

UNIVERZITET U BEOGRADU  
POLJOPRIVREDNI FAKULTET BEOGRAD–ZEMUN

Mr Petar M. Mitrović

**MORFOLOŠKA I MOLEKULARNA  
KARAKTERIZACIJA I IDENTIFIKACIJA  
GLJIVE UZROČNIKA RAKA STABLA  
ULJANE REPICE U SRBIJI**

doktorska disertacija

Beograd, 2013.

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF AGRICULTURE

MSc Petar M. Mitrović

**MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR  
CHARACTERIZATION AND  
IDENTIFICATION OF FUNGI CAUSING  
STEM CANKER OF OILSEED RAPE IN  
SERBIA**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2013.

**UNIVERZITET U BEOGRADU  
POLJOPRIVREDNI FAKULTET  
BEOGRAD – ZEMUN**

**Mentor:**

Dr Mirko Ivanović, redovni profesor  
*Poljoprivredni fakultet Beograd – Zemun*

**Članovi komisije:**

Dr Aleksa Obradović, redovni profesor, član  
*Poljoprivredni fakultet Beograd – Zemun*

Dr Ana Marjanović–Jeromela, član  
*Institut za ratarstvo i povrtarstvo – Novi Sad*

Dr Vojislav Trkulja, vanredni profesor, član  
*Poljoprivredni fakultet Banja Luka*

Dr Ivana Vico, docent, član  
*Poljoprivredni fakultet Beograd – Zemun*

**Datum odbrane:** \_\_\_\_\_

# MORFOLOŠKA I MOLEKULARNA KARAKTERIZACIJA I IDENTIFIKACIJA GLJIVE UZROČNIKA RAKA PRIZEMNOG STABLA ULJANE REPICE U SRBIJI

## REZIME

Rak prizemnog dela stabla ekonomski je važno oboljenje uljane repice u Evropi, Australiji i Severnoj Americi. Ovu bolest prouzrokuju dve vrste: *Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. de Not (anamorfni stadijum *Phoma lingam* (Tode ex Fr.) Desm. i *Leptosphaeria biglobosa* Shoem and Brun. Štete od *L. maculans* u Kanadi godišnje prelaze 30 miliona dolara, dok u Velikoj Britaniji, u uslovima povoljnim za razvoj patogena, štete mogu biti i do 56 miliona evra. Gljiva prouzrokuje velike štete i u Australiji a prisutna je i u Africi, Južnoj Americi i Aziji. Iako se *Leptosphaeria maculans* nalazila na listi karantinskih patogena u bivšoj Jugoslaviji, još 1965. godine je registrovana kao parazit karfiola u okolini Splita. Tokom 1983. konstatovana je u mnogim proizvodnim regionima Jugoslavije. Patogen je sa uljane repice izolovan 1987/88. a tokom 1995. godine u Republici Srbiji izolovan je sa semenskog i konzumnog kupusa. Tokom 2005. i 2006. godine parazit je izolovan u svim proizvodnim područjima uljane repice u Vojvodini. Iako je parazit kod nas izolovan još 1987/88, zatim 1995. godine i tokom 2005/06, ni patogen niti oboljenje koje prouzrokuje na uljanoj repici nisu detaljnije proučavani. Zbog toga su sprovedena morfološka i molekularna istraživanja 119 izolata gljiva izolovanih sa uljane repice u našoj zemlji da bi se dobili pouzdani podaci o etiologiji suve truleži korena i raka stabla uljne repice i identifikovali uzročnici ovog značajnog oboljenja. Proučene su morfološke, patogene i molekularne karakteristike 119 izolata izolovanih tokom 2008/10. godine u regionu (Vojvodina) Srbije. Pored izolata iz naše zemlje u ovim istraživanjima su korišćena i dva izolata iz Velike Britanije, kao referentni izolati. Svi proučavani izolati na podlozi od krompira (PDA) obrazuju plodnosna tela – piknide sa piknosporama. Piknospore su jednoćelijske, hijalne, uglavnom prave, sa ili bez kapi ulja na krajevima kod svih izolata.

Od 119 izolata 8 izolata (K-111, K-112, K-113, K-114, K-115, K-116, K-117 i K-118) imaju brz i pravilan porast micelije na PDA podlozi, obrazuju žutomrki pigment,

za razliku od ostalih koji se sporo razvijaju, ne obrazuju pigment, a ivice kolonija su nepravilnog oblika. Svi izolati obrazuju belu do prljavobelu miceliju.

Uz pomoć Burkardovog hvatača spora i sparivanja izolata metodom čačkalica, utvrđeno je da gljiva, pored anamorfnog, u Srbiji formira i teleomorfni stadium sa pseudotecijama, askusima i askosporama. Pseudotecije su mrke, okruglaste, veličine od 313 do 532  $\mu\text{m}$ . Askospore su septirane (5 septi), prave, do malo povijene, veličine 6–10  $\mu\text{m}$  x 42–74  $\mu\text{m}$ . Metodom slučajnog izbora, u okviru svoje grupe izdvojeni su sledeći izolati. Kao predstavnici B grupe izabrani po slučajnom metodu, izolati K-113 i K-115 stvaraju pigment u tečnoj Czapek-ovoj podlozi ali ne stvaraju fitotoksin. Izolati St-5, C-3 i S-11, kao predstavnici grupe A, ne stvaraju žutomrki pigment u Czapek-ovoj podlozi ali stvaraju fitotoksin. Pripadnost patogenim grupama (PG) određena je na osnovu ispoljenih simptoma na inokulisanim kotiledonima diferencijalnih sorti (Westar, Quinta i Glacier) uljane repice. Istraživanja su pokazala da 8 izolata pripada PG1, 5 izolata pripada PG2, 22 izolata pripada PG3 i 84 izolata pripada PG4 patogenoj grupi, dok PGT patogena grupa nije identifikovana. U ovim istraživanjima utvrđeno je da seme ima značajnu ulogu u epidemiologiji oboljenja. Inokulaciom semena je dokazano da se parazit, pored askospora, može širiti i zaraženim semenom.

Molekularna karakterizacija je obavljena primenom PCR i PCR-RFLP. Ovim analizama utvrđeno je da su u Srbiji prisutne obe vrste prouzrokovala suve truleži (raka) korena i raka stabla uljane repice, *Leptosphaeria biglobosa* NA1 podgrupa i *Leptosphaeria maculans*. Determinacija vrsta i strukture populacije „*Leptosphaeria* kompleksa“ u regionima gajenja uljane repice može poslužiti za sagledavanje epidemiologije parazita, kao i za mere suzbijanja.

**Ključne reči:** Uljana repica, zaraženo seme, diferencijalne sorte, *Leptosphaeria biglobosa*, *Leptosphaeria maculans*, izolati, patogena grupa, micelija, askospora, piknidi, piknospore, pseudotecija, PCR, PCR-RFLP.

Naučna oblast: Biotehničke nauke

Uža naučna oblast: Fitopatologija

UDK: 632.4+633.85(497.11)

# MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION AND IDENTIFICATION OF FUNGI CAUSING STEM CANKER OF OILSEED RAPE IN SERBIA

## ABSTRACT

Stem canker of oilseed rape is economically important disease in Europe, Australia and North America. This disease is caused by two species: *Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. de Not (anamorphic stadium *Phoma lingam* (Tode ex Fr.) Desm. i *Leptosphaeria biglobosa* Shoem and Brun. Damage caused by *L. maculans* in Canada annually exceeds \$ 30 million, while in the UK, under conditions favorable for pathogen development, the damage could be as high as 56 million. The fungus causes severe damage in Australia too and it is present in Africa, South America and Asia. Although *Leptosphaeria maculans* is on the list of quarantine pathogens in the former Yugoslavia, in 1965. it is registered as cauliflower parasite around Split. During the 1983rd was found in many manufacturing regions of Yugoslavia. The pathogen was isolated from oilseed rape in 1987/88. and during 1995. has been isolated from cabbage. During 2005 and 2006 parasit has been isolated in all production areas of oilseed rape in Vojvodina. Although parasite was isolated in 1987/88, then again in 1995. and during 2005/2006, Iako je parazit kod nas izolovan još 1987/88, zatim 1995. godine i tokom 2005/06, either pathogen or disease that causes on the oilseed rape were not investigated further. Therefore, morphological and molecular studies of 119 isolates of fungi isolated from oilseed rape in our country were carried out in order to obtain reliable data on the etiology of dry root rot and stem canker of oilseed rape and to identify the causes of this important disease. Were studied morphological, pathogenic and molecular characteristics of 119 strains isolated during 2008/10. in the region (Vojvodina) of Serbia. In addition to isolates from our country in these studies were used and the two isolates from the UK, as well as reference strains. All studied isolates on a potato medium (PDA) form fruiting bodies pycnidia with pycnosporos. Pycnosporos are unicellular, hyalic, mostly straight, with or without a drop of oil on the ends in all isolates.

Eight isolates out of 119 (K-111, K-112, K-113, K-114, K-115, K-116, K-117 i K-118) have quick and proper mycelia growth on PDA medium, form yellow-brownish

pigment, unlike others who are slow to develop, do not form the pigment and the edges of colonies are irregular in shape. All isolates form white to dirt-white mycelia.

Using Burkards spore catcher and isolates mating with toothpick method, it was found that fungus, in addition to anamorphic, in Serbia forms and teleomorphic stadium with pseudotecia, ascus and ascospores. Pseudotecia are brown, round, size from 313 to 532  $\mu\text{m}$ . Ascospores Ascospores are septated (5 septa), straight to slightly curved, sized from 6-10  $\mu\text{m}$  x 42–74  $\mu\text{m}$ . By random choice method, within their group the following isolates were segregated. As elected representatives of the B group of the randomized method, isolates K-113 and K-115 produce pigment in liquid Czapek's medium but do not create phytotoxin. Isolates ST-5, C-3 and C-11, as well as representatives of groups A, does not produce yellow-brown pigment in Czapek's medium but creates phytotoxin.

Affiliation to pathogenic groups (PG) was determined on the basis of symptoms displayed in the inoculated cotyledons of differential cultivars (Westar, Quinta and Glacier) of oilseed rape. Studies have shown that 8 isolates belongs to PG1, 5 isolates belongs to PG2, 22 isolates belongs to PG3 and 84 isolates belongs to PG4 pathogenic group, while PGT pathogen group is not identified. In this study, it was determined that seed has an important role in the epidemiology of the disease. Seed inoculation has proven that parasite, in addition to ascospores, may spread with infected seed.

Molecular characterization was performed using PCR and PCR-RFLP. These analyzes confirmed, in Serbia, the presence of both species causing dry rot (cancer) root and stem canker of oilseed rape, *Leptosphaeria biglobosa* NA1 subgroup and *Leptosphaeria maculans*. The determination of species and population structure of "Leptosphaeria complex" in the growing area of oilseed rape can be used for understanding the epidemiology of the parasite, as well as control measures.

**Key words:** Oilseed rape, infected seed, differential cultivar, *Leptosphaeria biglobosa*, *Leptosphaeria maculans*, isolates, pathogenic group, mycelium, ascospore, pycnidia, pycnospores, pseudotecia, PCR, PCR-RFLP.

Scientific area: Biotechnical Science

Specific scientific area: Phytopathology

UDK: 632.4+633.85(497.11)

## SADRŽAJ

<b>I UVOD</b> .....	1
<b>II CILJ ISTRAŽIVANJA</b> .....	4
<b>III RADNA HIPOTEZA</b> .....	5
<b>IV PREGLED LITERATURE</b> .....	6
4.1. Rasprostranjenost i značaj.....	6
4.2. Simptomi.....	7
4.3. Biologija i epidemiologija gljive.....	8
4.4. Razlike između <i>L. maculans</i> i <i>L. Biglobosa</i> .....	11
4.5. Morfološke karakteristike.....	14
<b>V MATERIJAL I METOD RADA</b> .....	15
5.1. Izolacija gljive i dobijanje monospornih kultura.....	15
5.2. Morfološke karakteristike.....	16
5.3. Dokazivanje postojanja teleomorfno stadijuma gljive.....	16
5.4. Obrazovanje pigmenta u tečnoj Czapek-ovoj podlozi.....	19
5.5. Ekstrakcija, izolacija i karakterizacija fitotoksina.....	19
5.6. Identifikacija fitotoksina LC – MS – MS metodom.....	20
5.7. Ispitivanje fitotoksičnosti.....	21
5.8. Određivanje patogenih grupa.....	21
5.9. Prenosnje patogena semenom.....	23
5.10 Molekularna karakterizacija.....	24
5.11 Ekstrakcija DNK.....	24
5.12 PCR–RFLP analiza.....	26
<b>VI REZULTATI ISTRAŽIVANJA</b> .....	28
6.1. Simptomi bolesti.....	28
6.2. Morfološke karakteristike proučavanih izolata.....	31
6.3. Dokazivanje postojanja teleomorfno stadijuma gljive.....	35
6.4. Infektivnost askospora .....	37
6.5. Obrazovanje pseudotecija i askospora u laboratorijskim uslovima....	38
6.6. Obrazovanje pigmenta u tečnoj Czapek-ovoj podlozi.....	39
6.7. Ekstrakcija, izolacija i karakterizacija fitotoksina.....	40
6.8. Test fitotoksičnosti.....	59
6.9. Određivanje patogenih grupa.....	60
6.10. Prenosnje patogena semenom.....	65
6.11. Molekularna karakterizacija.....	68
<b>VII DISKUSIJA</b> .....	78
7.1. Morfološke karakteristike proučavanih izolata.....	79
7.2. Dokazivanje savršenog stadijuma.....	80
7.3. Obrazovanje pigmenta u tečnoj Czapek-ovoj podlozi.....	83
7.4. Dokazivanje fitotoksina.....	83
7.5. Određivanje patogenih grupa.....	88
7.6. Prenosnje patogena semenom.....	89
7.7. Molekularna karakterizacija.....	90
<b>VIII ZAKLJUČAK</b> .....	93
<b>IX LITERATURA</b> .....	95



## I. UVOD

Uljana repica (*Brassica napus* var. *oleifera* L.) spada među četiri najvažnije uljane biljke u svetu (Marinković i sar. 2007). Najviše se gaji u Kini, Indiji, Australiji, Kanadi i zemljama Zapadne Evrope (Francuska i Nemačka). Na evropskom kontinentu i Australiji uglavnom se gaji ozima forma dok je u Kanadi dominantna jara uljana repica. Uljana repica se gaji zbog semena koje sadrži 40–48% ulja i 18–25% proteina (Marjanović-Jeromela i sar. 2002; Marinković i sar. 2003). Ulje kod starih sorti uljane repice se karakterisalo visokim sadržajem eruka kiselina i glukozinolata. Zbog sadržaja navedenih materija, ulje nije korišćeno za ishranu ljudi, a sačma zbog prisustva glukozinolata, nije upotrebljavana u ishrani domaćih životinja. U poslednje vreme, selekcijom su stvorene sorte i hibridi koji ne sadrže navedene materije u toksičnim koncentracijama. Pored navedenog načina upotrebe, u mnogim zemljama se ulje uljane repice sve više koristi u proizvodnji biodizela. Mogućnost proizvodnje biodizela iz repičinog ulja predstavlja osnovni razlog za povećanje proizvodnje kod nas (Mitrović i sar. 2009). Iako je uljana repica u Srbiji bila poznata još 30-ih godina prošlog veka, tehnologija proizvodnje i zaštita predstavljaju priličnu nepoznanicu. Smanjenje prinosa, a u nekim slučajevima i preoravanje zasejanih površina, i pored klimatskih faktora i agrotehničkih mera, može biti izazvano i neblagovremenom zaštitom (suzbijanje korova štetnih insekata i fitopatogenih gljiva). Uljanu repicu parazitira veći broj patogenih gljiva: *Plasmodiophora brassicae* Wor. *Peronospora parasitica* (Pers.) Fr. *Alternaria brassicae* (Berk.) Sacc, *Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. de Not, *Leptosphaeria biglobosa* Shoem and Brun, *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, *Botrytis cinerea* Pers, *Erisiphe cruciferarum* Opix ex Junell i neke druge.

Sve navedene vrste, u zavisnosti od klimatskih i drugih faktora, mogu prouokovati manje ili veće štete na usevu. Na osnovu literaturnih podataka, rak stabla i suva trulež korena je ekonomski najvažnija bolest uljane repice u Evropi, Australiji i Severnoj Americi (Fitt et al. 2006). Ovu bolest prouzrokuju dve vrste fitopatogenih

gljiva iz roda *Leptosphaeria* i to: *Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. de Not anamorfni stadijum: *Phoma lingam* (Tode ex Fr.) Desm i *Leptosphaeria biglobosa* Shoem and Brun. Obe vrste su prisutne na svim kontinentima (Anon 2004 cit loc. Fitt et al. 2006).

Epidemiološki, rak stabla predstavlja najznačajnije oboljenje uljane repice širom sveta (Gosende et al. 2003, Howlett et al. 2001). Intenzitet pojave bolesti zavisi od klimatskih faktora, agrotehničkih mera i otpornosti sorata (Howlett, 2004; Aubertot et al., 2006; Sosnowski et al., 2004). Tako na primer, Pedras et al. (1996) navode da gubici prinosa od *Leptosphaeria maculans* u Kanadi prelaze godišnje 30 miliona dolara, a u Velikoj Britaniji se smanjenje prinosa, kod osetljivih sorti, kreće i do 50% u godinama kada je napad raka jak (Gladders & Musa 1979). Fitt et al. (2006) navode da štete od ove bolesti na uljanoj repici u Velikoj Britaniji iznose oko 56 miliona evra po vegetacionoj sezoni.

U nekim godinama u Nemačkoj može biti zaraženo i preko 70% biljaka (Kruger 1979, Seidel et al. 1984). Parazit prouzrokuje simptome od nicanja pa do zrenja repice. Na kotiledonima, listu i ljuskama simptomi se ispoljavaju u vidu pegavosti, dok na stablu i korenu gljiva prouzrokuje rak, odnosno suhu trulež (Gabrielson 1983, Paul & Rowlinson 1992). Tokom jeseni, primarne infekcije patogen ostvaruje pomoću askospora koje se oslobađaju iz zrelih pseudotecija (Huang et al. 2003, Marcroft et al. 1999, Hammond et al. 1985).

Pored askospora, u Australiji piknospore patogena ostvaruju infekciju i prouzrokuju simptome na kotiledonima i hipokotilu (Barbetti & Khangura 2000 cit loc. West et al. 2001, Gosende et al. 2003). Tokom proleća micelija iz lista nastavlja rast i preko lisne drške inficira stablo prouzrokujući simptome raka (Hammond et al. 1985, Thürwächter et al. 1999). U Srbiji, patogen je izolovan sa kupusa glavičara u Vojvodini (Mitrović 1997), a sa uljane repice 1987. godine iz okoline Negotina i tokom 1988. iz Leskovca (Antonijević 1999). U 2005. i 2006. gljiva je izolovana sa biljaka uljane repice u svim proizvodnim regionima Vojvodine (Mitrović i Marinković 2007). Pojava simptoma u mnogome zavisi od vremenskih uslova. U godinama sa sušnim letom, pojava simptoma obično izostaje ili se prvi javljaju krajem novembra ili početkom decembra.. Slika je obrnuta u godinama sa čestim padavinama, naročito u drugom delu

vegetacije, od početka aprila pa sve do zrenja. Iako za sada nema ekonomskih šteta od ovog patogena kod nas ipak, posmatrano iz godine u godinu, broj pega na listu tokom jeseni i proleća kao i simptomi raka na stablu sve su učestaliji.

Masovnija pojava simptoma na nadzemnim organima biljaka navodi nas na razmišljanje da će ovaj parazit u budućnosti kao i u drugim zemljama postati ekonomski važno oboljenje uljane repice i kod nas.

