

Zaštita bilja  
vol. 56 (1-4), No 251-254, 5-24, 2005  
Beograd

UDK 630\*176.382: 630\*44  
Pregledni rad

## APIOGNOMONIOZNA PLAMENJAČA LIŠĆA I MLADARA I IZUMIRANJE GRANČICA I GRANA („ANTRAKNOZA“) PLATANA

MOMČILO ARSENIJEVIĆ, JELICA BALAŽ, TATJANA POPOVIĆ  
Poljoprivredni fakultet, Departman za zaštitu bilja, Novi Sad  
e-mail: marsa@neobee.net

U ovome radu se daju literaturni podaci i deo naših rezultata istraživanja o simptomima bolesti, karakteristikama patogena *Apiognomonium veneta* (Sacc. & Speg.) Höhnelt, njegovoj biologiji i ekološkim zahtevima, paralelno sa taksonomijom i nomenklaturom, kao i razvoju gljive *in vitro* i *in vivo*, suzbijanju i osetljivosti platana.

Parazit pripada razdelu *Ascomycota*, redu *Diaporthales*, porodici *Valsaceae* i rodu *Apiognomonium*. U biološkom ciklusu razvoja gljiva obrazuje peritecije sa askusima i askosporama i konidiomate sa konidijama. Prezimljavaju peritecije u opalom lišću. Askospore oslobođene iz peritecija u proleće obavljaju primarne zaraze, a sekundarne infekcije konidije. Patogen može prezimeti i u formi micelije u kori obolelih grančica i grana stvarajući konidiomate i konidije u proleće. Kiša i vetar su osnovni vektori spora. Prohladno i kišovito vreme u proleće pogodni su uslovi za zarazu platana. I obrnuto, suvo i toplije proleće onemogućava zarazu kad se bolest praktično i ne pojavljuje. Temperature od 9-12°C veoma su pogodne za infekciju platana u fazi početka razvoja pupoljaka. Infekcija se širi na mladare sve dok temperature ne pređu granicu od 14-16°C. Iznad 15.5°C zaraze praktično i nema. Smatra se da srednje dnevne temperature od 12.8°C od početka listanja platana osobito pogoduju zarazi.

Preparati na bazi bakra, ditiokarbamata i benzimidazola efikasni su protiv parazita. Pokazalo se da je *Platanus orientalis* L. otporan, a *P. occidentalis* L. relativno osetljiv, dok je hibrid *P. acerifolia* (Ait.) Willd., nastao ukrštanjem ove dve vrste, varijabilne otpornosti. Klonovi platana Bloodgood, Columbia i Liberty otporni su prema *A. veneta*.

*Ključne reči:* platan, *Platanus spp.*, plamenjača, „antraknoza“, *Apiognomonium veneta*, taksonimija, nomenklatura, morfologija, biologija, suzbijanje, otpornost.

## UVOD

Već duže vreme u Novom Sadu i drugim gradovima Republike Srbije, uočava se uvelost i sušenje lišća i mladara, a potom mlađih i starijih grana platana (*Platanus acerifolia* /Ait./ Willd). Obolevaju starija stabla u drvoredima i parkovima kao i sadnice u rasadnicima. Pojedine sadnice se potpuno ili delimično sasušuju. Bolest često ima takve razmere da krošnje obolelih stabala izgledaju kao vatrom spržene (sl. 3, 4, 7 i 8).

Suočeni s veoma nepovoljnim stanjem zdravstvenog izgleda platana, naročito u drvoredima Novog Sada, preduzeće Gradsko zelenilo, OOUR „Parkovi“ ovog grada iniciralo je istraživanje pojave ispoljene pri nezi i održavanju stabala platana. Da bi se ovo i ostvarilo, odobren je i Naučni projekat, finansiran od strane tadašnje Samoupravne interesne zajednice za naučni rad Vojvodine, Novi Sad (Arsenijević i sar., 1986). Neki rezultati istraživanja na spomenutom Projektu i brojne karakteristike parazita prikazani su u ovome radu, u cilju što boljeg obaveštenja naše stručne i naučne javnosti o ovoj toliko destruktivnoj bolesti platana ispoljene kod nas.

U ovome radu izneti su naši i literaturni podaci o simptomima bolesti, njenom rasprostranjenju u Srbiji i u svetu, kao i podaci o morfološko-ekološkim karakteristikama parazita, ciklusu razvoja, nejednakoj osetljivosti platana prema parazitu, preventivnim merama suzbijanja i drugim odlikama gljive (Neely et Himelick, 1965; Arx von, 1970; Petrak, 1971; Boerema et Verhoenen, 1972; Sinclair et Johnson, 1977; Barr, 1978, 1991; Sutton, 1980; Hawksworth et Sutton, 1983; Monod, 1983; Arsenijević i sar., 1986, 2006; Wittmann et Fickert, 1988; Smith *et al.*, 1988; Holliday, 1989; Rossman *et al.*, 1997). S obzirom na različite stavove, posebna pažnja posvećena je nomenklaturi, morfologiji anamorfa i njegovim sinonimima (Spies *et al.*, 1985, Aloj *et al.*, 1993; Tello *et al.*, 2000).

## SIMPTOMI OBOLJENJA

Simptomi bolesti se pojavljuju u proleće, početkom ili tokom prve dekade maja, naročito ako je vreme kišovito i prohladno. Prve promene uočavaju se na lišću koje vene, a kasnije se suši, postajući limunastožuto do smeđe obojeni (sl. 1). Venu i mladari, koji zajedno sa liščem, ispoljavaju simptome nalik plamenjači ili moniliozne paleži mladara koštičavih voćaka i sličnim promenama mikozne i bakteriozne prirode raznih biljaka.

Osim pojedinačnih, prvo hlorotičnih, a potom i nekrotičnih pega, na lišću se duž nerava i susednog tkiva razvija kontinuirana nekroza koja se širi sve do peteljke na mlađem i starijem lišću (sl. 2). Otuda i naziv za ove promene na lišću

„pegavost duž nerava“. Na nekrotičnom tkivu pored nerava, kao i na samom nervu razvijaju se plodonosna telašca anamorfa tipa acervula, ispoljena u vidu crnkastomrkih ispupčenja.

Usled nekroze kore i dubljih slojeva tkiva duž i po obimu, grančice i grane izumiru pojedinačno ili na većem delu krošnje. U slučaju izrazito jakog stepena zaraze samo su pojedinačne grane sa zdravim, zelenim lišćem.

Intenzitet zaraze mladara, grančica i lišća može dostići i više od 70% sredinom maja. Kod ovako jake infekcije, na deblu se od korena ka krošnji razvijaju izbojci, verovatno zbog nesklada između asimilativne površine obolelog lišća i asimilata iz korena platana. Ovakva stabla naredne vegetacije su znatno umanjene vitalnosti, deformisanih i suvih grančica i grana. Ponekad izumiru čitava stabla. Tokom leta nove zaraze su slabog stepena ili izostaju, izuzev na nervima i okolnom tkivu lista.

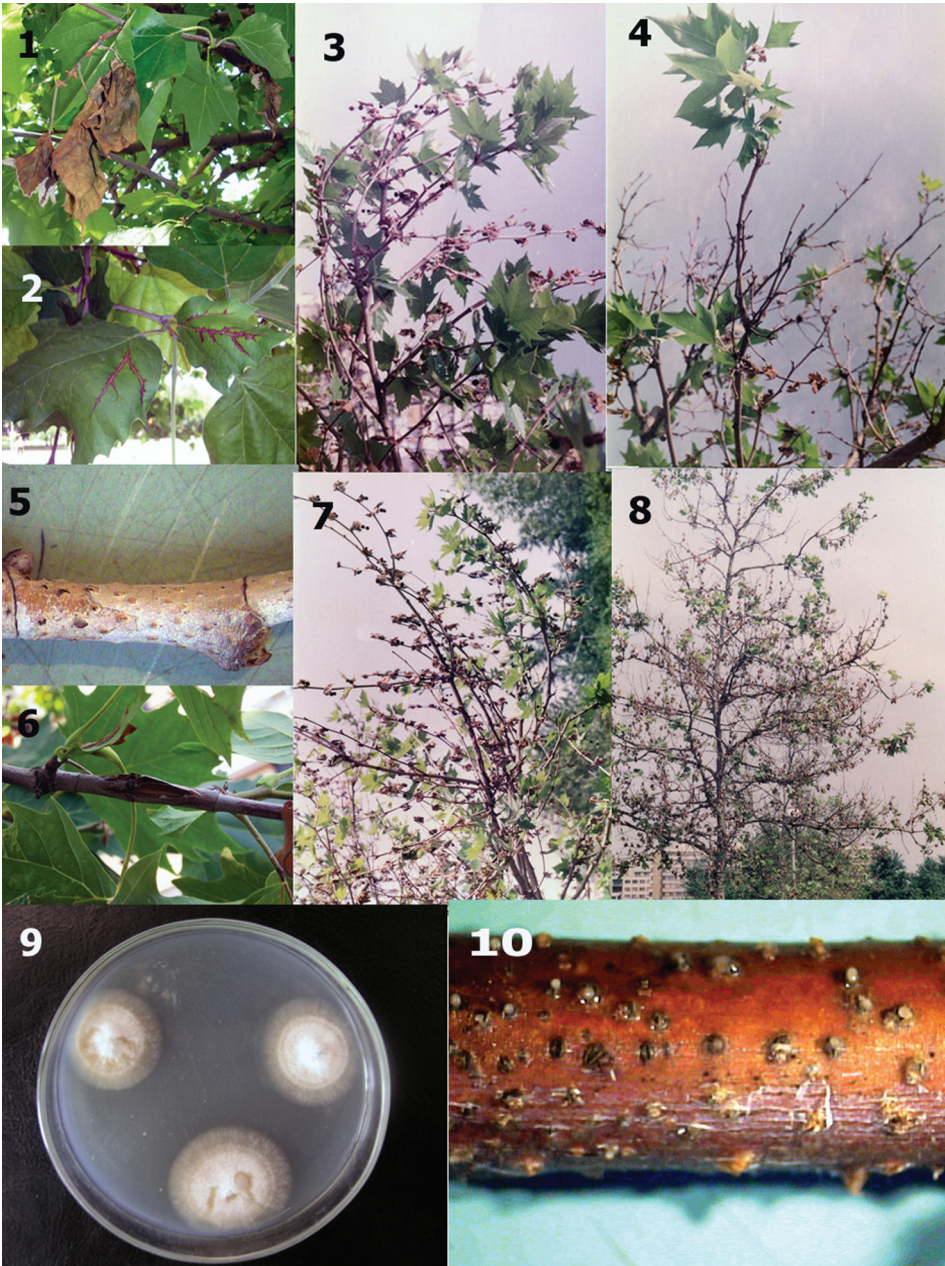
Iz ispupčeno okruglastih telašaca razvijenih u proleće (sl. 5), na kori obolelih mladara i mlađih grančica cure kapi eksudata sa konidijama parazita (sl. 10). Ova plodonosna telašca uočavaju se i na nekrotičnoj kori koja se deformiše i puca, stvarajući rak-rane, kako na mladim, tako i na starijim granama (sl. 6). Sve to sprečava uobičajeni razvoj platana, znatno umanjujući njegovu vitalnost i dekorativno-estetski izgled. Zbog nekroze kore, njene naboranosti i napuklosti nekrotičnog tkiva obolelih mladara i grančica pa i grana i manjih ili većih deformacija na njima tipa rak-ranica i rana, nastao je i naziv „*antraknoza*“ za ovu bolest platana.

Zbog defolijacije jače obolelog lišće grane više puta tokom iste sezone ogoljavaju. Infekcija manjih grančica i grana, usled prstenastog širenja rak-rana, ne samo što prouzrokuje izumiranje grane, nego i stvaranje mnoštva adventivnih pupoljaka iz kojih se razvija obilje tanjih i manjih mladara na mestu neposredno ispod prstenasto obuhvaćenog dela grane, dajući tom delu žbunast izgled.

Slične promene se ispoljavaju i na sadnicama platana u rasadniku, koje prvo venu, a potom se suše, najčešće zbog prstenastog širenja parazita obimom debla. Obolele sadnice uzete iz rasadnika izvor su zaraze na mladim, tek zasađenim sadnicama, ispoljene ranije ili nešto kasnije.

## O NAZIVU BOLESTI

Najčešći naziv za ovo oboljenje platana koristi se izraz „*antraknoza*“. On verovatno potiče zbog stvaranja rak-rana i ranica i prisustva plodonosnih struktura anamorfa na nekrotičnom tkivu kore obolelih mladara, grančica i grana. Međutim, opšte je poznato da se u fitopatologiji, ratarskoj i voćarskoj, ovaj termin upotrebljava onda kad se stvaraju ulegnuća u obolelom tkivu i acervule kao





**Sl. 1-10** – *Apiognomonium veneta*.. Početni simptom plamenjače lišća na obolelom mladom mladaru platana (**sl. 1**); nekroza lisnih nerava i okolnog tkiva (**sl. 2**); početna pojava jake infekcije lišća, mladara i grana platana (**sl. 3**); defolijacija obolelih grančica i grana kao posledica jake infekcije platana (**sl. 4**); konidiomate na oboleloj grančici platana (**sl. 5**); napuklost tkiva i stvaranje rak-rane na oboleloj grani platana (**sl. 6**); grana platana jako inficiranih (**sl. 7**); neobično jaka infekcija u drvodredima platana (**sl. 8**); razvoj kolonija patogena na krompir-glukoznoj podlozi (**sl. 9**); konidiomate na oboleloj grančici platana sa beličastim matriksom izbačenih konidija (**sl.10**).

*Apiognomonium veneta*. Initial symptom of leaves blight at diseased young plane shoot (**Fig.1**); necrosis of the leaves veins and the tissue around them (**Fig. 2**); initial appearance of a severe infection of leaves, shoots and plane twigs (**Fig. 3**); defoliation of diseased plane twigs and branches as consequence of the strong infection (**Fig. 4**); conidiomata at diseased plane twig d (**Fig. 5**); the tissue cracking and canker formation on plane branch diseased (**Fig. 6**); plane branches severe infected (**Fig. 7**); a severe infection in plane tree rows (**Fig. 8**); colonies development at PDA (**Fig. 9**); conidiomata on diseased plane twig with condial mass oozing out (**Fig. 10**).

plodonosne strukture parazita. S obzirom na promene tipa uvelosti i plamenjače lišća i mladara i izumiranja grančica i grana platana ispoljene u patogenezi bolesti, smatramo da bi logično bilo da se umesto „antraknoza“ za ovu mikozu koristi naziv: apiognomoniozna uvelost i plamenjača lišća i mladara i izumiranje grančica i grana platana. Time bi se preciznije ukazalo ne samo na suštinu promena ispoljenih na obolelom platanu, nego bi se konkretnije istakao i naziv parazita, a time bi se otklonilo i svako poistovećivanje naziva bolesti tipa antraknoze sa drugim mikozama ovog nimenovanja koje se mogu uočiti na raznim vrstama obolelih biljaka i njihovih organa.

Patogen prouzrokuje 3-4 različita tipa simptoma u zavisnosti od ekoloških uslova zemlje gde se platan gaji ili od autora koji je opisuju (Josifović, 1951; Spies *et al.*, 1985; Karadžić, 1992; Berry, 1998; Tello *et al.*, 2000; Anonymous, 2001; Douglas, 2006; Jurc, 2006; Kluepfel *et al.*, 2006). Najčešće se navode četiri tipa oboljenja: (1) plamenjača grana („twig blight“), (2) plamenjača pupoljaka („bud blight“), (3) plamenjača mladara („shoot blight“) i (4) plamenjača lišća („leaf blight“).

Plamenjača grana uočava u proleće pre pojave lišća, prouzrokujući izumiranje vrhova manjih jednogodišnjih grana. Plamenjača pupoljaka zapaža se u aprilu i maju, kada razvijeni pupoljci izumiru zbog prstenastog širenja rak-rana na obolelim grančicama, dok se kod pojave plamenjače mladara i još nepotpuno razvijenog lišća novi mladari i lišće naglo izumiru na inficiranim granama. Plamenjača lišća spoljavaja se u vidu smežuravosti, sparušenosti ili naboranosti i smeđavosti lišća koje može u potpunosti da izumre i opadne, što dosta podseća na simptom oštećenja mrazom tokom kasnog proleća (Spies *et al.*, 1985; Karadžić, 1992; Berry, 1998; Jurc, 2006; Kluepfel *et al.*, 2006).

## RASPROSTRANJENOST

U našoj zemlji parazit je veoma rasprostranjen (Arsenijević, 1983). Najčešće se nalazi u drvoredima mnogih gradova, po parkovima ili u okućnicama nekih gazdinstava, kao i u rasadnicima platana. Prisustvo gljive u Srbiji uočili smo u mnogim gradovima: Novi Sad, Bačka Palanka, Aleksa Šantić, Sombor, Subotica, Bačko Gradište, Ruma, Indija i to ne samo u Vojvodini, nego i u ostalim krajevima Republike Srbije: Beograd, Kragujevac i drugim mestima (Arsenijević i sar., 1986, 2006). To je gljiva skoro kosmopolitskog značaja. Njeno prisustvo utvrđeno je u Severnoj i Južnoj Americi, Australiji, na Novom Zelandu (Hitchcock et Cole, 1978), u Evropi i Aziji.

Od evropskih zemalja, osim Srbije, Crne Gore i Slovenije, postoji još i u Italiji, Austriji, Nemačkoj, Belgiji, Danskoj, Španiji, Švajcarskoj, Francuskoj, Turskoj,

na Kipru, u Velikoj Britaniji i drugim državama (Mijušković i Vučinić, 1974; Cellerino et Anselmi, 1978; Spies *et al.*, 1985; Tello *et al.*, 2000; Jurc, 2006).

## MORFOLOŠKE KARAKTERISTIKE PARAZITA

### Micelija

Kolonije gljive 7-10 dana nakon zasejavanja na krompir-glukoznu podlogu su kružnog oblika, sa režnjevitim obodom, beličaste boje (sl.9) sa pojavom koncentričnih krugova i tamnijih telašaca i to u supstratnom delu kolonija, koji počinje da dobija žućkastu boju. Boja kolonija prelazi u krembeličastu nakon 14 dana gajenja, dok supstratni deo izrazito svetlo oker boje. Izolati se razlikuju po brzini porasta kao i intenzitetu fruktifikacije. Uopšteno uzev, tamnija plodonosna tela anamorfa relativno se kasnije pojavljuju, tek oko 10-ak dana posle zasejavanja podloge, odnosno razvoja kolonija. Duže vreme su prazne, a konidije se u njima kasno uočavaju (Balaž i sar., 2004).

### Teleomorf

Peritecije formirane na obolelom lišću opalog sa platana su okrugle, crne, pojedinačne (130-400  $\mu\text{m}$ ), dublje uronjene u nekrotično tkivo obolelog lista iz kojeg svojim kratkim izraštajem („vratom“) izbijaju na površinu; stvaraju se u jesen na obolelom lišću, a askospore tokom zimskog perioda (Rathke, 1978; Spies *et al.*, 1985; Chauvel, 1991; Jurc, 2006).

Askusi su izduženi (40-55 x 9-13 $\mu\text{m}$ ), sužavajući se pri osnovi, a sadrže po osam vretenasto elipsastih askospora. Askospore su dvoćelijske, bezbojne, veličine 12-16 x 4-6 $\mu\text{m}$  (Viennot-Bourgin, 1949; ex. Tello *et al.*, 2000), septirane bliže svom donjem delu.

Razvoj i prisustvo peritecija, askusa i askospora na obolelom i opalom lišću platana nismo pratili. Prema Jurcu (2006) veličina peritecija zajedno sa vratom iznosi 150-350 $\mu\text{m}$ , a 50-100 $\mu\text{m}$  iznad površine lista, dok su peritecije na lišću prezimele znatno manje (Rathke, 1978).

### Anamorf

Što se razvoja i pojave anomorfa tiče, mišljenja su neusaglašena, pogotovu kad se radi o podacima iz starije literature (Josifović, 1951; Krstić i Usčuplić, 1965; Goidanich, 1975, iz kojih proizilazi da ova gljiva stvara nekoliko plodonosnih struktura u kojima se stvaraju jednoćelijske konidije.

Tako, Cellerino i Anselmi (1978) ističu stvaranje pseudopiknida sa pseudo-piknosporama, odnosno pseudokonidijama na stromatičnoj miceliji razvijenoj na obolelim granama, kao i acervula na nekrotičnom tkivu duž lisnih nerava, ispoljenih u vidu manjih pustula u kojima se formiraju jednoćelijske, bezbojne konidije, prosečne veličine  $10.2 \times 4.2 \mu\text{m}$ .

Prema Wulf-u i Butin-u (1987) u zoni lenticela stvaraju se krupne konidiomate (do  $900 \mu\text{m}$ ) delom kao acervule, a delom kao piknidi sa bezbojnim konidijama ( $9-12 \times 4-6 \mu\text{m}$ ).

Formiranje jednoćelijskih, bezbojnih, elipsastih do elipsastoizduženih konidija u acervulama duž nerava lista ( $10-14 \times 4-6 \mu\text{m}$ ) navodi i Goidanich (1975).

Jurc (2006) ističe stvaranje mednordastih acervula  $100-300 \mu\text{m}$  na lišću platanu, kao i krupnih ( $500-900 \mu\text{m}$ ), crnih, golim okom vidljivih piknida na tkivu izumrle kore obolelih grana. Iz piknida cure kapi eksudata sa konidijama. Oslobođanje jednoćelijskih konidija u vidu beličastih kapljica eksudata iz konidiomata formiranih na kori obolelih grančica uočili smo u Novom Sadu tokom druge polovine maja 2006. godine.

Izolati gljive poreklom iz Srbije formiraju plodnosne strukture anamorfa koje, sudeći prema njihovom izgledu, nemaju karakter ni pravih acervula ni piknida, ali su im konidije slične: bezbojne, jednoćelijske i sa po dve kapi ulja na krajevima.

Uopšteno uzev, sve konidije bilo da potiču iz acervula ili iz piknida manje-više sličnog su izgleda: bezbojne, jednoćelijske, elipsaste, elipastojajolike ili elipsastoizdužene.

### **Biološko-ekološke osobenosti gljive**

U svom biološkom ciklusu razvoja (graf. 1), *Apiognomonium veneta* stvara peritecije kao produkte polnog načina razmnožavanja (teleomorf) i acervule i piknide anamorfa, a u njima konidije odnosno piknospore (Josifović, 1951; Krstić i Usčuplić, 1965; Goidanich, 1975; Rathke, 1978; Chauvel, 1991; Karadžić, 1992; Jurc, 2006).

Prezimljavaju peritecije na opalom lišću i micelija u tkivu obolelih grančica. Askospore se iz prezimelih peritecija oslobađaju u proleće, vršeći primarne zaraze. Prema tome, peritecije i micelija izvor su primarnih infekcija u proleće. Chauvel (1991) osporava veću ulogu askospora kao infektivnog potencijala.

Početak proleća na kori obolelih grančica prezimela micelija nastavlja svoj razvoj, stvarajući piknide sa piknosporama, koje raznete vetrom i kišnim kapima vrše infekciju, klijujući i pri temperaturi od oko  $8^\circ\text{C}$  (Chauvel, 1991). Iz acervula oslobođene konidije brzo klijuju već posle šest časova pri temperaturi od  $20^\circ\text{C}$  (Jurc, 2006).



Infekciju platana favorizuju obilne kiše i/ili velika vlažnost, kada su temperature od 9-12°C u fazi bubrenja prvih pupoljaka i daljeg razvoja lišća. Infekcija se širi na mlade mladare kada temperature nisu iznad 14-16°C, a ponekad i tokom celog proleća (Cellerino et Anselmi, 1978).

Konidije iz novostvorenih konidionata vrše sekundarne infekcije. Zaraze razvijenog lišća nastaju kad temperature u proseku dostižu 18-20°C, a ponekad i tokom celog proleća, pa i kasnije. Optimalna temperatura za klijanje konidija u laboratoriji je 20°C i 25°C, dok su one iznad 30°C i ispod 5°C limitirajuće (Cellerino et Anselmi, 1978).

Razvijajući se ispod kutikule, micelija se može održati u latentnom stanju ili da se kasnije razvija kao endofit (Chauvel, 1991; Jurc, 2006).

U našim uslovima bolest se ispoljava tokom prve dekade maja meseca, pogotovo kad je vreme kišovito i prohladno, pa se može pretpostaviti da je infekcija platana ostvarena verovatno još krajem aprila (Arsenijević i sar., 2004). U SAD srednja dnevna temperatura iznad 15°C sprečava razvoj bolesti, odnosno do pojave bolesti dolazi samo u godinama kad je tokom prve dve nedelje za vreme listanja platana srednja dnevna temperatura ispod 15.5°C (Neely et Himelick, 1963; Filer, 1977, ex. Arsenijević i sar., 1986; Cellerino et Anselmi, 1978).

## TAKSONOMIJA I NOMENKLATURA

Teleomorf gljive *Apiognomonium veneta* (Sacc. & Speg.) Höhnelt pripada razdelu *Ascomycota*, redu *Diaporthales*, porodici *Valsaceae* i rodu *Apiognomonium*. Ranije je ova vrsta svrstavana u rod *Gnomonia* (*Valsaceae*) kao *Gnomonia veneta* Kleb.

Nekadašnji naziv anamorfa *Gloeosporium nervisequum* (Fuckel) Sacc. preimenovan je svojevremeno u *Discula platani* (Peck) Sacc. (Smith *et al.*, 1988), koja pripada bespolnim gljivama (*Deuteromycotina*).

U literaturi postoje više sinonima za anamorf vrste *A. veneta* naziva kao što su: *Gloeosporium platani* (Mont.) Oud., *Fusarium nervisequum* Fuckel, *Macrophoma petiolata* (Cooke) Berl. et Voglino, *Sphaeropsis petiolata* Cooke, *Sporonema platani* Bäuml., *Microstoma platani* Eddelb. et Eng. (Boerema et Verhoenen, 1972; Krstić i Usčuplić, 1965; Cellerino et Anselmi, 1978; Rathke, 1978; Spies *et al.*, 1985). Takođe, kao sinonimi za teleomorf spominju se: *Gnomonia platani* Kleb., *G. veneta* (Sacc. & Speg.) Kleb., *G. errabunda* Auersw., *Apiognomonium errabunda* Rob., *Laestadia veneta* Sacc. & Speg., *L. errabunda* Rehm. (Boerema et Verhoenen, 1972; Cellerino et Anselmi, 1978; Spies *et al.*, 1985; Smith *et al.*, 1988).

Sinonimi, navedeni u novijoj literaturi (Shoemaker, 1981; Wittmann et Fickert, 1988; Barr, 1991; Aloj *et al.*, 1993; Tello *et al.*, 2000; MycologyDB,

2001-2006), sledećih su naziva: *Apiosporopsis veneta* (Sacc. & Speg.) Traverso; *Diaporthe veneta* Sacc. & Speg. 1878; *Discella platani* Peck; *Discula nervisequa* (Fuckel) M. Morelet 1973; *Discula platani* (Peck) Sacc. 1884; *Fusarium nervisequum* Fuckel (1870) 1869-70; *Fusarium nervisequum* f. *platani* (Lév.) Fuckel (1870) 1869-70; *Fusarium platani* Mont. 1849; *Gloeosporidina platani* Butin & Kehr. 1998; *Gloeosporidium platani* (Lév.) Höhn.; *Gloeosporium nervisequum* (Fuckel) Sacc. 1884; *Gloeosporium platani* Mont. Oudem. 1873; *Gnomonia platani* Kleb. 1914; *Gnomonia veneta* (Sacc. & Speg.) Kleb. 1905; *Hymenula platani* Lév.; *Myxosporina platani* (Lév.) Höhn. 1920; *Placosphaeria platani* (Bäumler) Limber 1955; *Sporonema platani* Bäumler; (Eriksson *et al.*, 2006).

Istorijat saznanja o taksonomiji i nomenklaturi ovog patogena platana nalazi se i kod drugih autora (Aloj *et al.*, 1993; Tello *et al.*, 2000). Među njima ističu se i najnovija molekulska istraživanja izvanrednog sadržaja data od strane Castlebury *et al.* (2002), koja se odnose na predstavnike reda *Diaporthales*, njegove familije (*Gnomoniaceae*, *Melanconiaceae*, *Cryphonectria – Endothia* Complex, *Schizoparme* Complex, *Valsaceae*, *Diaporthaceae*, *Magnoporthaceae*), rodove (*Apiognomonia*, *Discula*, *Gnomonia*, *Gnomoniella* i druge) i vrste patogena.

## NOVIJI PODACI O STVARANJU ANAMORFA *IN-VIVO* U SVETU

**1. *Discula nervisequa* (Fuckel) comb.nov.** Kao što je napred već i istaknuto, anamorf gljive *A. veneta*, parazita platana, opisan je od strane brojnih autora i pod raznim nazivima. Svi su uočavali prisustvo različitih plodonosnih struktura, a najčešće onih tipa acervula i piknida.

Otuda bi se moglo zaključiti da u prirodi, na izumrlom tkivu platana postoji nekoliko tipova telašaca različitog izgleda, za koje su davani razni nazivi. To je bio i osnovni razlog zbog čega su nastajala razna njihova imena koja se mogu uočiti u više literaturnih izvora (Cellerino *et Anselmi*, 1978; Wulf *et Butin*, 1987; Aloj *et al.*, 1993; Tello *et al.*, 2000; Jurc, 2006).

Da li se ovde radilo o previdu činjeničnog stanja ili ovaj parazit stvarno poseduje različite strukture anamorfa, za koje su najčešće isticani nazivi vrsta rodova *Gloeosporium*, *Fusarium* i dr.

A, moguće je pretpostaviti da je u pitanju i polimorfizam jedne te iste plodonosne strukture. Ovo pogotovo i stoga što su podaci o anamorfu, prisutnog u pojedinim zemljama, bili neujednačeni.

Najzad, učinilo sa da sva ta raznolika telašca anamorfa gljive *A. veneta*, prividno neujednačenog izgleda, predstavljaju ustvari jednu strukturu anamorfa tipa acervula imenovanu kao *Discula platani* (Peck) Sacc. (Smith *et al.*, 1988 i dr.). I

učinilo se tako da je konfuzija oko naziva anamorfa ove gljive napokon rešena. Ali, izgleda nije tako! Jer, nedavno se iz Italije (Aloj *et al.*, 1993) pojavio jedan pregledni rad o raznim nazivima anamorfa i teleomorfa *A. veneta* u kome se predlaže da se *Discula nervisequa* (Fuckel) comb.nov. koristi kao nov naziv za anamorf, a *Fusarium nervisequum* (Fuckel) kao njegov osnovni bazionim (naziv na osnovu koga je nastalo novo imenovanje gljive). A opisane su i dve nove vrste: *Discula destructiva* sp. nov. prouzrokovatelj antraknoze pasje leske (*Cornus floria*) i *Gnomoniella fruxini* sp. nov. uzročnik antraknoze jasena i ističe njena povezanost sa anamorfom *Discula fraxinea* comb. nov. (Redlin, 1991; Redlin et Stack, 1998). Da istaknemo i to da je za rod *Discula* Sacc. karakteristično da njegove vrste stvaraju stromatične konidiomate, a konidije fjalidnoenteroblastično na enteroblastičnim fjalidama (Hollyday, 1989).

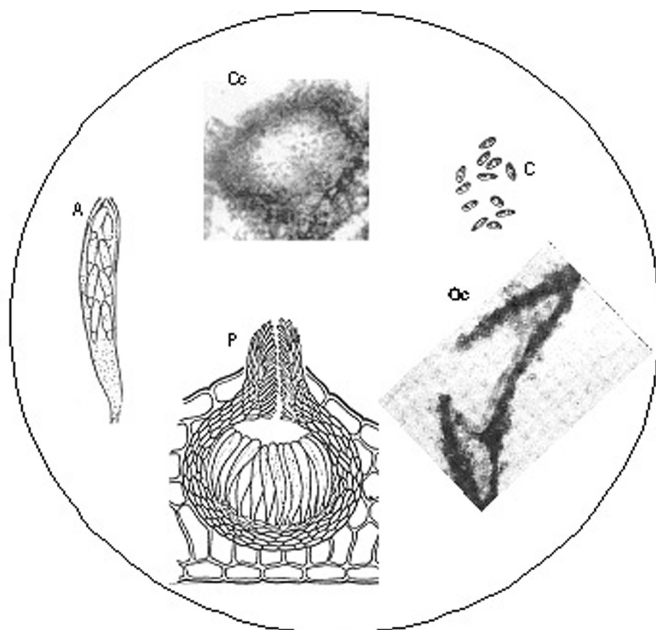
Interesantno je i to da za anamorf *A. veneta*, proučavan u Španiji, Tello *et al.* (2000) navode naziv *Sporonema platani* Bäuml., koja u ovoj zemlji stvara „zatrovane“ i „otvorene“ konidiomate.

**2. *Sporonema platani* Bäuml.** Kako je već i spomenuto, španski autori (Tello *et al.*, 2000) navode postojanje plodnosnih struktura anamorfa ove parazitne gljive, različitog izgleda formiranih na nekrotičnom tkivu platana gajenog u raznim rejonima Španije. Izgled ovih telašaca u zavisnosti je od toga da li se stvaraju na lišću, mladarima ili na grančicama obolelog platana.

Ispostavilo se naime, da se radi o jednom imenovanom anamorfu, ispoljenom kao dva različita oblika: u vidu „zatvorenih“ i „otvorenih“ telašaca. U prvom slučaju nastaju okruglasta, neizmenjena telašca tipa piknida bez ostiola; u drugom slučaju zbog pucanja i razrušavanja zida na njihovoj gornjoj strani, nastaje razdvajanje zida i ispoljavanje izrazite šupljine ispod. Za oba ova morfološki izmenjena oblika konidiomata dat je jedan naziv: *Sporonema platani* (Sutton, 1980). Otvorene konidiomate više su prisutne na obolelim granama i mladarima (graf.1).

Za anamorf o kome je reč, karakteristično je da su im konidiofore bezbojne, septirane i razgranate samo pri osnovi; konidije su neseptirane, bezbojne, glatke, tankih zidova; prave su ili blago savijene, vrh im je zaobljen, a osnova manje ili više ravna; elipsaste su ili se sužavaju prema osnovi, veličine su od 9.5-12 x 3.5-5 µm (Tello *et al.*, 2000). Kako se vidi, sve karakteristike roda *Sporonema* Desm. (Sutton, 1980). Prema Barnett i Hunter (2003) rod *Sporonema* karakterišu subepidermalni piknidi, tankih zidova, u početku zatvoreni, a kasnije pucaju radijalno, praveći pukotinu; tamni su; konidiofore su tanke, tipično razgranate; konidije su jednoćelijske, bezbojne, ovalnog do izduženog oblika.

Sve ovo napred istaknuto, ako se tako i prihvati, navodi na pomisao o tome da su možda slične strukture anamorfa, tipa acervula i piknida, ranije opisivane,



**Graf. 1** – *Apiognomonium veneta*. Biološki ciklus razvoja gljive. P – peritecija, A – askus sa askosporama (Josifović, 1951), Cc – zatvorena konidiomata gljive *Sporonema platani* formirane na obolelom lišću platana (Tello i sar., 2000), C – konidije (Goidanich, 1975), Oc – otvorena konidiomata gljive *Sporonema platani* formirane na oboleloj grančici platana (Tello et al., 2000).

**Graph. 1** – *Apiognomonium veneta*. Biological cycle of the fungus development. P – perithecium, A – ascus with ascospores (Josifović, 1951), Cc – closed conidioma of *Sporonema platani* developed at diseased plane leaf (Tello et al., 2000), C – conidia (Goidanich, 1975), Oc – open conidioma of *Sporonema platani* on diseased twig (Tello et al., 2000).

ustvari jedna kategorija konidiomate ispoljene kao otvorena (acervule) i zatvorena (piknidi) plodonosna telašca.

Otuda je verovatno i zabuna nastala ranije oko toga: kako imenovati jedne, a kako druge tvorevine jednog istog anamorfa? Jer, često su isticane kao acervule ili pseudopiknidi, verovatno što su bez ostiola (Cellerino et Anselmi, 1978; Wulf et Butin, 1987) ili u Francuskoj samo kao piknidi (Chauvel, 1991), odnosno kao piknidi i acervule (Jurc, 2006).



## KAKO BOLEST SPREČITI ?

S obzirom na to da je hemijsko suzbijanje ovog parazita ograničeno u urbanoj sredini zbog zagađenja i nepovoljnog dejstva fungicida na čovekovu okolinu, to higijensko-profilaktične mere imaju prioritet. One podrazumevaju: sakupljanje obolelog lišća opalog sa drveća i sasecanje i spaljivanje inficiranih grančica i grana (Arsenijević, 1983). Obe ove mere imaju za cilj da se smanji infektivni potencijal i onemoguće jače zaraze platana naredne godine. Povrede tkiva nastale pri odsecanju obolelih grančica i grana potrebno je isprskati fungicidima ili ih premazati nekim odgovarajućim dezinfekcionim sredstvom, što se naročito odnosi na tretiranje rak-rana radi sprečavanja njihovog daljeg razvoja i jače nekroze tkiva. Preporučuju se prihranjivanje stabala i umereno zalivanje, kako bi im se vitalnost pojačala (Berry, 1998; Browning, 1999; Ruhl, 2003; Douglas, 2006; Kluepfel *et al.*, 2006).

