

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 Dražzera 9, 11040 Beograd – Belgrade
Srbija – Serbia

Post office box 33-79

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

Fax: +381 11 2669-860



Simptomi C. apii na celeru u polju. (A. Milosavljević)
Symptoms of C. apii on celery in the field. (A. Milosavljević)

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

- Zorica Lepšanović, Mira Starović, Snežana Pavlović, Dragana Jošić*
ANTIFUNGALNA AKTIVNOST *PSEUDOMONAS CHLORORAPHIS* Q16
PREMA *SCLEROTINIA SCLEROTIORUM* POREKLOM
SA RAZLIČITIH LEKOVITIH BILJAKA.....56-63
- Tanja Vasić, Snežana Anđelković, Sanja Živković, Dragan Terzić,*
Jordan Marković, Jasmina Milenković, Jasmina Radović
ISPITIVANJE OSETLJIVOSTI RAZLIČITIH
GENOTIPOVA LUCERKE PREMA *COLLETOTRICHUM TRIFOLIUM*.....64-69
- Dobrivoj Poštić, Nebojša Momirović, Rade Stanisavljević,*
Ratibor Štrbanović, Veljko Gavrilović, Goran Aleksić, Lana Đukanović
ISPITIVANJE KVALITETA SEMENA ENGLESKOG LJULJA,
ITALIJANSKOG LJULJA I CRVENOG VIJUKA.....70-76
- Anja Milosavljević, Erika Pfaf Dolovac, Milana Mitrović,*
Jelena Jović, Ivo Toševski, Nataša Duduk, Nenad Trkulja
MORFOLOŠKA I MOLEKULARNA IDENTIFIKACIJA
CERCOSPORA APII NA CELERU U SRBIJI.....77-84
- Ratibor Štrbanović, Dobrivoj Poštić, Rade Stanisavljević,*
Lana Đukanović, Žarko Ivanović, Tanja Vasić, Nenad Dolovac
ZASTUPLJENOST KOROVA U NATURALNOM SEMENU LUCERKE.....85-90

CONTENTS

Scientific papers

- Zorica Lepšanović, Mira Starović, Snežana Pavlović, Dragana Jošić*
ANTIFUNGAL ACTIVITY OF PSEUDOMONAS CHLORORAPHIS Q16
AGAINST SCLEROTINIA SCLEROTIORUM ISOLATED
FROM DIFFERENT MEDICINAL PLANTS.....56-63
- Tanja Vasić, Snežana Anđelković, Sanja Živković, Dragan Terzić,
Jordan Marković, Jasmina Milenković, Jasmina Radović*
ASSESSMENT OF SENSITIVITY OF DIFFERENT ALFALFA GENOTYPES
TO COLLETOTRICHUM TRIFOLIUM.....64-69
- Dobrivoj Poštić, Nebojša Momirović, Rade Stanisavljević,
Ratibor Štrbanović, Veljko Gavrilović, Goran Aleksić, Lana Đukanović*
EXAMINATION QUALITY SEED PERENNIAL RYEGRASS,
ITALIAN RYEGRASS AND RED FESCUE.....70-76
- Anja Milosavljević, Erika Pfaf Dolovac, Milana Mitrović,
Jelena Jović, Ivo Toševski, Nataša Duduk, Nenad Trkulja*
MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR IDENTIFICATION
OF CERCOSPORA APII ON CELERY IN SERBIA.....77-84
- Ratibor Štrbanović, Dobrivoj Poštić, Rade Stanisavljević,
Lana Đukanović, Žarko Ivanović, Tanja Vasić, Nenad Dolovac*
THE DISTRIBUTION OF WEEDS IN NATURAL ALFALFA SEEDS.....85-90

ANTIFUNGALNA AKTIVNOST *PSEUDOMONAS CHLORORAPHIS* Q16 PREMA *SCLEROTINIA SCLEROTIORUM* POREKLOM SA RAZLIČITIH LEKOVITIH BILJAKA

ZORICA LEPŠANOVIĆ¹, MIRA STAROVIĆ², SNEŽANA PAVLOVIĆ, DRAGANA JOŠIĆ³

¹Institut za epidemiologiju, Vojnomedicinska akademija, Beograd

²Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Beograd

³Institut za zemljište, Beograd

e-mail: josicdragana@yahoo.com

REZIME

Fitopatogena gljiva *Sclerotinia sclerotiorum* je veoma destruktivni patogen stabla brojnih vrsta lekovitih biljaka. Kako u proizvodnji lekovitih biljaka nije dozvoljena upotreba pesticida, prisustvo ovog patogena prouzrokuje ozbiljne štete. Primena PGP (Plant Growth Promoting) bakterija, kao antagonista *S. sclerotiorum*, omogućuje zaštitu lekovitih biljaka. U ovim istraživanjima je ispitana aktivnost soja *Pseudomonas chlororaphis* Q16, pripadnika vrste koja spada među najefikasnije antagoniste *S. sclerotiorum*. Antifungalna aktivnost različitih frakcija kulture *P. chlororaphis* Q16 ispitivana je na 6 reprezentativnih izolata *S. sclerotiorum* poreklom sa različitih lekovitih biljaka: koprive, kima, belog sleza, odoljena i 2 vrste *Echinacea*. Najefikasnija je bila primena termostabilnih antifungalnih metabolita, frakcije koja je inhibirala porast micelije od 52,75% (izolata sa belog sleza) do 83,36% (izolata sa *E. purpurea*). Najujednačenija inhibicija porasta micelije ispoljena je primenom kultura starih 24^h: od 60,28% (izolata sa kima) do 76,47% (izolata sa koprive).

Ključne reči: *Pseudomonas chlororaphis*, *Sclerotinia sclerotiorum*, antifungalna aktivnost, lekovite biljke

UVOD

Gajenje lekovitih biljaka, kao i svih drugih biljaka, neminovno prati prisustvo različitih patogena. Imajući u vidu značaj lekovitih biljaka u lečenju ljudi, naročito je važno proizvesti ih bez prisustva patogena, posebno gljiva, jer one u velikoj meri redukuju prinos i remete sintezu sekundarnih metabolita (Singh i Dubez, 2012). Bolesti lekovitih biljaka su nedovoljno proučavane i pored značajnih šteta koje uzrokuju. Promene načina gajenja i berbe uvođenjem plantažne proizvodnje lekovitih biljaka dodatno su uticale na intenzivniju pojavu postojećih patogena, posebno onih sa širokim spektrom domaćina, kao što je *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, koja parazitira preko 400 biljnih vrsta (Gamlieel i sar., 1996; Pavlović i Stojanović, 2001; Szceponiek i Maruz, 2006). *S. sclerotiorum*, prouzrokovatelj bele truleži je najdestruktivniji patogen stabla

brojnih vrsta lekovitih biljaka. Velike štete nanosi naročito na *echinacea*, koprivi, odoljenu, kimu, a na belom slezu je 2000. godine u Banatu zabeležen napad koji je prepolovio prinos belog sleza (Stojanović i sar., 2006). Imajući u vidu ozbiljne štete koje uslovljava prisustvo ovog patogena, kao i činjenicu da u proizvodnji lekovitih biljaka nije dozvoljena upotreba pesticida, velike nade ulažu se u primenu antagonista u njihovoj zaštiti.

Rod *Pseudomonas* sadrži brojne vrste bakterija koje zauzimaju različite ekološke niše i ispoljavaju raznovrsne metaboličke osobine (Clarke, 1982). Među vrstama izolovanim iz zemljišta, mnoge funkcionišu kao rizobakterije koje stimulišu rast biljaka (PGPR – plant growth-promoting rhizobacteria). Ove vrste kolonizuju rizosfere biljaka i stimulišu rast svojih domaćina. Mehanizmi kojima to čine su različiti. Neke rizobakterije produkuju antibiotike

koji sprečavaju infekcije izazvane biljnim patogenima ili su antagonisti fitopatogenih organizama, dok druge direktno pomažu rast biljaka u odsustvu patogena, tako što fiksiraju azot, ili rastvaraju neke nutrijente kao što su mineralni fosfati.

Pseudomonas chlororaphis je nepatogena bakterija, koja ima važnu ulogu u supresiji patogena i stimulaciji rasta biljaka. Svoju biokontrolnu ulogu vrši tako što kolonizuje koren biljke i proizvodi razna inhibitorna jedinjenja koja deluju kao antifungalni metaboliti. Litički enzimi (proteaze, hitinaze, lipaze), N-acil-homoserin laktoni kao quorum-sensing molekuli, cijanovodonik, siderofore i antibiotici su najefikasniji metaboliti koji suprimiraju rast fitopatogena. Antibiotici fenazin-1-karboksilna kiselina (PCA) i 2-hidroksi-fenazin (2-OH-PHZ), 2,4 -DAPG, pirolinitrin i pioluteorin ispoljavaju širok spektar aktivnosti prema raznim fitopatogenima koji napadaju biljke važne za ljudsku ishranu, kao što su žitarice, voće, povrće i lekovito bilje (Chin-A-Woeng, 2001; Haas i De'fago, 2005; Liu et al., 2007). Primena *P. chlororaphis* u borbi protiv fitopatogena smanjuje upotrebu hemijskih pesticida i doprinosi zaštiti okoline i ljudskog zdravlja.

Ohrabrujući rezultati su postignuti u biološkoj kontroli *S. sclerotiorum* na korenu pasulja, tretiranjem antagonistima iz roda *Erwinia* i *Bacillus* (Godoy et al., 1990; Huang et al., 1993; Yuen et al., 1994; Tu, 1997). Vrsta *P. chlororaphis* ispoljila je značajno inhibitorno dejstvo prema porastu micelije *S. sclerotiorum* i klijanju sklerocija i askospora u *in vitro* uslovima (Savchuk, 2002). U *in vivo* uslovima Fernando i saradnici (2007) su pokazali da *P. chlororaphis* sojevi inhibiraju klijanje askospora *S. sclerotiorum* na laticama uljane repice.

U ovom radu ispitano je delovanje različitih frakcija kulture autohtonog izolata *P. chlororaphis* Q16 na porast micelije *S. sclerotiorum* izolovane sa šest lekovitih biljaka: *Ehinacea angustifolia*, *E. purpurea*, kima, odoljena, koprive i belog sleza.

MATERIJAL I METODE

Izolacija *Sclerotinia sclerotiorum*

Uzorci obolelih biljaka koprive (*Urtica dioica*), kima (*Carum carvi*), belog sleza (*Althea officinalis*), odoljena (*Valeriana officinalis* L.) i dve vrste ehinacea (*Ehinacea angustifolia* i *E. purpurea*) kolekcionisani su iz plantažnog zasada Instituta za proučavanje lekovitog bilja "Dr Josif Pančić" u lokalitetu Pančevo, u periodu 2011-2013. god. Odabrano je 6 reprezentativnih izolata *S. sclerotiorum*, koji su

korišćeni u daljem radu (Tabela 1).

Izolati *S. sclerotiorum* korišćeni u ovim ispitivanjima izolovani su iz sklerocija obolelih biljaka, koje su prethodno površinski dezinfikovane potapanjem u 50% v/v natrijum hipohloritu i 70% alkoholu u trajanju od 4 minuta, a zatim jedan minut u sterilnoj vodi. Sklerocije su zatim nanošene na podlogu od krompir dekstroznog agara (PDA) i inkubirane 4 nedelje na 20°C. Sklerocije formirane u kulturi su izdvojene i čuvane na temperature od 10°C kao zalihe za dalja istraživanja.

Antagonizam *P. chlororaphis* Q16 prema *S. sclerotiorum*

Antagonistička aktivnost *P. chlororaphis* Q16 na porast micelije *S. sclerotiorum* ispitivana je na Waksmannovim pločama (WA). Ispitivan je efekat kulture *P. chlororaphis* Q16 posle kultivacije 24^h u koncentraciji 1x10⁷ cfu/ml („puna“ kultura-pk) (i), kao i pojedinačnih frakcija: ćelija bez ekstracelularnog sadržaja (tzv. „opranih“ ćelija-oc) (ii) i termostabilnih antifungalnih metabolita u supernatantu (tam) (iii). Bakterijske ćelije su izdvojene iz kulture standardizovane koncentracije centrifugiranjem na 13000 rpm u trajanju od 10 min, „oprane“ sukcesivnim resuspendovanjem u sterilnom fiziološkom rastvoru i centrifugiranjem (3 puta), i resuspendovane u početnoj zapremini sterilnog fiziološkog rastvora. Ekstracelularni termostabilni antifungalni metaboliti sadržani u supernatantu dobijeni su posle filtracije i inkubacije 30 min na 70°C.

Kultura *P. chlororaphis* Q16 i njene pojedinačne frakcije su zasejani po obodu, a micelija *S. sclerotiorum* u centar Petri kutuje. Ogled je postavljen u 8 ponavljanja. Kontrolne varijante su sadržale samo miceliju na WA.

Zona inhibicije porasta micelije merena je posle 5 i 10 dana od zajesavanja i inkubacije na 25°C (Nair and Anith, 2009). Procenat inhibicije micelije *S. sclerotiorum* izračunat je po formuli: Inhibicija = Š(Kontrola -Tretman)/Kontrola x 100 (Ogbebor and Adekunle, 2005).

Statistička analiza je izvršena putem analize varijanse (ANOVA) primenom softvera Statistica 12 (StatSoft, Tulsa). Poređenja između parova proseka su urađena pomoću Duncan-ovog ili Fisher-ovog testa na nivou značajnosti od 5% (Sokal and Rohlf, 1995). Različitim malim slovima su obeleženi tretmani koji se razlikuju po značajnosti.

REZULTATI

Prvi znaci bolesti u vidu bele truleži nadzemnih organa pojavili su se polovinom jula 2011.

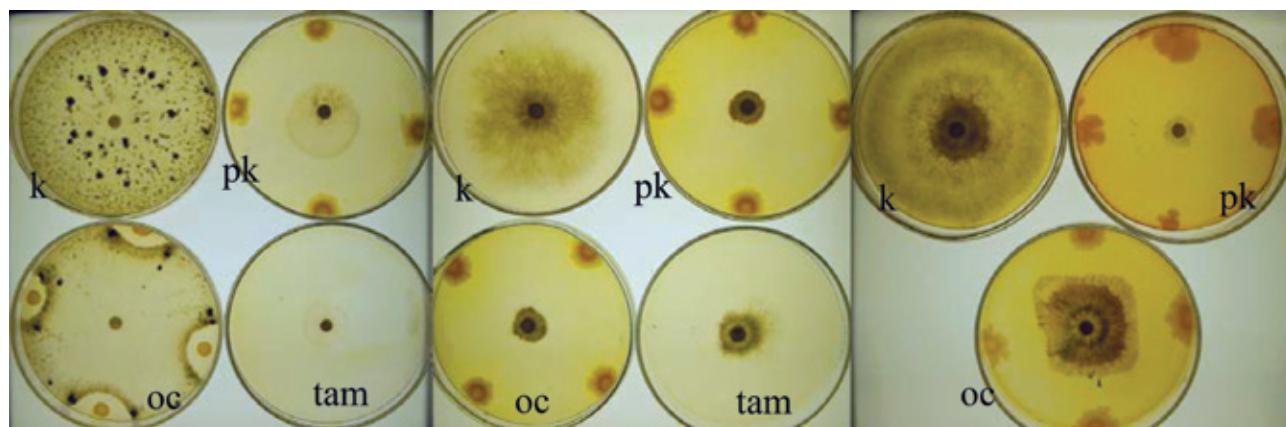
Tabela 1. Spisak reprezentativnih izolata *S. sclerotiorum*.
Table 1. List of representative isolates of *S. sclerotiorum*.

Izolat Isolate	Poreklo izolacije/ Origin of isolation		Godina Year
	Biljka domaćin Plant host	Biljni organ Plant organs	
<i>S. sc-Ko</i>	Kopriva (<i>Urtica dioica</i>)	Stablo	2011
<i>S. sc-Ki</i>	Kim (<i>Carum carvi</i>)	Stablo	2011
<i>S. sc-Bs</i>	Beli slez (<i>Althea officinalis</i>)	Cela biljka	2012
<i>S. sc-Od</i>	Odoljen (<i>Valeriana officinalis</i>)	Korenov vrat	2012
<i>S. sc-Ea</i>	Ehinacea (<i>Ehinacea angustifolia</i>)	Stablo i list	2013
<i>S. sc-Ep</i>	Ehinacea (<i>Ehinacea purpurea</i>)	Cela biljka	2013



Slika 1. *S. sclerotiorum*: bela trulež na *E. purpurea* (a), nekroza i izumiranje stabla i bočnih grana sa pojavom crnih sklerocija (b), i trulež korena i prizemnog dela stabla na belom slezu (c).

Figure 1. *S. sclerotiorum*: white stem rot on *E. purpurea* (a), necrosis of steem and root and formed sclerotinia (b), and necrosis of root and root crown on marshmallow (c).



Slika 2. Uticaj *P. chlororaphis* Q16 na porast *S. sclerotiorum* izolovane sa kima (*Carum carvi*) (a), belog sleza (*Althea officinalis*) (b) i odoljena (*Valeriana officinalis*) (c). k- kontrola; pk- „puna“ kultura (kultivacija 24^h); oc- „oprane“ ćelije; tam- termostabilni antifungalni metaboliti supernatanta.

Figure 2. Effects of *P. chlororaphis* Q16 on growth of *S. sclerotiorum* isolated from *Carum carvi* (a), *Althea officinalis* (b) and *Valeriana officinalis* (c). k- control; pk- „whole“ culture (cultivation 24^h); oc- „washed“ cells; tam- heat stable antifungal factors.

