

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 Dražžera 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



Xerothermno stanište Crepis foetida; Hyalesthes obsoletus na listu C. foetida.
Xerothermic habitat of Crepis foetida; Hyalesthes obsoletus on C. foetida leaf. (A. Kosovac)

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

- Andrea Kosovac, Miljana Jakovljević, Oliver Krstić, Tatjana Cvrković,
Milana Mitrović, Ivo Toševski, Jelena Jović*
CREPIS FOETIDA L. – NOVA BILJKA DOMAĆIN CIKADE HYALESTHES OBSOLETUS
SIGNORET 1865 (HEMIPTERA: CIXIIDAE), VEKTORA STOLBUR FITOPLAZME.....7-14
- Jovana Blagojević, Violeta Oro, Ivan Nikolić, Tatjana Popović,
Goran Aleksić, Veljko Gavrilović, Žarko Ivanović*
MORFO-FIZIOLOŠKA PROUČAVANJA IZOLATA
ALTERNARIA SPP. POREKLOM SA CELERA.....15-26
- Miloš Stevanović, Nenad Dolovac, Nenad Trkulja,
Anja Milosavljević, Slobodan Kuzmanović, Goran Aleksić*
SUZBIJANJE DIDYMELLA APPLANATA U ZASADIMA MALINE
PRIMENOM NOVIJIH ORGANSKIH FUNGICIDA TOKOM VEGETACIJE.....27-32
- Petar Mitrović, Željko Milovac, Vojislav Trkulja, Bojan Jocković,
Velimir Radić, Nenad Dušanić, Ana Marjanović-Jeromela*
THE POSSIBILITY OF SPREADING LEPTOSPHAERIA MACULANS
AND LEPTOSPHAERIA BIGLOBOSA BY RAPESEED SEED.....33-39
- Stefan Stošić, Saša Stojanović, Anja Milosavljević,
Erika Pfaf Dolovac, Svetlana Živković*
EFFECT OF CALCIUM SALTS ON POSTHARVEST
FUNGAL PATHOGENS IN VITRO.....40-46

CONTENTS

Scientific papers

- Andrea Kosovac, Miljana Jakovljević, Oliver Krstić, Tatjana Curković,
Milana Mitrović, Ivo Toševski, Jelena Jović*
CREPIS FOETIDA L. – NEW HOST PLANT OF CIXIID PLANTHOPPER
HYALESTHES OBSOLETUS SIGNORET 1865 (HEMIPTERA: CIXIIDAE),
VECTOR OF STOLBUR PHYTOPLASMA.....7-14
- Jovana Blagojević, Violeta Oro, Ivan Nikolić, Tatjana Popović,
Goran Aleksić, Veljko Gavrilović, Žarko Ivanović*
MORPHO-PHYSIOLOGICAL STUDY OF
ALTERNARIA SPP. ISOLATES FROM CELERY.....15-26
- Miloš Stevanović, Nenad Dolovac, Nenad Trkulja,
Anja Milosavljević, Slobodan Kuzmanović, Goran Aleksić*
CONTROL OF DIDYMELLA APPLANATA IN RASPBERRY ORCHARDS
USING NEW ORGANIC FUNGICIDES DURING VEGETACION.....27-32
- Petar Mitrović, Željko Milovac, Vojislav Trkulja, Bojan Jocković,
Velimir Radić, Nenad Dušanić, Ana Marjanović-Jeromela*
MOGUĆNOST PRENOŠENJA LEPTOSPHERA MACULANS I
LEPTOSPHERA BIGLOBOSA SEMENOM ULJANE REPICE.....33-39
- Stefan Stošić, Saša Stojanović, Anja Milosavljević,
Erika Pfaf Dolovac, Svetlana Živković*
IN VITRO EFEKAT KALCIJUMOVIIH SOLI
NA GLJIVIČNE SKLADIŠNE PATOGENE.....40-46

CREPIS FOETIDA L. – NOVA BILJKA DOMAĆIN CIKADE HYALESTHES OBSOLETUS SIGNORET 1865 (HEMIPTERA: CIXIIDAE), VEKTORA STOLBUR FITOPLAZME

ANDREA KOSOVAC, MILJANA JAKOVLJEVIĆ, OLIVER KRSTIĆ,
TATJANA CVRKOVIĆ, MILANA MITROVIĆ, IVO TOŠEVSKI, JELENA JOVIĆ

*Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Odsek za štetočine bilja, Zemun
e-mail: kosovac.andrea@gmail.com*

REZIME

Epidemiologija biljnih bolesti uzrokovanih fitoplazmama direktno je zavisna od biologije insekta vektora i njegove preferentnosti prema biljkama domaćinima. Bolest žutila vinove loze *Bois Noir* (BN) uzrokovana prisustvom stolbur fitoplazme (16SrXII-A podgrupa, 'Candidatus Phytoplasma solani'), tokom zadnjih 15 godina je postala jedna od ekonomski najznačajnijih bolesti vinove loze u Evropi. *Hyalesthes obsoletus* Signoret 1865 (Hemiptera: Cixiidae) kao glavni vektor stolbur fitoplazme na vinovu lozu direktno utiče na pojavu i učestalost ove bolesti, kao i na stepen štete u vinogradima. Epidemiološki ciklus BN fitoplazme uslovljen je biljkom domaćinom cikade *H. obsoletus* koja predstavlja izvor zaraze u vinogradu i od koje direktno zavisi prisustvo patogena u populaciji insekta. Prisustvo stolbur fitoplazme i simptoma BN bolesti registrovano je u svim vinogradarskim regionima Srbije.

U cilju utvrđivanja epidemioloških specifičnosti prenošenja stolbur fitoplazme u Srbiji, istraživanja u ovoj studiji su bila usmerena u pravcu determinisanja biljaka domaćina adulta cikade *H. obsoletus* i njihove genetičke osobenosti. Primarno su analizirane populacije u asocijaciji sa ranije poznatim domaćinima, koprivom (*Urtica dioica* L.) i poponcem (*Convolvulus arvensis* L.). Na osnovu sprovedenih terenskih istraživanja utvrđena je nova asocijacija odraslih jedinki *H. obsoletus* sa biljkom *Crepis foetida* L. (Asteraceae) na više lokaliteta u istočnoj i južnoj Srbiji.

Genetička struktura populacija cikade *Hyalesthes obsoletus* vezanih za odgovarajuće biljke domaćine je analizirana radi dobijanja jasne slike epidemioloških ciklusa stolbur fitoplazme u gajenim kulturama u Srbiji. Na osnovu analize tri mitohondrijalna genska regiona utvrđena je genetička diferencijacija populacija *H. obsoletus* u vidu dva genotipa vezanih svojim životnim ciklusom za *C. arvensis* i *U. dioica* sa jedne strane, odnosno za novoutvrđenog domaćina *C. foetida* sa druge strane. Dominacija jednog od ova dva genotipa u prirodi i distribucija biljaka domaćina daju osnov za dalja istraživanja potencijalne vektorske uloge i karakterizacije stolbur fitoplazme koju *H. obsoletus* prenosi kao i epidemioloških ciklusa vezanih za novu biljku domaćina u Srbiji.

Gljučne reči: *Hyalesthes obsoletus*, *Crepis foetida*, Srbija, vektor, biljka domaćin

UVOD

Hyalesthes obsoletus Signoret 1865 (Hemiptera: Cixiidae) je polifagna cikada, primarno mediteranskog rasprostranjenja čija je severna granica areala jugozapadna Nemačka, dok se na jugoistok prostire i na azijsko kopno na teritoriji Male Azije (Hoch i Remane, 1985). Glavni je i najznačajniji vektor stolbur

fitoplazme 'Candidatus Phytoplasma solani' (Maixner, 1994; Sforza i sar., 1998), koja se dovodi u vezu sa više zabeleženih bolesti gajenih kultura iz familije Solanaceae kao što su krompir, paradajz i paprika, ali i vinova loza, kukuruz, lavanda, jagoda i druge biljne kulture (Quaglino i sar., 2013). *Hyalesthes obsoletus* prenosi stolbur fitoplazmu putem ishrane floemskim

sokovima biljke domaćina, usled čega polifagni način ishrane ove cikade omogućava zaražavanje različitih biljnih vrsta i uslovljava kompleksan epidemiološki ciklus bolesti.

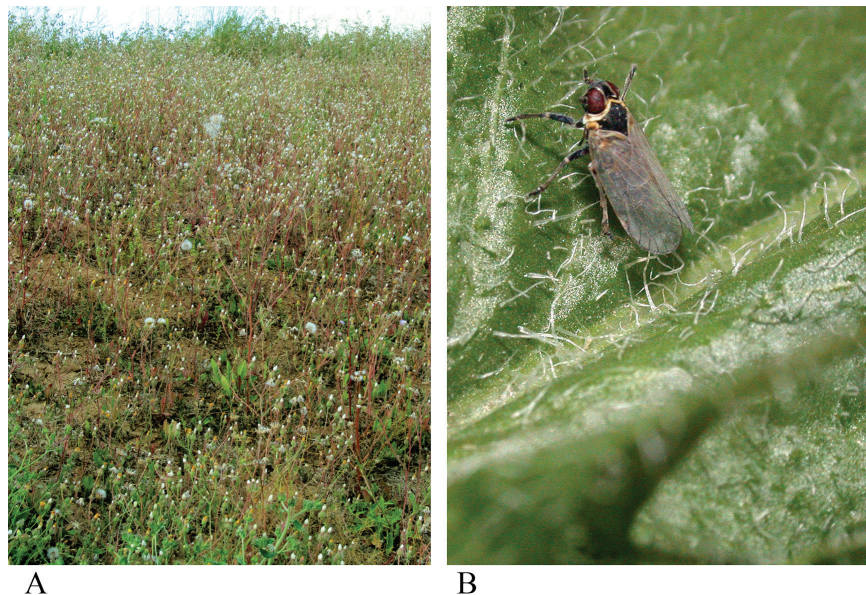
U mnogim vinogradarskim područjima širom Evrope i Male Azije stolbur fitoplazma uzrokuje ekonomski veoma značajnu bolest žutila vinove loze – *Bois Noir* (BN), poznatu kao *Vergilbungskrankheit* (VK) u Nemačkoj i *Legno nero* u Italiji. Karakteristični simptomi zaraze vinove loze stolbur fitoplazmom najčešće su crvenilo ili žutilo listova duž lisnih nerava, savijanje listova, izostanak lignifikacije korena i sušenje plodova. Unutar vinograda, simptomi BN često mogu biti lokalizovani na svega nekoliko čokota, što je posledica slučajnog zaražavanja biljaka usled polifagne ishrane vektora *H. obsoletus*, kome vinova loza nije primarni domaćin. Međutim, ukoliko je brojnost populacije insekta vektora i stopa zaraženosti jedinki stolbur fitoplazmom visoka, BN može uzrokovati značajne štete u vinogradima i dovesti do gubitka celokupne biomase vinove loze kada stepen zaraze može biti i preko 50%. (Maixner, 2006). Prisustvo stolbur fitoplazme i simptoma BN bolesti registrovano je u svim vinogradarskim regionima Srbije, a u pojedinim vinogradima stepen zaraze dostiže i preko 50% zaraženih čokota (Cvrković, 2010).

Životni ciklus *H. obsoletus* je sličan kao i kod ostalih vrsta cikada iz familije Cixiidae. Oplodene ženke polažu jaja u zemljištu u blizini korena biljke u grupama od 23–50 i tako se svih 5 larvenih stupnjeva razvija hraneći se na korenu domaćina. Prezimljavanje se odvija u L3 stadijumu u zemljištu na dubini od 20–25cm (Sforza i sar., 1999; Langer i sar., 2003). Kada se iz larvi razvijaju adulti, oni migriraju ka gornjim delovima biljke, ali to ne mora biti ista biljka, pa

ni ista biljna vrsta. U Evropi, *H. obsoletus* ima jednu generaciju godišnje, a period letenja adulta traje od polovine juna do sredine avgusta, u zavisnosti od abiotičkih faktora datog područja kao i biljke domaćina (Sforza i sar., 1998; Darimont i Maixner, 2001).

Hyalesthes obsoletus je polifagna vrsta, ali je razvićem ipak vezan za manji broj određenih biljaka na kojima se uglavnom može naći u većem broju. Dosadašnjim istraživanjima je utvrđeno da su širom južne Evrope i u Nemačkoj glavne biljke domaćini, na kojima se odvija razviće larvi *H. obsoletus*, poponac (*Convolvulus arvensis* L.) i kopriva (*Urtica dioica* L.) (Langer i Maixner, 2004), dok je u južnoj Francuskoj to *Lavandula angustifolia* L. (Sforza, 1999), a u Izraelu *Vitex agnus-castus* L. (Sharon, 2005).

Do sada nije utvrđeno koji sve faktori utiču na izbor biljke domaćina *H. obsoletus*, ali taj izbor ima značajan uticaj na vektorsku ulogu insekta i kao jak selektivni faktor može dovesti do simpatričke ekološke specijacije (Berlocher i Feder, 2002; Imo i sar., 2013). U Nemačkoj su, populacije *H. obsoletus* koje su u asocijaciji sa *C. arvensis* ili *U. dioica*, inficirane različitim genetičkim sojevima stolbur fitoplazme (Langer i Maixner, 2004) i ove dve populacije pokazuju različite biološke osobenosti u pogledu različitih perioda letenja (Maixner, 2006). Ovakva i slična saznanja ukazuju na potrebu za istraživanjima biljaka domaćina *H. obsoletus* na teritoriji Srbije u cilju utvrđivanja vektorske uloge različitih populacija i epidemioloških ciklusa koje one uslovljavaju. Tokom istraživanja ekoloških karakteristika populacija vrste *H. obsoletus* u Srbiji zabeležena je asocijacija sa novom biljkom domaćinom do sada nepoznatom u literaturi. Pored potvrđenih asocijacija sa već poznatim i očekivanim biljkama domaćinima, *U. dioi-*



Slika 1. A – Xerotermino stanište *Crepis foetida*; B – *Hyalesthes obsoletus* na listu *C. foetida*.
Figure 1. A – Xerothermic habitat of *Crepis foetida*; B – *Hyalesthes obsoletus* on *C. foetida* leaf.

ca i *C. arvensis*, registrovane su visokobrojne populacije odraslih jedinki *H. obsoletus*, koncentrisanih na gornjim delovima biljne vrste *Crepis foetida* L. (Asteraceae), (Slika 1).

U cilju utvrđivanja epidemioloških specifičnosti prenošenja stolbur fitoplazme u Srbiji, istraživanja u ovoj studiji su bila usmerena u pravcu determinisanja biljaka domaćina adulta cikade *H. obsoletus* i njihove genetičke osobenosti.

MATERIJAL I METODE

Za ova istraživanja, populacije *H. obsoletus* u asocijaciji sa različitim biljkama domaćinima sakupljane su tokom 2012. i 2013. godine na teritoriji istočne i južne Srbije. Sakupljanje insekata je vršeno u periodu od polovine juna do polovine avgusta kako u agroekosistemima na korovskim vrstama, tako i u prirodnim ekosistemima ruderalnih i livadskih staništa. Insekti su sakupljeni metodom košenja biljaka entomološkom mrežom i direktno sa nadzemnih delova biljaka domaćina pomoću aspiratora. Posebna pažnja je bila posvećena preciznom sakupljanju odraslih insekata na odgovarajućim biljkama domaćinima kako bi se populacije mogle dosledno grupisati i ispratiti od samog trenutka sakupljanja do analize rezultata. Obzirom da adulti *H. obsoletus* pokazuju izraženiju aktivnost i agregaciju na gornjim delovima biljke tokom najtoplijeg dela dana, sakupljanje je vršeno u skladu sa tim. Ulovljene jedinke su zatim sakupljene pomoću aspiratora i prebačene u krio-tubice (Sarstedt, Nemačka) sa 96% etil-alkoholom. Tubice sa sakupljenim insektima su na terenu čuvane na temperaturi od 7-11°C u prenosnom frižideru, a zatim u laboratorijskim uslovima u frižideru na 4°C.

Ekstrakcija DNK iz insekata je vršena nedeaktivnom, delimično modifikovanom TES metodom (Mahuku, 2004), koja ima za cilj očuvanje jedinki radi daljih morfoloških analiza. Pojedinačni adulti su punktirani kontrolisano pod binokularom Leica MS5 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany), sterilnom entomološkom iglom, lateralno, u predelu spoja između

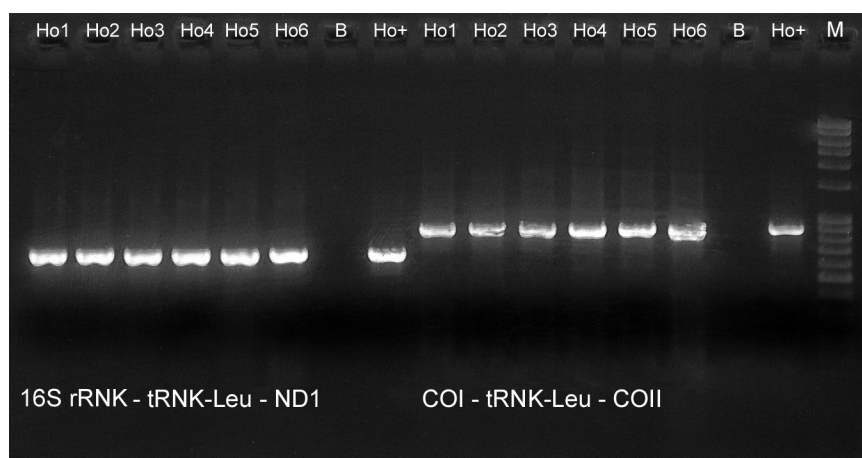
među prva dva sternita. Punktirane jedinke su prebačene u Eppendorf tubice zapremine 2ml, u koje je prethodno sipano 400 µl TES ekstrakcionog pufera (20 mM TRIS, 10 mM EDTA, 20% SDS) i 4 µl enzima proteinaze K (20 mg/ml), sa ciljem degradacije mekih tkiva insekta. Narednih 12 sati insekti su inkubirani na 56°C u vodenom kupatilu. Nakon inkubacije u tubicu je sipana jednaka zapremina hloroforma (400 µl) i centrifugiranjem 10 minuta na 11000 obrtaja na 4°C, izdvojena je DNK. Supernatant je prebačen u novu Eppendorf tubicu zapremine 1.5 ml i prethodni postupak ekstrakcije DNK hloroformom je ponovljen. U narednom koraku, u izdvojeni supernatant je dodat izopropanol u istoj zapremini (400 µl), što je nakon narednog centrifugiranja od 20 minuta na 12000 obrtaja na 4°C dovelo do taloženja DNK na dnu tubice. Izolovana DNK je isprana 96% etanolom, osušena vazдушnim strujanjem pod sterilnim digestorom i rastvorena u 50 µl TE pufera (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7.6). Ekstrahovana DNK čuvana je na -20°C.

U cilju utvrđivanja genetičke osobenosti populacija *H. obsoletus* vezanih za različite biljke domaćine, analizirana su tri mitohondrijalna (mtDNK) genska regiona: i) 16S rRNK tRNK-Leu - ND1 region koji obuhvata 16S ribozomalnu RNK (16S rRNK), transportnu RNK za leucin (tRNK-Leu) i nikotinamid-adenin-dinukleotid (NADH) dehidrogenazu subjedinicu 1 (ND1); ii) COI - tRNK-Leu - COII koji obuhvata gene za citohrom oksidazu subjedinicu 1 (COI), tRNK-Leu i citohrom oksidazu subjedinicu 2 (COII); iii) region gena COI dužine 1150 baznih parova (bp), uključujući i barkoding region (Tabela 1).

Prvi region, 16S rRNK - tRNK-Leu - ND1, ukupne dužine 400 bp, umnožen je pomoću LR-N-12945 i N1-J-12261 para prajmera (Hedin, 1997) (Tabela 1). PCR umnožavanje vršeno je u 20 µl zapremini reakcione smeše sadržaja: KAPA Taq A pufer (1 x 1.5 mM MgCl₂), MgCl₂ (1.5 mM), dNTPs (0.5 mM), prajmeri (0.4 µM), KAPA Taq polimeraza (Kapabiosystems) (0.0375 U/µl) i 1 µl ekstrahovane DNK uzorka. Da bi se eliminisala mogućnost da je tokom pripreme uzoraka došlo do

Tabela 1. Analizirani genski regioni mtDNK sa odgovarajućim prajmerima i sekvencama.
Table 1. Analyzed mtDNA gene regions with corresponding primers and sequences.