Što se tiče vremena primene fungicida, navode se više preporuka (Cellerino et Anselmi, 1978; Rathke, 1978; Marchetti et Zechini, 1983; Marchetti *et al.*, 1984; Chauvel, 1991; Anonymous, 1996; Browning, 1999; Jurc, 2006; Nameth et Chatfield, 2006). Sve se one uglavnom svode na to da se bolest predupredi pre njene pojave u proleće. Obično se preporučuju tri intervencije sledećih varijanti: (1) prilikom primene prve varijante, prvo prskanje bi se izvodilo rano u proleće kad pupoljci nabubre, a zatim pre i za vreme infektivnog perioda; (2) druga varijanta podrazumeva tretiranje u vreme otvaranja pupoljaka i još dva dodatna; (3) treća varijanta – kad pupoljci nabubre, zatim početkom otvaranja pupoljaka i deset dana kasnije. Hemijsko suzbijanje parazita najčešće se primenjuje u rasadnicima zbog gore navedenih razloga.

Prema literaturnim podacima (Cellerino et Anselmi, 1978; Rathke, 1978; Spies *et al.*, 1985; Anonymous, 1996; Berry, 1998; Browning, 1999; Douglas, 2006; Kluepfel *et al.*, 2006; Nameth et Chatfield, 2006) u suzbijanju oboljenja efikasnim su se pokazali preparati na bazi bakra, mankozeba, kaptana, hlorotalonila, benomila i tiofanat-metila. Tretiranje stabala u jesen u vreme opadanja lišća i zemljišta ispod, kao i injektiranje platana (u proleće ili tokom leta i u jesen) i zemljišta preparatima na bazi benzimidazola (Benomyl) takođe je za preporuku (Himelick et Neely, 1988; Chauvel, 1991; Anonymous, 1996; Jurc, 2006; Nameth et Chatfield, 2006).

Primena fungicida (Bakarni oksihlorid, Cineb i Dithane M-45) za tretiranje obolelih platana u drvodredima Novog Sada atomizerima tokom epifitotične 1985. godine, nije dala očekivane rezultate (Arsenijević i sar., 1986). To objašnjavamo vremenski i fenofazno neodgovarajućom intervencijom. Ovo je narednih godina uspešno korigovano češćim prskanjem stabala u kraćim vremenskim razmacima: pred početak razvoja vegetacije i pri njenom samom početku. Pošto kasnije opa-

snost od širenja bolesti u našim uslovima prestaje, tretiranja platana tokom leta kod nas nisu ni potrebna (neobjavljeno).

Na kraju, selekcija i stvaranje otpornih hibrida ili klonova platana i njihovo gajenje i ponajbolji je način sprečavanja jače zaraze.

## OSETLJIVOST PLATANA

Osetljivost domaćina zavisi od vrste platana, individualne osetljivosti stabla iste vrste, fiziološkog stanja biljaka, starosti lišća i inokulacionog pritiska parazita. Najosetljivije je lišće starosti 5-20-ak dana. Razlike u osetljivosti nema između mlađih i starijih biljaka (Cellerino et Anselmi, 1978).

Pojedine vrste platana nejednako se ponašaju prema parazitu. Tako je orijentalni platan (*Platanus orientalis* L.) ispoljio izrazitu otpornost, dok je američki platan (*P.occidentalis* L.) relativno osetljiv. *Platanus acerifolia* (Ait.) Willd. (= *P. x hybrida* Brot.), hibrid nastao između ove dve vrste (*P. x hybrida*) varijabilne je otpornosti (Cellerino et Anselmi, 1978; Smith *et al.*, 1988; Karadžić, 1992; Jurc, 2006).

Prema Smith-u i sar. (1988) proizlazi da je londonski platan (*P. x acerifolia*) najčešće parazitiran jer se u Evropi najviše i gaji. Njegovi klonovi varijabilne su osetljivosti. Zbog toga selekcija i stvaranje otpornih klonova *P. x acerifolia* (= *P. hybrida* Brot.) predstavljala bi u budućnosti i najuspešniji način suzbijanja ove toliko česte bolesti platana u Evropi.

Jurc (2006) takođe ističe da je hibrid stvoren ukrštanjem *P.acerifolia* i *P.occidentalis*, javorolisni platan (*P. x hispanica*) koji se u Sloveniji pokazao varijabilnog ponašanja, znatno izraženije otpornosti.

U populaciji platana gajenog u Novom Sadu (*P.acerifolia*) zapazili smo individualnu otpornost stabala. Neka stabla, nalazeći se u neposrednoj blizini jače obolelih, nisu ispoljavala simptome bolesti (Arsenijević i sar., 1986). Ovo ukazuje na mogućnost vegetativnog razmnožavanja platana korišćenjem otpornih matičnih stabala. U Severnoj Americi već postoje otporni klonovi selekcijom stvoreni (Anonymous, 1996; Anonymous, 1999; Browning, 1999; Jurc, 2006; Kluepfel *et al.*, 2006).

## UMESTO ZAKLJUČKA

*Apiognomonium veneta* (Sacc. & Speg.) Höhnelt (*Ascomycota*, *Diaporthales*, *Valsaceae*) čest je i ekonomski značajan parazit platana u Republici Srbiji. Kad mu uslovi za razvoj pogoduju prouzrokuje masovnu pojavu simptoma tipa plamenjače („*blight*“) lišća i mladara, kao i izumiranje („*dieback*“) grančica i grana.

*A. veneta* stvara peritecije (130-400 $\mu$ m) i izdužene askuse (40-55 x 9-13 $\mu$ m) sa po osam dvočelijskih askospora (12-16 x 4-6 $\mu$ m); peritecije prezimljavaju na obolelom lišću; u njima se tokom zime formiraju askospore koje se oslobađaju u proleće i vrše primarne zaraze.

Prezimeti može i micelija u nekrotičnom tkivu kore grančica i grana, koja nastavlja svoj razvoj u proleće stvarajući plodonosne strukture sa konidijama. Stvorene konidije vrše infekciju raznih organa platana: pupoljaka, lišća, mladara, grančica i grana.

Prisustvo acervula na obolelom tkivu platana ističu mnogi autori, dok je stvaranje piknida (*Sporonema platani* Bäuml.) izgleda još uvek diskutabilno (Cellerino et Anselmi, 1978; Rathke, 1978; Spies *et al.*, 1985; Wulf i Butin, 1987; Chauvel, 1991; Jurc, 2006).

Na hranljivoj podlozi parazit se relativno lako može izolovati. Pri tome stvara beličasto-okruglaste kolonije sporog razvoja. Na kolonijama se razvijaju plodonosne strukture anamorfa koje više podsećaju na acervule nego na piknide. A moguće je, izgleda, razvoj i jednih i drugih telašaca (Arsenijević i sar., 1986).

U acervulama se na nekrotičnom tkivu lista stvaraju konidije nalik na one iz kulture; konidije su elipsaste, jednočelijske, bezbojne, veličine 8.9-14.5 x 3.5-5.0 $\mu$ m. Na izumrloj kori obolelih grančica formiraju se zatvorena telašca tipa piknida. Njihove konidije su elipsaste do elipsastoizdužene, jednočelijske, veličine 9.0-16.0 x 3.2-5.3 $\mu$ m.

Anamorf ovog parazita platana poznat je kao *Discula platani* (Peck) Sacc. (Smith i sar., 1988). Međutim, prema Aloj-u i sar. (1993) za anamorf ove gljive predlaže se nov naziv *Discula nervisequa* (Fuckel) comb.nov., a za njegov prvi bazionim *Fusarium nervisequum* Fuckel. Za anamorf prisutan na platanu u Španiji Tello i sar. (2000) navode naziv *Sporonema platani* Bäuml.

Što se naziva teleomorfa tiče, ukazuje se na to da *A. veneta* (Sacc. & Speg.) Höhnelt (*Ascomycota*) ne pripada kompleksu pojedinih sličnih vrsta roda *Gnomonia*, odnosno *Apiognomonium* (*Apiognomonium errabunda* (Roberge) Höhnelt; anamorf: *Discula umbrinella* /Berk. & Broome/ M. Marelot) kako se to nekada mislilo, nego je to posebna vrsta, parazit platana. Jer, *A. errabunda* (Roberge) Höhnelt parazit je bukve, hrasta i drugog brojnog širokolisnog drveća (*Acer*, *Aesculus*, *Celtis*, *Fagus*, *Fraxinus*, *Quercus*, *Tilia*) na kome uzrokuje pega-

vost lišća i izumiranje mladara, slično kao i *A. veneta* na platanu (Monod, 1983; Smith *et al.*, 1988; Aloj *et al.*, 1993; Tello *et al.*, 2000).

Prohladno i vlažno vreme krajem aprila i početkom maja, kad se ova bolest platana u Srbiji najčešće i pojavljuje, znatno utiču na ostvarenje zaraze od strane *A. veneta* i ispoljavanje simptoma.

Brojni fungicidi ispoljili su toksični efekat prema *A. veneta* (Rathke, 1978; Cellerino et Anselmi, 1978; Marchetti et Zechini, 1983; Marchetti *et al.*, 1984; Spies *et al.*, 1985; Wulf et Butin, 1987; Himelick et Neely, 1988; Chauvel, 1991; Anonymous, 1996; Douglas, 2006; Jurc, 2006; Kluepfel *et al.*, 2006; Nameth et Chatfield, 2006) bilo da se vrši prskanje stabala ili injektiranje platana i zemljišta. Intervencije pred početak vegetacije i pri njenom samom početku najčešće se preporučuju jer kasnije, naročito tokom leta, opasnost od pojave bolesti prestaje (Arsenijević i sar., 1986). Ipak, gajenje otpornih klonova platana najbolja su garancija za sprečavanje jakih zaraza i obezbeđivanje dobrog zdravstvenog stanja ove ukrasne biljke (Smith *et al.*, 1988). A takvi kao što su Bloodgood, Columbia i Liberty već postoje (Anonymous, 1996; Anonymous, 1999; Browning, 1999; Jurc, 2006; Kluepfel *et al.*, 2006).

U populaciji platana (*Platanus acerifolia*) gajenog u Novom Sadu, pored osetljivih, u neposrednoj blizini, postoje i potpuno zdrava (otporna) stabla, što verovatno ukazuje na njegovu genetsku neujednačenost. Ovo bi se moglo iskoristiti za vegetativno razmnožavanje i proizvodnju sadnica otpornih prema *A. veneta*.

## LITERATURA

- Aloj, B., Nanni, B., Marziano, F., Noviello, C. (1993): Considerazioni nomenclaturiali sull' *Apiognomonina veneta*. *Mycologia Italiana* 22 (2): 15-18.
- Anonymous (1996): Sycamore (*Platanus*) – Anthracnose. <http://plant-disease.ippc.orst.edu>
- Anonymous (1999): Anthracnose Diseases of Shade Trees. [www.uri.edu/ce/factsheets/prints/anthractrees.html](http://www.uri.edu/ce/factsheets/prints/anthractrees.html)
- Anonymous (2001): Sycamore Anthracnose. Urban Forestry Services. Toronto - Parks, Forestry & Recreation.
- Arsenijević, M. (1983): Izumiranje platana – prouzročivač *Gnomonia veneta* (Sacc. & Speng.) Kleb. Biljne mikoze. Mikoze II. Odabrana predavanja. II izdanje. Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad, pp. 75-76.
- Arsenijević, M., Balaž Jelica, Popović Tatjana (2006): *Apiognomonina veneta* – čest i značajan parazit platana u Vojvodini. *Biljni lekar*, br. 6, 486-489.
- Arsenijević, M., Balaž Jelica, Popović Tatjana (2004, publ. 2007): Dejstvo temperature i padavina na intenzitet pojave *Apiognomonina veneta*, parazita platana. *Zaštita bilja*, vol.55: 19-26



- Arsenijević, M., Balaž Jelica, Popović, L., Šikoparija, Dobrila (1986): Istraživanje uzroka izumiranja platana u cilju njegove zaštite. Samoupravna interesna zajednica za naučni rad Vojvodine, Novi Sad; Poljoprivredni fakultet, Institut za zaštitu bilja, Novi Sad; Gradsko zelenilo, OOUR „Parkovi“, Novi Sad. Elaborat: 1-21, Novi Sad. Rezultati istraživanja na Projektu obavljenih u Novom Sadu tokom 1985. i 1986. godine.
- Arx, J.A.von (1970): A revision of the fungi classified as *Gloeosporium*. Verlag von J. Cramer, Lehre, pp. 203.
- Balaž Jelica, Arsenijević, M., Popović Tatjana (2004, publ. 2007): Uticaj hranljive podloge i temperature na razvoj anamorfa *in-vitro* gljive *Apiognomonium veneta*, parazita platana. Zaštiti bilja, vol. 55: 27-37
- Barnett, H.L., Hunter, B.B. (2003): Illustrated Genera of Imperfect Fungi. APS Press, St.Paul, Minnesota, USA, pp. 172-173.
- Barr, M.E. (1978): The *Diaporthales* in North America. Mycologia Memoir, No. 7: 1-232, J. Cramer.
- Barr, M.E. (1991): Revisions and additions to the *Diaporthales*. Mycotaxon 41(1): 287-305.
- Berry, F.H. (1998): Anthracnose Diseases of Eastern Hardwoods-FIDL (Forest Insect & Disease, Leaflet 133) [www.na.fs.fed.us](http://www.na.fs.fed.us) (pp. 1-7).
- Boerema, G.H., Verhoenen, A.A. (1972): Check-list for scientific names of common parasite fungi. Series 1a: Fungi on trees and shrubs. Netherland Journal Plant Pathology 78 (Supplement 1): 1-63.
- Browning, B. (1999): Sycamore Maple Blight. [www.bio.net/bionet/mm/ag-forst/1999-July/014001.html](http://www.bio.net/bionet/mm/ag-forst/1999-July/014001.html)
- Cellerino, G.P., Anselmi, N. (1978): Distribution of *Gnomonia platani* Kleb. and notes about host susceptibility, epiphytology and control. Informatore Fitopatologico 11/12 (XXVIII), Anno XXVIII: 53-64 (in Italian).
- Chauvel, G. (1991): Antraknoz platana. L'anthracnose du platane. Phytoma, 1991, No. 434, C. 57-58: 60-61 (Kraći prikaz iz Referativnog žurnala 5, 1992).
- Castlebury Lisa, A., Rossman Amy, Y., Jaklitsch, W.J., Vasilyeva Larissa, N. (2002): A preliminary overview of the *Diaporthales* based on large subunit-nuclear ribosomal DNA sequences. Mycologia 94(6): 1017-1031.
- Douglas, S.M. (2006): Anthracnose Diseases of Trees. [www.caes.state.ct.us/](http://www.caes.state.ct.us/).
- Eriksson, O.E., Baral, H.O., Currah, R.S., Hansen, K., Kurtzman, C.P., Rambold, G., Laessoe, T. (2006): Notes on ascomycete systematics. Myconet.
- Goidanich, G. (1975): Manuale Di Patologi a Vegetale, Bologna, Vol. II, pp. 588-590.
- Hawksworth, D.L. Sutton, B.C., Ainsworth, G.C. (1983): Ainsworth et Bisby's Dictionary of the Fungi. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey (Seventh Edition), pp. 445.

- Himelick, E.B., Neely, D. (1988): Systemic chemical control of sycamore anthracnose. *Journal of Arboriculture* 14: 137-141.
- Hitchcock, L.A., Cole, A.L.J. (1978): *Gnomonia platani*, the ascogenous state of *Gloeosporium platani*, found in New Zealand. *New Zealand Journal of Botany*, Vol.16: 411.
- Holliday, P. (1989): *A Dictionary of Plant Pathology*. Cambridge University Press, Cambridge, New York, New Rochelle, Melbourne, Sydney, pp. 309.
- Josifović, M. (1951): *Šumska fitopatologija*. Naučna knjiga, Beograd, pp. 384.
- Jurc, D. (2006): *Apiognomonina veneta* na platani. [www.fito-info.bf.uni-lj.si/ag/fito](http://www.fito-info.bf.uni-lj.si/ag/fito).
- Karadžić, D. (1992): *Gnomonia veneta* (Sacc. & Speg.) Kleb. Zaštita šuma (Šumska fitopatologija). *Zavod za udžbenike i nastavna sredstva*, Beograd; *Zavod za udžbenike*, Novi Sad; *Zavod za školstvo*, Podgorica, pp. 131.
- Kluepfel, M., Scott, J.M., Blake, J.H., Gorsuch, C.S. (2006): Sycamore Problems. Home & Garden Information Center. <http://hgic.clemson.edu>
- Krstić, M., Usčuplić, M. (1965): Najvažnije parazitske gljive šumskog bilja. *Univerzitet u Sarajevu, Sarajevo*, pp. 187.
- Marchetti, L., Zechini, A. (1983): *Gnomonia platani*: aspetti biologici e lotta chimica. *Informatore Fitopatologico* 6: 30-32.
- Marchetti, L., Zechini, A., Badiali, G. (1984): Un biennio di lotta chimica contro l'antracnosi del Platano. *Informatore Fitopatologico* (34) 10: 35-36.
- Mijušković, M., Vučinić Zora (1974): Prilog poznavanju parazitske mikroflore Crnogorskog primorja. *Glasnik republičkog zavoda zaštite prirode Prirodnjačkog muzeja Titograd* 7: 5-35, Titograd.
- Monod, M. (1983): Monographie Taxonomique des *Gnomoniaceae* (Ascomycetes de l'ordre des *Diaportales* I). *Sydovia* 9: 1-315.
- MycologyDB (2001-2006): NZFUNGI – New Zealand Fungi (and Bacteria). Landcare Research.
- Nameth, S., Chatfield, J. (2006): Anthracnose Leaf Blight of Shade Trees. <http://ohioline.osu.edu/hyg-fact/3000/3048.html>
- Neely, D. (1975): Treatment of foliar diseases of woody ornamentals soil injections of Benomyl. *Plant Disease Reporter*. Washington 59(4): 300-303.
- Neely, D. (1977): Long term control of foliar diseases of woody ornamentals with soil injections of Benomyl. *Plant Disease Reporter* 61: 370-372.
- Neely, D., Himelick, E.B. (1963): Temperature and Sycamore Anthracnose Severity. *Plant Disease Reporter* 47: 171-175.
- Neely, D., Himelick, E.B. (1965): Nomenclature of the Sycamore Anthracnose Fungus. *Mycologia* 57: 834-837.
- Petrak, F. (1971): Kritische Bemerkungen zu Nomenklatur der Gattung *Discula* Sacc. *Sydovia* 24: 270-273.

- Rathke, S. (1978): Die Blattnerkrankheit der Platane (*Gnomonia veneta* (Sacc. & Spæg.) Kleb.). Nachrichtenblatt für den Pflanzenschutz in der DDR, 12(32): 256.
- Redlin, S.C. (1991): *Discula destructiva* sp.nov. cause of dogwood anthracnose. Micologia 83: 633-642.
- Redlin, S.C., Stack, R.W. (1998): *Gnomoniella fraxini* sp.nov., teleomorph of the ash anthracnose fungus and its connection to *Discula fraxinea* comb.nov. Mycotaxon 32: 175-198.
- Rossmann, Amy, Y., Palm, Mary, E., Spielman Linda (1997): A Literature Guide for the Identification of Plant Pathogenic Fungi, APS Press, St. Paul Minnesota, pp. 290.
- Ruhl, G. (2003): Sycamores Losing Leaves. Plant & Pest Diagnostic Laboratory, Purdue University. [www.ppd.l.purdue.edu/PPDL/hot03/06-03.html](http://www.ppd.l.purdue.edu/PPDL/hot03/06-03.html)
- Shoemaker, R.A. (1981): Changes in Taxonomy and Nomenclature of Important Genera of Plant Pathogen. Annual Review of Phytopathology, Vol. 19: 297-307 (doi: 10.1146/annurev.py.19.090181.001 501).
- Sinclair, W.A., Johnson, W.T. (1977): Anthracnose diseases of trees and shrubs. Tree Pest Leaflet. A2, Ithaca, NY: NY State College of Agriculture and Sciences, Cornell University, pp.7.
- Smith, J.M., Dunez, J., Phillips, D.E., Lelliott, R.A., Archer, S.A. (1988): European Handbook of Plant Diseases. Blackwell Scientific Publications. Oxford, London, Edinburgh, pp. 583.
- Spies, J.I., Knösel, D., Meier, D. (1985): Anthracnose und Hitzeschäden an Platanen im Stadtgebiet von Hamburg. Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes 37(2): 17-21, Stuttgart.
- Sutton, B.C. (1980): The *Coelomycetes*. Fungi Imperfecti with Pycnidia, Acervuli and Stromata. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England, pp. 696.
- Tello, M.L., Gaforio, L., Pastor, S. (2006): Improvements detection and isolation of *Apiognomonium veneta* on plane trees. Proceedings of the 12th Mediterranean phytopathological congress, Rhodes Island, Greece 11-15 June 2006: 347-349.
- Tello, M.L., Redondo, C., Sagasta-Mateo, E. (2000): Health status of plane trees (*Platanus* spp.) in Spain. Journal of Arboriculture 26(5): 246-254, September 2000.
- Wittmann, W., Fickert, W. (1988): Die Blattbräune der Platane (*Discula platani* (Peck)Sacc.) (= *Gleospodium nervisequum* Sacc.) (= *Gleospodium platani* (Mont.)Sacc.). Hauptfruchtform: *Apiognomonium veneta* (Sacc. & Spæg.) Höhn. (= *Gnomonia veneta* Kleb.). Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer English Edn, 5: 4.
- Wulf, A., Butin, H. (1987): Krankheiten und Schädlinge der Platane. Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes, 39(10): 145-148, Stuttgart.

(Primljeno: 05.02.2006.)

(Prihvaćeno: 28.08.2007)

## **APIOGNOMONIA BLIGHT OF LEAVES AND SHOOTS AND TWIGS AND BRANCHES DIEBACK („ANTHRACNOSE“ ) OF PLANE TREES**

MOMČILO ARSENIJEVIĆ, JELICA BALAŽ, TATJANA POPOVIĆ  
Faculty of Agriculture, Department of Plant Protection, 21000 Novi Sad  
E-mail: [marsa@neobee.net](mailto:marsa@neobee.net)

### **Summary**

*Apiognomonium veneta* (Sacc. & Speg.) Höhnelt (*Ascomycota, Diaporthales, Valsaceae*) is frequent and economically important plane trees pathogen in Republic of Serbia. In favorable environmental condition pathogen causes leaves and shoots blight as well as twigs and branches dieback

In this paper the literature data concerning the symptoms of the disease and morphology, biology, ecology, taxonomy, nomenclature and control of pathogen are discussed.

(Submitted: 05.02.2006)

(Accepted: 28.08.2007)



Zaštita bilja  
vol. 56 (1-4), No 251-254, 25-54, 2005  
Beograd

UDK 634.1/2-235 (497.1-13)  
Naučni rad

## DOMAĆINI I RASPROSTRANJENOST *ERWINIA* *AMYLOVORA* (BURRILL) WINSLOW *ET AL.* U NIŠAVSKOM OKRUGU\*

MILIĆ VOJINOVIĆ  
AD „Agrorazvoj“, Niš

Ispitivana je pojava, rasprostranjenost i spektar domaćina *Erwinia amylovora* na području Nišavskog okruga u opština Niš, Gadžin Han, Aleksinac, Svrljig, Merošina, Doljevac i Ražanj. Izolacija patogena vršena je sa kruške, dunje, mušmule i oskoruše, koje su ispoljavale tipične simptome bakteriозne plamenjače, kao i sa biljaka sa simptomima nalik promenama koje prouzrokuje ova fitopatogena bakterija (dunjarica, japanska dunja, vatreni trn, jabuka, kajsija, breskva, višnja, šljiva i džanarika).

Identifikacija patogena obavljena je na osnovu morfoloških, odgajivačkih, biohemijsko-fizioloških i seroloških karakteristika i proverom patogenosti dobijenih izolata.

U regionu Nišavskog okruga *E. amylovora* je registrovana gotovo u svim područjima gajenja jabučastih voćaka u Nišavskom okrugu. Patogen je registrovan na krušci, dunji, mušmuli i oskoruši, koja se po prvi put spominje kao domaćin *E. amylovora* u Srbiji.

*Ključne reči:* *Erwinia amylovora*, bakteriозna plamenjača, rasprostranjenost, domaćini, identifikacija, Nišavski okrug.

### UVOD

Bakteriозna plamenjača, koju izaziva bakterija *E. amylovora* (Burrill 1882), spada u grupu ekonomski najznačajnijih oboljenja jabučastih voćaka. Prvi put je zapažena krajem 18. veka (1780) u Severnoj Americi na autohtonim vrstama gloga i divlje jabuke. Vrlo brzo se proširila na čitavu teritoriju SAD, da bi pu-

\* Skraćena verzija magistarske teze odbranjene na Poljoprivrednom fakultetu Prištinskog Univerziteta u Nišu 2007. godine

tem sadnog materijala bila prenetu u Japan (1903), Kanadu (1904), Novi Zeland (1919) i Meksiko (1921) (Zeller, 1974). Sa Novog Zelanda je prenetu u Englesku 1957. godine. Kasnije se proširila po celoj Evropi. Do 1998. godine registrovana je u 40 zemalja sveta (van der Zwet i Bonn, 1998). U SFRJ patogen je zvanično potvrđen 1990. godine (Panić i Arsenijević, 1991 b, 1996; Arsenijević i Panić, 1990, 1992). U 2003. godini posebno je bio izražen napad *E. amylovora* na dunji (Obradović *et al.*, 2003).

S obzirom da *E. amylovora* parazitira sve organe domaćina na kojima prouzrokuje nekrozu i izumiranje tkiva, ova bakterija spada u red najdestruktivnijih patogena. Kada su klimatski uslovi povoljni za razvoj patogena, obrazuju se kapljice bakterijskog eskudata, što je simptomatološki znak prisustva *E. amylovora*.

Simptomi bakteriozne plamenjače uočeni su prvi put na dunji i krušci na području Nišavskog okruga 1997. godine i do 2005. godine bolest se raširila u svim opštinama. Podaci o rasprostranjenosti i štetnosti oboljenja su oskudni za područje Nišavskog okruga. Zato je cilj ovih istraživanja bio da se utvrdi rasprostranjenost, štetnost i spektar domaćina *E. amylovora* u ovom regionu.

## MATERIJAL I METODE

### Rasprostranjenost *E. amylovora*, krug domaćina i intenzitet napada

Pojava i rasprostranjenost *E. amylovora* praćena je u 100 lokaliteta u opštinama Aleksinac (Deligrad, Bobovište, Trnjane, Korman, Gredetin, Rutevac, Žitkovac, Lužane, Jakovlje, Vrćenovica, Tešica, Mozgovo, Subotinac, Bovan, Katun, Crni kao, Kulina, Glogovica, Nozrina, Stublina, Bujmir, Ćićina, Moravac, Prćilovica, Adrovac, Suhotno, Kamenica, Dobrujevac, Prugovac, Lipovac, Kraljevo i Bradarac), Ražanj (Skorica, Grabovo, Smilovac, Vitoševac, Šetka, Pardik, Mađare, Varoš i Praskovče), Svrljig (Manojlica, Guševac, Okruglica, Gulijan, Beloinje, Ribare, Prekonoga, Periš, Lalinac, Labukovo, Popšica i Niševac), Merošina (Devča, Čubura, Rožina, Brest, Oblačina, Balajnac i Batušinac), Doljevac (Pukovac, Malošište, Orljane, Belotinac i Kočane), Gadžin Han (Taskovići, Ovsinjinac, Ravna Dubrava, Ličje, Dušnik, Sopotnica, Kaletinac, Semče, Grkinja, Dukat, Krastavče, Jakovlje, M. Kutina) i Niš (Trupale, Lalinac, Novo Selo, Sečanica, G. Toponica, Komren, Vele Polje, Medoševac, D. Matejevac, G. Matejevac, Kamenica, Knez selo, Vrelo, Međurovo, Gabrovac, Niška Banja, Sićevo, Vlase, Ostrovica, Čamurlija, Vrtište i Trnava) tokom vegetacije i u zimskom periodu u 2004. i 2005. godini (mapa 1.). Posebna pažnja je pri tome

posvećena pregledu glavnih domaćina *E. amylovora* među vrstama jabučastog voća (jabuka, kruška, dunja i mušmula), koje su zastupljene u značajnoj meri na malim plantažama u privatnom vlasništvu kao i pojedinačna stabla voćaka i ukrasnih biljaka na okućnicama ili usamljena na međama i utrinama. Utrine i međe predstavljaju značajna žarišta za širenje infekcije, jer se obolele stabla ne uklanjaju i ne uništavaju (Zeller, 1974; Meijneke, 1968). Pojava oboljenja je praćena i na vrstama divlje kruške, jabuke i gloga, a evidentirana je i udaljenost od zapuštenih zasada pod jabučastim voćem.

Ocena intenziteta pojave *E. amylovora* obavljena je po skali 1-10 (van der Zwet et Keil, 1979) pregledom po 100 stabala jabuke, kruške, dunje i mušmule.

### **Prikupljanje uzoraka obolelih biljaka**

Delovi biljka (cvet, plod, mladar, grane, skeletne grane i dr.) sa tipičnim i sumjivim simptomima bakteriozne plamenjače su kolekcionisani u pregledanima lokalitetima, pažljivo upakovani u kese i kutije i dostavljani u D.P. "Agrorazvoj", Niš, i Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Beograd, radi identifikacije uzročnika bolesti. Na svakoj kesi ili kutiji zabeleženi su lokalitet, vrsta i sorta biljke domaćin i promene uočene na njima, kako bi se nakon laboratorijskog proučavanja mogli identifikovati lokaliteti sa prisustvom *E. amylovora*. U lokalitetima na teritoriji opštine Niš prikupljeni su uzorci sa kruške, dunje, mušmule i oskoruše, Aleksinac sa kruške, dunje i mušmule, Svrlijig sa dunje i mušmule, Ražanj sa dunje i mušmule, Merošina sa kruške, dunje i mušmule, Doljevac sa dunje i mušmule i opštine Gadžin Han sa dunje i mušmule.

Posle uzimanja svakog uzoraka obavezno je vršena dezinfekcija ruku 96% etanolom, a uzorci obolelih biljaka nakon korišćenja su spaljivani.

### **Izolovanje na hranljivoj podlozi**

Izolovanje bakterije radi dobijanja čistih kultura iz obolelih uzoraka vršeno je uobičajenim postupkom, korišćenjem maceriranog tkiva i zasejavanjem macerata na hranljivu podlogu. Prikupljeni uzorci su isprani pod mlazom česmenske vode i prosušeni na filter papiru. Mali fragmneti, uzeti sa prelaza zdravog i obolelog tkiva, preneti su u flambiranjem sterilisane avane sa sterilnom vodom. Nakon 10-15 minuta vršeno je maceriranje tkiva sterilnim tučkom i dobijena suspenzija bakterija zasejana je na mesopeptonsku podlogu (NA), mesopeptonsku podlogu obogaćenu sa 5% saharoze (NAS) i King B podlogu (Arsenijević, 1988) u Petri kutijama pomoću bakteriloške petlje. Zasejane Petri kutije održavane su u termostatu 2-3 dana pri 25°C.

Od brojnih izolata za dalja istraživanja odabrano je 33 koji su (tabela 1) čuvani u frižideru i povremeno su presejavani.

### **Patogene odlike izolovanih sojeva**

#### *Inokulacija lišća duvana i muškatile*

Inokulacija lista duvana i muškatile obavljena je radi utvrđivanja hipersenzibilne reakcije ovih biljaka (Klement *et al.*, 1990). Suspenzija bakterija, spremljena od bakterijskog eksudata formiranog na prethodno inokulisanim nezrelim plodovima voćaka, ubrizgavana je medicinskim špricom u tkivo mezofila između 2 bočna nerva. Biljke su nakon inokulacije održavane u uslovima sobne temperature tokom 24 časa nakon čega je određivana pojava nekrotičnih promena, odnosno pojava hipersenzibilnosti ovih biljaka. Lišće duvana i muškatile tretirano na isti način vodom korišćeno je kao negativna kontrola.

#### *Inokulacija listova kruške i jabuke*

Lisne drške listova kruške (sorte viljamova, varamanka i ječmenka) i jabuke (sorte ajdared, šarunka, kolačara i mantet) potapane su suspenziju bakterija poreklom iz kulture, obavijene vatom i držane u vlažnoj komori 2-3 dana, a zatim u uslovima sobne temperature. Rezultati su očitavani 3, 5, 7, 10 i 15 dana nakon inokulacije (Panić *et al.*, 1989; Arsenijević *et al.*, 1991). Kontrolni listovi kruške i jabuke tretirani su na isti način vodom.

#### *Inokulacija nezrelih plodića kruške jabuke i šljive*

Veštačka inokulacija nezrelih plodova kruške (sorta viljamovka), jabuke (ajdared) i šljive (stenli), obavljena je nanošenjem kapi bakterijske suspenzije, poreklom iz kulture, ubodom pomoću igle na po tri mesta (u vidu trougla) svakog plodića. Inokulisani plodovi su čuvani u vlažnoj komori 1-2 dana, uz povremeno vlaženje vodom ručnom prskalicom, a zatim su prekriveni navlaženim polivinilom (Kudela, 1988; Arsenijević, 1988). Kontrolni plodovi kruške, jabuke i šljive tretirani su vodom.

#### *Inokulacija kriški plodova kruške*

Kriške plodova kruške sorte viljamova inokulisane su premazivanjem preseka ploda bakterijskom suspenzijom poreklom iz kulture, korišćenjem staklenog

štapića koji je na vrhu obmotan vatom. Inokulisani plodovi su postavljeni u sterilne Petri kutije sa navlaženim filter papirom. Nakon inkubacije u vlažnoj komori tokom 1-2 dana, Petri kutije su iznošene na laboratorijske stolove pri uslovima sobne temperature i očitavani su rezultati (Billing *et al.* 1960; Panić *et al.*, 1994). Kriške plodova kruške inokulisane su vodom služile su kao kontrola.

### **Karakteristike razvoja kolonija *E. amylovora* na hranljivim podlogama**

Izgled i karakteristike razvoja kolonija proučavane su na mesopeptonskoj podlozi (Arsenijević; 1988), mesopeptonskoj podlozi obogaćenoj sa 5% saharoze (Arsenijević; 1997), Kingovoj podlozi B (Lelliott i Stead, 1987; Arsenijević i Sremac 1993), Crosse-Goodmanovoj podlozi (Crosse i Goodman 1973), mesopeptonskoj podlozi sa ekstraktom kvasca i dekstrozom (Panić *et al.*, 1994) i CCT podlozi (Ishimaru i Klos; 1984) nakon 3 i 5 dana od zasejavanja. Posmatran je oblik kolonija, veličina, boja, sjajnost, ispupčenost i oblik ivica.

### **Preliminarni testovi za identifikaciju *E. amylovora***

#### *Ponašanje prema Gram-u*

Ponašanje bakterije prema Gramu proučeno je primenom 3% KOH po postupku Suslow *et al.* (1982) i Arsenijevića i Jovanovićeve (1995). Kultura bakterije stara 24 časa zahvaćena je čačalicom za zube i razmazana na mikroskopskoj pločici, dodato je nekoliko kapi 3% KOH i obavljena je homogenizacija mešanjem. Obrazovanje finih niti pri podizanju čačalice u vis dokazuju prisustvo gramnegativnih bakterija.

#### *Test fluorescentnosti na King-ovoj podlozi B*

Zakošena King-ova podloga B u epruvetama zasejavana je bakteriološkom petljom dobijenim sojevima bakterije i preneti u termostat pri 26°C. Nakon 24-48 sati praćena je pojava fluorescentnog sjaja (Lelliott i Stead, 1987; Arsenijević i Sremac, 1993).

#### *Enzimski imunoadsorpcioni test (ELISA)*

Pošto se primena ELISA testa pokazala se kao vrlo pouzdan način dokazivanja prisustva *E. amylovora* na jabučastim voćkama, primenili smo ovu metodu

za identifikaciju naših izolata po standardnoj proceduri koju su opisali Arsenijević i Mitrev (1995). Za ovu svrhu korišćeni su gotovi kompleti za DAS ELISA test («BIOREBA», Švajcarska).

Pozitivna i negativna kontrola su nanete na mikrolitarskoj ploči u G:11 i 12; H: 11 i 12. Vrednosti pozitivnih reakcija (pojava žute boje), koje ukazuju na prisustvo *E. amylovora*, obračunate su tako što je od proseka pozitivnih kontrola oduzet prosek negativnih kontrola i razlika pomnožena sa konstantom 0,06, a zatim je dobijena vrednost sabira sa prosekom negativne kontrole i sve vrednosti na čitaču veće od ovako dobijene smatraju se kao pozitivne reakcije za datu ELISA-ploču.