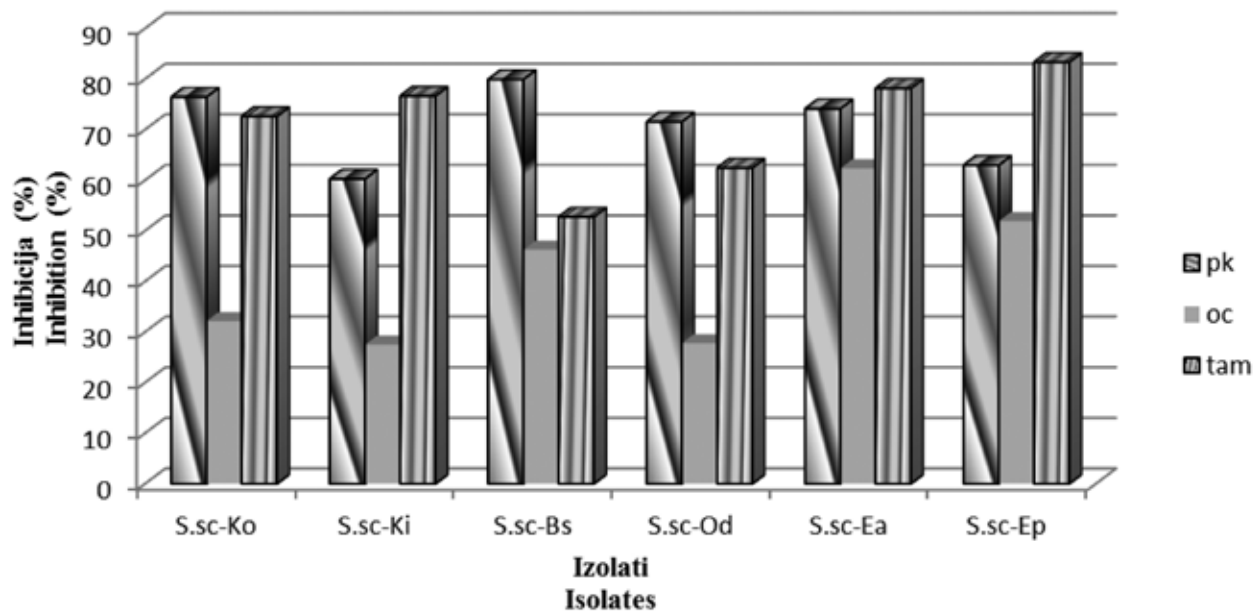
Tabela 2. Inhibicija porasta micelije *S. sclerotiorum* (%) poreklom sa različitih biljaka-domaćina delovanjem različitih frakcija kulture bakterije *Pseudomonas chlororaphis* Q16.

Table 2. Activity of various fractions of bacterial culture *Pseudomonas chlororaphis* Q16 on mycelial growth inhibition of *S. sclerotiorum* originating from different plant hosts.

Izolat <i>S.sclerotiorum</i> Isolate <i>S.sclerotiorum</i>	Frakcija kulture <i>P. chlororaphis</i> Q16 Fraction of <i>P. chlororaphis</i> Q16 culture		
	„Puna“ kultura (kultura stara 24 ^h) Whole culture (24 ^h grown culture)	„Oprane“ ćelije „washed“ cells	Termostabilni antifungalni metaboli Heat Stable Antifungal Factors
<i>S. sc-Ea</i>	74.14b	62.36a	78.16 b*
<i>S. sc-Ep</i>	62.99b	51.92a	83.36c
<i>S. sc-Ko</i>	76.47c	32.16a	72.65c
<i>S. sc-Ki</i>	60.28b	27.5a	76.67c
<i>S. sc-Bs</i>	79.94c	46.28a	52.75b
<i>S. sc-Va</i>	71.58c	27.8a	62.45b

*Vrednosti obeležene istim slovima po redovima ne razlikuju se statistički značajno ($P>0.05$).

* Means followed by a common letter within a rows are not significantly different ($P>0.05$).



Slika 3. Upporedna antifungalna aktivnost kulture (24^h) i njenih pojedinačnih frakcija bakterije *Pseudomonas chlororaphis* Q16 prema miceliji *Sclerotinia sclerotiorum* poreklom sa koprive, kima, belog sleza, odoljana i dve vrste ehinacea.

Figure 3. Comparative antifungal activity of 24^h old bacterial culture and its separate fractions of *Pseudomonas chlororaphis* strain Q16 to *Sclerotinia sclerotiorum* mycelia originating from nettle, cumin, marsh-mallow, caraway, valerian, and two types of Echinacea.

na koprivi i kimu, 2012. na belom slezu i odoljenu i 2013. na ehinacea vrstama u lokalitetu Pančevo. Stabljike zaraženih biljaka reaguju pojavom ovalnih, vlažnih pega koje su pokrivena bujnom belom

pamučnom micelijom. Nakon dve nedelje od pojave prvih simptoma, u okviru pega dolazi do formiranja lako uočljivih crnih sklerocija. Micelija gljive prstenasto obavija stabljiku, što dovodi do sušenja

bočnih grana. Vrlo brzo cela biljka se suši. Gljiva napada stabljiku, lišće i seme, a sklerocije su nađene i u korenovom vratu i srži stabla obolelih biljaka. U polju je lako prepoznati obolele biljke, jer su suve i pri dodiru biljka pada, tkivo u okviru pega postaje trulo, što prouzrokuje uništavanje sprovodnih sudova i prekid sprovođenja hranljivih materija (Slika 1).

Inhibitorno delovanje *P. chlororaphis* Q16 detektovano je kod svih reprezentativnih izolata *S. sclerotiorum*, nezavisno od njihovog porekla (Slika 2.). Stepem supresije rasta detektovan posle 5 dana inkubacije zadržao se do kraja inkubacionog perioda.

Primenom ekstracelularne frakcije koja sadrži termostabilne antifungalne metabolite ostvaren je najviši stepen inhibicije porasta micelije izolata *S.sc-Ep* od 83,36%. Najslabiju efikasnost ispoljila je frakcija opranih ćelija, koja je ostvarila procenat inhibicije porasta micelije *S. sclerotiorum* od 27,5 (izolata sa kima) – 62,26% (izolata sa *E.angustifolia*). Najviša efikasnost ispoljena je primenom frakcije supernatanta sa termostabilnim antifungalnim metabolitima, koja je inhibirala porast micelije od 52,75 (izolata sa belog sleza) – 83,36% (izolata sa *E. purpurea*). Najjednačena inhibicija porasta micelije ispoljena je primenom kultura starih 24^h, sa vrednostima od 60,28 kod izolata sa kima do 76,47% kod izolata sa koprive.

Poređenjem razlika stepena inhibicije porasta micelije poreklom sa svih kultura ispoljene su statistički značajne i vrlo značajne razlike primenom frakcije termostabilnih antifungalnih metabolita i opranih ćelija u odnosu na primenu kultura starih 24^h (Tabela 2, Slika 3).

DISKUSIJA

Antifungalna aktivnost nekoliko autohtonih *Pseudomonas* izolata, uključujući i *P. chlororaphis* Q16, dokazana je *in vitro* prema fitopatogenoj gljivi *Alternaria tenuissima* izolovanoj sa artičoke (*Cynara cardunculus* L., Asteraceae) (Jošić i sar., 2012a) i *Echinacea purpurea* (Protolipac et al., 2012). Među antifungalnim metabolitima soja *P. chlororaphis* Q16 detektovana je značajna količina fenazinskih antibiotika (PCA i 2-OH-PCA) (Jošić i sar., 2012a). Ovaj soj proizvodi indol-sirćetnu kiselinu (IAA) koja je jedan od važnih činioca u stimulaciji rasta biljaka (Poštić i sar., 2013).

Brojni pripadnici vrste *P. chlororaphis* inhibiraju rast različitih fitopatogena, naročito gljiva. Soj *P. chlororaphis* YL-1, koji je izolovan iz korena soje, suprimira rast fitopatogena od velikog agronomskog značaja. Ovaj soj inhibira *in vitro*

kako bakterije- *Burkholderia glumae*, *Clavibacter michiganensis*, *Erwinia amylovora*, tako i gljive - *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani* i *Fusarium oxysporum*. Analizom genoma ovog soja utvrđeno je prisustvo gena uključenih u sintezu fenazina, pirolnitrina i cijanovodonika koji imaju važne uloge u biološkoj kontroli patogena (Liu et al., 2014). *P. chlororaphis* soj PA23 takođe vrši supresiju bolesti izazavane fitopatogenom gljivom *S. sclerotiorum*. Iako PA23 proizvodi difuzibilne antibiotike fenazin-1-karboksilnu kiselinu, 2-hidroksifenazin i pirolnitrin (PRN), koji suprimiraju *S. sclerotiorum*, primarni antibiotik odgovoran za biokontrolu ovog patogena je PRN, koji se sintetisuje u dvostruko većoj koncentraciji kod PHZ(-) mutanta, ali ne učestvuje u produkciji biofilma. PHZ, pored antibiotskog delovanja na rast *S. sclerotiorum*, deluju stimulatивно na formiranje biofilma (Poritsanos et al., 2006; Selin et al., 2010). Među sekundarnim metabolitima koje ovaj soj sintetisuje su litički enzimi- lipaze i proteaze, cijanovodonik i siderofore koji doprinose antagonizmu prema *S. sclerotiorum* (Poritsanos et al., 2006; Zhang et al., 2006; Selin et al., 2010). Eksperimenti u polju su potvrdili da *P. chlororaphis* PA23 efikasno sprečava trulež stabljike uljane repice izazvanu *S. sclerotiorum* (Fernando et al., 2007; Savchuk and Dilantha Fernando, 2004).

U *in vivo* eksperimentima sa *P. chlororaphis* Q16, izvedenim u gnotobiotičkim uslovima, potvrđena je supresija bolesti izazvana gljivom *A. tenuissima* na različitim lekovitim biljkama. Redukcija infekcije tretiranjem biljaka sojem *P. chlororaphis* Q16 kod artičoke iznosila je 43.33% (Jošić i sar., 2012a), dok je kod bosiljka (*Ocimum basilicum* L.) dostizala 86,5% (Jošić i sar., 2012b). Ovi rezultati ukazuju na različit stepen osetljivosti svakog izolata *A. tenuissima* prema antifungalnim metabolitima istog antagonista.

Efekat inhibicije rasta micelija 6 izolata *S. sclerotiorum* različitog porekla uslovljen delovanjem PGP bakterije *P. chlororaphis* Q16, a naročito primena termostabilnih antifungalnih metabolita sa intervalom inhibicije od 52,75 (*S. sc-Bs*) do 83,36% (*S. sc-Ep*), otvara mogućnosti za dalje testiranje ovog soja u kontrolisanim uslovima i pri pojavi infekcije *S. sclerotiorum* u polju.

ZAHVALNICA

Ova istraživanja finansirana su u okviru Projekta III46007 Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

LITERATURA

- Chin-A-Woeng, T. F. C., van den Broek, D., de Voer, G., van der Drift, K. M., Tuinman, S., Thomas-Oates, J. E., Lugtenberg, B. J. J., Bloemberg, G. V. (2001): Phenazine-1-carboxamide production in the biocontrol strain *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 is regulated by multiple factors secreted into the growth medium. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 14: 969–979.
- Clarke, P. H. (1982): The metabolic versatility of pseudomonads. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 48(2): 105-130.
- Fernando Dilantha, W. G., Nakkeeran, S., Zhang, Y., Savchuk, S. (2007): Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary by *Pseudomonas* and *Bacillus* species on canola petals. *Crop Protection*, 26: 100-107.
- Gamliel, A., Katan, T., Yunis, H., Katan, J. (1996): Fusarium wilt and crown rot of sweet basil: Involvement of soilborne and airborne inoculum. *Phytopathology*, 86: 56-62.
- Godoy, G., Steadman, J. R., Yuen, G. (1990): Bean blossom bacteria have potential for biological control of wite mold disease cauded by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Annu. Rep. Bean. Improv.Coop.*, 33: 45-46.
- Haas, D., De' fago, G. (2005): Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nat. Rev. Microbiol.*, 3: 307-319.
- Huang, H. C., Kokko, E. G. I., Yanke, J., Phillippe, R. C. (1993): Bacterial suppression of basal pod rot and end rot of dry peas caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Can. J. Microbiol.*, 39: 227-233.
- Jošić, D., Protolipac, K., Starović, M., Stojanović, S., Pavlović, D., Miladinović, M., Radović, S. (2012a): Phenazines Producing *Pseudomonas* Isolates Decrease *Alternaria tenuissima* Growth, Pathogenicity and Disease Incidence on Cardoon. *Arch. Biol. Sci., Belgrade*, 64(4): 1495-1503.
- Jošić, D., Pavlović, S., Starović, M., Stojanović, S., Stanojković-Sebić, A., Pivić, R. (2012b): Biocontrol of *Alternaria tenuissima* originated from *Ocimum basilicum* L using indigenous *Pseudomonas* spp. Strains. 7th CMAP-SEEC, Subotica, Sebia, 27th-31th May, 2012. Proceedings, 195-200.
- Liu, H., He, Y., Jiang, H., Peng, H., Huang, X., Zhang, X., Thomashow, L. S., Xu, Y. (2007): Characterization of a phenazine-producing strain *Pseudomonas chlororaphis* GP72 with broad-spectrum antifungal activity from green pepper rhizosphere. *Current Microbiology*, 54: 302-306.
- Liu, Y., Lu, S-E., Baird, S. M., Qiao, J., Du, Y. (2014): Draft genome sequence of *Pseudomonas chlororaphis* YL-1, a biocontrol strain suppressing plant microbial pathogens. *Genome Announc.*, 2(1): e01225-13. doi:10.1128/genomeA.01225-13.
- Nair, C. B., Anith, K. N. (2009): Efficacy of acibenzolar-S-methyl and rhizobacteria for the management of foliar blight disease of amaranth. *Journal of Tropical Agriculture*, 47: 43-47.
- Ogbebor, N., Adekunle, A. T. (2005): Inhibition of conidial germination and mycelial growth of *Corynespora cassicola* (Berk and Curt) of rubber (*Hevea brasiliensis* muell. Arg.) using extracts of some plants. *African Journal of Biotechnology*, 4: 996-1000.
- Pavlović, S., Stojanović, S. (2001): First report of occurrence *Sclerotinia* blight on marshmallow (*Althae officinalisi* L.) in Serbia. VII Meeting Days of medicinal plants, Belgrade, Book of abstracts, pp. 45.
- Poritsanos, N., Selin, C., Fernando, W. G. D., Nakkeeran, S., de Kievit, T. R. (2006): A GacS deficiency does not affect *Pseudomonas chlororaphis* PA23 fitness when growing on canola, in aged batch culture or as a biofilm. *Can. J. Microbiol.*, 52: 1177-1188.

- Postic, D., Starovic, M., Popovic, T., Bosnic, P., Stanojkovic-Sebic, A., Pivic, R., Josic, D. (2013): Selection and RAPD analysis of *Pseudomonas* spp. isolates able to improve biological viability of potato seed tubers. *Genetika*, 45(1): 237-249.
- Protolipac, K., Pavlović, S., Starović, M., Stojanović, S., Lepšanović, Z., Jošić, D. (2012): Antifungal activity of idigenous *Pseudomonas* isolates against *Alternaria tenuissima* isolated from *Echinacea purpurea*. 7th CMAP-SEEC, Subotica, Serbia, 27th-31th May, 2012. Proceedings, pp. 187-191.
- Savchuk, S.C. (2002): Evaluation of biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* on Canola (*Brassica napus*) in the lab, in the greenhouse, and in the field. Msc. thesis, University of Manitoba, pp. 49-83.
- Savchuk, S. C., Dilantha Fernando, W. G. (2004): Effect of timing of application and population dynamics on the degree of biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* by bacterial antagonists. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 49: 379-388.
- Selin, C., Habibian, R., Poritsanos, N., Athukorala, S. N., Fernando, D., de Kievit, T. R. (2010): Phenazines are not essential for *Pseudomonas chlororaphis* PA23 biocontrol of *Sclerotinia sclerotiorum*, but do play a role in biofilm formation. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 7: 73-83.
- Singh, A., Dubey, N. K. (2012): An ethnobotanical study of medicinal plants in Sonbhadra District of Uttar Pradesh, India with reference to their infection by foliar fungi. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6: 2727-2746.
- Sokal, R. R., Rohlf, F. J. (1995): *Biometry: The principle and practice of statistics in biological research*, 3rd ed. New York: W.H. Freeman and Company.
- Stojanović, S., Pavlović, S., Starović, M. (2006): Medicinal and aromatic plant decay caused by *Sclerotinia sclerotiorum* in Serbia. of the 4th Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries, Isai, Romania, 28-31. 05, Proceedings, pp. 240-243.
- Szczeponek, A., Mazur, S. (2006): Occurrence of fungal diseases on lemon balm (*Mellisa officinalis* L.) and peppermint (*Mentha piperita* L.) in the region of Malopolska. *Commun Agric Appl. Biol. Sci.*, 71(3 Pt B): 1109-1118.
- Tu, J. C. (1997): Biological control of white mould in white bean using *Trichoderma viride*, *Gliocladium roseum* and *Bacillus subtilis* as protective foliar spray. In Proceedings of 49th International Symposium on Crop Protection, Gent, 62: 979-986.
- Yuen, G. Y., Craig, M. L., Kerr, E. D., Steadman, J.R. (1994): Influences of antagonist population levels, blossom development stage, and canopy temperature on the inhibition of *Sclerotinia sclerotiorum* on dry edible bean by *Erwinia herbicola*. *Phytopathology*, 84: 495-501.
- Zhang, Y., Fernando, W. G. D., de Kievit, T., Berry, C., Daayf, F., Paulitz, T. C. (2006): Detection of antibiotic-related genes from bacterial biocontrol agents using polymerase chain reaction. *Can. J. Microbiol.*, 52: 476-481.