Genski region	Dužina analiziranog regiona	Naziv prajmera	Sekvenca prajmera u 5'→3' smeru	Literatura
16S rRNK – tRNK-Leu - ND1	400 bp	LR-N-12945	CGACCTCGATGTTGAATTA	Hedin (1997)
		N1-J-12261	TCGTAAGAAATTATTTGAGC	Hedin (1997)
COI- tRNK-Leu - COII	780bp	S2792	ATACCTCGACGTTATTCAGA	Brown i sar. (1996)
		A3661	CCACAAATTTCTGAACATTGACCA	Brown i sar. (1996)
COI	1150bp	LCO1490	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	Folmer i sar. (1994)
		UEA8	TAACCTTTTTTCCCAACATTTT	Lunt i sar. (1996)



Slika 2. Amplikoni dva mtD-NK genska regiona *Hyalesthes obsoletus*: 16S rRNK - tRNK-Leu - ND1 i COI - tRNK-Leu - COII; kolone Ho1-Ho6 - uzorci *H. obsoletus*; B - negativna kontrola (voda); Ho+ - pozitivna kontrola *H. obsoletus* DNK.

Figure 2. Amplicones of two mtDNA gene regions of *Hyalesthes obsoletus*: 16S rRNA - tRNA-Leu - ND1 and COI - tRNA-Leu - COII; Ho1-Ho6 lines - *H. obsoletus* samples; B - negative controle (water); Ho+ - positive control of *H. obsoletus* DNA.

unakrsne kontaminacije, na svakih 10 uzoraka je primenjena negativna kontrola koju predstavlja dodatna tubica sa reagensima potrebnim za umnožavanje DNK, u koju je umesto 1 μ l uzorka dodat 1 μ l molekularne vode. Umnožavanje je urađeno u Eppendorf Mastercycler[®]ep, prema sledećem termalnom protokolu: inicijalna denaturacija 95°C 2 min; denaturacija 95°C 30 s, hibridizacija prajmera 48°C 1 min, ekstenzija 72°C 90 s (35 ciklusa), finalna ekstenzija 72°C 10 min.

Drugi region, COI - tRNK-Leu - COII, ukupne dužine 780 bp, umnožen je upotrebom prajmera S2792 i A3661 (Brown i sar., 1996) (Tabela 1). Uslovi reakcije umnožavanja bili su slični prethodno opisanim, kao i protokol pripreme uzoraka. Termalni uslovi reakcije bili su identični gore opisanim, dok je reakciona smeša sadržala višu finalnu koncentraciju $MgCl_2$ (5 mM).

Analiza trećeg mtDNK regiona, 1150 bp COI gena, izvršena je umnožavanjem pomoću para prajmera LCO1490 (Folmer i sar., 1994) i UEA8 (Lunt i sar., 1996) (Tabela 1.). Umnožavanje DNK vršeno je u 20 μ l zapremini PCR smeše sadržaja: KAPA Taq A pufer (1 x 1.5mM $MgCl_2$), $MgCl_2$ (2.25 mM), dNTPs (0.6 mM), prajmeri (0.5 mM), KAPA Taq polimeraza (Kapabiosystems) (0.05 U/ μ l) i 1 μ l DNK uzorka. Umnožavanje je vršeno prema sledećem termalnom protokolu: inicijalna denaturacija 94°C 3 min; denaturacija 94°C 1 min, elongacija 48°C 1 min, ekstenzija 72°C 2 min (30 ciklusa), finalna ekstenzija 72°C 7 min.

Nakon završenog umnožavanja, radi provere uspešnosti amplifikacije, 5 μ l PCR produkta svakog uzorka je elektroforetski razdvojeno u 1% agaroznom gelu obojenom etidium bromidom i vizualizirano pod UV transiluminatorom (Slika 2). Reakcije sekvenciranja amplikona su urađene u MacroGen-u (Južna Koreja) na ABI Prism 3700 automatskom kapilarnom sekvencatoru. Provera kvaliteta sekvenci

i njihovo prevođenje u FASTA format je urađeno u programu FinchTV v.1.4.0 (<http://www.geospiza.com>). Poređenje sekvenci i utvrđivanje nukleotidnih razlika je izvršeno pomoću CLUSTAL W programa integrisanog unutar MEGA5 programa (Tamura i sar., 2011), a ocena nukleotidnih razlika između populacija pomoću *engl.* pairwise metoda. Za analizu filogenetskih odnosa između populacija u asocijaciji sa različitim biljkama domaćinima korišćeni su Neighbor-Joining metod (Saitou i Nei, 1987) i metod maksimalne parsimonije. Sve filogenetske analize urađene su pomoću programa MEGA 5.

REZULTATI

Tokom istraživanja asocijacija cikade *Hyalesthes obsoletus* sa različitim biljkama domaćinima, obrađeno je ukupno dvadeset dva lokaliteta u istočnoj i južnoj Srbiji, na kojima su utvrđene populacije ove cikade vezane za *Convolvulus arvensis*, *Urtica dioica* i *Crepis foetida*. Na dva lokaliteta utvrđene su populacije *H. obsoletus* vezane za *C. arvensis* kao biljku domaćina, na 12 lokaliteta populacije vezane za *U. dioica* i na 8 za *C. foetida* kao novoutvrđenu biljku domaćina. Prisustvo i rasprostranjenje biljaka domaćina na teritoriji Srbije pokazalo je da se sve tri biljne vrste koje su bile predmet istraživanja ne mogu ograničiti na korovsko-ruderalnu kategoriju jer su pored poljoprivrednih površina i ruderalnih staništa, koja su pod konstantnim ili povremenim uticajem čoveka, prisutne i kao elementi biljnih zajednica u nenarušenim ekosistemima. *Convolvulus arvensis* je česta korovska vrsta u agroekosistemima, dok se *U. dioica* za razliku od centralne Evrope, gde je dominantna korovska vrsta vezana za vinograde, na teritoriji Srbije češće javlja na ruderalnim staništima. *Crepis foetida* je zabeležena unutar vinograda gde je na jednom od lokaliteta nađena u

sintopiji sa *C. arvensis*. Međutim, ova biljka se često javlja i na ruderalnim staništima gde je na dva lokaliteta registrovana u sintopiji sa *U. dioica*, ali je kao i prethodne dve vrste prisutna i u prirodnim ekosistemima, najčešće kserotermnih livada.

Sve tri biljke domaćini koje su registrovane na teritoriji Srbije su pokazale manje-više iste brojnosti populacija *H. obsoletus* nezavisno od tipa staništa. Terenske aktivnosti u cilju sakupljanja imaga *H. obsoletus* trajala su tokom cele sezone njihovog leta (polovina juna do polovina avgusta) kako bi bili pokriveni periodi kada je dinamika aktivnosti svih populacija najveća. Populacije *H. obsoletus* vezane za *C. arvensis* su registrovane samo na dva od ukupno dvadeset dva lokaliteta, dok su populacije vezane za *U. dioica* dominirale, i u ovim istraživanjima su utvrđene na ukupno dvanaest lokaliteta gde su insekti sakupljeni u značajnoj brojnosti. Potvrđeno je da se periodi leta adulta *H. obsoletus* u asocijaciji sa *U. dioica* i *C. arvensis* razlikuju u vremenu pojavljivanja. Jedinke vezane za *C. arvensis* se pojavljuju ranije (sredina juna) i imaju kratak period leta koji se preklapa u desetak dana sa populacijama vezanim za *U. dioica*. Populacije vezane za *C. foetida* su veoma brojne i prisutne u letu u periodu jula meseca i gotovo se u potpunosti poklapaju sa periodom leta populacija vezanih za *U. dioica*.

Analize genetičkih osobenosti populacija u asocijaciji sa ove tri biljke domaćina su izvršene na osnovu tri mtDNK regiona od kojih su dva već bila prethodno analizirana (Johannesen et al., 2008; 2012). Mitohondrijalni genski regioni 16SrRNK - tRNK-Leu - ND1 i COI - tRNK-Leu - COII su u analizama korišćeni kao jedinstvena spojena sekvencija (engl. concatenated) u dužini od 1180 bp. Upotrebom CLUSTAL W programa urađeno je poravnanje novodobijenih sekvenci sa sekvencama prethodno opisanih haplotipova (Johannesen et al., 2008; 2012) i kao rezultat je dobijen ukupno 21 haplotip. Rezultati analize genetičke distance pokazali su da je između haplotipova vezanih za *C. arvensis* i *U. dioica* sa jedne strane (17 haplotipova) i *C. foetida* sa druge (4 haplotipa), prisutna konstantna genetička distanca od 1.4%, dok su genetičke distance unutar grupa bile 0.3% u slučaju *C. arvensis* i *U. dioica* haplotiposke grupe i 0.1% u slučaju haplotipova vezanih za *C. foetida*.

Rekonstrukcija filogenetskog stabla kod sekvenciranih primeraka izvršena je preko modela p-distance, primenom Neighbor-Joining metoda i metodom maksimalne parsimonije. Na osnovu obe analize dobijena su filogenetska stabla identične topologije koja su pokazala grupisanje sekvenci u odnosu na njihove biljke domaćine sa visokim vred-

nostima "bootstrap" testa od 100%.

Dodatnom analizom COI fragmenta dužine 1150 baznih parova potvrđena je konstantna genetička divergentnost od 2.2% između populacija *H. obsoletus* vezanih za različite biljke domaćine. I na osnovu ovog genskog regiona sekvence su se grupisale u dva klastera, jedan sačinjen od primeraka u asocijaciji sa *C. arvensis* i *U. dioica*, a drugi od primeraka *H. obsoletus* u asocijaciji sa *Crepis foetida*.

DISKUSIJA

Istraživanja asocijacija cikade vektora *Hyalesthes obsoletus* sa različitim biljkama domaćinima doprinose razjašnjavanju problematike epidemiologije stolbur fitoplazme, posebno imajući u vidu da je u literaturi poznato preko 70 biljnih vrsta iz 14 familija u kojima je zabeleženo prisustvo stolbur fitoplazme (Sforza, 1998). Biljka domaćin ima fundamentalni značaj i uticaj na brojnost populacija vektora, njihovo rasprostranjenje kao i incidencu stolbur fitoplazme u vinogradima, a pored toga kao stalni izvor zaraze čini preduslov začetka epidemiološkog ciklusa bolesti i samim tim zahteva posebnu istraživačku pažnju. U slučaju *Bois Noir* oboljenja, vinova loza predstavlja krajnjeg domaćina, engl. dead end host-plant (Boudon-Padieu, 2000), što znači da *H. obsoletus* prenosi stolbur fitoplazmu slučajnim događajem, pasivno, prilikom ishrane floemskim sokovima biljke (Maixner i sar., 1995), ali ne može izvršiti akviziciju fitoplazme sa vinove loze. Problematika utvrđivanja biljke domaćina, koja omogućava razvoj larvalnih stupnjeva ali i predstavlja izvor hrane adultima, sve više dobija na značaju u epidemiološkim istraživanjima i u formiranju strategije kontrole bolesti. U Evropi je pokazano da su biljke koje su izvori zaraze stolbur fitoplazmom vrste na kojima *Hyalesthes obsoletus* kompletira svoje razviće: *Convolvulus arvensis* i *Urtica dioica* ili u južnoj Francuskoj *Lavandula angustifolia*. U Izraelu *H. obsoletus* kompletira ceo životni ciklus na *Vitex agnus-castus*, ali populacije koje izleću nisu zaražene fitoplazmom što znači da ova biljna vrsta nije istovremeno i rezervoar biljka (Sharon, 2005).

Crepis foetida kao novozabeležena biljka domaćin igra potencijalno značajnu ulogu u epidemiologiji stolbur fitoplazme u Evropi. Obzirom da su na ovoj biljci registrovane izuzetno brojne populacije *H. obsoletus* u Srbiji, ona svakako predstavlja izvor hrane adultima (Slika 1). Ukoliko se larvalni stadijumi razvijaju na korenu ove vrste i ukoliko je ona zaražena fitoplazmom, otvoriće se nova polja istraživanja usmerena ka utvrđivanju značaja ove biljne vrste u epidemiologiji stolbur fitoplazme. *Crepis*

foetida ima južno palearktičko rasprostranjenje od transkavkazja do Engleske, pa samim tim ako je u pitanju skorašnji događaj promene domaćina (*engl.* host shift) na teritoriji jugoistočne Evrope, usled globalnog zagrevanja se slična dešavanja mogu očekivati širom areala, što za posledicu svakako ima širenje areala vektora pa i same zaraze.

Analiza tri mitohondrijalna genska regiona populacija *H. obsoletus* u asocijaciji sa različitim biljkama domaćinima pokazuje značajnu i konstantnu genetičku diferencijaciju što ukazuje na postojanje dve divergentne linije (genotipa) koji su u vezi sa od-

govarajućim domaćinom. Obzirom da veći broj biljaka domaćina uvećava mogućnosti genetičke razmene i lokalnih adaptacija, ovaj podatak je od izuzetnog značaja, dajući mogućnosti za stvaranje novih epidemioloških puteva i ciklusa (Christensen i sar., 2005).

ZAHVALNICA

Rezultati istraživanja prikazani u ovom radu realizovani su u okviru projekta III-43001 koji finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

LITERATURA

Berlocher, H.S., Feder, J.L. (2002): Sympatric speciation in phytophagous insects: moving beyond controversy? *Annual Review of Entomology*, 47: 773–815.

Boudon-Padieu, E. (2000): Recent advances on grapevine yellows: Detection, etiology, epidemiology and control strategies. 13th Meeting ICVG, Adelaide, Australia, March 12–17, 2000. Extended abstracts, 87–88.

Brown, J.M., Abrahamson, J.G., Way, P.A. (1996): Mitochondrial DNA phylogeography of host-races of the goldenrod ball gallmaker, *Eurosta solidaginis* (Diptera: Tephritidae). *Evolution*, 50: 777–786.

Christensen, N.M., Axelsen, K.B., Nicolaisen, M., Schulz, A. (2005): Phytoplasma and their interactions with hosts. *Trends in Plant Science*, 10(11): 525–536.

Cvrković, T. (2010): Diverzitet faune cikada u vinogradima Srbije i njihova uloga u prenošenju *Bois noir* fitoplazme. Doktorska disertacija. Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu.

Darimont, H., Maixner, M. (2001): Actual distribution of *Hyalesthes obsoletus* Signoret (Auchenorrhyncha: Cixiidae) in German viticulture and its significance as a vector of Bois noir. *IOBC/wprs Bulletin*, 24: 199–202.

Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R. (1994): DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular marine biology and biotechnology*, 3: 294–299.

Hedin, M.C. (1997): Molecular phylogenetics at the population/species interface in cave spiders of the southern Appalachians (Araneae: Nesticidae: *Nesticus*). *Molecular Biology and Evolution*, 14: 309–324.

Hoch, H., Remane, R. (1985): Evolution und Speziation der Zikaden-Gattung *Hyalesthes* SIGNORET, 1865 (Homoptera Auchenorrhyncha Fulgoroidea Cixiidae). *Marburger Entomologische Publikationen*.

Imo, M., Maixner, M., Johannesen, J. (2013): Sympatric diversification vs. immigration: deciphering host-plant specialization in a polyphagous insect, the stolbur phytoplasma vector *Hyalesthes obsoletus* (Cixiidae). *Molecular Ecology* doi: 10.1111/mec.12237

Johannesen, J., Lux, B., Michel, K., Seitz, A., Maixner, M. (2008): Invasion biology and host specificity of the grapevine yellows disease vector *Hyalesthes obsoletus* in Europe. *Entomologia experimentalis et applicata*, 126: 217–227.

Johannesen, J., Foissac, X., Kehrli, P., Maixner, M. (2012): Impact of vector dispersal and host-plant fidelity on the dissemination of an emerging plant pathogen. *PLoS ONE*, 7(12): e51809.

Langer, M., Darimont, H., Maixner, M. (2003): Control of phytoplasma vectors in organic viticulture. *IOBC/wprs Bulletin*, 26: 197–202.

Langer, M., Maixner, M. (2004): Molecular characterisation of grapevine yellows associated phytoplasmas of the stolbur group based on RFLP-analysis of non-ribosomal DNA. *Vitis*, 43: 191–199.

Lunt, D., Zhang, D.X., Szymura, J.M., Hewitt, G.M. (1996): The insect COI gene: evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies. *Insect Molecular Biology*, 5: 153–165.

Mahuku, G.S. (2004): A simple extraction method suitable for PCR-based analysis of plant, fungal, and bacterial DNA. *Plant Molecular Biology Reporter*, 22(1): 71–81.

Maixner, M. (1994): Research note: Transmission of German grapevine yellows (Vergilbungskrankheit) by the plant-hopper *H. obsoletus* (Auchenorrhyncha: Cixiidae). *Vitis*, 33: 103–104.

Maixner, M., Ahrens, U., Semüller, E. (1995): Detection of the German grapevine yellows (Vergilbungskrankheit) MLO in grapevine, alternative hosts and a vector by a specific PCR procedure. *European Journal of Plant Pathology*, 3: 241–250.

Maixner, M. (2006): Temporal behaviour of grapevines infected by type II Vergilbungskrankheit (Bois Noir). In *Proceedings of the 15th ICVG Conference*, pp. 223–224. Stellenbosch, South Africa: South African Society for Enology and Viticulture.

Maixner, M., Langer, M., Gerhard, Y. (2006): Epidemiological characteristics of Bois Noir type I. In *Proceedings of the 15th ICVG Conference*, pp. 86–87. Stellenbosch, South Africa: South African Society for Enology and Viticulture.

Mahuku, G.S. (2004): A simple extraction method suitable for PCR-based analysis of plant, fungal, and bacterial DNA. *Plant Molecular Biology Reporter*, 22: 71–81.

Quaglino, F., Zhao, Y., Casati, P., Bulgari, D., Bianco, P. A., Wei, W., Davis, R. E. (2013): ‘*Candidatus* Phytoplasma solani’, a novel taxon associated with stolbur and bois noir related diseases of plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* doi:10.1099/ijs.0.044750-0.

Sforza, R., Clair, D., Daire, X., Larrue, J., Boudon-Padieu, E. (1998): The role of *Hyalesthes obsoletus* (Hemiptera: Cixiidae) in the occurrence of bois noir of grapevines in France. *Journal of Phytopathology*, 146: 549–556.

Sforza, R., Bourgoïn, T., Wilson, S.W., Boudon-Padieu, E. (1999): Field observations, laboratory rearing and descriptions of immatures of the planthopper *Hyalesthes obsoletus* (Hemiptera: Cixiidae). *European Journal of Entomology*, 96: 409–418.

Sharon, R., Soroker, V., Wesley, S., Zahavi, T., Harari, A., Weintraub, P. (2005): *Vitex agnus-castus* is a preferred host plant for *Hyalesthes obsoletus*. *Journal of Chemical Ecology*, 31: 1051–1063.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. (2011): MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28: 2731–2739.

(Primljeno: 15.01.2014.)
(Prihvaćeno: 24.02.2014.)

CREPIS FOETIDA L. – NEW HOST PLANT OF CIXIID PLANTHOPPER HYALESTHES OBSOLETUS SIGNORET 1865 (HEMIPTERA: CIXIIDAE), VECTOR OF STOLBUR PHYTOPLASMA

ANDREA KOSOVAC, MILJANA JAKOVLJEVIĆ, OLIVER KRSTIĆ,
TATJANA CVRKOVIĆ, MILANA MITROVIĆ, IVO TOŠEVSKI, JELENA JOVIĆ

*Institut for Plant Protection and Environment, Department of Plant Pests, Zemun
e-mail: kosovac.andrea@gmail.com*

SUMMARY

Epidemiology of plant diseases caused by phytoplasmas depends on vector's biology and its preference to the host plant. Grapevine yellows (GY) caused by stolbur phytoplasma (16SrXII-A subgroup, 'Candidatus Phytoplasma solani'), during last 15 years became one of the economically most important diseases of the grapevine in Europe. The cixiid planthopper *Hyalesthes obsoletus* Signoret (Hemiptera: Cixiidae) is a principle vector of stolbur phytoplasma and has the main influence on the incidence of the disease and yield losses in the vineyards. Epidemiological cycle of the Bois Noir (BN) is determined by the host plant of the *H. obsoletus* which is primal source of the disease in the vineyard and it affects presence of the pathogen in the insect's population. Presence of stolbur phytoplasma and symptoms of the BN disease is registered in all wine growing regions in Serbia.

This research was focused toward determining host plants of the *H. obsoletus* and its genetic characteristics in order to determine epidemiological characteristics of BN in Serbia. Based on this field research, along with populations associated with previously known host plants nettle (*Urtica dioica*) and bindweed (*Convolvulus arvensis*), new host plant association with *Crepis foetida* L (Asteraceae) was registered on several localities in east and south Serbia.