### **Biohemijsko-fiziološke odlike izolata *E. amylovora***

Od biohemijsko-fizioloških odlika dobijenih izolata *E. amylovora* ispitivano je:

- a) stvaranje levana na mesopeptonskoj podlozi podlozi obogaćenoj sa 5% saharoze,
- b) hidroliza želatina u podlozi od peptona, ekstrakta kvasca i želatina (Lelliott i Stead, 1987) nakon tri, sedam, 14 i 21 dana,
- c) hidroliza eskulina (Lelliott i Stead, 1987; Arsenijević, 1988),
- d) metabolizam glukoze u Hugh-Leifsonovoj podlozi 1% glukoze
- e) stvaranje kiselina iz ugljenih hidrata na podlozi od 2% peptona i vode i podlozi od kvašćevog ekstrakta i mineralnih soli s dodatkom purpurnog bromkrezola kao indikatora u koje su dodati D (+) glukoza, D (-) fruktoza, saharoza, D (-) riboza, D (-) sorbitol, glicerol, mesoinozitol i dulcitol do konačne koncentracije od 1% (Dye, 1983; Lelliott et Stead, 1987),
- f) stvaranje katalaze korišćenjem 20%-nog rastvora H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Arsenijević, 1988),
- g) aktivnost oksidaze po metodi Kovacs-a koji su opisali Arsenijević (1988) i Sands (1990), i
- h) stvaranje acetoina (metil crveno i VP test) (Dye, 1983; Arsenijević, 1988),

### **Odgajivačke odlike proučavanih izolata**

#### *Razvoj kolonija pri temperaturi od 34°C i 36°C*

Razvoj pri temperaturi od 34°C, odnosno 36°C, praćen je na podlozi od kvašćevog ekstrakta i mineralnih soli (Arsenijević, 1987). Po 5 ml podloge razliveno je u epruvete 16x160 mm i sterilisano u autoklavu pri temperaturi od 115°C



i pritisku od 1,2 atmosfere u vremenu od 20 minuta. Po tri epruvete s podlogom zasejane su svakim izolatom.

Nakon zasejavanja, epruvete s podlogom su održavane u vodenom kupatilu pri odgovarajućoj temperaturi u vremenu od 14 dana. Zamućenje podloge znači da se bakterija razvija pri spomenutoj temperaturi.

#### *Razvoj kolonija na podlozi sa 5% i 7% NaCl*

Za proučavanje razvoja *E. amylovora* u prisustvu 5% i 7% NaCl, epruvete sa zasejanom podlogom odžavane su u termostatu pri temperaturi od 27°C u vremenu od 14 dana. Zamućenje podloge ukazuje na pozitivan rezultat. Kao kontrola korišćene su nezasejane podloge (Sands, 1990).

### **Identifikacija patogena u laboratoriji**

Identifikacija obavljena je po proceduri propisanoj za identifikaciju sojeva *E. amylovora* (Crosse i Goodman, 1973; Ishimaru i Klos, 1984; Psalidas i Dimova, 1986; Arsenijević, 1988; Kudela, 1988; Shaad, 1988; Panić *et al.*, 1989; Klement *et al.*, 1990; Psalidas, 1990; Arsenijević i Sremac, 1993; Panić *et al.*, 1994; Arsenijević i Jovanović, 1995; Arsenijević i Mitrev, 1995; Arsenijević, 1997), na osnovu:

- a) ponašanja bakterija na mesopeptonskoj podlozi (Arsenijević, 1988), mesopeptonskoj podlozi obogaćenoj sa 5% saharoze (Arsenijević, 1997), Cross-Goodman-ovoj podlozi (Crosse i Goodman 1973), mesopeptonskoj podlozi s kvaščevim ekstraktom i dekstrozom (Panić *et al.*, 1994) i CCT podlozi (Ishimaru i Klos; 1984),
- b) testova patogenosti izolovanih sojeva na lišću duvana i muškatile (Klement *et al.*, 1990), lišću kruške i jabuke (Panić *et al.*, 1989, Arsenijević *et al.*, 1991), nezrelim plodovima kruške, šljive i jabuke (Kudela 1988, Arsenijević, 1988), kriškama plodova kruške (Billing *et al.* 1960; Panić *et al.*, 1994),
- c) specifičnih bakterioloških testova: ponašanje bakterije prema Gramu (Suslow *et al.*, 1982; Arsenijević i Jovanović, 1995), test fluorescentnosti na King-ovoj podlozi B (Lelliott i Stead, 1987; Arsenijević i Sremac 1993), metabolizam glukoze (Arsenijević 1988),
- d) ELISA-testa (Arsenijević i Mitrev 1995),
- e) biohemijsko-fizioloških odlika (Psalidas i Dimova 1986 ; Shaad 1988; Psalidas 1990)

Identifikacija patogena obavljena je u laboratorijama za fitopatologiju "Agrorazvoj"-a u Nišu i Instituta za zaštitu bilja i životnu sredinu u Beogradu.

## REZULTATI

### Simptomi bolesti

Bakterija *E. amylovora* parazitira sve biljne delove jabučastih voćaka. Usled nekroze i izumiranja tkiva organa obolelih biljaka (cveta, ploda, lista, grančice, skeletnih grana, debla) dolazi do promena ispoljenih u vidu paleži, odnosno stiče se utisak kao da je biljka vatrom spržena. Zbog tako karakterističnog simptoma obolelih biljaka potiče i naziv bolesti - bakteriozna plamenjača.

Prvi simptomi paleži primećeni su u rano proleće na tek otvorenim cvetovima koji dobijaju vlažan izgled, a zatim venu, postaju smežurani i tamnomrki. Širenjem infekcije biva zahvaćena cvetna drška, koja ubrzo postaje crna. Infekcija se preko cvetne drške dalje širi na mladare, koji nekrotiraju sušeći se delimično ili potpuno.

Oboleli mladari i grančice i lišće na njima postaju tamnomrke do crne boje. Često se vrh mladara se povija na dole u vidu "pastirskog štapa", što predstavlja tipičan simptom oboljenja (sl. 1). Sasušeno lišće na mladarima ne opada, što je takođe karakterističan simptom (sl. 2).

Na starijim skeletnim granama i deblu dolazi do pojave rak-rana različite veličine. Pokorično tkivo je ispucalo i na obolelim mestima udubljeno. Kada se pokorično tkivo otkloni uočava se jasna granica između zdravog i obolelog dela (sl. 3). Obolelo tkivo usled aktivnosti patogena dobija tamnomrku boju i postepeno izumiru ksilem, floem i kambijum. U uslovima toplog i vlažnog vremena u okviru pukotina i rak-rana primećuje se prisustvo eksudata, koji se razliva po površini kore (sl. 4).

Rak-rane na deblu su teško uočljive u početnoj fazi infekcije. Kasnije se ivična zona rak-rana uzdiže u odnosu na obolelo tkivo, tako da postaju lako uočljive.

Bolešću mogu biti zahvaćeni samo pojedinačni mladari ili pak mnoštvo grana i grančica, a usled prstenovanja mogu biti zahvaćene čitave skeletne grane, što često dovodi do sušenja čitavog stabala (sl. 5).

Simptomi su skoro identični na svim jabučastim voćkama, ali se izvesne razlike ogledaju u promeni boje obolelog ploda i lišća. (sl. 6). Obolelo lišće kruške ima tamnomrku boju, dok je lišće mušmule mrkocrvene nijanse. Nekroza tkiva mladara oskoruše je tamno mrke, a po obodu svetlo mrke boje (sl. 7).

### Rasprostranjenost *E. amylovora* na području Nišavskog okruga

Prisustvo *E. amylovora* registrovano je na jabučastim voćkama u skoro svim posmatranim lokalitetima (mapa 1 a i b) tokom 2004. i 2005. godine. Patogen

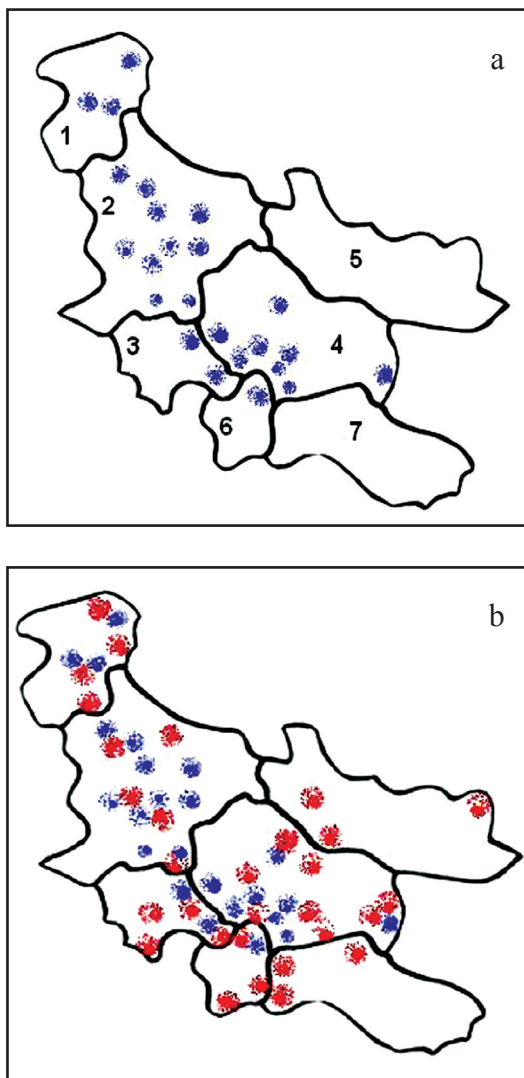


SI. 1-4. Simptomi uvelosti obolelog lišća dunje (SI. 1), zaražen mladac dunje savijen u obliku "pastirskog štapa" (SI. 2), nekroza ksilema sa jasno uočljivim prelazom između obolelog i zdravog tkiva grane oskoruše (SI. 3) i rak rana sa bakterijskim eksudatom na obolelej grani oskoruše (SI. 4)

Fig. 1-4. Symptom of quince leaves fading (Fig. 1), infected shoot of quince bende (curved) downward in a shape (form) of "shepherd's rod" (Fig. 2), xylem necrosis with obvious visible border zone between diseased and health tissue of mountain ash's branch (Fig. 3) and canker wounds on diseased branch of mountain ash (Fig. 4)

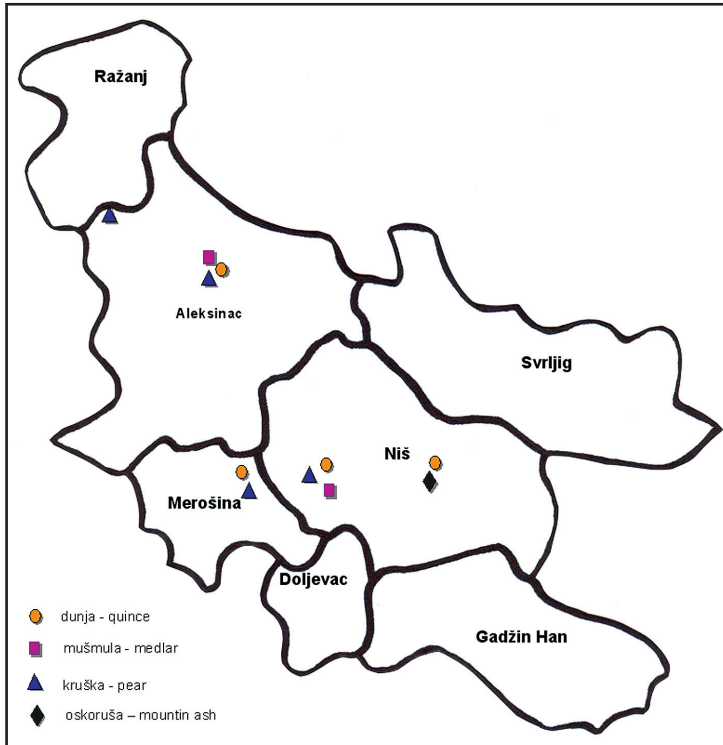
je prisutan u privatnim plantažama, okućnicama i na pojedinačnim stablima na međama i utrinama u blizini plantaža. Patogen nije registrovan u opštinama Svrljig i Gadžin Han tokom 2004. godine, ali je i u ovim lokalitetima dokazan tokom 2005. godine.

Plantažni zasadi sa većim stepenom infekcije (> 55%), u kojima nisu primenjivane mere zaštite i koji nisu iskrčeni predstavljaju glavna žarišta za dalje širenje patogena. Tako je u opštinama Merošina (lokalitet: Batušinac, Balajnac), Niš (lokaliteti: Trupale, Vrtište) i Aleksinac (lokaliteti: Nozrina i Moravac regi-



**Mapa 1.** – Rasprostranjenost bakteriozne plamenjače u opštinama Ražanj (1), Aleksinac (2), Merošina (3), Niš (4), Svrljig (5), Doljevac (6) i Gadžin Han (7) Nišavskog okruga u kojima je eksperimentalno dokazano prisustvo *E. amylovora* tokom 2004. (a) i 2005.(b) godine.

**Map 1.** – Spread of bacterial fire blight in communities Razanj (1), Aleksinac (2), Merosina (3), Nis (4), Svrljig (5), Doljevac (6) and Gadzin Han (7) of Nis district in wich *E. amylovora* was proved in 2004 (a) and 2005(b).



**Mapa 2.-** Glavna žarišta bakterije *E. amylovora* na teritoriji Nišavskog okruga

**Map 2.-** The main focus of infection of *E. amylovora* at territory of Nis district

stovan jak intenzitet bakteriozne plamenjače u zasadima dunje i mušmule kao glavnih žarišta, odakle se patogen širi na nove lokalitete i nove domaćine (mapa 2) u Nišavskom okrugu.

#### *Najčešća staništa E. amylovora na području Nišavskog okruga*

Prisustvo *E. amylovora* na području Nišavskog okruga dokazano je na manjim plantažama u privatnim posedima, na pojedinačnim stablima voćaka na okućnicama, kao i na utrinama i međama u blizini plantaža.

*Manji plantažni zasadi* – S obzirom da na području Nišavskog okruga manji plantažni zasadi u privatnom vlasništvu (površine 0,1-0,5 ha) dominiraju u ukupnoj voćarskoj proizvodnji, oboleli voćnjaci predstavljaju bitan činilac u daljem



širenju *E. amylovora* na ovoj teritoriji (sl. 8). Prisustvo bakterija *E. amylovora* u ovakvim staništima dokazana je u zasadima kruške sorte viljamovka i dunje na sortama leskovačka i vranjska.



**Sl. 5-8.-** Simptomi plamenjače mladara kruške (Sl. 5) i mušmule (Sl. 6), nekroza tkiva mladara oskoruše (Sl. 7) i simptomi bakteriozne plamenjače u zasadu jabučastog voća (Sl. 8)

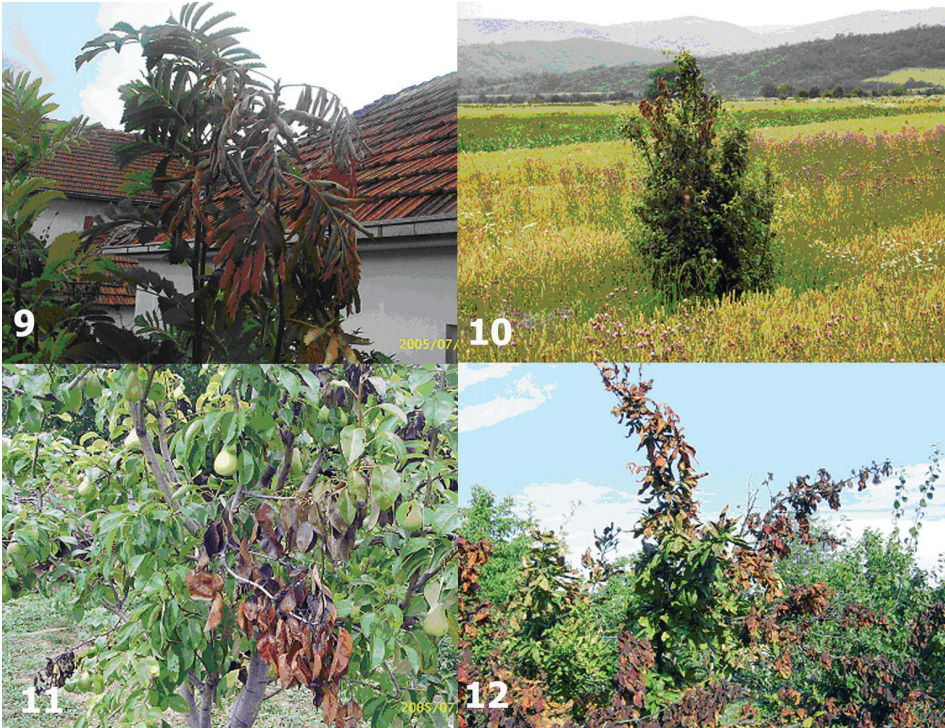
**Figl. 5-8.-** Symptoms of fire blight at pear shoot (Fig. 5) and medlar (Fig. 6), tissue necrosis of young shoots of mountain ash (Fig. 7) and fire blight symptoms in prune fruit tree orchard (Fig. 8)

*Pojedinačna stabla na okućnicama* - Patogen je izolovan i sa pojedinačnih obolelih stabla kruške, dunje i mušmule koja su često zastupljena na okućnicama gde se ne preduzimaju mere sasecanja i otklanjanja obolelih biljnih delova. Zbog toga, ova usamljena, pojedinačna stabla na okućnicama predstavljaju žarišta za dalje širenje patogena (sl. 9).

*Utrine i međe u blizini plantaža* – Na ovim staništima, na kojima se nalaze obolela, usamljena stabla kruške, dunje i mušmule, takođe predstavljaju



značajna žarišta za širenju infekcije, jer se obolela stabla ne uklanjaju i ne uništavaju (sl. 10).

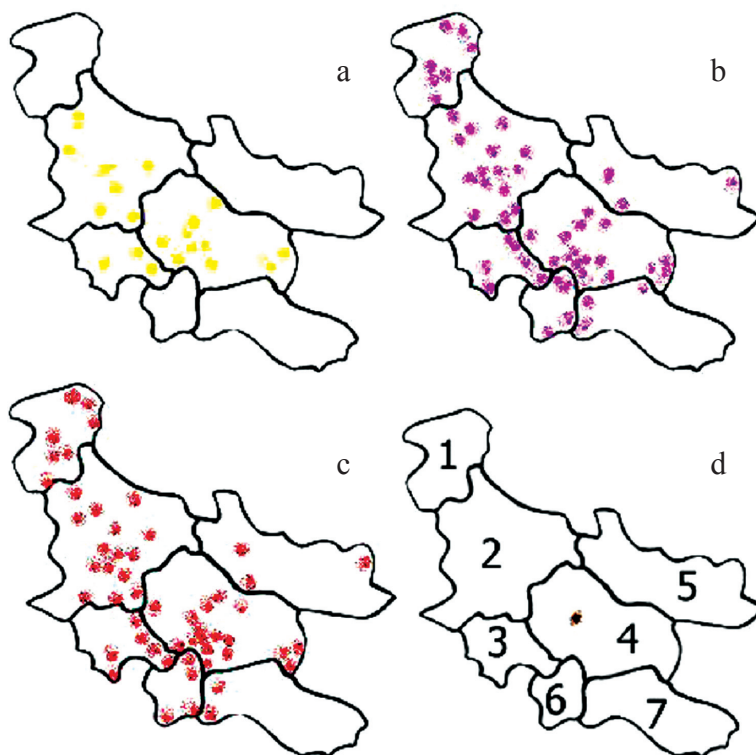


**Sl. 9-12.-** *E. amylovora*: Simptomi bakteriozne plamenjače na oskoruši (Sl. 9), pojedinačno stablo dunje na međi zaraženo sa bakterioznom plamenjačom (Sl. 10), kruška kao domaćin bakterije (Sl. 11) i pojava bakteriozne plamenjače jakog intenziteta na mušmuli (Sl. 12)

**Fig. 9-12.-** *E. amylovora*: Fire blight symptoms on moutin ash (Fig. 9), diseased single quince tree (Fig. 10), pear tree as the host of bacterium (Fig. 11) and severe occurrence of fire blight on medlar (Fig. 12)

### Domaćini *E. amylovora* na teritoriji Nišavskog okruga

Bakterija *E. amylovora* je primenom specifičnih testova identifikacije dokazana na dunji, krušci, mušmuli i oskoruši (sl. 11 i 12., mape 3 a-d), čime je potvrđeno da su prve tri vrste, na kojima je intenzitet oboljenja iznosio 5-95%, glavni domaćini ove bakterije na području Nišavsakog okruga. Tokom ovih istraživanja po prvi put je patogen registrovan na oskoruši u Srbiji u lokalitetu Donji Komren (opština Niš).



**Mapa 3.** – Rasprostranjenost *E. amylovora* u Nišavskom okrugu u opštinama Ražanj (1), Aleksinac (2), Merošina (3), Niš (4), Svrlijig (5), Doljevac (6) i Gadžin Han (7) gde je eksperimentalno dokazano prisustvo na krušci (a), dunji (b), mušmuli (c) i oskoruši (d)

**Map 3.** – Spread of bacterial fire blight in communities Razanj (1), Aleksinac (2), Merosina (3), Nis (4), Svrlijig (5), Doljevac (6) and Gadzin Han (7) of Niš district in which *E. amylovora* was proved at pear (a), quince (b), medlar (c) and mountain ash (d).

Patogen je prvi put izolovan iz uzoraka obolele dunje sorte leskovačka i mušmule sorte domaća sa pojedinačnih stabala koja se nalaze na okućnicama privatnih vlasnika u lokalitetima Vrtište i Trupale (opština Niš). Sa kruške sorte viljamova patogen je prvi put izolovan iz uzoraka u lokalitetu Nozrine (opština Aleksinac).

Na dunji i mušmuli *E. amylovora* je prisutna u svim opštinama okruga i to u intenzitetu zaraze od 5-95%. Intenzitet zaraze je najjači u opštinama Aleksinac i Merošina, a najslabiji u opštini Svrlijig. U zasadima kruške, na kojoj je prvi put utvrđen patogen u Srbiji, širenje je usporeno. Patogen je dokazan na stablima oskoruše samo u lokalitetu Donji Komren, opština Niš. Nije potvrđeno prisu-

stvo bakterije *E. amylovora* na jabuci u području Nišavskog okruga, iako je ona osetljiva prema ovom patogenu, pa se može se uskoro očekivati njegova pojava na ovoj vrsti.

**Tabela 1** – Spisak izolata *E. amylovora* korišćenih u istraživanjima  
**Table 1** – List of *E. amylovora* isolates used in study

Šifra izolata Isolate code	Domaćin Host	Poreklo izolata Origin of isolates	Godina izolacije Year of isolation
Kš-10	kruška-pear	Trupale – Niš	2004
Kš-13	kruška-pear	Vrtište – Niš	2004
Kš-14	kruška-pear	Devča – Merošina	2004
Kš-15	kruška-pear	Rožina – Merošina	2004
Kš-17	kruška-pear	Rutevac – Aleksinac	2005
Kš-18	kruška-pear	Deligrad – Aleksinac	2005
Kš-19	kruška-pear	Bobovište – Aleksinac	2005
Du-201	dunja-quince	Trupale – Niš	2004
Du-202	dunja-quince	Trupale – Niš	2004
Du-203	dunja-quince	Trupale – Niš	2005
Du-204	dunja-quince	Vrtište – Niš	2004
Du-205	dunja-quince	Vrtište – Niš	2005
Du-206	dunja-quince	Vrtište – Niš	2005
Du-207	dunja-quince	Vrtište – Niš	2005
Du-208	dunja-quince	Bobovište – Aleksinac	2004
Du-209	dunja-quince	Bobovište – Aleksinac	2005
Du-210	dunja-quince	Rutevac – Aleksinac	2004
Du-213	dunja-quince	Rutevac – Aleksinac	2005
Os-1	oskoruša- mountin ash	Komren – Niš	2005
Os-2	oskoruša- mountin ash	Komren – Niš	2005
Os-3	oskoruša- mountin ash	Komren – Niš	2005
Mš-101	mušmula - medlar	Vrtište – Niš	2004
Mš-102	mušmula - medlar	Vrtište – Niš	2005
Mš-103	mušmula - medlar	Vrtište – Niš	2004
Mš-104	mušmula - medlar	Vrtište – Niš	2005
Mš-105	mušmula - medlar	Trupale – Niš	2005
Mš-106	mušmula - medlar	Trupale – Niš	2005
Mš-107	mušmula - medlar	Trupale – Niš	2004
Mš-108	mušmula - medlar	Trupale – Niš	2005
Mš-109	mušmula - medlar	Rutevac – Aleksinac	2004
Mš-110	mušmula - medlar	Rutevac – Aleksinac	2005
Mš-111	mušmula - medlar	Komren – Niš	2005
Mš-115	mušmula - medlar	Komren – Niš	2004
Kš-55 <sup>a</sup>	kruška-pear	Subotica – Subotica	2003
1430 <sup>a</sup>	glog - hawthorn	Francuska	-
NCPPB 595 <sup>a</sup>	kruška-pear	Engleska	1957

<sup>a</sup> Identifikovani sojevi *E. amylovora* korišćeni kao kontrola - Identified strains of *E. amylovora* used as check strains

### Ocena intenziteta zaraze

Na osnovu ocene intenziteta zaraze *E. amylovora*, koja je izvršena na po 100 stabala raznih sorata jabuke, kruške, dunje i mušmule u Nišavskom okrugu (tab. 2)

**Tabela 2.** – Intenzitet oboljenja (%) na četiri domaćina *E. amylovora* u Nišavskom regionu <sup>a</sup>

**Table 2.-** Disease severity (%) at four hosts *E. amylovora* in area of Niš town

Domaćin - Host	Sorta- Cultivar	Intenzitet oboljenja-Disease severity (%) <sup>b</sup>
jabuka - apple	ajdared	0
	gloster	0
	šarunka	0
	kolačara	0
	mantet	0
kruška - pear	viljamova	7-12
	karamanka	0
	ječmenka	0
dunja - quince	leskovačka	51-75
mušmula - medlar	domaća	26-50

<sup>a</sup> od svake sorte u svim lokalitetima ocenjeno je po 100 stabala – hundred trees were estimated per each cultivar and locality

<sup>b</sup> ocena intenziteta oboljenja izračunata po skali 1-10 (van der Zwet i Keil,1979) - Disease severity was calculated according to scale 1-10 (van der Zwet and Keil,1979)

Na stablima jabuke raznih sorata nije utvrđeno prisustvo patogena. Kod kruške patogen je izolovan sa sorte viljamova. Dunja i mušmula na stablima koja su bila objekt posmatranja su zaražene od 26-75%.

### Karakteristike razvoja kolonija na hranljivim podlogama

Razvoj nešto krupnijih beličastih kolonija određenih karakteristika, tipičnih za vrstu *E. amylovora* uočen je već nakon 2-3 dana od zasejavanja bakterijskog macerata na ispitivanim podlogama (tab. 3, sl. 13-15). Takođe, dobivene su i kolonije žute boje koje pripadaju vrsti *E. herbicola* (tab. 4), koja kao česti prati-lac *E. amylovora* ima sasvim drugačije osobine (ne stvara levan, ne prouzrokuje hipersenzibilnu reakciju na listu duvana i muškatle, ne prouzrokuje nekroze na veštački inokulisanim plodovima i negativna je na ELISA testu).

**Tabela 3.** – Karakteristike razvoja kolonija sojeva *E. amylovora* na raznim podlogama**Table 3.** – Characteristics of colony growth of *E. amylovora* strains at different media

Podloga - Medium	Karakteristike kolonija Colony characteristics		
	Izgled <sup>a</sup> Appearance	Boja <sup>b</sup> Colour	Prečnik (mm) Diameter
Mesopeptonska –NA	Sj, Bi	B	1,5-2
Mesopeptonska + 5% saharoze - NAS	L, li	BŽ	3-4
Kingova podloga B - King's B	Sj, Bi	B	2-2,5
Crosse-Goodmanova podloga - Crosse-Goodman's <sup>c</sup>	Sj, I	B	3-4
Mesopeptonska + ekstrakt kvasca i dekstroza - NYDA	Isj,G	BŽ	2
CCT podloga – CCT	L	B	5

<sup>a</sup> Sj = sjajne - gleaming, Isj= izrazito sjajne - extremely gleaming , G= glatke - smooth, Bi = blago ispupčene – slightly convex, I = ispupčene s udubljenjima u obliku kratera – convex with characteristic punctaton of colony, L = levan tip – levan type, li = izrazito ispupčene – extremely convex

<sup>b</sup> B = bele - white, BŽ = bleđožute – pale yellow,

<sup>c</sup> ocenjeno nakon pet dana – evaluated after five days

**Tabela 4.** – Odlike izolata *E. herbicola***Table 4.** – Characteristics of *E. herbicola* isolates

Soj - Strain	Gram	O/F	Levan	HR	BEPK- Oozing	ELISA
E.h.2	-	++	-	-	-	-
E.h.5	-	++	-	-	-	-
E.h.7	-	++	-	-	-	-
E.h.10	-	++	-	-	-	-
E.h.12	-	++	-	-	-	-
1430 <sup>a</sup>	-	++	+	+	+	+

<sup>a</sup> Kontrolni soj *E. amylovora* - The check strain of *E. amylovora*





**Sl. 13-14.** – *E. amylovora*: Kolonije levan tipa na podlozi obogaćenoj saharozom (Sl. 13) i izgled kolonija na CCT podlozi (Sl. 14)

**Fig. 13-14.** – *E. amylovora*: Levan type colonies on medium enriched with sucrose (Fig. 13) and colony appearance on CCT medium (Fig. 14)



**Sl. 15-16.** – *E. amylovora*: Krupne kolonije sa karakterističnim udubljenjima na CG podlozi (Sl. 15) i bakterijski eksudat na inokulisanim plodovima kruške (Sl. 16)

**Fig. 15-16.** – *E. amylovora*: Craterous coloneis on CG medium (Fig. 15) and bacterial ooze on inoculated immature pear fruits( Sl. 16)



## Rezultati preliminarnih testova identifikacije

Svi proučavani sojevi *E. amylovora* poreklom sa dunje, mušmule kruške i oskoruše su gram negativni, ne stvaraju fluorescentni pigment na King-B podlozi, prouzrokuju hipersenzibilnu reakciju duvana, nekrozu veštački inokulisanih plodova kruške uz pojavu kapi bakterijskog eksudata, pozitivno reaguju sa odgovarajućim serumom pri ELISA-testu (tab. 5-8).

### Patogene odlike

#### *Hipersenzibilna reakcija*

Svi proučavani izolati *E. amylovora* poreklom sa kruške, dunje, mušmule i oskoruše prouzrokuju HR duvana i muškatle, što se ispoljava u vidu nekroze inokulisanog tkiva mezofila u periodu od 18-24 časa (tab. 9.)

#### *Inokulacija listova kruške i jabuke*

Na inokulisanim listovima kruške sorte viljamovka došlo je do pojave nekroze oko drške i lisnih nerava, 3-4 dana od inokulacije. Isto se dešava i sa listom jabuke sorte gloster. Narednih dana došlo je do postepenog nekrotiranja cele liske. Na inokulisanim listovima kruške sorti karamanka i ječmenka i jabuke sorti ajdared, kolačara, mantet i šarunka nisu primećene promene na lisnim drškama i listovima. Na kontrolnim listovima kruške tretiranim vodom ne uočavaju se nikakve promene.

#### *Inokulacija nesazrelih plodova kruške, jabuke i šljive*

Inokulisani nesazreli plodovi kruške sorti viljamovka i kaluđerka nakon 3-4 dana reaguju pojavom nekrotičnih pega oko mesta inokulacije i pojavom sitnih, beličastih kapljica bakterijskog eksudata (sl. 16). Narednih dana stvaranje eksudata je obilnije. Njegova boja je u početku bela do krem, da bi nakon nekoliko dana postala tamnija. Za 7 dana ceo plod je potpuno nekrotirao i pocrneo.

U nekim slučajevima na inokulisanim plodovima kruške bakterijski eksudat prekriva celu površinu plodića i ispoljava se u vidu jako sitnih beličastih kapljica. Nekrotične zone su uočene samo oko mesta inokulacije. Nema razlike u pogledu vremena formiranja kapljica bakterijskog eksudata na raznim sortama kruške.

Na nesazrelim plodovima šljive sorte stenli, došlo je do pojave mrkih, nekrotičnih zona oko mesta uboda 24 - 48 sati od inokulacije. Istovremeno, ili nešto kasnije, uočavaju se sitne, fine kapi bakterijskog eksudata formirane po celoj površini ploda ili samo oko mesta inokulacije.