(Priljeno: 23.05.2014.)
(Prihvaćeno: 27.06.2014.)

ANTIFUNGAL ACTIVITY OF *PSEUDOMONAS CHLORORAPHIS* Q16 AGAINST *SCLEROTINIA SCLEROTIUM* ISOLATED FROM DIFFERENT MEDICINAL PLANTS

ZORICA LEPŠANOVIĆ¹, MIRA STAROVIĆ², SNEŽANA PAVLOVIĆ, DRAGANA JOŠIĆ³

¹Institute of Epidemiology, Military Medical Academy, Belgrade, Serbia

²Institute for Plant Protection and Environment, Belgrade, Serbia

³Institute of Soil Science, Belgrade, Serbia

e-mail: josicdragana@yahoo.com

SUMMARY

Phytopathogenic fungi *Sclerotinia sclerotiorum* is very destructive pathogen of the stem of many medicinal plants. Because the use of pesticides is forbidden during production of medicinal plants, presence of *S. sclerotiorum* may produce serious loss. The use of PGP (Plant Growth Promoting) bacteria, for which have been demonstrated to show antifungal activity with varying degrees of antagonism, gives protection to medicinal plants.

The antifungal activity of different fractions of *P. chlororaphis* Q16 culture was examined on 6 representative isolates of *S. sclerotiorum* from medicinal plants: nettle, cumin, marshmallow, valerian and two strains of *Echinacea*. The highest efficacy of mycelial growth inhibition showed heat stable antifungal factor with growth inhibition range from 52.75% (marshmallow isolate) up to 83.36% (isolate from *E. purpurea*). The inhibition of mycelial growth was similar for all *S. sclerotiorum* isolates when 24^h culture was performed and ranged from 60.28% (cumin isolates) to 76.47% (nettle isolates).

Key words: *Pseudomonas chlororaphis*, *Sclerotinia sclerotiorum*, antifungal activity, medicinal plants

(Received: 23.05.2014.)

(Accepted: 27.06.2014.)

ISPITIVANJE OSETLJIVOSTI RAZLIČITIH GENOTIPOVA LUCERKE PREMA *COLLETOTRICHUM TRIFOLII*

TANJA VASIĆ¹, SNEŽANA ANDELKOVIĆ¹, SANJA ŽIVKOVIĆ², DRAGAN TERZIĆ¹,
JORDAN MARKOVIĆ¹, JASMINA MILENKOVIĆ¹, JASMINA RADOVIĆ¹

¹Institut za krmno bilje, Kruševac,

²Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Beograd
e-mail: tanja.vasic@ikbks.com

REZIME

Južna antraknoza ili trulež krune lucerke, izazvana gljivom *Colletotrichum trifolii* je bolest koja nanosi značajne štete na lucerki u Srbiji. U toku šestogodišnjeg perioda, u periodu leta i rane jeseni, sakupljane su biljke lucerke sa simptomima antraknoze. Stabljične infekcije izazivaju sušenje i povijanje gornjeg dela biljke, što dovodi do karakterističnog simptoma tzv. "pastirska kuka". Ispitivanje stepena osetljivosti različitih genotipova lucerke u eksperimentalnim uslovima obavljeno je sa jednim izolatom Coll-4 (*C. trifolii* poreklom iz Srbije) i jednim referentnim izolatom C-86-2 rasa 1. Deset komercijalnih genotipova lucerke različitog geografskog porekla (K-1, K-28, Zaječarska 83, Osječka 12, NS Slavija, Banja Luka, Affinity 401 + Z, Florida 77, Vernal S i Pery) ispitivano je u ovom radu. Inokulisane biljke lucerke pokazale su tipične simptome antraknoze. Nekrotične lezije pojavile su se na stabljikama zaraženih biljaka i došlo je do povijanja u gornjoj trećini stabala. Micelija parazita prorasta niz stablo i kada se stabljike osuše, nastupa antraknoza krune i korena. Osetljivost različitih genotipova lucerke prema ispitivanim izolatima *C. trifolii* određena je prema skali od 0-5. Ispitivani genotipovi lucerke su ispoljili različitu osetljivost prema testiranim izolatima vrste *C. trifolii*.

Ključne reči: lucerka, antraknoza, *Colletotrichum trifolii*, genotipovi, osetljivost

UVOD

Kao prouzrokovači antraknoze na lucerki obično se navode *C. trifolii*, *C. destructivum*, *C. dematium* i *C. truncatum* (Devine et al., 1971; Boland and Brochum, 1989; Frasyssinet, 2008; Hyde et al., 2009). Antraknoza na lucerki je zastupljena u Americi, Italiji, Hrvatskoj, Izraelu, Novom Zelandu, Australiji i Južnoj Americi (Vasić, 2007). U Srbiji je pojava antraknoze lucerke prvi put zabeležena u julu 1980. godine u okolini Subotice (Robotić i Klokočar-Šmit, 1983).

Prisustvo bolesti doprinosi da se usev lucerke proređuje i dovodi do skraćivanja perioda iskorišćavanja lucerišta. Biljke u podmaklim fazama razvoja bolesti u gornjem delu stabla povijene su u vidu kuke, što je tipičan simptom (Stuteville and Erwin, 1990). Kako bolest napreduje, infekcija se širi i sa stabljike prelazi u zonu korenovog vrata i korena. Infekcija krune i korena karakteriše se suvom truleži sa

promenom boje napadnutog tkiva u plavo-crnu (Lukezić, 1974). Infekcija krune može biti sa ili bez stabljičnih lezija. Obolele biljke na ovaj način mogu da propadnu u toku jedne vegetacione sezone ili prilično oslabljene, često podlegnu mrazu u zimskim uslovima (Barnes et al., 1969). Štete koje nastaju usled prisustva i razvoja prouzrokovača antraknoze posledica su smanjene količine i kvaliteta zelene mase od 10 čak i do 70% u zavisnosti od sorte lucerke, klimatskih i edafskih uslova (Stuteville and Erwin, 1990).

Cilj ovih istraživanja je da se determiniše osetljivost ispitivnih genotipova lucerke prema prouzrokovaču antraknoze *C. trifolii* u Srbiji i mogućnost dobijanja tolerantnih genotipova lucerke.

MATERIJAL I METODE

U cilju iznalaženja potencijalnih izvora otpornosti lucerke na vrstu *Colletotrichum trifolii*, ispiti-

vana je reakcija 10 komercijalnih genotipova lucerke, različitog porekla, četiri domaća komercijalna genotipa (K-1, K-28, Zaječarska 83 i NS Slavija), kao i dva genotipa iz bližeg okruženja Osječka 12 (Hrvatska) i Banja Luka (Bosna i Hercegovina). U ogled su takođe, uključeni i referentni američki komercijalni genotipovi (Affinity 401 + Z (HR), Florida 77 (MR), Vernal S (S) i Perry (LR)) koji pokazuju različite nivoe otpornosti prema *C. trifolii* (O'Neill, 1996; Gray et al., 2003). Affinity 401 + Z se opisuje kao visoko otporn genotip (Gray et al., 2003), Vernal S kao osetljiv (Ostazeski et al., 1969; Elgin and Ostazeski, 1982), dok se Florida 77 navodi kao srednje otporan i Perry kao osetljiv genotip (O'Neill, 1996; Gray et al., 2003).

Srpski izolat Coll-4 za ova istraživanja je odobran na osnovu morfoloških i molekularnih osobina. Referentni izolat C-86-2 determinisan do nivoa rase 1, dobijen je iz kolekcije INRA, Institut National de la Recherche Agronomique, France.

Ogled je postavljen u proleće 2010. godine u uslovima staklenika Instituta za krmno bilje, Kruševac. Seme lucerke posejano je u plastične kontejnere na dubini od 2 cm u sterilni supstrat (Klasman 1). U kontejnerima biljke lucerke gajene su četiri nedelje i nakon toga rasadene u veće saksije. Tri nedelje po rasadaivanju, biljke su inokulisane. U vreme inokulacije biljke su bile starosti sedam nedelja. Suspenzija konidija pripremljena je od kultura ispitivanih izolata, koje su gajene 10 dana na PDA podlozi pri temperaturi od 25°C, u mraku. Koncentracija spora određena je pomoću hemocitometra po Thom-u i iznosila je 4-6 x 10⁻⁴ spora/ml. Biljke lucerke povređene su kosidbom i prskane suspenzijom spora. Ogled je postavljen u deset ponavljanja po izolatu i po sorti, a kao negativna kontrola poslužile su biljke

lucerke inokulisane sterilnom vodom.

Osetljivost različitih genotipova lucerke prema ispitivanim izolatima *Colletotrichum trifolii* određivana je po modifikovanoj metodi Ostazeski et al. (1969), prema skali od 0-5.

- 0- Biljke bez simptoma,
- 1- Pojedinačne vodenaste pege u osnovi,
- 2- Prisutne udubljene lezije,
- 3- Pojava lezija duž stabla,
- 4- Nekroza celog stabla,
- 5- Uvenučje i sušenje celih stabala.

REZULTATI

Ispitivani izolati na stabljikama zaraženih biljaka lucerke izazvaju tipične simptome antraknoze. Posle 15 dana od inokulacije na testiranim biljkama javile su se pre svega nekrotične lezije na stablu i lagano povijanje vrha gornje trećine stabla. Nekrotične lezije širile su se dalje na celu biljku i kod pojedinih biljaka dovele do potpunog sušenja i propadanja biljaka. Ocena intenziteta razvoja bolesti vršena je na osnovu skale od 0-5. Reakcija ispitivanih genotipova lucerke kao i ocena indeksa oboljenja nakon inokulacije ispitivanim izolatima *C. trifolii* prikazana je u Tabeli 1.

Na osnovu indeksa oboljenja prema izolatu Coll-4 genotipovi Affinity 401+Z sa 2,4; Florida 77 sa 2,5 i Vernal S sa indeksom oboljenja 2,7 pokazali su značajnu otpornost. Prema referentnom izolatu C-86-2 determinisanom do rase 1, genotip Vernal S sa indeksom oboljenja 2.1 pokazuje visok nivo otpornosti. Isto tako genotipovi Banja Luka i K-28 sa indeksom oboljenja 2,3 i genotipovi NS Slavija i Florida 77 čiji su indeksi oboljenja 2,4 pokazuju visok

Tabela 1. Ocena osetljivost komercijalnih genotipova lucerke prema izolatima *C. trifolii*.
Table 1. Evaluation of sensitivity in commercial genotypes of alfalfa to isolates *C. trifolii*.

Genotipovi Genotypes	Coll-4		C-86-2	
	Indeks oboljenja Disease severity index %	Otporne biljke Resistant plants (1+2%)	Indeks oboljenja Disease severity index %	Otporne biljke Resistant plants (1+2%)
K-1	4.2	0	3.4	20
K-28	3.7	10	2.3	60
Zaječarska 83	3.3	30	3.6	20
Osječka 12	4.3	10	3.9	10
NS Slavija	3.9	10	2.4	60
Banja luka	3.3	30	2.3	70
Affinity 401 + Z	2.4	50	3.6	20
Florida 77	2.5	50	2.4	60
Vernal S	2.7	60	2.1	70
Perry	3.6	10	2.7	40
Kontrola	-	-	-	-

nivo otpornosti prema referentnom izolatu.

Dobijeni rezultati ukazuju na veliku varijabilnost u osetljivosti ispitivanih genotipova lucerke prema testiranim izolatima okarakterisanim kao *C. trifolii*. U toku ovih istraživanja utvrđeno je da su domaći genotipovi lucerke K-1, Zaječarska 83 pokazali veliku osetljivost prema ispitivanim izolatima *C. trifolii* (Tabela 1).

DISKUSIJA

Fitopatogena gljiva *C. trifolii* je jedan od najznačajniji patogen koji ugrožava useve pod lucerkom, prouzrokujući najčešće veoma značajne ekonomske štete (Elgin and Ostazeski, 1982; Allen et al., 1982; O'Neill et al., 1989). Problemi i štete od bolesti lucerke koji se u našim uslovima javljaju su veliki i teško rešivi između ostalog i zbog nepostojanja komercijalnih genotipova koje pokazuju otpornost prema gljivičnim prouzročivačima bolesti. Lucerka je visoko varijabilna vrsta, pre svega zbog svoje prirodne tetraploidnosti, što uslovljava kontrolu svake osobine sa najmanje 4 gena (Vasić, 2013).

Izolat Coll-4 bio je veoma patogena prema domaćim genotipovima lucerke. Nakon četiri nedelje od inokulacije izazvao je potpuno sušenje i propadanje biljaka genotipova K-1, K-28 i NS Slavija. Genotip Banja Luka pokazao je srednju otpornost prema ispitivanom izolatu. Američki genotip Perry je pokazao je niži nivo otpornosti, dok drugi američki genotipovi Affinity 401 + Z, Florida 77 i Vernal S pokazuju otpornost prema ispitivanom izolatu. Genotip Affinity 401 + Z u ovim istraživanjima je pokazao najbolju otpornost prema izolatu Coll-4 što je u skladu sa rezultatima (Gray et al., 2003), koji ukazuju da je genotip Affinity 401 + Z visoko otporan na *C. trifolii*. Međutim, na osnovi indeksa oboljenja domaći genotip K-28 pokazuje veliku otpornost prema referentnom izolatu C-86-2 rase 1, dok ostali domaći genotipovi K-1, NS Slavija i Zaječarska 83 pokazuju veliku osetljivost. Američki genotipovi Vernal S i Florida 77 pokazuju veliku otpornost prema testiranim izolatima.

Prema Ostazeski et al. (1969), osetljiv genotip ima 10% zdravih biljaka, dok se za genotip koja ima preko 65% zdravih biljaka može reći da je otporan. Genotip Arc, koji je otporan na rasu 1. *C. trifolii*, ima indeks oboljenja 2.72 odnosno 2.25 (Ostazeski et al., 1979). Devine et al. (1973) navode da je pet populacija lucerke dobijeno sa povećanom otpornošću prema *C. trifolii*. Otpornost prema *C. trifolii* može se povećati sa 5 na 82% nakon dva ili tri ciklusa selekcije (Devine et al., 1971). Međutim, pojava rasa *C. trifolii* ukazuje da je stvaranje otpornih genotipova

lucerke složenije nego što se mislilo. Prirodna otpornost prema prouzročivaču antraknoze još je nedovoljno poznata. Čini se da je otpornost kod genotipa Arc kontrolisana jednim dominantnim alelom i da poseduje vertikalnu otpornost prema rasi 1 *C. trifolii*, dok je otpornost kod genotipa Saranac AR, Vangaurd i Florida 77 složenije prirode i ovi genotipovi su otporni prema rasama 1 i 2 *C. trifolii* (Devine et al., 1971; Elgin and Ostazeski, 1982).

Elgin and Ostazeski (1982) testiraju nivo otpornosti genotipova Florida 77 i Perry prema izolatima *C. trifolii* rasa 1 i 2, i dolaze do zaključka da je kod genotipa Florida 77 u odnosu na rasu 1 *C. trifolii* bilo 11% otpornih biljaka, a u odnosu na rasu 2 iste vrste, bilo je otporno 10% biljaka. Isto tako kod genotipa Perry prema rasama 1 i 2 *C. trifolii* bilo je 2% zdravih biljaka. Genotip Vernal S pokazao je veću osetljivost u kontrolisanim uslovima nego na polju (Barnes et al., 1969). U uslovima postavljenog eksperimenta, može se zaključiti da je najveću otpornost pokazao američki genotip Vernal S, i ako je on u radovima predstavljen kao osetljiv genotip na antraknozu (Devine et al., 1971). Najmanju otpornost prema izolatima testirane vrste pokazali su domaći genotipovi K-1 i Zaječarska 83. Isto tako, Hrvatski genotip Osječka 12 pokazuje veliku osetljivost prema ispitivanim izolatima *C. trifolii*.

Vasić et al. (2009) proučavali su uticaj četiri izolata *C. trifolii* na četiri komercijalna genotipa lucerke (K-28, NS Mediana, Affinity + Z i Alfagraze) i utvrdili su značajnu osetljivost ispitivanog biljnog materijala prema vrsti *C. trifolii*.

Dobijeni rezultati ukazuju na visoku varijabilnost reakcije u sistemu genotip - izolat u testiranom biljnom materijalu. Pored toga, odgovor pojedinačnih biljaka u okviru genotipova na inokulaciju patogenim izolatima, takođe je bio jako varijabilan. Manji broj pojedinačnih biljaka uspele su, da i pored jasnih simptoma oboljenja donesu seme. Potomstvo ovih biljaka odličan je izvor otpornosti na ispitivane izolate patogena i biće uključeno u sledeći ciklus selekcije na ovu osobinu. Imajući u vidu rezultate Devine et al. (1971) koji ukazuju da je nakon nekoliko ciklusa selekcije moguće podići nivo otpornosti, nastavak istraživanja u ovom pravcu ima veliki potencijalni značaj.

Izdvojeni genotipovi lucerke koji su ispoljili viši nivo otpornosti biće dalje korišćeni u poljskim ogledima u različitim klimatskim uslovima kako bi se tačnije procenio nivo otpornosti na *C. trifolii* vrstu.

ZAHVALNICA

Munistarstvo prosvete, nauke u tehnološkog razvoja Republike Srbije, projekat TR 31057.

