutatum* f. sp. *hromogenum* (Gorter) Baxter, van der Weshuizen et Eicker. Izolat JC-4 sa ploda jabuke, kao i referentni soj CBS 294.67, formiraju kolonije svetlo do tamnosive

pigmentacije i pripadaju nechromogenom tipu vrste *C. acutatum*.

Svi proučavani izolati *C. acutatum* i *C. gloeosporioides* u uslovima *in vivo* i *in vitro* obrazuju plodnosna tela – acervule, kružnog ili nepravilnog oblika, crne do tamnomrke boje. Morfologija i biometričke vrednosti acervula slažu se sa literaturnim podacima (Mordue, 1971; Trkulja, 2004), ali s obzirom na preklapanja biometričkih vrednosti ispitivanih izolata, u konkretnom slučaju ovo nije pouzdan taksonomski kriterijum za diferencijaciju vrsta *C. acutatum* i *C. gloeosporioides*.

Konidije vrsta *C. acutatum* i *C. gloeosporioides* se oslobađaju iz acervula u lepljivoj, želatinoznoj masi ili matriksu, svetlonarandžaste boje. U pitanju je složena mešavina polisaharida i glikoproteina, sa manjim sadržajem drugih komponenata, pre svega enzima. Pri sazrevanju acervula, matriks se transformiše u "ljuspastu" izlučevinu, sa masom slepljenih konidija. Disperzija konidija iz mladih acervula se odvija vodenim kapima, a širenje spora iz zrelih acervula se odvija uz pomoć vetra (Nicholson and Morales, 1980).

Tokom proučavanja morfoloških karakteristika konidiomata u kulturi, nije utvrđeno prisustvo seta ni kod jednog izolata *Colletotrichum* spp., kao ni kod referentnih sojeva *C. acutatum* i *C. gloeosporioides*. Formiranje seta je zabeleženo samo na površini plodova, veštački inokulisanih izolatima JC-7 i JC-9. Formiranje seta u kulturi nisu utvrdili Stojanović (1997, 2002) i Lewis et al. (2004), za razliku od drugih istraživača koji napominju da njihovo obrazovanje pre svega zavisi od izolata, ali i od ekoloških uslova i hranljive podloge (von Arx, 1970; Quimio, 1977; Baxter et al., 1983; Photita et al., 2005).

Svi proučavani izolati *C. acutatum* i *C. gloeosporioides* u bazalnom delu konidiomata obrazuju konidiofore koje su izduženo cilindričnog oblika, hijalinske ili svetlosmeđe i blago povijene. Konidiogene ćelije su glatke, cilindrične i hijalinske. Izgled i veličina konidiofora i konidiogenih ćelija ispitivanih izolata odgovaraju opisima drugih autora (Baxter et al., 1983; Trkulja, 2004), a osim hijalinskih u literaturi postoje podaci i o konidioforama maslinastozelene ili smeđe boje (von Arx, 1970; Mordue, 1971; Vučinić and Latinović, 1999).

Morfološkim proučavanjem konidija konstatovane su razlike u obliku i dimenzijama, na osnovu čega je obavljena diferencijacija ispitivanih izolata *Colletotrichum* spp. Ovaj taksonomski kriterijum se u velikoj meri pokazao kao zadovoljavajući za međusobno diferenciranje vrsta *C. acutatum* i *C. gloeosporioides*. Konidije nechromogenih izolata (KC-6, KC-9, KC-12, JC-5, JC-6, JC-7, VC-3, VC-5, VC-7 i VC-9) su jednoćelijske, hijalinske, glatke, sa sitnim granulira-