**Tabela 5.** – Osnovne karakteristike tipičnih sojeva *E. amylovora* poreklom sa kruške, oskoruše, dunje i mušmule

**Table 5.** – The main characteristics of typical *E. amylovora* strains from pear, mountin ash, quince, and medlar

Domaćin Host	Sojevi Strains	Gram <sup>a</sup>	King-B <sup>b</sup>	HR <sup>c</sup>	BEPK <sup>d</sup>		ELISA <sup>e</sup>
					48 <sup>h</sup>	72 <sup>h</sup>	
Kruška pear	Kš-10	-	-	+	+	+	+
	Kš-13	-	-	+	+	+	+
	Kš-14	-	-	+	+	+	+
	Kš-15	-	-	+	+	+	+
	Kš-17	-	-	+	+	+	+
	Kš-18	-	-	+	+	+	+
Oskoruša Mountin ash	Kš-19	-	-	+	+	+	+
	Os-1	-	-	+	+	+	+
	Os-2	-	-	+	+	+	+
Dunja Quince	Os-3	-	-	+	+	+	+
	DU-201	-	-	+	+	+	+
	DU-202	-	-	+	+	+	+
	DU-203	-	-	+	+	+	+
	DU-204	-	-	+	+	+	+
	DU-205	-	-	+	+	+	+
	DU-206	-	-	+	+	+	+
	DU-207	-	-	+	+	+	+
	DU-208	-	-	+	+	+	+
	DU-209	-	-	+	+	+	+
	DU-210	-	-	+	+	+	+
Mušmula Medlar	DU-213	-	-	+	+	+	+
	Mš-101	-	-	+	+	+	+
	Mš-102	-	-	+	+	+	+
	Mš-103	-	-	+	+	+	+
	Mš-104	-	-	+	+	+	+
	Mš-105	-	-	+	+	+	+
	Mš-106	-	-	+	+	+	+
	Mš-107	-	-	+	+	+	+
	Mš-108	-	-	+	+	+	+
	Mš-109	-	-	+	+	+	+
	Mš-110	-	-	+	+	+	+
Kontrolni sojevi Check strains	Mš-111	-	-	+	+	+	+
	Mš-115	-	-	+	+	+	+
	Kš-55 <sup>f</sup>	-	-	+	+	+	+
	1430 <sup>f</sup>	-	-	+	+	+	+
	NCPBP 595 <sup>f</sup>	-	-	+	+	+	+
	KŠ-101 <sup>g</sup>	-	+	+	-	-	-

<sup>a</sup> Ponašanje prema Gramu – reaction according to Gram

<sup>b</sup> Fluorescentnost na King-ovoj podlozi B – fluorescence on King's B medium

<sup>c</sup> Hipersenzibilna reakcija na duvanu – hypersensytive rection on tobacco leaves

<sup>d</sup> Bakterijski eksudat na plodićima kruške – oozing on pear slices

<sup>e</sup> ELISA test

<sup>f</sup> Kontrolni sojevi *E. amylovora* – The chek isolates of *E. amylovora*

<sup>g</sup> Izolat *Pseudomonas syringae* v. *syringae* – isolate of *Pseudomonas syringae* v. *syringae*

**Tabela 6.** – Hipersenzibilna reakcija na listovima duvana i muškatle inokuliranih izolatima *E. amylovora***Table 6.** – Hypersensitive reaction of tobacco and medlar leaves inoculated with *E. amylovora* isolates

Sojevi Strains	Domaćin Host	Duvan Tobacco	Muškatla ?
KŠ-13	kruška-pear	+	+
KŠ-14	kruška-pear	+	+
KŠ-17	kruška-pear	+	+
KŠ-101	kruška-pear	+	+
KŠ-102	kruška-pear	+	+
KŠ-105	kruška-pear	+	+
OS-1	oskoruša- mountin ash	+	+
OS-2	oskoruša- mountin ash	+	+
OS-3	oskoruša- mountin ash	+	+
DU-201	dunja-quince	+	+
DU-202	dunja-quince	+	+
DU-203	dunja-quince	+	+
1430 <sup>a</sup>	dunja-quince	+	+
Kš-55 <sup>a</sup>	kruška-pear	+	+
KŠ-101 <sup>b</sup>	kruška-pear	+	+
NCPPB 595 <sup>a</sup>	kruška-pear	+	+
Kontrola-Check <sup>c</sup>	-	-	-

<sup>a</sup> kontrolni izolati *E. amylovora* – The check strains of *E. amylovora*<sup>b</sup> Izolat *Pseudomonas syringae* v. *syringae* – isolate of *Pseudomonas syringae* v. *syringae***Tabela 7.** – Dokazivanje prisustva *E. amylovora* u uzorcima ELISA testom**Table 7.** – The evidence of *E. amylovora* in samples by ELISA test

kruške pear		Sojevi izolovani sa – Strains isolated from				kontrolni sojevi checked strains			
		dunje quince	mušmule medlar	oskoruše mountin ash					
Kš-10	+ <sup>a</sup>	Du-201	+	Mš-101	+	Os-1	+	1430 <sup>b</sup>	+
Kš-11	+	Du-202	+	Mš-102	+	Os-2	+	KŠ-55 <sup>b</sup>	+
Kš-12	+	Du-203	+	Mš-103	+	Os-3	+	NC595 <sup>b</sup>	+
Kš-13	+	Du-204	+	Mš-104	+				
Kš-14	+	Du-205	+	Mš-105	+				
Kš-15	+	Du-206	+	Mš-106	+				
Kš-16	+	Du-207	+	Mš-107	+				
Kš-17	+	Du-208	+	Mš-108	+				
Kš-18	+	Du-209	+	Mš-109	+				
Kš-19	+	Du-210	+	Mš-110	+				
		Du-211	+	Mš-111	+				
		Du-212	+	Mš-112	+				
		Du-213	+	Mš-113	+				
		Du-214	+	Mš-114	+				
		Du-215	+	Mš-115	+				

<sup>a</sup> prisustvo *E. amylovora* - *E. amylovora* present<sup>b</sup> kontrolni izolati *E. amylovora* – The check strains of *E. amylovora*

**Tabela 8.** – Biohemijsko-fiziološke odlike izolata *E. amylovora*  
 Biochemical and physiological characteristics of *E. amylovora* isolates

Sojevi Strains	Stvaranje levana Levan production	Hidroliza želatina Hydrolysis of gelatin	Hidroliza eskulina Hydrolysis of aesculin	Metabolizam glukoze Glucose metabolism	Aktivnost katalaze Catalase activity	Aktivnost oksidaze Oxidase activity	Test stvaranja acetona Acetoin production	Metil red test Methyl red
				O/F				
Kš-10	+	+	-	+/+	+	-	+	-
Kš-13	+	+	-	+/+	+	-	+	-
Kš-15	+	+	-	+/+	+	-	+	-
Du-201	+	+	-	+/+	+	-	+	-
Du-203	+	+	-	+/+	+	-	+	-
Os-1	+	+	-	+/+	+	-	+	-
Os-2	+	+	-	+/+	+	-	+	-
Mš-101	+	+	-	+/+	+	-	+	-
Kš-55 <sup>a</sup>	+	+	-	+/+	+	-	+	-
1430 <sup>a</sup>	+	+	-	+/+	+	-	+	-
NCPPB 595 <sup>a</sup>	+	+	-	+/+	+	-	+	-

<sup>a</sup> Kontrolni sojevi *E. amylovora* – The check strains of *E. amylovora*

**Tabela 9.** – *E. amylovora*: Hidroliza mono i oligo saharida, polihidroksilnih alkohola i polisaharida od strane proučavanih izolata

**Table 9.** – *E. amylovora*: Hydrolysis of mono- and oligo sacharides, polyhidroxil alcohols and polysacharides by tested isolates

Sojevi - Strains	Fruktoza- fructose	Glukoza- glucose	Riboza- ribose	Saharoza- sucrose	Sorbitol- sorbitol	Manitol- manitole	Inozitol- inositol	Glicerol- glycerol	Dulcitol- dulcitol
Kš-10	+	+	+	+	+	+	-	+	-
Kš-13	+	+	+	+	+	+	-	+	-
Du-201	+	+	+	+	+	+	-	+	-
Du-203	+	+	+	+	+	+	-	+	-
Os-1	+	+	+	+	+	+	-	+	-
Mš-101	+	+	+	+	+	+	-	+	-
Kš-55 <sup>a</sup>	+	+	+	+	+	+	-	+	-
1430 <sup>a</sup>	+	+	+	+	+	+	-	+	-
NCPPB 595 <sup>a</sup>	+	+	+	+	+	+	-	+	-

<sup>a</sup> Kontrolni sojevi *E. amylovora* – The check strains of *E. amylovora*

Inokulisani plodići jabuke nisu pokazali pojavu bakterijskog eksudata.

Nisu primećene razlike između izolata u pogledu patogenosti prema nesazrelim plodovima dunje, mušmule, kruške i oskoruše koji reaguju ujednačeno uz pojavu nekrotičnih zona i kapi bakterijskog eksudata. Na kontrolnim nesazrelim plodovima kruške i šljive tretiranim vodom nisu zapažene nikakve promene.

#### *Inokulacija kriški plodova kruške*

Na veštački inokulisanim kriškama kruške zabeležena je pojava bakterijskog eksudata zlatno žute boje.

#### *ELISA test*

Svi proučavani izolati su Gram negativni, prouzrokuju nekrozu inokuliranih plodova kruške uz pojavu eksudata, ne stvaraju fluorescentni pigment na King-ovoj podlozi B, prouzrokuju hipersenzibilnu reakciju listova duvana i muškatele i pozitivno reaguju sa odgovarajućim antiserumom pri ELISA testu (tab. 10).

**Tabela 10.** – Razvoj izolata *E.amaylovora* na 34<sup>0</sup>C i 36<sup>0</sup>C na mesopeptonsko podlozi sa 5% i 7% NaCl

**Table 10.** – Development of *E.amaylovora* isolates at 34<sup>0</sup>C and 36<sup>0</sup>C on NA medium with 5% i 7% of NaCl

Šifra izolata Isolate code	Razvoj pri temperaturi Growth at temperatures		Razvoj na podlozi sa NaCl Growth on medium with NaCl	
	34 <sup>0</sup> C	36 <sup>0</sup> C	5%	7%
Kš-10	+ <sup>b</sup>	-	+	-
Kš-11	+	-	+	-
Du-204	+	-	+	-
Du-205	+	-	+	-
Du-206	+	-	+	-
Du-207	+	-	+	-
Oš-1	+	-	+	-
Oš-2	+	-	+	-
Mš-105	+	-	+	-
Mš-107	+	-	+	-
Kš-55 <sup>a</sup>	+	-	+	-
1430 <sup>a</sup>	+	-	+	-
NCPB595 <sup>a</sup>	+	-	+	-
Kontrola-Chek	-	-	-	-

<sup>a</sup> Kontrolni sojevi *E. amylovora* – The check strains of *E. amylovora*

<sup>b</sup> + = bakterije se razvijaju - bacterial development present, - = nema razvoja bakterije - bacterial development absent

To ukazuje da i klasični testovi patogenosti i neke odgajivačke odlike (Gram, HR, King-B) mogu imati značaja pri identifikaciji *E. amylovora*.

### **Biohemijsko-fiziološke odlike izolata *E. amylovora***

Proučavani izolati poreklom sa kruške, dunje, mušmule i oskoruše stvaraju katalazu, hidrolizuju želatin i stvaraju acetoin, negativan rezultat je zabeležen pri testovima stvaranja oksidaze, hidrolize eskulina i metil red testa. Svi sojevi glukozu metabolišu i u aerobnim i anaerobnim uslovima (O/F test) (tab. 11.)

Sojevi korišćeni u ovim istraživanjima stvaraju kiseline iz sledećih ugljenih hidrata: fruktoze, glukoze, riboze, saharoze, sorbitola, manitola i glicerola. Negativan rezultat zabeležen je pri testu metabolizma dulcitolu (tab. 12 i 13).

### **Odgajivačke odlike proučavanih izolata**

#### *Razvoj pri temperaturi od 34°C i 36°C*

Svi izolati bakterije poreklom iz Nišavskog okruga zasejani na tečnoj podlozi razvijaju se na 34°C ali ne i na 36°C (tab. 14.)

#### *Razvoj u podlozi sa 5% i 7% NaCl*

Svi izolati bakterije *E. amylovora* na tečnoj podlozi sa 5% NaCl su se razvili dok na podlozi sa 7% NaCl njihov razvoj nije zabeležen (tab. 6). Pozitivan rezultat se ispoljava zamućenjem zasejanih podloga u epruvetama, koje izostaje u kontrolnim epruvetama i u slučaju negativnog rezultata.

### **Karakteristike epifitne populacije bakterija**

Prilikom izolovanja epifitne populacije bakterija dobijen je veći broj izolata koje smo podelili u tri grupe:

- prva grupa na podlozi formira kolonije žute boje, Gram negativne, ne prouzrokuje patogene promene na inokulisanim plodovima i HR, pa smo ih identifikovali kao *Erwinia herbicola*;
- druga grupa su takođe Gram negativne bakterije, stvaraju fluorescentni pigment na King-B podlozi, stvaraju oksidazu, ne prouzrokuju HR duvana i nekrotične promene inokulisanih plodova pa su identifikovani kao *Pseudomonas fluorescens*;
- treća grupa bakterija, je na osnovu svojih odlika, identifikovana kao tipični predstavnik sojeva *Erwinia amylovora*.



## DISKUSIJA

Istraživanjima sprovedenim na teritoriji Nišavskog okruga tokom 2004. i 2005. godine dokazano je prisustvo *E. amylovora* na jabučastim voćkama (kruška, dunja i mušmula) u skoro svim posmatranim lokalitetima, kao i na oskoruši u Nišu. Glavna staništa bakterije na području Nišavskog okruga su plantažni zasedi privatnog poseda, pojedinačna stabla na okućnicama i usamljena stabla na međama i utrinama.

Patogen najveće štete prouzrokuje na krušci i dunji (Panić i Arsenijević, 1996), tako da je do kraja 1987. godine iskrčeno 224 ha kruške (Arsenijević, 1988). Ekonomski gubici nastali usled prisutva bakteriozne plamenjače u voćnjacima u periodu 1992-1996 procenjuju se na 6, 2 miliona DEM (Balaž i Stamenov, 1996). Poslednjih godina *E. amylovora* sve više se pojavljuje i kao parazit jabuke kao kod nas tako i u svetu (Arsenijević, Jovanović, Todorović, 1996., Hartman *et al.* 2000).

Prouzrokovatelj bakteriozne plamenjače je već dokazan u skoro svim važnijim područjima gajenja jabučastog voća u Srbiji (Panić i Arsenijević, 1996), a kao domaćini registrovani su na jabuci, dunji, mušmuli, divljoj krušci, glogu (Arsenijević i Panić, 1996), vatreni trn (Gavrilović i Arsenijević, 1998; Arsenijević i Gavrilović, 1998; Gavrilović *et al.*, 2001), japanskoj dunji (*Chaenomeles japonica*) i polegloj dunjarici (*Cotoneaster horizontalis*) (Balaž, 2000, Balaž *et al.*, 2004). Međutim, oskoruša do sada nije bila poznata kao domaćin *E. amylovora*.

Bakterija *E. amylovora* izolovana je sa svih biljnih delove, koji usled nekroze i izumiranja tkiva ispoljavaju bakteriozne plamenjače. Simptomi koji su prisutni na obolelim biljkama karakteristični su za bakteriju *E. amylovora* i odgovaraju opisu simptoma utvrđenih od strane naših i stranih autora (Panić i Arsenijević, 1996; van der Zwet i Keil, 1979). Mada su simptomi na ispitivanim domaćinima bili manje više slični, uočene su i izvesne razlike u zavisnosti od domaćina. Simptomatološke razlike kod različitih domaćina (krušci, jabuci, dunji i mušmuli) već su poznate (Arsenijević i Jovanović, 1997; Arsenijević *et al.*, 1994 b).

Pored simptoma tipičnih za *E. amylovora*, zapaženi su i simptomi slični bakterioznoj plamenjači koji mogu biti prouzrokovani raznim biotskim i abiotskim činiocima (Arsenijević *et al.*, 1994 b; Arsenijević i Balaž, 1982; Arsenijević *et al.*, 1973; Panić *et al.*, 1994; Ivanović, 1993; van der Zwet i Keil, 1979; Kudela, 1990; van der Zwet i Beer, 1991; Baumm, 1985; Panić i Arsenijević, 1996).

Izolovanje patogena uspešno je obavljeno na mesopeptonskoj podlozi i mesopeptonoskoj podlozi obogaćenoj s 5% saharoze, jer je saharoza veoma pogodan supstrat za razvoj *E. amylovora* (El-Helaly *et al.*, 1966, Lelliott i Stead, 1987, Arsenijević, 1988).

Tokom ovih istraživanja ukupno je proučeno 53 izolata bakterije. Izolati koji su reagovali pozitivno prouzrokovanjem hipersenzibilne reakcije muškatle, prisutvom bakterijskog eksudata na inokulisanim nesazrelim plodovima voćaka, bili pozitivni na ELISA-testu u reakciji sa odgovarajućim serumom, a ispoljili negativne rezultate fluorescentnosti na King-ovoj podlozi B, bojenju po Gramu, tipični su predstavnici bakterije *E. amylovora*. Ukupno je izolovano 33 takva soja koji pripadaju bakteriji *E. amylovora*.

Izolati koji su ispoljili pozitivne rezultate prouzrokovanjem hipersenzibilne reakcije duvana i stvaranja fluorescenosti na King-ovoj podlozi B, a negativne kod bojenja po Gramu i odsustvom bakterijskog eksudata na inokulisanim nesazrelim plodovima voćaka, tipični su predstavnici bakterije *Pseudomonas syringae*. Ukupno je izolovano 20 sojeva koji pripadaju ovoj bakteriji, ali oni nisu bili predmet datih proučavanja. Izolovani su i sojevi koji ukazuju na karakteristike saprofitske bakterije *E. herbicola*, koja je česti pratilac *E. amylovora* (Blakeman, 1991; Goodman, 1965).

Primenom klasičnih testova molekularnih i seroloških metoda moguća je pouzdana identifikacija uzročnika bolesti, odnosno prisustvo *E. amylovora*. Korišćeni kitovi za ELISA test su se pokazali kao veoma pouzdani za brzu identifikaciju i mogu se preporučiti u daljem radu. Rezultati preliminarnih testova identifikacije (ponašanje prema Gramu, fluorescentnost na King-ovoj podlozi B, inokulacija listova duvana i muškatle, pojava bakterijskog eksudata) uspešno su potvrđeni primenom ELISA testa.

Proučavani sojevi *E. amylovora* poreklom sa kruške, dunje, mušule, i oskoruše iz Nišavskog okruga kao i kontrolni sojevi ispoljavaju izrazitu uniformnost u pogledu patogenih i bakterioloških odlika. Na osnovu dobijenih rezultata nisu primećene značajne razlike u pogledu patogenih, seroloških, biohemijsko-fiziloških i molekularnih karakteristika sojeva *E. amylovora* poreklom sa različitih domaćina u Nišavskom okrugu. Oni, takođe, ispoljavaju izrazitu sličnost sa sojevima iz drugih lokaliteta u Srbiji kao i kontrolni sojevi iz Francuske i Engleske, što se u potpunosti slaže sa podacima iz literature (Gavrilović 1998, Van der Zwet 1979).

## LITERATURA

- Arsenijević M.(1988): Bakterio zebiljaka. II izdanje, p. 464. Naučna knjiga, Beograd
- Arsenijević M.(1997): Bakterioze biljaka. p.576, SPrint, NoviSad.
- Arsenijević M., Balaž Jelica (1982):Citosporozno izumiranje i rak-rana voćaka. Glasnik zaštite bilja, 2:38-42, Zagreb.
- Arsenijević M.,Đurišić S., Mitrev S. (1994): Serološko identifikovanje izolata bakterije *Erwinia amylovora* parazita jabučastih voćaka. Zaštita bilja, 210:275-278.

- Arsenijević M., Gavrilović V. (1998): Još jedan nalaz bakterije *Erwinia amylovora* na vatrenom trnu u Novom Sadu. *Biljn ilekar*, 2:169-172.
- Arsenijević M., Jovanović Gordana, Gavrilović, V. (1997): Pojava bakterije *Erwinia amylovora* na sadnicama jabuke u rasadničkoj proizvodnji. *Biljni lekar*, 4:443-446.
- Arsenijević M., Jovanović Olivera (1995): Nov postupak razlikovanja bakterija po Gram-u. *Zaštita bilja*, 211:57-62.
- Arsenijević, M., Mitrev, S. (1995): Karakteristike nekih atipičnih sojeva bakterija dobijenih prilikom izolovanja *Erwinia amylovora*. *Zaštita bilja*, 211:5-15.
- Arsenijević, M., Panić, M. (1990): Izveštaj Fitobakterioloških laboratorija u Novom Sadu i Beogradu o analizi sumnjivih uzoraka voćaka na prisustvo bakterije *E. amylovora* u 1990. godini. Savezni sekretarijat za poljoprivredu, Beograd.
- Arsenijević, M., Panić, M. (1992): Present status of *Erwinia amylovora* in Yugoslavia. 8<sup>th</sup> International Conference on Plant Pathogenic Bacteria. June 9.-12., Versailles, France.
- Arsenijević, M., Panić, M. (1996): Domaćini bakterije *Erwinia amylovora* do sada utvrđenih u Jugoslaviji. XI kongres voćara Jugoslavije, Čačak, 28.10.-01.11.1996. Zbornik rezimea: 145.
- Arsenijević, M., Panić, M., Antonijević D. (1991): Fire Blight of Pomaceous Fruit Trees in Yugoslavia. *Plant protection*, 196:87-97, Beograd
- Arsenijević, M., Sremac Smiljana (1993): *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae* parazit jabuke. *Zaštita bilja*, 206:283-293.
- Arsenijević, M., Sremac Smiljana, Aniko Kočiš (1992): Identifikacione karakteristike bakterije *Erwinia amylovora* i *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae* izolovanih iz obolelih voćaka. IX jugoslovenski simpozijum o zaštiti bilja. Vrnjačka Banja, 01.-05.12.1992. Zbornik rezimea: 44(37).
- Balaž Jelica, Knežević Tatjana, Smiljanić A., Stojšin Vera (2004): *Chaenomeles japonica* and *Cotoneaster horizontalis*, new hosts of *Erwinia amylovora* in Serbia, 10th International Workshop on Fire Blight, Bologna, Italy 5-9juli, 2004. Book of abstracts, 22.
- Balaž Jelica (2000): *E. amylovora* kao patogen jabuke. *Biljni lekar*, 6:457-463.
- Balaž Jelica (2000): Epifitotična pojava bakteriozne plamenjače na jabuci. *Biljni lekar*, 4:272-275.
- Balaž Jelica, Stamenov, M. (1997): Rasprostranjenost *Erwinia amylovora* u Vojvodini i preporuke za njeno suzbijanje. XIX seminar iz zaštite bilja, Beograd, 10. 1.02.1997. Rezimei referata: 33-35.
- Baum L. H. (1985): Praxisorientierte Untersuchungen zum Auftreten der Feuerbrandkrankheit (*Erwinia amylovora*) im Obstbauggebiet an der Niederelbe, p.158. Dissertation der Universitat Hamburg
- Billing Eve, Crosse J. E., Garrett, C. M. E. (1960): Laboratory diagnosis of fire light and bacterial blossom blight of pear. *Plant Pathology* 9:19-25.

- Crosse J.E., Goodman, R.N. (1973): A selective medium for and a definitive characteristics of *Erwinia amylovora*. *Phytopathology*, 63:1425-1426.
- Dye D.W. (1983): *Erwinia*: The "*Amylovora* and *Herbicola*" groups. In: Plant Bacterial Diseases. A Diagnostic G guide. Academic Press, Australia.
- El-Helalay, A. F., Abo-El-Dahab, M. K., El.Goorani, M. A. (1966): Nutritional requirements of isolates of *Erwinia amylovora*. *Phytopathology* 56: 845-849.
- Gavrilović V. (1998): Bakteriološke odlike sojeva *Erwinia amylovora*, "Zaštita bilja", br.224, Vol 49(2): 121-167
- Gavrilović V., Arsenijević M. (1998): Vatretni trn-novi domaćin bakterije *Erwinia amylovora* za našu zemlju. *Biljni lekar* 1:52-55, Novi Sad.
- Gavrilović V., Milijašević Svetlana, Arsenijević M. (2001): Mogućnosti izolovanja i identifikacije bakterije *Erwinia amylovora* sa površine rak-rana obolelih grana jabučastih voćaka. *Zbornik rezimea XII Simpozijuma o zaštiti bilja, Zlatibor, 25-29.XI 2002.g.*
- Goodman R. N. (1965): In vitro and in vivo interactions between components of mixed bacterial cultures isolated from apple buds. *Phytopathology* 55: 217-221.
- Hartman, J. R., Paulin, J. P., Parisi, L., Tomson S. (2000): INRA and apple disease research in the Loire Valley region in France. *Plant Disease*, 84:928-935.
- Ishimaru, C. Klos, E. J. (1984): A new medium for detecting *Erwinia amylovora* and its use in epidermiological studies. *Phytopatology* 74:1342-1345
- Ivanović, M. (1993): Mikoze biljaka, p.521. Nauka, Beograd.
- Jovanović, G., Arsenijević, M. (2001): Ekonomski značaj bakterije *E.amylovora* na teritoriji Južne Srbije *B.lekar*, 2:159-164
- Klement, Z., Rudolph, K., Sands, D. C. (1990): *Methods in Phytopathology*, p.568. Académial Kiadó, Budapest, Hungary.
- Küdela, V. (1988): *Erwinia amylovora* - Causal Agent of Fire Blight Rosaceous Plants in Chechoslovakia. *Ochr. Rostl.* 24 (3): 173-182.
- Küdela, V. (1990): Spála rúzovitých rostlin, p.163, *Min.zem.a výž ČSR Výst. Zem. A výživy, České Budejovice.*
- Lelliott, R. A., Stead, D. E. (1987): *Methods for the Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants*, p.216. British Society for Plant Pathology by Blackwell Scientific Publication. Oxford, London and Edinburg.
- Meijneke, C. A. R. (1968): An isolated outbreak in the Netherlands. *Versl. Mededel. Plantenz. kund. Dienst, Sep. Ser.No.380, Wageningen*
- Obradović, A., Vučinić, Z., Gavrilović, V. (2003): Epifitotična pojava bakterijske lamenače dunje u SCG; *Zbornik rezimea sa VI savetovanja o zaštiti bilja, Zlatibor 2003.*
- Panić, M., Arsenijević, M. (1991): *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow *et al.* - Pojava, rasprostranjenost i štetnost u svetu i u Jugoslaviji. *Glasnik zaštite bilja* 6: 191-197, Zagreb.

- Panić, M., Arsenijević, M. (1996): Bakteriozna plamenjača voćaka i ukrasnih biljaka - *Erwinia amylovora*. Monografska studija. Zajednica za voće i povrće, Beograd D. D. i Poljoprivredni fakultet, Novi Sad, p.413.
- Panić, M., Arsenijević, M., Antonijević, D. (1994): Rasprostranjenost, domaćini i bakteriološke odlike *Erwinia amylovora* u Jugoslaviji. III jugoslovenski kongres o zaštiti bilja. Vrnjačka Banja, 03.-07.10.1994. Zbornik radova: pp.145-159, Beograd.
- Panić, M., Antonijević, D., Jovanović, Olivera, Dragutinović, S. (1989): Prvi nalaz karantinske bakterije *Erwinia amylovora* u SFRJ. Rezultati analize uzoraka obolele kruške sa plantaže ZIK "Radoviško pole", Radoviš, SR Makedonija. Izveštaj Poljoprivrednog fakulteta, br.09-1145/2, pp. 1-3, 23.03.1989., Beograd.
- Psallidas, P. G., Dimova Maria (1986): Occurrence of the disease fire blight of pomaceous trees in Cyprus. Characteristics of the pathogen *Erwinia amylovora*. Annls Inst. Phytopath. Benaki, Greece, (N. S.) 15:61-70 Newsletter, Jan., 1989:16,23.
- Psallidas, P. G. (1990): Fire blight of Pomoceous trees in Greece. Evaluation of the disease and characteristics of the pathogen *Erwinia amylovora* Acta Horticulturae 273: 25-32.
- Sands, D. C. (1990): Physiological criteria-determinative tests. P. 131-143. Academic kiado Budapest.
- Schaad, N. W. (1980): Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. American Phytopath. Society, St. Paul, Minnesota.
- Suslow, T. W, Schroth, M. N., Isaka, M. (1982): Application of a Rapid method for Gram Differentiation of Plant Pathogenic and Saprophytic Bacteria without Staining. Phytopathology 72: 917-918.
- van der Zwet, T. (1993): Worldwide spread and present distribution fire blight an update. Acta Horticulturae 338:29-31.
- van der Zwet, T., Keil, H. L. (1979): Fire blight. A Bacterial Disease of Rosaceous Plants. U. S. Government Printing Office, Washington, DC., 1-200.
- van der Zwet, T., Beer, S. V. (1991): Fire blight - Its Nature, Prevention and Control. A Practical Guide to Integrated Disease Menagment U.S. Department of Agriculture. Agricultural Information Bulletin No.631, 83 pp.
- van der Zwet, T., Bonn, G. W. (1998): Recent spread and current worldwide distribution of fire blight. 8 th International Workshop on Fire Blight. October, 12.-15. 1998., Kuşadasi, Turkey.
- Zeller, W. (1974): Der Feuerbrand des Kernobstes hervorgerufen von *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al., p.121. Kommissionsveriaag. Paul Parey, Berlin.

(Primljeno: 15.05.2007.)  
(Prihvaćeno: 28.08.2007.)

## HOSTS AND DISTRIBUTION OF *ERWINIA AMYLOVORA* (BURRILL) WINSLOW ET AL. IN DISTRICT OF NIŠ

VOJINOVIĆ MILIĆ  
AD „Agrorazvoj“, Niš, Serbia

### Summary

Occurrence, distribution and host range of *Erwinia amylovora* in District of Niš (Communities of Gadžin Han, Aleksinac, Svrljig, Merošina, Doljevac, Ražanj and city of Niš) were investigated.

Isolations were obtained from *E. amylovora* host plants with typical symptoms (pear, quince, medlar and rowan trees), as well as from plants with symptoms similar to those caused by this pathogenic bacteria (*Cotoneaster* sp., Japanese quince, firethorn, apple, apricot, peach, sour cherry, plum and cherry plum).

Pathogen was identified using different diagnostic media and tests at plant pathology laboratories of "Agrorazvoj", Niš and Institute of plant protection and environment, Belgrade. Pear, quince, medlar and rowan trees are registered as pathogen hosts in this area, due to obtained results. Pathogen was not identified from *Cotoneaster* sp., Japanese quince, firethorn, apple, apricot, peach, sour cherry, plum and cherry plum, therefore, for present moment, they could not be considered as host plants of *E. amylovora* in District of Niš.

This is first report of rowan tree as *E. amylovora* host in Serbia.

*E. amylovora* is registered in almost all areas of pome fruit production in District of Niš.

*Key words:* *Erwinia amylovora*, bacterial blight, distribution, hosts, identification, District of Niš, rowan tree.

(Received: 15.05.2007.)

(Accepted: 28.08.2007.)

Zaštita bilja  
vol. 56 (1-4), No 251-254,55-66, 2005  
Beograd

UDK 632.4-425  
Naučni rad

## UTICAJ GODIŠNJEG DOBA NA STEPEN ZARAZE BRESKVE GLJIVOM *CYTOSPORA CINCTA*

TATJANA POPOVIĆ, JELICA BALAŽ  
Poljoprivredni fakultet, Departman za zaštitu bilja, Novi Sad  
e-mail: [popovict@eunet.yu](mailto:popovict@eunet.yu)

Devet izolata gljive *Cytospora cincta* Sacc., dobijeni iz obolelih uzoraka breskve (grane i grančice koje su se sušile) iz voćnjaka u Fruškoj Gori korišćeno je za inokulacije izvedenim na dvogodišnjih grana breskve u poljskim uslovima. Inokulacije su obavljene sukcesivno, svakog meseca, u periodu maj 2000. - april 2001. godine., kako bi se dobili podaci o uticaju godišnjeg doba, odnosno vrmena inokulacije, na stepen zaraze breskve ovom gljivom. Svi ispitivani izolati ispoljili su izrazita patogeno svojstva, prouzrokujući potpuno sušenje inokulisanih grana breskve. Agresivnost izolata je bila različita u zavisnosti od vremena inokulacije, što ukazuje na različit stepen osetljivosti biljke domaćina tokom godine.

Patogenost izolata u ogledima je najizraženija pri inokulacijama izvršenim u periodu oktobar-decembar, kada su izolati prouzrokovali potpuno sušenje inokulisanih grana. Inokulacije koje su vršene tokom proletnjih i letnjih meseci prouzrokovale su najslabije promene, jer je biljka domaćin aktivnošću kalusa lokalizovala infekciju, usled čega su se oko mesta inokulacije obrazovale kalusirane rak-rane. Sprovedeni eksperimenti su pokazali da sušenje breskve nastupa samo pri inokulacijama izvedenim u fazi mirovanja voćaka.

*Ključne reči:* breskva, *Cytospora cincta*, sezonska patogenost.

### UVOD

Prevrmeno sušenje i izumiranje voćaka u plantažnim zasadima breskve je dugogodišnji i već dugo aktuelan problem. Bolest se manifestuje pojavom rak-rana sa ili bez prisustva smole, nekrozom i izumiranjem grančica, grana ili čitave voćke. Proučavanja vršena poslednje 3-4 decenije uglavnom ukazuju na biotičke faktore, odnosno patogene, kao glavne prouzrokovaoče ove pojave. Među brojnim



patogenima, pre svega fitopatogenim gljivama, najznačajnija uloga se pridaje vrsti *Cytospora cincta* Sacc. (teleomorf *Leucocytospora cincta* /Sacc./ Höhn.). Brojni autori su dobili izolate gljive *C. cincta* sa obolele breskve i drugih koštičavih vrsta sa ispoljenim simptomima sušenja i izumiranja (Helton et Moisey, 1955; Chiarappa, 1960; Helton, 1961; Helton et Konicek, 1961; Kable et al., 1967; Gairola et Powell, 1970; Rozsnyay et Klement, 1973; Arsenijević i sar., 1973, 1982; Rozsnyay, 1977; Royse et Ries, 1978; Regner et al., 1990; Adams et al., 1990; Balaž i sar., 1994, 2000, 2005; Popović, 2004; Popović i Balaž, 2005).

Prema literaturnim podacima, *C. cincta* ima vrlo širok krug domaćina koji pripadaju rodovima *Cotoneaster*, *Prunus*, *Sorbus*, *Swida* i dr. (Ivanović i Ivanović, 2001). Ostale vrste roda *Cytospora* konstatovane su na velikom broju domaćina, ali najveći značaj imaju na koštičavom voću. Destruktivna aktivnost ovih gljiva je opisana na breskvi, kajsiji, šljivi, višnji, trešnji, jabuci, krušci, omorici, pamuku, bademu i dr.

Cilj ovih proučavanja je bio ispitivanje patogenosti izolata *C. cincta* tokom godine, da bi se utvrdio period u kome je breskva najpodložnija napadu ove gljive. Na osnovu rezultata ovih ispitivanja moguće je odrediti optimalne rokove za izvođenje hemijske zaštite i optimalno vreme izvođenja rezidbe.

## MATERIJAL I METODE RADA

### Izolacija i dobijanje čistih izolata

Izolacija parazita je vršena iz grana breskve koje su ispoljavale simptome sušenja iz voćnjaka u Fruškoj Gori. Na podlogu od krompira zasejavani su fragmenti (2 x 2mm) odvajani sterilnim skalpelom sa granice zdravog i obolelog tkiva. Zasejane Petri kutije stavljene su u termostat na temperaturu 25°C. Nakon 2-3 dana izvršen je pregled razvijenih kolonija gljiva u Petri kutijama. Oko svakog nanetog fragmenta razvijale su se kolonije gljive. Pažljivim postupkom pri izboru i presejavanjem odabranih delova kolonija u epruvete na kosu KDA podlogu, dobijeni su čisti izolati gljive. Zasejane epruvete su postavljene u termostat na temperaturu 25°C da bi se kolonije gljiva razvile i fruktificirale.

Izolacijama je dobijen velik broj izolata, od kojih su za dalja proučavanja odabrani reprezentativni.

### Ciklični inokulacioni ogledi u polju

U cilju dokazivanja patogenosti izolata gljive *C. cincta*, kao i uticaja faktora sredine i stanja biljke domaćina na ispoljavanje patogenosti, izvođeni su

inokulacioni ogledi na dvogodišnjim granama u plantažnim zasadima breskve (ZZ "Irig", Irig). Tokom rada praćeni su meteorološki uslovi tj. temperatura kao mogući uticajni faktor na uspeh izvršenih inokulacija, pojavu i širenje nekroze drvenastog tkiva i obrazovanje reproduktivnih organa.

Inokulacija je vršena tako što su se na dvogodišnjim granama breskve sterilnim skalpelom pravila tri zareza pod koru, dužine 3-4 cm. Ozleđena mesta su sa četkicom navlažena vodom i na njih su postavljeni fragmenti kolonija gljive stare 20 dana na podlozi od krompira. Kontrolne grane su tretirane istim postupkom ali bez nanošenja fragmenata gljive. Inokulisani delovi grana, kao i kontrolne grane, uvijene su vlažnom sterilnom vatom, a potom i aluminijumskom folijom, radi što dužeg obezbeđenja vlažnosti. Inokulacije su obavljene u tri ponavljanja, uključujući i kontrolu. Vata i aluminijumska folija su skidane oko 30 dana posle inokulacije. Ovaj metod se najčešće koristi za slična proučavanja i navodi ga veći broj autora (Helton et Konicek, 1961; Helton, 1961, 1962; Rozsnyay i Klement, 1973; Arsenijević i sar., 1973, 1982; Helton et Randall, 1975; Bertrand et English, 1976; Balaž i sar., 1994, 2000, 2005; Popović, 2004; Popović i Balaž, 2005).

Intenzitet infekcija nastalih posle veštačkih inokulacija grana breskve ocenjen je na osnovu veličine formiranih rak-rana, nekroze ili sušenja celih grančica, sa ili bez prisustva reproduktivnih organa. Rezultati oglada ocenjeni su nakon završetka jednogodišnjeg ciklusa inokulacija.

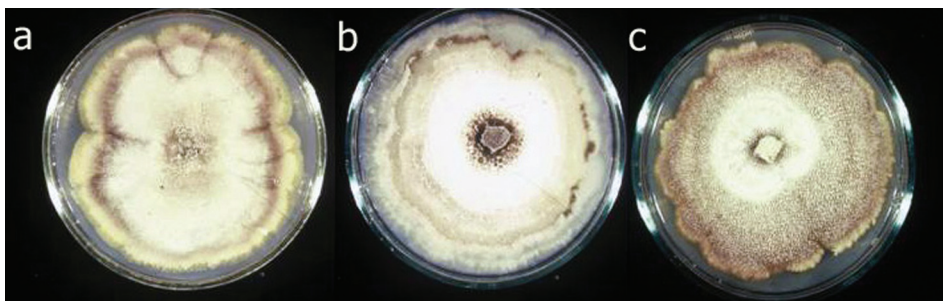
Inokulacioni ogledi su izvođeni tokom 2000/2001. godine. Ogledi su postavljani sukcesivno svakog meseca tj. postavljeno je 12 oglada (26. 05, 23. 06., 27.07, 23.08., 28. 09., 26. 10., 30.11 i 26. 12. 2000. godine i 26.01., 27.02., 26.03. i 26. 04 2001. godine). Rezultati su očitani 13. 01 2001. godine.

## REZULTATI RADA I DISKUSIJA

### Izolacija i dobijanje čistih izolata

Izolacija gljive je vršena na hranljivoj podlozi od krompira. Na podlozi su se, nakon 2-3 dana po zasejavanju, oko nanetih fragmenata obolelog tkiva obrazovale sivo-beličaste, prozirne kolonije gljive. Posle 6-7 dana kolonije su dostigle 2-3 cm u prečniku. U dalja proučavanja uključeni su izolati pod šiframa: C-1, C-2, C-3, C-4, C-5, C-6, C-7, C-8 i C-9.