LITERATURA

- Allen, S.J., Barnes, G.L., Caddel, J.L. (1982): A new race of *Colletotrichum trifolii* on alfalfa in Oklahoma. *Plant Disease*, 66: 922-924.
- Barnes, D.K., Ostazeski, S.A., Schillinger, J.A., Hanson, C.H. (1969): Effect of Anthracnose (*Colletotrichum trifolii*) Infection on Yield, Stand, and Vigor of Alfalfa. *Crop Science* 9: 344-346.
- Boland, G.J., Brochu, L.D. (1989): *Colletotrichum destructivum* on alfalfa in Ontario and cultivar response to anthracnose. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 11: 303-307.
- Devine, T.E., Hanson, C.H., Ostazeski, S.A., Campbell, T.A. (1971): Selection for Resistance to Anthracnose (*Colletotrichum trifolii*) in Four Alfalfa Populations. *Crop Science*, 11: 854-855.
- Devine, T.E., Hanson, C.H., Ostazeski, S.A., Hunt, O.J. (1973): Registration of alfalfa germplasm. *Crop Science*, 13: 289.
- Elgin, J.H., Jr. Ostazeski, S.A. (1982): Evaluation of Selected Alfalfa Cultivars and Related Medicago Species for Resistance to Race 1 and Race 2 Anthracnose. *Crop Science*, 22: 39-42.
- Frayssinet, S. (2008): *Colletotrichum destructivum* a new lucerne pathogen in Argentina. *Australasian Plant Disease Notes*, 3: 68.
- Gray, F., Hollingsworth, C., Koch, D. (2003): "B-1136 Alfalfa Disease Management". University of Wyoming. A full copy of this publication can be accessed at www.uwyo.edu/ces/plantsci.htm (accessed may, 2003).
- Hyde, K.D., Cai, L., Cannon, P.F., Crouch, J.A., Crous, P.W., Damm, U., Goodwin, P.H., Chen, H., Johnston, P.R., Jones, E.B.G., Liu, Z.Y., McKenzie, E.H.C., Moriwaki, J., Noireung, P., Pennycook, S.R., Pfenning, L.H., Prihastuti, H., Sato, T., Shivas, R.G., Tan, Y.P., Taylor, P.W.J., Weir, B.S., Yang, Y.L., Zhang, J.Z. (2009). *Colletotrichum* - names in current use. *Fungal Diversity*, 39: 147-182.
- Lukezić, F.L. (1974): Dissemination and Survival of *Colletotrichum trifolii* Under Field conditions. *Phytopathology*, 64: 57-59.
- Ostazeski, S.A., Barnes, D.K., Hanson, C.H. (1969): Laboratory Selection of Alfalfa for Resistance to Anthracnose, *Colletotrichum trifolii*. *Crop Science*, 9: 351-354.
- Ostazeski, S.A., Elgin, J.H., Jr., McMurtray, J.E. (1979): Occurrence of anthracnoses on formerly anthracnose-resistant „Arc“ alfalfa. *Plant Disease Report*, 63: 734-736.
- O'Neill, N.R., Elgin, J.H., Jr. and Baker, C.J. (1989): Characterization of Induced Resistance to Anthracnose in Alfalfa by Races, Isolates and Species of *Colletotrichum*. *Phytopathology*, 79: 750-756.
- O'Neill, N.R. (1996): Pathogenic Variability and Host Resistance in the *Colletotrichum trifolii*/*Medicago sativa* Pathosystem. *Plant Disease*, 80: 450-457.
- Robotić, V., Klokočar-Šmit, Z. (1983): *Colletotrichum trifolii* Bain et Essary prouzrokovatelj antraknoze lucerke. *Zaštita bilja*, 34(2), 164: 225-239.
- Stuteville, D.L., Erwin, D.C. (1990): Compendium of alfalfa diseases, second edition. St. Paul, Minnesota USA: The American Phytopathological Society, Aps Press, pp. 84.
- Vasić, T. (2007): *Colletotrichum trifolii* (Bain et Essary), prouzrokovatelj antraknoze, u kompleksu propadanja lucerke u Srbiji. *Poljoprivredni fakultet, Zemun-Beograd*, 1-88.

Vasić, T., Radović, J., Lugić, Z., Marković, J., Jevtić, G., Gajić, S. (2009): Occurrence of *Colletotrichum trifolii* (Bain et Essary), the inducer of alfalfa anthracnose in Serbia. In: C. Huyghe (ed.) Sustainable Use of Genetic Diversity in Forage and Turf Breeding. Springer, Ch 53: 369-374.

Vasić, T. (2013): Karakterizacija vrsta roda *Colletotrichum*, prouzrokovaca antraknoze lucerke u Srbiji i osetljivost genotipova. Poljoprivredni fakultet, Zemun-Beograd, 1- 178.

(Primljeno: 06.06.2014.)

(Prihvaćeno: 04.07.2014.)

ASSESSMENT OF SENSITIVITY OF DIFFERENT ALFALFA GENOTYPES TO *COLLETOTRICHUM TRIFOLII*

TANJA VASIĆ¹, SNEŽANA ANDELKOVIĆ¹, SANJA ŽIVKOVIĆ², DRAGAN TERZIĆ¹,
JORDAN MARKOVIĆ¹, JASMINA MILENKOVIĆ¹, JASMINA RADOVIĆ¹

¹ Institute for Forage Crops, Kruševac, Serbia

² University of Belgrade, Faculty of Agriculture, Belgrade, Serbia
e-mail: tanja.vasic@ikbks.com

SUMMARY

Southern anthracnose or crown rot, caused by *Colletotrichum trifolii*, is a disease that has been detected on alfalfa in Serbia. During a 6-years period, especially in summer and autumn, alfalfa plants with anthracnose symptoms were studied in the field. Stem infection resulted in wilting and death of the upper portion of the stem, giving rise to the characteristic “shepherd’s crook” symptom. To examine the level of sensitivity of different alfalfa genotypes in experimental conditions, one isolate: Coll-4 (*C. trifolii* originating from Serbia) and one reference isolate C-86-2 (races 1) *C. trifolii* were used. Ten commercial alfalfa genotypes of different origin (K-1, K-28, Zajecarska 83, Osjecka 12, NS Slavija, Banja Luka, Affinity 401 + Z, Florida 77, Vernal S and Perry) were examined in this study. Infected plants showed typical symptoms of anthracnose. Necrotic lesions appeared on the plant stems and gentle bending of the top of the upper third of stems occurred on tested plants. Necrotic lesions further spread onto the whole plant and in some plants led to withering. Assessment of damage by pathogen inoculation was based on the scale of 0-5. Investigated genotypes showed contrasting resistances to *C. trifolii* isolates.

Key words: alfalfa, anthracnose, *Colletotrichum trifolii*, genotypes, sensitivity

(Received: 06.06.2014.)

(Accepted: 04.07.2014.)

ISPITIVANJE KVALITETA SEMENA ENGLESKOG LJULJA, ITALIJANSKOG LJULJA I CRVENOG VIJUKA

DOBRIVOJ POŠTIĆ¹, NEBOJŠA MOMIROVIĆ², RADE STANISAVLJEVIĆ¹, RATIBOR ŠTRBANOVIĆ¹,
VELJKO GAVRILOVIĆ¹, GORAN ALEKSIĆ¹, LANA ĐUKANOVIĆ¹

¹Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Beograd

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

REZIME

Ispitivanjem semena engleskog ljulja (*Lolium perenne*), italijanskog ljulja (*Lolium multiflorum*) i crvenog vijuka (*Festuca rubra*) u toku pet godina (2010 - 2014. godina) utvrđene su vrlo visoke vrednosti svih značajnih pokazatelja kvaliteta semena. Prosečna utvrđena čistoća semena bila je preko 98,40%, sa variranjem po godinama od 96,7 % do 99,2 %. Pri tome najveći deo primesa činile su inertne materije, koje su varirale po godinama u intervalu od 0,0 % do 2,30 %. Prisustvo semena korova po godinama je variralo u intervalu od 0,0 % do 0,50 %. U semenu ispitivanih trava dominiraju korovi iz familija *Asteraceae*, *Caryophyllaceae*, *Chenopodiaceae* i *Polygonaceae*. Najzastupljeniji korovi u ispitivanim travama su *Amaranthus retroflexus* (obični štir) i *Chenopodium album* (obična pepeljuga). Učešće drugih vrsta po godinama kretalo se u intervalu od 0,0 % do 1,8 %. Klijavost semena varirala je od 75 do 88%, prosečno je iznosila 83%. Broj nenormalnih klijanaca bio je 4%, dok je prosečan broj nekljalog semena bio 13%.

Ključne reči: kvalitet trava, čistoća semena, klijavost, korovi

UVOD

Engleski ljulj, italijanski ljulj i crveni vijuk predstavljaju vrlo važne i rasprostranjene travne vrste značajne u ishrani stoke, naročito preživara. Značajne površine pod ovim travama nalaze se u jugoistočnoj Evropi, vrlo često se nalaze u smešama sa drugim travama (Stanisavljević et al., 2010a). Italijanski ljulj predstavlja najzastupljeniju travnu vrstu u Evropi, zauzima oko 23% od ukupnih 52 miliona ha površina pod travama (Humphreys et al., 2010).

Seme predstavlja jedan od najvažnijih činilaca uspešne poljoprivredne proizvodnje, koji obeležava početak svake biljne proizvodnje i zato je obezbeđivanje njegovog visokog kvaliteta prioritet savremenog sementarstva i preduslov za visoke prinose svih biljnih vrsta. Kvalitet semena se definiše kao skup osobina koje obezbeđuju uspešan razvoj nove biljke u okviru agroekoloških uslova sredine. Kako bi iskoristili potencijal rodnoći trava neophodno je proizvesti seme visokog kvaliteta, što predstavlja

jedan od osnovnih preduslova za sigurne, visoke i kvalitetne prinose trava. Klijavost semena predstavlja najvažniji pokazatelj kvaliteta semena, odnosno životne sposobnosti od koje zavisi njena upotrebna vrednost (Poštić i sar., 2010a). Osim visoke ukupne klijavosti važno je da seme ima i odgovarajuću energiju klijanja (Poštić i sar., 2011). U proizvodnji svake bijne vrste veoma je važno brzo i ujednačeno nicanje biljaka u polju, koje direktno zavisi od energije klijanja semena (Poštić i sar., 2010b)

Ukoliko su agroekološki uslovi skoro idealni (temperatura vazduha i temperatura zemljišta) klijavost semena dobijena u laboratorijskim uslovima dobar je pokazatelj životne sposobnosti semena na osnovu kojeg se može predvideti nicanje useva u polju. Seme visoke životne sposobnosti daje klijanac koji će u polju ostvariti najbolji sklop, ujednačeno nicanje useva, što omogućuje postizanje stabilnih prinosa izvanrednog kvaliteta.

Cilj rada je bio da se na osnovu višegodišnjih rezultata istraživanja utvrde relevantni faktori

kvaliteta semena trava, odnosno da se izvrši analiza pokazatelja kvaliteta trava u petogodišnjem periodu (2010 - 2014. godina).

MATERIJAL I METODE

Kao materijal u istraživanjima korišćeni su uzorci semena trava engleskog ljulja (*Lolium perenne*), italijanskog ljulja (*Lolium multiflorum*) i crvenog vijuka (*Festuca rubra*) iz uvoza tokom perioda (2010 - 2014. godine). Ispitivanja pokazatelja kvaliteta semena trava izvršena su u Laboratoriji za ispitivanje kvaliteta semena i sadnog materijala Instituta za zaštitu bilja i životnu sredinu u Beogradu. Praćeni su sledeći pokazatelji kvaliteta: čistoća semena, energija klijanja, ukupna klijavost, masa 1000 semena i sadržaj vlage semena.

Ispitivanje klijavosti semena izvršeno je standardnom metodom sa 4x100 semena na filter papiru, koji je prethodno navlažen 0,2% rastvorom KNO₃. Seme je zatim izloženo prethodnom hlađenju (ph) četiri dana na temperaturi 4-8°C. Nakon toga seme je naklijavano 14 dana na temperaturi 20-30°C i relativnoj vlažnosti vazduha od 95%. Posle pet dana, od dana stavljanja na naklijavanje ocenjena je energija klijanja (EK) engleskog i italijanskog ljulja, dok je posle sedam dana ocenjivana energija klijanja crvenog vijuka. Ukupna klijavost ispitivanih trava utvrđena je nakon 14 dana naklijavanja, odnosno određen je broj normalnih klijanaca prema ISTA pravilima (ISTA Rules, 2008) i Pravilniku o kvalitetu semena (Sl. list SFRJ br. 47/87).

REZULTATI I DISKUSIJA

Najvažniji pokazatelji kvaliteta semena koji određuju njegovu poljoprivrednu vrednost su čistoća, klijavost, masa 1000 semena i sadržaj vlage semena.

Čistoća semena trava

Pod čistoćom semena podrazumeva se odnos količine čistog semena vrste koja se ispituje i količine semena drugih vrsta poljoprivrednog bilja, korova i inertnih materija. Rezultati čistoće ispitivanih trava u petogodišnjem periodu prikazani su u tabeli 2. Prosečna utvrđena čistoća semena iznosi 98,6% za sve tri ispitivane vrste trava što je znatno iznad vrednosti propisane zakonom (Tabela 1).

Najveća prosečna čistoća semena ustanovljena je kod italijanskog ljulja 98,8%, zatim kod crvenog vijuka 98,6%, dok je najmanja čistoća semena konstatovana kod engleskog ljulja 98,4% (Tabela 2).

Utvrđeno variranje čistoće semena ispitivanih trava po godinama najveće je kod engleskog ljulja od 96,7 do 99,2 %, zatim kod crvenog vijuka od 97,7 do 99,2%, dok je najmanji interval variranja ustanovljen kod italijanskog ljulja od 98,2 do 99,1% (Tabela 2).

Inertne materije predstavljaju delovi semena osnovne biljne vrste i korova manje od polovine normalne veličine, prazne pleve i plevice, slobodni prazni cvetici, seme trava sa kariopsom manjom od propisane, delovi cvasti i stabla.

Najveći deo primesa čine inertne materije, prosečno oko 0,9%, variranjem po godinama od 0,0 do 2,3% (Tabela 2). Posmatrano po ispitivanim vrstama u proseku najveći procenat inertnih materija zabeležen je kod crvenog vijuka 1,20%, zatim kod italijanskog ljulja 0,86%, dok je najmanji procenat inertnih materija utvrđen kod engleskog ljulja 0,74% (Tabela 2).

Seme drugih vrsta predstavlja seme koje ne pripada ispitivanoj vrsti semena. Najveći udeo drugih vrsta zastupljen je u semenu engleskog ljulja 0,66%, zatim italijanskog ljulja 0,24%, dok je najmanje učešće drugih vrsta ustanovljeno u semenu crvenog vijuka od 0,08% (Tabela 2).

U semenu engleskog ljulja utvrđeno je prisustvo sledećih vrsta: *Phleum pratense*, *Dactylis glomerata*, *Poa* spp., *Festuca* spp. i *Medicago sativa*.

Seme drugih vrsta čije je prisustvo ustanovljeno kod italijanskog ljulja su *Phleum pratense* i *Festuca* spp.

Druge vrste koje su konstatovane kod crvenog vijuka su: *Lolium* spp., *Dactylis glomerata*, *Poa* spp. i *Trifolium repens*.

Sve identifikovane druge vrste pripadaju gajenim vrstama sa kojima se ispitivane trave kombinuju u travnim i tavno-legumioznim smešama pri setvi i zasnivanju travnjaka i pašnjaka. Prisustvo semena drugih vrsta u ispitivanim travama je nepoželjno samo ukoliko je seme trava namenjeno za gajenje kao pojedinačnog useva.

Seme korova je zastupljeno u proseku sa oko 0,1%, i varirao je po godinama od 0,0 do 0,5% (Tabela 2). Utvrđeno je prisustvo 26 vrsta semena korova, obuhvaćenih sa 23 roda i 10 familija iz odeljka *Magnoliophyta*. U semenu ispitivanih trava dominiraju korovi iz familija *Asteraceae*, *Caryophyllaceae*, *Chenopodiaceae*, *Polygonaceae*, *Poaceae* i *Brassicaceae* (Tabela 3).

Najzastupljeniji korovi su *Amaranthus retroflexus* (obični štir) i *Chenopodium album* (obična pepeljuga), koji se nalaze u semenu sve tri ispitivane travne vrste (Tabela 3). Upravo ove dve korovske vrste predstavljaju najčešće zastupljene korove u Srbiji

Tabela 1. Norme kvaliteta za seme trava.
Table 1. Quality standards for grass seed.

Vrsta Species	Čistoća najmanja Purity min. (%)	Druge vrste najviše Other species max. (%)	Korovi najviše Weeds max. (%)	Klijavost najmanja Germination min. (%)	Vlaga najviše Moisture max. (%)
<i>Lolium perenne</i>	94	2	1	70	13
<i>Lolium multiflorum</i>	94	2	1	70	13
<i>Festuca rubra</i>	90	3	1	70	13

Tabela 2. Čistoća semena (%).
Table 2. Seed purity (%).