Genetic structure of *H. obsoletus* populations associated with specific host plants is analyzed in order to obtain precise information about epidemiological cycle of stolbur phytoplasma in agroecosystems in Serbia. According to results of the three analyzed mtDNA regions, genetic differentiation is present between *H. obsoletus* populations associated with *C. arvensis* and *U. dioica* on the one and *C. foetida* on the other side. Domination of one of these two genotypes in nature and distribution of the host plants provides the basis for further research of the potential vector ability and characterization of the stolbur phytoplasma which is being transmitted by *H. obsoletus* and epidemiological cycles related to the new host plant in Serbia.

Key words: *Hyalesthes obsoletus*, *Crepis foetida*, Serbia, vector, host plant

(Received: 15.01.2014.)

(Accepted: 24.02.2014.)

Zaštita bilja
Vol. 65 (1), N°287, 15-26, 2014, Beograd
Plant Protection
Vol. 65 (1), N°287, 15-26, 2014, Belgrade

UDK: 635.128-295.2;
632.952.2
Naučni rad
Scientific paper

MORFO-FIZIOLOŠKA PROUČAVANJA IZOLATA *ALTERNARIA* SPP. POREKLOM SA CELERA

JOVANA BLAGOJEVIĆ¹, VIOLETA ORO², IVAN NIKOLIĆ², TATJANA POPOVIĆ²,
GORAN ALEKSIĆ², VELJKO GAVRILOVIĆ², ŽARKO IVANOVIĆ²

¹Stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije

²Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Beograd
e-mail:kipepeo11@gmail.com

REZIME

Vrste roda *Alternaria* predstavljaju jedne od najznačajnijih gljiva patogenih familije *Apiaceae*. Promene koje izazivaju na biljkama domaćinima su mrka trulež korena, pegavost lišća, sušenje listova i lisnih preteljki. Tokom 2012. i 2013. godine na teritoriji Srbije, prikupljeni su uzorci celera sa karakterističnim simptomima pegavosti lišća i sušenja listova. Identifikacija izolata je izvršena analizom morfoloških karakteristika spora gljive. Nakon identifikacije izvršena su uporedna proučavanja uticaja različitih hranljivih podloga, temperatura, pH vrednosti podloga i kvaliteta svetlosti na morfološke karakteristike izolata, porast kolonija i morfologiju spora.

Cljučne reči: celer, *Alternaria*, morfologija, fiziologija, porast micelije, sporulacija

UVOD

Familija *Apiaceae* Lindl. (familija šargarepa i peršuna, ranije poznata pod nazivom *Umbelliferae* Juss. ili štitoonoše) je karakteristična po cvastima koje se grupišu podsećajući na kišobran ili štiti. Zbog odsustva opšte prihvaćene klasifikacije može se reći da obuhvata oko 300-455 rodova i do 3750 vrsta (Constance, 1971; Downie, 2000). Ova familija predstavlja vrlo značajnu grupu začinskih i lekovitih biljaka koje se gaje širom sveta. Najznačajniji predstavnici su: šargarepa (*Daucus carota subsp. sativus* (Hoffm.) Arcang), celer (*Apium graveolens* L. var. *rapaceum* (Mill.) DC), paštrnak (*Patinaca sativa* L.), peršun (*Petroselinum crispum* L.), kim (*Carum carvi* L.), mirođija (*Anethum graveolens* L.), komorač (*Foeniculum vulgare* Mill.), anis (*Pimpinella anisum* L.), korijander (*Coriandrum sativum* L.) i angelika (*Angelica archangelica* L.) (Koike, 2006). Celer (*Apium graveolens* var. *rapaceum*) je

dvogodišnja biljka koja se gaje zbog hranljivog korena, sočnog lista i lisne drške. Proizvodi se širom sveta, a najviše u Americi (Nonnecke, 1989).

Brojne patogene gljive ugrožavaju gajenje i proizvodnju biljaka iz familije *Apiaceae*, a među njima poseban značaj imaju gljive iz roda *Alternaria*. Najveći broj predstavnika ovog roda su saprobi koji se mogu naći u biljnim ostacima ili u zemljištu, ali mogu biti i patogeni za ekonomski vrlo značajne biljke kao što su žitarice, uljarice, povrće, voće i različito ukrasno bilje (Jolly, 1964; Ellis, 1971; Simmons and Roberts, 1993; Strandberg, 1992; Rotem, 1994; Thomma, 2003; Peever et al., 2004). Taksonomija roda *Alternaria* se bazira na morfologiji i razvoju konidija i konidiofora gljive (Elliot, 1917; Wiltshire, 1947; Simmons, 1967) koji mogu biti vrlo varijabilni, što stvara velike poteškoće prilikom identifikacije. Za većinu vrsta gljiva iz roda *Alternaria* teleomorfni stadijum nije poznat (Ellis, 1971).

Simptomi koje ovi patogeni mogu izaziva-

ti na biljkama familije *Apiaceae* su lisna pegavost (Netyer and Kenneth, 1969; Pryor and Standberg, 2002; Pryor, 2003), sušenje listova, nekroza lisnih peteljki i crna trulež (Ellis and Holiday, 1972; Pryor, 2002; Farrar et al., 2004). Među najznačajnijim vrstama roda *Alternaria* patogenima familije *Apiaceae* mogu se svrstati sledeće:

- *Alternaria dauci* (J. G. Kuhn) J. W. Groves & Skolkose, patogen celera, šargarepe, pastrnka i peršuna (Farrar et al., 2004), prouzrokuje crnu lisnu pegavost i lisnu palež (Pryor and Standberg, 2002). Početni simptomi se javljaju na ivicama listova u vidu pega koje se šire i spajaju, lišće dobija crnu boju i počinje da se suši. Takođe je zabeleženo da može doći do propadanja klijanaca, truleži plodova, pegavosti krtola i stabljika (Strandberg, 1988);

- *Alternaria radicina* Meser, Drechsler and Eddy, patogen celera, šargarepe, peršuna, pastrnka i kima (Ellis and Holliday, 1972; Wearing, 1980; Farrar et al., 2004; Pryor, 2002). Prouzrokuje sušenje klijanaca, sušenje krune i listova i crnu trulež korena. Simptomi se najčešće ispoljavaju u vidu sitnih braonkastih lezija sa hlorotičnim oreolom koje se spajaju obrazujući crne lezije, posebno u korenu lisne peteljke šireći se dalje prema korenu (Koike, 2006);

- *Alternaria alternata* (Fries) Keissler, patogen 300 različitih vrsta biljaka. Prouzrokuje lisnu pegavost, trulež i propadanje klijanaca kod biljaka familije *Apiaceae* (Solfrizzo, 2005);

- *Alternaria petroselini* (Neerg.) E. G. Simmons, patogen celera, peršuna, kima i anisa. Prouzrokuje lisnu pegavost koja dovodi do sušenja celih listova i lisnih peteljki. Ova vrsta je često pogrešno klasifikovana, kao *A. radicina* (Pryor and Gilbertson, 2002);

Od drugih vrsta roda *Alternaria*, patogena familije *Apiaceae* pominju se i *Alternaria carotii-nculateae* (Simmons, 2007), *Alternaria selini* (Simmons, 2007) i *Alternaria smyrnii* (Simmons, 2007).

S obzirom na značaj fitopatogenih gljiva iz roda *Alternaria*, cilj ovog rada je bio da se izvrši identifikacija *Alternaria* spp. patogena celera i da se izvrše uporedna morfološko-fiziološka proučavanja karakteristika dobijenih izolata.

MATERIJAL I METODE

Prikupljanje materijala

U toku 2012. i 2013. godine prikupljene su obolele biljke celera sa karakterističnim simptomima lisne pegavosti i sušenja listova poreklom sa pet lokaliteta na teritoriji Srbije (Tabela 1.).

Tabela 1. Geografsko poreklo izolata sa celera, simptomi i godine izolacije.

Table 1. Geographical origin of the isolates from celery, symptoms and the year of isolation.

Izolat Isolate	Simptom Symptom	Lokalitet Locality	Godina Year
IZB 1c	Sušenje listova	Horgoš	2013
IZB 2c	Sušenje listova	Horgoš	2013
IZB 3c	Lisna pegavost	Negotin	2013
IZB 4c	Lisna pegavost	Negotin	2013
IZB 5c	Sušenje listova	Negotin	2013
IZB 6c	Lisna pegavost	Borča	2012
IZB 7c	Sušenje listova	Borča	2012
IZB 8c	Sušenje listova	Loznica	2012
IZB 9c	Lisna pegavost	Novi Pazar	2013
IZB 10c	Sušenje listova	Novi Pazar	2013

Izolacija patogena iz biljnog materijala i dobijanje monosporijalnih izolata

Izolacija patogena je vršena prema metodi Dhingra i Sinclair (1986). Obolelo lišće sa simptomima je površinski dezinfikovano u 3% rastvoru natrijum-hipohlorita (NaOCl) u trajanju od 30 sekundi. Sitni lisni fragmenti uzimani su sa prelaza obolelog i zdravog tkiva i zasejavani u Petri kutije sa sterilnim krompir dekstroznim agarom (PDA, Dhingra and Sinclair, 1986). Petri kutije su postavljene na inkubaciju u termostatu na temperaturu od 24 °C. Nakon 3 dana razvoja, deo micelije presejavan je na novu PDA podlogu i inkubiran na 24 °C 5 dana čime su dobijeni čisti izolati gljive. Za dalji rad odabrano je deset reprezentativnih izolata. Za dobijanje monosporijalnih izolata, u Petri kutije je dodavano 10 ml sterilne vode i blagim utrljavanjem pomoću staklenog štapića skidana micelija sa konidijama kako bi se odvojila od podloge. Nakon toga pripremljena su razređenja od 10^{-1} i 10^{-2} iz kojih je po 0.1 ml zasejavan na vodeni agar (WA, Dhingra and Sinclair, 1986). Nakon inkubacije u trajanju od 12 h, pojedinačne prokljale konidije zasejavane su na PDA podlogu i postavljene u termostatu na temperaturu od 24 °C. Monosporijalni izolati su presejavani u epruvete sa zakošenom PDA podlogom i na taj način je formirana kolekcija izolata koja je čuvana u frižideru na temperaturi od 4 °C.

Ispitivanje morfoloških osobina konidija izolata

Ispitivanje morfoloških osobina konidija izolata vršeno je posmatranjem privremenih mikro-

skopskih preparata (Muntanola-Cvetković, 1987). Pasterovom pipetom su na predmetno staklo postavljene 1-2 kapi sterilne vode u koju je iglom nanešen fragment micelije izolata gajenog 7 dana na podlozi od šargarepe i krompira (PCA, Dhingra i Sinclair, 1986). Ispitivani su izgled i dimenzije konidija, širina, dužina, broj transverzalnih i longitudinalnih septi i dužina vrata konidije (Simmons, 2007). Konidije su slučajno odabirane u vidnom polju mikroskopa i za svaki izolat odabirano je 100 konidija. Ogled je postavljen u 3 ponavljanja.

Ispitivanje uticaja ekoloških faktora

Ispitivanje uticaja ekoloških faktora obuhvatio je ispitivanje porasta micelije i intenziteta sporulacije na različitim vrstama hranljivog medijuma, na različitim pH vrednostima podloge, na različitim temperaturama i u uslovima različitog kvaliteta svetlosti.

Uticaj hranljivih podloga na morfologiju, porast i sporulaciju izolata

Ispitivanje uticaja hranljivih podloga na morfologiju, porast i sporulaciju izolata vršeno je na 5 različitih podloga: V8 podloga (Simmons, 1992), podloga od šargarepe i krompira (Simmons, 2007), podloga od vodenog agara (Dhingra and Sinclair, 1986), podloga od krompir-dekstroznog agara (Dhingra and Sinclair, 1986) i podloga od slad agara (MA, Sheppard and Maddox, 2001).

Fragmenti micelije izolata (prečnika 5 mm) gajenih 7 dana na PDA podlozi, zasejavani su u centar Petri kutije i postavljeni na inkubaciju u termostatu na temperaturu od 25 °C. Eksperiment je postavljen u tri ponavljanja. Porast izolata je određivan petog dana od datuma zasejavanja merenjem prečnika kolonija. Opisivani su boja, izgled i tekstura micelije, ivice kolonije, izgled naličja micelije, pojava segmenata i zoniranost micelije.

Intenzitet sporulacije, određivan je pomoću hemocitometra, merenjem koncentracije konidija u suspenziji (Muntanola-Cvetković, 1987). Pet dana nakon zasejavanja izolata na različite podloge, dodavano je po 2 ml sterilne vode. Staklenim štapićem micelija sa konidijama je odvajana od podloge. Voda sa suspenzijom je presipana u tubice i vorteksovana, kako bi se što efikasnije konidije odvojile od micelije. Suspenzija je dalje filtrirana kroz sterilnu pamučnu gazu, radi odstranjivanja micelije. Potom je kap suspenzije nanošena na hemocitometarsku pločicu. Pločica je

posmatrana pod mikroskopom na uvećanju 100x. Prebrojavanjem spora unutar polja na hemocitometru i korišćenjem odgovarajuće formule utvrđivana je gustina spora. Merenja su vršena u tri ponavljanja.

Uticaj kiselosti podloge na morfologiju, porast i sporulaciju izolata

Ispitivanje uticaja kiselosti podloge na morfologiju, porast i sporulaciju izolata vršeno je na PDA podlozi. Kiselost podloge je podešavana sa 1M HCl i 1M NaOH na pH vrednosti od 3, 6 i 9. Uticaj kiselosti podloge na izolate je praćen posmatranjem morfologije kolonije izolata, merenjem porasta i intenziteta sporulacije. Ogled je postavljen u tri ponavljanja.

Uticaj temperature na morfologiju, porast i sporulaciju izolata

Ispitivanje uticaja temperature na porast i sporulaciju izolata posmatrano je na PDA podlozi pri temperaturama 5°C, 13°C, 20°C, 23°C, 25°C, 30°C i 35°C. Ogled je postavljen u tri ponavljanja.

Uticaj svetlosti na morfologiju, porast i sporulaciju izolata

Uticaj svetlosti na morfologiju kolonija, porast i sporulaciju izolata ispitivan je na PDA podlozi u različitim uslovima osvetljenja pri temperaturi 24°C tokom 5 dana. Izolati su izlagani stalnoj veštačkoj svetlosti, stalnom mraku i smeni svetlost-mrak 8-16h. Ogled je postavljen u tri ponavljanja.

REZULTATI

Prikupljanje materijala

Obolele biljke celera sa karakterističnim simptomima lisne pegavosti i sušenja listova sakupljene su sa 5 različitih lokaliteta na teritoriji Srbije (Tabela 1). Iz prikupljenih biljaka sa simptomima, dobijeno je 10 monosporijalnih izolata *Alternaria* spp. koji su korišćeni za dalja istraživanja.

Ispitivanje morfoloških osobina konidija i preliminarna identifikacija izolata

Na osnovu proučavanja morfoloških osobina konidija (boja, oblik, dužina i širina tela konidije, prisutnost i dužina vrata konidija, broj longitudinalnih i transverzalnih septi) izdvojene su tri grupe izolata.

Prva grupa obuhvata izolate IZB 3c, IZB4c, IZB7c, IZB9c i IZB10c, kod kojih su konidije elipsoidne, u lančanim nizovima i do 15 u nizu. Dimenzije konidiospora u proseku za ovu grupu izolata na V8 podlozi iznosile su 20–45 x 5–14 μm , a na PCA podlozi 12–25 x 5–12 μm . U proseku ove konidije su imale 3–4 transferzalne septe i 1–3 longitudinalne septe. Kljun odnosno sam vrh konidija je bio kratak ovalnog oblika ili se nije ni formirao. Boja konidija je braonkasta. Prema literaturnim podacima veličina i struktura ovih konidija odgovara vrsti *Alternaria alternata* (Simmons, 2007).

Druga grupa izolata obuhvata izolate pod šiframa IZB1c, IZB2c, i IZB5c, kod kojih se mogu uočiti znatno okruglastije konidiospore nego što je to slučaj kod *Alternaria alternata*. Veličina konidiospora je u proseku bila 15–75 x 10–50 μm . Kod ove grupe mogle su se uočiti 2–8 transferzalnih i 1–3 longitudinalnih septi u proseku. Boja spora je braonkasta. Izolati iz ove grupe nisu mogli biti identifikovani prema ključu Simmons (2007).

Treću grupu čine izolati IZB 6c i IZB 8c, kod kojih su se spore značajno razlikovale od prve dve grupe. Oblik spora je izdužen elipsoidan, sa vrlo dugačkim vratom koji je značajno premašivao dimenzije tela spore. Spore su tamnomaslinaste, a vratovi su svetlije boje i suženi na vrhu. Prosečne dimenzije spora iznosile su 43–100 x 16–27 μm . Broj transverzalnih septi je veći nego što je to slučaj kod prethodnih grupa i maksimalno je iznosio 15, dok je longitudinalnih septi bilo do 3. Prema literaturnim podacima veličina i struktura ovih konidija odgovara vrsti *Alternaria dauci* (Simmons, 2007).

Ispitivanje uticaja ekoloških faktora

Uticaj hranljivih podloga na morfologiju, porast i sporulaciju izolata

Morfološke odlike kolonija su posmatrane na podlogama V8, PCA i PDA. Proučavani izolati na ovim podlogama formiraju tri grupe koje se podudaraju sa grupama dobijenim preliminarnom identifikacijom konidiospora.

Prvu grupu čine izolati IZB 3c, IZB 4c, IZB 7c, IZB 9c i IZB 10c, kod kojih je micelija vazdušaste teksture, tamnosive boje, pravilnih ivica, ivičnih linija oko 5 mm, sa blago ispupčenim centralnim delom micelije. Na ovim podlogama moguće je uočiti koncentrične krugove koji zapravo predstavljaju zone sporulacije. Na PCA podlozi, micelija je nešto slabija nego što je to slučaj na V8 podlozi. Sektor na miceliji nisu uočeni kod pod-

loga PCA i V8. Sa naličja micelija je mrka, ravna i ne uočavaju se promene u boji podloge.

Drugu grupu čine izolati IZB 1c, IZB 2c, i IZB 5c, kod kojih je micelija vazdušaste teksture svetlobraon sa centrom tamnije braon boje. Ivica kolonije je žućkaste boje, talasasta, debljine oko 7 mm. Na miceliji nisu uočeni sektori i zone.

Treću grupu čine izolati IZB 6c i IZB 8c koji su na podlozi V8 formirali maslinastobraon miceliju, vazdušaste teksture pravilnog kružnog oblika, sa jasno izraženim koncentričnim krugovima sa lica i naličja. Ivica je beličasta i pravilna, debljine oko 3 mm. Nije uočeno formiranje sektora, niti je dolazilo do promene boje podloge.

Prema rezultatima ispitivanja uticaja 5 različitih hranljivih podloga (Tabela 2), može se istaći da je najveći porast izolata beležen na podlozi V8, a najslabiji na podlozi MA. Najveći porast na V8 podlozi je bio kod izolata IZB 4c, a najmanji kod izolata IZB 2c. Na podlozi PCA najveći porast je kod izolata IZB 4c, a najmanji kod izolata IZB 5c. Na podlozi WA maksimalan porast je beležen kod izolata IZB 10c, a najmanji kod izolata IZB 2c. Na PDA maksimalan porast je bio kod izolata IZB 9c, a najmanji kod IZB 2c. Kod MA podloge najveći porast je zabeležen kod izolata IZB 10 c, a najmanji kod IZB 5c. S obzirom da se intenzitet porasta kolonija izolata nije dovoljno razlikovao na ispitivanim podlogama nisu se mogle izdvojiti pojedine grupe.

Nakon 5 dana intenzitet sporulacije (spore/ml suspenzije) određen pomoću hemocitometra (Tabela 3). Utvrđeno je da je V8 podloga najpogodnija za sporulisanje izolata, a najveća sporulacija je kod izolata IZB 9c. Intenzitet sporulacije izolata je manji na PCA podlozi, zatim na WA i PDA, dok je najmanja gustina spora zabeležena na podlozi MA gde izolati IZB 6c i IZB 8c nisu sporulisali. Intenzitet sporulacije ne može biti značajan taksonomski kriterijum jer se na osnovu ovog kriterijuma grupe izolata ne mogu jasno razdvojiti.

Uticaj kiselosti podloge na porast i sporulaciju izolata

Uticaj kiselosti PDA podloge na porast i sporulaciju izolata ispitivan je kod tri različite pH vrednosti podloge: 3, 6 i 9. Peti dan nakon zasedavanja posmatrane su karakteristike formiranih kolonija, porast i sporulacija izolata (Tabela 4).

Na podlozi pH 3, micelija je uglavnom pamučasta, beličaste boje i slabe bujnosti. Ivice micelije su nepravilne, mada jasno izražene. Najve-

Tabela 2. Prečnik kolonija proučavanih izolata na hranljivim podlogama (mm).
Table 2. Diameter of the studied colonies on nutrition media (mm).