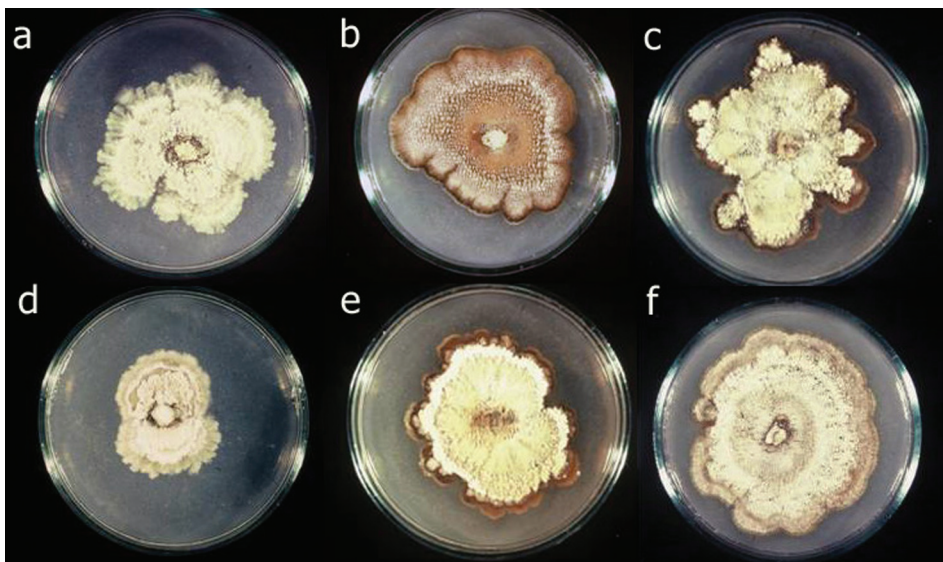
Prema ispoljenim karakteristikama pri razvoju na KDA podlozi izolati su podeljeni u dve grupe. Prvu grupu čine izolati C-3, C-4 i C-5 (sl. 1) čije kolonije su se dosta brzo razvijale na podlozi. Micelija je u početku beličasta i rastresita. Kasnije postaje kompaktna, ima homogen razvoj i obrazuje nekoliko koncentričnih krugova, a boja se menja prelazeći u sivkastu ili mrkožučkastu.



Sl. 1. – *C. cincta*. Izgled kolonija izolata C-3 (a), C-4 (b) i C-5 (c) na KDA.

Fig. 1. – *C. cincta*. Appearance of colonies of isolates C-3 (a), C-4 (b) and C-5 (b) on PDA

Supstratna micelija je mrka. Oblik kolonija je okruglast sa srednje razvijenom vazdušnom micelijom. Ivice su režnjevite ili talasaste. Ispoljene karakteristike izolata ove grupe tokom razvoja na podlozi od krompira odgovaraju opisu izolata *C. cincta* poreklom sa breskve koje su navode Arsenijević i sar. (1973). U drugu grupu svrstani su ostali izolati (C-1, C-2, C-6, C-7, C-8 i C-9) čije kolonije karakteriše sporiji razvoj na podlozi (sl. 2). Micelija je u početku prozirno



Sl. 2. *C. cincta*. Izgled kolonija izolata C-1 (a), C-2 (b) i C-6 (c), C-7 (d), C-8 (e) i C-9 (f) na KDA.

Fig. 2. *C. cincta*. Appearance of colonies of isolates C-1 (a), C-2 (b) i C-6 (c), C-7 (d), C-8 (e) and C-9 (f) on PDA.

beličasta, kasnije prelazi u žućkasto-mrku ili maslinasto-sivkastu. Vazдушna micelija je kompaktna, kožasta, gusta i srednje bujna. U toku razvoja takođe formira nekoliko koncentričnih krugova. Supstratna micelija je tamnije boje. Oblik kolonija je nepravilno okruglast, a ivice su talasaste ili režnjevite, ponekad i sa izraženim grananjem ka periferiji.

Helton et Moisey (1955) su izolacijama sa obolele šljive dobili izolate gljiva iz roda *Cytospora*. Prema ovim autorima, obrazovane kolonije su nepravilnog okruglastog oblika sa izraženim koncentričnim krugovima, talasastih ili režnjevitih ivica, što je u skladu sa našim rezultatima.

Prema Willison (1936, loc. cit. Biggs, 1997) dve veoma slične vrste, *C. cincta* i *Cytospora leucostoma* (Pers.) Sacc. teško se mogu razlikovati, pa se diferencijalne karakteristike uglavnom svode na odgajivačke odlike vrsta na KDA ili Leonianovom malc agaru. Razlike se odnose na boju micelije, pri čemu bela prelazi u maslinasto kožastu kod *C. cincta*, a u slučaju *C. leucostoma* bela prelazi u mrko-sivu. Autor ističe da obe gljive mogu biti lako izolovane stavljanjem malih komada tkiva sa ivice rak-rane na podlogu od malca.

### Ciklični inokulacioni ogledi u polju

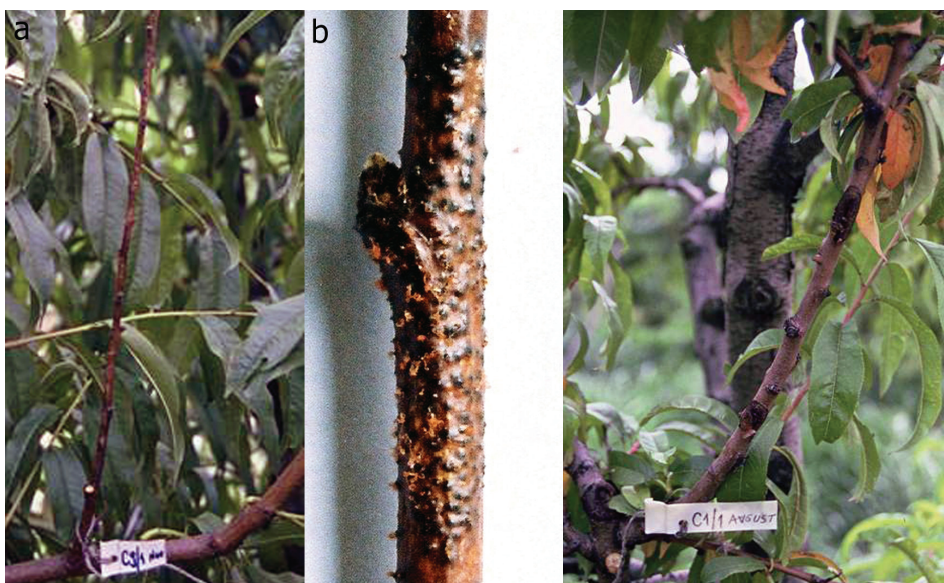
Na inokulisanim granama patološki proces je započinjao oko mesta inokulacije promenom boje kore u mrku i uleganjem tkiva. Daljim širenjem pega dolazilo je do spajanja nekrotičnih površina, usled čega se kora nabirala i izbeljavala. Bolest rezultira potpunim sušenjem grana na kojima obično dolazi i do obrazovanja crnih piknidija iz kojih se oslobađa masa piknospora u vidu narandžasto-crvenih končića (sl. 3).

Ponekd nekrotični proces može biti zaustavljen obrazovanjem novog kalusa biljke domaćina. U tom slučaju nekroza oko mesta inokulacije dobija izgled kalusiranih rak-rana, koje sprečavaju dalje širenje patogena na inokulisanoj grani (sl. 4).

Tokom ocene rezultata inokulacionih ogleda, primećeno je da se u okviru obrazovanih nekrotičnih pega ili rak-rana (oko mesta inokulacije) obrazuje smola, pa je nakon detaljnog pregleda inokulisanih grana zaključeno da je u većini slučajeva infekcija gljivom *C. cincta* praćena i obilnim stvaranjem smole oko rak-rana.

Rezultati inokulacionih ogleda (graf. 1) potvrdili su pretpostavku o uticaju faktora spoljašnje sredine i vitalnosti biljaka domaćina na stepen patogenosti i agresivnosti gljive *C. cincta* i u našim uslovima. Većina ispitivanih izolata ispoljava najveću patogenost, koja se manifestuje potpunim sušenjem inokulisanih grana, pri inokulacijama izvedenim u periodu mirovanja voćaka. Tako, potpuno sušenje grana konstatovano je samo pri inokulacijama izvedenim u oktobru,



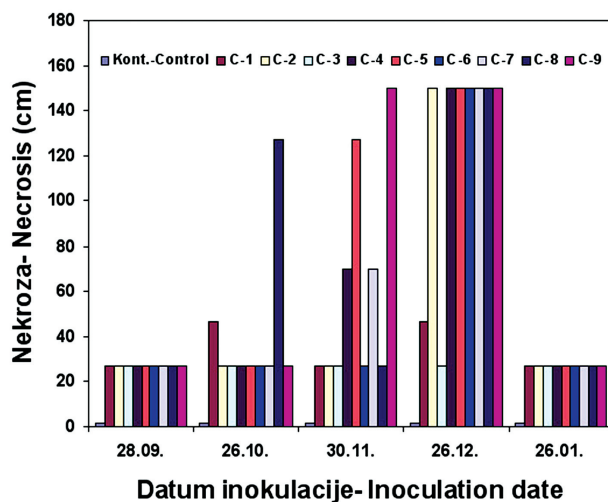


**Sl. 3.** *C. cincta*. Potpuno sušenje inokuliranih grana breskve (a) i izgled piknida i oslobađanje piknospora u vidu niti na inokuliranim granama breskve (b).

**Fig. 3.** *C. cincta*. Die-back of inoculated peach twigs (a) and pycnidia with extruded pycnidiospores (b).

**Sl. 4.** *C. cincta*. Kalusirane rak-rane na inokuliranoj grani breskve.

**Fig. 4.** *C. cincta*. Localized canker on inoculated peach twig.



**Graf.1.** *C. cincta*. Prosečna patogenost izolata na inokuliranim granama breskve.

**Graph.1.** *C. cincta*. Average pathogenicity of isolates on inoculated peach twigs.

novembru i decembru. Tokom novembra i decembra sušenje inokuliranih grana su prouzrokovali izolati C-4, C-5, C-7 i C-9 (sl. 5), u decembru i izolati C-2, C-6 i C-8, a pri inokulacijama izvedenim u oktobru, samo je izolat C8 prouzrokovao potpuno sušenje. U ostalim slučajevima, ovi izolati, kao i izolat C-1, prouzrokovali su nekrotične pege oko zareza, koje su se u nekim slučajevima i delimično spajale. Izolat C-3 je u svim slučajevima prouzrokovao samo neznatnu nekrozu oko mesta inokulacije. Različiti stepen agresivnosti izolata *Cytospora* spp. navodi i Chiarappa (1960). Ovaj autor je konstatovao postojanje razlika u virulentnosti izolovanih *Cytospora* spp. sa aktivnih zona rak-rana grana i stabala šljive, što je dokazao različitim metodama inokulacije. Ispitivanjima virulentnosti izolata *C. cincta* i *C. leucostoma* sprovedenim na stablima šljive i breskve, Helton i Konicek (1961) su zaključili da postoje razlike u virulentnosti među izolatima (od saprofita do jakih patogena rana) i da nisu specifični prema domaćinu (što je odlika varijeteta).



**Sl. 5.** *C. cincta*. Sušenje grana breskve inokuliranih izolatom C-7 u novembru (a) i decembru 2000. godine (b, c).

**Fig. 5.** *C. cincta*. Die-back of peach twigs inoculated with isolate C-7 in november (a) and december (b, c) in 2000.

Kod svih izolata koji su u periodu oktobar-decembar prouzrokovali potpuno sušenje inokuliranih grana, utvrđeno je i prisustvo piknida sa piknosporama (sl. 6).

U inokulacionim ogledima izvedenim u periodu maj-septembar 2000. i januar-april 2001., nijedan od ispitivanih izolata nije prouzrokovao sušenje grana, nego samo nekrozu oko mesta zareza koja je zaustavljena obrazovanjem kalusiranog tkiva, što je onemogućilo dalje širenje patogena (kalusirane rak-rane).

Grane koje su inokulirane samo vodom (kontrola) nisu pokazale nikakve patološke promene tokom celog inokulacionog ogleda.



**Sl. 6.** *C. cincta*. Obrazovanje pknida na granama breskve inokulisanih izolatom C-8 u novembru (a) i devembru (b) 2000. godine.

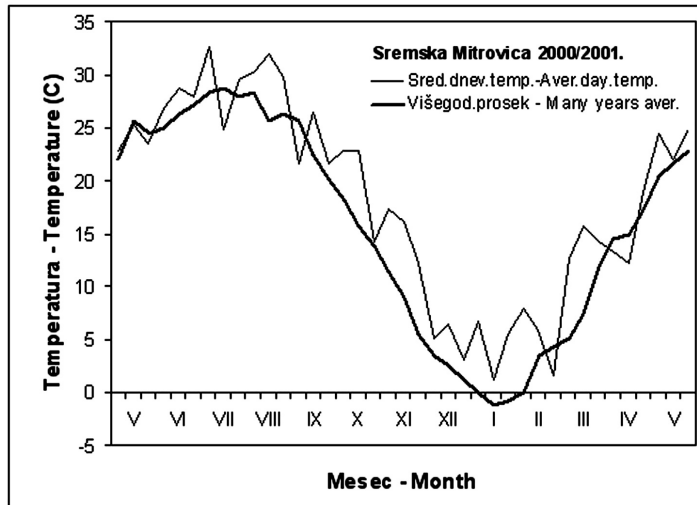
**Fig. 6.** *C. cincta*. Pycnidia formation on peach twigs inoculated with isolate C-8 in november (a) and december (b) in 2000.

Rezultati o vremenu ostvarene infekcije u skladu su sa literaturnim podacima koje su mnogi autori tokom proučavanja naveli za gljivu *C. cincta*. Tako, Arsenijević et al. (1973, 1982) proučavajući sezonski razvoj ove gljive na breskvi, navode da inokulacije izvedene tokom jesenjih i zimskih meseci (septembar-april), u periodu mirovanja voćaka, nesumnjivo pokazuju jake patološke promene koje imaju za posledicu nekrozu ksilema, floema i kambijuma, obrazovanje krupnih rak-rana sa smolom i izumiranje tj. sušenje grana. Nasuprot tome, inokulacije izvršene tokom letnjih meseci, u periodu intenzivnog razvoja voćaka, prouzrokovale su vrlo slabe promene, jer je dolazilo samo do nekroze ksilema; dalji razvoj je zaustavljen aktivnošću kalusa, tako da se parazit lokalizovao. Prema Bertrand i English (1976) razvoj rak-rana je kod inokulacije sa *C. cincta* najveći u proleće, a najmanji u leto. Rozsnyay et Klement (1973) i Rozsnyay (1977) proučavajući patogenost *C. cincta* u zasadima kajsije, ističu da je aktivni period gljive *C. cincta* u periodu juli-mart, dok ozlede koje su inokulisane u proleće i rano leto bivaju prekrivene novim kalusom koji lokalizuje širenje patogena. Najosetljiviji period za biljku domaćina (kada je patogen destruktivniji) prema ovim autorima je septembar, oktobar i novembar, mada i zimske infekcije omogućuju stvaranje krupnih rak-rana ili mogu prouzrokovati izumiranje zaraženih grana. Tisserat (2003) ističe da je glavni infektivni period gljiva *C. cincta* i *C. leucostoma* tokom ranog i srednjeg perioda mirovanja (novembar-decembar), mada se infekcija može ostvariti i u kasnim zimskim ili ranim prolećnim periodima. Kable et al. (1967) takođe ističu da se infekcija sa *Cytospora* sp. lakše ostvaruje u jesen nego u rano leto.

Na osnovu dobijenih rezultata inokulacionih ogleda u polju, može se zaključiti da jaka nekroza i sušenje grana nastupa samo pri inokulacijama izvedenim tokom kasne jeseni i zime (period mirovanja voćaka). Prema graf. 2



proizilazi da su najuspešnije bile one inokulacije koje su izvođene pri niskim temperaturama. Nasuprot tome, nekroza se pri inokulacijama izvršenim tokom letnjih meseci javlja samo na mestu inokulacije. Iz graf. 2 takođe proizilazi, da su srednje dnevne temperature u periodu izvođenja ogleđa (2000/2001.) uglavnom bile više u odnosu na višegodišnji proseć, čime bi se mogao objasniti relativno kratak period uspešnih inokulacija (oktobar-decembar). Prema Arsenijević i Balaž (1982) svi faktori koji utiču na smanjenje vitalnosti biljnog organizma (slab razvoj voćaka, suša, niske temperature i sl.) doprinose nastanku bolesti citosporoznog raka. Tisserat (2003) takođe ističe da *C. cincta* uglavnom kolonizira samo biljna tkiva koja su već na neki način oštećena. Kao faktore koji doprinose invaziji i širenju ove gljive u biljci navodi stres uzrokovan sušom, niskim temperaturama, nedostatkom hraniva ili usled truleži korena (prouzrokovali - nematode ili drugi patogeni). U prilog ovom idu istraživanja Bertrand-a i sar. (1976) koji su ispitivali uticaj stresa na stablima šljive, prouzrokovan jakom vlažnošću posle berbe. Zaključeno je da kod ovakvih stabala dolazi do značajnog razvoja raka i da jesenji vlažni stres za samo jednu sezonu, u inače zdravom drveću, rezultira značajnom aktivnošću patogena u narednom periodu.



**Graf. 2.** Srednje dnevne temperature u Sremskoj Mitrovici tokom 2000/2001. godine.

**Graph. 2.** Mean daily temperatures in Sremska Mitrovica during 2000/2001

Kad je u pitanju otpornost, Bertrand i English (1976) ističu da su bujnija stabla otpornija u odnosu na manje bujna, koja su dosta osetljiva i na njima se rak-rane razvijaju i tokom leta.

## LITERATURA

- Adams, G., Hammar S., Proffer, T. (1990): Vegetative Compatibility in *Leucostoma persoonii*. *Phytopathology*, Vol. 80, No. 3: 287-291.
- Arsenijević, M., Balaž, J. (1982): Citosporozno izumiranje i rak-rane voćaka. *Glasnik zaštite bilja*, br. 2: 38-42, Zagreb.
- Arsenijević, M., Jasnić, S., Balaž, J., Petrov, M. (1973): Prilog proučavanju *Cytospora cincta* Sacc. kao parazita breskve. *Zaštita bilja*, br. 126: 337-349, Beograd.
- Arsenijević, M., Jasnić, S., Balaž, J., Petrov, M. (1982): Razvoj *Cytospora cincta* Sacc. kao parazita breskve tokom godine. *Zaštita bilja*, Vol. 33 (1), br. 159: 73-83, Beograd.
- Balaž, J., Grbić, R., Pižurica, B. (1994): Gljive kao prouzrokovači sušenja grana breskve i mogućnosti njihovog suzbijanja. *Savremena poljoprivreda*, Vol. 42 vanredni broj: 43-48, Novi Sad.
- Balaž, J., Popović, T., Bagi, F. (2005): *Cytospora cincta* kao prouzrokovač sušenja mladara breskve. *Sedmo savetovanje o zaštiti bilja*, Soko Banja, 15-18. novembar.
- Balaž, J., Popović, T., Knežević, T. (2000): Proučavanje uzročnika sušenja breskve u području Fruške Gore. *Zbornik rezimea XI Jugoslovenskog Simpozijuma o zaštiti bilja sa međunarodnim učešćem i Savetovanje o primeni pesticida*, Zlatibor.
- Bertrand, P. F., English, H. (1976): Virulence and Seasonal Activity of *Cytospora leucostoma* and *C. cincta* in French Prune Trees in California. *Plant Disease Reporter*, Vol. 60, No. 2: 106-110.
- Bertrand, P. F., English, H., Uriu, K., Schick, F. J. (1976): Late Season Water Deficits and Development of *Cytospora* Canker in French Prune. *Phytopathology*, Vol. 66, No. 11: 1318-1320.
- Biggs, A. R. (1997): *Leucostoma* Canker of Stone Fruits, *Leucostoma persoonii* and *L. cincta*. *Fruit Disease Focus*. West Virginia University, Kearneysville Tree Fruit Research and Education Center.
- Chiarappa, L. (1960): Distribution and a Mode of Spread of *Cytospora* Canker in an Orchard of the President Plum Variety in California. *Plant Disease Reporter*, Vol. 44, No. 8: 612-616.
- Gairola, C., Powell, D. (1970): *Cytospora* Peach Canker in Illinois. *Plant Disease Reporter*, Vol. 54, No. 10: 832-835.
- Helton, A. W. (1961): First Year Effects of 10 Selected *Cytospora* Isolates on 20 Fruit and Forest Tree Species and Varieties. *Plant Disease Reporter*, Vol. 45, No. 7: 500-504.
- Helton, A. W., (1962): Relative Efficiency of Three Methods of Inoculating Tree Stems with *Cytospora* Fungi. *Phytopathology*, Vol. 52, No. 12: 1266-1268.

- Helton, A. W., Konicek, D. E. (1961): Effects of Selected *Cytospora* Isolates from Stone Fruits on Certain Stone Fruit Varieties. *Phytopathology*, Vol. 51, No. 3: 152-157.
- Helton, A. W., Moisey, J. A. (1955): *Cytospora* Damage in Idaho Prune Orchards. *Plant Disease Reporter*, Vol. 39, No. 12: 931-943.
- Helton, A. W., Randall, H. (1975): Cambial Gummosis in *Prunus domestica* Infected with *Cytospora cincta*. *Plant Disease Reporter*, Vol. 59, No. 4: 340-344.
- Ivanović, M. S., Ivanović, D. M. (2001): Mikoze i pseudomikoze biljaka. Poljoprivredni fakultet, Zemun.
- Kable, P. F., Fliegel, P., Parker, K. G. (1967): *Cytospora* Canker on Sweet Cherry in New York State: Association with Winter Injury and Pathogenicity to Other Species. *Plant Disease Reporter*, Vol. 51, No. 3: 155-157.
- Popović T. (2004): Etiološka proučavanja sušenja grana breskve na području Fruške Gore. Magistarska teza. Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.
- Popović, T., Balaž, J. (2005): Identifikacija prouzrokovača prevremenog sušenja breskve. Sedmo savetovanje o zaštiti bilja, Soko Banja, 15-18. novembar.
- Regner, K. M., Johnson, D. A., Gross, D. C. (1990): Etiology of Canker and Dieback of Sweet Cherry Trees in Washington State. *Plant Disease*, Vol. 74, No. 6: 430-433.
- Royse, D. J., Ries, S. M. (1978): Detection of *Cytospora* Species in Twig Elements of Peach and its Relation to the Incidence of Perennial Canker. *Phytopathology*, Vol. 68, No. 4: 663-667.
- Rozsnyay, Z. D. (1977): *Cytospora* Canker and Dieback of Apricots. *EPPO Bull*, 7 (1): 69-80.
- Rozsnyay, Z. D., Klement, Z. (1973): Apoplexy of apricots. *Acta Phytopathologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, Vol. 8 (1-2): 57-69.
- Tisserat, N. (2003): Perennial Canker of Peach. Kansas State University. College of Agriculture. Department of Plant Pathology.

(Primljeno: 20.06.2007.)

(Prihvaćeno: 28.08.2007)

## THE SEASONAL INFLUENCE OF *CYTOSPORA CINCTA* INFECTIONS ON PEACH

POPOVIĆ TATJANA, BALAŽ JELICA

Agriculture faculty, Department for plant protection, Novi Sad

E-mail: [popovict@eunet.yu](mailto:popovict@eunet.yu)

### Summary

The peach die-back pathogen (*Cytospora cincta* Sacc.) was isolated from diseased branches collected from the Fruska Gora mountain region. Nine isolates, marked as C-1, C-2, C-3, C-4, C-5, C-6, C-7, C-8 and C-9, were chosen for pathogenicity tests. Field inoculations of two-year-old peach branches were made monthly from May 2000 to April 2001.

Symptoms on inoculated branches suggest that inoculations performed during autumn and winter months, i.e. during dormant period, cause die-back, while infections carried out during spring and summer mainly remain localized due to outgrowth of host's new tissue.

*Key words:* peach, *Cytospora cincta*, dieback, pathogenicity.

(Received: 20.06.2007.)

(Accepted: 28.08.2007.)

Zaštita bilja  
vol. 56 (1-4), No 251-254, 67-76, 2005  
Beograd

UDK 632.4-425  
Naučni rad

## UTICAJ NEKIH PREPARATA NA RAZVOJ IZOLATA *CYTOSPORA CINCTA IN VITRO*

POPOVIĆ TATJANA, BALAŽ JELICA  
Poljoprivredni fakultet, Departman za zaštitu bilja, Novi Sad  
E-mail: [popovict@eunet.yu](mailto:popovict@eunet.yu)

U radu su prikazani rezultati proučavanja delovanja preparata na razvoj gljive *Cytospora cincta* Sacc. u uslovima *in vitro*. U ispitivanjima je korišćeno 6 izolata gljive *C. cincta*, dobijenih izolacijama sa obolelih grana breskve. Korišćeni su sledeći preparati: Benomil WP-50, Venturin S-50, Punch 40-EC, Topas 100-EC, Konker, Clarinet, Bordovska čorba WP-20 i Bakarni kreč 50. Ogleđi su izvođeni na hranljivoj podlozi (krompir-dekstrozni agar) u koju su dodavani fungicidi određenih doza.

Rezultati su pokazali da su svi preparati sa sistemčnim delovanjem (Benomil WP-50, Punch 40-EC, Topas 100-EC, Konker i Clarinet) ispoljavaju visoku efikasnost, izazivajući smrtnost pri dozama manjim od 25 ppm. Efikasnost preparata sa preventivnim delovanjem (Bordovska čorba WP-20, Bakarni kreč 50 i Venturin S-50) je bila dosta niža, jer im je minimalna inhibitorna koncentracija bila dosta visoka (750 ppm i više).

*Ključne reči:* *Cytospora cincta*, izolati, fungicidi, *in vitro*, minimalna inhibitorna koncentracija.

### UVOD

*Cytospora cincta* Sacc. je jedan od glavnih prouzrokovala sušenja i izumiranja breskve već duži niz godina na području Fruške Gore (Arsenijević i sar., 1973, 1982; Balaž i sar., 1994, 2000, 2005; Popović, 2004; Popović i Balaž, 2005a).

Pravilnim sprovođenjem i kombinacijom hemijskih i agrotehničkih mera može se postići uspešna zaštita breskve od raznih biotičkih i abiotičkih prouzrokovala sušenja. Jedna od bitnih agrotehničkih mera je pomeranje vremena rezidbe nakon kretanja vegetacije, jer su voćke tada manje osetljive prema

ostvarenju infekcija i širenju ovog patogena. Ovakav stav zastupa veći broj autora (Helton i Moisey, 1955; Luepschen i Rohrbach, 1969; Arsenijević i Balaž, 1982; Biggs, 1992; Abbruzzetti, 1997; Tisserat, 2003).

Prema literaturnim podacima, važno je primenu fungicida izvesti u jesen, za vreme ili posle opadanja lišća kao i tokom zime (period mirovanja voćaka) sa preparatima na bazi bakra (Helton, 1962; Simon, 1983; Balaž i sar., 1994; Abbruzzetti, 1997), kao i benomila i kaptafola (Royse i Ries, 1978; Arsenijević i Balaž, 1982; Tuset et al., 1997).

Cilj ovog rada je proučavanje uticaja nekih fungicida na porast kolonija izolata gljive *C.cincta* u uslovima *in vitro*, čime bi se dobili podaci o fungicidima koji bi se mogli preporučiti za zaštitu breskve od prouzrokovala prevremenog sušenja.

## MATERIJAL I METODE RADA

Preparati Benomil WP-50, Venturin S-50, Punch 40-EC, Topas 100-EC, Konker, Clarinet, Bordovska čorba WP-20 i Bakarni kreč 50 dodavani su u različitim dozama u krompri glukoznu podlogu (tab.1). Podloga sa fungicidima zasejana je fragmentima miselije gljive starosti 20-ak dana. Korišćeno 6 izolata, označenih kao C-2, C-4, C-5, C-6, C-7 i C-9, koji su dobijeni izolovanjem patogena sa obolelih grana breskve. Uporedo je postavljena i kontrola za koju je korišćen isti postupak i ista podloga ali bez dodavanja fungicida. Ogledi su postavljeni u tri ponavljanja. Ovakav metod za ispitivanje efikasnosti preparata *in vitro* navodi i veći broj autora (French i Helton, 1962; Harvey i Helton, 1962; Rohrbach i Helton, 1965; Balaž i sar., 1994; Popović, 2004; Popović i Balaž, 2005b i dr.).

Kao početne koncentracije (doze) ispitivanih fungicida korišćene su maksimalne koncentracije preporučene od proizvođača koje su, preko ogleada III - VII, postepeno smanjivane (tab.1) u cilju utvrđivanja minimalne inhibitorne koncentracije – MIC (Beresford, 1994; Arras et al., 1995). Ogledi su ocenjeni praćenjem razvoja kolonija gljive nakon 4, 7, 11, 14, 18, 21, 25 i 28 dana od zasejavanja fragmenata gljive.

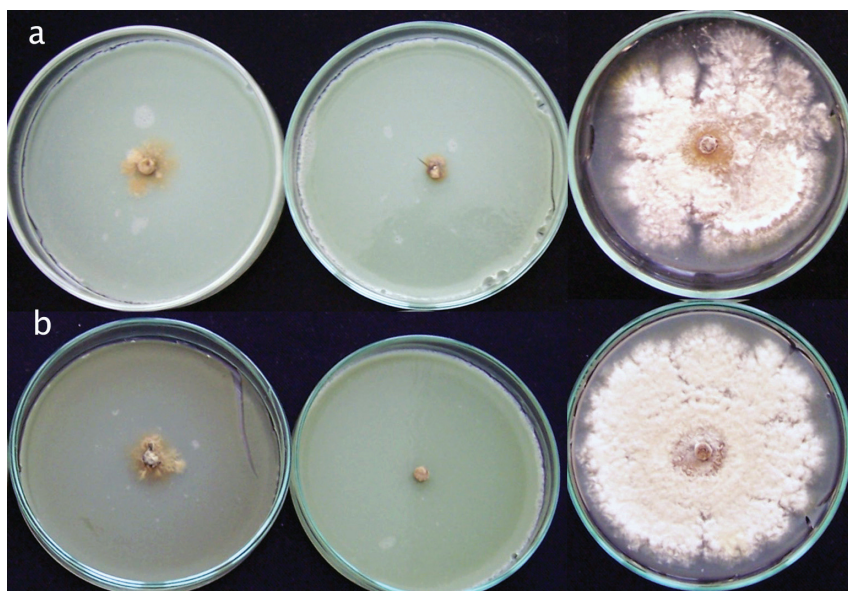
## REZULTATI RADA I DISKUSIJA

Preporučena doza za primenu preparata Bordovska čorba WP-20 (ogled I) je 15000 ppm. Pri ovoj dozi gljiva se uopšte nije razvijala, kao ni smanjenjem doze na 12500 ppm. Razvoj izolata je konstatovan tek na 10000 ppm, na osnovu čega je zaključeno da je MIC za preparat Bordovska čorba WP-20 bila 12500 ppm (sl. 1).

**Tabela. 1.** Ispitivane koncentracije fungicida  
**Table 1.** Investigated concentration of fungicides

Naziv fungicida Fungicide name	Activna materija Active ingredient	Koncentracija Concentration (%)	Ispitivana koncentracija fungicida Investigated concentration of fungicide						
			I ogled I assay	II ogled II assay	III ogled III assay	IV ogled IV assay	V ogled V assay	VI ogled VI assay	VII ogled VII assay
BENOMIL WP-50	benomil	0,04-0,06	0,1	0,05	0,025	0,01	0,005	0,001	0,001
VENTURIN S-50	kaptan	0,3	0,3	0,15	0,075	0,03	-	-	-
PUNCH 40-EC	flusilazol	0,0025-0,0075	0,01	0,005	0,0025	0,001	0,0005	0,0001	0,0001
TOPAS 100-EC	penkonazol	0,025	0,04	0,02	0,01	0,004	0,002	0,0004	0,0004
KONKER	vinklozolin + karbendazim	0,1-0,15	0,15	0,075	0,0375	0,015	0,0075	0,0015	0,0015
CLARINET	pirimetanil + flukvinkonazol	0,1-0,15	0,15	0,075	0,0375	0,015	0,0075	0,0015	0,0015
BORDOVSKA ČORBA WP-20	bakar sulfat	1,5-2	1,5	1,25	1,0	-	-	-	-
BAKARNI KREČ 50	bakarni oksihlorid	0,5-0,75	0,5	0,4	0,25	0,1	-	-	-



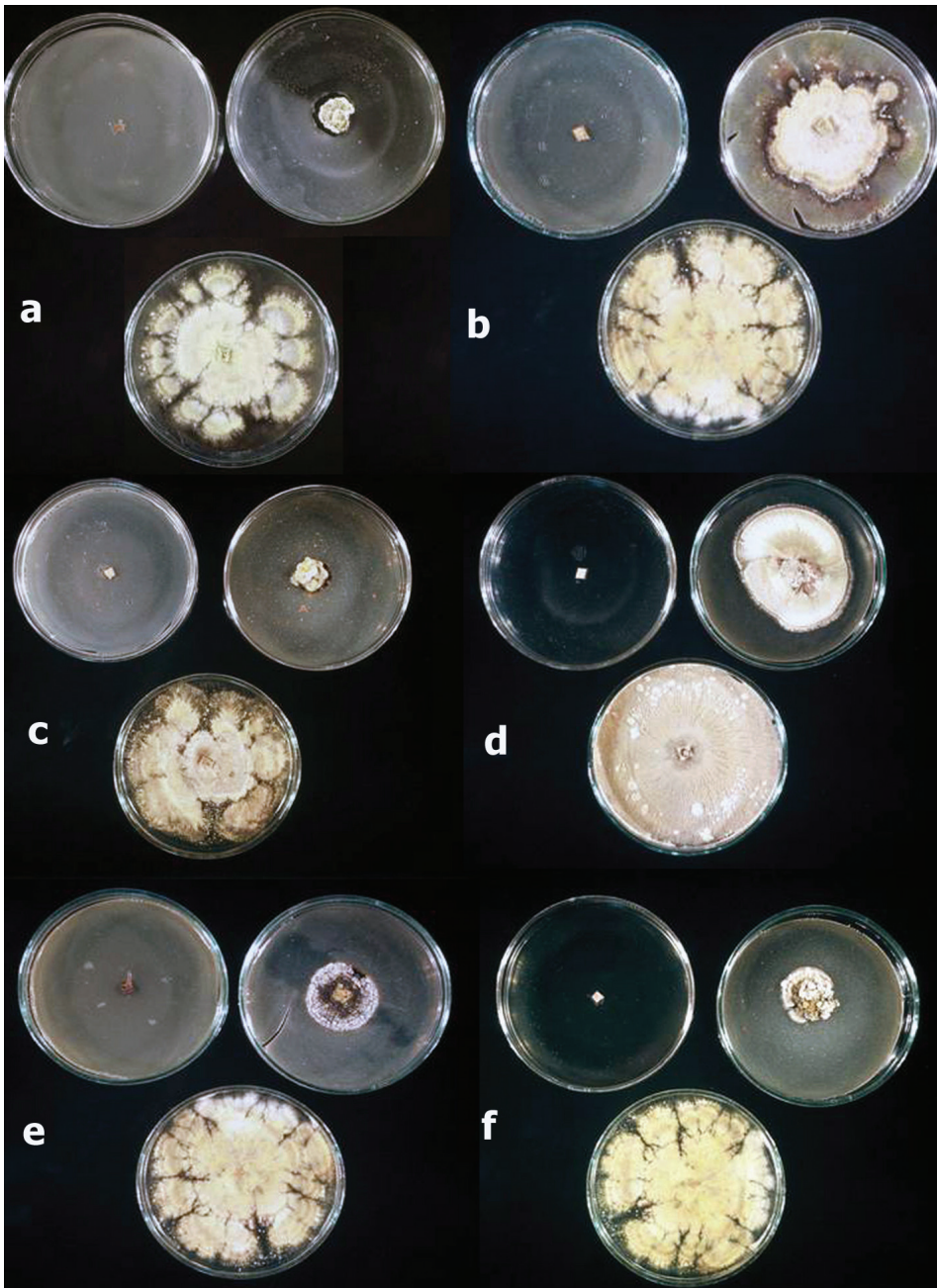


**Sl. 1.** *C. cincta*. Porast kolonija izolata C-6 (a) na KDA sa 10000 ppm (levo) i 12500 ppm (u sredini) Bordovske čorbe WP-20 (desno kontrola– bez fungicida) i izolata C-7 (b) sa 10000 ppm (levo) i 12500 ppm ( u sredini) Bakarnog kreča (desno kontrola– bez fungicida).

**Fig. 1** *C. cincta*. Colony growth of isolates C-6 (a) on PDA with 10000 ppm (left) and 12500 ppm (in the middle) of Bordeaux mixture WP-20 (right control – no fungicide added) and C-7 (b) on PDA with 10000 ppm (left) and 12500 ppm (in the middle) of Copper oxychloride (right control – no fungicide added).

Patogen se nije razvijao ukoliko je podlozi dodavana preporučena doza Bakarnog kreča 50 i Venturina S-50 od 5000 ppm, odnosno 3000 ppm. Razvoj gljivice uočen je tek pri dozama od 1000 ppm (Bakarni kreč 50) i 300 ppm (Venturin S-50), na osnovu čega je utvrđeno da je MIC za Bakarni kreč 50 bila 2500 ppm i 750 ppm za preparat Venturin S-50 (sl. 1b i 2a).