## II. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ove disertacije je:

- da dâ pregled stanja oboljenja u svetu i kod nas;
- da potvrdi postojeća i ostvari nova saznanja o patogenu izučavanjem morfoloških parametara;
- da obezbedi nova saznanja o patogenu izučavanjem molekularnih karakteristika
- da na osnovu dobijenih rezultata izvrši identifikaciju patogena;
- da utvrdi značaj toksina i njihov uticaj na nastanak bolesti;
- da odredi patogene grupe;
- da diskutuje o postojećim i razradi nove mere kontrole oboljenja.

Morfološka karakterizacija će se obaviti proučavanjem uobičajenih mikoloških parametara, a molekularna karakterizacija će se zasnivati na analizi sekvencioniranih delova genoma i genetskoj srodnosti/različitosti izolata gljive dobijenih u ovom radu sa kontrolnim izolatima ovog patogena dobijenim iz Velike Britanije (Center for Agricultural Research, Rothamsted).

Rezultati ovih istraživanja doprineće sagledavanju značaja raka krune i prizemnog dela stabla uljane repice u proizvodnji ove industrijske biljke kao i potpunijem sagledavanju značaja raka korena i stabla uljane repice kod nas, s obzirom na to da ova bolest kod nas nije proučavana.

### III. RADNA HIPOTEZA

Proizvodnja uljane repice u našoj zemlji je u velikoj meri zavisna od pojave bolesti. Prethodna ispitivanja su pokazala da je bolest prisutna i kod nas. Međutim, ni patogen niti bolest nisu detaljnije izučavani.

Nedostatak morfoloških i molekularnih istraživanja ekonomski najznačajnijih bolesti uljane repice u našoj zemlji, kao i problemi vezani za utvrđivanje prisustva, rasprostranjenosti i učestalosti pojave, njihovu klasifikaciju, identifikaciju, morfološku i molekularnu karakterizaciju ukazali su na potrebu njihovog svestranijeg i detaljnijeg proučavanja.

Istraživanja koja su definisana ovom disertacijom zasnivaju se na pretpostavci da su obe vrste gljiva, uzročnici raka prizemnog dela stabla uljane repice, prisutne i u Srbiji. S obzirom da na osnovu dosadašnjih istraživanja osim pojave i prisustva ovog oboljenja kod nas drugi parametri patogena nisu detaljnije proučavani, pretpostavka je da će ova studija na osnovu morfoloških i molekularnih istraživanja ukazati na načine i puteve širenja ovog oboljenja i doprineti unapređenju metoda detekcije i identifikacije, pouzdanoj molekularnoj karakterizaciji patogena i dijagnozi oboljenja na uljanoj repici, što je osnova razrade odgovarajućih mera kontrole bolesti.

Postavljenim ciljevima, ova disertacija bi predstavljala doprinos ne samo u proučavanju populacije ovog/ih patogena, nego bi bila model sistem za proučavanje populacija i drugih patogena uljane repice u našoj zemlji. Rezultati ovih ispitivanja doprineće potpunijem sagledavanju prisustva ovog oboljenja na području Srbije u usevu uljane repice kao jednoj od najvažnijih biljaka domaćina.

## IV. PREGLED LITERATURE

### 4. 1. Rasprostranjenost i značaj

Rak stabla i suva trulež korena važno je oboljenje uljane repice u Evropi, Australiji i Severnoj Americi (Fitt et al. 2006). Ovu bolest prouzrokuju dve vrste fitopatogenih gljiva iz roda *Leptosphaeria*: *Leptosphaeria maculans* (Desm.) ces. and de Not anamorf *Phoma lingam* (Tode. Fr.) Desmas, koja izaziva rak prizemnog dela stabla i suhu trulež korena, i *Leptosphaeria biglobosa* Shoem and Brun, koja izaziva simptome u vidu raka na gornjim delovima stabla, uglavnom izazivajući manje štete, dok ozbiljne štete može izazvati u zemljama sa višim letnjim temperaturama (Huang et al. 2005, Fitt et al. 2006). Obe vrste se javljaju i u Africi, Srednjoj i Južnoj Americi i Aziji (Anon. 2004 cit loc Fitt et al. 2006). *L. maculans* najveće štete prouzrokuje u Zapadnoj Evropi, Australiji i Kanadi (West et al. 2001). Tako na primer Pedras et al. (1996) navode da gubici prinosa koje *L. maculans* prouzrokuje u Kanadi godišnje prelaze 30 miliona dolara dok se u Velikoj Britaniji, u godinama kada je napad ovog patogena jak, smanjenje prinosa kod osetljivih sorti kreće i do 50% (Gladders & Musa 1979), pri čemu Fitt et al. (2006) navode da smanjenje prinosa, odnosno novčana vrednost neostvarenog prinosa uljane repice u Velikoj Britaniji iznosi oko 56 miliona evra po vegetacionoj sezoni. U Nemačkoj suva trulež takođe predstavlja ekonomski važno oboljenje uljane repice. U nekim godinama može biti zaraženo preko 70% biljaka (Krüger 1979 Seidel et al. 1984). Krüger (1978, 1979) navodi da je bolest konstatovana u svim područjima gajenja uljane repice u Nemačkoj. U ranim 70-im godinama dvadesetog veka jake epidemije ove bolesti su zaustavile razvoj industrije uljane repice u Australiji (Bokor et al. 1975). Do sredine 1990, kao isključivi uzročnik raka stabla uljane repice u Poljskoj smatrana je *L. biglobosa* (Jedryczka et al. 1994). Međutim, Karolewski et al. (2002) navode da je *L. maculans* raširena u zapadnom delu Poljske a *L. biglobosa* u istočnom delu Poljske. U Češkoj i Mađarskoj se takođe javljaju obe vrste

gljiva ( Szlavik et al. 2003) dok je u Rusiji dominantna *L. biglobosa* (Jedryczka et al. 2002). Bolest se ređe javlja u Škotskoj, Indiji i Kini.

West et al. (2001) navode da je u Kini sa uljane repice izolovana samo *L. biglobosa*. Na području bivše SFRJ *Phoma lingam* (teleomorf *Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. de Not je prvi put registrovana na karfiolu u okolini Splita (Panjaninin, 1965). Cvjetković i sar. (1983) takođe navode da je tokom 1982. konstatovana u mnogim proizvodnim regionima Jugoslavije, iako se parazit nalazio na karantinskoj listi. Takođe, Mustapić i sar. (1984) navode da postoji opasnost da se rak stabla uljane repice proširi u mnoge proizvodne regione Jugoslavije. U Srbiji parazitna gljiva *Phoma lingam* je izolovana sa kupusa 1995. godine (Mitrović 1997). Sa uljane repice u Negotinu je izolovana 1987. godine, tokom 1988. u Leskovcu (Antonijević 1999), dok je tokom 2005. i 2006. godine ovaj parazit izolovan u svim proizvodnim područjima uljane repice u Vojvodini (Mitrović i Marinković, 2007).

## 4. 2. Simptomi

U početku pege su male, svetlosmeđe boje, često nepravilno okruglastog oblika, ponekad okružene hlorotičnim tkivom. Pege izazvane izolatima A grupe *L. maculans* se povećavaju starenjem. U okviru njih se obrazuju sitna crna telašca-piknidi gljive (West et al. 1999). Ponekad centralni deo pega na listu ispada usled udara kišnih kapi. B grupa izolata *L. biglobosa*, takođe prouzrokuje sitne mrke pege sa vrlo malo piknida u okviru njih ili bez piknida (Brun et al. 1997, Thürwächter et al. 1999). Na hipokotilu micelija izaziva suženje neposredno iznad površine zemlje ili ispod prvih listova. Vremenom suženi deo stabla postaje crne boje. U Zapadnoj Australiji na pojedinim parcelama, u povoljnim godinama za razvoj parazita, može biti zaraženo i preko 70% biljaka u fenofazi kotiledona (Barbetti & Khangura 1999). U Evropi je pojava simptoma na hipokotilu retka (Paul & Rawlinson 1992).

Tokom proleća micelija gljive iz lista preko lisne drške inficira stablo (Hammond & Lewis 1987b, Thürwächter et al. 1999). Na prizemnom delu stabla, kruni ili vratu korena pege su oivičene tamnobraon ili ljubičastom marginom. Ovakve pege se mogu često zapaziti na listovima tokom jeseni u Zapadnoj Evropi (Hammond et al. 1985). Tokom obrazovanja plodova- ljuski i sazrevanja semena pege na stablu se šire i spajaju

obrazujući veću nekrotičnu površinu. Tkivo u okviru pega puca pa dolazi do stvaranja suve truleži ili raka (Paul i Rawlinson 1992; Mitrović i Trkulja, 2010). Pored prizemnog dela stabla, simptomi se mogu često zapaziti i na gornjem delu stabla (Hammond et al. 1985; Williams i Fitt, 1999). Pege na gornjem delu stabla i granama su izduženog oblika, sivosmeđe boje, oivičene tamnim rubom. U kasnijem periodu, centralni deo pega postaje sivobeke boje s brojnim crnim piknidima.

Pege mogu biti duge i do nekoliko cm (Mitrović i Trkulja, 2010). Često se može zapaziti prevremeno sazrevanje biljaka koje ima za rezultat značajno smanjenje prinosa. Uvenuće biljaka je često prouzrokovano prstenastim obuhvatanjem stabala (Davies 1986) ili razaranjem unutrašnjih tkiva vrata korena usled čega dolazi do poremećaja u transportu vode (Mitrović i Marinković, 2007; Mitrović i Trkulja, 2010). U povoljnim uslovima (temperatura vlaga) parazit prouzrokuje slične pege i na ljuskama koje pucaju i prevremeno sazrevaju (Petrie i Vanterpool, 1974).

Sa zaraženih ljuski parazit prelazi na seme što može predstavljati problem ako se takvo seme koristi za setvu (Wood & Barbetti 1977a, Kharbanda & Stevens 1993). Jače inficirano seme je sitno, sivobeke boje, dok je manje kontaminirano seme sivo do svetlocrvenkasto. U oba slučaja, pored male upotrebne vrednosti, ovakvo seme je neupotrebljivo za setvu (Mitrović i Trkulja 2010). Pored navedenih simptoma parazit prouzrokuje uvelost i propadanje cvetova. U prvim fazama dolazi do uvenuća a kasnije cvetovi postaju rudimentirani, tamne boje. U ovoj fazi cvetne grančice i drške cvetova postaju sivobeke boje na kojima se zapažaju plodonosna tela gljive – piknidi (Mitrović i Trkulja 2010).

#### 4. 3. Biologija i epidemiologija gljive

Tode (1791 cit. loc. Pound 1947) je opisao suhu trulež (blackleg) na mrtvim stablima kupusa i njenog prouzrokovača nazvao *Sphaeria lingam*. S obzirom na to da je gljivu našao na mrtvim stablima kupusa, smatrao je da je u pitanju saprofitni organizam. Međutim, Desmazières (1849 cit. loc Pound 1947) je istu gljivu pronašao tokom vegetacije (na živim biljkama), nakon čega ju je preimenovao u rod *Phoma*. Potom je Rostrup (1894 cit. loc Pound 1947) u Danskoj opisao slično oboljenje na beloj rotkvi (repa) i prouzrokovača opisao kao *Phoma napobrassicae* Rostrup. Međutim, Henderson



(1918 cit loc. Pound 1947) je detaljnim izveštajem o pojavi *Phoma lingam* na kupusu u državi Wisconsin, SAD, opisao dve vrste piknida koje stvara gljiva. Isti autor navodi da postoje značajni dokazi da je *P. napobrassicae* u stvari vrsta *Phoma lingam*. Smith (1956) je otkrio savršeni stadium *Leptosphaeria maculans* na stabljikama uljane repice na Novom Zelandu mada se u literaturi često susreće da je savršeni stadium otkriven na Novom Zelandu 1957. godine (Anonimus 1957 cit. loc. Williams 1992). Gljiva se u prirodi održava pomoću piknida, micelije i pseudotecija. Piknidi se obično prenose semenom dok su pseudotecije prisutne u biljnim ostacima. U povoljnim uslovima temperature i visoke relativne vlažnosti, piknidi i pseudotecije oslobađaju obilnu količinu konidija (piknospore) i askospora (Williams 1992).

Prilikom setve zaraženog semena piknidi na semenu pod uticajem zemljišne vlage pucaju i oslobađaju piknospore koje mogu zaraziti hipokotil ili se simptomi ispoljavaju u vidu pegavosti na kotiledonima (Barbetti & Khangura 2000 cit. loc. West et al. 2001). U okviru pega na kotiledonima stvaraju se novi piknidi. Ovi piknidi u povoljnim uslovima oslobađaju piknospore koje se kišnim kapima i insektima prenose na nove biljke.

Piknospore klijaju u infektivnu hifu i preko stoma ili povreda inficiraju biljno tkivo. Uloga piknospora u epidemiologiji bolesti je u Zapadnoj Evropi minimalna ali je veoma značajna u Zapadnoj Australiji (West et al. 2001). S obzirom da je utvrđeno da u Australiji infekciju klijanaca (faza kotiledona) osim askospora mogu prouzrokovati i piknospore gljive (Barbetti & Khangura 2000 cit. loc. West et al. 2001). Kontaminirano seme takođe može biti izvor inokuluma za početne infekcije kotiledona. Ove infekcije rezultiraju pojavom pega kružnog oblika sa velikim brojem formiranih piknida u početnim stadijumima razvoja biljaka (Sylvester-Bradley & Makepeace 1985). Mogućnost prenošenja patogena semenom kupusa, uljane repice, rotkve i drugih kupusnjača je verovatno doprinela da je ova gljiva prisutna na svim kontinentima (West et al. 2001). Pored piknospora, parazit može ostvariti zarazu i askosporama. U Velikoj Britaniji i drugim zemljama Zapadne Evrope, askospore predstavljaju glavni izvor inokuluma za pojavu raka stabla na uljanoj repici (McGee 1977, Schramm & Hoffmann 1991, Gladders & Musa 1980). Nakon žetve gljiva se na zaraženim biljkama (stablama) održava u formi saprofitne micelije (Williams 1992).

Ubrzo posle žetve pseudotecije mogu biti vidljive na prizemnom delu stabla (područje simptoma bolesti), dok se na gornjim delovima stabla plodnosna tela formiraju nekoliko nedelja kasnije (Hammond 1985 cit. loc. West et al. 1999). Gljiva može da opstane u biljnim ostacima i nekoliko godina (Petrie 1986). Ipak, najveća produkcija askospora je u prvoj godini posle žetve (McGee 1977; Sosnowski et al. 2006; Naser et al. 2008). Glavni vremenski faktori koji utiču na dozrevanje pseudotecija i oslobađanje askospora su temperatura i vlažnost (Pérés & Poisson 1997). Formiranje pseudotecija na temperaturi od 15–20°C je dosta slično za obe vrste (*L. maculans*, *L. biglobosa*), dok *L. biglobosa* pri temperaturi ispod 10°C formira pseudotecije vrlo sporo (Toscano-Underwood et al. 2003). Pri temperaturi 5°C sazrevanje i oslobađanje askospora traje manje od 58 dana, dok na 15°C traje 22 dana. Najjače infekcije lista su primećene pri temperaturi od 15 do 20°C i dužini vlaženja lista od 48 časova (Toscano-Underwood et al. 2001). Međutim, infekcije se ostvaruju i na temperaturi od 5 do 20°C i dužini trajanja vlažnog perioda od 8 do 72 časa (Toscano-Underwood et al. 2001).

Biddulph et al. (1999a cit. loc. West et al. 1999) navodi da se infekcija listova može ostvariti na temperaturi od 4 do 20°C i dužini vlaženja lista duže od 4 časa. U uslovima Srednje i Zapadne Evrope oslobađanje askospora započinje u septembru ili oktobru najviše 1 do 2 meseca kasnije (Thürwüchter et al. 1999), dok u sušnim regionima Zapadne Australije obrazovanje pseudotecija i oslobađanje askospora započinje 18 meseci nakon žetve (Gladders et al. 2006). U Istočnoj Evropi oslobađanje askospora je utvrđeno i tokom aprila sledeće godine (Fitt et al. 2006). Oslobođene askospore padaju na površinu lista i u povoljnim uslovima inficiraju listove preko stoma ili povreda. Infekciona hifa se širi u biljnom tkivu obrazujući haustoriju, nakon čega ona raste dalje prouzrokujući prve vidljive simptome infekcije palisadnih ćelija (Hammond & Lewis 1987a).

Izumiranjem palisadnih ćelija javljaju se prvi simptomi bolesti na biljkama. A-grupa (*L. maculans*) na mestu infekcije izazivaju male tamne pege u okviru kojih gljiva stvara brojne piknide, dok B-grupa prouzrokuje nešto sitnije pege, tamne boje, sa nekoliko piknida ili bez stvaranja piknida na biljkama (Brun et al. 1997). Nastale pege se tokom jeseni povećavaju i postaju različitog oblika. Tokom zime i početkom proleća micelija se razvija interćelijski i preko lista i lisne drške dolazi do stabla (Hammond &

Lewis 1987a). U kontaktu micelije gljive i stabla uljane repice patogen sa biotrofnog načina ishrane prelazi na nekrotrofni, izazivajući tipične simptome raka na stablu (Hammond & Lewis 1987b). Na stablu osetljivih vrsta biljaka A grupa *L. maculans* prouzrokuje intenzivne povrede kortikalnog tkiva koje su svetlosmeđe boje, često oivčene tamnijom marginom, dok B grupa veoma retko izaziva povrede korteksa ali preko povreda lisne drške inficira srž stabla bez vidljivih spoljnih simptoma (Wes et al. 1999).

#### 4. 4. Razlike između *L. maculans* i *L. biglobosa*

U ranijem periodu populacija gljive *L. maculans* na osnovu patogenosti izolata je bila deljena u dve grupe koje su označene kao virulentne ili slabovirulentne – avirulentne (McGee & Petrie 1978 Koch et al. 1989 Badawy & Hoppe 1989), zatim na osnovu RFLP analize u grupa A i B (Johnson & Lewis 1990) odnosno Tox<sup>+</sup> izolati koji stvaraju toksične materije (fitotoksine) i Tox<sup>0</sup> koji ne proizvode navedene materije (Balesdent et al. 1992). Jake epidemije u Australiji prouzrokuje samo grupa A, dok u Kanadi i Zapadnoj Evropi štete pricinjavaju obe grupe (Wes et al. 2001). Brun et al. (1997) i Williams and Fitt (1999) navode da se grupe razlikuju po virulentnosti, odnosno da je grupa A visoko virulentna, dok je grupa B manje virulentna. U novije vreme virulentnost izolata *L. maculans* se vezuje za „effector“ molekule. To su mali molekuli koji obavijaju proteine bogate cisteinom ili se vezuju na određena mesta enzima prouzrokujući njihovu aktivnost, koja se ogleda u ispoljavanju fitotoksičnosti (Hogenhout et al. 2009).

Koch et al. (1991) i Mengistu et al. (1991) su proučavali virulentnost različitih izolata *L. maculans* na tri sorte uljane repice (Westar, Quinta i Glacier) i svrstali ih u 4 patogene grupe: PG<sub>2</sub>, PG<sub>3</sub> i PG<sub>4</sub>, dok su svi slabo virulentni izolati svrstani u PG<sub>1</sub>. Kuusk et al. (2002) navode da se patogene grupe (PG) 2, 3 i 4 mogu svrstati u grupu A a PG<sub>1</sub> u grupu B. Na osnovu RFLP analize i analize izoenzima utvrđeno je da agresivni izolati formiraju kompaktnu grupu koja se razlikuje od slabo virulentnih izolata. Istim metodama je, takođe, utvrđeno da se slabo virulentni izolati mogu svrstati u tri podgrupe: NA1 NA2 i NA3 (Koch et al. 1991, Gall et al. 1995). Gall et al. (1995)

navode da je NA1 podgrupa dominantna u Evropi, dok je NA2 više zastupljena u Kanadi.