Izolati Isolate	Hranljive podloge Nutrition media				
	V8	PCA	WA	PDA	MA
IZB 1c	55.7 ±0.21*	49.0 ±0.23	44.2 ±0.33	32.7 ±0.13	25.3 ±0.23
IZB 2c	41.9 ±0.32	43.7 ±0.54	40.2 ±0.21	23.6 ±0.10	21.2 ±0.55
IZB 3c	65.5 ±0.24	58.1 ±0.26	57.1 ±0.63	53.5 ±0.47	50.1 ±0.31
IZB 4c	70.4 ±0.34	67.3 ±0.35	64.4 ±0.47	56.1 ±0.15	53.4 ±0.30
IZB 5c	43.5 ±0.19	43.1 ±0.73	40.3 ±0.47	24.7 ±0.25	20.4 ±0.20
IZB 6c	58.5 ±0.21	44.3 ±0.5	45.4 ±0.30	26.4 ±0.11	24.2 ±0.13
IZB 7c	67.4 ±0.21	62.3 ±0.15	59.5 ±0.52	55.5 ±0.47	50.3 ±0.10
IZB 8c	57.3 ±0.17	46.2 ±0.39	48.2 ±0.21	32.5 ±0.54	21.7 ±0.71
IZB 9c	67.5 ±0.28	63.3 ±0.12	60.9 ±0.72	61.6 ±0.42	52.9 ±0.42
IZB 10c	66.6 ±0.27	65.8 ±0.21	67.1 ±0.65	60.4 ±0.34	56.4 ±0.86

*standardna devijacija

Tabela 3. Intenzitet sporulacije na različitim hranljivim podlogama (konidije/ml).
Table 3. Sporulation intensity on different nutrition media (conidia/ml).

Izolati Isolate	Hranljive podloge Nutrition media				
	V8	PCA	WA	PDA	MA
IZB 1c	249 ±0.33*	115 ±0.36	37 ±0.47	67 ±0.40	14 ±0.22
IZB 2c	219 ±0.24	161 ±0.29	34 ±0.15	70 ±0.31	13 ±0.39
IZB 3c	237 ±0.48	163 ±0.17	136 ±0.22	109 ±0.37	31 ±0.51
IZB 4c	174 ±0.28	151 ±0.23	153 ±0.21	93 ±0.41	27 ±0.49
IZB 5c	304 ±0.26	176 ±0.19	52 ±0.38	52 ±0.48	23 ±0.34
IZB 6c	123 ±0.38	35 ±0.44	7 ±0.40	19 ±0.18	0.0
IZB 7c	283 ±0.44	178 ±0.48	124 ±0.20	97 ±0.35	24 ±0.17
IZB 8c	98 ±0.61	17 ±0.39	6 ±0.14	13 ±0.39	0.0
IZB 9c	320 ±0.34	183 ±0.47	107 ±0.28	173 ±0.24	35 ±0.50
IZB 10c	262 ±0.36	133 ±0.28	168 ±0.38	163 ±0.51	38 ±0.41

*standardna devijacija

ći porast zabeležen je za izolati IZB 9c i IZB 10c. Najslabiji porast pokazao je izolat IZB 8. Izolati se na osnovu zabeleženog porasta ne mogu diferencirati u grupe.

Kiselost podloge pH 6 je znatno povoljnija za rast od pH 3 i 9. Na osnovu izgleda kolonija moguće je diferencirati 3 grupe izolata. Izolati IZB 3c, IZB 4c, IZB 7c, IZB 9c i IZB 10c obrazovali su vazdušastu miceliju tamnosive boje, ravnih ivica. Drugu grupu čine izolati IZB 1c, IZB 2c i IZB 5c kod kojih je micelija tamna, nepravilnih ivica. Izolati IZB 6 i IZB 8 obrazovali su beličastu miceli-

ju sa jasnim ivičnim linijama.

Na pH 9 se prema morfologiji može razlikovati prva grupa izolata, ali druge dve ne mogu. Najveći porast je bio kod izolata IZB 9c, a najmanji kod izolata IZB 5c.

Provera intenziteta sporulacije na različitim pH vrednostima podloge je pokazala da se ne mogu izvojiti posebne grupe izolata. Najveći intenzitet sporulacije pokazao je izolat IZB 9c za sve pH vrednosti. Takođe, može se uočiti da je pH 9 povoljnija za porast i sporulaciju za sve ispitivane izolati od pH 3 (Tabela 5).

Tabela 4. Porast izolata na različitim pH vrednostima podloge (mm).**Table 4.** Isolates growth rate on different pH values of nutrition media (mm).

Izolat Isolate	pH 3	pH 6	pH 9
IZB 1c	23 ± 0.33*	30 ± 0.53	28 ± 0.41
IZB 2c	20 ± 0.51	24 ± 0.47	27 ± 0.38
IZB 3c	33 ± 0.51	54 ± 0.55	49 ± 0.13
IZB 4c	37 ± 0.62	57 ± 0.28	45 ± 0.23
IZB 5c	21 ± 0.62	25 ± 0.14	23 ± 0.33
IZB 6c	20 ± 0.15	27 ± 0.21	25 ± 0.24
IZB 7c	36 ± 0.53	54 ± 0.43	45 ± 0.54
IZB 8c	19 ± 0.17	33 ± 0.31	27 ± 0.56
IZB 9c	39 ± 0.43	65 ± 0.65	50 ± 0.17
IZB 10c	39 ± 0.45	62 ± 0.59	49 ± 0.73

*standardna devijacija

Tabela 5. Intenzitet sporulacije na različitim pH vrednostima podloge (konidije/ml).**Table 5.** Sporulation intensity on different pH values of nutrient media (conidia/ml).

Izolat Isolate	pH 3	pH 6	pH 9
IZB 1c	17 ± 0.33*	50 ± 0.53	26 ± 0.41
IZB 2c	23 ± 0.51	25 ± 0.47	25 ± 0.38
IZB 3c	23 ± 0.51	53 ± 0.55	38 ± 0.13
IZB 4c	31 ± 0.62	57 ± 0.28	40 ± 0.23
IZB 5c	29 ± 0.62	37 ± 0.14	31 ± 0.33
IZB 6c	7 ± 0.15	15 ± 0.21	10 ± 0.24
IZB 7c	23 ± 0.53	53 ± 0.43	22 ± 0.54
IZB 8c	5 ± 0.17	20 ± 0.31	7 ± 0.56
IZB 9c	35 ± 0.43	97 ± 0.65	41 ± 0.17
IZB 10c	25 ± 0.45	69 ± 0.59	30 ± 0.73

*standardna devijacija

Tabela 6. Uticaj različitih temperatura na porast izolata (mm).**Table 6.** Influence of different temperatures on the growth of isolates (mm).

Izolat Isolate	5°C	13°C	20°C	25°C	30°C	35°C
IZB 1c	21.3 ± 0.27*	23 ± 0.34	26 ± 0.25	30 ± 0.26	32 ± 0.56	28 ± 0.33
IZB 2c	19.3 ± 0.56	21 ± 0.56	22 ± 0.23	26 ± 0.33	27 ± 0.37	23 ± 0.66
IZB 3c	14.3 ± 0.23	22 ± 0.98	38 ± 0.98	52 ± 0.64	47 ± 0.53	37 ± 0.13
IZB 4c	16.7 ± 0.14	27 ± 0.53	38 ± 0.67	54 ± 0.51	49 ± 0.72	39 ± 0.27
IZB 5c	19.2 ± 0.25	21 ± 0.23	23 ± 0.16	24 ± 0.34	26 ± 0.35	24 ± 0.22
IZB 6c	20.1 ± 0.38	25 ± 0.14	38 ± 0.15	53 ± 0.11	54 ± 0.36	40 ± 0.38
IZB 7c	18.4 ± 0.43	25 ± 0.86	43 ± 0.38	58 ± 0.79	52 ± 0.22	45 ± 0.57
IZB 8c	20.5 ± 0.25	24 ± 0.45	39 ± 0.27	51 ± 0.56	56 ± 0.30	40 ± 0.36
IZB 9c	22.1 ± 0.49	30 ± 0.56	42 ± 0.55	60 ± 0.56	55 ± 0.35	44 ± 0.62
IZB 10c	20.7 ± 0.30	31 ± 0.67	41 ± 0.36	60 ± 0.63	52 ± 0.74	44 ± 0.58

*standardna devijacija

Tabela 7. Uticaj temperature na intenzitet sporulacije (konidija/ml).**Table 7.** Effect of temperature on the sporulation intensity (conidia/ml).

Izolat Isolate	5°C	13°C	20°C	25°C	30°C	35°C
IZB 1c	11.4±0.24*	17.3±0.23	43.9±0.28	67.2±0.47	50.4±0.25	9.1±0.33
IZB 2c	9.6±0.19	23.5±0.47	52.8±0.51	60.7±0.90	57.5±0.19	11.8±0.28
IZB 3c	0.0	5.9±0.38	26.5±0.24	69.3±0.27	57.5±0.23	0.0
IZB 4c	0.0	9.3±0.33	32.5±0.33	73.6±0.22	59.9±0.24	0.0
IZB 5c	8.1±0.43	20.5±0.25	40.5±0.27	52.4±0.38	46.1±0.48	4.7±0.58
IZB 6c	0.0	0.0	5.3±0.48	15.7±0.41	7.5±0.56	0.0
IZB 7c	7.4±0.45	15.5±0.34	37.0±0.21	78.1±0.28	59.0±0.78	3.4±0.39
IZB 8c	0.0	2.0±0.38	7.3±0.34	14.8±0.46	5.6±0.52	0.0
IZB 9c	8.2±0.29	14.6±0.29	39.5±0.12	133.3±0.17	78.7±0.26	6.6±0.39
IZB 10c	6.7±0.41	12.9±0.38	40.5±0.37	150.8±0.44	107.3±0.48	7.5±0.25

*standardna devijacija

Tabela 8. Uticaj različitog osvetljenja na porast izolata (mm).
Table 8. The effect of lighting on the growth of isolates (mm).

Izolat Isolate	Smena svetlost-mrak 8-16h Light – Dark period 8-16h	Veštačka svetlost Artificial conditions	Potpuni mrak Complete darkness
IZB 1c	27.4 ± 0.19*	23.9 ± 0.59	25.1 ± 0.18
IZB 2c	21.6 ± 0.39	20.5 ± 0.26	20.3 ± 0.16
IZB 3c	57.6 ± 0.40	57.9 ± 0.45	54.3 ± 0.23
IZB 4c	58.7 ± 0.40	59.7 ± 0.65	56.5 ± 0.44
IZB 5c	19.8 ± 0.13	20.3 ± 0.37	20.0 ± 0.31
IZB 6c	37.7 ± 0.60	34.9 ± 0.39	33.5 ± 0.30
IZB 7c	63.4 ± 0.20	60.3 ± 0.22	62.6 ± 0.45
IZB 8c	30.5 ± 0.38	39.9 ± 0.21	31.6 ± 0.21
IZB 9c	61.0 ± 0.22	65.3 ± 0.39	62.4 ± 0.90
IZB 10c	68.5 ± 0.43	67.7 ± 0.52	61.7 ± 0.22

*standardna devijacija

Tabela 9. Uticaj različitog osvetljenja na intenzitet sporulacije izolata (konidija/ml).
Table 9. The effect of lighting on the sporulation intensity (conidia/ml).

Izolat Isolate	Smena svetlost-mrak 8-16h Light – dark period 8-16h	Veštačka svetlost Artificial light	Potpuni mrak Complete darkness
IZB 1c	80.5 ± 0.49*	71.5 ± 0.26	70.4 ± 0.67
IZB 2c	70.3 ± 0.56	57.2 ± 0.76	57.7 ± 0.73
IZB 3c	80.4 ± 0.20	72.3 ± 0.33	69.3 ± 0.56
IZB 4c	99.6 ± 0.30	70.4 ± 0.70	73.6 ± 0.78
IZB 5c	55.9 ± 0.74	57.9 ± 0.37	60.5 ± 0.70
IZB 6c	14.4 ± 0.23	9.4 ± 0.89	7.5 ± 0.27
IZB 7c	120.8 ± 0.40	73.5 ± 0.27	78.1 ± 0.34
IZB 8c	15.1 ± 0.11	9.5 ± 0.30	10.3 ± 0.43
IZB 9c	160.1 ± 0.32	140.6 ± 0.39	133.3 ± 0.13
IZB 10c	180.3 ± 0.73	160.3 ± 0.62	150.8 ± 0.45

*standardna devijacija

Uticaj temperature na morfologiju porast i sporulaciju izolata

Uticaj temperature na porast i sporulaciju izolata proučavan je na podlozi PDA i to na 6 različitih temperatura: 5°C, 13°C, 20°C, 25°C, 30°C i 35°C. Nakon 5 dana porasta ispitivane su morfološke karakteristike izolata i intenzitet sporulacije.

Prema dobijenim rezultatima, pokazalo se da su niske temperature najnepovoljnije za porast izolata. Na temperaturi 5°C najveći porast je bio kod izolata IZB 9c (Tabela 6). Svi izolati na ovoj temperaturi su obrazovali beličastu miceliju, sa jasnom ivicom. Micelija je u centru naborana, što se može videti i sa naličja. Četiri izolata na ovoj temperaturi nisu sporulisala i to IZB 3c, IZB 4c, IZB 6c, i IZB 8c. Najveći intenzitet sporulacije je kod izolata IZB 1c (Tabela 7).

Na temperaturi 13°C, porast i sporulacija su

nešto intenzivniji. Najveći porast je bio kod izolata IZB 10c, a najveća sporulacija kod IZB 2c. Morfološka kolonija je vrlo slična prethodno opisanoj.

Temperature 20°C, 25°C i 30°C su se pokazale najoptimalnije za porast i sporulaciju svih izolata. Najveći porast je kod izolata IZB 9c, a najmanji kod IZB 5c. Najveći intenzitet sporulacije je kod izolata IZB 10c.

Na temperaturi 35°C, porast kolonija i sporulacija su znatno manji. Najveće vrednosti su zabeležene kod izolata IZB 7c, a najveći intenzitet sporulacije kod IZB 10c. Četiri izolata nisu sporulisala i to IZB 3c, IZB 4c, IZB 6c i IZB 8c. Boja micelija je kod svih izolata na ovoj temperaturi bila tamnija.

Na osnovu gore navedenog se može zaključiti da temperatura nije dovoljan taksonomski kriterijum na osnovu koga bi se izdvojile određene grupe izolata.

Uticaj svetlosti na porast i sporulaciju ispitivanih izolata

Rezultati ispitivanja uticaja svetlosti su pokazali da režim svetlosti nije značajno uticao na morfologiju i porast ispitivanih izolata (Tabela 8). Različiti uslovi osvetljenja nisu značajnije uticali na izgled, boju i strukturu kolonija. Na osnovu rezultata nije se moglo sa sigurnošću utvrditi koji uslovi osvetljenja i kog trajanja stimulatивно deluju na sporulaciju, ali je primećeno da je smena veštačke svetlosti i mraka intenzivnije indukovala sporulaciju (Tabela 9). Razlika u porastu i sporulaciji između uslova mraka i svetlosti se nije mogla precizno utvrditi. Najveća gustina spora utvrđena je kod IZB 10c u uslovima smene svetlosti, a najmanja kod IZB 6c u uslovima potpunog mraka.

DISKUSIJA

U cilju proučavanja varijabilnosti patogenih vrsta roda *Alternaria* izolovanih sa celera, tokom 2012. i 2013. godine sakupljane su biljke sa područja Horgoš, Novi Pazar, Loznica, Borča i Negotin. Odbirane biljke celera su imale jasne simptome lisne pegavosti i sušenja listova, koji odgovaraju simptomima koje izazivaju patogene gljive iz roda *Alternaria* (David, 1988; Strandberget et al., 1998; Raid and Roberts, 2004; Davies et al., 2005; Pryor and Strandberg, 2002; Fararet et al., 2004; Marthe et al., 2002).

Vrste roda *Alternaria* su široko rasprostranjene i mogu inficirati do 4000 različitih domaćina (Pryor, 2003). Zbog nedovoljno jasnih kriterijuma i velike varijabilnosti ove grupe fitopatogena, klasifikacija ovog roda je u mnogim slučajevima nejasna (Rotem, 1994; Simmons, 1992; Simmons, 2007). Najčešći i najpouzdanije korišćeni morfološki karakteri za identifikaciju ovih gljiva su konidije i njihove dimenzije, broj transverzalnih i longitudinalnih septi i načini granjanja konidiofora. U velikom broju slučajeva postojala su velika slaganja ovako dobijenih morfo grupa sa molekularnim filogenetskim analizama (Pryor, 2002; Hong, 2005; Lawrence, 2012), mada se u određenim slučajevima pokazalo da rezultati dobijeni na osnovu morfologije nisu bili filogenetski informativni. Lawrence et al. (2012) navode da su morfološki karakteri vrlo korisni i neophodni za razdvajanje najvećeg broja vrsta roda *Alternaria*.

U ovom radu proučavana je morfologija izolata gajenih na različitim hranljivim podlogama, pri različitim temperaturama, različitim pH vrednosti-

ma podloge i različitim svetlosnim režimima.

Proučavanjem morfoloških karakteristika spora izdvojile su se tri grupe izolata. Kod prve grupa izolata (IZB 3c, IZB 4c, IZB 7c, IZB 9c i IZB 10c), uočene su elipsoidne konidije, u nizovima, zelenobraon boje. U skladu sa podacima Simmons (2007) veličina i struktura ovih konidija odgovarala je vrsti *A. alternata*. Kod druge grupe izolata (IZB 1c, IZB 2c i IZB 5c) spore su okruglastije, prosečnih dimenzija na V8 podlozi 15-75 x 10-50 μm sa 2-7 transverzalnih i 1-3 longitudinalnih septi. Na osnovu osobina spora, ova grupa se nije mogla jasno identifikovati. Kod treće grupe (izolati IZB 6c i IZB 8c) oblik spora je izduženo elipsoidan, dimenzija 43-100 x 16-27 μm, sa vratovima koji su bili dužine do 300 μm. Broj transverzalnih septi je bio veći nego kod prethodnih grupa i maksimalno je iznosio 15, dok je broj longitudinalnih septi do 3. Prema Simmons (2007) navedene osobine odgovaraju vrsti *Alternaria dauci*.

Dalja ispitivanja uticaja hranljivih podloga su pokazala da su se izolati razlikovali po porastu i boji micelije, boji i širini ivične linije kao i po intenzitetu sporulacije. Najveći porast izolati su pokazali na podlozi V8 (izolat IZB 4c), zatim na podlogama PCA (izolat IZB 4c), WA (izolat IZB 10c), PDA (izolat IZB 9c), a najslabiji porast za sve izolate beležen je na podlozi MA (izolat IZB 5c). Na podlozi V8 izdvojile su se 3 grupe izolata, identične raspodeli koju su pružila proučavanja morfologije spora. Prva grupa izolata se izdvojila na osnovu vazdušaste micelije svetlosive boje, ravnih ivica; druga grupa na osnovu pamučaste micelije mrke boje, talasastih ivica, a treća grupa je sa beličastom micelijom vazdušaste strukture sa izdignutim centrom. Ovi rezultati su u saglasnosti sa navodima Simmons (2007). Porast kolonija izolata se nije razlikovao dovoljno da bi se mogle izdvojiti grupe izolata. Takođe je utvrđeno da je V8 hranljiva podloga najpogodnija za sporulisanje svih izolata. Zbog razlika u gore navedenim vrednostima, uticaj hranljivih podloga ne može biti značajan samostalni taksonomski kriterijum jer se ne mogu jasno izdvojiti grupe izolata.

Uticaj kiselosti PDA podloge na porast i sporulaciju izolata ispitivan je na 3 različite pH vrednosti podloge: 3, 6 i 9. Najpovoljnija za porast i sporulaciju izolata je pH 6 gde se mogu izdvojiti grupe koje su i ranije uočene. Na osnovu izgleda kolonija na pH 6 moguće je diferencirati tri grupe izolata. Izolati prve grupe, IZB 3c, IZB 4c, IZB 7c, IZB 9c i IZB 10c su obrazovali vazdušastu miceliju tamnosive boje, ravnih ivica; izolati druge grupe IZB 1c, IZB 2c i IZB 5c su sa tamnom micelijom, nepravilnih ivica i slabog porasta i intenziteta sporulacije; treća grupa izolata IZB 6 i IZB 8 obrazovala je beličastu miceli-

ju sa jasnim ivicama. Ovakav opis kolonija navode i drugi autori (Pryor, 2002; Yu, 1992). Prema našim rezultatima i Ellis (1971) navodi da je pH 9 povoljnija za porast i sporulaciju izolata od pH 3.