Svi korišćeni preparati sa sistemskim delovanjem (Benomil WP-50, Punch 40-EC, Topas 100-EC, Konker i Clarinet) ispoljili su izražen inhibitorni efekat, jer je porast gljivice primenom ovih preparata konstatovan tek pri smanjenju početne, preporučene, doze za 1000 puta (sl. 2b-f). Prema tome, iz ovih oglada proizilazi da je MIC za preparat Benomil WP-50 bila 10 ppm, za Punch 40-EC 1 ppm, za Topas 100-EC 4 ppm, za Konker 15 ppm i za Clarinet 15 ppm.



**Sl. 2.** *C. cincta*. Porast kolonija izolata C-7 (a) na KDA sa 1500 ppm (gore levo) i 750 ppm (gore desno) Venturina S-50 (dole kontrola– bez fungicida), C-9 (b) na KDA sa 10 ppm (gore levo) i 1 ppm (gore desno) Benomila WP-50 (dole kontrola– bez fungicida), C-6 (c) na KDA sa 1 ppm (gore levo) i 1 ppm (gore desno) Puncha 40-EC (dole kontrola– bez fungicida), C-5 (d) na KDA sa 4 ppm (gore levo) i 0.4 ppm (gore desno) Topasa 100-EC (dole kontrola– bez fungicida), C-9 (e) na KDA sa 15 ppm (gore levo) i 1.5 ppm (gore desno) Konkera (dole kontrola– bez fungicida) i izolata C-9 (f) na KDA sa 15 ppm (gore levo) i 1,5 ppm (gore desno) Clarineta (dole kontrola– bez fungicida).

**Fig.2** *C. cincta*. Colony growth of of isolates C-7 (a) on PDA with 1500 ppm (upper left) and 750 ppm (upper right) of Venturin S-50 (down control – no fungicide application), C-9 (b) on PDA with Benomil WP-50 with 10 ppm (upper left) and 1 ppm (upper right) of Benomil WP-50 (down control – no fungicide application), C-6 (c) on PDA with 1 ppm (upper left) and 0,1 ppm (upper right) of Punch 40-EC (down control – no fungicide application), C-5 (d) on PDA with 4 ppm (upper left) and 0.4 ppm (upper right) of Topas 100-EC (down control – no fungicide application), C-9 (e) on PDA with 15 ppm (upper left) and 1.5 ppm (upper right) of Konker (down control – no fungicide application) and C-9 (f) on PDA with 15 ppm (upper left) and 1.5 ppm (upper right) of Clarinet (down control – no fungicide application).

French i Helton (1962) navode da se prema laboratorijskim standardima, vrednim proučavanja smatraju samo oni preparati koji smrtnost patogena izazivaju pri dozama od 25 ppm ili niže i da se samo takvi preparati ispituju dalje na toksičnost i sposobnost translokacije u stablima voćaka. Na osnovu ovih podataka može se zaključiti da su u našim ispitivanjima dobru efikasnost ispoljili samo preparati sa sistemčnim delovanjem (Benomil WP-50, Punch 40-EC, Topas 100-EC, Konker i Clarinet), dok je kod preventivnih preparata (Venturin S-50, Bordovska čorba WP-20 i Bakarni kreč 50) MIC bila visoka.

Istraživanja većeg broja autora (French i Helton, 1962; Harvey i Helton, 1962; Helton, 1962, 1963; Helton i Harvey, 1963; Rohrbach i Helton, 1965; Williams i Helton, 1967; Helton i Rohrbach, 1967; Helton i Kochan, 1967, 1968) su takođe bila usmerena ka iznalaženju fungicida kojima bi se uspešno mogla sprečiti ili redukovati infekcija sa *Cytospora* vrstama. U tu svrhu su izvođeni brojni *in vitro* i *in vivo* ogledi.

U *in vitro* uslovima je ispitan veliki broj jedinjenja postupkom koji se sastojao u dodavanju određenih koncentracija preparata u podlogu malc ekstrakcioni agar, zasejavanju izolata gljive i praćenju porasta kolonija. Efikasnost preparata odnosno jedinjenja je utvrđena na osnovu laboratorijskog standarda (visoko efikasni su oni koji izazivaju smrtnost gljive pri dozama manjim od 25 ppm). Tako, prema nekim autorima, visoko efikasna jedinjenja su: cikloheksimid /Acti-dione/ (French i Helton, 1962), Na-pyridinethione /Omadine/ (French i Helton, 1962; Harvey i Helton, 1962), oxyquinoline citrate /Citroxin/ (French i Helton, 1962; Harvey i Helton, 1962; Rohrbach i Helton, 1965), oxyquinoline sulfate /Sunox/ (French i Helton, 1962; Rohrbach i Helton, 1965), 8-hydroxyquinoline benzoate (Harvey i Helton, 1962) i preparati Mycostatin (French i Helton, 1962; Harvey i Helton, 1962), Phytostreptin (French i Helton, 1962) i Gerox (Harvey i Helton, 1962). Najslabija aktivnost na test gljivu je primećena među karbamatima, regulatorima rasta i benzenovim jedinjenjima (Rohrbach i Helton, 1965).

Dalja ispitivanja efikasnosti ovih jedinjenja odnosno preparata se zasnivaju na *in vivo* ogledima, prskanjem ili injektiranjem inokulisanih (obolelih) stabala voćaka znatno većim dozama preparata od onih koje su letalne za analiziranu gljivu u prethodnim *in vitro* testovima. Rezultati ovih ogleda su pokazali da su 8-quinolinoli (Helton, 1962, 1963; Helton i Harvey, 1963; Williams i Helton, 1967; Helton i Rohrbach, 1967; Helton i Kochan, 1967, 1968), cikloheksimidi (Helton, 1962, 1963; Williams i Helton, 1967; Helton i Rohrbach, 1967; Helton i Kochan, 1967, 1968), aminotrihlorofenilacetic acid - amine salt (Helton i Rohrbach, 1967), Phytoactin L-456 (Helton i Rohrbach, 1967; Helton i Kochan, 1967), Na 2-pyridinethiol, 1-oxide (Helton i Rohrbach, 1967), 1-oxido-2-pyridylthiomethyl propyl ether (Helton i Rohrbach, 1967) i 2,3,6-trichlorophenylacetic acid - so-



dium salt (Helton i Rohrbach, 1967) bili absorbovani i translocirani bez gubitka fungicidne aktivnosti i da su profilaktički (preventivni) efekti ovih jedinjenja bili više naglašeni nego terapijski (kurativni).

## LITERATURA

- Abbruzzetti, G. (1997): Withered and cankerous branches, a widespread disease of peach. Terra e Sole, Vol. 52, No. 655/656: 91-94.
- Arras, G., Agabbio, M., Piga, A., D'hallewin, G. (1995): Fungicide effect of volatile compounds of *Thymus capitatus* essential oil. ISHS Acta Horticulturae 379.
- Arsenijević, M., Balaž, J. (1982): Citosporozno izumiranje i rak-rane voćaka. Glasnik zaštite bilja, br. 2: 38-42, Zagreb.
- Arsenijević, M., Jasnić, S., Balaž, J., Petrov, M. (1973): Prilog proučavanju *Cytospora cincta* Sacc. kao parazita breskve. Zaštita bilja, br. 126: 337-349, Beograd.
- Arsenijević, M., Jasnić, S., Balaž, J., Petrov, M. (1982): Razvoj *Cytospora cincta* Sacc. kao parazita breskve tokom godine. Zaštita bilja, Vol. 33 (1), br. 159: 73-83, Beograd.
- Balaž, J., Grbić, R., Pižurica, B. (1994): Gljive kao prouzrokovajući sušenja grana breskve i mogućnosti njihovog suzbijanja. Savremena poljoprivreda, Vol. 42 vanredni broj: 43-48, Novi Sad.
- Balaž, J., Popović, T., Bagi, F. (2005): *Cytospora cincta* kao prouzrokovatelj sušenja mladara breskve. Sedmo savetovanje o zaštiti bilja, Soko Banja, 15-18. novembar.
- Balaž, J., Popović, T., Knežević, T. (2000): Proučavanje uzročnika sušenja breskve u području Fruške Gore. Zbornik rezimea XI Jugoslovenskog Simpozijuma o zaštiti bilja sa međunarodnim učešćem i Savetovanje o primeni pesticida, Zlatibor.
- Beresford, R. (1994): Understanding fungicide resistance. The Orchardist, Vol: 67, No:(9):24.
- Biggs, A. R. (1992): A review of pruning techniques for peach trees in relation to the incidence of dieback and infection by *Leucostoma spp.* Acta Horticulturae, No. 322: 127-134.
- Chandler, W. A. (1974): Postpruning Sprays not Effective in Control of Peach Tree Decline. Plant Disease Reporter, Vol. 58, No. 5: 388-391.
- French, W. J., Helton, A. W. (1962): In Vitro Toxicity of Forty-six Compounds to a *Cytospora* Isolate from Italian Prune. Phytopathology, Vol. 52, No. 8: 810-814.
- Harvey, A. E., Helton, A. W. (1962): In Vitro Effects of Seventeen Chemical Agents on *Cytospora cincta*. Plant Disease Reporter, Vol. 46, No. 8: 593-596.
- Helton, A. W. (1962): Effect of Bordeaux Spray and Plastic Covering in Preventing Invasion of Low-Temperature-Injured Stems of Prune Trees by *Cytospora* Fungi. Plant Disease Reporter, Vol. 46, No. 2: 77-79.

- Helton, A. W. (1963): Chemotherapeutic Suppression and Exaggeration of *Cytospora* Canker Disease in Peach Trees. *Phytopathology*, Vol. 53, No. 5: 562-568.
- Helton, A. W., Harvey, A. E. (1963): Absorption, Toxicity, and Bio-assay of High-Potency Fungicides in *Prunus domestica*. *Phytopathology*, Vol. 53, No. 8: 895-898.
- Helton, A. W., Kochan, W. J. (1967): First and Second Year Effects on *Cytospora* Canker Disease of Italian Prune Trees Sprayed with Four Concentrations of Cycloheximide Thiosemicarbazone. *Plant Disease Reporter*, Vol. 51, No. 8: 655-658.
- Helton, A. W., Kochan, W. J. (1968): Systemic-Chemical Paints for the Control of *Cytospora* Canker Disease in Prune Trees. *Plant Disease Reporter*, Vol. 52, No. 2: 154-157.
- Helton, A. W., Moisey, J. A. (1955): *Cytospora* Damage in Idaho Prune Orchards. *Plant Disease Reporter*, Vol. 39, No. 12: 931-943.
- Helton, A. W., Rohrbach, K. G. (1967): Chemotherapy of *Cytospora* Canker Disease in Peach Trees. *Phytopathology*, Vol. 57, No. 4: 442-446.
- Luepschen, N. S., Rohrbach, K. G. (1969): *Cytospora* Canker of Peach Trees: Spore Availability and Wound Susceptibility. *Plant Disease Reporter*, Vol. 53, No. 11: 869-872.
- Popović T. (2004): Etiološka proučavanja sušenja grana breskve na području Fruške Gore. Magistarska teza. Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.
- Popović, T., Balaž, J. (2005a): Identifikacija prouzrokovala prevremenog sušenja breskve. Sedmo savetovanje o zaštiti bilja, Soko Banja, 15-18. novembar.
- Popović, T., Balaž, J. (2005b): Efikasnost fungicida u suzbijanju patogenih izolata gljive *Cytospora cincta* u uslovima *in vitro*. Sedmo savetovanje o zaštiti bilja, Soko Banja, 15-18. novembar.
- Rohrbach, K. G., Helton, A. W. (1965): In Vitro Effects of Fifty Pesticidal Substances on an Isolate of *Cytospora cincta* from Italian Prune. *Phytopathology*, Vol. 55, No. 4: 382-386.
- Royse, D. J., Ries, S. M. (1978): Detection of *Cytospora* Species in Twig Elements of Peach and its Relation to the Incidence of Perennial Canker. *Phytopathology*, Vol. 68, No. 4: 663-667.
- Simon, E. (1983): Control of Branch Dieback, Cankers and Early Death as a Determining Element of Peach Tree Protection. P. Int. Conf. Integr. Plant Prot., 2: 56-60, Budapest.
- Tisserat, N. (2003): Perennial Canker of Peach. Kansas State University. College of Agriculture. Department of Plant Pathology.
- Tuset, J. J., Hinarejos, C., Portilla, M. T. (1997): Incidence of *Phomopsis amygdali*, *Botryosphaeria berengeriana* and *Valsa cincta* Diseases in Almond Under Different Control Strategies. *Bulletin OEPP*, Vol. 27, No. 4: 449-454.



Williams, R. E., Helton, A. W. (1967): Prevention and Cure of *Cytospora* Canker Disease of Peach Trees with Systemic Chemicals. Plant Disease Reporter, Vol. 51, No. 10: 834-838.

(Primljeno: 27.06.2007.)

(Prihvaćeno: 28.08.2007.)

## EFFECT OF SOME FUNGICIDES ON *CYTOSPORA CINCTA* DEVELOPMENT *IN VITRO*

POPOVIĆ TATJANA, BALAŽ JELICA

Faculty of Agriculture, Department of Plant Protection, 21000 Novi Sad

E-mail: [popovict@eunet.yu](mailto:popovict@eunet.yu)

### Summary

Effect of some fungicides on growth of isolates *Cytospora cincta* Sacc., the causer agent of beach die-back, was studied. Six isolates of pathogen were grown on PDA in which different doses of preventive and systemic fungicides were added. The same row on PDA with no fungicides were use as control.

Assays were started with 8 fungicides (Benomil WP-50, Venturin S-50, Punch 40-EC, Topas 100-EC, Konker, Clarinet, Bordou mixture WP-20 and Copper carbonate 50) at their recommend doses for use. Also, the fungicides were applied in different doses with the aim to find out minimal inhibitory concentration (MIC).

All systemic fungicides (Benomil WP-50, Punch 40-EC, Topas 100-EC, Konker and Clarinet) showed high efficiency because they completely inhibited *C.cincta* growth at doses lower than 25 ppm. For preventive fungicides (Bordou mixture WP-20, Copper acarbonate 50 and Venturin S-50) MIC were much more higher (750 ppm and more).

*Key words:* *Cytospora cincta*, isolates, growth *in vitro*, minimal inhibitory concentration.

(Received: 27.06.2007.)

(Accepted: 28.08.2007.)

## PORAST I SPORULISANJE KOLONIJA *VENTURIA INAEQUALIS* NA RAZLIČITIM TEMPERATURAMA I PODLOGAMA

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

Najveći broj tretmana u zaštiti jabuke izvodi se protiv prouzrokovača čađave pegavosti lista i krastavost plodova. Međutim, mali broj raspoloživih fungicida, često primenjenih u povećanim količinama, uzrokuje pojavu smanjene osetljivosti patogena prema upotrebljanim fungicidima. Zato se javila potreba ispitivanja ove pojave i u laboratorijskim uslovima. Da bi se ova istraživanja sprovedla potrebno je ispitati uslove pod kojima patogen ima optimalni porast i fruktifikaciju, u cilju iznalaženja najboljih podloga i uslova za gajenje patogena koji bi poslužili u ispitivanjima njegove osetljivosti prema fungicidima u laboratorijskim uslovima. Prema dobijenim rezultatima, temperaturni optimum za porast kolonija je između 15° i 20°C, minimum je oko 1°C, a maksimum je 27°C. Najpogodnija podloga za sporulaciju patogena je podloga od slada, a neznatno slabija sporulacija je na podlozi od krompira. Utvrđeno je da je intenzitet sporulacije najveći pri temperaturi od 15°C, na podlozi od slada (1, 6 x 10<sup>5</sup> spora/ml).

*Ključne reči:* jabuka, čađava krastavost ploda, *Venturia inaequalis*, porast, fruktifikacija, temperatura, podloge

### UVOD

Jabuka je najintenzivnije gajena voćarska kultura na našim prostorima sa veoma značajnom godišnjom proizvodnjom plodova. Međutim, ovu proizvodnju ugrožava pojava raznih, veoma destruktivnih patogena. Jedan od najznačajnijih je prouzrokovač čađave krastavosti ploda – *Venturia inaequalis* (Cooke) Winter. Ovaj patogen može potpuno da ugrozi proizvodnju jabuke u odsustvu hemijske zaštite. O značaju *V. inaequalis* govori i podatak, da od ukupne potrošnje pesti-

cida koji se primenjuju pri proizvodnji jabuke, 75% otpada na suzbijanje bolesti mikozne prirode (fungicidi), od čega 70% za čađavu krastavost. Veliki problem u zaštiti jabuke od ovog patogena predstavlja činjenica da se veoma često i u povećanim količinama primenjuje mali broj fungicida. To je uzrokovalo pojavu smanjene osetljivosti patogena prema upotrebljavanim fungicidima zahvaljujući velikoj sposobnosti patogena za variranje i prevladavanje prepreka koje pred njega postavlja priroda ili čovek. Zato se javila potreba ispitivanja smanjene osetljivosti patogena u laboratorijskim uslovima, pa je zbog toga gajenje patogena u uslovima in vitro ponovo aktuelizovano. Rezultati ispitivanja saopšteni u ovom radu predstavljaju doprinos jednostavnijem i efikasnom gajenju patogena na veštačkim podlogama u cilju iznalaženja najboljih podloga i uslova za gajenje patogena koji bi poslužili u ispitivanjima njegove osetljivosti prema fungicidima u laboratorijskim uslovima.

## MATERIJAL I METODE

Fragmenti vazdušne micelije kolonije *V.inaequalis* sa monosporne kulture uzgajane na podlozi od slada (izolat poreklom iz Leskovca) zasejani su na hranljive podloge slad-agar (SA), odvarak lista jabuke (OLJ) i krompir glukozni agar – specijal (KGA), koje su podešene na pH 6,0. Zasejane podloge izlagane su temperaturama od 1°, 5°, 10°, 15°, 20°, 25°, 30°, 33° i 35°C u politermostatu u mraku (Borić, 1985; Arsenijević i Guberinić, 1989). Kulture su pregledane svakodnevno u cilju utvrđivanja početka razvoja kolonija na pojedinim temperaturama. Porast kolonija meren je u intervalima od sedam dana tokom šest nedelja razvoja, dok je za konačan porast kolonija uzet prečnik izmeren 42-og dana od zasejavanja (Borić, 1985). Prikazani podaci predstavljaju proseke od pet ponavljanja.

Obrazovanje reproduktivnih organa (konidija) praćeno je svakog dana od početka razvoja micelije u periodu od 42 dana. Početak sporulacije patogena utvrđivan je u kulturama na kosoj podlozi u epruvetama i na čvrstoj podlozi u Petri kutijama prečnika 5 cm. Micelija je zahvatana fitopatološkom iglom, prenošena na mikroskopsku pločicu, a zatim pripreman privremeni preparat koji je posmatran pod mikroskopom, kako bi se utvrdilo eventualno prisustvo spora. Na ovaj način je pouzdano mogao biti određen početak sporulacije.

Intenzitet sporulacije, odnosno gustina konidija u 1 ml suspenzije, utvrđivana je pomoću hemocitometra po Thom-u sa 16 polja ukupne površine 1 mm<sup>2</sup> i dubine 0,2 mm. Gustina konidija određivana je posle 30 dana od zasejavanja patogena (Ross, 1974), na svakoj od ispitivanih zakošenih podloga u epruvetama i svim temperaturama na kojima je bilo porasta micelije, kako bi se utvrdile razlike u in-

tenzitetu sporulacije. Suspenzija konidija pripremana je tako što je 1 ml destilovane vode dodavan u epruvetu sa kulturom patogena uz blago grebanje metalnom spatulom da bi se konidije odvojile od micelije. Dobijena suspenzija je presipana u čistu epruvetu i proceđena kroz polietilensku mrežu da bi se odstranila micelija. Pasterovom pipetom uzimana je suspenzija spora i prenošena na hemocitometar. Prve dve kapi suspenzije su odstranjivane, a sledeća je nanošena između pokrovne ljušpice i staklene ploče hemocitometra i pod mikroskopom pri uvećanju od 100 x vršeno je prebrojavanje konidija. Brojanje je rađeno u 32 ponavljanja (32 polja). Utvrđivan je ukupan broj spora, a iz toga je zatim izračunavan prosečan broj spora po 1mm<sup>2</sup> Gustine spora u 1 cm<sup>3</sup> (1ml) suspenzije izračunavana je po sledećoj formuli:  $N = n \times 5 \times 1000$ , gde je  $N$  = broj spora u 1 ml suspenzije (gustina spora /1ml), a  $n$  = prosečan broj spora na 1 mm<sup>2</sup>.

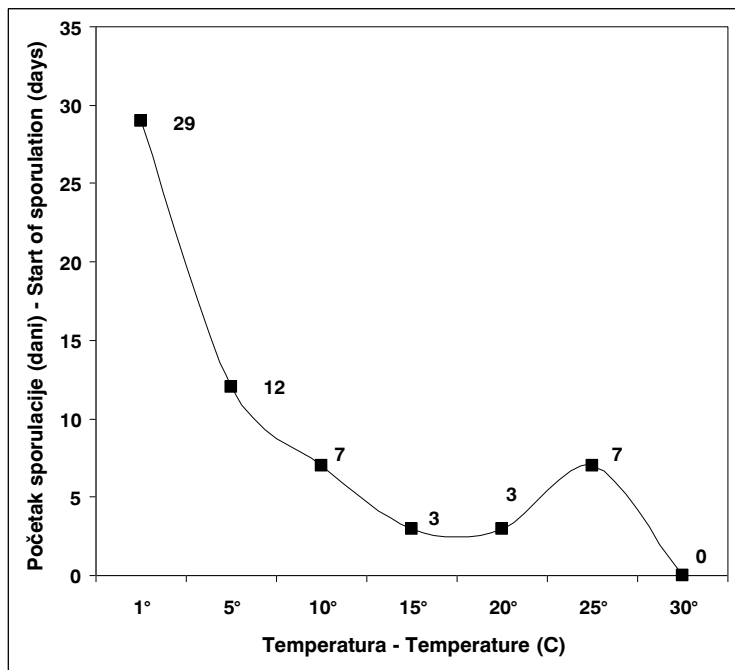
## REZULTATI I DISKUSIJA

Početak razvoja kolonija značajno zavisi od temperature gajenja (graf. 1). Ukoliko se temperatura snižava, početak rasta je sve kasniji. Tako, na 1°C početak rasta je tek posle 72 h, na 20°C i 25°C posle 22 h i 24 h, a na 30°C i višim temperaturama nema porasta kolonija. Ispitivane hranljive podloge (SA, KGA, OLJ) ne pokazuju uticaj na početak porasta kolonija *V. inaequalis* i u ovom pogledu kolonije se ponašaju isto na svim ispitivanim temperaturama.

Porast kolonija vrlo značajno zavisi od temperature i podloge na kojoj se patogen gaji, kao i njihove interakcije (tab. 1). Optimalne temperature za porast kolonija patogena se razlikuju u zavisnosti od korišćene podloge i iznose 15-25°C na SA, 15-20°C na OLJ i 20°C na KGA. Minimalna temperatura je oko 1°C, a maksimalna 27°C (graf. 2). Slične rezultate je saopštio Aderhold (1926, loc.cyt. Wiesmann, 1931), navodeći da je optimalna temperatura za porast gljive *V. inaequalis* oko 20°C. Ispitujući uticaj temperature na ispoljavanje bolesti koju prouzrokuje ovaj patogen Keitt i Jones (1943, loc.cyt. Mac Hardy, 1996) su saopštili rezultate sa kojima se u osnovi slažu rezultati ovih istraživanja.

Temperatura od 15°C najbolje diferencira razlike u porastu kolonija na korišćenim podlogama. Na ovoj temperaturi porast kolonija se značajno razlikuje u zavisnosti od korišćene podloge (26,7 mm na OLJ, 30,4 mm na KGA 36,6 mm na SA). Ovakvi rezultati razvoja patogena nisu utvrđeni pri temperaturi od 20°C i ostalim ispitivanim temperaturama.

Iz dobijenih rezultata vidi se da je najveća razlika u porastu kolonija, kada se uzmu u obzir sve ispitivane temperature, utvrđena na podlozi od krompira (KGA). Ostale dve ispitivane podloge (SA i OLJ) ne ispoljavaju ovakav efekat na porast kultura *V. inaequalis*. S druge strane, podloga od slada omogućila je



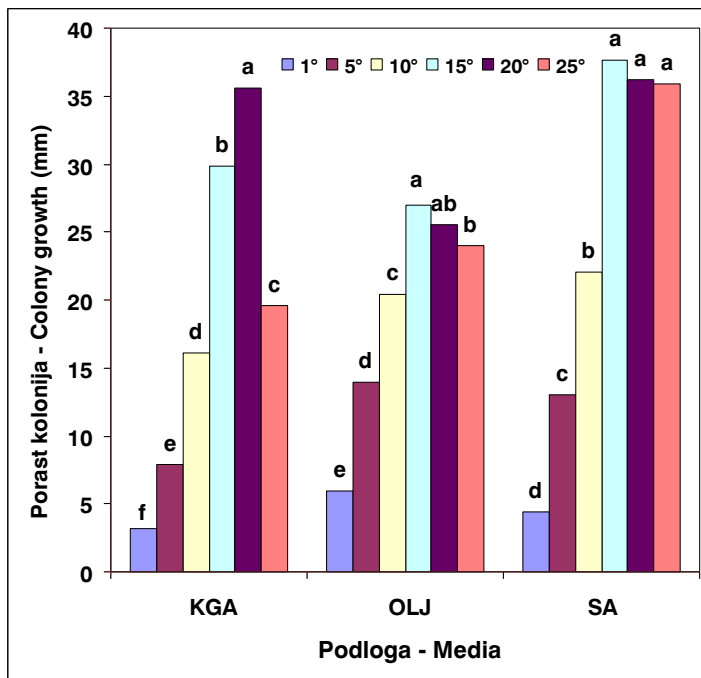
**Graf. 1.** – Početak porasta kolonija *V. inaequalis* na raznim temperaturama  
**Graph. 1.** – The start of development of *V. inaequalis* colonies at different temperature

ispoljavanje šireg spektra optimalnih temperatura za porast kolonija. To su temperature između 15° i 25°C i između njih se ne pojavljuju statistički značajne razlike u odnosu na ukupan porast kolonija. Na podlozi od odvarka lista jabuke, optimum za porast kolonija je između 15° i 20°C, dok je na podlozi od krompira, za porast gljive optimalna temperatura od 20°C. Upoređenjem konačnog porasta kolonija na pojedinim podlogama vidi se da je najbolji porast kolonija *V. inaequalis* postignut na podlozi od slada, a da je nešto slabiji porast na podlozi od krompira. Najslabije rezultate u pogledu uslova za porast kolonija pokazala je podloga od odvarka lista jabuke (OLJ). Rezultati ovih istraživanja slažu se sa rezultatima Borića i sardnika (1994) koji su ispitivali morfološke karakteristike izolata *V. inaequalis* i odgajivačke vrednosti osam hranljivih podloga, među kojima je najbolji rast kolonija postignut na krompir glukoza agaru - specijal. Slične rezultate saopštili su Putto i Chudhary (1987) koji su, ispitujući osam hranljivih podloga, ustanovili da je najbolja za razvoj gljive krompir glukozna podloga (KDA).

**Tabela 1.** Analiza varijanse uticaja temperature i podloge na porast kolonija *V.inaequalis*<sup>a</sup>**Table 1.** Analysis of variance for effect of temperature and media on colony growth of *V.inaequalis*<sup>a</sup>

Izvori varijacije Source of variation	Stepeni slobode Degree of fidom	Suma kvadrata Sum of squares	Sredina kvadrata Mean square	F
Blokovi -Blocks	4	24.47	6.12	1.14
Tretmani -Treatments	20	16221.27	811.06	
Temp.-Temps. (A)	6	14574.20	2429.03	451.15 **
Podloge- Media (B)	2	595.03	297.52	55.26 **
A X B	12	1052.04	87.67	16.28 **
Greška -Error	80	430.73	5.38	
Ukupno - Total	104	16676.46		

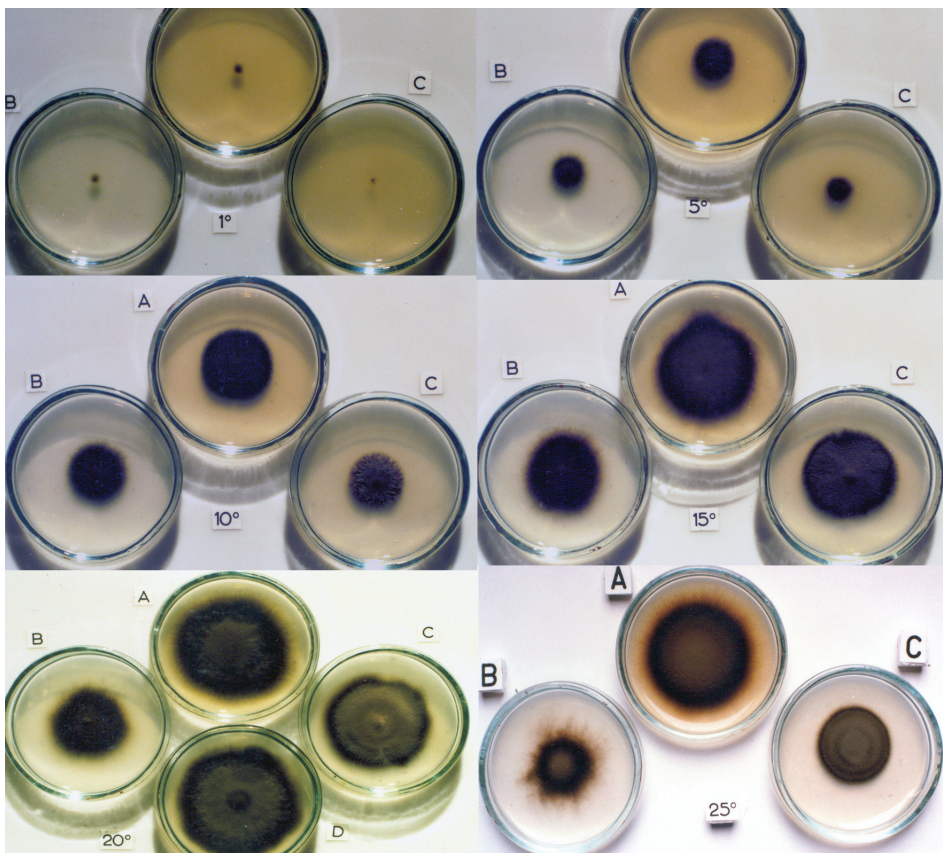
<sup>a</sup> Kolonije *V.inaequalis* na podlogama KGA, SA i OLJ su inkubirane na temperaturama 1, 5, 10, 15, 20, 25, i 30C u mraku tokom 42 dana – Colonies of *V.inaequalis* PDA, maltz agar and apple leaf decantion agar were incubated at 1, 5, 10, 15, 20, 25, and 30C in darkness for 42 days.

**Graf. 2.** – Porasta kolonija *V.inaequalis* na raznim temperaturama i tri podloge

**Graph. 2.** – Colony growth of *V.inaequalis* colonies at different temperature and three media



Temperatura utiče na izgled i strukturu kolonija *V.inaequalis* (sl. 1), što je najuočljivije na KGA. Na temperaturi od 1°C vazdušni deo kolonija je maslinastozelen, kružnog oblika sa jasno ograničenim ivicama, bez uočljivog ruba. Supstratni deo kolonija je za nijansu tamniji, kružnog je oblika i sa jasnom ivicom. Centralni deo kolonije nije izdignut. Na temperaturi od 5°C kolonije su kružnog oblika, ali za razliku od prethodne temperature imaju tamniji rub, širine oko 1 mm. Vazdušni deo kolonija je siv i somotaste građe sa neznatno izdignutim centralnim delom. Supstratni deo kolonija je tamno maslinast do mrk. Na teme-



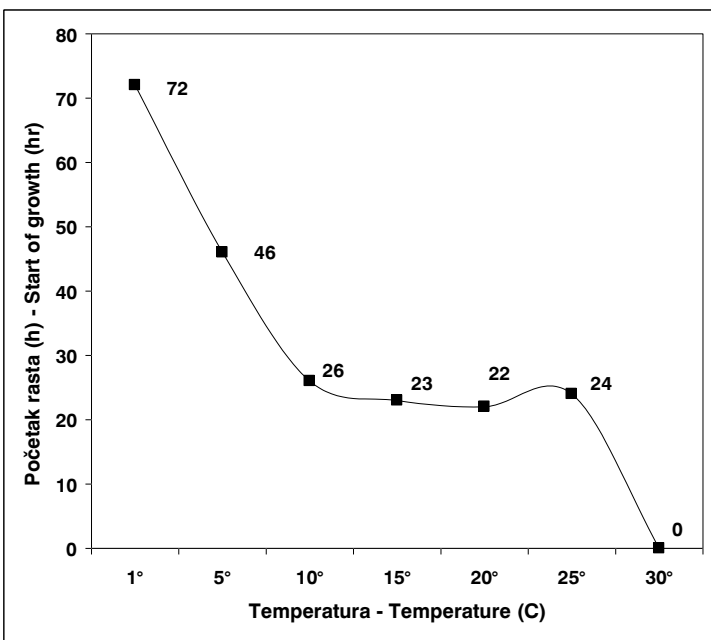
**Sl. 1.** *V.inaequalis*. - Porast kolonija na podlozi od slada (A), odvarka lista jabuke (B) i krompira (C) pri raznim temperaturama nakon 42 dana<sup>z</sup>.

**Fig. 1.** *V.inaequalis*. – Colony growth on malt agar (A), apple leaf decantion agar (B) and potatoe dextrose agar (C) at different temperatures after 42 days<sup>z</sup>.

<sup>z</sup> Na 20°C u ogled je uključena i podloga od ekstrakta slada (D). - Malt extract agar (D) was included in experiment at 20°C.

raturi od 10°C je vrlo uočljiva razlika u izgledu kolonija, koje su kružnog oblika sa nešto svetlijim rubom, širine oko 2 mm. Vazdušni deo kolonija je svetlo sive boje, somotaste strukture sa gušćom micelijom, a kolonije su reljefne po svojoj površini. Centralni deo kolonija je izdignut, a ivica je takođe reljefna (micelija po ivici grudvičastog izgleda). Supstratni deo kolonija u svom centralnom delu je mrk, a na periferiji svetliji, širine oko 3 mm. Na temperaturi od 15°C, za razliku od prethodne, vazdušni deo kolonija nije reljefan po površini, što je i najuočljivija razlika u odnosu na kolonije sa prethodne temperature. Centralni deo kolonija je blago izdignut, prečnika oko 2 mm. Supstratni deo kolonija je mrk bez naglašenog ruba. Na temperaturi od 20°C kolonije su nepravilno kružnog oblika sa talasastom ivicom i jasno izraženim tamnijim rubom, širine oko 3 mm. Vazdušni deo kolonija blago ispupčen u središnjem delu, a od kolonija sa prethodnih temperatura razlikuje je blago nijansiran tamniji prsten (u središnjem delu kolonije), prečnika oko 10 mm. Supstratni deo kolonija je tamno mrke boje sa svetlijim središnjim delom i tamnijim rubom širine oko 3 mm. Na temperaturi od 25°C, za razliku od prethodnih, uočljiva su 2 uska koncentrična prstena, za nijansu tamnije boje od ostalog dela kolonije, kao i uzak rub iste nijanse.

Početak sporulacije konstatovan je posle 29 dana od početka razvoja micelije na temperaturi od 1°C, na 5°C posle 12 dana, a na 10° i 25°C posle 7 dana. Temperature od 15° i 20°C su najpovoljnije za početak sporulacije, na kojima obrazovanje konidija počinje posle tri dana od početka razvoja micelije (graf. 3).



**Graf. 3.**

– Početak sporulacije kolonija *V. inaequalis* na raznim temperaturama

**Graph. 3.**

– The start of sporulation of *V. inaequalis* colonies at different temperature

Različite temperature utiču i na intenzitet sporulacije kolonija, odnosno na gustinu spora (u 1 ml suspenzije). Utvrđeno je da je intenzitet sporulacije najveći pri temperaturi od 15 °C, na podlozi od slada (166500 spora/ml). Sa snižavanjem temperature, rapidno opada i intenzitet sporulacije. Vrlo nizak intenzitet sporulacije utvrđen je i na temperaturi od 25 °C (tab. 2). Na temperaturi od 20 °C nema sporulacije ili je ona slaba, tako da na podlozi od malca iznosi svega 5625 spora/ml, dok na ostalim podlogama izostaje. Najmanje razlike u intenzitetu sporulacije pri pojedinim temperaturama razvoja patogena su na podlozi od krompira (KGA). Rezultati ovih istraživanja slažu se sa rezultatima koje je saopštio Ross (1974), prema kome je obrazovanje konidija optimalno pri temperaturi od 16 °C.