Balesdent et al. (1998) je predložio mogućnost identifikacije vrsta i podvrsta unutar *Leptosphaeria* kompleksa zasnovanu na ITS restrikcijom profilu korišćenjem 5 enzima *AluI*, *BamHI*, *HaeIII*, *EcoRII* i *RsaI*. Na osnovu dobijenih rezultata Balesdent et al. (1998) je podelio *Leptosphaeria* kompleks u 7 grupa: (1.) *Brassica Tox<sup>+</sup>*, (2.) *Lepidium Tox<sup>+</sup>*, (3.) *Brassica Tox<sup>0</sup>* NA1 podgrupa, (4.) *Brassica Tox<sup>0</sup>* NA2 podgrupa, (5.) *Brassica Tox<sup>0</sup>* NA3 podgrupa (6.) *Erysimum Tox<sup>0</sup>* i (7.) *Thlaspi Tox<sup>0</sup>*. Na osnovu AFLP istraživanja internacionalne kolekcije reprezentativnih izolata (The International Blackleg of Crucifers Network IBCN) Purwantara et al. (2000) predlaže dalje podgrupisanje u nekim od ovih 7 grupa.

Osim razlika u molekularnim i virulentnim karakteristikama, među izolatima postoji razlika i u produkciji fitotoksina sirodezmin PL (Koch et al. 1989). Sirodezmin PL je proizvod patogene gljive *L. maculans* i pripada klasi epipolitiiodioksipiperazina (ETP) koji se karakteriše prisustvom disulfidnog mosta (Gardiner et al. 2004, 2005). Diketopiperazinski prsten potiče od cikličnog dipeptida i sumporni mostovi su odgovorni za sve poznate toksične efekte ovih molekula (Mullbacher et al. 1986). Pored sirodezmina, PL u filtratu kulture su otkriveni i drugi sirodezmini (sirodezmin B, C, H, K) (Badawy & Hope 1989, Pedras & Seguin-Swartz 1992, Pedras et al. 2007, Pedras et al. 2008a, Mitrović et al., 2012). Mnogi selektivni toksini imaju određenu ulogu u virulentnosti patogenih gljiva (Howlett 2006, Wolpert et al. 2002). Uloga neselektivnih toksina u virulentnosti je složenija, a produkcija toksina nije uvek u korelaciji sa virulentnošću (Elliott et al. 2007).

Sirodezmini su neselektivni toksini koji izazivaju hlorozu, nekrozu, inhibiraju rast korena i odumiranje biljnih ćelija kod domaćina i biljaka koje nisu domaćini (Badawy & Hoppe 1989, Fox & Howlett 2008). Pored navedenog, ova jedinjenja se odlikuju antibakterijskim i antivirusnim osobinama (Rouxel et al. 1988). Prisustvo sirodezmina nespecifičnog za domaćina u filtratu kulture je omogućilo razvrstavanje izolata u *Tox<sup>+</sup>* ili *Tox<sup>0</sup>* (Balesdent et al. 1992, Fitt et al. 2006). Postojanje dva različita RFLP profila, povezana sa razlikama u patogenosti i proizvodnji pigmenta u tečnoj kulturi omogućuje klasifikaciju izolata u A (jako virulentni *Tox<sup>+</sup>*) ili B (slabo virulentni *Tox<sup>0</sup>*) grupu (Fitt

et al. 2006). U odsustvu RFLP analize agresivni (virulentni) izolati se mogu svrstati u grupu A na osnovu produkcije sirodezmina PL i nemogućnosti obrazovanja pigmenata u tečnoj Czapek-ovoj podlozi (Brun et al. 1997). Oznaka za B grupu je korišćena za slabo virulentne i avirulentne izolate, koji ne produkuju sirodezmin ali stvaraju pigment u tečnoj Czapek-ovoj podlozi (Williams & Fitt 1999). Brojna ranija istraživanja ukazuju da izolati A grupe imaju spor i nepravilan rast na nizu agaroznih podloga, dok izolati B grupe imaju brz i pravilan oblik kolonije (Humpherson-Jones 1986, Koch et al. 1989).

Prema literarnim navodima (Fitt et al. 2006, West et al. 2001) B grupa (*Leptosphaeria biglobosa*) pričinjava male štete na uljanoj repici koje se ogledaju u pegavosti gornjih delova stabla. Međutim, Balesdent et al. (1992) i Brun et al. (1997) navode da B grupa pored pegavosti lista može prouzrokovati i infekciju srži stabla. U *in vitro* uslovima, ponovljive razlike u morfologiji pseudotecija i nemogućnost ukrštanja A sa B grupom pojedinačnih askospora i ukrštanje suprotnih tipova sparivanja A sa A ili B sa B ukazale su da su dve grupe različite vrste nazvane *Leptosphaeria maculans* za A grupu i *Leptosphaeria biglobosa* za NA 1 B grupu (Somda et al. 1997, Shoemaker & Brun 2001). Na osnovu molekularnih karakteristika, vrste domaćina i geografskog porekla (Mendes-Pereira et al. 2003) su *Leptosphaeria* kompleks podelili u 7 grupa: *Leptosphaeria biglobosa brassicae*, *Leptosphaeria biglobosa canadensis*, *Leptosphaeria biglobosa erysimi*, *Leptosphaeria biglobosa thlaspii*, *Leptosphaeria biglobosa australensis*, *Leptosphaeria maculans brassicae* i *Leptosphaeria maculans lepidii*. Pored razdvajanja *Leptosphaeria* kompleksa u dve različite vrste odnosno u 7 grupa (vrsta) kod *L. maculans* je otkriveno 10 rasa označenih kao AvrLm1 do AvrLm9 i alm1 (Balesdent et al. 2002, 2005) i dve rase označene kao LepR1 i LepR2 (Yu et al. 2005). Za svaki AvrLm kod gljive je pronađen major gen kod uljane repice, označen kao RLM (Balesdent et al. 2005). Na osnovu genetičke raznolikosti, u populaciji *L. maculans*, dokazivanje i klasifikacija patogena se vrši pomoću diferencijalnog seta sorti kod kojih je utvrđen RLM gen koji odgovara određenom Avr lokusu *L. maculans*.

#### 4. 5. Morfološke karakteristike

Na krompir dekstroznoj podlozi (PDA), u zavisnosti od izolata i lokaliteta, gljiva obrazuje vazdušnu miceliju, sivobeke boje, dok je supstratna micelija mlečnobeke boje. Vremenom dolazi do obrazovanja bledocrnog pigmenta u podlozi (Pound 1947). Kolonije su pravilnog ili nepravilnog oblika, često sa režnjevitom ivicom (Pound 1947, Mitrović 1997). Humpherson-Jones (1986) i Koch et al. (1989) navode da izolati A grupe imaju spor i nepravilan rast na nizu agarizovanih podloga, dok izolati B grupe imaju brz porast i pravilan oblik. Mitrović (1997) takođe navodi da avirulentni izolati imaju brz porast u odnosu na virulentne izolate. Piknidi su dosta ravnomerno raspoređeni na površini kolonije i crne su boje. Gljiva obrazuje dva tipa piknida: tip 1 su piknidi skleroidnog oblika mrke boje sa suženom ostiolom prečnika 200–500  $\mu\text{m}$  i Tip 2 su piknidi loptastog oblika, crni, prečnika 200–600  $\mu\text{m}$  sa zidom koji je sastavljen od nekoliko slojeva ćelija od kojih je spoljašnji sloj ćelija sa zadebljanim zidom. Konidije (piknospore) su bezbojne, cilindrične, jednoćelijske, uglavnom prave, neke iskrivljene, sa ili bez kapi ulja na krajevima, veličine 3–5 x 1,5–2  $\mu\text{m}$  (Punithalingam & Holliday 1972). Osim piknida gljiva obrazuje i savršeni stadijum.

Pseudotecije se obrazuju na stabljikama nakon skidanja useva. U početku su uronjene u biljno tkivo a vremenom dolazi do pucanja epidermisa i do pojavljivanja ostiola pseudotecija na površinu stabljike. Pseudotecije su crne, loptaste, sa ili bez ostiole, prečnika 300–500  $\mu\text{m}$  (Punithalingam i Holliday, 1972). Pseudotecije sadrže veći broj askusa, a u svakom askusu se nalazi 8 askospora (West et al. 1999, Thürwächter et al. 1999). Askospore su prave do blago povijene, na krajevima su sužene i zaobljene, u početku svetlobraon a kasnije žutobraon, sa po 5 septi veličine 35–70 x 5–8  $\mu$  (Punithalingam & Holliday 1972; Williams 1992).

## V. MATERIJAL I METOD RADA

### 5. 1. Izolacija gljive i dobijanje monospornih kultura

Kulture gljiva izolovane su iz obolelih biljnih delova uljane repice koji su prikupljeni iz devet lokaliteta (Karavukovo, Crvenka, Prigrevica, Subotica, Rimski šančevi, Srbobran, Beška, Banatsko Karadordevo, Srpski Miletić) u periodu od 2008 do 2010. godine.

Gljive su determinisane na osnovu morfoloških karakteristika (porast, izgled i boja micelije, izgled ivice kolonije, prisustvo plodonosnih tela, lučenje pigmenta u tečnoj Czapek-ovoj podlozi, građa i izgled micelije, veličina, oblik, boja i građa pseudotecija, piknida, askusa, askospora i piknospora *L. maculans*; *L. biglobosa*), produkciji fitotoksina i virulentnosti izolata na diferencijalnim sortama. Od ukupnog broja (121 izolat), dva izolata su dobijena iz Velike Britanije označeni kao L.m (*L. maculans*) i L.b (*L. biglobosa*) i služili su kao kontrolni izolati u daljim istraživanjima, dok su ostali izolati poreklom iz Srbije.

Izolacija je rađena standradnim fitopatiološkim metodama. Isečeni su sitni fragmenti sa obolelih biljnih organa i potopljeni u 3% rastvor natriumhipohlorita u trajanju od 3 do 5 minuta, a nakon toga su isprani destilovanom vodom i prirodno sušeni u kontrolisanim uslovima. Nakon sušenja, fragmenti obolelog tkiva su naneti na hranjivu podlogu od krompir dekstroznog agara (PDA) (Difco Detroit USA) koja je prethodno razlivena u Petri kutije.

Da bi se sprečio razvoj bakterija, u podlogu je dodavano 50 mg streptomycin-sulfata (Galenika Beograd, Srbija) po litru. Petri kutije sa ovakvo zasejanom podlogom su stavljene u termostat na temperaturi od  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ . Posle 10–15 dana je posmatrano obrazovanje sporonosnih organa pod binokularom. Dobijanje čistih kultura (izolata) je urađeno na sledeći način: Piknospora, koje se oslobađaju iz piknida u vidu jedne sluzaste kapljice, poreklom sa hranjive podloge, vrhom kopljaste igle su prenete u

plastične epruvete u kojima je prethodno dodato 2 ml sterilne vode. Pripremljena suspenzija konidija je razlivena u Petri kutije. Posle 48 časova je posmatrano klijanje konidija pod binokularom. Klijuale konidije, zajedno sa delom podloge, prenete su na PDA podlogu i stavljene u termostat na  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$  radi razvoja monospornih izolata gljive. Na ovaj način je izolovano 119 izolata gljive koji su korišćeni u daljim ispitivanjima. Pored ovih izolata korišćena su i dva referentna izolata dobijena iz Centra za poljoprivredna proučavanja, Rothamsted, iz Velike Britanije, a označeni su sa L.m (*Leptosphaeria maculans*) i L.b (*Leptosphaeria biglobosa*).

Izolati koji su izolovani u Vojvodini označeni su početnim slovom biljnog dela (K-koren, C-cvet, L-list, S-seme) sa koga su izolovani, izuzev izolata sa stabla koji su označeni sa dva slova (St-prizemno stablo do 30 cm visine, GS-gornji delovi stabla i grana i Lj-ljuska). Nakon toga, determinisani izolati su presejani na kosu PDA podlogu i čuvani na temperaturi  $+ 4^{\circ}\text{C}$ .

## 5. 2. Morfološke karakteristike

Na PDA podlozi pri temperaturi  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$  proučavane su makroskopske osobine izolata (12 izolovanih i 2 kontrolna) gljive (porast, izgled i boja micelije, izgled ivice, kolonije, prisustvo plodonosnih tela, miris i lučenje pigmenata), kao i mikroskopske odlike (građa i izgled micelije, veličina, oblik, boja i građa askusa piknospora i askospora i merena veličina pseudotecija i piknida) (Muntanjola-Cvetković 1987). Ogled je postavljen u četiri ponavlja. Korišćeni su sledeći izolati: L.m i L.b kao referentni izolati i izolati K-112, K-113, K-114, K-115, K-117, K-8, LJ-3, L-10, GS-27, St-12, S-2 i C-5. Porast micelije navedenih izolata je izražen u cm posle 5, 10 i 15 dana.

## 5. 3. Dokazivanje postojanja teleomornog stadijuma gljive

Prisustvo savršenog, teleomornog stadijuma (*L. maculans*) je ispitivano na dva načina:

Žetveni ostaci sa jasno izraženim simptomima oboljenja su prikupljeni u lokalitetu Crvenke, u plastične kese (Magyar et al. 2006). Materijal je donet u Institut za ratarstvo i povrtarstvo i stavljen na površinu zemljišta. Neposredno u blizini žetvenih ostataka je



postavljen Burkardov hvatač spora (Burkard Manufacturing Co.Ltd) (McGee 1977, Thürwächter et al. 1999). Ogljed je postavljen 10. oktobra. Zbog nedostatka padavina tokom oktobra, stabljike su prskane vodom ( $3-5 \text{ mm/m}^2$ ) svaka 2 do 3 dana (Pérés et al. 1999). Mikroskopski pregled traka na Burkardovom hvataču spora je vršen svaki 7 dan. Nakon 20 dana je izvršen binokularni i mikroskopski pregled delova stabla. Pregledom je utvrđeno obrazovanje pseudotecija sa askusima bez askospora. Tom prilikom su uzeta inficirana stabla (10 cm dužine) koja su prethodno oprana česmenskom vodom i stavljena u polietilenske kese (Poisson & Pérés 1999; Naseri et al. 2009).

U svaku plastičnu kesu, pod kosim uglom, stavljeno je po 5 stabljika (ukupno 5 kesa) i dodato 25–30 ml destilovane vode. Kese su delimično zatvorene i u uspravnom položaju stavljene u kontrolisane uslove sa 12 h fotoperiodom. Noćna temperatura je podešena na  $8-10^\circ\text{C}$  a dnevna  $13-15^\circ\text{C}$ . Destilovana voda je dodata da bi obezbedila potrebnu vlažnost za obrazovanje pseudotecija askusa i askospora i za sakupljanje askospora, koje su kasnije korišćene za proveru patogenosti. Prvi pregled je urađen nakon 5 dana a naredni pregledi su vršeni svaka 2 dana. Nakon pojave askospora izvršeno je merenje pod mikroskopom zrelih pseudotecija, askusa i askospora i proučena građa i oblik askospora.

Pored morfoloških karakteristika, ispitivana su i patogena svojstva askospora na sledeći način: U džifi saksije, koje su prethodno napunjene kompostom, rasađeno je po 5 kljalih semena uljane repice sorte Banaćanka. U 3 saksije kotiledoni su povređeni sterilnom iglom. Na povređeni deo mikropipetom je naneto  $5 \mu\text{l}$  suspenzije askospora  $10^5$  (Koch et al. 1989). U sledeće 3 saksije kotiledoni su takođe povređeni, a inokulacija je rađena prskanjem kotiledona ručnom prskalicom. Kod treće grupe biljaka inokulacija je rađena prskanjem bez prethodnog povređivanja kotiledona. Kontrolne biljke uljane repice su tretirane destilovanom vodom. Inokulisane biljke, zajedno sa kontrolom, stavljene su u kontrolisane uslove na  $15^\circ\text{C}$  i 95% RH 24 časa a zatim su prenete u staklenik. Prvi pregled biljaka izvršen je posle 5 dana a pojava simptoma i promene na biljkama su posmatrane u narednih 20 dana. Reizolacija patogena iz obolelih delova je urađena nakon pojave simptoma.

Suspenzija askospora je napravljena na sledeći način: pomoću stereo mikroskopa pseudotecije, zajedno sa delovima biljnog tkiva, odvojene su kopljastom iglom od

ostaloga dela stabla i stavljen u destilovanu vodu (Mengistu et al. 1993). Ova mešavina je prenetu u epruvetu i ručno protresana. Zatim je sadržaj iz epruveta zajedno sa suspenzijom spora iz kesa proceđen kroz sito (140 MESH) u cilju odvajanja pseudotecija i askusa od askospora. Pomoću hemocitometra koncentracija suspenzije je podešena na oko  $10^5$  askospora po ml. Suspenzija askospora je stavljena u kontrolisane uslove temperature  $15^{\circ}\text{C}$  u narednih 48 h. Nakon klijanja askospora izvršena je provera patogenosti kako je prethodno opisano.

Nastanak (formiranje) pseudotecija i askospora u laboratorijskim uslovima je urađena po metodi (Petrie & Lewis 1985, Mengistu et al. 1995) uz određene modifikacije. Drvenasti delovi stabla ili grana bez simptoma oboljenja 8-9 cm dužine su stavljeni u Petri kutije i dva puta sterilisani na  $120^{\circ}\text{C}$  u trajanju od 20 min. Nakon sterilizacije u Petri posude je razlivena podloga od vodenog agara u koju je prethodno dodato 50 mg streptomycin-sulfata.

Tabela 1. Ukrštanje virulentnih izolata *L. maculans* i slabovirulentnih izolata *L. biglobosa*

Izolati	Lm	GS-13	C-2	K-112	LJ-1	St-1	K-11
St-1	+	–	+	–	–	+	+
C-2	+	+	+	+	–	+	–
Lm	+	+	+	+	+	+	–
GS-13	+	+	+	–	–	–	–
GS-11	+	+	+	+	–	–	–
GS-4	+	–	+	+	+	+	+
St-6	+	+	–	–	–	+	+
K-16	+	+	+	–	–	–	+
K-112	+	+	+	+	+	–	–
K-118	+	+	+	+	+	+	+
S-4	+	+	–	+	+	+	–
S-10	+	–	+	–	+	–	+
L-4	+	+	+	–	+	–	–
L-8	+	–	+	+	+	+	–
LJ-2	+	+	+	–	–	+	–
K-23	+	–	+	–	–	+	+

+ - izolati koji su međusobno ukrštanji

– - izolati koji nisu međusobno ukrštanji

Sa PDA podloge fragment micelije i piknida je stavljen pored stabla na 2-3 mesta. Sa druge strane je paralelno postavljen drugi izolat. U ovim ispitivanjima su korišćeni sledeći izolati: L.m, St-1, C-2, GS-13, GS-11, GS-4, St-6, K-16, S-4, S-10, L-4, L-8, LJ-

2, K-23, LJ-1, K-11 (*L. maculans*) i K-112 i K-118 (*L. biglobosa*). Kulture su inkubirane na  $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ , 6 dana u tami, a zatim je rast kultura nastavljen u blizini fluorescentne svetlosti od 320-380 nm sa 12 h fotoperiodom i temperaturom  $16^{\circ}\text{C}$ . Obrazovanje pseudotecija je praćeno u narednih 10 nedelja. Ukrštanje izolata (mating-type) je prikazano u tabeli 1.

#### 5. 4. Obrazovanje pigmenta u tečnoj Czapek-ovoj podlozi

U cilju razdvjanja izolata i određivanja njihove pripadnosti proučavanim gljivama (*L. maculas* i *L. biglobosa*), analizirali smo obrazovanje pigmenta u tečnoj Czapek-ovoj podlozi. Podloga je razlivena u epruvete i sterilisana u autoklavu na  $120^{\circ}\text{C}$  u trajanju 20 minuta. U svaku epruvetu je razliveno 10 ml podloge. Nakon hlađenja na podlogu je naneta micelija gljive (*L. maculans*: L.m, St-5, C-3, S-11 i *L. biglobosa*: K-113, K-115), a zatim su epruvete stavljene u uslove kontrolisane temperature ( $20^{\circ}\text{C}$ ) i 12 h fotoperiodom (McGee & Petrie 1978). Formiranje pigmenta je praćeno u naredne 4 nedelje na osnovu promene boje podloge.