Vrsta Species	Osobina Characteristics	Godina - Year					CV	Prosek Average
		2010	2011	2012	2013	2014		
<i>Lolium perenne</i>	Čistoća / Purity	99,2	98,1	96,7	98,9	99,1	1,06	98,40
	Druge vrste Other species	0,4	0,6	1,8	0,0	0,5	102,5	0,66
	Inertne materije Inert matter	0,0	1,3	1,2	1,1	0,3	75,5	0,74
	Korovi / Weeds	0,4	0,0	0,3	0,0	0,1	113,5	0,20
<i>Lolium multiflorum</i>	Čistoća / Purity	98,9	98,9	98,2	98,9	99,1	0,35	98,80
	Druge vrste Other species	0,0	0,0	1,0	0,0	0,2	180,7	0,24
	Inertne materije Inert matter	1,1	1,1	0,8	1,1	0,2	45,5	0,86
	Korovi / Weeds	0,0	0,0	0,0	0,0	0,5	223,6	0,10
<i>Festuca rubra</i>	Čistoća / Purity	99,2	99,0	98,6	97,7	98,6	0,58	98,62
	Druge vrste Other species	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	223,6	0,08
	Inertne materije Inert matter	0,8	1,0	1,4	2,3	0,5	58,03	1,20
	Korovi / Weeds	0,0	0,0	0,0	0,0	0,5	223,6	0,10
Prosek Average	Čistoća / Purity	99,1	98,66	97,83	98,5	98,93	0,49	98,61
	Druge vrste Other species	0,13	0,20	0,93	0,0	0,37	111,4	0,33
	Inertne materije Inert matter	0,63	1,13	1,13	1,50	0,33	48,9	0,93
	Korovi / Weeds	0,13	0,0	0,10	0,0	0,37	126,2	0,13

(Radičević i sar., 2008).

U uzorcima ispitivanih trava utvrđeno je manje zastupljeno prisustvo semena sledećih korova: *Centaurea cyanus*, *Sinapis arvensis*, *Melandrium rubrum*, *Silene alba*, *Chenopodium hibridum*, *Rumex crispus* i *Galium aparine* (Tabela 3).

Klijavost semena trava

Energija klijanja predstavlja utvrđen broj normalnih zdravih i jakih klijanaca (posle prvog ocenjivanja). Od energije klijanja direktno zavisi brzina i ujednačenost nicanje biljaka u polju. Klijavost semena predstavlja ustanovljen broj normalnih klijanaca, u odnosu na ukupan broj semena stavljenih

na klijanje nakon 14 dana naklijavanja. Minimalna klijavost semena ispitivanih trava za stavljanje u promet, prema našim zakonskim propisima iznosi 70% (Tabela 1).

Tokom naših istraživanja u periodu 2010-2014. godina kod ispitivanih trava utvrđena je prosečna klijavost semena od 83% (Tabela 4), što je znatno iznad zakonskog minimuma. Uočeno je veliko variranje po godinama energije klijanja kod svih ispitivanih trava od 67 do 83%, dok je variranje klijavosti po godinama bilo nešto manje od 75 do 88% (Tabela 4).

Uticao godine varirao je za energiju klijanja, bio je veći kod semena *Loliuma* (*L. perenne* CV=7,99%; *L. multiflorum* CV=7,94%) od vrednosti

Tabela 3. Prisustvo korova u semenu trava.
Table 3. Presence of weeds in grass seed.

Familija/Family	Rod/Genus	Vrsta/Species
<i>Amarantaceae</i>	<i>Amaranthus</i>	<i>A. retroflexus</i> S ₁₋₃
	<i>Antemis</i>	<i>A. arvensis</i> S ₁
	<i>Centaurea</i>	<i>C. cyanus</i> S ₁ S ₃
<i>Asteraceae</i>	<i>Leucanthemum</i>	<i>L. vulgare</i> S ₃
	<i>Matricaria</i>	<i>M. inodora</i> S ₃
	<i>Onopordon</i>	<i>O. tauricum</i> S ₃
	<i>Raphanus</i>	<i>R. raphanistrum</i> S ₁
<i>Brassicaceae</i>	<i>Sinapis</i>	<i>S. arvensis</i> S ₁ S ₃
	<i>Thlaspi</i>	<i>T. arvense</i> S ₃
	<i>Myosotis</i>	<i>M. arvensis</i> S ₃
<i>Boraginaceae</i>	<i>Melandrium</i>	<i>M. rubrum</i> S ₁ S ₃
	<i>Caryophyllaceae</i>	<i>Silene</i>
<i>Stellaria</i>		<i>S. media</i> S ₁
<i>Chenopodiaceae</i>		<i>Chenopodium</i>
<i>Plantaginaceae</i>	<i>Plantago</i>	<i>P. lanceolata</i> S ₃
	<i>Agropyrum</i>	<i>A. repens</i> S ₁
<i>Poaceae</i>	<i>Apera</i>	<i>A. spica-venti</i> S ₁
	<i>Cynodon</i>	<i>C. dactilon</i> S ₁
	<i>Panicum</i>	<i>P. crus-galli</i> S ₂
	<i>Bilderdykia</i>	<i>B. convolvulus</i> S ₁
<i>Polygonaceae</i>	<i>Polygonum</i>	<i>P. lapathifolium</i> S ₂ <i>R. acetosella</i> S ₃
	<i>Rumex</i>	<i>R. crispus</i> S ₁ S ₃
	<i>Rubiaceae</i>	<i>Galium</i>

S-Species (S₁ *Lolium perene*; S₂ *Lolium italicum*; S₃ *Festuca rubra*);

utvrđene kod crvenog vijuka (CV= 4,11%). Ista tendencija utvrđena je kod ukupne klijavosti, broja normalnih klijanaca i nekljalog semena (Tabela 4).

Prosečno učešće nenormalnih klijanaca kod ispitivanih trava iznosilo je 4%, sa neznatnim variranjem po godinama od 3 do 5% (Tabela 4).

Udeo nekljalog semena kod ispitivanih trava bio je 13 %, što se može smatrati vrlo visokim, što može biti posledica mirovanja semena trava. Mirovanje semena trava je nepoželjna osobina pri zasnivanju livada i pašnjaka, koja negativno utiče na formiranje kvalitetnih pašnjaka (Stanisavljević et al., 2010b). Međutim, mirovanje semena trava i odlaganje klijanja semena u prirodnim uslovima može biti i pozitivna osobina, ako seme kasnije klija u povoljnijim uslovima (Stanisavljević et al., 2010b).

Masa 1000 semena i sadržaj vlage u semenu trava

Masa 1000 semena predstavlja pokazatelj krunoće i nalivenosti semena. Veća masa 1000 seme-

na po pravilu ukazuje na veću životnu sposobnost semena, odnosno veću energiju klijanja i klijavost. Ova fizička osobina semena određena je uticajem niza agrotehničkih i agroekoloških faktora.

U našim istraživanjima kao što se i očekivalo, najveća masa 1000 semena konstatovana je kod engleskog ljulja 3,18 g, zatim kod italijanskog ljuja 2,77 g, dok je najmanja masa 1000 semena utvrđena kod crvenog vijuka 1,13 g (Tabela 5). Masa 1000 semena ispitivanih vrsta trava može se smatrati zadovoljavajućom za svaku pojedinačnu vrstu.

Za masu 1000 semena kod crvenog vijuka utvrđena je veća varijabilnost (CV=7,85) od italijanskog ljulja (CV=6,52%) i engleskog ljulja (CV=3,06%) Tabela 5.

Prosečan sadržaj vlage u semenu ispitivanih trava iznosio je 11,8% (Tabela 5). Ispitivano seme trava može se smatrati da je bilo povoljne vlažnosti za uspešno skladištenje i čuvanje semena, s obzirom da vlaga semena predstavlja osnovni činilac dobrog čuvanja semena. Variranje vlage semena ispitivanih

Tabela 4. Klijavost semena (%).
Table 4. Seed germination (%).

Vrsta Species	Osobina Characteristics	Godina - Year					CV	Prosek Average
		2010	2011	2012	2013	2014		
<i>Lolium perenne</i>	Energija klijanja First count	68	81	76	68	78	7,99	74
	Klijavost / Final count	85	88	84	75	85	5,9	83
	Nenormalni klijanci Abnormal seedlings	3	3	4	5	4	22,02	4
	Neklijalo seme Ungerminated	12	9	12	20	11	32,9	13
	Energija klijanja First count	79	74	69	70	83	7,94	75
<i>Lolium multiflorum</i>	Klijavost / Final count	88	84	81	79	87	4,58	84
	Nenormalni klijanci Abnormal seedlings	3	4	4	5	3	22,02	4
	Neklijalo seme Ungerminated	9	12	15	16	10	24,59	12
	Energija klijanja First count	73	72	72	67	75	4,11	72
	Klijavost / Final count	84	80	84	83	82	2,03	83
<i>Festuca rubra</i>	Nenormalni klijanci Abnormal seedlings	5	4	4	4	5	12,45	4
	Neklijalo seme Ungerminated	11	16	12	13	13	14,39	13
	Energija klijanja First count	73	76	72	68	79	5,65	74
	Klijavost / Final count	86	82	83	79	85	3,30	83
	Nenormalni klijanci Abnormal seedlings	4	4	4	5	4	10,65	4
Prosek Average	Neklijalo seme Ungerminated	10	14	13	16	11	18,65	13

Tabela 5. Masa 1000 semena (g) i sadržaj vlage (%) u semenu trava.
Table 5. Mass 1000-seed (g) and seed moisture content (%) in grass seed.

Vrsta Species	Osobina Characteristics	Godina - Year					CV	Prosek Average
		2010	2011	2012	2013	2014		
<i>Lolium perenne</i>	Masa 1000 semena 1000-seed mass	3,05	3,21	3,32	3,17	3,16	3,06	3,18
	Vlaga semena Moisture content	11,9	11,7	11,5	11,8	12,2	2,19	11,8
<i>Lolium multiflorum</i>	Masa 1000 semena 1000-seed mass	2,68	2,54	2,76	3,01	2,88	6,52	2,77
	Vlaga semena Moisture content	11,8	11,9	11,5	11,4	12,1	2,45	11,7
<i>Festuca rubra</i>	Masa 1000 semena 1000-seed mass	1,09	1,01	1,24	1,19	1,14	7,85	1,13
	Vlaga semena Moisture content	11,9	12,0	11,8	11,4	12,0	2,11	11,8
Prosek Average	Masa 1000 semena 1000-seed mass	2,27	2,25	2,44	2,46	2,39	4,10	2,36
	Vlaga semena Moisture content	11,9	11,9	11,6	11,5	12,1	2,08	11,8

trava po godinama kretalo se u intervalu od 11,4 do 12,2% (Tabela 5).

Na osnovu iznetih rezultata ispitivanja kvaliteta semena trava možemo zaključiti sledeće:

Čistoća semena u proseku za sve ispitivane trave iznosila je 98,6%, sa variranjem po godinama od 96,7 do 99,2%. Najveći deo primesa u semenu trava činile su inertne materije 0,9%. Prosečan udeo drugih vrsta bio je 0,3%, dok je udeo korova oko 0,1%. Najčešći korovi u semenu trava su *Amaranthus retroflexus* i *Chenopodium album*. Prosečna energija klijanja iznosila je 74%, a klijavost 83%. Učešće netipičnih ponika je samo 4%, dok je udeo nekljalog semena 13%. Kvalitet semena ispitivanih

trava u periodu od 2010. do 2014. godine je visok, odnosno vrednosti pokazatelja kvaliteta semena bile su iznad nivoa minimalnih vrednosti propisanih pravilnikom o kvalitetu semena. Setvom semena trava ovakvog kvaliteta uz optimalne agrotehničke mere i uslove sredine mogu se dobiti visoki prinosi.

ZAHVALNICA

Zahvaljujemo se Ministarstvu prosvete, nauke i tehnološkog razvoja RS na finansijskoj podršci prilikom izvođenja ovih istraživanja, Projekti TR 31018 i III 46007.

LITERATURA

Humphreys M., Boller B., Posselt U.K., Veronesi F., (2010): Ryegrasses, Fodder Crops and Amenity Grasses. Springer, 211-260.

ISTA (2008): International Rules for Seed Testing. International Seed Testing Association, Switzerland.

Poštić, D., Protić, R., Aleksić, G., Gavrilović, V., Živković S., Trkulja, N., Ivanović, Ž., (2010a): Ispitivanje kvaliteta semena ozime pšenice u periodu 2000-2005 godina, Zaštita bilja, IZBIS-Beograd, Vol. 61: 20-24.

Poštić, D., Momirović, N., Dolijanović, Ž., (2010b): Ocena kvaliteta semena paprike. Prvi međunaradni naučni simpozijum agronoma, Jahorina, Zbornik Rezimea: 405-410.

Poštić, D., N. Momirović, Z. Bročić, Ž. Dolijanović, N. Trkulja, N. Dolovac, Ž. Ivanović (2011): Ocena kvaliteta semena paradajza (*Lycopersicon esculentum* L.), Zbornik radova, PKB Institut Agroekonomik, Vol. 17: 131-135.

Pravilnik o kvalitetu semena poljoprivrednog bilja (1987), Službeni list SFRJ broj 47.

Radičević Z., Radenković T., Bojović J. (2008): Uticaj klimatskih faktora na promenu sastava korovske flore u Srbiji. Acta Herbologica, Vol. 17(1): 31-36.

Stanisavljević R., Dragičević V., Milenković J., Đukanović L., Đokić D., Terzić D., Dodig D., (2010a): Effects of the duration of after-ripening period on seed germinations and seedling size in three fescue species. Spanish Journal of Agricultural Research, 8(2): 454-459.

Stanisavljević R., Simić A., Sokolović D., (2010b): Seed production of perennial forage grasses in Serbia. Biotechnology in Animal Husbandry, Belgrade, 26(2): 159-172.

Stanisavljević R., Đokić D., Milenković J., Đukanović L., Stevović V., Simić A., Dodig D., (2011): Seed germination and seedling vigour of italian ryegrass, cocksfoot and timothy following harvest and storage. Cienc. Agrotec., Lavras, 35(6): 1141-1148.

(Primljeno: 23.05.2014.)
(Prihvaćeno: 20.06.2014.)

EXAMINATION QUALITY SEED PERENNIAL RYEGRASS, ITALIAN RYEGRASS AND RED FESCUE

DOBRIVOJ POŠTIĆ¹, NEBOJŠA MOMIROVIĆ², RADE STANISAVLJEVIĆ¹, RATIBOR ŠTRBANOVIĆ¹,
VELJKO GAVRILOVIĆ¹, GORAN ALEKSIĆ¹, LANA ĐUKANOVIĆ¹

¹Institute for Plant Protection and Environment, Belgrade, Serbia

²University of Belgrade, Faculty of Agriculture, Belgrade-Zemun, Serbia
e-mail: pdobrivoj@yahoo.com

SUMMARY

Examination is seed quality of perennial ryegrass (*Lolium perenne*), italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) and red fescue (*Festuca rubra*) during the five years 2010 – 2014. The average established seed purity was over 98.40%, with varying by year from 96.7% to 99.2%. The greatest part of the impurities was inert matter, which are varied over the years in the range from 0.0% to 2.30%. Presence of weed seeds by year varied in the range from 0.0% to 0.50%. In the seeds of the tested grasses dominate the weeds from the family *Asteraceae*, *Caryophyllaceae*, *Chenopodiaceae* and *Polygonaceae*. The most common weeds in the investigated grasses were *Amaranthus retroflexus* and *Chenopodium album*. Participation of other species by year ranged from 0.0% to 1.8%. Seed germination varied from 75 to 88%, the average was 83%. The number of abnormal seedlings was 4%, while the average number of ungerminated seeds was 13%.

Key words: Quality grass, seed purity, germination, weeds

(Received: 23.05.2014.)

(Accepted: 20.06.2014.)

MORFOLOŠKA I MOLEKULARNA IDENTIFIKACIJA *CERCOSPORA APII* NA CELERU U SRBIJI

ANJA MILOSAVLJEVIĆ¹, ERIKA PFAF DOLOVAC¹, MILANA MITROVIĆ¹, JELENA JOVIĆ¹,
IVO TOŠEVSKI¹, NATAŠA DUDUK², NENAD TRKULJA¹

¹Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Beograd

²Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Beograd

e-mail: anjamilosavljevic@yahoo.com

REZIME

C. apii predstavlja jednu od najštetnijih fitopatogenih gljiva celera. Tokom 2012. god na teritoriji Velikog Gradišta su prikupljeni uzorci celera sa karakterističnim simptomima pegavosti lista i njihova identifikacija je izvršena pomoću morfoloških i molekularnih metoda. Test patogenosti je obavljen na zdravim biljkama i svi ispitivani izolati prouzrokuju karakteristične simptome nakon inokulacije. Konidiofore iz stroma formiraju zbijene fascikule ili su pojedinačne, prave do blago zakrivljene, smeđe boje. Konidije su pojedinačne, hijalinske i septirane (5-13 septi), cilindrične do blago sužene na jednoj strani ili prave do blago zakrivljene i zatupaste na vrhu. U osnovi su zasečene, skoro kvadratnog oblika i stanjene. Amplifikovani su fragmenti očekivanih dužina za internal transcribed spacer (ITS1/ITS4), kalmodulin (CAL-228F/CAL2Rd) i histon (CYLH3F/CYLH3R) genima i dobijene sekvence su pokazale 100% identitet sa sekvencama *C. apii* u bazi gena.

Ključne reči: *Cercospora apii*, *Apium graveolens* var. *dulce*, identifikacija

UVOD

Celer (*Apium graveolens* var. *dulce*) pripada familiji *Apiaceae* koja obuhvata oko 300-450 rodova i preko 3500 vrsta (Constance, 1971; Downie, 2000). Familija obuhvata grupu začinskih i lekovitih biljnih vrsta koje se gaje širom sveta. Najznačajniji predstavnici su šargarepa (*Daucus carota*), celer (*Apium graveolens*), peršun (*Petroselinum crispum*), mirođija (*Anethum graveolens*), komorač (*Foeniculum vulgare*) (Koike, 2006). Celer je dvogodišnja biljka koja se gaji zbog hranljivog korena, sočnog lista i lisne drške. Proizvodi se širom sveta, a najviše u Americi (Nonnecke, 1989) dok se kod nas najviše gaji u istočnoj i južnoj Srbiji.