Rezultati ispitivanja uticaja temperature na porast, sporulaciju i morfologiju izolata nisu pokazali značajne razlike u karakterima da bi se na osnovu njih izvršila identifikacija. Optimalne temperature su bile od 20°C, 25°C i 30°C, što je bilo u skladu sa navodima Mogan and Lacey (1984). Sporulacija i porast su bili znatno smanjeni na temperaturama 35°C, 13°C i 5°C. Na osnovu temperature kao ekološkog faktora nije moguće izdvojiti grupe izolata, stoga ova ispitivanja nisu bila pouzdan kriterijum za taksonomiju.

Ispitivanja uticaja svetlosti su pokazali da režim svetlosti ne utiče značajno na morfologiju, porast i sporulaciju ispitivanih izolata. Pod uticajem svetlosti izdvojili su se izolati IZB 6c i IZB 8c koji su prethodno identifikovani kao *A. dauci*, što je u skladu sa navodima Strandberg (1977), dok se ostali izolati nisu značajnije razlikovali.

Svi ispitivani izolati su ispoljili porast i spo-

rulaciju na svim ispitivanim uslovima u ovom radu, što ukazuje na njihovu veliku prilagodljivost ekološkim faktorima, a to može biti posledica njihove varijabilnosti i široke rasprostranjenosti u različitim klimatskim i ekološkim uslovima (Thomma, 2003). Proučavanje uticaja hranljivih podloga, temperature, kiselosti i svetlosti kao posebnih taksonomskih kriterijuma nisu dovoljna za identifikaciju, razlikovanje i grupisanje gljiva unutar roda *Alternaria*. Kako bi se razumelo poreklo velike varijabilnosti i bolje upoznala genetička struktura populacije gljiva iz roda *Alternaria* poreklom sa celera, moraju se izvršiti dalja molekularna istraživanja. U svakom slučaju, rezultati pokazuju da je ispitivanje morfoloških karakteristika izolata neophodno za identifikaciju, klasifikaciju i procenu genetičke raznovrsnosti vrsta roda *Alternaria*.

ZAHVALNICA

Rad je realizovan u okviru projekta TR31018 Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

LITERATURA

- Constance, L. (1971): History of the classification of Umbelliferae (Apiaceae). Heywood, V. H. Šed.Ć. The biology and chemistry of the Umbelliferae, 1-11. Academic Press, London.
- Downie, S. R., D. S. Katz-Downie, and M. F. Watson (2000): A phylogeny of the flowering plant family *Apiaceae* based on chloroplast DNA *rpl16* and *rpoC1* intron sequences: towards a suprageneric classification of subfamily *Apioideae*. *American Journal of Botany*, 87: 273-292.
- David, J. C. (1988): *Alternaria dauci*. CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria. Commonwealth Mycological Institute, Kew Surrey England., No. 951.
- Dhingra, O. D. and Sinclair, J. B. (1986): *Basic Plant Pathology Methods*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, USA, pp. 1-355.
- Farrar, J., Pryor, B., A., and Davis, R. M. (2004): *Alternaria* diseases of carrot. *Pl. Dis.*, 88: 776-784.
- Elliot, J. A. (1917): Taxonomic characters of the genera *Alternaria* and *Macrosporium*. *American Journal of Botany*, 4: 439-476.
- Ellis, M. B. (1971): *Demataceous hyphomycetes*. CAB International, Wallingford, Oxon, England. 608 pp. Sinclair, W. A., Lyon, H. and Johnson, W. T. 1987. *Diseases of Trees and Shrubs*. Cornell University Press, Ithaca, NY, USA. 575 pp.
- Ellis, M. B. and Holliday, P. (1972): *Alternaria radicina*. CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria. Commonwealth Mycological Institute, Kew Surrey England.No. 346.
- Hong, S. G. and Pryor, B. M. (2005): Development of selective media for the isolation and enumeration of *Alternaria* species from soil and plant debris. *Can. J. Microbiol. / Rev. Can. Microbiol.*, 50: 461-468.

- Joly, P. (1964): Le genre *Alternaria*. Recherches physiologiques, biologiques et systematiques. Encyclopedie Mycologique, No. 33. P. Chevalier, Paris.
- Koiike, S. T., Gladders, P., and Paulus, A. O. (2006): Vegetable diseases: A color handbook. Boston: Academic Press.
- Marthe, F., Scholze, P., Kramer, R., Proll, E., Hammer, K. (2002): Evaluation of parsley for resistance to the pathogens *Alternaria radicina*, *Erysiphe heraclei*, *Fusarium oxysporum* and celery mosaic virus (CeMV). Plant Breeding, 122: 3.
- Muntanola-Cvetković, M. (1987): Opšta mikologija, Niro Književne novine, Beograd, pp. 13-320.
- Mogan, N., Lacey, J. (1984): Effects of temperature and pH on water relations of field and storage fungi. Transaction of the British Mycological Society, 82(1): 71-82.
- Nonnecke, I. L. (1989): Vegetable production. New York: Van Nostrand Reinhold.
- Peever, T. L., Ibanez, A., Akimitsu, K. and Timmer, L. W. (2004): World wide phylogeography of the citrus brown spot pathogen, *Alternaria alternata*. Phytopathology, 92: 794-802.
- Pryor, B. M. and Gilbertson, R. L. (2002): Relationships and taxonomic status of *Alternaria radicina*, *A. carotiincultae* and *A. petroselini* based upon morphological, biochemical and molecular characteristics. Mycologia, 94 (1): 49-61.
- Pryor, B. M. (2002): *Alternaria* Leaf Blight of Cumin. In Compendium of Umbelliferous Crop.
- Pryor, B. M. and Michailides, T. J. (2002): Morphological, pathogenic and molecular characterization of *Alternaria* isolates associated with alternaria late blight of pistachio. Phytopathology, 92: 406-416.
- Pryor, B. M. and Strandberg, J. O. (2002): *Alternaria* Leaf Blight of Carrot. In Compendium of Umbelliferous Crop Diseases, Edited by Davis, R. M. and Raid, R. N., The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, pp. 15-16.
- Pryor, B. M., Strandberg, J. O., Davis, R. M. Nunez, J. J. and Gilbertson, R. L. (2002): Survival and persistence of *Alternaria dauci* in carrot cropping systems. Plant. Dis., 86: 1115-1122.
- Pryor, B. M. (2002): *Alternaria* Leaf Blight of Parsley. In Compendium of Umbelliferous Crop Diseases, Edited by Davis, R. M. and Raid, R. N., The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, pp. 17.
- Pryor, B. M. (2002): Black Rot. In Compendium of Umbelliferous Crop Diseases, Edited by Davis, R. M. and Raid, R. N., The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, pp. 25-27.
- Pryor, B. (2003): *Alternaria* online. *Alternaria* on line, University of Arizona Diseases, Edited by Davis, R. M. and Raid, R. N., The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, pp. 16.
- Raid, R. and Roberts, P. (2004): *Alternaria* leaf spot (*Alternaria radicina*). Specific common diseases. in 2004 Florida Plant Disease Management Guide: Parsley.
- Raid, R. N. (2002): Early Blight of Celery. In Compendium of Umbelliferous Crop Diseases, Edited by Davis, R. M. and Raid, R. N., The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, pp. 20-21.
- Rotem, J. (1994): The genus *Alternaria*, Biology, Epidemiology and Pathogenicity. APS Press, St Paul, Minnesota, pp. 1-325.

- Sheppard, J. and Maddox, D. (2001): Detection of *Alternaria dauci* and *Alternaria radicina* on Carrot (*Daucus carota*). International seed health Initiative-Vegetables, pp 1-14.
- Simmons E.G. (1967): Typification of *Alternaria*, *Stemphylium*, and *Ulocladium*. *Mycologia*, 59:67-92.
- Simmons, E. G. (1992): *Alternaria* Taxonomy: Current Status, Viewpoint, Challenge. In *Alternaria* Biology, Plant Diseases and Metabolites, Topics in Secondary Metabolism – Volume 3, ed. by Chelkowski, J. and Visconti, A., Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, pp: 1-35.
- Simmons, E.G., Roberts, R.G. (1993): *Alternaria* themes and variations (73). *Mycotaxon* 48, 109-140.
- Simmons, E.G. (2007): *Alternaria*. An identification manual. Utrecht, the Netherlands: CBS Biodiversity Series 6. pp. 1-775.
- Solfrizzo, M., De Girolamo, A., Vitti, C., Visconti, A. and van den Bulk, R. (1992): Liquid Chromatographic Determination of *Alternaria* Toxins in Carrots. PMID: 15084092 (PubMed – indexed for MEDLINE).
- Strandberg, J. O. (1977): Spore Production and Dispersal of *Alternaria dauci*. *Phytopathology*, 67: 1262-1266.
- Strandberg, J. O. (1987): Isolation, storage and inoculum production methods for *A. dauci*. *Phytopathology*, 77: 1008-1012.
- Strandberg, J. O. (1992): *Alternaria* Species that Attack Vegetable Crops: Biology and Options for Disease Management. In *Alternaria* Biology, Plant Diseases and Metabolites, Topics in Secondary Metabolism – Volume 3, ed. by Chelkowski, J. and Visconti, A., Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, pp: 175-208.
- Strandberg, J. O. (2002): A selective medium for the detection of *Alternaria dauci* and *Alternaria radicina*. *Phytoparasitica* 30: 269-284.
- Thomma, B. P. H. J. (2003): *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite. *Molecular Plant Pathology*, 4: 225-236.
- Wiltshire S.P. (1947): Species of *Alternaria* on brassicae. *Mycolog Paper*, 20: 1 – 15.
- Wearing, A. H. (1980): *Alternaria radicina* on celery in South Australia. *APP Aust Plant Pathology*, Melbourne: Australian Plant Pathology Society, 9: 116.
- Yu, H. S. (1992): Occurrence of *Alternaria* species in Counties of the Far East and Their Taxonomy. In *Alternaria* Biology, Plant Diseases and Metabolites, Topics in Secondary Metabolism – Volume 3, ed. by Chelkowski, J. and Visconti, A., Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, pp: 37-62.

(Priljeno: 20.01.2014.)
(Prihvaćeno: 19.03.2014.)

MORPHO-PHYSIOLOGICAL STUDY OF *ALTERNARIA* SPP. ISOLATES FROM CELERY

JOVANA BLAGOJEVIĆ¹, VIOLETA ORO², IVAN NIKOLIĆ², TATJANA POPOVIĆ²,
GORAN ALEKSIĆ², VELJKO GAVRILOVIĆ², ŽARKO IVANOVIĆ²

¹Scholar of Ministry of Education, Science and Technological Development
of the Republic of Serbia

²Institute for Plant Protection and Environment, Belgrade, Serbia
e-mail:kipepeo11@gmail.com

SUMMARY

Genus *Alternaria* represents one of the most important pathogens of *Apiaceae* family. Alternariose symptoms may develop on foliage causing leaf spot, necrosis and eventually drying and black root. Celery plants with characteristic symptoms were collected during 2012 and 2013 in Serbia. The preliminary identification was done by analysis of morphological characteristics of conidia. After identification cultural characteristics, growth rate and spore morphology were examined and compared based on influence of ecological factors such as nutrient medium, temperature, pH value of the medium and light quality.

Key words: celery, *Alternaria*, morphology, physiology, mycelial growth, sporulation

(Received: 20.01.2014.)

(Accepted: 19.03.2014.)

Zaštita bilja
Vol. 65 (1), N°287, 27-32, 2014, Beograd
Plant Protection
Vol. 65 (1), N°287, 27-32, 2014, Belgrade

UDK: 634.711-248.231;
631.147
Naučni rad
Scientific paper

SUZBIJANJE *DIDYMELLA APPLANATA* U ZASADIMA MALINE PRIMENOM NOVIJIH ORGANSKIH FUNGICIDA TOKOM VEGETACIJE

MILOŠ STEVANOVIĆ, NENAD DOLOVAC, NENAD TRKULJA,
ANJA MILOSAVLJEVIĆ, SLOBODAN KUZMANOVIĆ, GORAN ALEKSIĆ

Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Beograd
e-mail: stevanovicmilos14@yahoo.com

REZIME

Prouzrokovajući »kompleksa sušenja« maline predstavljaju najveći problem u njenoj proizvodnji smanjujući prinose i životni vek zasada. Ovaj kompleks sačinjen je od više prouzrokovaca bolesti, a najznačajniji u tom kompleksu je *Didymella applanata*, prouzrokovac kestenaste pegavosti maline. S obzirom na biologiju patogena tretiranje biljaka tek nakon berbe nije dovoljno efikasno jer patogen u povoljnim uslovima može da zarazi malinu daleko ranije. Cilj rada je ispitivanje efikasnosti novijih organskih fungicida primenjenih pre i posle berbe maline kao i međusobno poredjenje njihove biološke efikasnosti. Dobijeni rezultati pokazuju da su ispitivani fungicidi ispoljili veoma visoku efikasnost u suzbijanju *D. applanata* kako na listu tako i na izdancima maline (od 83.0 – 96.5%).

Cljučne reči: *Didymella applanata*, fungicidi, efikasnost, malina.

UVOD

Ukupnom proizvodnjom od 637.765 t godišnje (FAOSTAT, 2011) malina zauzima značajno mesto u voćarskoj proizvodnji u svetu. U Srbiji je po količini i vrednosti proizvodnje najvažnija jagodasta voćna vrsta, a takodje i najrentabilnija voćka (Nikolić i Milivojević, 2010.). Proizvodnju maline ugrožavaju brojni prouzrokovaci bolesti koji nanose velike štete u proizvodnji i iziskuju ulaganje značajnih sredstava za njihovo suzbijanje. Prouzrokovaci »kompleksa sušenja« maline predstavljaju najveći problem u njenoj proizvodnji smanjujući prinose i životni vek zasada. Ovaj kompleks sačinjen je od više prouzrokovaca bolesti, a najznačajniji u tom kompleksu je *Didymella applanata*, prouzrokovac kestenaste pegavosti maline. Osim maline gljiva napada i kupinu kao i hibride nastale njihovim ukrštanjem (Williamson, 1997). Bolest se javlja u različitom intenzitetu iz godine u godinu, u zavisnosti od uslova spoljašnje sredine, pre svega od vlage. U sušnim godinama bolest se slabo razvija dok se u kišnim i vlažnim uslovima bolest razvija veoma intenzivno. Simpto-

mi bolesti mogu se videti na listu i stablu. Na listu se javljaju nekrotične pege u obliku slova »V« koje najčešće počinju sa ivice lista i šire se uz lisni nerv, a oko pege se može uočiti hlorotični oreol (Ivanović i Ivanović, 2005). Sa lista, zaraza se širi na lisnu dršku a potom i na stablo na kome se javljaju kestenjaste pege koje se šire oko nodusa i mogu se čak spojiti i pokriti čitavu internodiju. Tokom zime pege se »izbeljuju« i dobijaju srebrnkastu ili sivkastu boju i u njima se mogu uočiti pseudotecije, kasnije i piknidi (Ivanović, 2001). Zaraženi izdanci bivaju oslabljeni, lako izmrzavaju, a ako se u proleće iz zaraženih pupoljaka formiraju rodne grančice one će dati sitne i neugledne plodove. Tokom narednog proleća i leta dolazi do pucanja i odvajanja kore sa izdanaka (Ivanović i Ivanović, 2005).

Zaštita maline od ove bolesti veoma je teška. Osim uklanjanja i uništavanja izdanaka koji su doneli rod jedina efikasna mera u kontroli bolesti je primena fungicida. U praksi je primena fungicida ograničena dugim vremenom berbe maline, i najčešće se izvodi tek po završenoj berbi. S obzirom na biologiju patogena tretiranje

biljaka tek nakon berbe nije dovoljno efikasno jer patogen u povoljnim uslovima može da zarazi malinu daleko ranije. Osnovna pretpostavka je da sa tretmanima biljaka treba početi znatno ranije pre berbe, vodeći računa o karenci, kako bi se postigla maksimalna efikasnost u primeni fungicida što bi obezbedilo ne samo veće prinose naredne godine već i dugovečnost zasada koji se progresivno suše iz godine u godinu usled neadekvatnog suzbijanja bolesti. Stoga je i cilj rada ispitivanje efikasnosti novijih organskih fungicida koji se, s obzirom na mehanizam delovanja i zadržavanja u vidu rezidua u plodovima, mogu primeniti ne samo posle već i pre berbe maline kao i međusobno poredjenje njihove biološke efikasnosti.

MATERIJAL I METODE

Ogled je izveden tokom 2013. godine na dva lokaliteta, Donja Kamenica (Valjevo) i Divljaka (Arilje), u zasadima maline sorte Willamette starosti od 5 godina (Donja Kamenica) i 7 godina (Divljaka). Uzgojni oblik je špalirskog tipa. Za ispitivanje efikasnosti fungicida u suzbijanju *D. applanata* ne postoje standardizovane EPPO metode kao za većinu drugih prouzrokovaca bolesti pa je ogled po-

stavljen i vođen prema iskustvima struke kao i po drugim standardnim metodama koje se koriste za ispitivanje efikasnosti fungicida u drugim voćarskim kulturama. Osnovni podaci o primeni prikazani su u Tabeli 1.

Eksperimentalni plan organizovan je po potpuno slučajnom blok sistemu po metodi PP 1/152 (2) (EPPO, 1997a). Veličina osnovne parcele bila je 25 m², a ogled je izveden u četiri ponavljanja. Primena fungicida vršena je motornim lednim orošivačem marke Solo (Solo Port 423, Germany), potpunim kvašenjem biljaka uz upotrebu 1000 l/ha vode. Biljke su tretirane ukupno po pet puta na oba lokaliteta i to 3 puta pre i dva puta posle berbe maline od fenofaze 60-92 po BBCH skali.

Ocena ogleđa uradjena je na listu i stablu jednogodišnjih izdanaka kada se ispoljila dovoljno jasna razlika između kontrole i tretiranih varijanti. Na listu, ocena bolesti uradjena je po skali od 0-4 (0- bez zaraze, 1- od 1 do 10 % lisne površine zahvaćeno bolešću, 2- od 10-25 % lisne površine zahvaćeno bolešću, 3- od 25 - 50 % lisne površine zahvaćeno bolešću, i 4- preko 50 % lisne površine zahvaćeno bolešću), dok je na stablu posmatrana pojava kestenastih pega na nodusima i beležen broj obolelih kao i ukupan broj nodusa na posmatranim izdancima.

Tabela 1. Detalji primene fungicida.

Table 1. Details of fungicides application.

Broj tretmana/ No. of treatment	Lokalitet/Locality					
	Donja Kamenica			Divljaka		
	Vreme primene/ Time of application	BBCH	t°C	Vreme primene/ Time of application	BBCH	t°C
1.	15.05.2013.	60	18	16.05.2013.	60	19
2.	30.05.2013.	67	19	31.05.2013.	67	16
3.	14.06.2013.	85	23	14.06.2013.	85	21
4.	23.07.2013.	91	26	25.07.2013.	91	26
5.	16.08.2013.	92	20	15.08.2013.	92	22
Vreme ocene/ Time of assessment	08.10.2013.			27.09.2013.		

Obrada podataka obavljena je primenom standardnih statističkih metoda PP 1/181 (2) (EPPO, 1997b). Intenzitet bolesti na listu izračunat je prema formuli Townsend-Heuberger-a,

$$DS (\%) = \frac{\sum (nv)}{4N}, \text{ gde je } n - \text{ broj listova po kategoriji, } v - \text{ kategorija zaraze, } N - \text{ ukupan broj listova.}$$

Izračunavanje intenziteta bolesti na stablu vršeno je po formuli

$$DS (\%) = \frac{X}{Y} \times 100, \text{ gde je } X - \text{ broj zaraženih nodusa po ponavljanju, a } Y - \text{ ukupan broj nodusa po ponavljanju.}$$

Efikasnost fungicida izračunata je prema formuli Abbott-a (Abbott, 1925),

$$FE (\%) = \frac{X-Y}{X} \times 100, \text{ gde je } X - \text{ intenzitet bolesti u kontroli, } Y - \text{ intenzitet bolesti u ispitivanoj varijanti.}$$

Dobijeni podaci su potom analizirani primenom ANOVE, a sredine su poređene Duncan-ovim testom.

REZULTATI I DISKUSIJA

Rezultati efikasnosti fungicida prikazani su u tabelama 2, 3, 4, i 5. U netretiranim kontrolnim varijantama na oba lokaliteta bolest se razvila u umerenom intenzitetu i to, 20,8 - 22,6% na listu i 33,1 - 34,5% na izdancima. Svi ispitivani fungicidi ispoljili su statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu. Rezultati prikazani u navedenim tabelama pokazuju da su ispitivani fungicidi ispoljili veoma visoku efikasnost u suzbijanju *D. applanata* kako na listu tako i na izdancima maline.