#### 5. 5. Ekstrakcija, izolacija i karakterizacija fitotoksina

Za ekstrakciju, izolaciju i karakterizaciju fitotoksina je korišćeno 5 izolata gljive (K-113, C-3, St-5, S-11 i L.m). Svih 5 izolata ponaosob je zasejano u Czapek-ovu tečnu podlogu (McGee & Petrie 1978) koja je prethodno razlivena u epruvete. Izolati su gajeni u kontrolisanim uslovima temperature  $20^{\circ}\text{C}$  sa 12 h fotoperiodom. Nakon 30 dana je izvršeno filtriranje, odnosno micelija gljive je odvojena od tečne podloge. Filtrat je ekstrahovan etil-acetatom (6 ml etil-acetata je dodato u 5 ml filtrata kulture) (Koch et al. 1989, Pedras & Bisesenthal 2001). Voda iz organskog ekstrakta je odvojena dodavanjem natrium-sulfata ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ).  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  je odstranjen filtriranjem kroz kvalitativni filter papir nakon čega je vršeno uparavanje u struji azota. Suvi ostatak je, potom, rastvoren u 100 ml hloroforma, na sobnoj temperaturi. Hlorofomski rastvor je staklenim kapilarom nanet na tankoslojnu (TLC) ploču (silikogel 6,20x20 cm x0,25 mm

Macherey-Nagel) i potom stavljen u kadu za razvijanje, u kojoj se nalazi kao razvijlač etil-acetata: hloroform u odnosu 1:1.

Posle razvijanja, ploča je izvađena iz kade, osušena u sušnici na 20°C i posmatrana pod UV lampom (254 nm), pri čemu je jasno uočeno nekoliko izdiferenciranih traka za koje je na osnovu literaturnih podataka (Koch et al. 1989) pretpostavljeno da odgovaraju fitotoksinima, a na osnovu dobijenih preliminarnih rezultata postavljen je ponovo eksperiment sa većom količinom podloge za preparativno izolovanje fitotoksina. Na preparativnu ploču (silikogel G, debljina sloja 2 mm, Macherey-Nagel) nanet je hloroformski rastvor i uzorak je razvijen prema prethodno navedenom postupku. Mrlje detektovane pod UV svetlošću (označene sa 1, 2a, 2b, 2c, 2d i 3) su skinute sa preparativne ploče i svaka pojedinačno ekstrahovana u apsolutnom etanolu (20 ml) na sobnoj temperaturi, uz mešanje, u trajanju od 2 h. Nakon toga, etanolni ekstrakt je dekantovan i prečišćen preko kolone sefadeksa (SPE BARKER Bond SEPAA dex 6–25) prethodno kondicionirane sa 10 ml etanola. Etanolni filtrat je uparen u struji azota, a zatim je suvi ostatak korišćen za identifikaciju fitotoksina LC-MS-MS metodom i fitotoksični test.

## 5. 6. Identifikacija fitotoksina LC – MS – MS metodom

Suvi ostaci su ponovo rastvoreni u 0,5% etanolu a zatim su ispitani tehnikom tečne hromatografije sa tandemskom masenospektrometrijskom detekcijom. Korišćen je Agilent Technologies series 1200 Rapid Resolution Liquid Chromatograph instrument uparen sa Agilent Technologies series 6410A Triple – Quad masenim detektorom sa elektrosprej jonskim izvorom. Injektovano je 1 µl nerazblaženog uzorka.

Komponente su razdvojene na Zorbax Eclipse XDB-C18 koloni dimenzija 50mm x 4,6 mm x 1,8 µm (Agilent Technologies) temperiranoj na 40°C uzorak je eluiran u gradientnom modu: 0 min 30% B 7–10 min 100% B post time 2,5 min uz protok mobilne faze od 1 ml/min pri čemu je kao komponenta A korišćen 0,1% vodeni rastvor mravlje kiseline a kao komponenta B – 0,1% rastvor mravlje kiseline u acetonitrilu. Praćen je UV signal eluata na 210 nm i 240 nm (širina trake u oba slučaja 4 nm) uz 550 nm (širina trake 100 nm) kao referentnu talasnu dužinu. Kompletan eluat prosleđen je u

elektrosprej jonski izvor bez deljenja toka. Parametri jonskog izvora bili su: pritisak nebulajzera 40 psi temperatura gasa za sušenje 350°C protok gasa za sušenje 9l/min napon na kapilari 4000 V napon fragmentora 100 V. Svi uzorci su prvo analizirani u MS2Scan modu (MS<sup>1</sup> eksperiment) uz pozitivni polaritet u m/z opsegu 150–900. Zatim je reprezentativni uzorak (1/2b) analiziran u Production Scan modu (MS<sup>2</sup> i pseudo MS<sup>3</sup> eksperimenti) uz (M + N)<sup>+</sup> jone pretpostavljenih pikova sirodezmina kao jone prekursore i kolizioni napon 0–30 V (uz 10 V inkremente). Svi dobijeni podaci određeni su u MassHunter Workstation-Qualitative Analysis (ver. B.03.01) softveru (Agilent Technologies). U ispitivanim uzorcima detektovan je niz pikova jedinjenja čija molekulska masa i izotopski profil odgovaraju sirodezminima. LC-MS-MS analiza je urađena u laboratoriji za organsku hemiju Prirodno-matematičkog fakulteta Novi Sad, Departman za hemiju biohemiju i zaštitu životne sredine.

### 5. 7. Ispitivanje fitotoksičnosti

Na osnovu preparativnog izolovanja i LC – MS – MS analize izvršeno je ispitivanje fitotoksičnosti izolovanih fitotoksina. Frakcije (mrlje) označene sa 1, 2a, 2b, 2c, 2d i 3 sa preparativne ploče su ekstrahovane u etanolu i razblažene sa vodom do 0,5% koncentracije etanola. Različite frakcije toksina su nanete kao male 5 µl kaplje na povređeni deo kotiledona uljane repice sorte Quinta (Koch et al. 1989, Bodawy & Hoppe 1989). Inokulisane biljke su držane na 22°C ±2°C 70–80% relativne vlažnosti i 12 h fotoperiod. Simptomi su ocenjeni posle 2 dana korišćenjem skale po (Badawy & Hoppe 1989): - (nema simptoma); + (slaba nekroza inokulisanog kotiledona); + + (srednja nekroza); + + + (jaka nekroza); + + + + (nekroza celog kotiledona ili lista). Kao kontrola je korišćen sirovi ekstrakt izolata K-113.

### 5. 8. Određivanje patogenih grupa

Određivanje patogenih grupa (PG1, PG2, PG3, PG4) u Srbiji je urađena po metodi Koch et al. (1991), Mengistu et al. (1991), Chen & Fernando (2006). Seme je dezinfikovano potapanjem u 3% rastvor natrijumhipohlorita (NaOCl) u trajanju od 3 do 5 min, a nakon toga je isprano česmenskom vodom i sušeno na sobnoj temperaturi u

kontrolisanim uslovima. Uspešnost dezinfekcije je proverena na hranljivoj PDA podlozi. U po dve Petri kutije je naneto dezinfikovano seme sorti (Westar Quinta i Glacier) a kao kontrolna varijanta je korišćeno nedezinfikovano seme navedenih sorti. Nedezinfikovano seme je korišćeno kao kontrolna varijanta u odnosu na dezinfikovano seme sa ciljem dobijanja potvrde uspešnosti izvedene dezinfekcije. U svaku kutiju je stavljeno po 5 semena. Ovako pripremljene Petri kutije su stavljene u termostat na  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  u tami. Nakon 15 dana je izvršen vizuelni i mikroskopski pregled semena, podloge i izniklih biljaka. U plastične kontejnere sa ćelijama dimezija 4 x 5 cm koje su prethodno napunjene sa sterilisanim supstratom zasejana je po 1 biljka. Nakon nicanja (6-7 dana), kada su se kotiledoni razdvojili izvršena je inokulacija na sledeći način: sterilnom iglom je izvršena povreda jednog kotiledona dok drugi kotiledon nije povređivan. Na povređeni deo je mikropipetom naneto 5  $\mu\text{l}$  suspenzije piknospora čija je koncentracija bila ( $10^6/\text{ml}$ ).

Suspenzija piknospora je dobijena na sledeći način: svaki izolat je nanet na hranljivu PDA podlogu u tri ponavljanja. Nakon 10–15 dana na osnovu binokularnog pregleda u Petri kutije je dodato 10 ml sterilne destilovane vode (Bonman et al. 1981). Sterilni stakleni štapić je nežno povlačen preko površine piknida i micelije da bi došlo do oslobađanja piknospora. Oslobođene piknospore iz Petri kutije su procedene kroz 10 MESHSA sito u sterilne plastične tube.

Pomoću hemocitometra koncentracija je podešena  $10^6$  piknospora po ml, a nakon toga u svaku tubu je dodato 10  $\mu\text{l}$  maceriranog biljnog soka uljane repice. Pripremljena suspenzija je držana u kontrolisanim uslovima na temperaturi  $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  i 12 h fotoperiodu u trajanju od 56 h a zatim je korišćenja za inokulaciju. Klijavost piknospora je proverena na osnovu mikroskopskog pregleda. Nakon inokulacije biljke su prenete u kontrolisane uslove na temperaturu od  $20^{\circ}\text{C}$  95% RH i 12 h fotoperiod. Posle 48 h biljke su stavljene u uslove staklenika. Tokom praćenja pojave simptoma pravi listovi su odstranjivani više puta.

Posle 12 do 13 dana ogled je ocenjen po skali Koch et al. (1991): 0 – bez pojave pegavosti i nekroze oko povređenog dela, 1 – ograničeno tamnjenje tkiva oko povrede pega prečnika 0,5–1,5 mm, 3 – tamne nekrotične pege prečnika 1,5–3,0 mm, 5 – tamne pege 3–6 mm veličine na naličju lista braonkaste, 6 – kao kod ocene vrednosti skale 5

ali manje nekrotične površine na licu lista, 7 – sivozelene pege ograničene veličine ili velike nekrotične pege, 8 – velike sivozelene pege sa ili bez piknida, 9 – velike sivozelene pege sa obilnom sporulacijom. U ovim istraživanjima su korišćeni svi izolovani izolati iz Srbije (119 izolata) kao i 2 kontrolna izolata iz Velike Britanije. Svaki izolat je ispitivan na svim sortama uljane repice u 6 ponavljanja. S obzirom da izolati iz PG1 grupe prouzrokuju veoma slabe simptome na kotiledonima, a u cilju preglednosti izazvane fitotoksičnosti korišćena je i kontrolna varijanta (sorta Glacier, na čije kotiledone je naneta destilovana voda).

### 5. 9. Prenošnje patogena semenom

U cilju dokazivanja načina prenošenja parazita, urađen je test prenošenja parazita semenom. Dezinfekcija semena je urađena na isti način kao što je već napred opisano u poglavlju određivanje patogenih grupa. Suspenzija piknospora je dobijena na isti način ali nije proceđena kroz sito i nije dodavan macerirani biljni ekstrakt uljane repice. U pripremljenu suspenziju, u kojoj su se osim piknospora nalazili i delovi micelije, potopljeno je seme uljane repice Quinta. Potopljeno seme je držano na  $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  i 12 h fotoperiodom u narednih 48 h. Po 5 inokulisanih semena je zatim posejano u plastične kontejnere sa ćelijama prečnika 4 x 5 cm napunjene kompostom. Nakon setve, plastični kontejneri su držani na  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  i 12h fotoperiod. U ovom ogledu su korišćeni sledeći izolati: C-5, L-5, K-7, LJ-3, S-11, St-1, GS-3 (*L. maculans*) i K-113, K-115 (*L. biglobosa*). Pojava simptoma je ocenjivana nakon 7 i 14 dana od momenta nicanja. Ocene su vršene sa + = vidljivi simptomi na kotiledonima ili hipokotilu i – = zdrave biljke. Kod kontrolne varijante seme je potopljeno u destilovanu vodu. Ogled je postavljen u 6 ponavljanja, a patogenost izolata gljiva u odnosu na kontrolnu varijantu je testirana primenom Dunett-ovog testa. Posle 14 dana je urađena reizolacija patogena.

## 5. 10. Molekularna karakterizacija

Dosadašnja istraživanja pokazala su da morfološke karakteristike nisu dovoljne za pravilnu i pouzdanu deteminaciju gljiva izolovanih iz uljane repice. Zbog toga, u ovom istraživanju sprovedena je molekularna identifikacija svih proučavanih izolata.

Ekstrakcija DNK je izvršena:

- po O’Gorman et al. (1994), uz određene modifikacije po Kuusk et al. (2002);
- po Day and Shattock (1997);

## 5. 11. Ekstrakcija DNK

Micelija i piknidi su sastrugani sa PDA podloge u plastične kade. Nakon merenja težine, micelija je prenetu u sterilne avane u koje je dodat sterilni kvarcni pesak. Posle mlevenja (maceriranja) mešavini je dodato 500 µl ekstrakcionog putera (2% (w/v) CTAB 100 µl Tris-HCl pH 8,0, 20 mM EDTA pH 8,0, 1,4 M NaCl i 1% (w/v) polivinil pirolidona. Nakon inkubacije na 65°C u trajanju od 30 min mešavina je ekstrahovana sa fenol:hloroform:izoamil alkoholom u zapreminskom odnosu (25:4:1). Posle kratkog vorteksovanja (protresanja) u mikroeprovete dodat je hloroform i izoamil alkohol u zapreminskom odnosu (24:1). Sadržaj u mikroeprevetama je centrifugiran 10 minuta na 1300 g.

Nakon centrifugiranja tečna (gornja) faza oko 500 µl je prenetu u nove mikroeprovete i dodaje se 300 µl izopropanola. Ponovo se inkubira 10 min na sobnoj temperaturi a zatim se centrifugira 10 min na 1300 g. Posle centrifugiranja tečni deo je pažljivo odliven iz tube a zatim je dodato 600 µl rashlađenog 10% etanola. Nakon vorteksovanja u trajanju od 10 sekundi u inkubatoru tube su centrifugirane 10 min na 1300 g. Posle centrifugiranja tečnost iz tube je pažljivo odlivena i dodato 600 µl 70% etanola. Nakon kratkog vorteksovanja tečnost je odlivena a tube su stavljene u sušnicu na 50°C u trajanju od 10 min. Dobijeni talog je rastvoren u 25 µl TE pufera pH 8,0 posle čega je ekstrakt zamrznut na -20 °C. Na ovaj način je ekstrahovana DNK iz 7 izolata



(L.m. L. b. Referentni izolati i K-115, GS-25, ST-5, S-11, C-3. (O’Gorman et al. 1994 uz određene modifikacije po Kuusk et al. 2002).

Micelija i piknidi su skinuti sa podloge u plastične kade. Nakon merenja težine micelije i piknida preneti su u avan i dodata je mala količina kvarcnog peska. Nakon maceriranja u avane je dodato 800 µl CTAB pufera a zatim je smeša prenetu u tube 2 ml. Tube su stavljene u inkubator na 65°C u trajanju od 1 h a na svakih 15 min sadržaj u tubama je vorteksovan u trajanju od 5 min. Nakon inkubacije u tube je dodato 600 µl hloroforma i 10 sekundi je vorteksovan u inkubatoru na 25°C.

Tube su zatim centrifugirane 10 min na 1300g da bi došlo do razdvajanja čvrste i tečne faze. Tečna faza (oko 500 µl) je prenetu u nove tube i dodato je 300 µl izopropanola. Ponovo je inkubirana 10 min na sobnoj temperaturi a zatim centrifugirana 10 min na 1300 g. Nakon centrifugiranja tečnost je odlivena iz tuba a zatim je dodato 600 µl 70% etanola. Tube su vorteksovane 10 sekundi u inkubatoru a zatim centrifugirane 10 min na 1300 g posle čega je izvršeno odlivanje tečnosti iz tuba. Otvorene tube su stavljene u sušnicu na 50 °C u trajanju od 10 min. Dobijeni talog je rastvoren u 100 µl TE pufera i ostavljen nekoliko minuta na sobnoj temperaturi a zatim zamrznut na –20 °C. Na ovaj način je ekstrahovana DNK iz svih izolata (ukupno 123) uključujući i referentne izolate (Day & Shattock 1997).

**Lančana reakcija polimeraze (PCR)** Ekstrakt DNK je odmrznut i izmerena je koncentracija DNK na spektrofotometru. Iz tube je mikropipetom 10 µl DNK preneto u kivetu gde je već dodato 500 µl destilovane vode. Napravljena smeša je stavljena u spektrofotometar i očitana je koncentracija DNK koja ne sme biti ispod 50 ng/µl posle čega je izvršeno pravljenje mešavine za PCR analizu. Za izvođenje PCR analize (Kuusk et al. 2002) su korišćena: dva prajmera 5’-CCCAGTGCAGTTCCAG-3’ i 5’-CATAGCAAGTGTGCATCG-3’ (APH12 prajmeri Sambrook et al. 1989 cit loc. Kuusk et al. 2002) koji amplifikuju (umnožavaju) fragment oko 1900 bp (*L. biglobosa*) i dva prajmera 5’-GCGTAAGAAGCGTGCCTTAGAGTC-3’ i 5’-TCCTGCTCCTACTCCTTCTCTAGC-3’ (LMR1 prajmeri Taylor & Borgmann 1994) koji amplifikuju fragment oko 580 bp i koriste se za identifikaciju grupe A izolata (*L. maculans*).

PCR reakcija je obavljena u ukupnoj zapremini od 25 µl koja sadrži: 1 µl gljivične DNK (*L. maculans* i *L. biglobosa*) 11 µl PCR vode 12,5 µl master mix REDTaq (Sigma Aldrich) sa MgCl<sub>2</sub> (Taq polimeraza 0,06 U/ µl 3mM MgCl<sub>2</sub> 0,002% želatina i 0,4 mM dNTP) i po 12,5 µl svakog prajmera. Napravljena smeša je kratko centrifugirana a zatim su tube stavljene u PCR aparat (Eppendorf master cycler gradient). Amplifikacija je urađena po sledećem PCR programu: 94° za 2 min sledećih 30 ciklusa, 2 min na 94°C, 2 min na 55°C (LMR1 prajmeri), odnosno 2 min na 60°C (APH 12 prajmeri) i 3 min na 72°C. PCR amplifikacija fragmenta je vizuelno posmatrana na 1,5% agaroznom gelu obojenim sa etidijum bromidom. Pored navedenih prajmera za PCR amplifikaciju su korišćeni i prajmeri PN3(5'CCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATC) i PN-10(TCCGCTTATTGATATGCTTAAG) po Balesdent et al. (1998).

Amplifikacija je obavljena u ukupnoj zapremini od 25 µl koja sadrži: 1 µl gljivične (*L. maculans* i *L. biglobosa*) DNK 11 µl PCR vode 12,5 µl master mix REDTaq (Sigma aldrich) sa MgCl<sub>2</sub> (Taq plimerase 0,06 U/µl 3 mM MgCl<sub>2</sub> 0,002% želatin 0,4 mM dNTP) i po 1,25µl svakog prajmera. Napravljena smeša je kratko centrifugirana a zatim su tube stavljene u PCR aparat (Eppendorf master cycler gradient). Svaki ciklus se sastojao od 30 s na 94°C, 30 s na 58°C i 1 min na 72°C. Ukupno je obavljeno 37 ciklusa. Nakon završene PCR amolifikacije fragmenti su vizuelno posmatrani na 1,5% agaroznom gelu obojenim sa etidijum bromidom.

## 5. 12. PCR–RFLP analiza

Od ukupno 119 izolata plus dva referentna izolata za PCR-RFLP analizu su korišćeni sledeći izolati: L.b (referentni izolat *L. biglobosa*) K-111, K-112, K-113, K-114, K-115, K-116, K-2, St-16, GS-25, L-5, C-3, LJ-2, S-1 i L.m. (referentni izolat *L. maculans*).