nim sadržajem, prave ili blago povijene i cilindrične. Biometrijske vrednosti konidija navedenih izolata odgovaraju opisima vrste *C. gloeosporioides* poreklom sa različitih domaćina: 12-21 x 3,5-6 µm (von Arx, 1970); 9-24 x 3-6 µm (Mordue, 1971); 9-24 x 3-4,5 µm (Sutton, 1980); 9,5-20 x 3-6,5 µm (Baxter et al., 1983); 12,5-18,5 x 3,9-5 µm (Ivanović i Ivanović, 1992); 13-21 x 3,5-5 µm (Gunnell and Gubler, 1992); 12,3-14,8 x 4,6-5,5 µm (Berstein et al., 1995); 12-22 x 3,9-5,5 µm (Trkulja, 2004); 15,7 x 4,1 µm (Whitewal-Weckert et al., 2007). Konidije izolata KC-21, KC-23, KC-82 i JC-4, su jednoćelijske, hijalinske, glatke, prave, sitno granuliranog sadržaja, dominantno fusiformnog oblika. Oblik i veličina konidija navedenih izolata odgovaraju kriterijumima koji važe za vrstu *C. acutatum*: 8-16 x 2,5-4 µm (Dyko and Mordue, 1979); 8,5-16,5 x 2,5-4 µm (Sutton, 1980); 13-17 x 3,5-4,5 µm (Baxter et al., 1983); 13-19 x 3,5-5 µm (Gunnell and Gubler, 1992); 8,1-15,3 x 3,5-5,2 µm (Berstein et al., 1995); 13-17,5 x 3,5-4,5 µm (Trkulja, 2004); 14,7 x 3,8 µm (Lewis et al., 2004); 10,8-13,5 x 2,9-3,6 µm (Whitewal-Weckert et al., 2007).

Rezultati dobijeni izračunavanjem količnika, tj. odnosa dužine/širine konidija takođe ukazuju na postojanje dve grupe izolata. Adaskaveg and Hartin (1997) su proučavajući biometrijske vrednosti konidija prouzrokovala antraknoze ploda badema, citrusa, papaje, jagode i breskve, utvrdili da odnos dužine/širine konidija izolata *C. acutatum* iznosi 2,6-3,8, a konidija *C. gloeosporioides* 3,2-3,5.

Produkti klijanja konidija ispitivanih izolata *C. acutatum* i *C. gloeosporioides* su inicijalne hife, apresorije i sekundarne konidije. Klijanja je najčešće temeno, a znatno ređe temeno-bočno ili bočno. Potpuno bočno klijanje je uočeno samo u slučajevima kada dolazi do formiranja više od dve inicijalne hife, što su u svojim radovima konstatovali Stojanović (1997), Latinović (1999) i Trkulja (2004). O'Connell et al. (1992), takođe napominju da vrste roda *Colletotrichum* obrazuju jednu ili više inicijalnih hifa i apresorija prilikom naklijavanja konidija u destilovanoj vodi na različitim veštačkim površinama: staklu, nitroceluloznoj membrani, polistirenu i dr. Na ovaj način formirane hife i apresorije su identične onima koje se obrazuju *in vivo*, tokom infekcionog procesa na biljci domaćinu.

Kod ispitivanih izolata *C. gloeosporioides* utvrđeno je obilno formiranje sekundarnih konidija direktno na vrhovima majčinskih konidija ili na krajevima inicijalnih hifa. U skladu sa rezultatima Stojanović (1997) i Latinović (1999), konstatovano je da sekundarne konidije retko klijaju dok su na materinskoj konidiji, a nakon odvajanja klijaju obrazujući inicijalnu hifu.