Jedno od najznačajnijih i najštetnijih oboljenja celera je pegavost lista koju prouzrokuje fitopatogena gljiva *Cercospora apii* Fresen., (Koike, 2007; Raid, 2003). Rod *Cercospora* obuhvata preko 650 vrsta od kojih je 281 takson bilo nemoguće identifikovati pa su oni svrstani u grupu *Cercospora apii*

sensu lato (Crous i Braun, 2003). Vrste koje pripadaju ovoj grupi su morfološki slične i izazivaju veoma slične simptome pegavosti biljaka. Pored fitopatogenih, ovoj grupi pripadaju i neke saprofitne vrste koji se razvijaju na nekrotiranom biljnom tkivu, kao i sekundarni patogeni koji prodiru u biljno tkivo nakon ulaska drugih patogena, što kompleks *C. apii* s.l. čini taksonomski nestabilnim (Crous and Braun, 2003). S obzirom da morfološka identifikacija do nivoa vrste u okviru roda *Cercospora* nije pouzdan taksonomski kriterijum, razvojem savremene molekularne metodologije, istraživanja su orjentisana na iznalaženje genskih markera za identifikaciju i detekciju ovih vrsta. Analizom sekvenci ITS regiona (internal transcribed spacer), različiti autori su utvrdili da ovaj marker nije pogodan za identifikaciju bliskih vrsta unutar roda *Cercospora* (Stewart et al., 1999; Goodwin et al. 2001; Taylor et al., 2003). U cilju pronalaženja odgovarajućeg genetičkog markera Groenewald et al. (2005) su pored ITS regiona analizirali i nekoliko drugih gena: aktin (ACT), fak-

tor elongacije (EF), kalmodulin (CAL) i histon (H3).

Simptomi koje prouzrokuje *C. apii* prvi put su zabeleženi sredinom 19. veka u zapadnoj Evropi (Fresenius, 1863), a potom je prisustvo ovog patogena utvrđeno u svim područjima gde se celer gaji (Raid and Sui, 2012). Danas pegavost lista celera predstavlja ozbiljan problem u proizvodnji ove važne začinske biljke (Kucharek, 2004). Štete nastale od ove bolesti mogu u pojedinim zemljama dostići i 100%, što je zabeleženo na Floridi (Berger, 1973; Sherf and MacNab, 1986).

S obzirom da je u Srbiji takođe konstatovan veoma visok intenzitet zaraze, na nekim lokalitetima i 80% (Milosavljević et al., 2014), cilj ovog rada bio je identifikacija uzročnika pegavosti celera pomoću morfoloških i molekularnih metoda u cilju potvrde njegovog prisustva u Srbiji.

MATERIJAL I METODE

Uzorkovanje i izolacija

Tokom avgusta i septembra 2012. godine, prilikom pregleda useva celera u okolini Velikog Gradišta uočene su biljke sa simptomima karakterističnim za *C. apii*. Uzorci stabla i lišća sa biljaka zahvaćenih pegavošću pakovani su u papirne kese i u ručnom frižideru transporovani do laboratorije Instituta za zaštitu bilja u cilju izolacije patogena. Monosporijalna izolacija je izvršena direktno sa simptomatičnog lišća celera (Gams et al., 1988) u Petri kutije sa krompir-dekstroznim agarom (KDA), (Dhingra and Sinclair, 1986). Kulture su postavljene u termostat na temperaturu od 25°C, bez svetlosti u trajanju od 2-5 dana. Novoformirana micelija je presejana na novu KDA podlogu i ovakve kulture čuvane su na 25°C, u mraku u trajanju od 14 dana. Reprezentativni monosporijalni izolati su dalje korišćeni u cilju morfološke i molekularne identifikacije patogena (Crous and Braun, 2003). Izolati koji su dobijeni se čuvaju presejavanjem na epruvete sa zakošenom KDA podlogom u frižideru na temperaturi od 4°C.

Provera patogenosti

Patogenost izolata ispitivna je na zdravim, dve nedelje starim biljkama celera sorte Yuta. Na svakoj biljci su odabrana po tri lista, koja su najpre dezinfikovana 70% etanolom. Epidermis svakog lista je zagreban sterilnom iglom radi pospešivanja infekcije i nakon toga inokulisan. Isečci micelije patogena sa KDA podlogom (Ø5 mm) postavljeni su na površinu lista celera. Kontrolne biljke su inokulisane

isečcima čistog KDA mediuma. Ukupno 12 biljka je inokulisano isečcima sa micelijom izolata, dok je 12 biljaka iskorišćeno kao kontrola. Sve biljke su čuvane u vlažnoj komori 48 h, a zatim su prenete u staklenik na 20°C (Milosavljević et al., 2014). Nakon dve nedelje pojavili su se prvi simptomi, nakon čega je patogen reizolovan radi potvrđivanja Kohovih postulata.

Morfološke karakteristike

Ispitivanjem morfoloških karakteristika izolata sa celera obrađene su i proučene mikroskopske osobine. Mikroskopski preparati pripremani su tako što je na predmetno staklo naneta kap vode, a zatim su u nju preneseni fragmenti micelije i konidiofora sa konidijama direktno sa pege na zaraženoj biljci. Materijal je nakon toga prekriven pokrovnom ljusticom i odmah se pristupalo mikroskopiranju (Olympus BX51). Pri mikroskopiranju su određivane veličina, dužina, boja, oblik konidija i konidiofora (Crous and Braun, 2003).

DNA ekstrakcija, amplifikacija i sekvencioniranje

Tri izolata CAC4-1, CAC-24 i CAC-30 odabrana su za molekularnu identifikaciju vrste. Izolati su gajeni na KDA podlozi na 25°C u mraku. Pomoću sterilne igle sa površine kulture stare 14 dana uzeto je 100 mg micelije svakog izolata, a potom je ona zamrznuta pomoću tečnog azota i usitnjena u sterilnim tubicama pomoću mikrotučka. DNK je zatim ekstrahovana pomoću DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) prema uputstvu proizvođača i čuva se na -20°C.

U cilju molekularne identifikacije korištena su tri različita para prajmera koji umnozavaju tri genska regiona; ITS1/ITS4 (ITS region) (White et al., 1990), CAL-228F/CAL2Rd (calmodulin gen) (Carbone and Kohn, 1999; Groenewald, 2013) i CYLH3F/CYLH3R (histon H3 gen) (Crous et al., 2004).

Vizuelizacija umnoženih produkata PCR reakcije (lančana reakcija polimeraze) obavljena je elektroforetskim razdvajanjem nukleinskih kiselina u 1% agaroznom gelu u 1x TBE puferu, bojenjem etidijumbromidom i posmatranjem pod UV-transiluminatorom. Elektroforeza je obavljena pri konstantnoj struji od 40 mA u trajanju od približno 40 min u aparatu za elektroforezu (BluePower 500, Serva electrophoresis GmbH, UK). Za određivanje veličine amplifikovanih produkata PCR korišćen je marker MassRuler™ DNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences GmbH, Lithuania). Pozitivnom reakcijom smatrana je pojava traka očekivanih veličina

za određeni par prajmera koja je unapred poznata.

Svi amplifikovani produkti su prečišćeni pomoću komercijalnog QIAquick PCR purification kit (QIAGEN) prema uputstvu proizvođača. Sekvenciranje je urađeno na automatskom kapilarnom sekvencionatoru u Macrogenu (Seul, Južna Koreja) koristeći iste prajmere kao i za umnožavanje gena.

Za prevođenje sekvenci korišćen je program FinchTV v.1.4.0. Sekvence su ručno poravnate u MEGA 5.0 softveru pomoću *ClustalW* programa (Tamura et al., 2011). DNK sekvence svih izolata u okviru jednog regiona (ITS, CAL ili H3) su uporedene kako međusobno tako i sa dostupnim sekvenca-

ma u NCBI bazi podataka za određeni region i vrstu. Sekvence su zatim deponovane u banci gena pod šiframa od KJ210596 do KJ210604.

REZULTATI

Simptomi bolesti

Simptomi se prvo javljaju na listu u vidu sitnih žućkastih pega koje se brzo razvijaju u kružne sivo-smeđe pege. Lezije se vremenom povećavaju i spajaju i praćene su pojavom nekrotičnih zona koje dovode do slabljenja celokupne biljke (Slika 1).



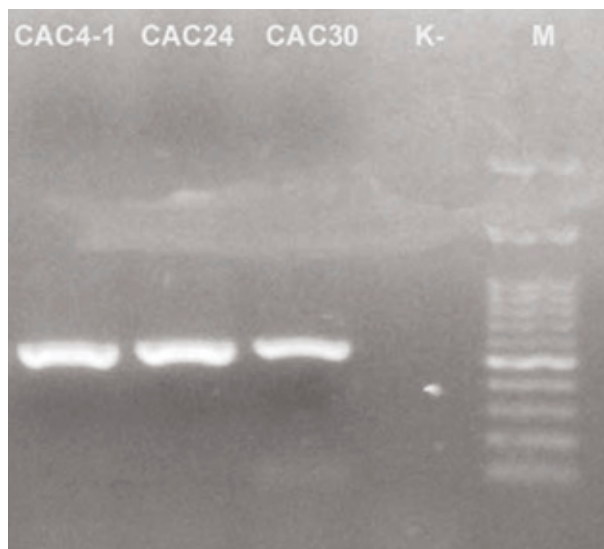
Slika 1. Simptomi *C. apii* na celeru u polju.
Figure 1. Symptoms of *C. apii* on celery in the field.



Slika 2. Lezije na peteljckama celera.
Figure 2. Lesions on the stalk of celery.

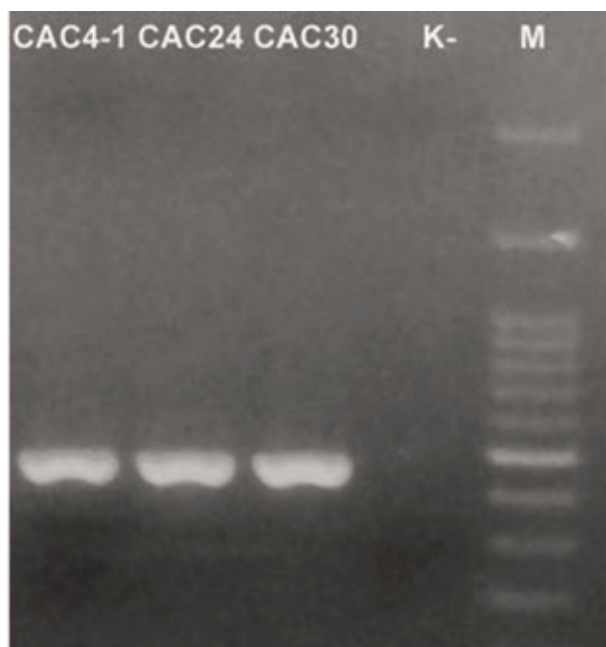


Slika 3. Izgled konidiofora i konidija *C. apii*.
Figure 3. Conidiophores and conidia of *C. apii*.



Slika 4. Amplifikacija DNK fragmenta *C. apii* izolata sa celera parom prajmera ITS1/ITS4. Uzorci sa celera - CAC4-1, CAC24 i CAC30; negativna kontrola - K-; marker - M.

Figure 4. Amplification of DNA fragment of *C. apii* isolates from celery with ITS1/ITS4 pair of primers. Isolates - CAC4-1, CAC24 and CAC30; negative control - K; marker - M.



Slika 5. Amplifikacija DNK fragmenta *C. apii* izolata sa celera parom prajmera CAL-228F/CAL2Rd. Uzorci sa celera - CAC4-1, CAC24 i CAC30; negativna kontrola - K-; marker - M.

Figure 5. Amplification of DNA fragment of *C. apii* isolates from celery with CAL-228F/CAL2Rd pair of primers. Isolates - CAC4-1, CAC24 and CAC30; negative control - K; marker - M.

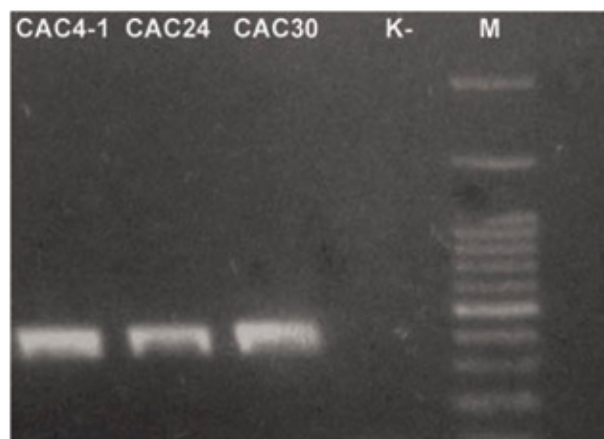
Kada su uslovi povoljni za sporulaciju, lezije poprimaju beličastu boju. Spore se dalje lako raznose vetrom i doprinose brzom širenju bolesti. Patogen takođe zahvata i peteljku gde su lezije žuto-mrke boje i blago ulegnute i izdužene (Slika 2).

Provera patogenosti

Svi izolati su na test biljkama prouzrokovali karakteristične simptome, slične onima u polju. Simptomi su se pojavljivali u vidu pegavosti lista nakon dve nedelje. Kohovi postulati su potvrđeni postupkom reizolacije patogena iz inokuliranih biljaka. Oblik i veličina konidiofora i konidija su se kretali u istim intervalima u oba testa. Na kontrolnim test biljkama nije došlo do pojave simptoma bolesti.

Morfološke karakteristike

Konidiofore koje izbijaju iz stroma i formiraju zbijene fascikule, ponekada se pojavljuju pojedinačno. Prave su do blago zakrivljene, pri osnovi su smeđe boje, pri vrhu svetlije. Dimenzije konidiofora su se kretale u opsegu 40-90 × 5-8 μm. Konidije su



Slika 6. Amplifikacija DNK fragmenta *C. apii* izolata sa celera parom prajmera CYLH3F/CYLH3R. Uzorci sa celera - CAC4-1, CAC24 i CAC30; negativna kontrola - K-; marker - M.

Figure 6. Amplification of DNA fragment of *C. apii* isolates from celery with CYLH3F/CYLH3R pair of primers. Isolates - CAC4-1, CAC24 and CAC30; negative control - K; marker - M.

pojedinačne, hijalinske i septirane, sa 5-13 poprečnih septi, veličine 45-160 × 4-5 μm. Po obliku mogu biti cilindrične do blago sužene na jednoj strani, ili prave do blago zakrivljene i zatupaste na vrhu. U osnovi su zasečene, skoro kvadratnog oblika i stanjene (Slika 3).

Molekularna identifikacija

Amplifikovani su fragmenti očekivanih dužina za internal transcribed spacer (ITS1/ITS4), kalmodulin (CAL-228F/CAL2Rd) i histon (CYLH3F/CYLH3R) gene (Slike 4, 5 i 6). Negativne kontrole nisu dale amplifikaciju.

Nakon sekvencioniranja PCR produkata tri odabrana izolata dobijene su sekvence delova gena koje su prijavljene u GenBank bazu podataka, svaka pod određenim pristupnim brojem (KJ210596 sve do KJ210604). Blast analiza ITS sekvenci pokazala je 100% identitet sa nekoliko vrsta roda *Cercospora* (*C. apii* (Acc. No. JX143532), *C. beticola* (JX143556), *C. zebrina* (KC172066)). Sekvence dobijene pomoću CAL i H3 su pokazale 100% identitet samo sa sekvencama *C. apii* koje su u bazi deponovane pod rednim brojevima JX142794 i JX142548.

DISKUSIJA

Pegavost lista celera koju prouzrokuje fitopatogena gljiva *C. apii* primećena je tokom obilaska polja celera u okolini Velikog Gradišta 2012. godine. Prisustvo fitopatogene gljive *C. apii* prvi put je potvrđeno na području Srbije 2014. godine. (Milosavljević et al., 2014). U ovom radu prikazana je metodologija korišćena za identifikaciju vrste *C. apii* pomoću morfoloških karaktera i molekularnih markera.

Morfološki veoma slične vrste roda *Cercospora* Crous and Braun (2003), su izdvojili u zasebnu grupu *Cercospora apii* s. l., jer nije bila moguća njihova pouzdana morfološka identifikacija. U ovom istraživanju morfološkom identifikacijom izolata sa biljaka celera, zasnovanoj na mikroskopskim karakteristikama (dimenzije i izgled konidiofora i konidija), zaključeno je da se radi o *C. apii*. Fresen. Izolati *C. apii* sa celera su se pokazali patogenim na test biljkama nakon čega su i reizolovani, čime su potvrđeni Kohovi postulati. Morfološke mikroskopske osobine izolata, uzetih direktno sa biljaka iz polja kao i sa biljaka u testu, ne pokazuju razliku, što potvrđuje da patogen ne gubi na sposobnosti infekcije u testu *in vivo*. Simptomi na inokulisanim test biljkama su identični simptomima koji su prisutni na biljkama u polju.