Najbolji rezultati dobijeni su u varijanti gde je primenjen izopirazam 100 g/l + difenokonazol 40 g/l u koncentraciji od 0,15 % (do 96,3 i 95,8 % na

listu odnosno na izdancima). Nešto nižu efikasnost (do 95,9 na listu i do 96,5 na izdancima) ispoljio je azoksistrobin 250 g/l primenjen u koncentraciji od 0,075 %. Izopirazam 100 g/l + difenokonazol 40 g/l primenjen u koncentraciji od 0,1 % ispoljio je efikasnost od 94,8-93,2 % na listu odnosno izdancima što je nešto niže u odnosu na efikasnost u varijanti sa višom koncentracijom. Varijanta u kojoj je primenjen difenokonazol 250 g/l u koncentraciji primene od 0,05 % ispoljila je nižu efikasnost od predhodnih fungicida (do 86,2% na listu odnosno do 87 % na izdancima). Iako postoje razlike u efikasnosti jedino difenokonazol 250 g/l ispoljava statistički značajnu razliku u odnosu na druge ispitivane fungicide.

Tabela 2. *Didymella applanata*. Intenzitet zaraze lista maline. (Donja Kamenica, 2013.).

Table 2. *Didymella applanata*. Disease intensity on raspberry leaves. (Donja Kamenica, 2013.).

Fungicid/ Fungicide	Konc.prim./ Concentration	Ms*	Sd	E%
Izopirazam 100 g/l + difenokonazol 40 g/l/ Isopyrasam 100 g/l + difenoconazole 40 g/l	0,1%	1.08 a	0.10	94.8
Izopirazam 100 g/l + difenokonazol 40 g/l/ Isopyrasam 100 g/l + difenoconazole 40 g/l	0,15%	0.84 a	0.20	96.0
Difenokonazol 250 g/l/ Difenoconazole 250 g/l	0,05%	3.55 b	0.45	83.0
Azoksistrobin 250 g/l/ Asoksistrobin 250 g/l	0,075%	0.85 a	0,13	95.9
Netretirana kontrola/ Untreated control	-	20.8 c	1,14	-

*Vrednosti obeležene istim slovima ne razlikuju se statistički značajno ($p < 0,05$). LSD0.05= 0,93

*Mean values in columns followed by different letters are significantly different ($p < 0,05$). LSD0.05= 0,93

Tabela 3. *Didymella applanata*. Intenzitet zaraze izdanaka maline. (Donja Kamenica, 2013.).
Table 3. *Didymella applanata*. Disease intensity on raspberry canes. (Donja Kamenica, 2013.).

Fungicid/ Fungicide	Konc.prim./ Concentration	Ms*	Sd	E%
Izopirazam 100 g/l + difenokonazol 40 g/l/ Isopirasam 100 g/l + difenoconazole 40 g/l	0,1%	2.36 a	0.52	93.2
Izopirazam 100 g/l + difenokonazol 40 g/l/ Isopirasam 100 g/l + difenoconazole 40 g/l	0,15%	1.51 a	0.38	95.6
Difenokonazol 250 g/l/ Difenoconazole 250 g/l	0,05%	4.50 b	0.71	87.0
Azoksistrobin 250 g/l/ Asoksistrobin 250 g/l	0,075%	1.20 a	0,16	96.5
Netretirana kontrola/ Untreated control	-	34.5 c	2,31	-

*Vrednosti obeležene istim slovima ne razlikuju se statistički značajno ($p < 0,05$). LSD0.05= 1,66

*Mean values in columns followed by different letters are significantly different ($p < 0,05$). LSD0.05= 0,93

Tabela 4. *Didymella applanata*. Intenzitet zaraze lista maline. (Divljaka, 2013.).
Table 4. *Didymella applanata*. Disease intensity on raspberry leaves. (Divljaka, 2013.).

Fungicid/ Fungicide	Konc.prim./ Concentration	Ms*	Sd	E%
Izopirazam 100 g/l + difenokonazol 40 g/l/ Isopirasam 100 g/l + difenoconazole 40 g/l	0,1%	1.55 a	0.65	93.1
Izopirazam 100 g/l + difenokonazol 40 g/l/ Isopirasam 100 g/l + difenoconazole 40 g/l	0,15%	0.83 a	0.29	96.3
Difenokonazol 250 g/l/ Difenoconazole 250 g/l	0,05%	3.13 b	0.61	86.2
Azoksistrobin 250 g/l/ Asoksistrobin 250 g/l	0,075%	1.10 a	0,27	95.1
Netretirana kontrola/ Untreated control	-	22.6 c	1,88	-

*Vrednosti obeležene istim slovima ne razlikuju se statistički značajno ($p < 0,05$). LSD0.05= 1,41

*Mean values in columns followed by different letters are significantly different ($p < 0,05$). LSD0.05= 0,93

Dobijeni rezultati u saglasnosti su sa rezultatima drugih autora, koji su dobili pozitivne rezultate u suzbijanju *D. applanata* primenom organskih fungicida. Rekanović i saradnici, 2012. su, u ispitivanjima efikasnosti fungicida i biofungicida u suzbijanju *D. Applanata*, utvrdili da su najbolju efikasnost ispoljili Acanto Plus (81.29 - 87.63%) i Switch 62.5-WG (82.28 - 85.29%). U navedenim istraživanjima, dobru efikasnost pokazali su i Amistar Extra, Folicur EM 50-WP i Signum. Biofungicidi koje su ispitivali, ispoljili su nisku efikasnost, F-Stop (7.98 - 11.16%) i Polyversum (14.19 - 16.94%). Shternshis i sar. (2006) su ispitujući efe-

kat hitinase u suzbijanju *D. applanata* u *in vitro* i poljskim uslovima utvrdili značajan stepen inhibicije formiranja plodonosnih tela i razvoja patogena. Navedeni podaci ukazuju na činjenicu da je primena organskih fungicida u suzbijanju pomenutog patogena neophodna, ne samo posle berbe, nego i pre berbe (vodeći računa o karenci), kako bi se postigla optimalna kontrola bolesti u zasadima maline. Pravovremenom primenom fungicida u toku vegetacije može se postići dobra kontrola ovog patogena i dobro zdravstveno stanje malinjaka čime se obezbeđuje dobar, kvalitetan rod i dugovečnost zasada.

Tabela 5. *Didymella applanata*. Intenzitet zaraze izdanaka maline. (Divljaka, 2013.).
Table 5. *Didymella applanata*. Disease intensity on raspberry canes. (Divljaka, 2013.).

Fungicid/ Fungicide	Konc.prim./ Concentration	Ms*	Sd	E%
Izopirazam 100 g/l + difenokonazol 40 g/l/ Isopyrasam 100 g/l + difenoconazole 40 g/l	0,1%	2.4 a	0.80	92.7
Izopirazam 100 g/l + difenokonazol 40 g/l/ Isopyrasam 100 g/l + difenoconazole 40 g/l	0,15%	1.4 a	0.15	95.8
Difenokonazol 250 g/l/ Difenoconazole 250 g/l	0,05%	4.4 b	0.88	86.6
Azoksistrobin 250 g/l/ Asoksistrobin 250 g/l	0,075%	1.5 a	0,45	95.5
Netretirana kontrola/ Untreated control	-	33.1 c	1,81	-

*Vrednosti obeležene istim slovima ne razlikuju se statistički značajno ($p < 0,05$). $LSD_{0,05} = 1,56$

*Mean values in columns followed by different letters are significantly different ($p < 0,05$). $LSD_{0,05} = 0,93$

ZAHVALNICA

Rad je realizovan u okviru projekta TR31018, Ministarstva za prosvetu i nauku Republike Srbije.

LITERATURA

Abbott, W.S. (1925): A method of computing effectiveness of an insecticide, *Journal of Economic Entomology*, 18: 265-267.

EPPO (1997a): Guidelines for the efficacy evaluation of plant protection products: Design and analysis of efficacy evaluation trials – PP 1/152(2), in EPPO Standards: Guidelines for the efficacy evaluation of plant protection products, 1, EPPO, Paris: 37-51.

EPPO (1997b): Guidelines for the efficacy evaluation of plant protection products: Conduct and reporting of efficacy evaluation trials – PP 1/181(2), in EPPO Standards: Guidelines for the efficacy evaluation of plant protection products, 1, EPPO, Paris: 52-58.

FAOSTAT (2011) :<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>.

Ivanović, M., Ivanović, D. (2001): Mikoze i Pseudomikoze biljaka. P. P.D-M-V, Beograd, pp. 270-273.

Ivanović, M., Ivanović, D. 2005. Bolesti voćaka i vinove loze i njihovo suzbijanje. Beograd. pp. 264-269.

Nikolić, D., M., Milivojević, M., J. (2010): Jagodaste voćke, tehnologija gajenja. Beograd.

Shternshis V. Margarita, Beljaev A. A., Shpatova V. Tatjana, Duzhak B.A., Panfilova I. Zoja (2006): The effect of chitinase on *Didymella applanata*, the causal agent of raspberry cane spur blight. *BioControl*, 51: 311-322.

Rekanovic, E., Stepanovic, M., Potocnik, I., Milijasevic-Marcic, S., Todorovic, B., Duduk, B., Gavrilovic, V. (2012): Field Efficacy of Fungicides and Biofungicides in the Control of Spur Blight of Raspberries in Serbia. X International Rubus and Ribes Symposium, vol. 946 br., str. 289-292.

Williamson, B. (1997): Spur blight. In: Compendium of raspberry and Blackbarry Diseases and Insects, ed. Ellis et al., APS Press. St. Paul, Minnesota, USA, pp. 7-9.

(Primljeno: 30.01.2014.)
(Prihvaćeno: 03.03.2014.)

CONTROL OF *DIDYMELLA APPLANATA* IN RASPBERRY ORCHARDS USING NEW ORGANIC FUNGICIDES DURING VEGETACION

MILOŠ STEVANOVIĆ, NENAD DOLOVAC, NENAD TRKULJA,
ANJA MILOSAVLJEVIĆ, SLOBODAN KUZMANOVIĆ, GORAN ALEKSIĆ

Institute for Plant Protection and Environment, Belgrade, Serbia
e-mail: stevanovicmilos14@yahoo.com

SUMMARY

Raspberry cane decay disease are the major problem in its production by reducing yield and lifetime of orchards. This disease cause a several disease-causing agents, and the most important is *Didymella applanata*, causal agent of raspberry spur blight. With regard to the biology of the pathogen fungicide use postharvest is not efficient enough because pathogen can infect raspberry far earlier. Therefore, the aim of this study is testing the efficacy of newer organic fungicides applied before and after the harvest raspberries and mutual comparison thereof on biological efficacy. The results show that the tested fungicides exhibited very high efficacy against *D. applanata* on the raspberry leaves and the canes (from 83.0 - 96.5%).

Key words: *Didymella applanata*, fungicides, efficacy, raspberry

(Received: 30.01.2014.)

(Accepted: 03.03.2014.)

THE POSSIBILITY OF SPREADING *LEPTOSPHAERIA MACULANS* AND *LEPTOSPHAERIA BIGLOBOSA* BY RAPESEED SEED

PETAR MITROVIĆ¹, ŽELJKO MILOVAC¹, VOJISLAV TRKULJA², BOJAN JOCKOVIĆ¹,
VELIMIR RADIĆ¹, NENAD DUŠANIĆ¹, ANA MARJANOVIĆ-JEROMELA¹

¹Institute of Field and Vegetable Crops Novi Sad, Serbia

²Agricultural Faculty Banja Luka, Agricultural Institute Banja Luka

SUMMARY

Stem canker (blackleg) is economically the most important disease of oilseed rape worldwide. This disease is caused by two species of pathogenic fungi of the genus *Leptosphaeria*: *Leptosphaeria maculans* (Desm.) ces. and de Not anamorf *Phoma lingam* (Tode. Fr.) Desmas, that causes stem canker and blackleg root and *Leptosphaeria biglobosa* Shoem and Brun, that causes symptoms such as cancers of the upper part of the stem usually causing less damage, and can cause serious damage in countries with higher summer temperatures. Pathogenic fungi from one area to another are transmitted by ascospores and contaminated (infected) seed. In order to prove the modes of transmission of parasites, the test is done transmitting the parasite by seeds. Disinfected seeds of oilseed rape cultivars Quinta were submerged in the suspension of pycnospores. Submerged seeds were kept at 20 °C ± 1 °C and 12 h photoperiod for 48 h. After planting in plastic containers seeds were kept at 25 °C ± 1 °C and 12h photoperiod. In this experiment the following isolates were used: C-5, L-5, K-7, LJ-3, S-11, St-1, GS-3 and Lm as a reference isolate (*L. maculans*) followed by K-113, K-115 and Lb as a reference isolate (*L. biglobosa*). The symptoms were assessed after 7 and 14 days after emergence. Ratings were made with + which meant visible symptoms on cotyledons or hypocotyl and - what referred to healthy plants. After 7 days, the isolates (Lm, C-5, L-5, K-7, LJ-3, S-11, St-1, GS-3) were caused disease symptoms on plants of oilseed rape. This pathogenicity is reflected in the number of seedlings, leaf spots and stalk lodging cotyledons. At isolate Lb (reference isolate *L. biglobosa*) K-113 and K-115 after 7 and 14 days was not observed pathogenicity on rapeseed plants. The control variety seeds were soaked in distilled water. The trial was set in 6 reps, and pathogenicity of fungal isolates in relation to the control was tested using Dunette's test. After 14 days re-isolation of pathogen was done.

Key words: *Leptosphaeria maculans*, *Leptosphaeria biglobosa*, pathogenicity, pycnospores, seeds, stem canker

INTRODUCTION

Oilseed rape (*Brassica napus* var. *oleifera* L.) is one of the four most important oilseed plants in the world (Marinković et al. 2007). Rapeseed is parasited by growing number of pathogenic fungi: *Plasmodiophora brassicae* Wor. *Peronospora parasitica* (Pers.) Fr. *Alternaria brassicae* (Berk.) Sacc, *Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. de

Not, *Leptosphaeria biglobosa* Shoem and Brun, *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, *Botrytis cinerea* Pers, *Erisiphe cruciferarum* Opix ex Junell and some others. All the above types, depending on the climate and other factors, may result in minor or major damage to crops. Blackleg and stem canker is economically the most important disease of oilseed rape in Europe, Australia and North America (Fitt et al. 2006; Gosende

et al., 2003; Howlett et al. 2001) This disease is caused by two species of plant pathogenic fungi of the genus *Leptosphaeria*, *L. maculans* (Desm.) Ces. de Not, anamorphic stadium: *Phoma lingam* (Tode ex Fr.) Desm and *L. biglobosa* Shoem and Brun. Both types are present in all continents (Anon 2004 loc cit. Fitt et al. 2006). Pathogen on oilseed rape cause symptoms of cotyledon stage until ripening crops (Mitrovic and Trkulja.2010). At the root, stem and upper stem parasite causes the symptoms of canker, while on the leaf and pod occurs in the form of spots. When sowing infected seeds in presence of soil moisture pycnidia burst and release pycnosporangia that can infect the hypocotyl or the symptoms manifest themselves in the form of spot of the cotyledons (Barbetti & Khangura 2000 cit. Loc. West et al. 2001). Within the spots on cotyledons new pycnidia are created. These pycnidia in favorable conditions released pycnosporangia that raindrops and insects transfer to the new plant. Pycnosporangia germinate in infectious hyphae and over stoma or wound to infect plant tissue. Pycnosporangia role in the epidemiology of the disease in Western Europe is minimal but it is very important in Western Australia (West et al. 2001). It was found that in Australia, infection of seedlings (cotyledon stage) except ascospores can cause fungus and pycnosporangia (Barbetti & Khangura 2000 cit. Loc. West et al. 2001). The infected seeds can also be a source of inoculum for the initial infection of cotyledons. These infections result in the appearance of spots circular in shape with a large number of pycnidia formed in the early stages of plant development (Sylvester-Bradley & Makepeace 1985). The possibility of transferring pathogens seeds of cabbage, oilseed rape, radish and other *brassicaceae* is probably due to that the fungus is present in all continents (West et al. 2001).

MATERIALS AND METHODS

Isolation of fungi and obtaining pure cultures

Infected plants of oilseed rape were collected during 2009 /2010 in the region of Vojvodina. The infected plant parts (root, stem, upper stem, leaf, flower, pod, seeds) with certain symptoms of disease were used for isolation of fungi. Fragments of the diseased tissue were immersed in a 3% solution of sodium hypochlorite for a period of 3-5 minutes, and then were washed with distilled water, and naturally dried in a controlled environment. After drying, the affected tissue

fragments were applied to the culture medium of potato dextrose agar (PDA) (Difco Detroit USA) which was previously poured into Petri dishes. To prevent bacterial growth, the substrate was added 50 mg of streptomycin sulfate (Galenika Belgrade, Serbia) per liter. Petri dishes seeded with such a substrate are placed in a thermostat at a temperature of 25 ± 1 °C. After 10 to 15 days was observed the formation of pycnidia and pycnosporangia under binocular. Pycnosporangia, which are released in the form of droplets of pycnidia are transferred to the tip of the needle into the plastic tube which was previously added 2 ml of sterile water. Prepared conidial suspension was poured into Petri dishes. After 48 hours of germination of conidia was observed under the binocular. Germinated conidia, together with part of the nutrient medium, were transferred to PDA medium and placed in a thermostat at 25 ± 1 °C in order to obtain pure cultures of the fungus. In this way was isolated 119 strains of the fungus, while the present studies the following isolates were used: C-5, L-5, K-7, LJ-3, S-11, St-1, GS-3 and Lm as a reference isolate (*L. maculans*) followed by K-113, K-115 and Lb as a reference isolate (*L. biglobosa*). Reference isolates originate from the Centre for Agricultural Studies, Rothamsted, UK.

Disinfection of seeds

The seeds were disinfected by dipping in a 3% solution of sodium hypochlorite (NaOCl) for 3 to 5 min, and then were washed with tap water and dried at room temperature under controlled conditions. The success of disinfection was tested on PDA nutrient medium. In two Petri dishes was applied disinfected seed of cultivar Quinta. As a control were used not disinfected seeds. In each Petri dish were placed 5 seeds. Thus prepared Petri dishes were placed in a thermostat at $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ in the dark. After 15 days was carried out visual and microscopic review of seed, nutrient medium and seedlings.

Spreading of pathogens by seed

In order to prove the way of spreading parasites, the test is done on spreading of the parasite by seeds. The suspension of pycnosporangia was prepared as follows: Each isolate was applied to a PDA nutrient medium with three replications. After 10-15 days on the basis a binocular reviews in Petri dishes was added 10 ml of sterile distilled water (Bonman et al. 1981). Sterile glass rod was gently withdrawn

over the surface of pycnidia and mycelium to obtain release of pycnospora. In prepared suspension of pycnospora and mycelium is submerged seed of rapeseed cultivar Quinta. The submerged seed was kept at $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ and 12 h photoperiod for 48 h. By 5 inoculated seeds were then sown in plastic containers with cell diameter 4 x 5 cm filled with compost. After planting, plastic containers were kept at $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ and 12h photoperiod. The appearance of symptoms was assessed after 7 and 14 days after emergence of the plants. Ratings were made with + which meant visible symptoms on cotyledons or hypocotyl and – what referred to healthy plants. The control variety seeds were soaked in distilled water. The experiment was set to 6 replicates and pathogenicity of fungal isolates in relation to the control was tested using Dunette's test (Table 1). After 14 days was performed re-isolation pathogen.

RESULTS AND DISCUSSION

Number of infected (failed) and healthy plants was the main criterion for assessing the level of pathogenicity (transfer of parasite seed) of tested isolates. After 7 days, all the isolates (Lm, C-5, L-5, K-7, LJ-3, S-11, St-1, GS-3) are shown at specific pathogenicity of rapeseed plants (Fig. 1.2). The pathogenicity was manifested in the number of seedlings, the number of lodged plants, leaf spot cotyledon and hypocotyl (Fig. 1) and (Fig. 2). At L.b (reference isolate *L. biglobosa*) K-113 and K-115 strains after 7 days was not observed pathogenicity on oilseed rape plants. Number of seedlings in these isolates was similar to the control treatment (Graph.1). Even after 14 days (Lb, K-113 and K-115 isolates) was not observed occurrence of symptoms on plants (Graph. 2)

Table 1. Pathogenicity of isolates compared to the control application (Dunette's test).
Tabela 1. Patogenost izolata u poređenju sa kontrolom (Danetov test).