Klijanjem konidija izolata *Colletotrichum* spp. dolazi do formiranja apresorija, direktno na sporama ili na krajevima kraćih i dužih inicijalnih hifa. Prema Sutton-u (1968) apresorije se mogu obrazovati i na vrhovima vegetativnih hifa, odnosno direktno na miceliji, ali ova pojava u našem eksperimentu nije utvrđena. Formirane apresorije ispitivanih izolata *C. acutatum* su tamnomrke do crne boje, sferične ili ovalne, a izolata identifikovanih kao *C. gloeosporioides* nepravilnog ili sferičnog oblika. Dobijeni rezultati se poklapaju sa biometrijskim vrednostima apresorija koje se u literaturi navode za vrste *C. acutatum*: 7,5–15 x 5–8 µm (Baxter et al., 1983); 6,5–10,5 x 4,5–6 µm (Trkulja, 2004) i *C. gloeosporioides*: 6–20 x 4–12 µm (Mordue, 1971; Sutton, 1980); 6–20 x 4,5–9 µm (Baxter et al., 1983); 7,5–17,5 x 5,5–8,5 µm (Trkulja, 2004).

Formiranje apresorija pri klijanju konidija je primarna karakteristika gljiva roda *Colletotrichum* (von Arx, 1970). Ovi organi u prvom stadijumu infekcije imaju prevashodnu ulogu u vezivanju parazita za površinu domaćina, a prema navodima Purkayastha and Sen Gupta (1973) njihovo obrazovanje je uslovljeno različitim faktorima, kao što su kontakti stimulan, priroda supstrata, prisustvo difuznih biljnih metabolita i spoljni faktori. U toku sazrevanja apresorija, prema Bailey-u et al. (1992) dolazi do razvoja debelog višeslojnog ćelijskog zida, potom sekrecije tankog sloja ekstracelularne, mucilaginozne mase i formiranja pore u ventralnom zidu koji je u kontaktu sa supstratom. Značaj mucilaginozne mase je u zaštiti apresorija od ekstremnih temperatura, a dokazano je i da pomaže u adheziji, tj. procesu prijanjanja gljive za površinu biljke domaćina.

Tokom naših istraživanja izolati *C. acutatum* i *C. gloeosporioides*, kao i referentni sojevi ovih vrsta, nisu formirali teleomorfni stadijum *Glomerella* spp. Prisustvo peritecija nije uočeno na veštački inokulisanim plodovima, kao ni na površini kultura koje su u tu svrhu čuvane do potpunog iscrpljivanja. Izostanak obrazovanja savršenog stadijuma *Glomerella* u svojim eksperimentima navode Freeman et al. (1998), Vučinić and Latinović (1999) i Trkulja (2004). Na hranljivim podlogama Baxter et al. (1983) i Sto-

janović (1997) su konstatovani samo sterilne začetak askomata, što je česta odlika vrste *C. gloeosporioides*. Prema Mordue-u (1971) formiranje peritecija je mnogo izraženije na starijim kulturama gljiva i one su u većini slučajeva znatno grupnije od peritecija formiranih na prirodnom supstratu. Shi et al. (1996) u inventarizaciji vrsta *Colletotrichum*, prouzrokovala antraknoze ploda jabuke, naglašavaju da izolati *C. acutatum* ne obrazuju peritecije, a da je kod manje od polovine svih kultura *C. gloeosporioides* utvrđeno obrazovanje *G. cingulata*. Guerber and Correll (2001) su u laboratorijskim uslovima prvi utvrdili formiranje *G. acutatum*, savršene forme konidijskog stadijuma *C. acutatum*. Mali značaj teleomorfa u epidemiologiji vrsta roda *Colletotrichum* utvrdili su Fitzell and Peak (1984). Na osnovu poljskih ogleda, ovi autori su zaključili da se uloga askospora u infektivnom procesu gljive ne može pouzdano dokazati, jer iako su peritecije bile formirane, prisustvo askospora u vazduhu nije utvrđeno. S druge strane, vrste *C. acutatum* i *C. gloeosporioides* su pre svega patogeni subtropskih i tropskih predela, pa je u takvim klimatskim uslovima smanjena realna potreba formiranja teleomorfa, kao stadijuma za prezimljavanje.