PCR-RFLP analiza je urađena po (Balesdenet et al. 1998) uz preporuke proizvođača (Fermentas life science). Deset mikrolitara PCR produkta dobijenih korišćenjem PN3 I PN10 prajmera je digestovano za 5 h na 37°C sa 20 U sa jednim od sledećih enzima: BamHI, HaeIII, RsaI, EcoRII i AluI. Nakon inkubacije restrikcioni fragmenti su posmatrani u 1,5% agaroznom gelu obojenim sa 20 µl etidijum bromida.

Za ovu analizu izolati su nasumično odabrani. Izolati K-2, St-16, GS-25, L-5, C-3, LJ-2 i S-1 u ovim ispitivanjima su na neki način predstavljali grupu odnosno biljni organ sa koga su izolovani. Od ukupno 8 pod oznakom K-111, K-112, itd. za RFLP analizu je korišćeno 6 izolata. S obzirom da ovih 8 izolata u morfološkom pogledu je pokazalo veliku sličnost sa referentnim izolatom L.b 6 izolata je korišćeno za PCR-RFLP analizu da bi se identifikovalo kojoj podgrupi NA-1, NA-2 ili NA-3 *L. biglobosa* pripadaju izolati poreklom iz Srbije. Molekularna istraživanja su urađena u biotehnološkoj laboratoriji Poljoprivrednog instituta u Banja Luci.

## VI. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

### 6. 1. Simptomi bolesti

Simptome suve truleži (blackleg), odnosno rak stabla (stem canker) uljane repice prouzrokuju dve vrste *L. maculans* i *L. biglobosa*. Patogen (*L. Maculans*) prouzrokuje simptome bolesti na biljkama uljane repice od faze kotiledona pa sve do zrenja useva. U fazi kotiledona gljiva prouzrokuje suženje prizemnog dela stabla usled čega biljke poležu i propadaju, a na kotiledonima okruglaste sivkaste pege u okviru kojih micelija gljive obrazuje brojna mrka telašca-piknide. Napadnuti kotiledoni se suše i propadaju. Pojava simptoma u ovoj fazi razvoja je uglavnom uzrokovana setvom zarazenog semena ili ponovljenom setvom. Od faze kotiledona pa sve do zrenja, patogen vrši infekciju uglavnom pomoću askospora. Oslobođene askospore padaju na površinu lista i u povoljnim uslovima inficiraju list preko stominih otvora (sl. 1).



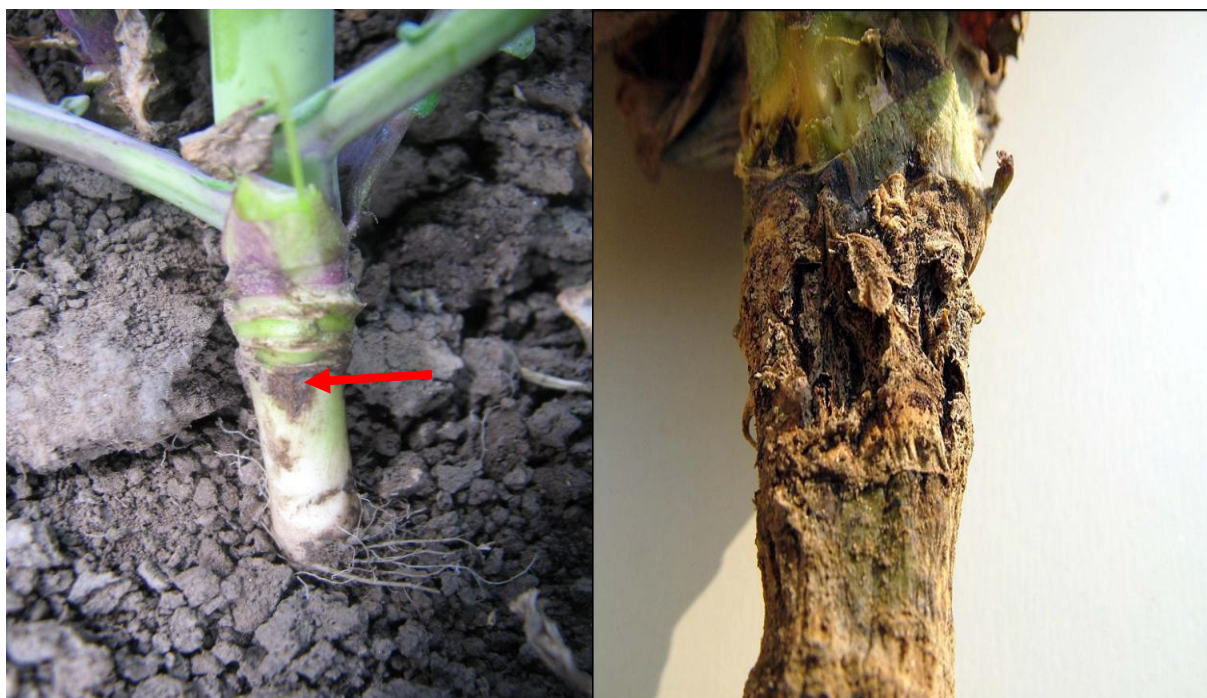
Askospora klija u infektivnu hifu koja u biljnom tkivu obrazuje haustoriju. Porast hife u biljnom tkivu prouzrokuje prve uočljive znake infekcije palisadnih ćelija. Sa zaraženog lista micelija gljive tokom jeseni prelazi na vrat korena prouzrokujući promene tkiva u vidu mrkih pega (sl. 1a).

Slika 1. Inficirani list uljane repice *L. maculans*

U okviru ovih pega micelija gljive prezimljava i nastavlja razvoj iduće godine prouzrokujući simptome suve trulezi (blackleg) korena (sl. 1b). Napadnute biljke u

početku venu zatim se suše i ne donose prinos. U proljetnom delu vegetacije (april, maj) oslobodjene askospore inficiraju praktično sve nadzemne organe biljke. Na prizemnom i gornjem delu stabla i grana parazit prouzrokuje nekrotične pege i do nekoliko centimetara dužine, oivičene tamnijim (marginom) rubom (sl. 2a i 2b).

Tkivo u okviru pega puca, te natak način se stvaraju rak rane sa brojnim obrazovanim piknidima gljive. Kod inficiranih biljaka jedan deo ljuski je nedovoljno ispunjen ili su zrna štura. Veoma često u vreme nalivanja zrna (druga polovina maja i prva dekada juna) pojačani vetrovi izazivaju lomljenje biljaka na mestu infekcije, što dovodi do poleganja, povećanog procenta praznih ljuski i otežanog skidanja useva. Pored navedenih parazit prouzrokuje uvelost i propadanje cvetova (sl. 3), pegavost ljuski (sl. 4) i lista (sl. 5). Sa zaraženih ljuski micelija gljive prelazi na seme (sl. 6). Inficirano seme ima znatno manji sadržaj ulja i proteina, a kod semenskih useva se ne može koristiti za setvu.



Slika 1a. Početni simptomi suve truleži vrata korena uljane repice

Slika 1b. Krajnji simptomi suve truleži vrata korena uljane repice



Slika 2a. Simptomi raka prizemnog dela stabla uljane repice

Slika 2b. Simptomi raka gornjeg dela stabla uljane repice



Slika 3. Uvelost cvetova uljane repice prouzrokovane gljivom *L. maculans*

Slika 4. Pega na ljusci uljane repice prouzrokovane gljivom *L. maculans*



Slika 5. Pega na listu uljane repice prouzrokovana gljivom *L. maculans*



Slika 6. Seme (levo: zdravo seme, desno: zaraženo)

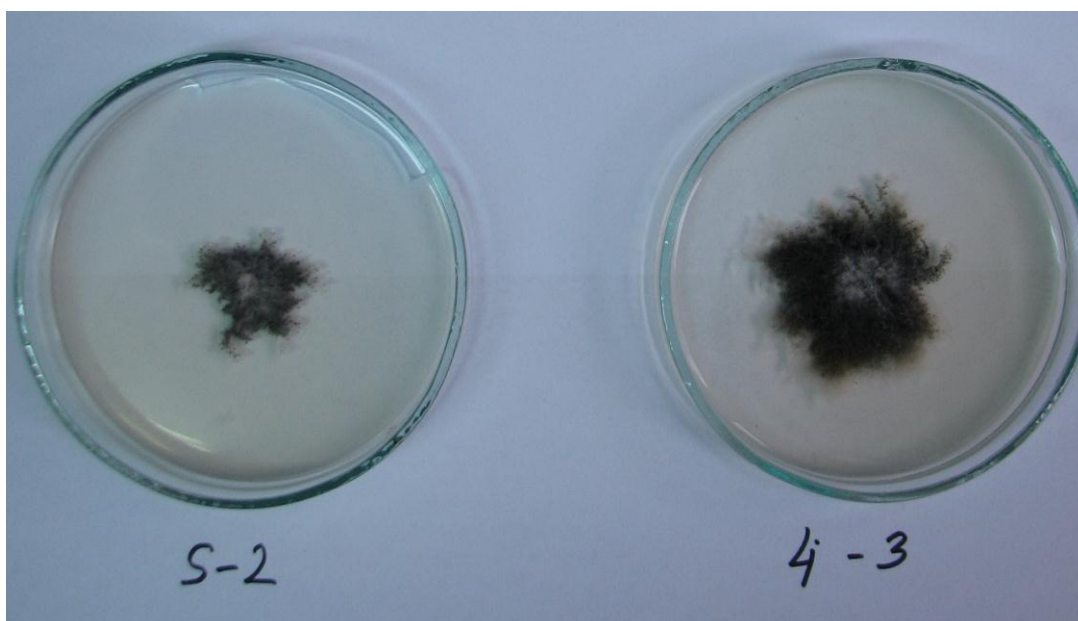
## 6. 2. Morfološke karakteristike proučavanih izolata

Na PDA podlozi posle 5 dana (na temperaturi  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) izolati (L.m, St-12, LJ-3, L-10, C-5, GS-27, S-2, K-8) obrazuju okruglasto nepravilne kolonije sa režnjevitim obodom. Micelija je rastresita bele do prljavobele boje. Supstratna micelija je prljavobele boje i nepravilnog oblika. Kod druge grupe izolata (L.b, K-112, K-113, K-114, K-115, K-117) vazдушna micelija je prljavobele boje, a kolonije su okruglastog oblika. Supstratna je takođe prljavobele boje okruglastog oblika sa ravnim obodom.

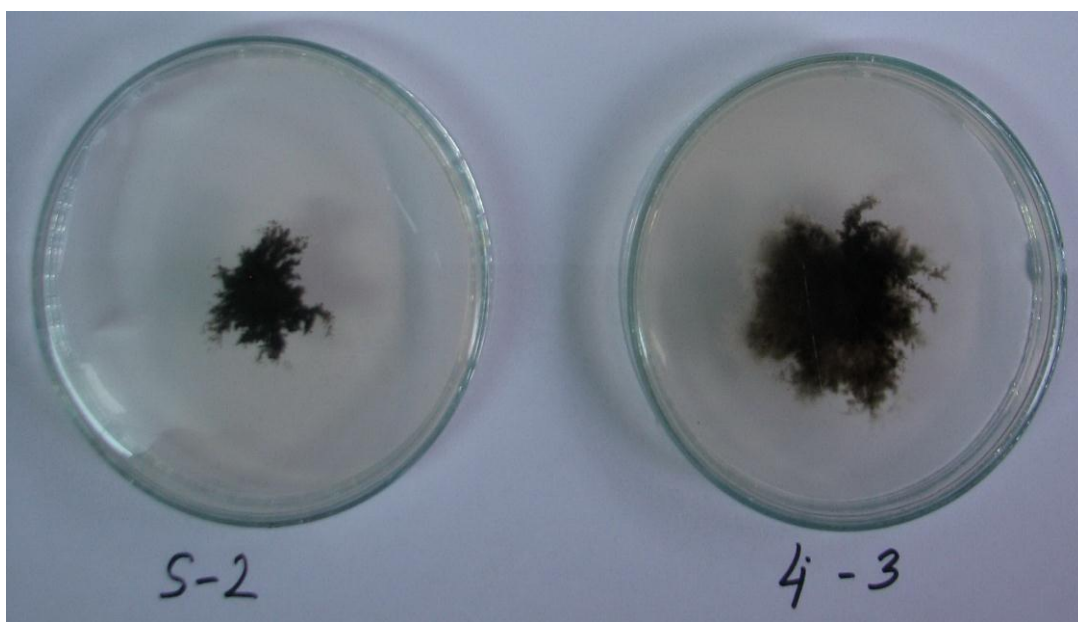
Posle 10 dana (L.m, L-10, LJ-3, K-8, GS-27, St-12, S-2, C-5) kolonija ima nepravilan oblik (u zavisnosti od izolata okruglastorežnjevit do režnjevit) sa nazubljenom ivicom. Centralni deo kolonije je crne boje, koja potiče od obrazovanih piknida, dok je rubni deo prljavobele boje. Supstratna kolonija je takođe, po obliku nepravilna, crne (mrke) boje, nazubljenih ivica sa rubom prljavobele boje. Kod izolata L.b, K-112, K-113, K-114, K-115, K-117 vazдушna kolonija je okruglastog oblika, po ivicama nazubljena. Centralni deo kolonije je žutomrke boje, dok je rub prljavobele, sa

početkom formiranja sporonosnih tela. Supstratna kolonija je okruglasta, sa pojavom žutomrkog pigmenta u centralnom delu, dok je rub prljavobele boje nazubljenih ivica.

Posle 15 dana (L.m, L-10, LJ-3, K-8, GS-27, St-12, S-2, C-5) vazдушna kolonija zbog obilne fruktifikacije, ima mrku boju, a samo pojedini delovi ruba kolonije su prljavo bele boje. Sa starošću rubni deo kolonije postaje sve nepravilniji. Izgled vazdušne i supstratne kolonije (LJ-3 i S-2) ispitivanih izolata je prikazan na slikama 7 i 8.



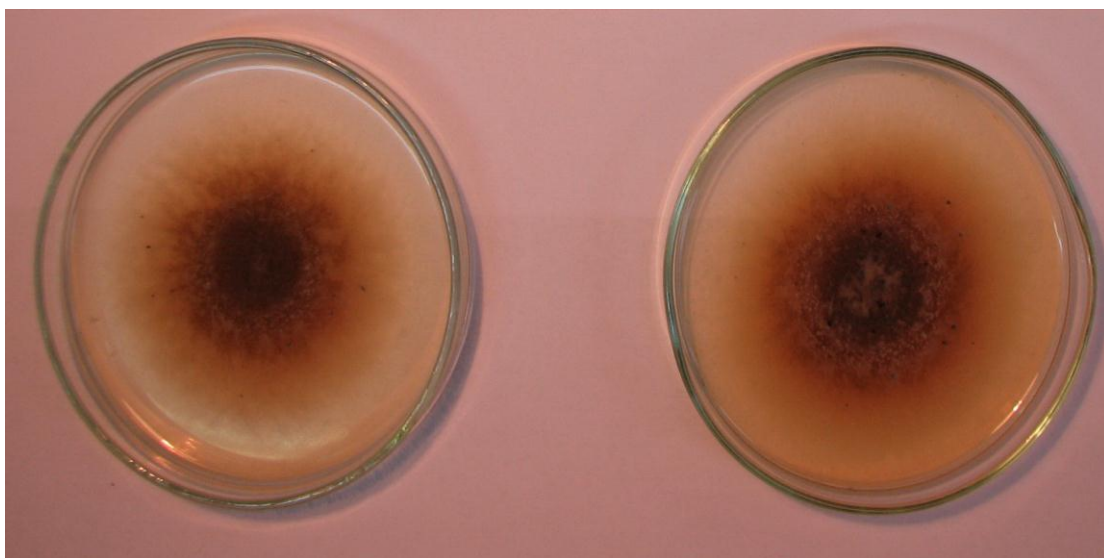
Slika 7. Izgled vazdušne kolonije na PDA podlozi kod (S-2 i LJ-3) izolata



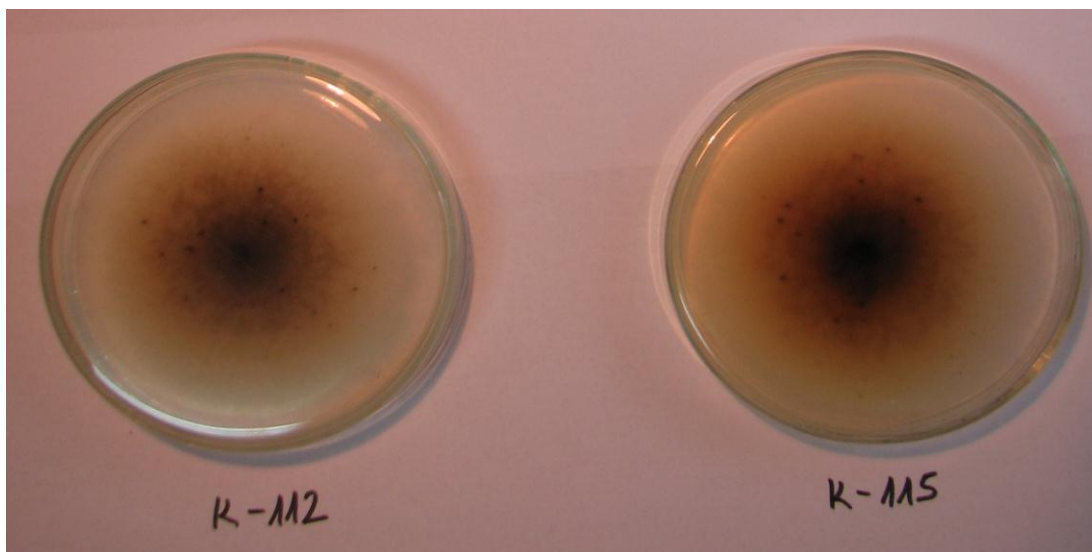
Slika 8. Izgled supstratne kolonije na PDA podlozi kod (S-2 i LJ-3) izolata



Posle 15 dana (L.b, K-112, K-113, K-114, K-115, K-117) u supstratnom delu kolonije je došlo do intenzivnijeg formiranja žutomrkog pigmenta. Vazдушna kolonija je sivomrka, dok je rub kolonije prljavobele boje. Izgled vazdušne i supstratne kolonije kod ispitivanih izolata K-112 i K-115 je prikazan na slikama 9 i 10. Piknidi su okruglasti, mrke boje, pojedinačni ili u stromatičnim tvorevinama. Prečnik piknida kod L.b, K-112, K-113, K-114, K-115 i K-117 izolata se kretao od 240–480 $\mu$ m, a kod izolata L.m, L-10, LJ-3, K-8, GS-27, St-12, S-2, C-5, od 220 x 510  $\mu$ m.



Slika 9. Izgled vazdušne kolonije na PDA podlozi kod K-112 i K-115 izolata



Slika 10. Izgled supstratne kolonije na PDA podlozi kod K-112 i K-115 izolata

Piknospore se oslobađaju iz piknida u vidu jedne želatinozne kapi, krem do ružičaste boje (Sl. 11). Piknospore su jednoćelijske, hijalne, kratko cilindrične, uglavnom prave, neke malo povijene, sa ili bez kapi ulja na krajevima veličine 1,30 x 2,20 x 2,80–5,40  $\mu\text{m}$ , uglavnom kod svih ispitivanih izolata. Porast micelije i sporulacija ispitivanih izolata prikazan je u tabeli 2.