**Tabela 2.** Uticaj temperature i podloge na intenzitet sporulacije *V.inaequalis* u kulturi

**Table 2.** Effect of temperatures and media on sporulation of *V.inaequalis*

Temperatura Temperature °C	Broj konidija/ml (x 10 <sup>3</sup> ) na tri podloge <sup>z</sup> Number of conidia/ml (x 10 <sup>3</sup> ) on thre media		
	SA	OLJ	KGA
1°	0,312	0,625	7,187
5°	7,500	0,781	50,625
10°	10,312	1,250	96,400
15°	166,500	1,562	157,500
20°	5,625	0,000	0,000
25°	0,625	0,000	0,000

<sup>z</sup> SA = podloga od slada (maltz agar), OLJ = podloga od odvarka lista jabuke (apple leaf decantion agar), KGA=krompir glukozna podloga (potato dextrosa agar)

Najpogodnija podloga za sporulaciju je SA, a neznatno slabija sporulacija je na KGA. Ovi rezultati slažu se sa rezultatima Ross-a (1974) koji je ispitivao sporulaciju (produkciju konidija) *V. inaequalis* na veštačkim hranljivim podlogama i utvrdio da je gljiva na podlozi od slada davala stalno visok prinos konidija, a slične rezultate saopštili su Putto i Chudhary (1987).

## LITERATURA

- Arsenijević, M., Guberinić, Đ. (1989): Razvoj *Septocyta ruborum* (Lib.) Petr. (syn. *Rhabdospora ramealis*) Rob. Ex Desm. (Sacc) in vitro. Arhiv za poljoprivredne nauke, 50, 178.
- Borić, B. (1985a): Uticaj visokih temperatura na klijavost konidija *Venturia inaequalis* (Cooke) Winter. Zaštita bilja, 172:143-148
- Borić, B. (1985b): Uticaj temperature na klijavost spora *Venturia inaequalis* (Cooke) Winter i uticaj starosti na njihovu vitalnost. Zaštita bilja, 173:295-302
- Borić, B. (1985): Rast kultura i obrazovanje reproduktivnih organa *Pleospora herbarum* (Pers. ex Fr.) Rabenh. na različitim temperaturama i pH vrednostima. Zaštita bilja, 174:371-377.
- Borić, B., Draganić, M., Aleksić, G. (1994): Morfološke karakteristike izolata *Venturia inaequalis* sa teritorije Jugoslavije i odgajivačke vrednosti nekih hranljivih p odloga. Treći jugoslovenski kongres o zaštiti bilja (Zbornik rezimea (38), 48, Vrnjačka Banja).
- Backus, E.J., Keitt, G.W. (1940): Some nuclear phenomena in *Venturia inaequalis*. Bull. Torrey Botanical Club, 67: 765-770 (loc.cyt. MacHardy, 1996)
- Dhindra, D.D., Sinclair, B.J. (1985): Basic Plant Pathology Methods . CRC Press, Inc, Boca Raton, Florida
- Ivanović, M. (1992): Mikoze biljaka. Nauka, Beograd, 1-521
- Korhonen, K., Hintikka, V. (1980): Simple isolation and inoculation methods for fungal cultures. Karstenia 20: 19-22.
- MacHardy, E. W. (1996): Apple scab - biology, epidemiology and management. American Phytopathological Society, ST. Paul, Minnesota, 1-545.
- Mišić, P. (1967): Ispitivanje načina pripreme čiste kulture *Fusicladium dendriticum* (Walr.) Fck. I njegove primene u inokulaciji hibrida jabuke u fazi kotiledona. Ju. voćarstvo, 1, 40 -45.
- Mišić, P. (1994): Jabuka, Nolit, Beograd, 1-647.
- Moore, M.H. (1964): Glasshouse experiments on apple scab. I. Foliage infection in relation to wet and dry periods. Ann. Appl. Biol. 53: 423-435.
- Puttoo, B.L, Basu Chaudhary, K.C. (1987): Growth and sporulation of *Spilosea pomi* anamorph *Venturia inaequalis* on agar media. Proc. Nat. Acad. Sci., India. B., 57, N°3, 313-314.
- Ross, R.G. (1974): Conidium production of *Venturia inaequalis* in synthetic culture media. Can. J. Plant Sci. 54: 93-100.
- Sholberg, P.L., Yourston, J.M., Warnock, D. (1989): Resistance of *Venturia inaequalis* to Benomyl and Dodine in British Columbia, Canada. Plant Dis. Vol 73, No8, 667-669.

- Sholberg, P.L., Yourston, J.M. (1991): Phenotype Paterns of Benomyl-Resistant Isolates of *Venturia inaequalis* in Eight Orhards in British Columbia, Canada. *Plant Disease*, vol 75, No 6, 616-619.
- Stojanović, D. (1958): Prilog proučavanju biologije i mogućnosti suzbijanja *Venturia inaequalis* (Cke) Wint. *Zaštita bilja*, 45, 3-12.
- Studt, H.G., Wetzien, H.C. (1975): Der Einfluß der Umweltfaktoren Temperatur, relative Luftfeuchtigkeit und Licht auf die Konidienbildung beim Appfelschorf, *Venturia inaequalis* I (Cooke) Winter. *Phytopathol. Z.* 84: 115-130.
- Wallroth, F.G. (1833): *Cladosporium dendriticum* FL. *Crypt. Germ.*, 1:169 (loc.cyt. Mac Hardy, 1996).
- Wiesmann, R. (1931): Untersuchungen über Apfel und Birnenschopf-pilz *Fusicladium dendriticum* (Wallr.) Fekl. Und *Fusicladium pirinum* (Lib.) Fekl.sowie die Schorfanfälligkeit einzelner Apfel und Birnensorfen. *Landw. Jahrb. Schweiz.* 45: 109-156.

(Primljeno: 21.06.2007.)

(Prihvaćeno: 28.08.2007)

## **COLONY GROWTH AND SPORULATION OF *V. INAEQUALIS* AT DIFFERENT TEMPERATURES AND MEDIA**

GORAN ALEKSIĆ, SAŠA STOJANOVIĆ, MIRA STAROVIĆ,  
SLOBODAN KUZMANOVIĆ, NENAD TRKULJA  
Institute for Plant protection and Environment, Belgrade  
e-mail: algoran@sezampro.yu

The largest number of fungicide treatments in disease control of apple are realised against apple scab. However, a small number of available fungicides which were frequently used in increased doses caused the problems of less susceptibility of pathogen to applied fungicides.

The effect of different temperatures and media on pathogen colony growth and sporulation were investigated to find out the optimal conditions for pathogen development. The optimal temperature for colony growth was 15 °C - 20 °C, minimal around 1 °C, a maximal 27 °C. The most suitable medium for pathogen sporulation was malt agar, and insignificantly less suitable was PDA. Sporulation was the more abundant at 15 °C (1, 6 x 10<sup>5</sup> spora/ml).

*Key words:* apple, apple scab, *Venturia inaequalis*, growth, sporulation, temperature, media

(Received: 21.06.2007.)

(Accepted: 28.08.2007.)

Zaštita bilja  
vol. 56 (1-4), No 251-254, 87-105, 2005, Beograd

UDK 633.854.78-266  
Naučni rad

## DALJA PROUČAVANJA BAKTERIJE *PSEUDOMONAS MARGINALIS* PV. *MARGINALIS* UZROČNIKA CRNILA I VLAŽNE TRULEŽI STABLIJKE SUNCOKRETA

MOMČILO ARSENIJEVIĆ<sup>1</sup>, STEVAN MAŠIREVIĆ<sup>2</sup>, OLIVERA JOVANOVIĆ<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Poljoprivredni fakultet, Departman za zaštitu bilja, Novi Sad

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

<sup>3</sup>Viša politehnička škola, Beograd

Proučene su morfološke, patogene i bakteriološke karakteristike četiri izolata bakterije izolovane iz uzoraka obolelih stabljika suncokreta ispoljenih u vidu crnila i mrke truleži.

Bakterije sva četiri izolata štapićastog su oblika, asporogene, gramnegativne i polarnog rasporeda cilija. Na Kingovoj podlozi B stvaraju fluorescentni pigment, a na infiltriranom lišću ne prouzrokuju hipersenzibilnu reakciju (HR) duvana.

Osim stabljika suncokreta, krompira i paradajza, simptome tipa truleži uzrokuju i na inokulisanim kriškama mrkve, paštrnaka, lukovicama crnog luka, lišću kupusa i salate, cvastima karfiola, kao i na plodovima paprike i paradajza.

Sudeći na osnovu ovih odlika i biohemijsko-fizioloških karakteristika, proizlazi da proučavana bakterija izolovana iz obolelih stabljika suncokreta pripada rodu *Pseudomonas*, odnosno patogenu *Pseudomonas marginalis* (Brown) Stevens 1925, a najverovatnije patogenom varijetetu *P. marginalis* pv. *marginalis* (Brown) Stevens 1925.

*Ključne reči:* suncokret, bakterija, izolati, patogenost, bakteriološke odlike, *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis*.

### UVOD

Tokom 1988. i 1989. godine u nekoliko lokaliteta Banata u Vojvodini uočena je pojava crnila i truleži mladih stabljika suncokreta gradom oštećenih.

Analizom sakupljenih uzoraka dominirao je simptom razmekšavanja i dezorganizacije čvrstine kako spoljašnjeg tako i unutrašnjeg tkiva obolele stabljike, odnosno njene srži.



Kako slične promene mogu prouzrokovati činioci razne prirode, a naročito bakterija *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* Hauben et al. 1998 (raniji naziv: *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* /Jones/ Bergey et al., 1923) (Arsenijević, 1970; Arsenijević i Maširević, 1987, 1988) ili njoj srodna bakterija ovog roda (Arsenijević i sar., 1989), pristupili smo izolovanju i identifikaciji patogena pretpostavljajući da su bakterije te koje učestvuju u patogenezi bolesti ispoljene na obolelim stabljikama suncokreta.

Ovo tim pre, jer se pokazalo da se ovakva pojava na stabljici suncokreta uočava kod nas već duže vreme osobito posle gradobitne oluje i padavina. I to ne samo na mlađim nego i na starijim biljkama suncokreta (Arsenijević, 1970).

Proučavanjem sojeva bakterije izolovane iz obolelih stabljika mlađih biljaka suncokreta, o kojima je reč, ispostavilo se da ne pripadaju grupi *Erwinia* odnosno *Pectobacterium* nego rodu *Pseudomonas*.

Zbog toga ćemo se u daljem izlaganju zadržati na karakteristikama ove bakterije roda *Pseudomonas* izolovane iz natrulih stabljika suncokreta, pogotovo što se često pojavljuje i na povrću i od značaja je za povrtarske biljke uzrokujući trulež korena celera, paštrnaka, peršuna, lišća glavica salate, cvasti karfiola, brokolija, a i drugih vrsta (Bergey, 1986; Arsenijević, 1990, 1992, 1997; Arsenijević i Obradović, 1996; Arsenijević i sar., 1994, 1996, 1998; Jovanović, O. i Arsenijević, 1998; Obradović, 1999; Gavrilović i sar., 2001 i dr.).

## MATERIJAL I METODE

### Materijal

Obolele biljke sakupljene su u nekoliko navrata, obično posle grada kada se bolest i najčešće pojavljuje, dopremane su u laboratoriju i detaljno analizirane. Posmatran je kako njihov spoljašnji tako i unutrašnji izgled stabljike uočavajući promenu čvrstine, boje i konzistencije obolelog tkiva. Posle ovakvog pregleda vršena je priprema za izolovanje bakterija na unapred pripremljenoj mesopeptonskoj podlozi.

### Izolovanje bakterije

Posle površinskog premaza nekrotičnog tkiva obolelih stabljika alkoholom, u cilju otklanjanja njegove nepoželjne kontaminacije, uzdužnim presekom sterilnim skalpelom odvajani su oboleli delovi tkiva i poprečno saseceni na sterilnom filter papiru.



Tako pripremljeni delići tkiva postavljani su u sterilne porculanske avane pincetom napaljenom na plamenu špiritusne lampe. Uz dodatak sterilisane vode i tarenjem dezinfikovanim tučkom dobro su u avanu izgnječeni.

Dobijeni macerat sterilisanom bakteriološkom petljom zasejavan je razmazom preko površine podloge prethodno razlivena u Petri kutije i prosušene u sušnici 20 minuta pri 30°C.

Zasejane Petri kutije sa podlogom postavljene su u termostat pri 25°C radi razvoja maceratom nanetih bakterija.

Razvijene kolonije bakterija na oko interesantne i čiste presejavane su na koso mesopeptonsku (NA) podlogu s 2% glicerina (NAG), u cilju dobijanja čistih izolata i njihovog održavanja (Arsenijević, 1997).

Ovim postupkom izolovano je više sojeva bakterija od kojih su tokom daljeg istraživanja korišćena četiri: Su-134, Su-142, Su-150 i Su-182.

### **Provera patogenosti dobijenih izolata**

*Inokulacija biljaka suncokreta, paradajza, paprike, krompira i muškatle.*

Mlađe biljke suncokreta uzrasta 50 cm sa 5-8 razvijenih listova i sočnih dobro razvijenih stabljika, inokulisane su nanošenjem suspenzije bakterija koncentracije 10<sup>8</sup> CFU/ml ubodom u stabljiku laboratorijskom iglom prethodno uronjenu u suspenziju. Kao kontrola korišćena je destilovana voda i autentičan soj *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis* (Pm-3) izolovan iz paštrnka u SAD.

Inokulisana mesta na stabljici suncokreta obavijena su vlažnom vatom i staniol papirom radi održavanja potrebne vlažnosti. Vlažna vata i papir odstranjivani su posle nekoliko dana odnosno pri pojavi uvelosti lišća na inokulisanim biljkama, što pri višoj temperaturi obično traje četiri dana.

Istovetan postupak primenjen je i pri inokulaciji odraslih i dobro razvijenih biljaka paradajza, paprike, krompira i muškatle.

*Inokulacija nesazrelih plodova paradajza i paprike.*

Inokulisani plodovi ubodom korišćenjem suspenzije 10<sup>8</sup> CFU/ml izolata sa suncokreta i Pm-3 sa paštrnka postavljani su u vlažne klima komore do pojave nekroze tkiva, a onda su izneti na laboratorijske stolove radi praćenja daljih promena. Negativna kontrola i ovde je tretirana destilovanom vodom.

*Inokulacija kriški krompira, mrkve, paštrnka, lukovica crnog luka, lišća glavica kupusa i salate i cvasti karfiola.*

Inokulacija kriški ovih biljaka vršena je nalivanjem suspenzije bakterija ( $10^8$  CFU/ml) u otvore bušačem pripremane na centru kriški, a lišću ubodom u tkivo. Svi tretmani postavljeni su u poveće vlažne Petri kutuje do pojave truleži tkiva. I ovde je izolat Pm-3 korišćen kao pozitivna kontrola, a destilovana voda kao negativna.

### **Morfološke odlike bakterije**

Proučavane su pomoću običnog svetlosnog i elektronskog mikroskopa. Određivan je oblik bakterija, prisustvo ili odsustvo spora kao i raspored flagela koristeći uobičajene postupke (Klement et al., 1990; Arsenijević, 1992, 1997).

### **Odgajivačke karakteristike**

Praćene su posmatranjem razvoja i izgleda kolonija formiranih na mesopeptonskoj (NA) i mesopeptonskoj podlozi obogaćenoj sa 5% saharoze (Fahy i Persley, 1983). Prema ovim autorima određivan je i razvoj bakterija u tečnoj podlozi pri  $37^{\circ}\text{C}$  i u podlozi sa 5% NaCl.

Fluorescentnost bakterija određivana je na Kingovoj podlozi B, a ponašanje prema Gramu korišćenjem 3% KOH (Arsenijević i Jovanović, O., 1995).

### **Biohemijsko-fiziološka svojstva**

Stvaranje polisaharida levana, oksidaze, pektolitička aktivnost bakterija na kriškama krompira, formiranje arginin dehidrolaze i hipersenzibilne reakcije duvana (Lopat testovi) proučavano je prema Lelliott-u i Stead-u (1987).

A stvaranje katalaze, fosfataze i lecitinaze, amonijaka, sumporvodonika, indola, redukcija nitrata i razlaganje želatina kao i ugljenih hidrata (dulcita, glukoze, laktoze, manita, saharoze i sorbitola) prema Fahy-u i Persley-u (1983) i Klementu i sar. (1990) (ex: Arsenijević, 1997).

## REZULTATI

### Simptomi bolesti

Dosta podsećaju na promene tipa truleži stabljika suncokreta i krompira koje prouzrokuju bakterije grupe *Erwinia* podvrsta (subsp.) *carotovora* i *atroseptica* i vrste *E. chrysanthemi* (Arsenijević, 1990; Arsenijević i Maširević, 1987, 1988; Arsenijević i sar., 1989) odnosno roda *Pectobacterium* (Hauben et al., 1998).

Osnovni simptomatološki znak ispoljava se u vidu razmekšavanja i truleži stabljike koja postaje crne boje, gubi svoju čvrstinu usled dezorganizacije njenog tkiva, zbog čega se savija i poleže, suši se i kasnije potpuno izumire (sl.1).

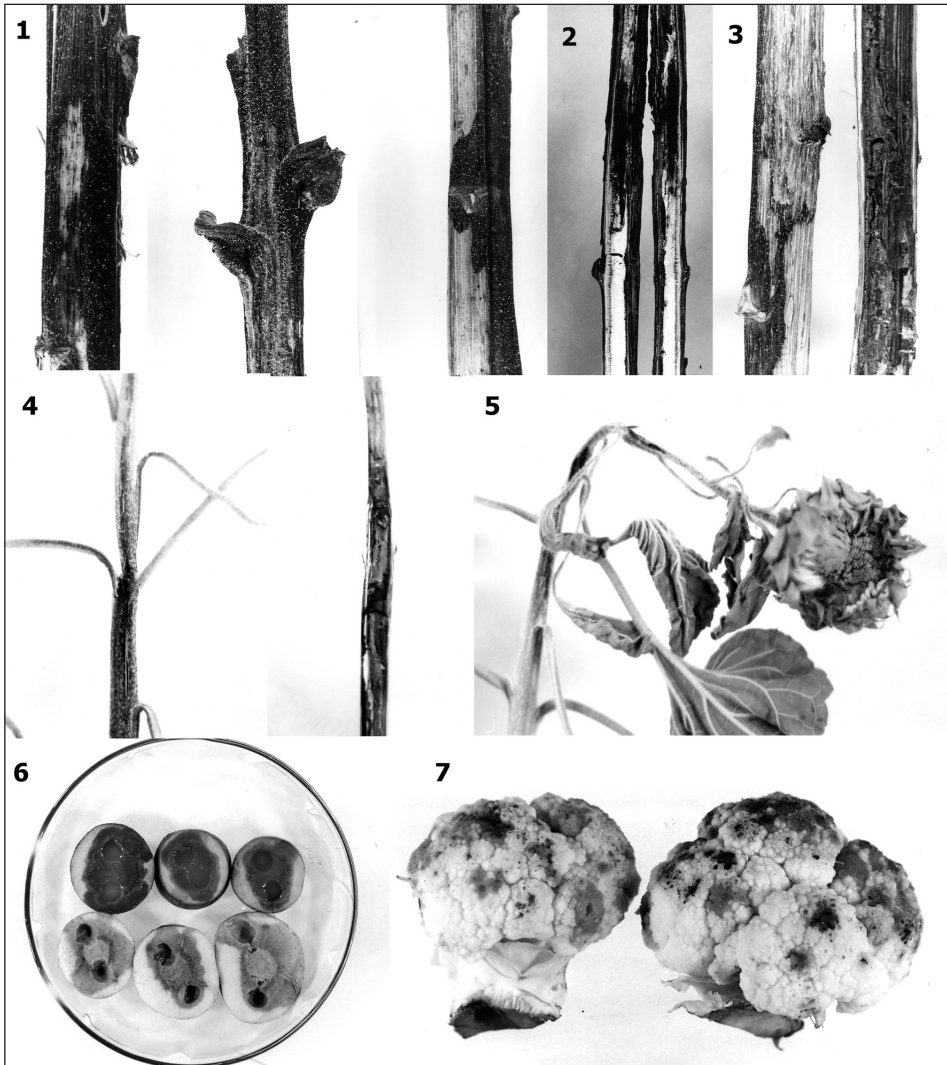
Uzdužnim ili poprečnim presekom sveže obolele stabljike suncokreta uočavaju se i promene njene srži koja umesto bele boje postaje mrka pa tamna, skoro crna. I obolelo tkivo srži takođe postaje sočno, mekano zahvaćeno procesom truleži i raspadanja (sl.2).

Ovako izmenjena srž kasnije se suši i skuplja postajući šupljikava jer se njeno tkivo mestimično nabora zbog čega i cela stabljika neispunjena svežom srži ostaje „prazna“ i šuplja neispunjena tkivom.

To je poslednja faza u patogenezi ove bakterioze kad se obolele stabljike potpuno sasušuju zadržavajući samo privremeno svoju crnu boju. Jer, ovako suve gube svoje prvobitno crnilo postajući svetlosive spolja posmatrane (sl.3).

Na kraju ovog patološkog procesa cela unutrašnjost obolele stabljike je u celosti šuplja, ostaju samo njeni čvrsti spoljni zidovi izrazito sive boje. Usled sasušenog tkiva i potpunog gubitka njegove svežine i vlažnosti, takve stabljike su neobično lagane bez one njihove uobičajene težine i izrazito su sive naoko posmatrane (sl.3).

Zbog svega napred navedenog i simptomatološke sličnosti koje bakterije roda *Erwinia* (*Pectobacterium*) i *Pseudomonas marginalis*, o kome je u ovome radu reč, uzrokuju i dijagnoza ove bolesti tipa truleži stabljike suncokreta vizuelno vršena je otežana. Zato, izolovanje patogena iz obolelog tkiva i određivanje njegovih osnovnih bakterioloških karakteristika, npr. izgled i boja kolonija, fluorescentnost na Kingovoj podlozi B, stvaranje ili odsustvo oksidaze, HR duvana i drugih testova je neophodno (Palleroni, 1984; Bradbury, 1986; Lelliott i Stead, 1987; Arsenijević, 1992, 1997).



*Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis*. **Sl.1** (a, b, c) – crnilo obolelih stabljika suncokreta (Prirodna zaraza); **sl.2** – izgled unutrašnjeg dela na uzdužnom preseku obolelih stabljika suncokreta, crna boja ukazuje na obolelu srž, bela predstavlja zdravu srž (Prirodna zaraza); **sl.3** – izbeljavanje spoljašnjeg površinskog tkiva i nestanak crnila na oboleloj stabljici (levo) i izgled stabljične srži na kojoj crna boja još ne iščezava (Prirodna zaraza); **sl.4** – izgled spoljašnjosti (levo) i unutrašnjosti (desno) mladih stabljika suncokreta veštački inokulisanih ubodom pomoću igle korišćenjem suspenzije bakterija  $10^8$  CFU/ml; **sl.5** – nekroza tkiva s pojavom mrkocrne boje na mestima inokulacije stabljike suncokreta izvršene suspenzijom bakterija  $10^8$  CFU/ml ubodom u tkivo pomoću igle; **sl.6** – razmekšavanje i trulež kriški mrkve (gore) i paštrnaka (dole) inokulisanih nalivanjem suspenzije bakterija u otvore tkiva prethodno pripremljenih; **sl.7** – mrkocrna trulež glavića karfiola inokulisanih suspenzijom bakterija ubodom pomoću igle (Orig.).

*Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis*. **Fig.1** (a, b, c) – blackness of sunflower stems diseased (Natural infection); **Fig.2** – view of inner part on longitudinal section through the sunflower stems diseased, black colour indicate on the pith diseased, white once represent healthy tissue respectively (Natural infection); **Fig.3** – bleaching of the outer, superficial tissue and disappear of the blackness on stem diseased (left) and view of stem pith on which the black colour still not disappear (Natural infection); **Fig.4** – view of outer (left) and inner part (right) of the young sunflower stems artificially inoculated by the pricking with the needle using bacterial suspension  $10^8$  CFU/ml; **Fig.5** – tissue necrosis with brown black colour appearance on the places of sunflower stems inoculated carried out by pricking using bacterial suspension  $10^8$  CFU/ml; **Fig.6** – softening and rotting of the carrot slices (above) and parsnip (down) inoculated by the pouring of bacterial suspension into the holes previously prepared; **Fig.7** – brown black rotting of cauliflower heads inoculated by pricking with the needle using bacterial suspension  $10^8$  CFU/ml (Orig.).

## Patogenost proučavanih sojeva

*Suncokret, paradajz, krompir, paprika, muškatla.*

Sva tri izolata prouzrokuju izrazite patološke promene na inokulisanom suncokretu koje se osobito pri višoj temperaturi uočavaju brzo, već posle 24-48 sati, a nakon četiri dana od inokulacije biljke venu.

Na stabljici spolja posmatrano zapaža se maslinastozelenkasta nekroza pokoričnog tkiva koja se prstenasto i duž stabljike širi i koja se jasno uočava naročito ako se epidermis odstrani. Tada se primećuje da nekroza zahvata i sudovno sprovodno tkivo stabljike dopirući sve do srži (sl. 4 i 5).

Stabljično tkivo oko inokulisane zone razmekšava se i truli, šireći se sve do srži koja se takođe razmekšava ispoljavajući simptome razmekšavanja i smežuravosti. Usled ovako ispoljene destrukcije tkiva stabljike i njene srži inokulisane biljke venu gubeći svoju čvrstinu (sl.5).

Slične promene na stabljici i srži nastaju i pri inokulaciji ubodom u stabljiku biljaka paradajza i krompira. Ali, pri tome promene tkiva su nešto svetlije.

Međutim, na inokulisanim stabljikama muškatile i paprike nisu uočene očekivane promene što se verovatno može objasniti izrazitom starošću biljaka korišćenih za inokulaciju, čije je stabljično tkivo zahvaćeno procesom lignifikacije uveliko očvrstlo.

*Plodovi paradajza i paprike.*

Na nesazrelim plodovima paradajza i paprike pojavljuje se nekroza i pegavost tkiva koja postepeno poprima karakter truleži koja se nešto sporije razvija.

### **Kriške krompira, mrkve, paštrnaka, lukovica crnog luka, lišće kupusa i salate, cvasti karfiola**

Na svim ovim kriškama nastaje proces truleži (sl.6) koja se brzo razvija zahvatajući je u celosti već posle 24-48 sati, ili nešto sporije kod crnog luka.

Na inokulisanom lišću kupusa i salate i cvastima karfiola (sl.7) inokulisanih ubodom razvijaju se mrke pege koje vremenom tamne postajući crne kad se tkivo razmekšava i truli, kako duž nerava tako i ono između njih (tab.1).

Na svim napred spomenutim biljkama (suncokretu, paradajzu, krompiru, paprici i muškatli), plodovima paradajza i paprike, kao i na kriškama krompira, mrkve, lukovica crnog luka i lišću kupusa i salate, kontrolni izolat Pm-3 (*P. marginalis* pv. *marginalis*) isto se ponaša kao i sva četiri naša soja (Su-134, Su-142, Su-150 i Su-182) poreklom sa suncokreta.



Isto tako kontrolni tretmani, u ogledima provere patogenosti proučavane bakterije, inokulisani destilovanom vodom bez ikakvih su promena (tab.1).

**Tab. 1.** Patogenost sojeva *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis* (Su-134, Su-142, Su-150, Su-182) poreklom sa natrulih stabljika suncokreta i obolelog paštrnaka (Pm-3).

**Tab. 1.** Pathogenicity of *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis* strains originated from sunflower stems rot (Su-134, Su-142, Su-150, Su-182) and diseased parsnip (Pm-3).

Test patogenosti na Pathogenicity tests on	Sojevi - Strains					Kontrola Check
	Su-134	Su-142	Su-150	Su-182	Pm-3	
<b>Mladim biljkama - Young plants of</b>						
suncokreta -sunflower	+	+	+	+	+	-
krompira - potato	+	+	+	+	+	-
paradajza - tomato	+	+	+	+	+	-
paprike - pepper	-	-	-	-	-	-
muškatle - pelargonium	-	-	-	-	-	-
<b>Nesazrelim plodovima - Unripe fruits of</b>						
paradajza - tomato	+	+	+	+	+	-
paprike - pepper	+	+	+	+	+	-
<b>Vlažna trulež - Soft rot of</b>						
kriški krompira - slices of potato	+	+	+	+	+	-
kriški mrkve - slices of carrot	+	+	+	+	+	-
kriški paštrnaka - slices of parsnip	+	+	+	+	+	-
lukovica crnog luka - onion bulbs	+	+	+	+	+	-
lišća kupusa - cabbage leaves	+	+	+	+	+	-
lišća salate - lettuce leaves	+	+	+	+	+	-
cveta karfiola - cauliflower flower	+	+	+	+	+	-

### Morfološke i odgajivačke odlike patogena

Posmatrane pod običnim svetlosnim mikroskopom, bakterije sva četiri proučavana izolata (Su-134, Su-142, Su-150 i Su-182) uočavaju se u vidu izduženih štapića; gramnegativne su i asporogene, polarnog rasporeda flagela pri mikroskopiranju elektronskim mikroskopom.

Na mesopeptonskoj podlozi (NA) formirane kolonije su žućkastokrem boje, manjeg obima, a na podlozi obogaćenoj s 5% saharoze su levan tipa: krupne, sluzaste, ispupčene, sjajne, glatke površine i okruglih ivica.

Na Kingovoj podlozi B stvaraju žućkasti difuzioni pigment koji fluorescira posmatran pod ultravioletnim (UV) svetlom; razvijaju se u tečnoj podlozi sa 5% NaCl ali ne i pri temperaturi od 37°C (tab.2).

### **Biohemijsko-fiziološke karakteristike**

Sva četiri naša izolata i kontrolni Pm-3 stvaraju levan, oksidazu, pektolitičkih su svojstava, proizvode arginin dehidrolazu i ne prouzrokuju hipersenzibilnu reakciju duvana. Prema tome, Lopat testovi imaju ove oznake: L(+), O(+), P(+), A(+), T(-), odnosno +,+,+,+,- (tab.2).

Što se tiče ostalih odlika naši sojevi sa suncokreta, kao i kontrolni Pm-3, stvaraju katalazu, fosfatazu, lecitinazu i amonijak, redukuju nitrate i razlažu želatin ali ne proizvode sumpor-vodonik ni indol niti razlažu skrob, ali hidrolizuju tvvin 80 (tab.2).

Sva četiri soja i Pm-3 kao izvore ugljenika koriste fruktozu, glukozu, manit, rafinozu, saharozu, sorbitol i trehalozu, ali ne i dulcitol, ni laktozu (tab.2). Ponašanje saharoze različito je prema pojedinim autorima (Fahy i Persley, 1983; Wimalajeewa i sar., 1987; Schaad, 1988 i dr.).

## **DISKUSIJA**

### **Opšte konstatacije**

Još davne 1988. i 1989. godine iz obolelih stabljika suncokreta ispoljenih u vidu vlažne truleži izolovana je fitopatogena bakterija identifikovana kao *Erwinia carotovora* (Jones) Bergey et al., 1923 prema tada važećoj nomenklaturi (Arsenijević, 1970). To je bio i prvi nalaz ovog parazita suncokreta uopšteno uzev.

Ova je bakterija i kasnije privlačila našu pažnju u nekoliko navrata (Arsenijević i Maširević, 1987, 1988) i to ne samo kao parazit suncokreta nego i raznih povrtnarskih biljaka: krompira, kupusa, salate, karfiola i drugih (Arsenijević, 1990; Arsenijević i sar., 1994, 1996; Arsenijević i Obradović, 1996; Obradović, 1996, 1999; Jovanović, O., 1998; Gavrilović i sar., 2001).

Istraživanja sojeva ove bakterije poreklom sa suncokreta iz nekadašnje Jugoslavije i SAD ukazala su na specifične karakteristike njene približavajući se tako više sojevima *E.carotovora* subsp. *atroseptica* nego podvrsti *E.carotovora* subsp. *carotovora*.

**Tabela. 2.** Bakteriološke karakteristike sojeva *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis* (Su-134, Su-142, Su-150, Su-182) poreklom sa natrulih stabljika suncokreta i referentnog soja (Pm-3) sa obolelog paštrnaka.

**Table. 2.** Bacteriological characteristics of *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis* strains (Su-134, Su-142, Su-150, Su-182) isolated from roted sunflower stems and referent strain (Pm-3) from parsnip.

Svojstvo - The property	Sojevi - Strains					Kontrola Check
	Su-134	Su-142	Su-150	Su-182	Pm-3	
boja kolonija - colony colour	ŽK	ŽK	ŽK	ŽK	ŽK	NCBD
oblik bakterija - bacterial shape	Š	Š	Š	Š	Š	NCBD
stvaranje spora - spore production	-	-	-	-	-	NCBD
reakcija prema Gram-u - Gram reaction	GN	GN	GN	GN	GN	NCBD
flagelacija - flagellation	P	P	P	P	P	NCBD
fluorescencija - fluorescence	+	+	+	+	+	NCBD
metabolizam glukoze - glucose metabolism	O	O	O	O	O	NCBD
levan - levan	+	+	+	+	+	NCBD
oksidaza - oxidase	+	+	+	+	+	NCBD
pektinaza - pektinase	+	+	+	+	+	NCBD
arginin dehidrolaza - arginine dihydrolase	+	+	+	+	+	NCBD
HR duvana - tobacco HR	-	-	-	-	-	NCBD
stvaranje katalaze - catalase production	+	+	+	+	+	NCBD
stvaranje fosfataze - phosphatase production	+	+	+	+	+	NCBD
stvaranje lecitinaze - lecithinase production	+	+	+	+	+	NCBD
stvaranje amonijaka - ammonium production	+	+	+	+	+	NCBD
stvaranje H <sub>2</sub> S - H <sub>2</sub> S production	-	-	-	-	-	NCBD
stvaranje indola - indole production	-	-	-	-	-	NCBD
hidroliza želatina - gelatin hydrolysis	+	+	+	+	+	NCBD
hidroliza skroba - starch hydrolysis	-	-	-	-	-	NCBD
hidroliza Tvina 80 - Tween 80 hydrolysis	+	+	+	+	+	NCBD
redukcija nitrata - nitrate reduction	+	+	+	+	+	NCBD
razvoj na podlozi sa 5% NaCl	+	+	+	+	+	NCBD
development on medium with 5% NaCl						
razvoj pri 37°C - growth at 37°C	-	-	-	-	-	NCBD
kiselina iz dulcita - acid from dulcitol	-	-	-	-	-	NCBD
kiselina iz fruktoze - acid from fructose	+	+	+	+	+	NCBD
kiselina iz glukoze - acid from glucose	+	+	+	+	+	NCBD
kiselina iz laktoze - acid from lactose	-	-	-	-	-	NCBD
kiselina iz manita - acid from mannitol	+	+	+	+	+	NCBD
kiselina iz rafinoze - acid from raffinose	+	+	+	+	+	NCBD
kiselina iz sorbitola - acid from sorbitol	+	+	+	+	+	NCBD
kiselina iz saharoze - acid from sucrose	+	+	+	+	+	NCBD
kiselina iz trehaloze - acid from trehalose	+	+	+	+	+	NCBD

Legenda: - = negativan rezultat, + = pozitivan rezultat, NCBD = nema razvoja kontaminirajućih bakterija u kontrolnim epruvetama na nezasejanoj podlozi, ŽK = žučkasto krem boja, Š = štapičast oblik, GN = negativna reakcija prema Gram-u, P = polarna flagelacija

Legend: - = negative result; + = positive result; NCBD = no contaminating bacteria development in check tubes on unsown medium, ŽK = yellowish cream, Š = rodshape, GN = Gram negative reaktion, P = polar flagellation

Analizom masnih kiselina ispostavilo se da bi sojevi *Erwinia carotovora* iz suncokreta mogli predstavljati i eventualno nov takson ove bakterije (Arsenijević i sar., 1989). Nažalost, ova istraživanja ni do današnjih dana nisu nastavljena iz više razloga.

Bakterija *P.c. spp. atroseptica* izolovana je i iz plodova paprike (Stommel i sar., 1996) i ukazano je na varijabilnost u pogledu patogenosti i agresivnosti sojeva različitog porekla (Smith i Burtz, 1990) što je i kod nas utvrđeno (Arsenijević i sar., 1998).

Nešto kasnije iz nekrotičnog tkiva stabljike i lišća suncokreta ispoljenog u vidu pegavosti izolovana je i kod nas proučena jedna druga nepektolitička bakterija predstavnik roda *Pseudomonas* identifikovana kao *Pseudomonas syringae* pv. *helianthi* (Kawamura 1934) Young Dye et Wilkie 1978 takođe nedovoljno proučavana i malo poznata u svetu (Arsenijević i Maširević, 1989, 1995; Arsenijević i sar., 1989, 1994, 1995).

Međutim, tokom 1988. i 1989. godine iz tkiva obolelih stabljika mlađih biljaka suncokreta koje su ispoljavale simptome crnila i vlažne truleži izolovana je i treća bakterija pripadnik rodu *Pseudomonas* pektolitičkih svojstava o čemu je i reč u ovome radu (Arsenijević i Maširević, 1996).