Tradicionalne metode identifikacije gljiva roda *Colletotrichum*, zasnovane su na morfološkim karakteristikama: boji kolonije, obliku i veličini konidija, acervula i apresorija, prisustvu/odsustvu seta i eventualnom formiranju teleomornog stadijuma *Glomerella* spp. (Freeman et al., 1998). S obzirom na veliki broj intermedijarnih formi, navedeni kriterijumi nisu uvek adekvatni za diferencijaciju vrsta *C. acutatum* i *C. gloeosporioides*. Morfološka karakterizacija izolata *Colletotrichum* spp. poreklom sa antraknoznih plodova voća, kao i njihova morfološka identifikacija do nivoa vrste, pokazala se u izvesnoj meri pouzdanom, što je potvrđeno i molekularnom analizom (Živković, 2011).

ZAHVALNICA

Ova istraživanja su finansirana sredstvima Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, Projekat TR 31018.

LITERATURA

- Adaskaveg, J.E. and Hartin, R.J. (1997): Characterization of *Colletotrichum acutatum* isolates causing anthracnose of almond and peach in California. *Phytopathology*, 87: 979–987.
- Arx, J.A. von (1957): Die Arten der Gattung *Colletotrichum*. *Cda Phytopath. Z.*, 29: 413–4468.
- Arx, J.A. von (1970): A revision of the fungi classified as *Gloeosporium*. J. Cramer, Lehre.

- Bailey, J.A., O'Connell, R.J., Pring, R.J., Nash, C. (1992): Infection Strategies of *Colletotrichum* species. In *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control* (eds J.A. Bailey and M.J. Jeger), CAB Internacional, Wallingford, UK., pp. 88-120.
- Baxter A.P., van der Westhuizen, G.C.A., Eicker, A. (1983): Morphology and taxonomy of South African isolates of *Colletotrichum*. South African. J. Bot., 2: 259-289.
- Bernstein, B., Zehr, E.I., Dean, R.A., Shabi, E. (1995): Characteristics of *Colletotrichum* from peach, apple, pecan, and other hosts. Plant Disease, 79: 478-482.
- Cannon, P.F., Buddie, A.G., Bridge, P.D. (2008): The typification of *Colletotrichum gloeosporioides*. Mycotaxon, 104: 189-204.
- Dyko, B.J. and Mordue, J.E.M. (1979): *Colletotrichum acutatum*. CMI Description of Pathogenic Fungi and Bacteria. No. 630. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, England.
- Gonzales, E. and Sutton, T.B. (2004): Population diversity within isolates of *Colletotrichum* spp. causing *Glomerella* leaf spot and bitter rot of apples in three orchards in North Carolina. Plant Disease, 88: 1335-1340.
- Gunnell, P.S. and Gubler, W.D. (1992): Taxonomy and morphology of *Colletotrichum* species pathogenic to strawberry. Mycologia, 84: 157-165.
- Guerber, J.C. and Correll, J.C. (2001): Characterization of *Glomerella acutata*, the teleomorph of *Colletotrichum acutatum*. Mycologia, 93: 216-229.
- Guerber, J.C., Liu, B., Correll, J.C., Johnston, R.P. (2003): Characterization of diversity in *Colletotrichum acutatum sensu lato* by sequence analysis of two gene introns, mtDNA and intron RFLPs, and mating compatibility. Mycologia, 95: 872-895.
- Freeman, S., Katan, T., Shabi, E. (1998): Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose disease of various fruits. Plant Disease, 82: 596-605.
- Fitzell, R.D. and Peak, C.M. (1984): The epidemiology of anthracnose disease of mango: inoculum source, spore production and dispersal. Ann. App. Biol., 104: 53-59.
- Ivanović, M. i Ivanović, D. (2001): Mikoze i pseudomikoze bilja. TND Produkt doo, Zemun.
- Johnston, P.R. and Jones D. (1997): Relationship among *Colletotrichum* isolates from fruit rots assessed using rDNA sequences. Mycologia, 89: 420-430.
- Latinović, J. (1999): Morfološke karakteristike klijanja konidija *C.gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc., uzročnika antraknoze masline. Micologia Montenegrina, 1: 121-125.
- Lewis, I.M.L., Nava-Diaz, C., Miller, S.A. (2004): Identification and management of *Colletotrichum acutatum* on immature bell peppers. Plant Disease, 88: 1198-1204.
- Mordue, J.E.M. (1971): *Glomerella cingulata*. CMI Descriptions of Pathogenic fungi and Bacteria, No. 315. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, England.
- Nicholson, R.L. and Morales, W.B.C (1980): Survival of *Colletotrichum graminicola*: importance of spore matrix. Phytopathology, 70: 255-261.
- O'Connell, R.J., Nash, C., Bailey, J.A. (1992): Lectin citochemistry: A new approach to understanding cell differentiation, pathogenesis and taxonomy in *Colletotrichum*. In *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control* (eds J.A. Bailey and M.J. Jeger), CAB Internacional, Wallingford, UK., pp. 67-87.