Slika 11. Izgled želatinoznih, ružičasto-crvenkastih kapi piknospora oslobođenih iz piknida na zaraženom stablu uljane repice

Tabela 2. Prečnik (cm) i sporulacija kolonija ispitivanih izolata *L. maculans* i *L. biglobosa* na PDA podlozi i temperaturi  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$

Izolat	Posle 5 dana	Sporulacija	Posle 10 dana	Sporulacija	Posle 15 dana	Sporulacija
<b>L.b</b>	1,55	-	4,30	-	9	+
<b>K-112</b>	1,57	-	4,02	+	9	+
<b>K-113</b>	1,50	-	4,42	+	9	+
<b>K-114</b>	1,50	-	4,35	+	9	++
<b>K-115</b>	1,60	-	4,40	+	9	++
<b>K-117</b>	1,57	-	4,45	-	9	+
<b>L-10</b>	1,67	-	2,35	+	4,10	+++
<b>LJ-3</b>	1,73	-	2,60	+	4,55	+++
<b>K-8</b>	1,57	-	2,95	++	4,60	+++
<b>L.m</b>	1,51	-	3,30	++	4,70	+++
<b>St-12</b>	1,48	-	2,95	++	3,90	+++
<b>S-2</b>	1,40	-	2,32	+	2,70	+++
<b>C-5</b>	1,80	-	2,42	++	4,05	+++
<b>GS-27</b>	1,50	-	2,40	+	3,05	+++

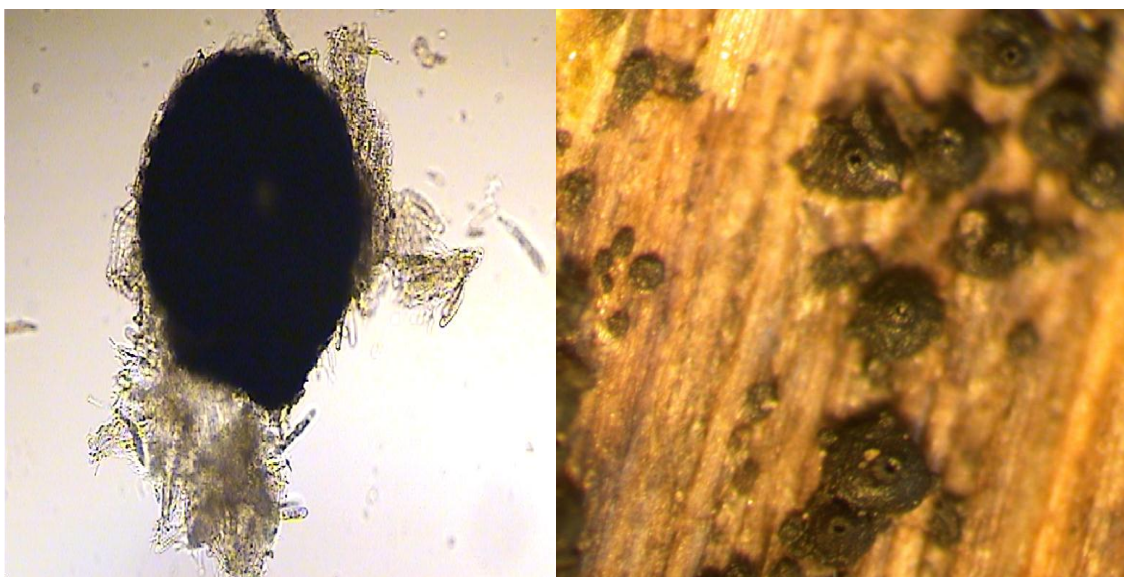
- Nema sporulacije; + Slaba sporulacija; ++ Srednja sporulacija; +++ Jaka sporulacija

Na osnovu tabele 2 može se zapaziti da izolati *L. biglobosa* (L.b, K-112, K-113, K-114, K-115, K-117) imaju brz porast na PDA podlozi. Sporulacija kod izolata *L. maculans* (L.m, L-10, LJ-3, K-8, St-12, S-2, C-5 i GS-27) je dosta slabija u odnosu na grupu izolata koji pripadaju *L. biglobosa*. Razlike u porastu koje se mogu zapaziti između ispitivanih izolata su zbog reznjevitog izgleda kolonija prilikom merenja.

### 6. 3. Dokazivanje postojanja teleomornog stadijuma gljive

Prisustvo askospora patogene gljive *L. maculans* kod nas je otkriveno na dva načina, kao što je opisano u materijalu i metodi rada. Prva pojava askospora na osnovu mikroskopskog pregleda traka Burkardovog hvatača spora je primećena 13. novembra 2009. godine. Od 13. Novembra na svakih 7 dana, je vršen pregled do 20. decembra 2009. U tom periodu, najobilnije oslobađanje askospora je primećeno krajem novembra i početkom decembra. Zbog niskih temperatura (golomrazica), a kasnije i snežnih padavina dalje praćenje oslobađanja askospora je prekinuto. Praćenje njihovog oslobađanja je nastavljeno tokom proleća naredne godine. Oslobađanje je praćeno do 20. maja. Iz istih žetvenih ostataka tokom 2010. prvo oslobađanje je primećeno krajem marta i početkom aprila. Od 15. aprila do 20. maja uglavnom je oslobađanje askospora (brojčano posmatrano) bilo približno isto. I tokom jeseni i u prolećnom delu prilikom mikroskopskog pregleda uočeno je da se askospore najviše oslobađaju u drugom delu dana.

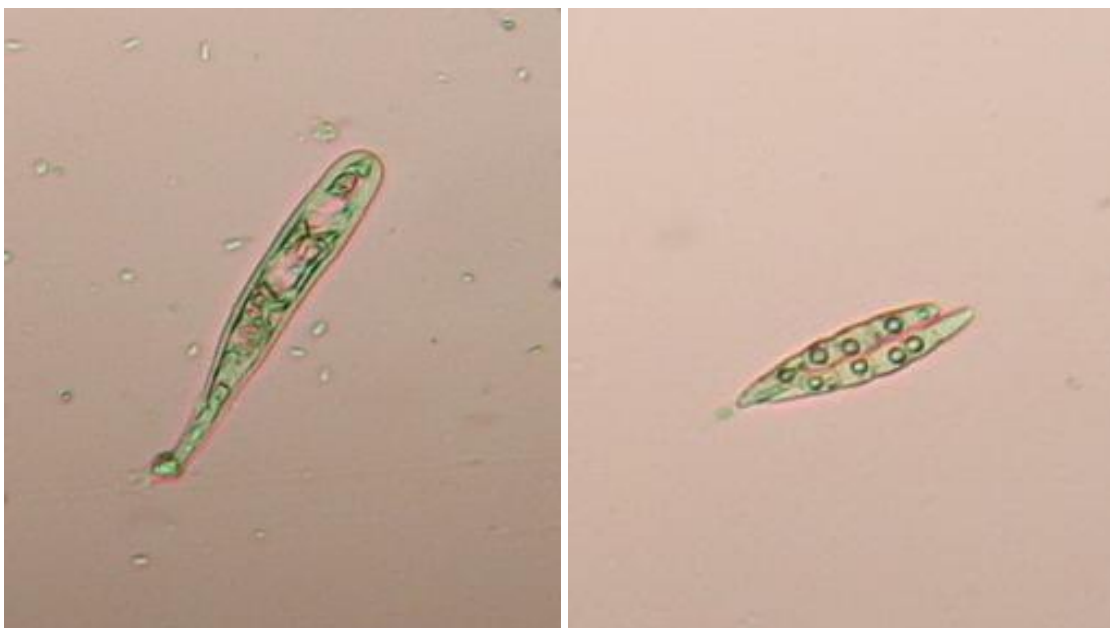
Prvi pregled inficiranih stabala uljane repice stavljenih u plastične kese u laboratorijskim uslovima je izvršen nakon 5 dana, binokularnim pregledom pseudotecija tokom 2009.godine. Kasniji pregledi su vršeni na svakih 48 h i prva pojava askospora je registrovana nakon 11 dana. Nakon pojave askospora izvršeno je merenje i proučena građa sporonosnih organa. Pseudotecije su okruglastog oblika mrke boje sa kratkim vratom, prečnika od 313 do 532  $\mu\text{m}$  (Sl. 12). Ostiole (vrat) se pojavljuju u momentu oslobađanja askospora (Sl. 13).



Slika 12. *L. maculans*.  
Pseudotecija gljive

Slika 13. *L. maculans*.  
Pseudotecije sa obrazovanim ostiolama

Askusi su cilindrični do topuzasti sa kratkom drškom hijalni i na mestu gde se nalazi drška su suženi dok na drugom kraju su veoma prošireni veličine 16,72–21,39  $\mu\text{m}$  x 90,00–160,00  $\mu\text{m}$  (Sl. 14). U askusima se nalaze askospore složene u po dva reda. Askospore su prave do blago povijene i sužene na krajevima žutomrke boje sa 5 septi veličine: 6–10,5  $\mu\text{m}$  x 42–74  $\mu\text{m}$  (Sl. 15). Uljane kapi su u početku retke, sa starenjem zrnasti sadržaj dolazi do izražaja i tada se septe teško uočavaju.



Slika 14. *L. maculans*. Askus gljive

Slika 15. *L. maculans*. Askospore gljive

#### 6. 4. Infektivnost askospora

Infektivnost askospora je ispitivana na kotiledonima uljane repice sorte Banaćanka prema postupku opisanom u metodama rada. Prva pojava simptoma se mogla zapaziti već posle 5 dana u vidu hloroze oko povređenog mesta. Nakon 7 dana hloroza je obuhvatila ceo kotiledon. Na biljkama gde je suspenzija konidija naneta prskanjem kotiledona pegavost se pojavila kasnije takođe u vidu hlorotičnih pega. Kasnije kod sva tri načina inokulacije kotiledona, centar pega je poprimio sivkastu boju sa nekrotičnim rubom (Sl. 16). Pojava plodonosnih tela je zapažena 15 dana posle inokulacije. Rizolacijom na hranjivu PDA podlogu dobijen je konidiski stadijum gljive opisan pod imenom *Phoma lingam* (Tode: Fr.) Desmaz.



Slika 16. *L. maculans*

Simptomi na mladim biljkama uljane repice nastali pri inokulaciji kotiledona askosporama (slika desno) – Kontrolne neinokulisane biljke (slika levo)

## 6. 5. Obrazovanje pseudotecija i askospora u laboratorijskim uslovima

Nakon 10 nedelja od postavljanja ogleda izvršen je binokularni i mikroskopski pregled ukrštanih izolata. U tabeli 3 je prikazano kod kojih izolata su se obrazovale pseudotecije i askospore.

Tabela 3. Obrazovanje pseudotecija i askospora nakon ukrštanja virulentnih izolata *L. maculans* i slabovirulentnih izolata *L. biglobosa*

Izolat	L.m	GS-13	C-2	K-112	LJ-1	St-1	K-11
St-1	-	0	-	0	0	-	+
C-2	+	-	-	-		-	0
L.m	-	-	+	-	-	-	0
GS-13	-	-	-	0	0	0	0
GS-11	-	-	-	-	0	0	0
GS-4	-	0	-	-	+	-	+*
St-6	-	-	0	0	0	-	+
K-16	-	+	-	0	0	0	-
K-112	-	-	-	-	-	0	0
K-118	-	-	-	-	-	-	-
S-4	-	+	0	-	+	+*	0
S-10	-	0	-	0	-	0	+*
L-4	-	+*	-	0	+	0	0
L-8	+	0	+	-	-	-	0
LJ-2	-	+*	-	0	0	+	0
K-23	-	0	-	0	0	-	-

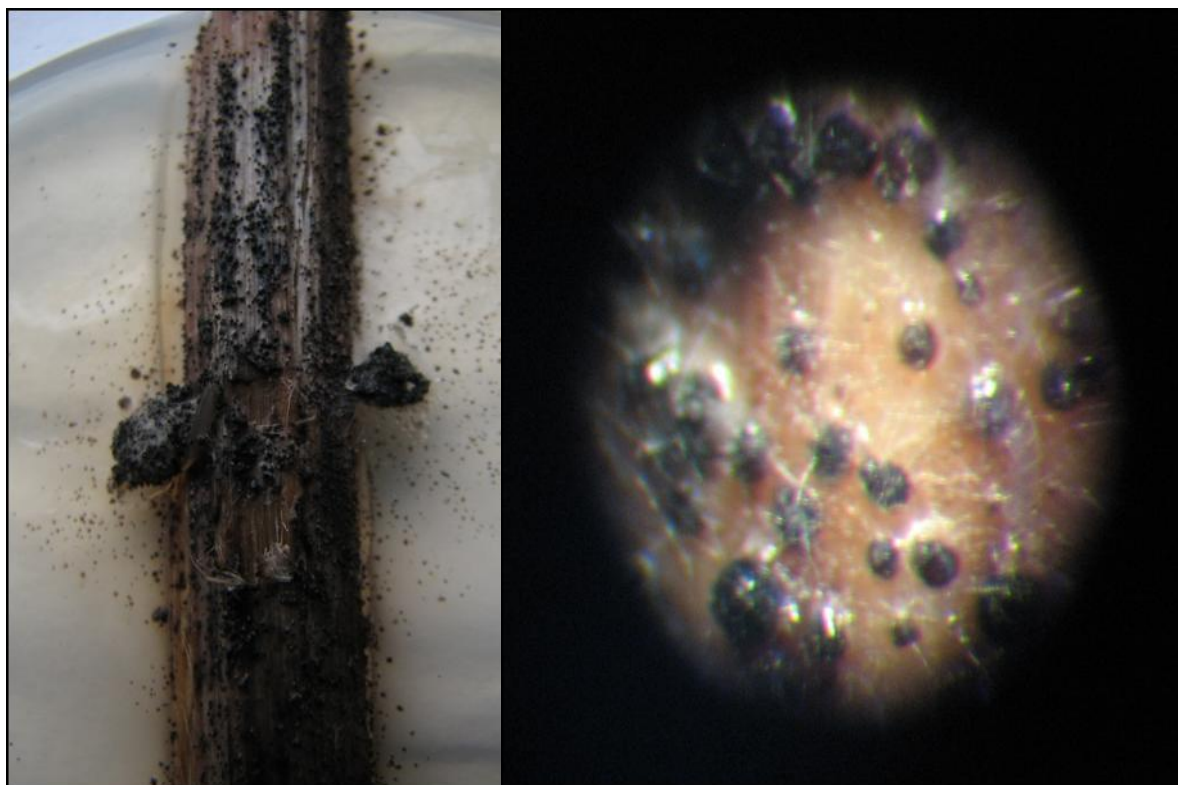
+ = Obrazovane pseudotecije sa askosporama

+<sup>\*</sup> = Obrazovane pseudotecije bez askospora

- = Odsustvo pseudotecija

0 = Nisu sparivani izolati

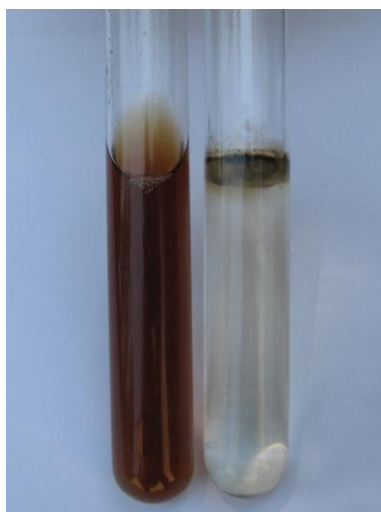
U tab. 3 se može zapaziti da izolat L.m. (referentni izolat) iz geografski udaljenih regiona pokazuju kompatibilnost kod ukrštanja. Ni jedno ukrštanje nije dobijeno (obrazovanje pseudotecija) između virulentnih (L.m., St-1, C-2, GS-13, GS-11, GS-4, St-6, K-16, S-4, S-10, L-4, L-8; Lj-2, K-23, K-11) i slabovirulentnih izolata (K-112 i K-118) (tab. 1). Ova ukrštanja takođe pokazuju da izolati poreklom iz Vojvodine pripadaju različitim tipovima sparivanja, što može dovesti do stvaranja novih virulentnih rasa parazita (sl. 17a i b).



Slika 17a i b. Pseudotecije dobijene u laboratorijskim uslovima

## 6. 6. Obrazovanje pigmenata u tečnoj Czapek-ovoj podlozi

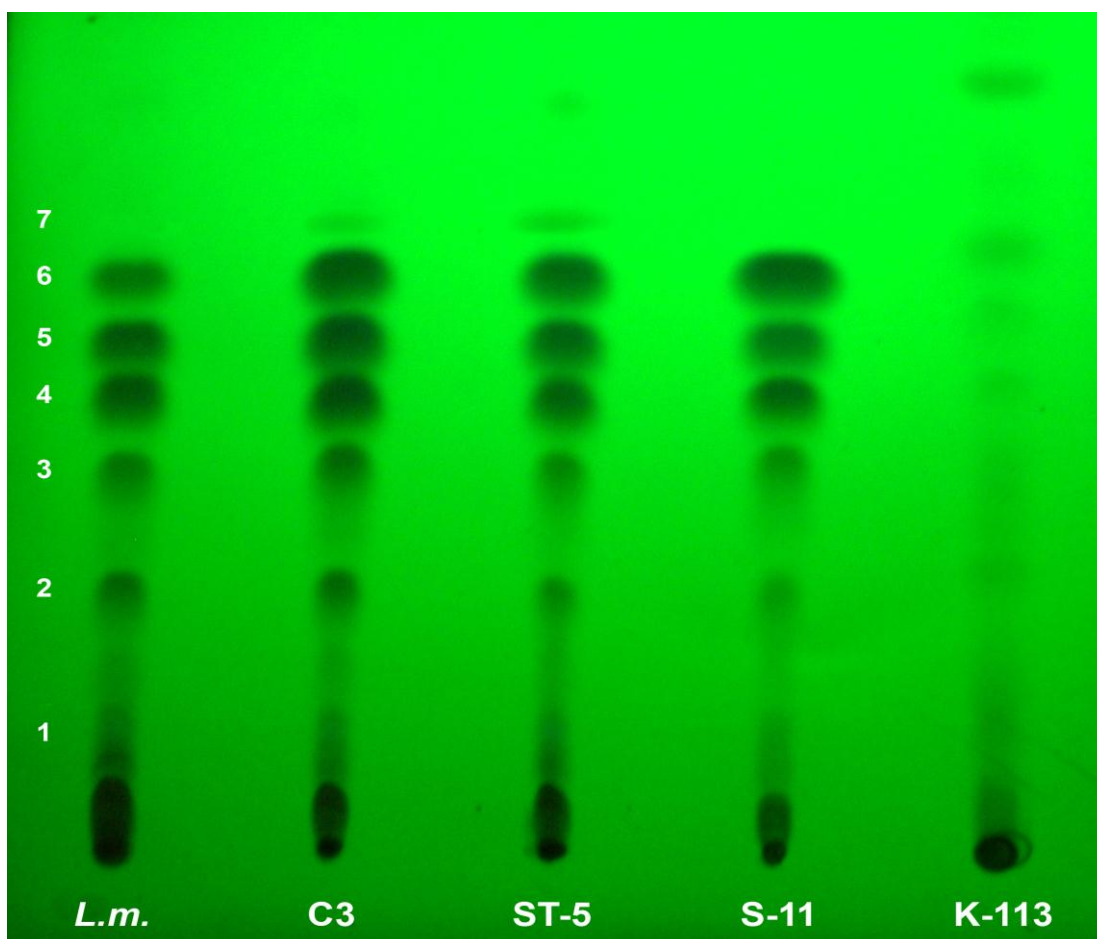
U cilju razdvajanja izolata na osnovu obrazovanja pigmenata u tečnoj Czapek-ovoj podlozi, zapaženo je da nakon 30 dana izolati *L. maculans* (L.m, St-5, C-3, S-11) nisu produkovali žutomrki pigment, u odnosu na izolate gljive *L. biglobosa* (K-113 i K-115), koji obrazuju žutomrki pigment u tečnoj Czapek-ovoj podlozi (sl. 18).



Slika 18. Produkcija pigmenata u tečnoj Czapek-ovoj podlozi

## 6. 7. Ekstrakcija, izolacija i karakterizacija fitotoksina

Na osnovu ekstrakcije i karakterizacije fitotoksina koje proizvode patogeni gljivi *L. maculans* pregledom TLC ploča pod UV lampom uočeno je 6 tačaka (mrlja) kod izolata L.m, St-5, C-3, S-11, za koje je pretpostavljeno da odgovaraju fitotoksinima, a na osnovu literarnih podataka (Koch et al. 1989). Takođe je uočeno da kod izolata K-113, mrlje na TLC ploči nisu jasno izdiferencirane (uočljive), a ni Rf vrednosti nisu izračunate zbog nejasnoće mrlja, što ukazuje da ovaj izolat ne proizvodi fitotoksin. Na slici 20 je prikazan izgled mrlja kod ispitivanih izolata sa izračunatim Rf vrednostima.