### Polifagnost bakterije

Ispostavilo se naime, da su proučavani sojevi ove treće bakterije člana roda *Pseudomonas* izrazito polifagnog karaktera parazitirajući u uslovima veštačke inokulacije osim stabljika suncokreta još i stabljike paradajza i krompira uzrokujući razmekšavanje i trulež ne samo stabljika nego i njihovih srži.

Ovi sojevi, poreklom sa suncokreta uzrokuju i trulež inokulisanih kriški raznog povrća: krompira, mrkve, lukovica crnog luka, lišća kupusa i salate, cvasti karfiola, kao i plodova paradajza i paprike (tab.1).

### Morfološke, odgajivačke i biohemijsko-fiziološke odlike

Četiri naša proučavana soja izolovana sa obolelih stabljika suncokreta (Su-134, Su-142, Su-150 i Su-182) kao i kontrolni Pm-3 (*Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis*) poreklom sa paštrnaka u potpunosti su istih karakteristika (tab. 1 i 2).

Svi su štapičastog oblika, asporogeni, gramnegativni i polarnog rasporeda flagela; fluorescentni i bleđučkastih kolonija razvijenih na podlozi.

U pogledu Lopat testova ispoljavaju ove karakteristike: +,+,+,- odnosno L(+), O(+), P(+), A(+), T(-). Jer, stvaraju levan, oksidazu, pektolitičke su aktivnosti, proizvode arginin dehidrolazu i ne prouzrokuju hipersenzibilnu reakciju duvana (tab.2). Odnosno ++++V (Schaad, 1988; Schaad i sar., 2001). Jer, HR du-

vana varijabilna je (Fahy i Persley, 1983; Palleroni, 1984; Bradbury, 1986; Lelliot i Stead, 1987; Arsenijević, 1990, 1992, 1997; Obradović, 1999 i dr.).

Što se njihovih ostalih karakteristika tiče stvaraju katalazu, fosfatazu, lecitinazu i amonijak, redukuju nitrate i razlažu želatin; ne proizvode sumpor-vodonik ni indol, niti razlažu škrob, ali hidrolizuju tvín 80 (tab.2).

Sva četiri naša soja i kontrolni Pm-3 koriste glukozu, fruktozu, manit, rafinozu, saharozu, sorbitol i trehalozu, ali ne i dulcitol ni laktozu (tab.2), mada ima i suprotnih rezultata što se nekih ugljenih hidrata tiče. Ponašanje saharoze npr. (Fahy i Persley, 1983; Wimilajeewa i sar., 1987; Schaad, 1988 i dr.).

### Identifikacija patogena

Sudeći na osnovu postignutih rezultata, a naročito polifagnosti bakterije i njene pektolitičke aktivnosti u odnosu na brojne biljke domačine, karakteristika Lopat testova proizlazi da sva četiri naša proučavana soja izolovana iz obolelih stabljika suncokreta pripadaju grupi IVa pektolitičkih bakterija roda *Pseudomonas* (Lelliot i Stead, 1987) odnosno rRNA grupi I ovog roda, tj. biološkom varijetetu II bakterije *Pseudomonas fluorescens* (Fahy i Persley, 1983; Palleroni, 1984; Bradbury, 1986; Lelliott i Stead, 1987; Schaad, 1988; Arsenijević, 1992, 1997), tj. bakteriji *Pseudomonas marginalis* (Brown) Stevens 1925; najverovatnije patogenom varijetetu *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis* (Brown) Stevens 1925 s kojim ispoljava najveće sličnosti.

### Ostala razmatranja

To što neki sojevi ove bakterije izolovani s raznih domaćina ispoljavaju razlike u pogledu parazitizma nekih inokuliranih biljaka kao i razlike fenotipskih karakteristika bakterije (Tsuchiya i sar., 1979, 1980, 1982; Wimilajeewa i sar., 1987; Babelegoto et al., 1989; ex RPP, vol.70, No.10, 1991; 1989; Arsenijević, 1990; Arsenijević i Maširević, 1996; Obradović, 1999) može se objasniti heterogenošću populacije različitog spektra virulentnosti patogena koja u prirodi verovatno postoji. Zbog toga nam se i čini da je imenovanje *P.marginalis* pv. *alfalfae* (Shinde et Lukezic) Young, Dye i Wilkie 1978 parazita lucerke i *P.m.pv.pastinacae* (Burkholder) Young, Dye et Wilkie 1978 patogena paštrnaka (Bradbury, 1986; Arsenijević, 1992, 1997) kao posebnih taksona diskutabilno, mada se Kersters i sar. (1996), Schaad i sar. (2001), kao i drugi autori ranije, za ovu taksonomsku podjelu zalažu.

U svakom slučaju molekulsko-genetska istraživanja koja bi usledila ukazala bi na srodnost i taksonomske razlike između ova dva patogena varijeteta i trećeg

*P.m.pv.marginalis* koje bi eventualno postojale što se bakterije *Pseudomonas marginalis* tiče.

I ne samo to, nego se u poslednje vreme sve više pažnje poklanja etiološkim i molekulske genetskim proučavanjima bakterija izolovanih iz obolele srži stabljike paradajza i taksonomskoj analizi populacije *P.fluorescens* kao uzročnika ove pojave (Catara i sar., 2002).

Naime, imenovana je tako i nova vrsta *Pseudomonas mediterranea* sp.nov. prouzročivač nekroze srži stabljike paradajza i izvršena revizija populacije *P.corrugata* (Demir, 1990; Catara i sar., 2002; Saygili i sar., 2004; Basim i sar., 2005 i dr.).

Koliko nam je iz literature poznato (Bradbury, 1986) suncokret se navodi kao domaćin bakterije *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis*. Ali, sojevi ovog patovara poreklom sa suncokreta, izgleda, da nisu posebno proučavani. To je i bio osnovni razlog što smo naša četiri izolata deponovali 1995. godine u Međunarodnu kolekciju mikroorganizama u Novom Zelandu (International Collection of Microorganisms from Plants /ICMP/, Private Bag, Auckland, New Zealand, DSIR Mt Albert Research Centre): Su-134 (ICMP-12345), Su-142 (ICMP-12346), Su-150 (ICMP-12347) i Su-182 (ICMP-12348).

I na kraju, neki preliminarni rezultati istraživanja, skoro informativnog karaktera, sojeva bakterije *Pseudomonas marginalis* poreklom sa natrulih stabljika suncokreta izolovanih u Novom Sadu, saopšteni su u Kini na Međunarodnoj konferenciji o suncokretu održane 1996. godine, Beijing / Shenyang, China, 12-20 June 1996 (Arsenijević i Maširević, 1996).

## LITERATURA

- Arsenijević, M. (1970): A bacterial soft rot of sunflower (*Helianthus annuus* L.). Acta Phytopath. Acad. Sci. Hung., 5 (2-4): 317-326.
- Arsenijević, M. (1990): Bakterije prouzročivači truleži glavica karfiola i salate u Jugoslaviji. Zaštita bilja 191: 21-29, Beograd.
- Arsenijević, M. (1992): Fitopatogene bakterije. Naučna knjiga, Beograd, pp.166.
- Arsenijević, M. (1997): Bakterioze biljaka. III izmenjeno i dopunjeno izdanje. SPrint, Novi Sad, pp.576.
- Arsenijević, M., Đurišić, S., Ištvan Melinda, Gajić Olivera (1994): Karakteristike sojeva *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* i *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* izolovanih iz obolelih stabljika i krtola krompira. Zaštita bilja 207: 27-39, Beograd.
- Arsenijević, M., Gudmestad, N.C., Maširević, S. (1989): Characteristics of some *Erwinia* soft rot strains. Proc. 7<sup>th</sup> Inter. Conf. Plant Path., Bact., Budapest, Hungary, 1989 (Plant Pathogenic Bacteria, ed. Z. Klement): 761-766.



- Arsenijević, M., Jovanović Olivera (1995): Nov postupak razlikovanja bakterija po Gramu. *Zaštita bilja* 211: 57-62, Beograd.
- Arsenijević, M., Jovanović Olivera, Maširević, S. (1995): *Pseudomonas syringae* pv. *helianthi* parazit stabljike i lisne peteljke suncokreta. *Zaštita bilja* 214: 273-284, Beograd.
- Arsenijević, M., Maširević, S. (1987): Etiologija bakterijske truleži suncokreta. *Glasnik zaštite bilja* 6: 211-217, Zagreb.
- Arsenijević, M., Maširević, S. (1988): Bacterial parasites of sunflower (*Helianthus annuus* L.) in Yugoslavia. Proc. 12<sup>th</sup> Inter. Sunflower Conf. II, 145-149, Novi Sad, Yugoslavia, 1988.
- Arsenijević, M., Maširević, S. (1989): Bacterial Leaf Spot and Blight of Sunflower Caused by *Pseudomonas syringae* pv. *helianthi* in Yugoslavia. *Plant Diseases* (Abstr.) 73: 368.
- Arsenijević, M., Maširević, S. (1995): Bacterial stem spot of Sunflower. Breeding and cultivation of wheat, sunflower and legume crops in the Balkan countries. Institute for Wheat and Sunflower, Gen. Toshevo, Agricultural Academy, Sofia; Union of scientists, Dobrich (1995).
- Arsenijević, M., Maširević, S. (1996): Bacterial soft rot of sunflower stem pith. Proceedings of 14<sup>th</sup> International Sunflower Conference. Beijing/Shenyang, China, 12-20 June 1996 (*Plant Pathology*): 771-776.
- Arsenijević, M., Obradović, A. (1996): Occurrence of bacterial wilt and soft rot of seed cabbage plants (*Brassica oleracea* var. *capitata*) in Yugoslavia. *Journal of Phytopathology* 144: 315-319.
- Arsenijević, M., Obradović, A., Jovanović Olivera (1998): Pathogenic and biochemical differentiation among *Erwinia* soft rot strains originated from various hosts. *Plant Pathogenic Bacteria. Proceedings of the 9<sup>th</sup> International Conference*, 26-29 August, Madras, India, pp.81-88.
- Arsenijević, M., Trkulja, V., Mitrović, P. (1996): Bakterijska trulež glavica kupusa. *Zaštita bilja* 218: 301-311, Beograd.
- Arsenijević, M., Vennete, J., Maširević, S. (1989): Pathogenic and Physiological Properties of *Pseudomonas syringae* pv. *helianthi*. Proc. 7<sup>th</sup> Inter. Conf. Plant Path., Bact., 11-16 June, Budapest, Hungary, 1989 (*Plant Pathogenic Bacteria*, ed. Z. Klement): 521-526.
- Arsenijević, M., Vennete, J., Maširević, S. (1994): *Pseudomonas syringae* pv. *helianthi* Kawamura 1934) Dye, Wilkie et Young 1978, a Pathogen of Sunflower (*Helianthus annuus* L.). *J. Phytopathology* 142: 199-208.
- Babelegoto, N.M., Siniscalco, A., Ciccamesse, F. (1989): Un marciume molle della cicoria (*Cichorium intybus* L.) causato da *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis* (Brown) Stevens. *Difesa delle Piante* 12 (1-2): 133-138 (A soft rot of chicory /*Cichorium intybus* L./ caused by *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis* (Brown) Stevens. (In RPP, vol.70, No.10, 1991).

- Basim, H., Basim, S., Yilmaz, S., Ilkucan, M. (2005): First report of pith necrosis of tomato caused by *Pseudomonas mediterranea* in Turkey. *Plant Pathology* 54: 240.
- Bradbury, J.F. (1986): *Guide to Plant Pathogenic Bacteria*. C.A.B. International Mycological Institute, pp. 329, England.
- Catara, V., Surra, L., Morineau, A., Achouok, W., Christan, R., Gardan, L. (2002): Phenotypic and genomic evidence for the revision of *Pseudomonas corrugata* and proposal of *Pseudomonas mediterranea* species sp.nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52: 1749-1758.
- Demir, G. (1990): The occurrence of *Pseudomonas corrugata* on tomatoes in Turkey. *Journal of Turkish Phytopathology* 19: 63-70.
- Fuhy, P.C., Persley, G.H. (1983): *Plant Bacterial Diseases*. Academic Press, Sydney, Australia, pp. 393.
- Gavrilović, V., Obradović, A., Arsenijević, M. (2001): Bacterial Soft Rot of Carrot, Parsley and Celery. S. H. De Boer (ed.), *Plant Pathogenic Bacteria*: 269-271. Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands.
- Hauben, L., Moore, E., Vauterin, L., Steenackers, M., Mergaert, J., Verdonck, L., Swings, J. (1998): Phylogenetic position of phytopathogens within the enterobacteriaceae. *Systematic and Applied Microbiology* 21: 384-397.
- Jovanović Olivera (1998): Biohemijsko-fiziološke karakteristike bakterija grupe „*Erwinia carotovora*“ različitog porekla. *Zaštita bilja* 224: 169-180, Beograd. (Deo doktorke disertacije odbranjene na Poljoprivrednom fakultetu u Zemunu, 1997).
- Jovanović Olivera, Arsenijević, M. (1998): Bacteriological Characteristics of Some Yugoslavian *Erwinia* Soft Rot Strains Originating from Lettuce Head Leaves. *Acta Phytopathologica and Entomologica Hungarica* 33 (3-4), pp. 239-244. *Académiai, Kiadó, Budapest*.
- Kerstens, K., Ludwig, W., Vancanneyt, M., De Vos, P., Gillis, M., Schleifer, K.H. (1996): Recent Changes in the Classification of the *Pseudomonas*: an Overview. *System. App. Microbiol.* 19: 465-477.
- Klement, Z., Rudolph, K., Sands, D.C. (1990): *Methods in Phytobacteriology*. *Académiai Kiadó, Budapest, Hungary*, pp. 568.
- Lelliott, R.A., Stead, D.E. (1987): *Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants*. British Society for Plant Pathology, Blackwell Scientific Publications. Oxford, London and Edinburgh, pp. 216.
- Obradović, A. (1996): Patogene i biohemijsko-fiziološke karakteristike bakterija grupe „*Erwinia carotovora*“ parazita krompira. *Zaštita bilja* 215: 57-70, Beograd. (Magistarska teza, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad, 1994).
- Obradović, A. (1999): Identifikacija bakterija rodova *Pseudomonas* i *Erwinia* patogena salate i karfiola. *Zaštita bilja* 227: 9-60, Beograd. (Doktorska disertacija, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad, 1998).

- Palleroni, N.J. (1984): Genus I. *Pseudomonas* Migula 1894, pp. 141-199; *Pseudomonas fluorescens* p. 165. In: Bergey's manual of systematic bacteriology (N.R. Krieg and J.H.Holt, eds.), Vol.1. The Williams and Wilkins Co, Baltimore.
- Saygili, H., Aysan, Y., Sahin, F., Ustun, N., Mirik, M (2004): Occurrence of pith necrosis caused by *Pseudomonas fluorescens* on tomato plants in Turkey. *Plant Pathology* 53: 803.
- Shaad, N.W. (1988) ed.: *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. APS Press. The American Phytopath. Society, St.Paul, Minnesota. 2nd Edition, pp. 158(65).
- Shaad, N.W., Jones, J.B., Chun, W. (2001 Eds): *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. Third Edition APS PRESS. The American Phytopath. Society, St.Paul, Minnesota, pp. 158 (65).
- Smith, C., Burtz, J.A. (1990): Variation in the pathogenicity and aggressiveness of the strains of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* isolated from different hosts. *Plant Dis.* 74: 505-509.
- Stommel, J.R., Goth, R.W., Heynes, K.G. (1996): Pepper (*Capsicum annuum*) Soft Rot Caused by *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *Plant Disease* 80: 1109-1112.
- Tsuchiya, Y., Ohata Kan-ichi, Azegami, K. (1982): Pathogenicity of the Causal Bacteria of Rot of Lettuce, *Pseudomonas cicchorii*, *Ps. marginalis* pv. *marginalis* and *Ps. viridiflava* to Various Weeds. *Bulletin of the National Institute of Agricultural Sciences, Series C No. 361* (February, 1982): 41-59 (Ibaraki, Japan).
- Tsuchiya, Y., Ohata Kan-ichi, Jemura, H., Sanematsu, T., Shirata, A., Fujii, H. (1979): Identification of Causal Bacteria of Head Rot of Lettuce. *Bulletin of the National Institute of Agricultural Sciences. Series C No. 33: 77. 99* (Ibaraki, Japan).
- Tsuchiya, Y., Ohata Kan-ichi, Shirata, A. (1980): Pathogenicity of the Causal Bacteria of Head Rot of Lettuce, *Pseudomonas cicchorii*, *P. marginalis* and *P. viridiflava* to Various Crop Plants. *Bulletin of the National Institute of Agricultural Sciences. Series C No. 34* (January, 1980): 51-73 (Ibaraki, Japan).
- Wimilajeewa, D.L.S., Hallam, N.D., Hayward, A.C., Price, T.V. (1987): The Etiology of Head Rot Disease of Broccoli. *Australian Journal of Agricultural Research* 38: 735-742.

(Primljeno: 05.06.2007.)

(Prihvaćeno: 28.08.2007.)

**FURTHER INVESTIGATIONS OF THE BACTERIUM *PSEUDOMONAS MARGINALIS* PV. *MARGINALIS* CAUSAL AGENT OF BLACKNESS AND SOFT ROT OF SUNFLOWER STEM**

M. ARSENIJEVIĆ<sup>1</sup>, S. MAŠIREVIĆ<sup>2</sup>, OLIVERA JOVANOVIĆ<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Agriculture, Department of Plant Protection, Novi Sad

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

<sup>3</sup>Higher Polytechnical School, Belgrade

Correspondence: M. Arsenijević, e-mail: [marsa@neobee.net](mailto:marsa@neobee.net)

### Summary

Many bacterial strains were isolated from sunflower plants diseased expressing typical stem rot symptom. The outer part of the stem diseased was olive black and inner once brown to black (Figs 1-3).

The plant stems lost their hardness and the pith became softening and later swelling and dry. The plants diseased bends and lays down and died.

Among the strains isolated four of them (Su-134, Su-142, Su-150 and Su-182) were studied in regarding to their pathogenicity, cultural, morfological and biochemical-physiological characteristics paralelly with reference strain of *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis* (Pm-3) originated from parsnip diseased (Tables 1 and 2).

It was shown that their properties were the same in all respects investigated.

All the strains studied form yellowish cream colonies on NA and King's medium B. The bacteria were gramnegative, asporogenous, rodshaped with polar flagella arrangement (Table 2). They fluorence on King's medium B forming levan type colonies.

By artificial inoculations of sunflower plants by pricking into the stems using bacterial suspension  $10^8$  CFU/ml the disease was reproduced (Figs 4 and 5).

Simmilar symptoms appeared on potato and tomato plants inoculated. No symptoms appeared on check plants using sterile water for stems inoculation.

All strain investigated express pectolytic activity on potato slices and other ones (carrot, parsley and parsnip cabbage, slices and on potato and tomato fruits as well as on lettuce and cabbage leaves).

Oxidase, arginine dihydrolase production were positive but tobacco HR negative. Therefore, Lopat test showed these characteristics: (++++-).

Glucose metabolism, catalase, phosphatase, lecithinase, ammonium production and nitrate reduction were positive. Gelatin and Tween 80 hydrolysis were positive and starch negative. Indol and H<sub>2</sub>S production were negative (Table 2).

The strains growth at 37°C were negative and development in liquid media with 5% NaCl positive (Table 2).

They utilised fructose, glucose, mannitol, raffinose, sorbitol and sucrose but not dulcitol nor lactose (Table 2).

On the basis of the results obtained it was concluded that our sunflower soft rot strains investigated belongs to the fluorescent, pectolytic bacterium of the genus *Pseudomonas* (group IVa), i.e. to *Pseudomonas marginalis* (Brown) Stevens 1925 (Section I, rRNA group I of the genus *Pseudomonas* biovar II of *Pseudomonas fluorescens* /Trevisan/ Migula 1895 bacterium respectively). The most probably to *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis* (Brown) Stevens 1925 towards to whom express many similarity (Palleroni, 1984; Bradbury, 1986; Lelliott i Stead, 1987; Arsenijević, 1992, 1997).

Four strains of this sunflower soft rot bacterium (*Pseudomonas marginalis*) were deposited in International Collection of Microorganisms from Plants (ICMP), Private Bag, Auckland, New Zealand, DSIR Mt Albert Research Centre in 1995 under the follows signs and numbers: Su-134 (ICMP-12345), Su-142 (ICMP-12346), Su-150 (ICMP-12347) and Su-182 (ICMP-12348).

*Key words:* sunflower, bacterium, isolates, pathogenicity, bacteriological properties, *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis*.

(Received: 05.06.2007.)

(Accepted: 28.08.2007.)





Zaštita bilja  
vol. 56 (1-4), No 251-254, 107-, 2005  
Beograd

UDK 631.53.027.2  
635.25-295.2  
Naučni rad

## **EFIKASNOST NOVIJIH FUNGICIDA ZA ZAŠTITU SEMENSKOG CRNOG LUKA OD PATOGENA *PERONOSPORA DESTRUCTOR***

TANAS TRAJČEVSKI  
Zemjodjelski institut, Skopje

U toku 2006. i 2007. godine vršena su ispitivanja prisutnosti patogena *Peronospora destructor* (Berk.) Caspary ex Berk na crnom luku u Republici Makedoniji, osobito na crnom luku za seme u OPO Butel u Skoplju, ispitivalana je i efikasnost novijih fungicida za zaštitu crnog luka od ovog parazita.

Izvršenim ispitivanjima u 2006 godini utvrđeno je da su veći indeks efikasnosti pokazali fungicidi : Acrobat MZ sa 90,99%, Galben-C sa 90,91%, Ridomil gold MZ sa 88,69%. i Kocpin WP sa 88,34%. Pri ispitivanjima u 2007 godini indeks efikasnosti je bio veći zbog viših temperatura i manje padavina , što je bilo nepovoljno za razvoj i širenje ovog patogena. U 2007 godini najveći indeks efikasnosti pokazali su fungicidi: Galben-C sa 94,43%, Acrobat MZ sa 91,67%, Kocpin WP sa 89,03%, Ridomil gold MZ sa 88,97%.

Drugi ispitivani fungicidi imali su nešto manji indeks efikasnosti u poređenju sa predhodno navedenim fungicidima.

*Ključne reči: Peronospora destructor, crni luk, fungicidi, efikasnost, zaštita.*

### **UVOD**

Crni luk se dosta gaji u Republici Makedoniji, pri čemu su zastupljene različite sorte i hibridi. Mladi crni luk za salatu najviše se gaji u Bašinom selu u okolici Velesa. Rane sorte luka tipa srebrenjaka najviše se gaje u okolini Đevđelije, i u okolini Skoplja. Kasne sorte crnog luka se gaje najviše u selu Bučin u okolini Kruševa, kao i u okolini Gostivara. Sorte crnog luka spljesnute forme, takozvane "pogačare", za konzumaciju u zimskom periodu najviše se gaje u okolini Svetog

Nikole. Redovno prisutan parazit na crnom luku koji može uzrokovati velike štete je *Peronospora destructor* (Berk.) Caspary ex Berk (sinomim *Peronospora shleideni* Ung.) - uzročnik plamenjače, značajan parazit crnog luka u mnogim zemljama sveta (Lorbeer and Andaloro, 1984). Parazit je naročito štetan na luku pri proizvodnji semena. Semenski usev luka je dvogodišnji i je izvor je zaraže drugih lukova. Redovna pojava ovog patogena je problem koj traži pravilna rešenja i pri organskoj poroizvodnji crnog luka (Kotoet i Fisher, 2004). Pored primene preventivnih mera za zaštitu od ovog patogena, kao što plodored i odstranjivanje biljnih ostataka, takođe je važno odstranjivanje korova u usevu, prostorna izolacija između arpadžika, luka za glavice i leja sa rasadom, izbegavanje gajenja luka na površinama gde je slaba cirkulacija vazduha, gajenje luka na ocednom tlu, odstranjivanje samoniklih lukova i višegodišnjih domaćina ovog patogena, izbegavanje preguste sadnje, izbegavanje preobilnog đubrenja azotom, kao i gajenje otpornijih sorti i hibrida, Kofoet i Zinkernagel (1990), Kotoet i sar. (1990), Popkova i sar. (1980).

Radi zaštite crnog luka od ovog patogena svake godine moraju se sprovoditi mere zaštite, među kojima su hemijske mere veoma značajne. Zbog štetnosti i redovnog prisustva ovog patogena, kao i pojave rezistentnosti, neophodno je uvođenje novih i efikasnih fungicida.

## MATERIJAL I METODE RADA

U toku 2006 i 2007 godine na oglednom polju Butel, Poljoprivrednog instituta u Skoplju, vršena su ispitivanja efikasnosti novijih fungicida na crnom luku za seme sorte Sidra.

Ogled je postavljen po blok sistemu sa slučajnim rasporedom parcela, pri čemu je veličina osnovne parcele iznosila 50m<sup>2</sup>.

Ispitivani fungicidi i primenjene doze i koncentracije predstavljene su u tabeli (tab. 1). Tretiranje parcela je vršeno leđnom motornom prskalicom . Prvo tretiranje u 2006. godini je izvedeno 20. maja i 24. maja u 2007. godini. Ostala tri tretiranja su vršena u razmaku od po 15 dana. Ocena efikasnosti je vršena 29. jula u 2006. godini i 25. jula u 2007 godini. Ocena efikasnosti je vršena po skali: 0 = potpuno zdravo lišće bez pega, 1 = površina lišća zahvaćena do 25 %, 2 = površina lišća zahvaćena 25,1-50 %, 3 = površina lišća zahvaćena 50,1- 75 % i 4 = površina lišća zahvaćena 75,1-100 %. Indeks obolenja je izračunat po formuli Townsend –Heubergera a efikasnost po Abbottu.

U toku vegetacije u 2006. godini bilo je više padavina u odnosu na 2007. godinu kada je bilo manje padavina a temperature su bile više.

**Tab.1.** Pregled primenjenih fungicida u ogledima  
**Tab.1.** Riew of the examined fungicides in investigation

Fungicid Fungicide	Activna materija Active ingridient	Doza/koncentr. Doses/concentr.	Proizvođač Producer
Acrobat MZ <sup>a</sup>	mankoceb 60% + dimetamorf 9%	2 kg/ha	BASF
Bakarni antracol	propineb 60% + copperoksihlorid 9%	0,4 %	Bayer
Bravo 500 SC <sup>a</sup>	Chlorothalonil 500 g/l	2 lit/ha	Syngenta
Champion	50% copper hydroxide	0,4 %	Agtrol Chemical
Galben –C	Benalaksil 4% + 33% copper of coperok- sihloride	5 kg/ha	Isagro spa
Kocpin WP	Copper hydroxide 77%	2 kg/ha	Agropin
Mankozeb <sup>a</sup>	mankozeb 80%	0,25%	Herbos
Ridomil gold MZ <sup>a</sup>	mankozeb 64 % + metalaxyl –M 4%	2,5 kg/ha	Syngenta
Quadris <sup>a</sup>	Azoxystrobin 250 g/l	0,75 l/ha	Syngenta

<sup>a</sup> Fungicid nije registrovan u Republici Makedoniji za zaštitu crnog luka od *P.destructor*, a koristi se u nekim zemljama u svetu. - Fungicide not registered for control *P.destructor* in FYR Macedonia, but is in use in some countries in the world.

## REZULTATI I DISKUSIJA

Simptomi napada patogena *P. destructor* na semenskom crnom luku su se manifestovale na lišću, i cvetonosnom stablu, pojavom blede žutih izduženo ovalnih pega. U vlažnim uslovima (hladno i vlažno vreme- visoka relativna vlažnost vazduha, obilne rosa, česte kiše, vodena magla) na pegama se javlja sivkasto ljubičasta prevlaka sporonosnih organa, kasnije na pegama se naseljavaju sekundarni fakultativni paraziti i saprofitne gljive i pege dobijaju tamnomarkirani izgled (sl. 1 i 2). Najčešće su štete od napada ovog parazita na semenskom crnom luku, pri čemu propada biljna masa (lišće i cvetonosno stablo). Sa širenjem parazita po lišću isto se sasuši, dok se cvetonosno stablo može polomiti ili polegnuti, i takve biljke daju malo semena ili je seme šturo, pa je prinos umanjen. Ovaj parazit može uništiti kako nadzemnu biljnu masu i seme tako i lukovice. Spore ovog obligatnog parazita se prenose vetrom.

Rezultati ispitivanja efikasnosti primene novijih fungicida u zaštiti crnog luka od napada *P.destructor* su predstavljeni u tabeli br. 2.



**Sl. 1.** - *P. destructor*: Izduženo žučkaste pege na cvetonosnom stablu semenskog crnog luka (original, foto Trajčevski)

**Fig. 1.** - *P. destructor*- Elongated yellowish spots on flower stems of onion. (original, photo Trajchevski)



**Sl. 2.** - *P. destructor*. Simptomi na lišću i cvetonosnom stablu u žarištu napada (original, foto Trajčevski)

**Fig. 2.** - *P. destructor*. Symptoms on the flower stems and leaves in the focus of infection (original, photo Trajchevski)

**Tabela 2.** Efikasnost primenjenih fungicida za zaštitu crnog luka od napada *P. destructor*, ogledi u Oglednom dobru Butel u Skoplju.**Table 2.** - Efficacy of tested fungicides in controlling *P. destructor*, OPO Butel, Skopje in 2006, and 2007 year.

Fungicid Fungicide	Doza/koncentr. Doses/concentr.	Indeks obolenja - Disease severity (%)		Efikasnost – Efficiency (%)	
		2006	2007	2006	2007
Acrobat MZ <sup>a</sup>	2 kg/ha	7,04	5,24	90,99	91,67
Bakarni antracol	0,4 %	12,62	7,30	83,84	88,39
Bravo 500 SC <sup>a</sup>	2 lit/ha	15,31	9,65	80,40	84,66
Champion	0,4 %	14,25	8,39	81,76	86,66
Galben – C	5 kg/ha	7,10	3,50	90,91	94,43
Kocpin WP	2 kg/ha	9,11	6,90	88,34	89,03
Mankozeb <sup>a</sup>	0,25%	14,11	10,37	81,94	83,52
Ridomil gold MZ <sup>a</sup>	2,5 kg/ha	8,83	6,94	88,69	88,97
Quadris <sup>a</sup>	0,75 l/ha	11,20	10,19	85,65	83,80
Kontrola - Control		78,14	62,93	-	-

<sup>a</sup> Fungicid nije registrovan u Republici Makedoniji za zaštitu crnog luka od *P.destructor*, a koristi se u nekim zemljama u svetu. - Fungicide not registered for control *P.destructor* in FYR Macedonia, but is in use in some countries in the world.

Prema dobijenim rezultatima ispitivanja u 2006. godini najveću efikasnost ispoljili su fungicidi: Acrobat M sa efikasnošću 90,99%, Galben – C sa efikasnošću 90,91%, Ridomil gold MZ sa 88,69% i Kocpin WP sa 88,34%, dok su ostali fungicidi ispoljili su nešto manju efikasnost.

Ispitivanjima u 2007. godini najveću efikasnost pokazali su fungicidi Galben-C sa 94,43%, Acrobat MZ sa 91,67%, Kocpin WP sa 89,03%, Ridomil gold MZ sa 88,97%, Bakarni antracol sa 88,39%. Drugi fungicidi ispitivani u ogledima pokazali su nešto manju efikasnost. Upotreba Ridomila je česta u zaštiti luka od *P.destructor*, međutim pri čestoj upotrebi ovog fungicida vegetacija se produžava tako da lukovice ostaju nedozrele. Upotreba sistemskog fungicida kakv je Ridomil gold MZ za zaštitu crnog luka od ovog patogena je preporučljiva pri obrazovanju glavica.

Za zaštitu crnog luka od *P.destructor* koriste se i fungicidi: Baldo C (bena-laksil 4,2% + bakaroksihlorid 33%) , zatim Rosso ( mankozeb 64% + metalaksil 8%), AVI WG (fosetil al 80%), Alanat 80 WP (alyminium phosphide 80% ), Badi (metalaksyl –M 8%), Nordox 75 WG (bakarni oksid), Kocide 101 (bakarni hidroksid) i dr. Pri primeni fungicida na luku zbog glatke površine lišća crnog luka



i slivanja fungicida treba koristiti i sredstvo za bolje lepljenje kakvo je Citowett (oktilfenoletoksilat) ili druga sredstva. Pri primeni fungicida, tokom izvođenja ogleda, dodavano je obrano mleko.

Prema ispitivanjima Khalila i Khana (2004) u Pakistanu uspešna zaštita crnog luka od ovog parazita postiže se jednim tretmanom pri pojavi bolesti i i druga dva tretiranja u intervalima od 3-7 dana tako da se može držati nivo plamaernjače crnog luka na nivou koji je prihvatljiv. Tretiranje crnog luka za zaštitu od patogena *P.destructor* sprovodi se i kombinacijom fungicida koji su ispitivani u ovom radu. Obično se zadnje tretiranje izvodi sa fungicidom koji ima manju karencu (Quadris i dr.).

Zaštita crnog luka od ovog patogena sprovodi se nizom preventivnih mera, međutim hemijska zaštita je veoma važna pri čemu je posebno preporučljiva integrlana zaštita prema Develash i Sunga,(1997), Hoffmann i sar.(1996).

#### LITERATURA

- Develash, R.K., Sugha,S.K (1997): Menagement of downy mildew (*Peronospora destructor*) of onion (*Allium cepa*). Crop Protection ,Volume 16.No.1,February 1997, pp.63-67(5).
- Hoffmann, M. P., Petzoldt, H. C., Frodsham, C. A (1996): Integrated Pest Management for onions , New York State IPM,Progfram Publication, No.119.
- Kotoet,A;Kik.C;Wietsma,A.W;De Vris ,N.J (1990):Intherance of Resistance to Downy Mildew š*Peronospora destructor* [Berk] Capsć from *Allium roylei* Stearn in the Backcross *Allium cepa* L. x ( *A.roylei* x *A.cepa*) .Plant Breeding 105 (2) ,144-149.
- Kotoet,A;Fisher,K(2004): Evaluation of plant resistance improvers to control *Peronospora destructor*, *P.parasitica*;*Bremia lactucae* and *Peronospora cubensis*. Institute of Vegetable and Ornamental Crops,Department of Plant Health,Teodor Echter Meyer weg 1,d-14979.Grossb Earn , Germany.Gemuse (Munchen) 2004 (vol.40) (No.3) 18-21.
- Kotoet,A;Zinkernagel,V (199): Resistance to downy mildew *Peronospora destructor berk.Cops*.In *Allium species*.Zeitschrift Fuer Pflanzenkrankheiten und Fflanzenschutz.97 (1): 13-23.
- Lorbeer ,J Andolaro,J (1984): Disease of onions.Downy Mildew . NYSAES , Geneva,NY, Page 737.20.
- Muhammad R,K;Nagib,U,K (2004): Suzbijanje plamenjače luka ( *Peronospora destructor* Berkley) sa minimalnim brojem tretmana .Agricultural Research Institute D.I.Khan, 29020 Pakistan.. V. Kongres o zaštiti bilja, Zlatibor,22-26. novembra 2004 god.



Popova K.V; Palilov N.A; Kiryanova ,E.V (1980): Some biological features of the pathogen of *Peronospora destructor* mold in onions and the basis for the system of protective control measures against it . Izvestiya Timiryazevskoi Selskokhozyaistvennoi Akademii (2) :122-130.

(Primljeno: 02.06.2008.)

(Prihvaćeno: 28.08.2008.)

## THE EFFICIENCY OF NEWLI FUNGICIDES FOR CONTROL DOWNY MILDEW OF ONION (*PERONOSPORA DESTRUCTOR* / BERK/ CASPARY EX BERK)

TANAS TRAJČEVSKI

Institute of Agriculture, Skopje, FYR Macedonia

### Summary

The question of control of the onion downy mildew disease caused by *Peronospora destructor* is continually actual problem. The researching and the introduction of new fungicides is permanent project.

In this abstract are given the results of examination of new fungicides for protection onion. The examination is done in 2006 and 2007 in OPO Butel, Skopje, Republic of Macedonia, with aim to control downy mildew (*Peronospora destructor*). In the examination were tested next fungicides: Acrobat MZ (mankozeb + dimetamorf), Bakarni antracol (propineb + copperoksihlorid), Bravo 500 SC (chlorothalonil), Champion (copper hydroxide), Galben-C (benalaksil + copper of coperoksihloride, Kocpin WP (Coper hydroxide), Mankozeb (mankozeb), Ridomil gold MZ (mankozeb + metalaxyl-M) and Quadris (azoxystrobin).

The most efficiens fungicide applied in this research were: Acrobat MZ with index of efficacy 90,99%, Galben-C index of efficacy 90,91%, Ridomil gold MZ index of efficacy 88,69%, Kocpin WP index of efficacy 88,34 % in 2006. In 2007 year index of efficacy of fungicides is: Galben-C index 94,43%, Acrobat MZ index 91,67%, Kocpin WP index 89,03%, Ridomil gold MZ index 88,97%.

*Key words:* onion, down mildew, *Peronospora destructor*, control, fungicides, efficacy.

(Received: 02.06.2008.)

(Accepted: 28.08.2008.)