- Peres, N.A., Timmer, L.W., Adaskaveg, J.E., Correll, J.C. (2005): Lifestyles of *Colletotrichum acutatum*. Plant Disease, 89: 784-796.
- Photita, W., Taylor, P.W.J., Ford, R., Hyde, K.D., Lumyong, S. (2005): Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum* species from herbaceous plants in Thailand. Fungal diversity, 18: 117-133.
- Purkayastha, R.P. and Sen Gupta, M. (1973): Studies on conidial germination and appressoria formation in *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. causing anthracnose of jute (*Corchorus olitorius* L.). Zeitschrift fur Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz, 80: 718-724.
- Shi, Y., Correll, J.C., Guerber, J.C., Rom, C.R. (1996): Frequency of *Colletotrichum* species causing bitter rot of apple in the southeastern United States. Plant Disease, 80: 692-696.
- Simmonds, J.H. (1965): A study of the species of *Colletotrichum* causing ripe fruit rot in Queensland. Qld. J. Agric. Anim. Sci., 22: 437-459.
- Smith, B.J. and Black, L.L. (1990): Morphological, cultural and pathogenic variation among *Colletotrichum* species isolated from strawberry. Plant Disease, 74: 69-76.
- Stojanović, S. (1997): Epidemiološka i ekološka proučavanja *Colletotrichum gloeosporioides*, superparazita stroma *Polystigma rubrum*. Doktorska disertacija. Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.
- Stojanović, S., Gavrilović, V., Starović, M., Pavlović, S., Živković, S. (2002): Novi domaćini gljiva iz roda *Colletotrichum* u Srbiji. Zaštita bilja, 243: 171-179.
- Sutton, B.C. (1968): The appressoria of *Colletotrichum graminicola* and *C. falcatum*. Canadian Journal of Botany, 46: 873-876.
- Sutton, B.C. (1980): The *Coelomycetes* – Fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata. CMI, Kew, Surrey, England.
- Sutton, B.C. (1992): The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control* (eds. J.A. Bailey and M.J. Jeger), CAB International, Wallingford, UK, pp. 1-26.
- Trkulja, V. (2004): Patogene, morfološke i odgajivačke odlike *Colletotrichum* spp. prouzrokovaca gorke truleži ploda jabuke. Doktorska disertacija, Poljoprivredni fakultet, Beograd.
- Quimio, T.H. (1977): Species of *Colletotrichum* in Philippines. Nova Hedwigia, 28: 543-553.
- Vučinić, Z. and Latinović, J. (1999): *Colletotrichum gloeosporioides*, a new olive (*Olea europea* L.) parasite in Yugoslavia. Acta Horticulturae, 474: 577-579.
- Whitelaw-Weckert, M.A., Curtin, S.J., Huang, R., Steel, C.C., Blanchard C.L., Roffey, P.E. (2007): Phylogenetic relationships and pathogenicity of *Colletotrichum acutatum* isolates from grape in subtropical Australia. Plant Pathology, 56: 448-463.
- Živković, S. (2011): Uporedna proučavanja izolata *Colletotrichum* spp. prouzrokovaca antraknoze. Doktorska disertacija, Poljoprivredni fakultet Novi Sad.