Pre razvoja savremenih metoda istraživanja, identifikacija vrsta iz roda *Cercospora* se zasnivala na produkciji toksina cercosporina, specifičnosti prema biljci domaćinu i morfološkim karakteristikama (Chupp, 1954; Ellis, 1971; Fajola, 1978). Međutim, navedene karakteristike ne mogu biti pouzdan taksonomski karakter za determinaciju vrsta roda *Cercospora*, jer su varijabilne (Jenns et al., 1989), a izgled i veličina konidija i kondiofora su veoma slične za mnoge vrste roda *Cercospora* (Welles, 1933). Pored toga, mnoge vrste ovog roda mogu kolonizirati tkiva primarno parazitirana od strane drugih vrsta, pri čemu se mogu izolovati sa atipičnih biljaka domaćina (Berger and Hanson, 1963; Groenewald et al., 2005; Groenewald et al., 2006). Ovakvi nalazi su ukazali

da identifikacija vrsta u okviru roda *Cercospora* ipak nije moguća samo klasičnim metodama na osnovu morfoloških karakteristika, već je iziskivala nove metode. Razvojem nauke u primenu se uvode nove molekularne metode putem analiza različitih genskih markera u cilju pronalaženja pouzdanog metoda identifikacije do nivoa vrste. Analiza sekvenci ITS, CAL i H3 gena korišćenih u ovom istraživanju, izabrana je kao metod za potvrdu identifikacije *C. apii* (White et al., 1990; Carbone and Kohn, 1999; Groenewald, 2013, Crous et al., 2004). Na osnovu BLAST analize sekvenci ITS regiona utvrđeno je da izolati sa celera pokazuju 100% identitet sa više vrsta iz roda *Cercospora* i to sa *C. apii* (JX143532), *C. beticola* (JX143556), *C. zebrina* (KC172066). Sekvenciniranjem nekoliko konzervativnih regiona (ITS, ACT, EF, CAL i H3), u cilju određivanja adekvatnog genetičkog markera za identifikaciju bliskih vrsta roda *Cercospora*, Groenewald et al. (2005) su utvrdili da su vrste *C. apii*, *C. apicola* i *C. beticola* veoma slične i da u sekvencama ITS, ACT, EF, i H3 gena nema razlika značajnih za diferencijaciju na nivou vrste. ITS region nije dovoljno specifičan za identifikaciju, što jasno ukazuje da vrste koje pripadaju kompleksu *C. apii* s. l. pored morfološke imaju i visok stepen sličnosti i na molekularnom nivou (Goodwin et al., 2001). Analizom fragmenata ITS gena utvrđeno je da patogen pripada rodu *Cercospora* spp., ali nije utvrđena i vrsta. Ovo potvrđuje tezu da je ITS region nespecifičan za precizno određivanje vrsta unutar roda *Cercospora*. Analizom CAL i H3 gena utvrđen je 100% identitet samo sa sekvencama *C. apii* depozitiranim u bazi gena (JX142794 i JX142548) (Milosavljević et al., 2014).

Na osnovu sveobuhvatnih morfoloških i molekularnih analiza, patogen – prouzročivač pegavosti lista celera identifikovan je kao *C. apii*.

ZAHVALNICA

Istraživanja su realizovana u okviru projekta TR31018 Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

LITERATURA

- Berger, R.D., and Hanson, E.W. (1963): Pathogeny, host-parasite relationship, and morphology of some forage legume *Cercosporae*, and factors related to disease development. *Phytopathology*, 53: 500-508.
- Berger, R.D. (1973): Early blight of celery: Analysis of disease spread in Florida. *Phytopathology*, 63: 1161-1165.
- Berger, R.D. (1973): Disease progress of *Cercospora apii* resistant to benomyl. *Plant Dis. Repr.*, 57: 837-840.
- Carbone, I. I., and Kohn, L.M. (1999): A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia*, 91: 553-556.
- Chupp, C. (1954): A monograph of the fungus genus *Cercospora*. Itacha, New York. Constance, L. (1971): History of the classification of *Umbelliferae* (*Apiaceae*). Heywood, V.H. Šed.Č. The biology and chemistry of the *Umbelliferae*, 1-11. Academic Press, London.
- Crous, P.W., and Braun, U. (2003): *Mycosphaerella* and its anamorphs: 1. Names published in *Cercospora* and *Passalora*. CBS Biodiversity Series, 1: 1-571.
- Crous P.W., Groenewald J.Z., Risède J.M., Simoneau P., Hywel-Jones N.L. (2004): *Calonectria* species and their *Cylindrocladium* anamorphs: species with sphaeropedunculate vesicles. *Studies in Mycology*, 50: 415-430.
- Dhingra, O.D., and Sinclair, J.B. (1986): Basic plant pathology methods. 3.ed. Boca Raton: CRC Press. pp. 119-178: Establishment of disease and testing for resistance.
- Downie, S.R., D.S. Katz-Downie, M.F. Watson (2000): A phylogeni of the flowering plant family *Apiaceae* based on chloroplast DNA *rpl16* and *rpoC1* intron sequences: towards a suprageneric classification of subfamily *Apioideae*. *American Jurnal of Botany*, 87: 273-292.
- Ellis, M.B. (1971): *Dematiaceous Hyphomycetes*. CABI Bioscience, Egham, Surrey, U.K.
- Fajola, A.O. (1978): Cultural studies in *Cercospora* taxonomy: I. Interrelationship between some species from Nigeria. *Nova Hedwigia*, 29: 912-921.
- Fresenius, G. (1863): *Beitrag zur Mykologie* 3. Heinrich Ludwig Brommer Verlag, Frankfurt, Germany.
- Gams, W., Hoekstra, E.S. i Aproot, A. (1998): CBS Course of Mycology, 4th ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, The Netherlands.
- Goodwin, S.B., Dunkley, L.D., Zismann, V.L. (2001): Phylogenetic analysis of *Cercospora* and *Mycosphaerella* based on the internal transcribed spacer region of ribosomal DNA. *Phytopathology*, 91: 648-658.
- Groenewald, M., Groenewald, J.Z., Braun, U., Crous, P.W. (2005): Distinct species exist within the *Cercospora apii* morphotype. *Phytopathology*, 95: 951-959.
- Groenewald, M., Groenewald, J.Z., Braun, U., Crous, P.W. (2006): Host range of *Cercospora apii* and *C. beticola* and description of *C. apicola*, a novel species from celery. *Mycologia*, 98: 275-285.
- Groenewald, J.Z., Nakashima, C., Nishikawa, J., Shin, H-D., Park, J-H., Jama, A-N., Groenewald, M., Braun, U., P.W. Crous (2013): Species concepts in *Cercospora*: spotting the weeds among the roses. *Studies in Mycology*, 75: 115-170.
- Jenns, A.E., Daub, M.E., Upchruch, R.G. (1989): Regulation of cercosporin accumulation in culture by medium and temperature manipulation. *Phytopathology*, 79: 213-219.

- Koike, S.T., Gladders, P., Paulus, A.O. (2006): *Vegetable diseases: A color handbook*. Boston: Academic Press.
- Koike, S.T., Gladders, P., Paulus, A. (2007): *Vegetable diseases: A color handbook*. Academic press, Burlington, MA.
- Kucharek, T. (2004): *Florida Plant Disease Management Guide: Carot*. 2004 Florida Plant Disease Management Guide. University of Florida Institute of Food and Agricultural Sciences. Online publication PDMG-V3-35.
- Milosavljević, A., Pfaf-Dolovac, E. Mitrovic, M., Jovic, J., Tosevski, I., Duduk, N., Trkulja, N. (2014): First report of *Cercospora apii* causal agent of *Cercospora* early blight of celery in Serbia. *Plant Disease*. Accepted for publication. Posted online on 13 Mar 2014.
- Nonnecke, I.L. (1989): *Vegetable production*. New York: Van Nostrand Reinhold.
- Raid, R.N. (2003): Early blight of celery. P.20-21. In: R.M. Davis and R.N. Raid (eds.). *Compendium of umbelliferous crop diseases*. APS Press. St. Paul, MN.
- Raid, R.N., and Sui, D.D. (2012): Management of Celery Early Blight Using Low-risk Chemistries. *Proc. Fla. State Hort. Soc.*, 125: 222-225.
- Sherf, A.F., and Mac.Nab, A.A. (1986): *Cercospora blight*. *Vegetable diseases and their control*. 2nd edition. John Wiley & Sons, New York. pp.,162-166.
- Stewart, E. L., Liu, Z., Crous, P.W., Szabo, L.J. (1999): Phylogenetic relationships among some cercosporoid anamorphs of *Mycosphaerella* based on rDNA sequence analysis. *Mycological Research*, 103: 1491-1499.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. (2011): MEGA 5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28: 2731-2739.
- Taylor, J.E., Groenwald, J.Z., Crous, P.W. (2003): A Phylogenetic analysis of *Mycosphaerellaceae* leaf spot pathogens of *Proteaceae*. *Mycological Research*, 107: 653-658.
- Welles, C.G. (1933): Taxonomic studies on the genus *Cercospora* in the Phillipine Islands. *American Journal of Botany*, 12: 195-218.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. , Taylor, J. (1990): Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Chapter 38. Pages 315-322. In: *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications* (M. Innis, D. Gelfand, J. Sninsky and T. White, eds.). Academic Press, Orlando, Florida.

(Priljeno: 04.06.2014.)
(Prihvaćeno: 08.07.2014.)

MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR IDENTIFICATION OF *CERCOSPORA APII* ON CELERY IN SERBIA

ANJA MILOSAVLJEVIĆ¹, ERIKA PFAF DOLOVAC¹, MILANA MITROVIĆ¹,
JELENA JOVIĆ¹, IVO TOŠEVSKI¹, NATAŠA DUDUK², NENAD TRKULJA¹

¹Institut for Plant Protection and Environment, Belgrade

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

SUMMARY

C. apii is one of the most damaging plant pathogenic fungi of celery. During the 2012, samples of celery with typical symptoms of leaf blight were collected on the territory of Veliko Grdaište and their identification is performed using morphological and molecular methods. The pathogenicity test was conducted on healthy plants and all tested isolates caused typical symptoms after inoculation. Conidiophores arising from the stromata formed dense fascicles or single, straight to slightly curved, brown. Conidia are solitary, hyaline and septate (5-13 septa), cylindrical to obclavate, or straight to slightly curved, obtuse at the apex. Truncated and thickened at the base. Fragments of the expected length for the internal transcribed spacer (ITS1/ITS4), calmodulin (CAL-228F/CAL2Rd) and histone (CYLH3F/CYLH3R) gene were amplified and the obtained sequences showed 100% identity with the *C. apii* sequences deposited in GenBank.

Key words: *Cercospora apii*, *Apium graveolens* var. *dulce*, identification

(Received: 04.06.2014.)

(Accepted: 08.07.2014.)

ZASTUPLJENOST KOROVA U NATURALNOM SEMENU LUCERKE

RATIBOR ŠTRBANOVIĆ¹, DOBRIVOJ POŠTIĆ¹, RADE STANISAVLJEVIĆ¹,
LANA ĐUKANOVIĆ¹, ŽARKO IVANOVIĆ¹, TANJA VASIĆ², NENAD DOLOVAC¹

¹Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Beograd

²Institut za krmno bilje, Kruševac

e-mail: ratibor.strbanovic@yahoo.com

REZIME

U ovom radu ispitivana je zastupljenost semena različitih korovskih vrsta u naturalnom semenu različitih sorata lucerke sa različitih lokaliteta. Kod svih ispitivanih sorti lucerke i na svim lokalitetima identifikavano je 25 različitih vrsta korova, od toga 14 vrsta su bili višegodišnji korovi, dok su ostalih 11 bile jednogodišnje korovske vrste. Od opasnih višegodišnjih korova koji se razmnožavaju generativnim i vegetativnim putem identifikovani su (*Sorghum halepense* i *Cirsium arvense*). Najveći broj semena korova imala je jednogodišnja vrsta *Picris echioides* L. kod sorte K-22 na lokalitetu Ratari (446). Takođe veliki broj semena utvrđen je i kod višegodišnje vrste *Cichorium intybus* L. i to kod svih ispitivanih sorata lucerke. Najmanji broj semena utvrđen je kod vrste *Rumex* sp. (četiri semena) i to jedino kod sorte NS-Mediana na lokalitetu Bačko Gradište I, kao i kod vrste *Conium maculatum* (sedam semena) samo kod sorte K-28 na lokalitetu Banatsko Karađorđevo. Najviše prisutnih korovskih vrsta (devet) utvrđeno je kod sorte lucerke NS-Mediana na lokalitetu Bačko Gradište I, dok je najmanji broj korovskih vrsta (dve) konstatovan kod sorte Banjalučanka na lokalitetu Kozarska Dubica.

Ključne reči: lucerka, korovi, seme, sorta, lokalitet

UVOD

Plava lucerka (*Medicago sativa* L.) jedna je od najstarijih krmnih biljnih vrsta i bila je poznata još pre 8000 godina. Vodi poreklo sa teritorije današnjeg Irana i Arabije, mada se vrste roda *Medicago* mogu naći po celoj Aziji (Michaud et al., 1988). U svetu se gaji na površini od 33 miliona hektara, a u Srbiji je zastupljena na površini od oko 190.000 hektara (Štrbanović, 2010). Areal gajenja lucerke je na svim kontinentima u više od 80 zemalja, od umereno hladnog do tropskog pojasa. Široka geografska rasprostranjenost lucerke uslovljena je njenom velikom adaptabilnošću na različite klimatske i zemljišne uslove (Julier et al., 1995).

Lucerka je, posle kukuruza, najvažnija krmna vrsta u našoj zemlji, zahvaljujući ne samo povoljnom hemijskom sastavu i visokom sadržaju proteina, već i visokim prinosima i veoma dobrim biološkim osobinama. U ishrani domaćih životinja

može se koristiti kao zelena masa, seno ili konzervisana u kombinaciji sa drugim krmnim biljkama (Đorđević i Dinić, 2007).

Korovi mogu znatno uticati na smanjenje kvaliteta prinosa gajenih biljaka. Sadržaj semena nekih korovskih biljaka u žetvenom prinosu pšenice dovodi do promene kvaliteta brašna i umanjuje njegove upotrebne vrednosti. Tako, na primer, sadržaj semena kukolja (*Agrostemma githago* L.), ili ljulja (*Lolium temulentum* L.), u količini od svega 0,5% u žitu dovodi do toga da brašno postaje otrovno i može izazvati veoma štetne posledice, čak i sa smrtonosnim ishodom kod ljudi koji koriste hleb od takvog brašna. Seme kokotca (*Melilotus officinalis* (L.) Pall.) daje brašnu neprijatan miris. Korovske biljke prirodnih i veštačkih (sejanih) livada smanjuju kvalitet sena. Otrovnost vrste, ako su masovno zastupljene, mogu dovesti do toga seno postane neupotrebljivo za ishranu stoke (Kojić i Janjić, 1994).

Na smanjenje prinosa lucerke pored in-

sekata i drugih štetočina, kao i prouzrokovala biljnih bolesti, utiču i korovi. Osnovno štetno delovanje korova odražava se kroz konkurentnost za vodu, hranljive materije i svetlost. Korovi su uglavnom male hranljive vrednosti, neprijatnog mirisa i ukusa a utiču i na pogoršanje kvaliteta semena lucerke. Od ekonomskog značaja se, prvenstveno, izdvajaju višegodišnje vrste korova, kao što su: *Cirsium arvense* (L.) Scop., *Sorghum halepense* (L.) Pers., *Convolvulus arvensis* L. i vrste iz roda *Cuscuta* sp. (Konstantinović i sar., 2004).

Pri kombajniranju semenske lucerke materijal koji se dobija predstavlja mešavinu semena gajene biljke, semena drugih i korovskih biljaka, kao i razne nečistoće organskog i neorganskog porekla. Gubici semena lucerke pri doradi su u direktnoj zavisnosti od vrste i količine korova i ostalih nečistoća, organskog i neorganskog porekla prisutnih u naturalnom semenu. Ukoliko je procenat nečistoća i korova u naturalnom semenu veći, utoliko je i sam tehnološki proces dorade duži, što povećava utrošak energije, a samim tim i cenu koštanja doradenog semena. Naročito je štetan veliki sadržaj semena viline kosice (*Cuscuta* sp.) koja je po veličini slična lucerki i otežava čišćenje i odvajanje kada se izmeša sa semenom lucerke. Iz tih razloga dorada semena zahteva skupu opremu i veliki utrošak rada za odstranjivanje semena korova (Đokić i sar., 2011). Korovi u semenskom usevu lucerke otežavaju žetvu, kontaminiraju seme i otežavaju proces dorade. Da bi se sprečila pojava štetnih korova u usevu mora se delovati preventivno, odnosno izbegavanjem same

pojave korova i njihovo suzbijanje u početnim stadijumima rasta korovskih biljaka (Miladinović, 2001).

Ispitivanja obuhvaćena ovim radom imaju za cilj utvrđivanje zastupljenosti semena korovskih biljnih vrsta u naturalnom semenu različitih sorata lucerke sa različitih lokaliteta.

MATERIJAL I METODE

U cilju realizacije ovog oglada istraživanje je obavljeno u akreditovanoj laboratoriji za ispitivanje kvaliteta semena i sadnog materijala Instituta za zaštitu bilja i životnu sredinu u Beogradu. U usevu lucerke primenjene su standardne agrotehničke mere, žetva semena svih sorata lucerke obavljena je u drugom otkosu tokom avgusta meseca 2013. godine, a seme lucerke čuvano je u papirnim kesama i kontrolisanim uslovima temperature i relativne vlažnosti vazduha tj. u komori za skladištenje i čuvanje semena. Materijal koji se koristi u ovom istraživanju je naturalno seme pet različitih sorata lucerke, gde je svaka sorta bila zastupljena na tri različita lokaliteta (Tabela 1.). Nakon toga je iz naturalnog semena svih sorata lucerke sa svih lokaliteta formiran prosečni uzorak mase 50 g. gde je utvrđena biološka čistoća, odnosno prisustvo semena drugih biljnih vrsta i semena korova, prema pravilniku o kvalitetu semena poljoprivrednog bilja „Službeni list SFRJ“ br. 47/87 Republike Srbije. Rezultati istraživanja biće prikazani brojem nađenih semena korova kod svih sorata lucerke i na svim lokalitetima.