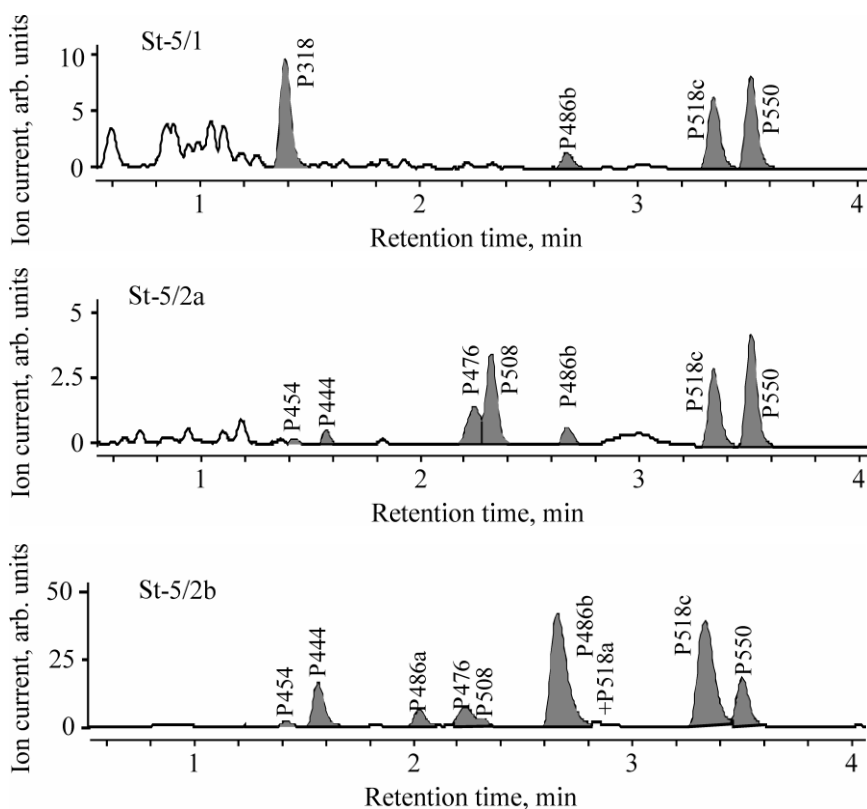


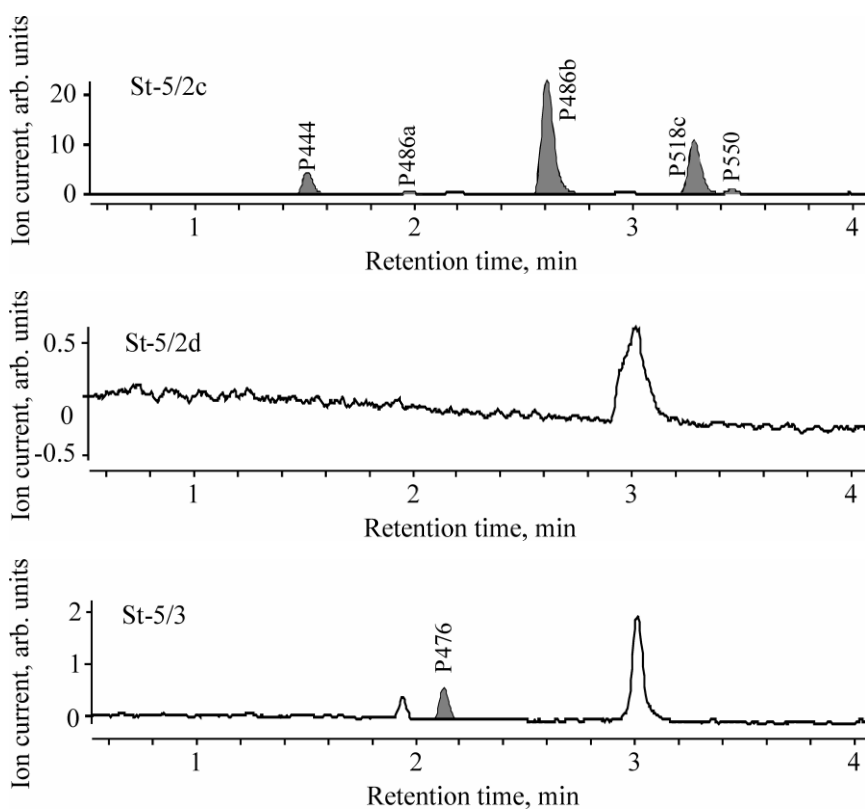
Slika 19. Tankoslojna hromatografija etil acetatnih frakcija izdvojenih iz filtrata kulture kod 4 izolata (L.m, St-5, C-3, S-11) *L. maculans* i jedan izolat (K-113) *L. biglobosa*. Etil acetatne frakcije su izdvojene na silikogelu sa hloroformom: etil acetatom (1:1) kao razvijajući. Jedinjenja su ispitana pod UV svetlom (254 nm). Rf vrednost frakcija (mrlja) 1-6 je: 1 (Rf = 0,11), 2 (Rf = 0,17), 3 (Rf = 0,27), 4 (Rf = 0,34), 5 (Rf = 0,42) i 6 (Rf = 0,51).



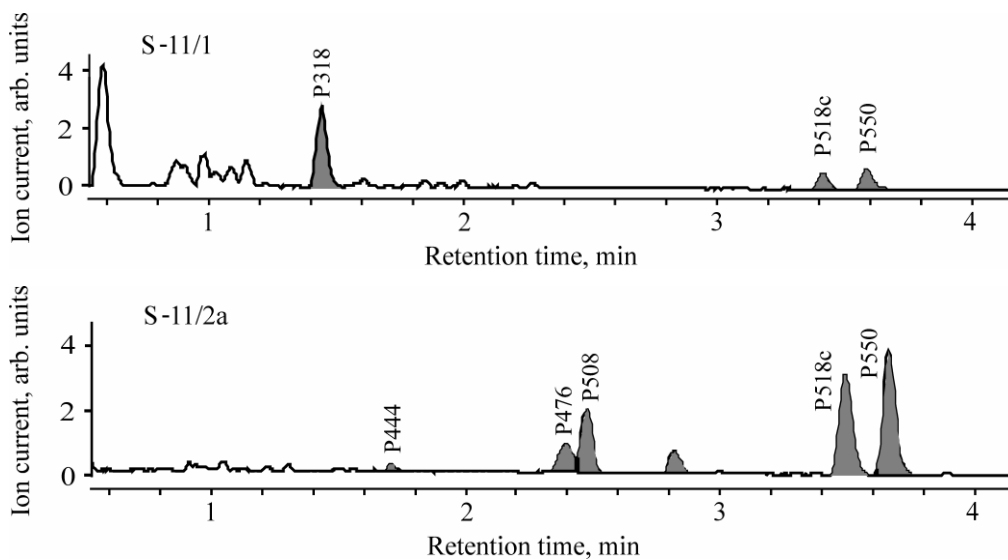
Na osnovu dobijenih rezultata tankoslojne hromatografije je izvršeno preparativno izolovanje fitotoksina (prema prethodno opisanoj proceduri) i tom prilikom pod UV svetlom su detektovane 3 mrlje označene sa 1, 2 i 3 a njihova Rf vrednost je: 0,15, 0,44 i 0,60. Na osnovu Rf vrednosti mrlje 2 izvršeno je dodatno nanošenje na TLC ploču i nakon razvijanja su dobijene 4 mrlje koje su označene sa 2a, 2b, 2c i 2d a njihova Rf vrednost je 2a (Rf = 0,49), 2b (Rf = 0,40), 2c (Rf = 0,32) i 2d (Rf = 0,22). Frakcije 1, 2a, 2b, 2c, 2d i 3 su zatim korišćene kako je navedeno u LC-MS-MS analizi i fitotoksičnom testu. Kod izolata St-5, C-3 i S-11, LC-MS-MS analizom su detektovani pikovi (Sl. 20–23) sa molekularnom težinom izotopskim profilom i fragmentacijskim obrascem koji su u skladu sa sirodezminima i drugim sekundarnim biomolekulama koji su otkriveni kod referentnog izolata L.m (*L.maculans* Sl. 23).

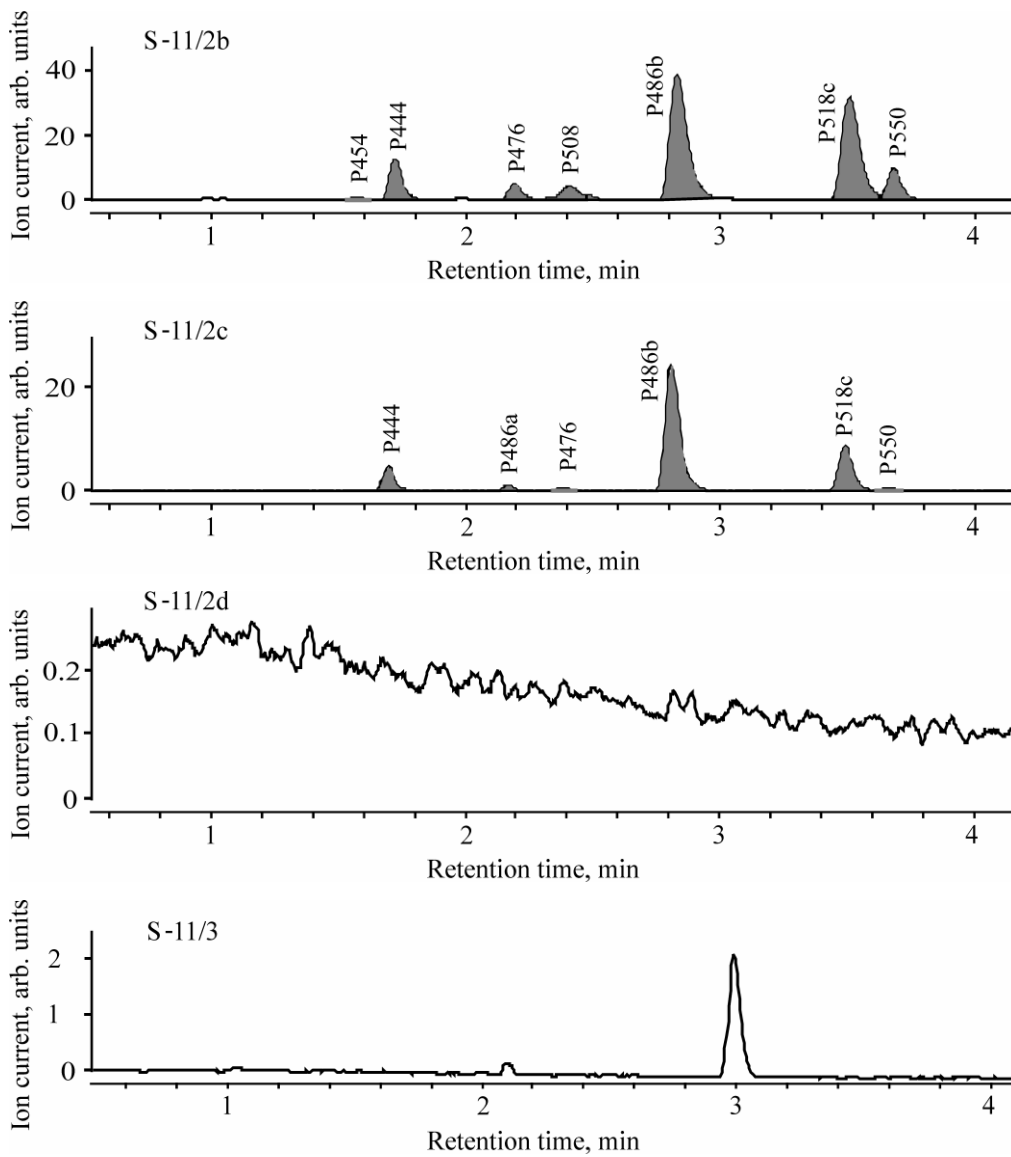
Slika 20.



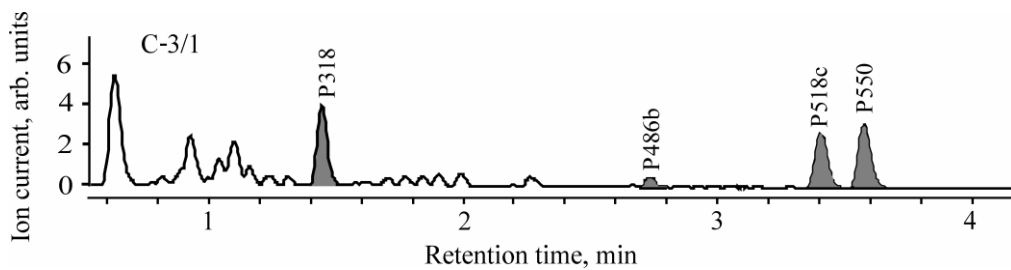


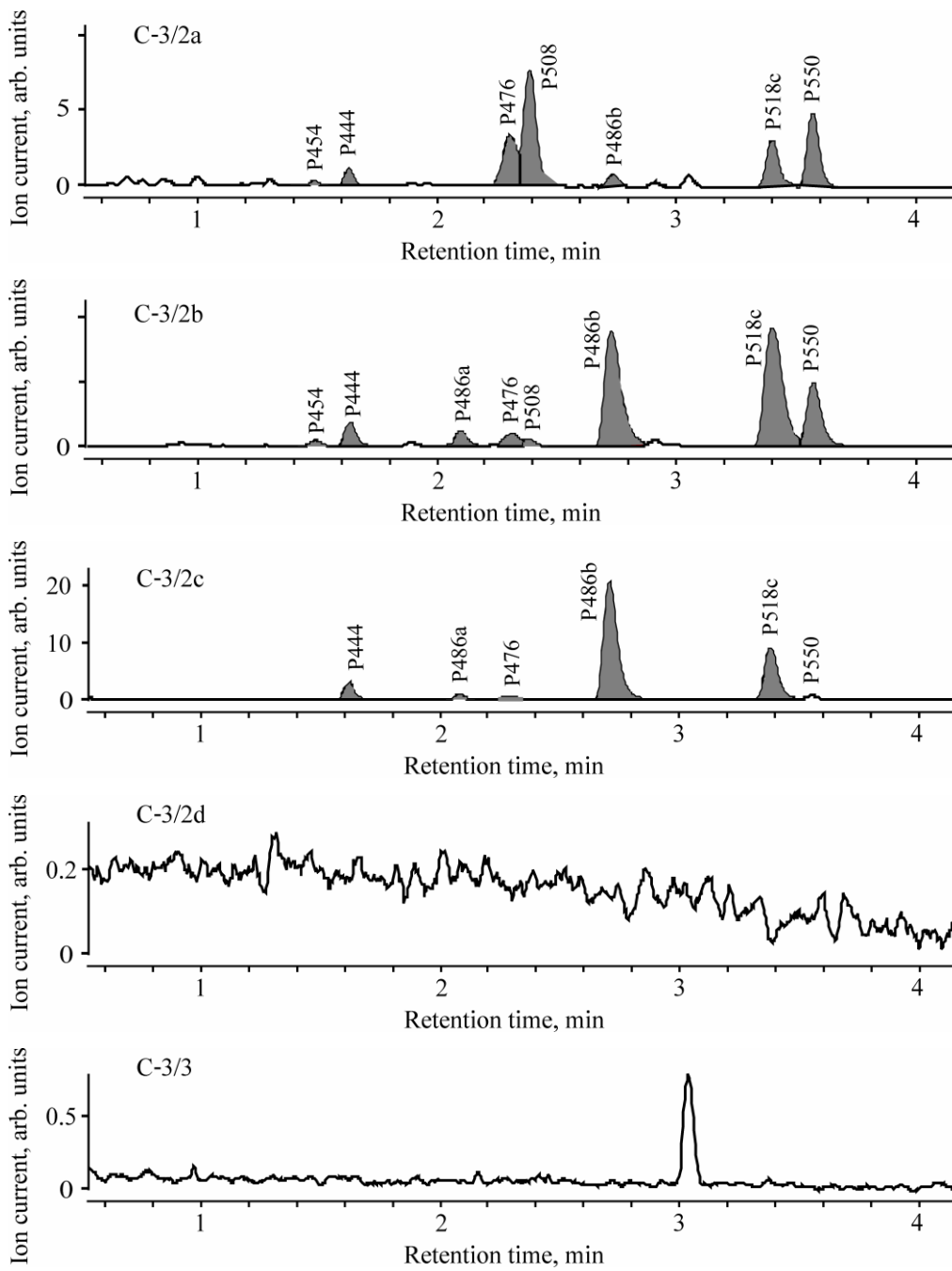
Slika 21.



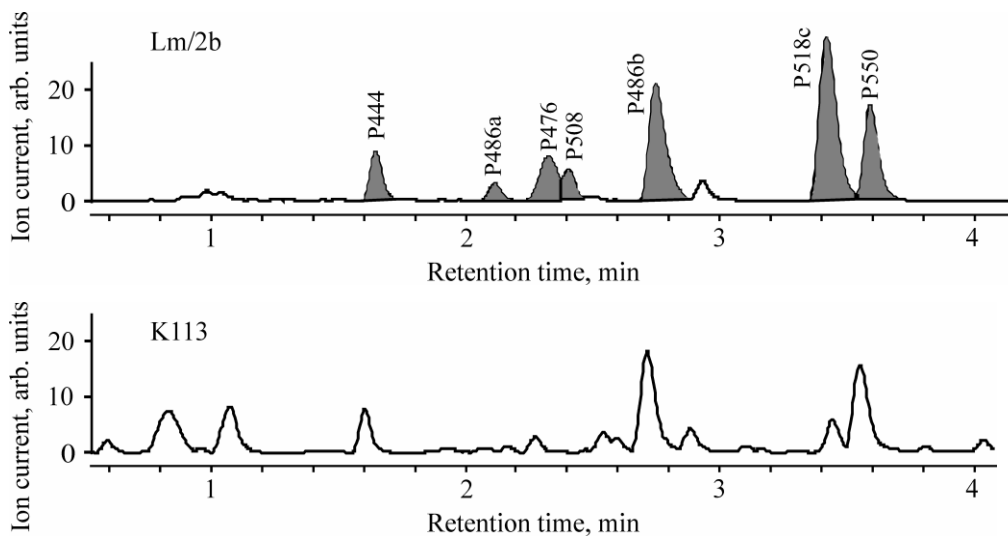


Slika 22.

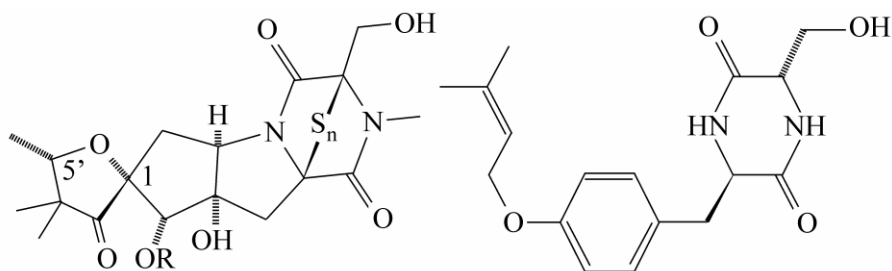




Slika 23.



Slika 24.