Isolates (Izolati)	% of germinated plants after 7 days (% niklih biljaka posle 7 dana)	% of healthy plants after 14 days (% zdravih biljaka posle 14 dana)
L.m	ns ^a	*
L.b	ns	ns
C-5	ns	**
L-5	ns	**
K-7	ns	**
Lj-3	ns	**
S-11	**	**
St-1	**	**
GS-3	**	**
K-113	ns	ns
K-115	ns	ns

ns- not significant; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$
(ns- nije značajno)

^aall comparisons were done with *arcsin* transformed data
(^asva poređena rađena sa *arcsin* transformisanim podacima)



Fig.1. Symptoms in oilseed rape plants originated from seeds inoculated with *L. maculans*.

Slika 1. Simptomi na biljkama uljane repice kao posledica zaraženosti semena gljivom *L. maculans*.

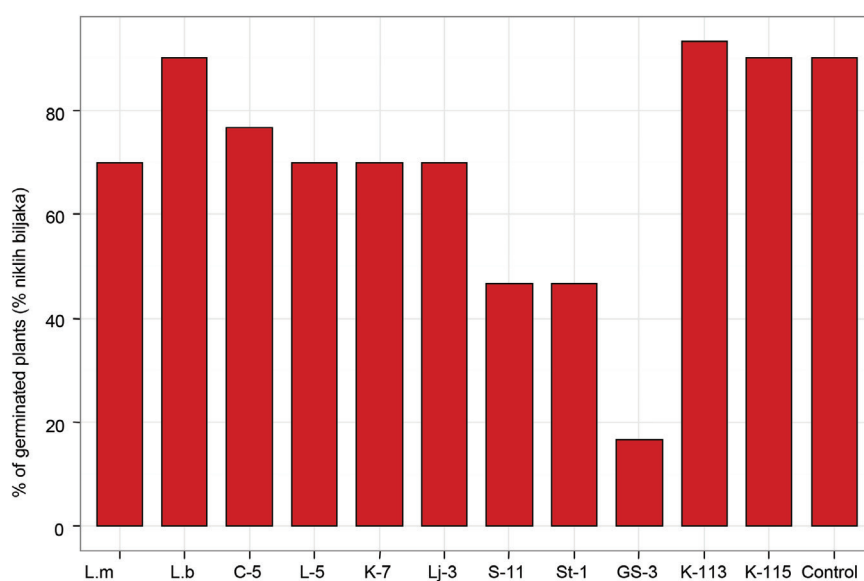


Fig.2. Symptoms on the hypocotyl and cotyledons of rapeseed plants caused from infected seed with *L. maculans* (left: infected plants, right: healthy plant).

Slika 2. Simptomi na hipokotilu i kotiledonima biljaka uljane repice kao posledica zaraženosti semena gljivom *L. maculans* (le vo: zaražene biljke, desno zdrave biljke).

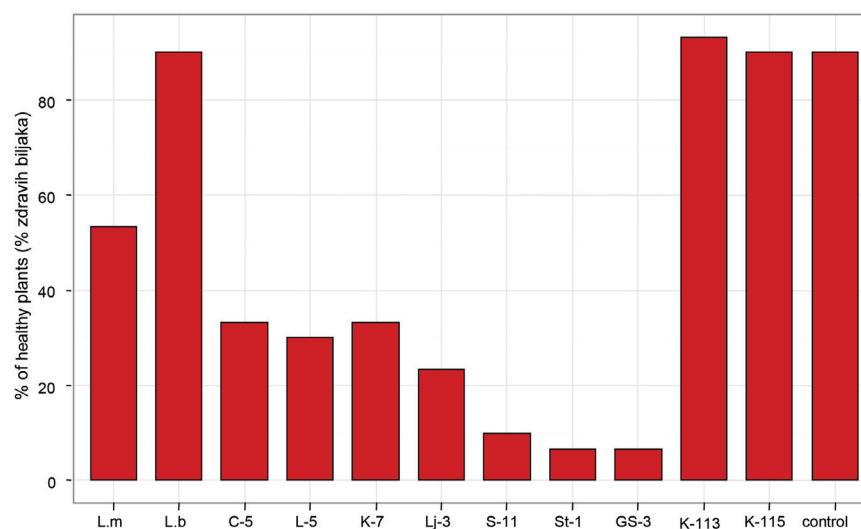
Limiting factor in the production of rapeseed, which in recent years expanding the production regions of our country, are a great number of plant pathogenic fungi. Among the many diseases, stem canker is an economically important disease of oilseed rape in the world (Fitt et al., 2006), and probably in the near future with us. The parasite causes the symptoms on cotyledon and growth stages until maturity (Petrie, 1979, Paul and Rawlinson, 1992). The fungus is naturally maintained by pycnidia, mycelia and pseudotecija (Williams, 1992). On the basis of performed tests all isolates: Lm, C-5, L-5, K-7, LJ-3, S-11, St-1, GS-3 caused the symptoms of the disease on rapeseed seedlings except isolates of Lb, K-113, and K-115, which means that they cannot be transmitted by seed of rapeseed (Graph.1). After 14 days, the percentage of dead plants, arising from infected

seed has increased among most of the isolates, which agrees with the results of Bonman et al. (1981). The appearance of symptoms of the hypocotyl and cotyledons infected seeds, indicate that the parasite may be transmitted in this way (Petrie 1979b, 1992 Hall, Wood and Barbetti, 1977a). Wood & Barbetti (1977a) reported that in Western Australia, the percentage of infected seeds ranges from 0.1-0.2%, while in Canada it ranges up to 5% (Hall et al. 1996). Gabrielson (1983) reported that the seed can be infected up to 18%. In addition to oilseed rape pathogen is transmitted by other *brassica* (Gugel & Petrie 1992). The presence of *L. maculans* and *L. biglobosa* in the world where rape is grown and on all continents can be interpreted as the ability to transfer them to the seed of this plant (West et. al 2001). The frequent occurrence of symptoms on cotyledons and hypocotyl in Australia,



Graph. 1. Pathogenicity of isolates on the oilseed rape plants after 7 days.

Grafik 1. Patogenost izolata na biljkama uljane repice posle 7 dana.



Graph. 2. Pathogenicity of isolates on the oilseed rape plants after 14 days.

Grafik 2. Patogenost izolata na biljkama uljane repice posle 14 dana.

despite the ascospores is associated with frequent contamination of seeds (Barbetti and Khangura cit. Loc. West et al. 2001, West et al., 2001). Although infections are on rare seeds, can be very important in the spread of pathogens into new regions (Jacobsen & Williams, 1971), or the spread of the fungus within the same and neighbouring regions (Bonman et al., 1981). In experiments in Canada, frequent infections seeds initially caused a leaf spot on plants and later pathogen caused stem canker (Hall et al. 1996). These statements confirm our examination of the possibility of transmission of the fungus by the seed.

CONCLUSION

Isolates C-5, L-5, K-7, LJ-3, S-11, St-1 and GS-3 caused symptoms after 7 and 14 days,

whereas occurrence of symptoms at K-113 and K-115 was not observed. The results obtained in these studies provide new information on pathogenic fungi of stem canker on rapeseed in Serbia, which contributes to a better understanding of the epidemiology of the disease and easier control. Based on the conducted research it can be concluded that the pathogenic fungus *L. maculans* and *L. biglobosa* can be transmitted also by rapeseed seed.

ACKNOWLEDGEMENT

This research is a part of the project TR 31025 financed by the Ministry of Science and Technological Development of the Republic of Serbia.

REFERENCES

- Bonman, J. M., Gabrielson, R. L., Williams, P. H., Delwiche, P. A. (1981): Virulence of *Phoma lingam* to cabbage. *Plant Disease*, 65: 865 – 867.
- Fitt, L. D. B., Brun, H., Barbetti, J. M., Rimmer, R. S. (2006): World-wide importance of phoma stem canker (*Leptosphaeria maculans* and *L. biglobosa*) on oilseed rape (*Brassica napus*). *European Journal of Plant Pathology*, 114: 3-15.
- Gabrielson, R. L. (1983): Blackleg disease of crucifers caused by *Leptosphaeria maculans* (*Phoma lingam*) and its control. *Seed Science and Technology*, 11: 749-780.
- Gosende, S., Penaud, A., Aubertat, J. N., Schnieder, O., Pinochet, X. (2003): Evolution of soil surface oilseed rape stubbles and their ability to produce spores of *Leptosphaeria maculans*. *International Rapeseed Congress (XI), Proceeding 4*, AP 11.14: 1166-1168.
- Gugel, R. K., Petrie, G. A. (1992): History occurrence impact and control of blackleg of rapeseed. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 14: 36-45.
- Hall, R. (1992): Epidemiology of blackleg of oilseed rape. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 14: 46-55.
- Hall, R., Chigogora, J. L., Phillips, L. G. (1996): Role of seedborne inoculum of *Leptosphaeria maculans* in development of blackleg on oilseed rape. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 18: 35-42.
- Howlett, B. J., Idnurm, A., Pedras, M. S. C. (2001): *Leptosphaeria maculans* the causal agent of blackleg disease of Brassicas. *Fungal Genet. Biol.*, 33: 1-14.
- Jacobsen, B. J., Williams, P. H. (1971): Histology and control of *Brassica oleracea* seed infection by *Phoma lingam*. *Plant Disease Reporter*, 55: 934-8.
- Kharbanda, P. D., Stevens, R. R. (1993): Seed testing for blackleg of Canola. Vegreville AB Canada: AECV93-E1.
- Marinković, R., Marjanović-Jeromela, A., Mitrović, P. (2007): Privredni značaj osobine i tehnologija proizvodnje uljane repice. *Biljni lekar*, 35 (4): 377-393.
- Mitrović, P., Trkulja, V. (2010): *Leptosphaeria maculans* i *Leptosphaeria biglobosa* – uzročnici raka stabla i suhe truleži korijena uljane repice. *Glasnik zaštite bilja*, 4: 34-45.
- Paul, V., Rowlinson, C. J. (1992): Diseases and pests of rape. Verlag Theodore Mann Gelsenkirchen- Buer Germany.
- Petrie, G. A. (1979): Blackleg of rape. *Canadian Agriculture*, 24: 22-25.
- Petrie, G. A. (1979b): Prevalence of a highly virulent strain of *Leptosphaeria maculans* (blackleg) in seed samples of rape and turnip rape produced in western Canada in 1976 and 1977. *Canadian Journal Plant Science*, 59: 899-901.
- Petrie, G. A., Vanterpool, T. C. (1974): Infestation of crucifer seed in Western Canada by the blackleg fungus *Leptosphaeria maculans*. *Canadian Plant Disease Survey*, 54: 119-123.
- West. S. J., Kharbanda, D. P., Barbetti, J. M., Fitt, L. D. B. (2001): Epidemiology and management of *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker) on oilseed rape in Australia, Canada and Europe. *Plant Pathology*, 50: 10-27.
- Williams, P. H. (1992): Biology of *Leptosphaeria maculans*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 14: 30-35.
- Wood, P. McR., Barbetti, M. J. (1977a): The role of seed infection in the spread of blackleg of rape in Western Australia. *Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry*, 17: 1040-1044.

(Received: 20.02.2014.)

(Accepted: 26.03.2014.)

MOGUĆNOST PRENOŠENJA *LEPTOSPHAERIA MACULANS* I *LEPTOSPHAERIA BIGLOBOSA* SEMENOM ULJANE REPICE

PETAR MITROVIĆ¹, ŽELJKO MILOVAC¹, VOJISLAV TRKULJA², BOJAN JOCKOVIĆ¹,
VELIMIR RADIĆ¹, NENAD DUŠANIĆ¹, ANA MARJANOVIĆ-JEROMELA¹

¹Institut za ratarstvo i povrtarstvo Novi Sad, Srbija

²Poljoprivredni fakultet, Banja Luka, Poljoprivredni Institut, Banja Luka

REZIME

Rak stabla (crna noga) je najznačajnije oboljenje uljane repice širom sveta. Bolest mogu prouzrokovati dve vrste patogenih gljiva iz roda *Leptosphaeria*: *Leptosphaeria maculans* (Desm.) ces. i de Not, anamorf *Phoma lingam* (Tode. Fr.) Desmas, koja prouzrokuje rak stabla i crnu nogu na korenu i *Leptosphaeria biglobosa* Shoem and Brun, koja prouzrokuje simptome slične raku ali na gornjim delovima stabla obično prouzrokujući manje štete. Ozbiljnije štete mogu nastati u zemljama sa višim letnjim temperaturama. Patogene gljive se iz jedne oblasti u drugu prenose askosporama i zaraženim semenom. Da bi se utvrdili načini prenošenja parazita testirana je mogućnost prenošenja semenom. Dezinfikovano seme uljane repice, kultivara Quinta je potopljeno u suspenziju piknospora. Ovakvo seme je držano na 20°C ± 1°C i 12h fotoperiodu tokom 48 sati. Posle setve seme je preneto u plastične posude a temperatura čuvanja je bila 25°C ± 1°C i fotoperiod od 12h. U ovom eksperimentu korišćeni su sledeći izolati: C-5, L-5, K-7, LJ-3, S-11, St-1, GS-3 i Lm kao referentni izolat (*L. maculans*) kao i K-113, K-115 i Lb kao referentni izolat (*L. biglobosa*). Ocena prisustva simptoma je rađena posle 7 i 14 dana od nicanja. Sa znakom + su se obeležavale biljke sa vidljivim simptomima na kotiledonima ili hipokotilu a znakom - biljke bez pojave simptoma. Posle 7 dana izolati Lm, C-5, L-5, K-7, LJ-3, S-11, St-1 i GS-3 su izazvali simptome bolesti na biljkama uljane repice. Patogenost se ogledala kroz broj oštećenih klijanaca, lisnih pega i povijenih kotiledona. Kod izolata Lb (referentni izolat *L. biglobosa*) K-113 i K-115 posle 7 i 14 dana nije primećena patogenost na biljkama uljane repice. Kontrolna varijanta semena je potapana u destilovanu vodu. Ogled je postavljen u 6 ponavljanja, i patogenost izolata gljive u odnosu na kontrolu je izražena Danetovim testom. Posle 14 dana izvedena je ponovna izolacija patogena.

Ključne reči: *Leptosphaeria maculans*, *Leptosphaeria biglobosa*, patogenost, piknospore, seme, rak stabla

(Primljeno: 20.02.2014.)
(Prihvaćeno: 26.03.2014.)

EFFECT OF CALCIUM SALTS ON POSTHARVEST FUNGAL PATHOGENS *IN VITRO*

STEFAN STOŠIĆ¹, SAŠA STOJANOVIĆ², ANJA MILOSAVLJEVIĆ²,
ERIKA PFAF DOLOVAC², SVETLANA ŽIVKOVIĆ²

¹Scholar of Ministry of Education, Science and Technological Development
of the Republic of Serbia

²Institute for Plant Protection and Environment, Belgrade, Serbia
e-mail:stefan.stosic@gmail.com

SUMMARY

In the recent years, several studies have shown that calcium salts may have potential as environmentally compatible, nontoxic fungicides for controlling postharvest fungal pathogens. Therefore, the objective of this study was to evaluate and compare the effects of calcium chloride and calcium hydroxide on *in vitro* mycelial growth, spore germination and germ tube growth of *Colletotrichum acutatum*, *C. gloeosporioides*, *Alternaria alternata*, and *Penicillium expansum*. The obtained results showed that the fungal isolates grew similarly or stimulated in the presence of 1 and 1.5% calcium salts compared to the control. After seven days of incubation, reduction of mycelial growth was observed only on PDA supplemented with 2% calcium salts. Calcium chloride and calcium hydroxide at 1.5% and 2.0% concentrations significantly decreased spore germination and germ tube growth of all fungal isolates. The results of this study show that the tested calcium salts can be used as an alternative treatment against postharvest fungal pathogens *C. acutatum*, *C. gloeosporioides*, *A. alternata* and *P. expansum*.

Key words: postharvest fungal pathogens, calcium salts, *in vitro* effect

INTRODUCTION

Synthetic fungicides have been routinely used to control postharvest diseases. However, the development of fungicide resistance and an increasing environmental concern over fungicide residues in food have stimulated to find alternative means for controlling postharvest decay (Holmes and Eckert, 1999). Among alternatives to synthetic chemicals, several inorganic salts and organic, lipophilic acids and their salts have shown increasing evidence of efficacy in controlling plant pathogens. Many of these salts are widely used in industry as preservatives and antimicrobials (Russell and Gould, 1991) and have shown some advantages for utilization as postharvest chemicals, such as a broad-spectrum antimicrobial activity with low mammalian toxicity (Olivier et al., 1998), and biocompatibility (Horst et al., 1992).

Several studies have been undertaken in re-

cent years identifying the fungicidal properties of many different antimicrobial salts. Sodium carbonate, sodium bicarbonate, potassium carbonate, potassium bicarbonate, ammonium bicarbonate, and potassium silicate have been tested for inhibition of fungal pathogens on fruits, vegetables, field crops and ornamentals. These salts demonstrated *in vitro* and/or *in vivo* inhibition of *Fusarium tricinctum*, *F. graminearum*, *F. sporotrichioides*, *Aspergillus ochraceus*, *A. flavus*, *A. niger*, *P. griseofulvum*, *P. notatum*, *P. digitatum*, *P. expansum*, *Botrytis cinerea*, *Helminthosporium solani*, *C. acutatum*, and *C. gloeosporioides* (DePasquale et al., 1990; Olivier et al., 1998; Smilanick et al., 1999; Karabulut et al., 2001; Hervieux et al., 2002; Conway et al., 2007; Hasan et al., 2012). Sorbic and propionic acids and their salts are used as preserving additives in milled corn and have been tested for the suppression of mycotoxins and storage molds (Rusul et al., 1987; BuaZZi and Marth, 1991).

Calcium is a key plant nutrient that has a significant role in cell functions, including reducing softening and senescence of fruits (Conway et al., 1991). Many disorders of crops, such as bitter pit in apple, cork spot in pear, and blossom end rot in tomato that are caused by calcium deficiency could be reduced by calcium spraying (Kader, 2002). The most common form of calcium supplement is calcium chloride, however, many proprietary products containing calcium in other forms, or combined with other nutrients are available.

Few studies have examined the potential role of calcium supplementation in the postharvest period for reducing decay (Conway et al., 1994). Saftner et al. (1997) reported that postharvest calcium treatment of apples provided broad-spectrum protection against *P. expansum* and *B. cinerea*, and Alternaria rot of the apple cultivar Nittany was effectively managed with pre- and postharvest calcium applications (Biggs et al., 1993; Biggs et al., 2000; Maouni et al., 2007). Biggs (1999) examined the effects of calcium salt solutions on two *Colletotrichum* species originated from apple fruits. The results verified the effect of calcium salts on reduction of disease severity, expressed as lesion diameter. Also, there are few reports about effects of calcium salts on infection of tropical fruits by *Colletotrichum* spp. (Chillet et al., 2000; Mahmud et al., 2008; Madani et al., 2014). The ability of calcium to reduce the development of postharvest diseases of fruit has been attributed mainly to the formation of calcium cross-linkages in the cell wall, resulting in decreased effectiveness of cell wall-macerating enzymes secreted by the pathogen (Conway et al., 1988).

Postharvest fungal decay may cause significant losses to the apple production and storage in Serbia. Therefore, the present study was conducted in order to examine and compare the effects of two calcium salts on *in vitro* growth, spore germination and germ tube elongation of the postharvest pathogens *C. acutatum*, *C. gloeosporioides*, *A. alternata*, and *P. expansum*.

MATERIAL AND METHODS

Pathogens

C. acutatum, *C. gloeosporioides*, *A. alternata*, and *P. expansum* were isolated from decayed apple fruits. The fungi were maintained on potato dextrose agar (PDA) at 4°C.

Effect of calcium salts on mycelial growth *in vitro*

Pure calcium salts used in this study were calcium chloride and calcium hydroxide. Salts were prepared in sterile deionized distilled water, added to autoclaved warm (~50°C) PDA to provide a final concentration of 1, 1.5, and 2% (w/v). An agar disc (Ø5 mm) taken from an active colony of tested fungal pathogens was placed in the center of each of three replicate Petri plates. PDA not supplemented with calcium salts served as a control. The all Petri plates were incubated at 25°C, and growth was assessed after 7 days.

Effect of calcium salts on spore germination and germ tube elongation *in vitro*

Spore suspensions of all tested fungal pathogens were obtained from 2- week-old cultures incubated at 25°C by flooding the cultures with sterile-distilled water containing 0.05% (v/v) Tween 80, and filtered through four layers of sterilized cheesecloth. Spore concentration was determined with a hemacytometer, and adjusted to 1×10^6 conidia/ml. Aliquots of 100 μ l of the pathogen suspension were transferred to glass tubes containing 5 ml potato dextrose broth (PDB), and then the tested chemicals were added to each tube to achieve the proposed concentration. All tubes were put on a rotary shaker at 110 rpm at 25°C. After 18 h incubation, 100 spores of pathogens were measured for germination rate. Spores were considered germinated when germ tube length was equal to or greater than spore length.