Tabela 1. Ispitivane sorte i lokaliteti lucerke.
Table 1. The tested cultivars and sites alfalfa.

Sorta (Cultivar)	Poreklo (Origin)	Lokaliteti (Sites)	
K-28	Srbija (Serbia)	Banatsko Karadordevo	45°34'19.70" N; 20°34'31.28" E
		Ratari	44°21'05.92" N; 20°51'03.35" E
		Niš	43°18'02.94" N; 21°58'11.86" E
K-22	Srbija (Serbia)	Osipaonica	44°32'35.81" N; 21°03'58.98" E
		Ratari	44°22'15.74" N; 20°47'56.21" E
		Aleksandrovo	45°38'52.34" N; 20°38'39.62" E
NS-Mediana	Srbija (Serbia)	Vršac	45°04'12.22" N; 21°33'38.96" E
		Bačko Gradište I	45°31'54.66" N; 20°02'04.09" E
		Bačko Gradište II	45°32'53.23" N; 20°00'34.35" E
Banjalučanka	Republika Srpska (Republic of Srpska)	Maglajani	44°57'00.38" N; 17°20'53.29" E
		Banjaluka	44°40'24.21" N; 17°34'44.69" E
		Kozarska Dubica	45°11'04.30" N; 16°48'23.97" E
OS-88	Hrvatska (Croatia)	Osijek I	45°32'27.89" N; 18°48'20.64" E
		Osijek II	45°31'01.11" N; 18°42'53.79" E
		Istra (Novi Grad)	45°20'46.64" N; 13°33'15.35" E

Tabela 2 . Korovi u naturalnom semenu lucerke.
Table 2. Weeds in natural alfalfa seeds.

Sorta (Cultivar)	Lokalitet (Locality)	Korovi (Weeds)	Broj semena (Number of seeds)
K - 28	Banatsko Karadordevo	<i>Lolium perenne</i> L.	13
		<i>Festuca rubra</i> L.	10
		<i>Sorghum halepense</i> (L.) Pers.	9
		<i>Conium maculatum</i> L.	7
		<i>Bilderdykia convolvulus</i> (L.) Dumort	19
		<i>Crepis setosa</i> Haller f.	142
		<i>Lactuca serriola</i> L.	43
	Ratari	<i>Cichorium intybus</i> L.	153
		<i>Silene cucubalus</i> Wibel	23
<i>Picris echioides</i> L.		326	
<i>Crepis setosa</i> Haller f.		19	
Niš	<i>Lolium perenne</i> L.	43	
	<i>Phleum pratense</i> L.	32	
	<i>Plantago lanceolata</i> L.	35	
	<i>Myosotis arvensis</i> (L.) Hill	42	
	<i>Picris echioides</i> L.	19	
	<i>Crepis setosa</i> Haller f.	38	
	<i>Lactuca serriola</i> L.	18	
K - 22	Osipaonica	<i>Lolium perenne</i> L.	41
		<i>Sorghum halepense</i> (L.) Pers.	17
		<i>Cichorium intybus</i> L.	19
		<i>Arctium lappa</i> L.	14
		<i>Amaranthus retroflexus</i> L.	81
	Ratari	<i>Silene dioica</i> (L.) Clairv.	21
		<i>Silene cucubalus</i> Wibel	20
		<i>Picris echioides</i> L.	446
		<i>Cichorium intybus</i> L.	113
Aleksandrovo	<i>Lolium perenne</i> L.	16	
	<i>Picris echioides</i> L.	82	
	<i>Crepis setosa</i> Haller f.	157	
NS – Mediana	Vršac	<i>Amaranthus retroflexus</i> L.	32
		<i>Chenopodium album</i> L.	2
		<i>Silene dioica</i> (L.) Clairv.	2
		<i>Matricaria inodora</i> L.	3
		<i>Cichorium intybus</i> L.	2
		<i>Picris echioides</i> L.	166
	Bačko Gradište I	<i>Amaranthus retroflexus</i> L.	19
		<i>Chenopodium album</i> L.	12
		<i>Chenopodium hybridum</i> L.	33
		<i>Setaria viridis</i> (L.) P.Beauv.	32
		<i>Sorghum halepense</i> (L.) Pers.	16
		<i>Cichorium intybus</i> L.	23
<i>Polygonum aviculare</i> L.		35	
<i>Rumex</i> sp.	4		
<i>Calystegia sepium</i> (L.) Scop.	5		
Bačko Gradište II	<i>Amaranthus retroflexus</i> L.	22	
	<i>Chenopodium album</i> L.	13	
	<i>Chenopodium hibridum</i> L.	34	
	<i>Setaria viridis</i> (L.) P.Beauv.	9	
	<i>Sorghum halepense</i> (L.) Pers.	34	
	<i>Cichorium intybus</i> L.	16	
	<i>Picris echioides</i> L.	3	
<i>Polygonum aviculare</i> L.	16		
Banjalučanka	Maglajani	<i>Lolium perenne</i> L.	91
		<i>Silene dioica</i> (L.) Clairv.	135
		<i>Chenopodium album</i> L.	13
		<i>Amaranthus retroflexus</i> L.	16
	Banjaluka	<i>Apera spica-venti</i> (L.) P. Beauv.	11
		<i>Amaranthus retroflexus</i> L.	51
		<i>Silene dioica</i> (L.) Clairv.	13
		<i>Myosotis arvensis</i> (L.) Hill	18
		<i>Crepis setosa</i> Haller f.	9
Kozarska Dubica	<i>Plantago lanceolata</i> L.	21	
	<i>Cichorium intybus</i> L.	12	
OS - 88	Osjek I	<i>Amaranthus retroflexus</i> L.	28
		<i>Cichorium intybus</i> L.	12
		<i>Matricaria inodora</i> L.	10
		<i>Setaria viridis</i> (L.) P.Beauv.	34
		<i>Arctium lappa</i> L.	36
	Osjek II	<i>Setaria viridis</i> (L.) P.Beauv.	18
		<i>Chenopodium hybridum</i> L.	11
		<i>Cirsium arvense</i> (L.) Scop.	17
		<i>Arctium lappa</i> L.	53
		<i>Silene dioica</i> (L.) Clairv.	16
	Istra (Novi Grad)	<i>Lolium perenne</i> L.	19
		<i>Picris echioides</i> L.	284
<i>Calystegia sepium</i> (L.) Scop.		9	

REZULTATI

Nakon analize čistoće semena svih uzoraka različitih sorata lucerke izdvojeni su korovi sa svih lokaliteta koji su obuhvaćeni ovim ispitivanjem. Svi nađeni korovi su identifikovani i prikazani su u (Tabeli 2.).

Kod svih ispitivanih sorti lucerke i na svim lokalitetima identifikovano je 25 različitih vrsta korova, od toga 14 vrsta su bili višegodišnji korovi (*Arctium lappa*, *Calystegia sepium*, *Cirsium arvense*, *Cichorium intybus*, *Conium maculatum*, *Festuca rubra*, *Lolium perenne*, *Matricaria inodora*, *Phleum pratense*, *Plantago lanceolata*, *Rumex* sp., *Silene dioica*, *Silene cucubalus* i *Sorghum halepense*), dok su ostalih 11 bile jednogodišnje korovske vrste (*Amaranthus retroflexus*, *Apera spica-venti*, *Bilderdykia convolvulus*, *Chenopodium album*, *Chenopodium hybridum*, *Crepis setosa*, *Lactuca serriola*, *Myosotis arvensis*, *Picris echioides*, *Polygonum aviculare*, *Setaria viridis*).

Od opasnih višegodišnjih korova koji se razmnožavaju generativnim i vegetativnim putem identifikovani su (*Sorghum halepense* i *Cirsium arvense*). Korov *Sorghum halepense* identifikovan je samo u Srbiji kod sve tri sorte lucerke i to na lokalitetima Banatsko Karađorđevo, Osipaonica, Bačko Gradište I i Bačko Gradište II, dok ga na teritoriji Republike Srpske i Hrvatske nije bilo na ispitivanim sortama i lokalitetima. Korovska vrsta *Cirsium arvense* utvrđena je samo na teritoriji Republike Hrvatske kod sorte lucerke OS-88 i to na lokalitetu Osijek II, dok je na ostalim ispitivanim područjima nije bilo.

Najveći broj semena korova imala je jednogodišnja vrsta *Picris echioides* L. kod sorte K-22 na lokalitetu Ratari 446 semena, kod sorte K-28 takođe na lokalitetu Ratari 326 semena, kod sorte OS-88 na lokalitetu Istra 284 semena i kod sorte NS-Mediana na lokalitetu Vršac 166 semena. Ova vrsta jedino nije konstatovana kod sorte lucerke Banjalučanka ni na jednom ispitivanom lokalitetu.

Takođe veliki broj semena utvrđen je i kod višegodišnje vrste *Cichorium intybus* L. i to kod svih ispitivanih sorata, sorta K-28 na lokalitetu Ratari imala je 153 semena, sorta K-22 takođe na lokalitetu Ratari 113 semena, kod sorte NS-Mediana ova vrsta je utvrđena na sva tri ispitivana lokaliteta a najviše na lokalitetu Bačko Gradište I 23 semena. Kod sorte Banjalučanka na lokalitetu Kozarska Dubica konstatovano je 12 semena, dok je kod sorte OS-88 takođe utvrđeno 12 semena na lokalitetu Osijek I.

Najmanji broj semena utvrđen je kod vrste *Rumex* sp. četiri semena i to jedino kod sorte

NS-Mediana na lokalitetu Bačko Gradište I, kao i kod vrste *Conium maculatum* sedam semena samo kod sorte K-28 na lokalitetu Banatsko Karađorđevo.

Najviše prisutnih korovskih vrsta (devet) utvrđeno je kod sorte lucerke NS-Mediana na lokalitetu Bačko Gradište I, dok je najmanji broj korovskih vrsta (dve) konstatovan kod sorte Banjalučanka na lokalitetu Kozarska Dubica.

DISKUSIJA

Štetno delovanje korova na lucerku ispoljava se kroz smanjenje prinosa, pogoršanje kvaliteta sena i skraćivanje vremena eksploatacije useva. Osnovne mere borbe protiv korova u usevu lucerke sastoje se u setvi čistog i doradenog semena i efikasnom suzbijanju korova u toku prve godine tj. u godini zasnivanja useva lucerke kako bi se formirao pravilan i gust sklop useva lucerke koji će imati veliku konkurentsku sposobnost u odnosu na korove. Blagovremenom kosidbom useva lucerke trebamo sprečiti plodonosnje korova i smanjenje količine semena korova u zemljištu a samim tim i zakorovljenost u prvom redu jednogodišnjim vrstama korova (Kojić i Šinžar, 1985).

Proučavanjem korovske flore lucerke u lucerištu starom jednu, tri, četiri i deset godina na lokalitetu sela Miokovci u okolini Čačka utvrđeno je prisustvo 116 različitih korovskih vrsta. U prvoj godini gajenja lucerke, odnosno u godini zasnivanja lucerišta najveći procenat korova pre prvog otkosa bio je iz grupe terofita, iz familija *Brassicaceae* i *Asteraceae*. U narednim godinama gajenja lucerišta usled veoma niske tehnologije gajenja došlo je do znatnog proređivanja useva što je uzrokovalo masovnu pojavu višegodišnjih korova iz grupe hemikriptofita i to iz familija: *Fabaceae*, *Asteraceae* i *Poaceae* (Pavlović et al., 2004).

Na području Pelagonia regiona u Republici Makedoniji ispitivana je korovska flora u usevu lucerke sorte „Debarska“ tokom dve godine uz primenu standardnih agrotehničkih mera. U 2008. godini utvrđeno je prisustvo 12 vrsta korova, a ukupan broj korova bio je 170,3 biljaka/m². Najveći broj korovskih biljaka konstatovan je kod vrste *Echinochloa-crus galli* (58,5 biljaka/m²), *Chenopodium album* (37,0 biljaka/m²), *Anthemis cotula* (29,5 biljaka/m²) i *Polygonum convolvulus* (21,3 biljaka/m²). U 2009. godini konstatovano je 10 korovskih vrsta sa ukupnim brojem korova koji je iznosio 148,5 biljaka/m² i to *Linaria spuria* (42,5 biljaka/m²), *Echinochloa-crus galli* (39,3 biljaka/m²) i *Polygonum convolvulus* (28,5 biljaka/m²) (Pacanoski, 2011).

Seme lucerke na tržištu najčešće ima visoku cenu koštanja pa se ne retko naši poljoprivredni proizvođači odlučuju da za setvu koriste naturalno seme koje nije dorađeno i time svesno ili nesvesno doprinose zakorovljavanju useva. Na osnovu ispitivanja sprovedenom u ovom radu i to na uzorcima naturalnog semena lucerke od 50g. možemo lako izračunati koliko je semena različitih korovskih vrsta prisutno u 18-20kg. lucerke koliko je najčešće potrebno za setvu jednog hektara lucerke. Na osnovu svega iznetog možemo zaključiti da prilikom

zasnivanja lucerišta treba koristiti dorađeno i deklarirano seme lucerke kao i primenu kompletnih agrotehničkih mera da bi u što većoj meri doprineli manju zakorovljenost lucerke a samim tim i povećali njenu perzistentnost.

ZAHVALNICA

Rad je rezultat projekata Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja, Projekti TR 31057 i TR 31018.

LITERATURA

Dokić, D., Stanislavljević, R., Terzić, D., Marković, J., Štrbanović, R., Mileusnić, Z., Dimitrijević, A. (2011): Dorađena semena lucerke na različitim sistemima mašina. *Journal on Processing and Energy in Agriculture*, 15(3): 201-204.

Dorđević, N., Dinić, B. (2007): Hrana za životinje. Cenzone tech-Europe, d.o.o., Arandelovac.

Julier, B., Porcheron, A., Ecalle, C., Guy, P. (1995): Genetic variability for morphology, growth and forage yield among perennial diploid and tetraploid lucerne populations (*Medicago sativa* L.). *Agronomie* 15, 295-304.

Kojić, M., Janjić, V. (1994): Osnovi Herbologije. Institut za istraživanje u poljoprivredi „Srbija“, Beograd.

Kojić, M., Šinžar, B. (1985): Korovi. Naučna knjiga, Beograd. 1-327.

Konstantinović, B., Masledžija, M., Konstantinović, B. (2004): Značaj višegodišnjih korova i parazitnih cvetnica u usevu lucerke i mogućnosti suzbijanja. *Acta agriculturae Serbica*, vol. 9, br. spec. br., 413-419.

Michaud, R., Lehman, W. F., Rumbaugh, M.P. (1988): World distribution and historical development. In *Alfalfa and alfalfa improvement*. Agronomy, USA. 25-82.

Miladinović, M. (2001). Proizvodnja semena krmnog bilja. Naučni institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad.

Pacanoski, Z. (2011): Weed control in newly seeded alfalfa (*Medicago sativa* L.) with postemergence herbicides. *Herbologia*, 12(3): 55-64.

Pavlović, D., Topalić-Trivunović, Lj., Belošević, Lj. (2004): Weeds flora in alfalfa fields. *Acta herbologica*, vol. 13(1): 59-64.

Pravilnik o kvalitetu semena poljoprivrednog bilja (1987). Službeni list SFRJ broj 47.

Štrbanović, R. (2010): Genetička varijabilnost agronomskih osobina različitih genotipova lucerke (*Medicago sativa* L.). Magistarska teza, Poljoprivredni fakultet Zemun, Univerzitet u Beogradu. 1-99.

(Primljeno:13.05.2014.)
(Prihvaćeno:20.06.2014.)

THE DISTRIBUTION OF WEEDS IN NATURAL ALFALFA SEEDS

RATIBOR ŠTRBANOVIĆ¹, DOBRIVOJ POŠTIĆ¹, RADE STANISAVLJEVIĆ¹,
LANA ĐUKANOVIĆ¹, ŽARKO IVANOVIĆ¹, TANJA VASIĆ², NENAD DOLOVAC¹

¹*Institute for Plant Protection and Environment, Belgrade*

²*Institute for Forage Crops, Kruševac*

e-mail: ratibor.strbanovic@yahoo.com

SUMMARY

In this study the presence of seeds of various weed species in natural alfalfa seed of different cultivars from different localities. In all studied cultivars of alfalfa and in all localities was found 25 different weed species, of which 14 species were perennial weeds, while the other 11 were annual weed species. Since dangerous perennial weeds which proliferate by vegetative and generative identified by (*Sorghum halepense* and *Cirsium arvense*). The highest number of weed seeds had annual species *Picris echioides* L. cultivar K-22 at the site Ratari 446 seeds. Also a large number of seeds was determined and the perennial species *Cichorium intybus* L. in all the cultivars of alfalfa. The lowest number of seeds were found in the species *Rumex sp.* four seeds and only the cultivar NS-Mediana at the site Bačko Gradište I, as with species *Conium maculatum* seven seeds only in the cultivar K-28 at the site Banatsko Karađorđevo. Most weeds species present (nine) was found in alfalfa cultivars NS-Mediana at the site Bačko Gradište I, and while the lowest number of weeds species (two) was found in the cultivar Banjalučanka at the site Kozarska Dubica.

Key words: alfalfa, weeds, seed, cultivar, locality

(Received: 13.05.2014.)

(Accepted: 20.06.2014.)

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

INSTRUCTION TO AUTHORS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Additional notes

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

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

EDITORIAL Board for "Plant Protection"

CIP – Katalogizacija u publikaciji
Narodna biblioteka Srbije, Beograd

632.9

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

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