(Primljeno: 12.11.2014.)
(Prihvaćeno: 09.12.2014.)

MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF ISOLATES OF *COLLETOTRICHUM* SPP. – CAUSAL AGENTS OF ANTHRACNOSE

SVETLANA ŽIVKOVIĆ¹, SAŠA STOJANOVIĆ¹, JELICA BALAZŽ²

¹Institute for Plant Protection and Environment, Belgrade

²University of Novi Sad, Faculty of Agriculture, Novi Sad
e-mail: zivkovicsvetla@gmail.com

SUMMARY

In the morphological studies were included isolates of *Colletotrichum* spp. originating from pear, apple and sour cherry fruits, as well as reference strains of *C. acutatum* (CBS 294.67) and *C. gloeosporioides* (CBS 516.97). The colony characteristics, appearance, shape and size of conidioma, appressoria, and conidia of isolates of *Colletotrichum* spp. were studied. The four morphological groups of colonies on PDA were observed, confirming the great phenotypic variability of isolates of *Colletotrichum* spp. Most isolates from apple and pear fruits (KC-6, KC-9, KC-12, JC-5, JC-7, JC-9), formed the first morphological group. The isolates from sour cherry (VC-3, VC-5, VC-7, VC-9) are separated in the fourth morphological group. The size and shape of conidia from these isolates fit the description of *C. gloeosporioides*. The chromogenic isolates from pear (KC-21, KC-23, KC-82) formed the second morphological group, and in the third morphological group is isolate (JC-4) from apple fruit. The morphology of conidia from these isolates fit the description of *C. acutatum*. During this research were evident that all isolates formed conidioma – acervuli. The tested cultures of *Colletotrichum* spp. did not form teleomorph. Because of outstanding variability, most of the studied characteristics cannot be independently applied as taxonomic criteria. Obtained results showed that, for *Colletotrichum* species classification, at least two taxonomic criteria should be used: morphological features combined with molecular identification.

Key words: morphology, anthracnose, *Colletotrichum acutatum*, *Colletotrichum gloeosporioides*

(Received: 12.11.2014.)

(Accepted: 09.12.2014.)

UPUTSTVO AUTORIMA

Časopis "Zaštita bilja" objavljuje naučne radove, pregledne radove i prethodna saopštenja iz oblasti zaštite bilja. Radovi se štampaju na srpskom ili engleskom jeziku. Uz radove na engleskom jeziku štampa se i rezime na srpskom jeziku. Rukopis (1)otkucan sa duplim proredom sadrži: zaglavlje, naslov, imena autora i adrese, rezime, ključne reči, tekst rada (sa poglavljima: uvod, materijal i metode, rezultati, diskusija, zahvalnica, literatura i rezime sa ključnim rečima), tabele i grafikone, fotografije i crteže.

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

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

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

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

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

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

FOTOGRAFIJE I CRTEŽI – Fotografije i crteži treba da su kontrastni i oštri. Na poledini

fotografija i crteža grafitnom olovkom označiti njihov broj, ime autora i skraćeni naslov rada. Pri tome, na posebnim stranicama priložiti pune naslove na srpskom i engleskom jeziku, uz podatke o imenu autora i naslovu rada.

Ostale napomene

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

REDAKCIJA ČASOPISA "ZAŠTITA BILJA"

INSTRUCTION TO AUTHORS

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

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

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

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

ABSTRACT – should contain most 200 words of the text. **KEY WORDS** – there must be up to 6 key words.

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

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

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

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

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

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

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

Additional notes

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

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

EDITORIAL Board for "Plant Protection"

CIP – Katalogizacija u publikaciji
Narodna biblioteka Srbije, Beograd

632.9

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

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