The efficacy of each treatment was calculated according to the following formula: $R(\%) = K-T/K \times 100$, where R is reduction, K is spore germination or germ tube growth in control medium, and T is spore germination or germ tube growth in a medium with tested calcium salts.

Statistical Analysis

All treatments consisted of three replicates, and experiments were repeated twice. The data were analyzed by analysis of variance (ANOVA). Mean values were compared using Duncan's multiple range test, and significance was evaluated at $P < 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

Calcium chloride and calcium hydroxide at 1% stimulated mycelial growth of *C. acutatum*

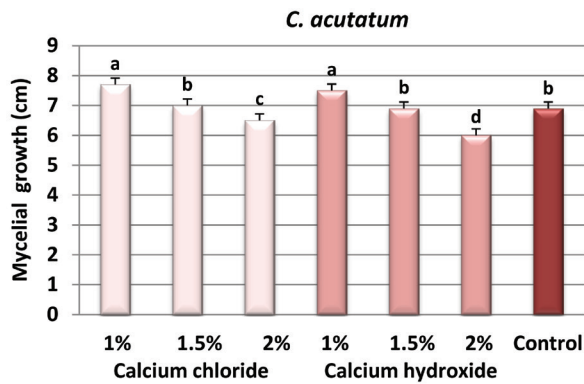


Fig. 1. Effect of calcium salts on mycelial growth of *C. acutatum*. Means with the same letter are not significantly different according to the Duncan's multiple range test ($P < 0.05$).

Sl. 1. Efekat kalcijumovih soli na porast micelije *C. acutatum*. Vrednosti sa istim slovom nisu statistički značajno različite na osnovu Duncan's multiple range testa ($P < 0.05$).

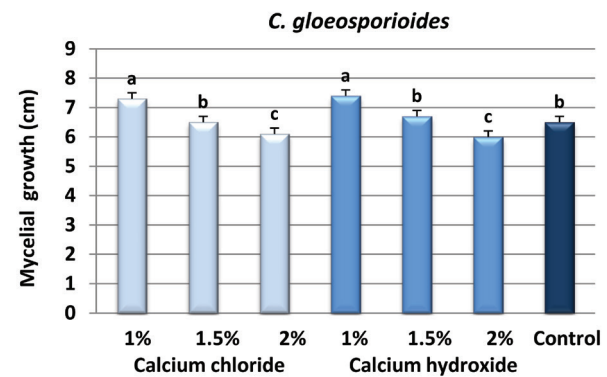


Fig. 2. Effect of calcium salts on mycelial growth of *C. gloeosporioides*. Means with the same letter are not significantly different according to the Duncan's multiple range test ($P < 0.05$).

Sl. 2. Efekat kalcijumovih soli na porast micelije *C. gloeosporioides*. Vrednosti sa istim slovom nisu statistički značajno različite na osnovu Duncan's multiple range testa ($P < 0.05$).

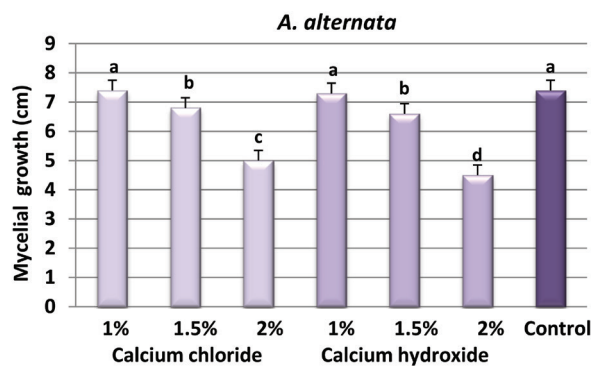


Fig. 3. Effect of calcium salts on mycelial growth of *A. alternata*. Means with the same letter are not significantly different according to the Duncan's multiple range test ($P < 0.05$).

Sl. 3. Efekat kalcijumovih soli na porast micelije *A. alternata*. Vrednosti sa istim slovom nisu statistički značajno različite na osnovu Duncan's multiple range testa ($P < 0.05$).

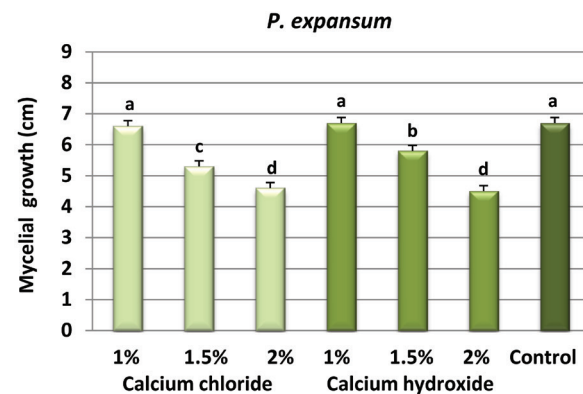


Fig. 4. Effect of calcium salts on mycelial growth of *P. expansum*. Means with the same letter are not significantly different according to the Duncan's multiple range test ($P < 0.05$).

Sl. 4. Efekat kalcijumovih soli na porast micelije *P. expansum*. Vrednosti sa istim slovom nisu statistički značajno različite na osnovu Duncan's multiple range testa ($P < 0.05$).

and *C. gloeosporioides* relative to the control. The mycelial growth at 1.5% calcium salts was similar compared to the control (Fig. 1-2). Also, no reduction in growth was observed when *A. alternata* and *P. expansum* were cultured on PDA supplemented with 1% calcium chloride and calcium hydroxide (Fig. 3-4). In this experiment, only the calcium salts at 2% concentration reduced mycelial growth of all tested pathogens, relative to the control. Our results are in agreement with those of other researchers who demonstrated that the fungal isolates grew similarly or stimulated in the presence of calcium

salts compared to the control (Biggs, 2004; Madani et al., 2014). Tian et al. (2002) recorded that calcium chloride at 2% inhibited the growth of *R. stolonifer*, although calcium chloride was tolerated by *A. alternata* and *P. expansum* *in vitro* where their growth was highly affected only at 6% concentration (Maouni et al., 2007). Calcium salts also have been shown to reduce mycelial growth *in vitro* and reduce incidence and severity of infection of peach fruits and shoots by *Monilinia fructicola* and *Leucostoma persoonii*, respectively (Biggs and Peterson, 1990; Biggs et al., 1997).

Table 1. Effect of calcium salts on *in vitro* conidial germination and germ tube growth of postharvest fungal pathogens.**Tabela 1.** *In vitro* efekat kalcijumovih soli na klijavost konidija i porast klicine cevi skladišnih gljivičnih patogena.

Treatment Tretman	Conc. %	Pathogen Patogen							
		<i>C. acutatum</i>		<i>C. gloeosporioides</i>		<i>A. alternata</i>		<i>P. expansum</i>	
		RSG* (%)	RGTG** (%)	RSG (%)	RGTG (%)	RSG (%)	RGTG (%)	RSG (%)	RGTG (%)
Calcium chloride	1	16.8d***	35.3d	16.3c	29.4d	21.1d	38.9d	31.5d	46.6c
	1.5	24.3c	47.4c	23.4b	41.5c	38.8c	49.6c	44.3c	59.3b
	2	38.5a	57.1a	38.2a	53.1a	52.7a	63.8a	61.1a	70.5a
Calcium hydroxide	1	16.2d	34.1d	13.3d	30.4d	22.5d	37.5d	32.8d	47.6c
	1.5	23.6c	46.1c	24.7b	40.9c	38.1c	47.5c	44.6c	59.8b
	2	32.8b	53.3b	37.9a	48.7b	47.4b	59.8b	57.8b	70.2a

RSG* - Reduction of spore germination; RGTG** - Reduction of germ tube growth; *** - Means in column followed by the same letter are not significantly different according to the Duncan's multiple range test ($P < 0.05$).

RSG* - Redukcija klijavosti konidija; RGTG** - Redukcija porasta klicine cevi; *** - Vrednosti u koloni označene istim slovom nisu statistički značajno različite na osnovu Duncan's multiple range testa ($P < 0.05$).

Conidial germination assay were conducted to test the potential for calcium chloride and calcium hydroxide at different concentrations to inhibit germination of postharvest fungal pathogens. The both of calcium salts were effective in reducing the spore germination and germ tube growth of *C. acutatum*, *C. gloeosporioides*, *A. alternata* and *P. expansum*. In most cases, in treatments with 1 and 1.5% calcium salts, inhibition percentage did not exceed 50%. The spore germination of all tested pathogens was decreased significantly on PDA supplemented with 2% calcium salts (Table 1.). Also, inhibition of germ tube growth was greater, and increases with salts concentration (Table 1.). Our findings are in agreement with those of Eryani-Raqeeb et al. (2009) who demonstrated that high concentration of calcium reduced spore germination of the papaya anthracnose pathogen. Droby et al. (1997) observed inhibition of spore germination and germ tube elongation of *P. digitatum* in culture, as well as inhibition of polygalacturonase activity. Wisniewski et al. (1995) have indicated that calcium chloride reduced germination and germ tube elongation of *B. cinerea* and *P. expansum in vitro*. Increasing concentrations of calcium chloride (25–175mM) resulted in decreased spore germination and germ tube growth of both pathogens, but the greatest effect was observed in the case of *B. cinerea*.

Reduced spore germination shows that the pathogen may be more sensitive to calcium at the conidial stage relative to the mycelial growth stage.

The mechanisms by which calcium salts inhibited fungal spore germination and germ tube elongation are not known. One hypothesis is that high concentration of extracellular calcium may increase calcium in the cytosol to toxic levels. With a minimum level of calcium ion concentration being necessary for normal cell growth, any limitation in regulation of intracellular calcium level may result in reduced organism development (Droby et al., 1997). Calcium ions may reduce the incidence of fungal infection by directly inhibiting fungal growth and by inhibiting cell wall-degrading enzymes produced by the pathogens. These effects were probably due the toxicity of higher concentration of calcium on pathogens by affecting the osmotic balance in the fungal cells and inhibition of pectinolytic enzymes (Miceli et al., 1999).

Several studies have shown that calcium salts may have potential as environmentally compatible, nontoxic fungicides for controlling postharvest pathogens. Our results support these findings by showing that calcium chloride and calcium hydroxide restrict *in vitro* conidial germination and germ tube growth of *C. acutatum*, *C. gloeosporioides*, *A. alternata*, and *P. expansum*.

ACKNOWLEDGMENT

This study was supported by the Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia, Project TR 31018.

REFERENCES

- Biggs, A. R., and Peterson, C. A. (1990): Effect of chemical applications to peach bark wounds on accumulation of lignin and suberin and susceptibility to *Leucostoma personii*. *Phytopathology*, 80: 861-865.
- Biggs, A. R., Ingle, M., Solihati, W. D. (1993): Control of *Alternaria* infection of fruit of apple cultivar Nittany with calcium chloride and fungicides. *Plant Disease*, 77: 976-980.
- Biggs, A.R., El-Kholi, M.M., El-Neshawy, S., Nickerson, R. (1997): Effects of calcium salts on growth, polygalacturonase activity, and infection of peach fruit by *Monilinia fruticola*. *Plant Disease*, 81: 399-403.
- Biggs, A.R. (1999): Effects of calcium salts on apple bitter rot caused by two *Colletotrichum* species. *Plant Disease*, 83: 1001-1005.
- Biggs, A. R., Hogmire, H. W., Collins, A. R. (2000): Assessment of an alternative IPM program for the production of apples for processing. *Plant Disease*, 84: 1140-1146.
- Biggs, A.R. (2004): Effect of inoculum concentration and calcium salts on infection of apple fruit by *Botryosphaeria dothidea*. *Plant Disease*, 88: 147-151.
- Buazzi, M. M., and Marth, E. H. (1991): Mechanisms of the inhibition of *Listeria monocytogenes* by potassium sorbate. *Food Microbiol.*, 8: 249-256.
- Conway, W. S., Gross, K. C., Boyer, C. D., Sams, C. E. (1988): Inhibition of *Penicillium expansum* polygalacturonase activity by increased apple cell wall calcium. *Phytopathology*, 78: 1052-1055.
- Conway, W.S., Sams, C.E., Abbott, J.A., Bruton, B.D. (1991): Postharvest calcium treatment of apple fruit to provide broad-spectrum protection against postharvest pathogens. *Plant Disease*, 75: 620-622.
- Conway, W. S., Sams, C. E., Brown, G. A., Beavers, W. B., Tobias, R. B., Kennedy, L. S. (1994): Pilot test for the commercial use of postharvest pressure infiltration of calcium into apples to maintain fruit quality in storage. *HortTechnology*, 4: 239-243.
- Conway, W.S., Leverentz, B., Janisiewicz, W.J., Blodgett, A.B., Saftner, R.A., Camp, M.J. (2007): Integrating heat treatment, biocontrol and sodium bicarbonate to reduce postharvest decay of apple caused by *Colletotrichum acutatum* and *Penicillium expansum*. *Postharvest Biology and Technology*, 34: 11-20.
- Chillet, M., de Lapeyre de Ballaire, L., Dorel, M., Joas, J., Dubois, C., Marchal, J., Perrier, X. (2000): Evidence for the variation in susceptibility of bananas to wound anthracnose due to *Colletotrichum musae* and the influence of edaphic conditions. *Scientia Horticulture*, 86(1): 33-47.
- DePasquale, D. A., El-Nabarawy, A., Rosen, J. D., Montville, T. J. (1990): Ammonium bicarbonate inhibition of mycotoxigenic fungi and spoilage yeasts. *J. Food Prot.*, 53: 324-328.
- Droby, S., Wisniewski, M. E., Cohen, L., Weiss, B., Touitou, D., Eilam, Y., Chalutz, E. (1997): Influence of CaCl_2 on *Penicillium digitatum*, grapefruit peel tissue, and biocontrol activity of *Pichia guilliermondii*. *Phytopathology*, 87: 310-315.
- Eryani-Raqeeb, A.A., Mahmud, T.M.M., Syed Omar, S.R., Mohamed Zaki, A.R., Al Eryani, A.R. (2009): Effects of calcium and chitosan treatments on controlling anthracnose and postharvest quality of papaya (*Carica papaya* L.). *Int. J. Agric. Res.* 4: 53-68.
- Hasan, M.F, Mahmud, T.M.M, Kadir, J., Ding, P., Zaidul, I.S.M. (2012): Sensitivity of *Colletotrichum gloeosporioides* to sodium bicarbonate on the development of anthracnose in papaya (*Carica papaya* L. cv. Frangi). *Australian Journal of Crop Science*, 6(1):17-22.

- Hervieux, V., E.S. Yaganza, J. Arul, Tweddell, R.J. (2002): Effect of organic and inorganic salts on the development of *Helminthosporium solani*, the causal agent of potato silver scurf. *Plant Disease*, 86: 1014-1018.
- Holmes, G.J., and Eckert, J.W. (1999): Sensitivity of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* to postharvest citrus fungicides in California. *Phytopathology*, 89: 716-721.
- Horst, R. K., Kawamoto, S. O., Porter, L. L. (1992): Effect of sodium bicarbonate and oils on the control of powdery mildew and black spot of roses. *Plant Disease*, 76: 247-251.
- Kader, A.A. (2002): Post-Harvest Technology of Horticultural Crops. 3rd.eds. University of California, Oakland, California. Division of Agriculture and Natural Resources Publication 3311.
- Karabulut, O.A., Lurie, S., Droby, S. (2001): Evaluation of the use of sodium bicarbonate, potassium sorbate and yeast antagonists for decreasing postharvest decay of sweet cherries. *Postharvest Biology and Technology*, 23: 233-236.
- Madani, B., Mohamed, M.T.M., Biggs, A.R., Kadir, J., Awang, Y., Tayebimeigooni, A., Shojaei, T.R. (2014): Effect of pre-harvest calcium chloride applications on fruit calcium level and post-harvest anthracnose disease of papaya. *Crop Protection*, 55: 55-60.
- Mahmud, T.M.M., Al Eryani-Raqeeb, A., Syed Omar, S.R., Mohamed Zaki, A.R., Abdul-Rahman, A.E. (2008): Effects of different concentrations and applications of calcium on storage life and physicochemical characteristics of papaya (*Carica Papaya* L.). *American Journal of Agricultural and Biological Science*, 3(3): 526-533.
- Maouni, A., Lamarti, A., Aidoun, A., Khaddor, M., Badoc, A. (2007): Effect of benzimidazole fungicides and calcium chloride on *Alternaria alternata* and *Penicillium expansum* rot during storage of pears. *Afric. J. Biotech.*, 6 (11): 1289-1292.
- Miceli, A., Ippolito, A., Linsalata, V., Nigro, F. (1999): Effect of pre-harvest calcium treatment on decay and biochemical changes in table grape during storage. *Phytopathol. Mediterr.*, 38: 48-53.
- Olivier, C., Halseth, D. E., Mizubuti, E. S. G., Loria, R. (1998): Postharvest application of organic and inorganic salts for suppression of silver scurf on potato tubers. *Plant Disease*, 82: 213-217.
- Rusul, G., El-Gazzar, F. E., Marth, E. H. (1987): Growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 in the presence of propionic acid and at different initial pH values. *J. Food Prot.*, 50: 909-914.
- Russell, N. J., and Gould, G. W. (1991): Food Preservatives. Eds.Blackie and Son, London, U.K.
- Saftner, R.A., Conway, W.S., Sams, C.E. (1997): Effects of some polyamine biosynthesis inhibitors and calcium chloride on *in vitro* growth and decay development in apples caused by *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum*. *J. Am. Soci. Horti. Sci.*, 122: 380-385.
- Smilanick, J.L., Margosan, D.A., Usall, J., Michael, F. (1999): Control of citrus green mold by carbonate and bicarbonate salts and the influence of commercial post harvest practices on their efficacy. *Plant Disease*, 83: 139-145.
- Tian, S.P., Fan, Q., Xu, Y., Jiang, A.L. (2002): Effects of calcium on biocontrol activity of yeast antagonists against the postharvest fungal pathogen *Rhizopus stolonifer*. *Plant Pathology*, 51 (3): 352-358.
- Wisniewski, M. E., Droby, S., Chalutz, E., Elam, Y. (1995): Effects of Ca²⁺ and Mg²⁺ on *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum* *in vitro* and on the biocontrol activity of *Candida oleophila*. *Plant Pathology*, 44: 1016-1024.

(Received: 31.01.2014.)
(Accepted: 28.02.2014.)

IN VITRO EFEKAT KALCIJUMOVIH SOLI NA GLJIVIČNE SKLADIŠNE PATOGENE

STEFAN STOŠIĆ¹, SAŠA STOJANOVIĆ², ANJA MILOSAVLJEVIĆ²,
ERIKA PFAF DOLOVAC², SVETLANA ŽIVKOVIĆ²

¹Stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije

²Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Beograd
e-mail:stefan.stosic@gmail.com

REZIME

Tokom poslednjih nekoliko godina, više studija je pokazalo da u kontroli gljivičnih skladišnih patogena soli kalcijuma mogu imati potencijal kao ekološki kompatibilni, netoksični fungicidi. Stoga je cilj ovog istraživanja bio da se u *in vitro* uslovima procene i uporede efekti kalcijum hlorida i kalcijum hidroksida na porast micelije, klijavost konidija i rast klicine cevi gljiva *C. acutatum*, *C. gloeosporioides*, *A. alternata*, i *P. expansum*. Dobijeni rezultati su pokazali da je u prisustvu 1 i 1,5% kalcijumovih soli porast izolata gljiva u tretmanima sličan ili povećan u odnosu na kontrolu. Nakon 7 dana inkubacije, redukcija porasta micelije je utvđena samo na PDA podlozi sa 2% soli kalcijuma. Kalcijum hlorid i kalcijum hidrok- sid u koncentracijama od 1,5 i 2,0% značajno smanjuju klijavost konidija i rast klicinih cevi svih ispitivanih izolata gljiva. Rezultati ove studije pokazuju da se testirane soli kalcijuma mogu primeniti kao alternativni tretman u kontroli gljivičnih skladišnih patogena, *C. acutatum*, *C. gloeosporioides*, *A. alternata* i *P. expansum*.

Ključne reči: gljivični skladišni patogeni, soli kalcijuma, *in vitro* efekat

(Primljeno: 31.01.2014.)

(Prihvaćeno: 28.02.2014.)

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

REDAKCIJA ČASOPISA "ZAŠTITA BILJA"

INSTRUCTION TO AUTHORS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Additional notes

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

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

EDITORIAL Board for "Plant Protection"

CIP – Katalogizacija u publikaciji
Narodna biblioteka Srbije, Beograd

632.9

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

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