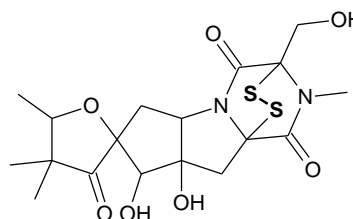


- n=1, R=Ac sirodesmin H  
 n=2, R=H sirodesmin J, 1-*epi*-sirodesmin J  
 n=2, R=Ac sirodesmin A, sirodesmin PL  
 n=3, R=H de-*O*-acetylsirodesmin C/F  
 n=3, R=Ac sirodesmin C/F  
 n=4, R=H de-*O*-acetylsirodesmin B/E/K  
 n=4, R=Ac sirodesmin B/E/K

phomamide

U ispitivanim uzorcima detektovan je niz pikova jedinjenja čija molekulska masa i izotopski profil odgovaraju sirodezminima.

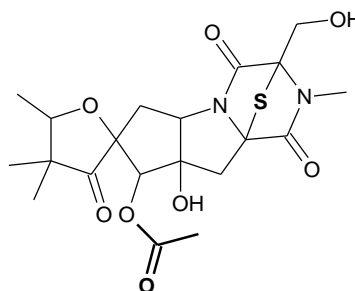
Pik sa retencionim vremenom  $t_R=1,57$  min (označen sa **P444**) pripada jedinjenju molekulske mase 444 Da, što odgovara **sirodezminu J** (de-*O*-acetilsirodezmin A) ili njegovom **1-epimeru** (de-*O*-acetilsirodezmin PL).



U MS<sup>1</sup> spektru (sl. 25) uočavaju se slabi signali  $m/z$  445 [M+H]<sup>+</sup>, 467 [M+Na]<sup>+</sup> i 483 [M+K]<sup>+</sup> i fragment  $m/z$  381 [M+H-S<sub>2</sub>]<sup>+</sup> kao osnovni jon. Profil izotopskih pikova:

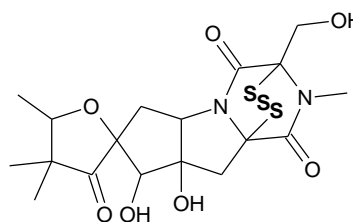
A (100%), A+1 (22,9%) i A+2 (12,3%) u dobrom je slaganju sa teorijskim profilom za bruto-formulu  $C_{18}H_{24}N_2O_7S_2$  (100%, 22,9%, 12,8%). U  $MS^2$  spektru (sl. 26) dominira fragment  $m/z$  381  $[M+H-S_2]^+$ .

Pik sa  $t_R=1,42$  min (**P454**) pripada jedinjenju molekulske mase 454, što odgovara **sirodezminu H** (monosulfidni homolog 1-epi-sirodezmina A). U  $MS^1$  spektru (sl. 27.) uočavaju se joni 455  $[M+H]^+$ , 477  $[M+Na]^+$ , 493  $[M+K]^+$ , kao i fragmenti 437  $[M+H-H_2O]^+$  i 393  $[M+H-H_2O-CO]^+$ . Profil izotopskih pikova: A (100%), A+1 (22,6%), A+2 (8,4%) saglasan je sa teorijskim profilom za  $C_{20}H_{26}N_2O_8S$  (100%, 24,4%, 8,9%).



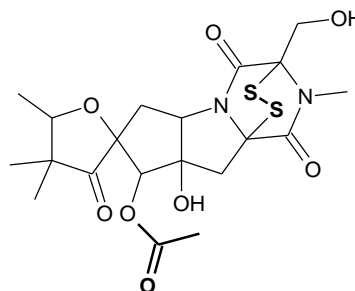
U  $MS^2$  spektru (sl. 28) uočava se niz fragmenata koji odgovaraju gubitku alkoholne OH grupe acetil-grupe (u vidu ketena  $C_2H_2O$ ) i neidentifikovane grupe  $m/z=78$ : 437  $[M+H-H_2O]^+$ , 413  $[M+H-C_2H_2O]^+$ , 393  $[M+H-CO_2]^+$ , 377  $[M+H-78]^+$ , 351  $[M+H-CO_2-C_2H_2O]^+$ , 315  $[M+H-CO_2-78]^+$  itd.

U  $MS^1$  spektru pika sa  $t_R=2,22$  min (**P476**) prikazanom na slici 29 uočavaju se joni niskog intenziteta na  $m/z$  477  $[M+H]^+$  499  $[M+Na]^+$  i 515  $[M+K]^+$  kao i intenzivan (osnovni jon u spektru) fragment 381  $[M+H-S_3]^+$ . Na osnovu molekulske mase i gubitka  $S_3$  može se zaključiti da je u pitanju do sada nezabeležen **de-O-acetil derivat sirodezmina C ili F**. Profil izotopskih pikova: A (100%), A+1 (25,0%), A+2 (17,2%) u saglasnosti je sa pretpostavljenom formulom  $C_{18}H_{24}N_2O_7S_3$  (teorijski profil 100%, 23,7%, 17,4%).



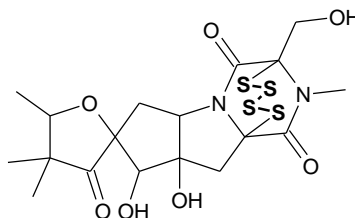
U  $MS^2$  spektru (sl. 30) kao osnovni jon javlja se fragment 381  $[M+H-S_3]^+$  a pored njega prisutni su i joni 353  $[M+H-S_3-CO]^+$  i 325  $[M+H-S_3-2CO]^+$ .

Detektovana su dva koja odgovaraju jedinjenjima molekulske mase 486: **P486a** ( $t_R=2,03$  min) i **P486b** ( $t_R=2,66$  min). Dva poznata jedinjenja ove mase – **sirodezmin A** i **sirodezmin G** (ili **PL**) – predstavljaju epimere i nije ih moguće razlikovati isključivo na osnovu MS spektra. U  $MS^1$  spektrima oba pika (sl. 31 i 33) prisutni su joni  $487 [M+H]^+$ ,  $509 [M+Na]^+$ ,  $525 [M+K]^+$  kao i intenzivan fragment  $423 [M+H-S_2]^+$ .

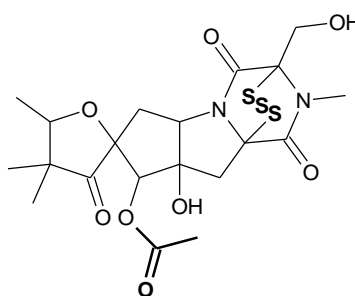


Profil izotopskih pikova A, A+1 i A+2 kod pika P486a (100%, 25%, 14,0%) odn. (100%, 23,6%, 14,2%) kod pika P486b u skladu je sa bruto formulom  $C_{20}H_{26}N_2O_8S_2$  (teorijski profil: 100%, 25,2%, 13,5%). Najznačajniji fragmenti u  $MS^2$  spektrima oba pika (sl. 32 i 34) su:  $423 [M+H-S_3]^+$ ,  $395 [M+H-S_3-CO]^+$ ,  $367 [M+H-S_3-2CO]^+$ ,  $246$  i  $229$ .

Pik sa retencionim vremenom 2,32 min označen kao **P508** u  $MS^1$  spektru (sl. 35) sadrži jone  $m/z$  531  $[M+Na]^+$  i 547  $[M+K]^+$  slabog intenziteta, i  $m/z$  381  $[M+H-S_4]^+$  kao osnovni jon. Na osnovu molekulske mase i gubitka 4 atoma sumpora može se zaključiti da je u pitanju **tetrasulfidni homolog de-O-acetilsirodezmina A** odn. de-O-acetil-derivat sirodezmina B, E ili K.



Detektovana su tri pika jedinjenja molekulske mase 518: slabo zastupljeni **P518a** ( $t_R=2,71$  min) i **P518b** ( $t_R=2,92$  min) i intenzivni **P518c** ( $t_R=3,34$  min). U  $MS^1$  spektrima ovih pikova (sl. 36, 38 i 40) uočavaju se joni  $m/z$  519  $[M+H]^+$  541  $[M+Na]^+$  i 557  $[M+K]^+$  kao i intenzivan jon fragmenta  $m/z$  423  $[M+H-S_3]^+$ . Poznata su dva izomerna trisulfidna sirodezmina mase 518: **sirodezmin C** i **F**.

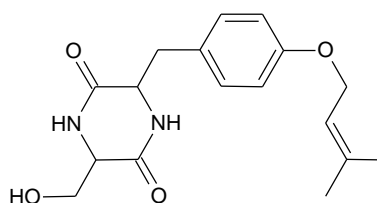
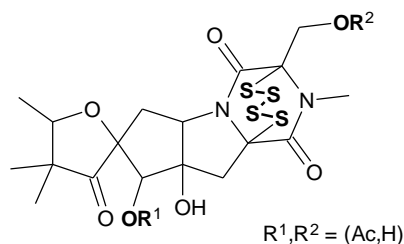


Teorijski izotopski profil za ova jedinjenja, bruto-formule  $C_{20}H_{26}N_2O_8S_3$ , dat je kao A (100%), A+1 (26,0%), A+2 (18,1%) i u dobroj je saglasnosti sa eksperimentalnim podacima: 100%, 26,5% i 17,2 % za P518a, 100%, 26,3% i 16,3% za P518b, i 100%, 26,6% i 18,8% za P518c.

Budući da su sirodezmini C i F 1-epimeri, može se očekivati da će imati slične ili identične  $MS^2$  spektre. Zaista,  $MS^2$  spektri pikova P518a i P518c (sl. 39 i 41) pokazuju veoma sličan obrazac fragmentacije: osnovni jon na  $m/z$  423  $[M+H-S_3]^+$ , i niz fragmenata:  $m/z$  395  $[M+H-S_3-CO]^+$ , 367  $[M+H-S_3-2CO]^+$ , 246, 229 i 140.  $MS^2$  spektar trećeg pika (sl. 39) P518b značajno se razlikuje – dok je i u ovom slučaju osnovni jon 423, javlja se i više fragmenata odsutnih kod P518a i P518c – intenzivni fragment  $m/z=345$   $[M+H-S_3-78]^+$  kao i joni 501  $[M+H-H_2O]^+$  i 441  $[M+H-78]^+$ . Moguće je da ovaj pik predstavlja izomer sirodezmina C i F sa različitim položajem acetil-grupe (na C2a-OH grupi ili bočnoj hidroksimetil-grupi).

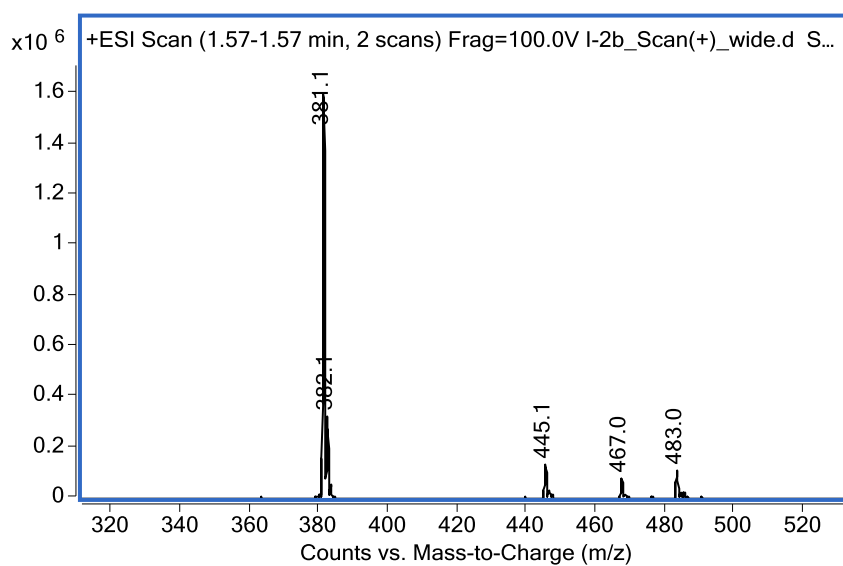
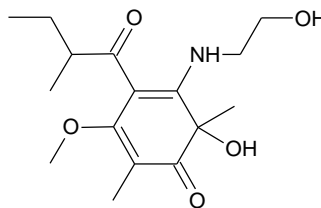
Pik sa retencionim vremenom 3,51 min, označen sa **P550**, u  $MS^1$  spektru (sl. 42) sadrži slab signal na  $m/z$  589  $[M+K]^+$  i intenzivan signal na  $m/z$  423  $[M+H-S_4]^+$ . Na osnovu molekulske mase i gubitka 4 atoma sumpora može se zaključiti da je u pitanju tetrasulfidni homolog sirodezmina A, odnosno **sirodezmin B, D, E ili K**.

Samo u frakcijama II/1 i III/1 detektovan je pik **P318** na  $t_R=1,39$  min. U  $MS^1$  spektru (sl. 43) se pored jonâ  $m/z$  319  $[M+H]^+$ , 341  $[M+Na]^+$ , 357  $[M+K]^+$  i 659  $[2M+Na]^+$  zapaža i intenzivan fragment  $m/z$  251 (osnovni jon). Molekulskej masi od 318 odgovara **fomamid**. Fragment  $m/z$  251 u tom slučaju odgovara gubitku *O*-vezane prenil-grupe kao  $C_5H_5$ . Profil izotopskih pikova: A (100 %), A+1 (18,0 %), A+2 (2,8 %) saglasan je sa pretpostavljenom formulom  $C_{17}H_{22}N_2O_4$  (teorijski profil 100 %, 20,1 %, 2,7 %).

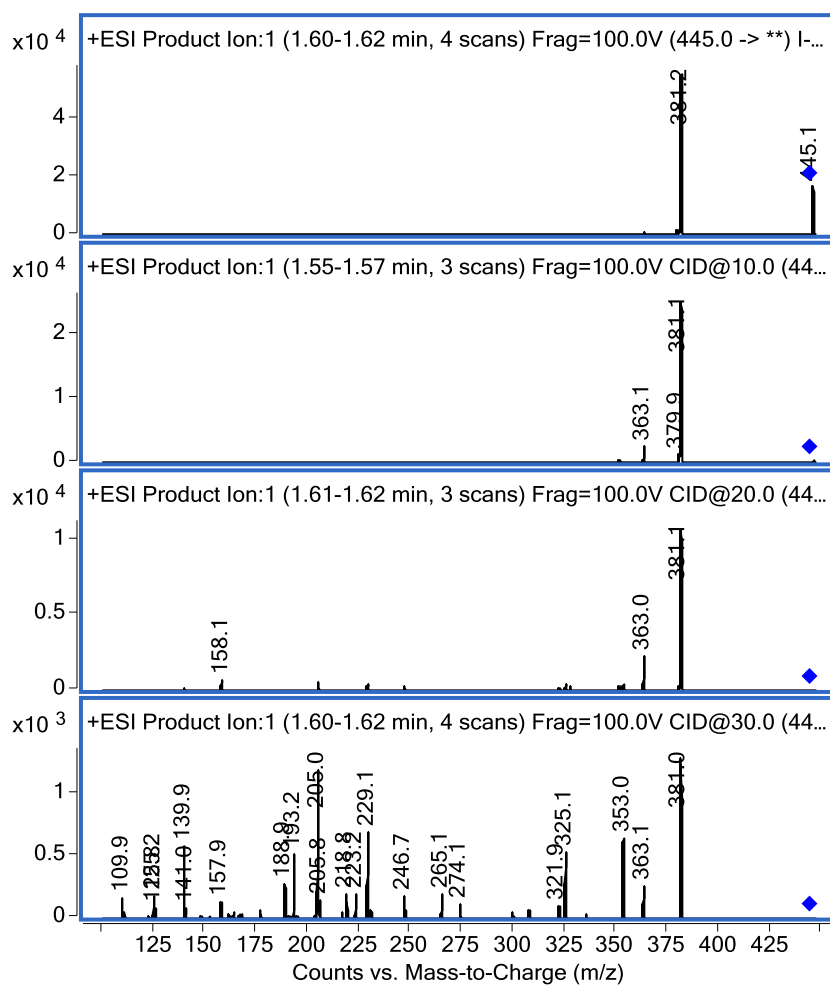
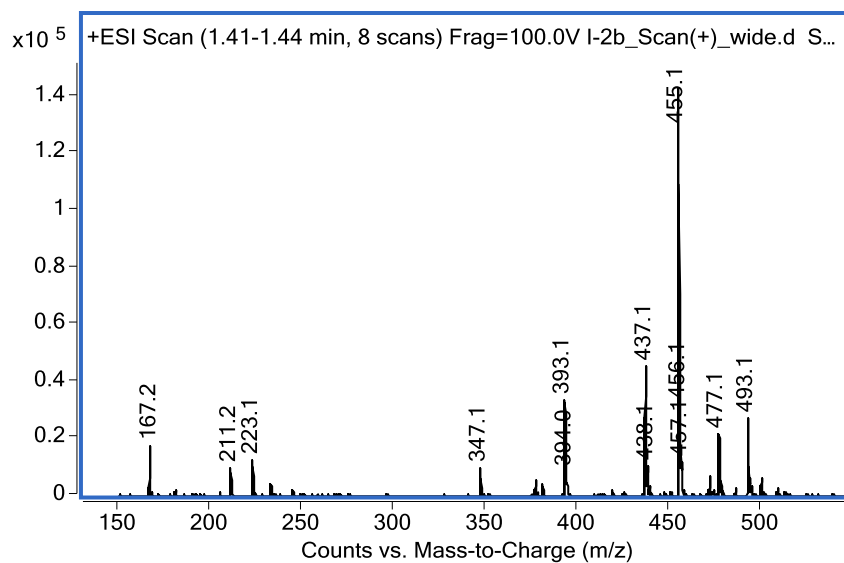


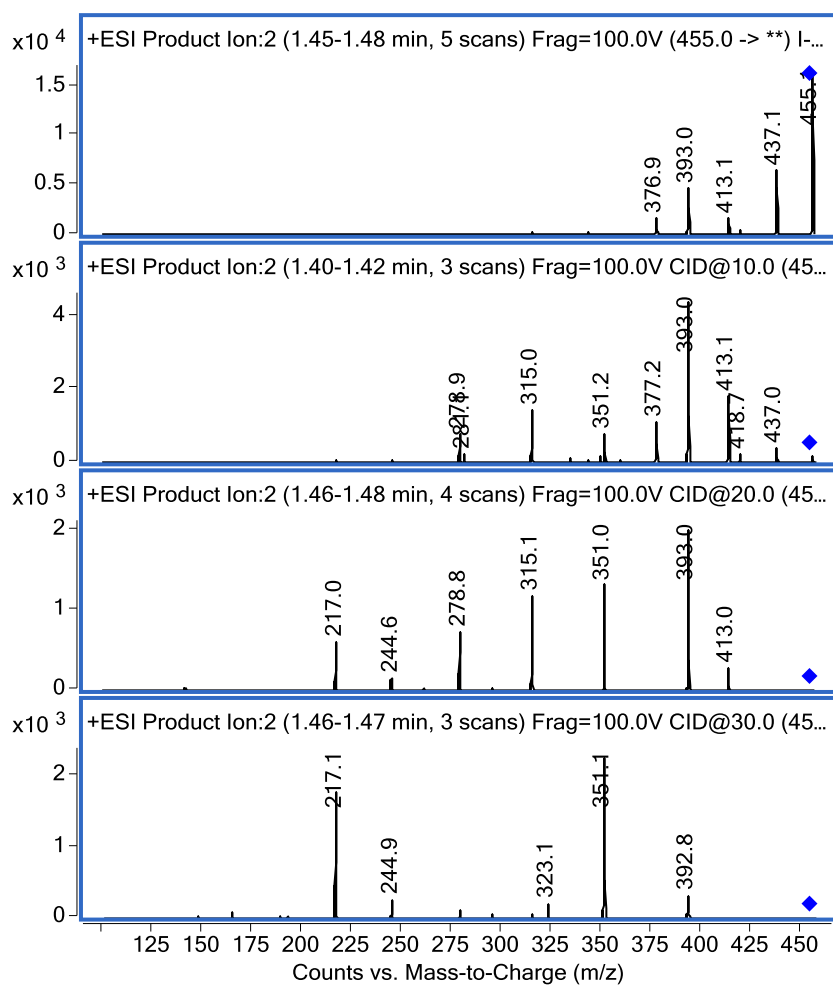
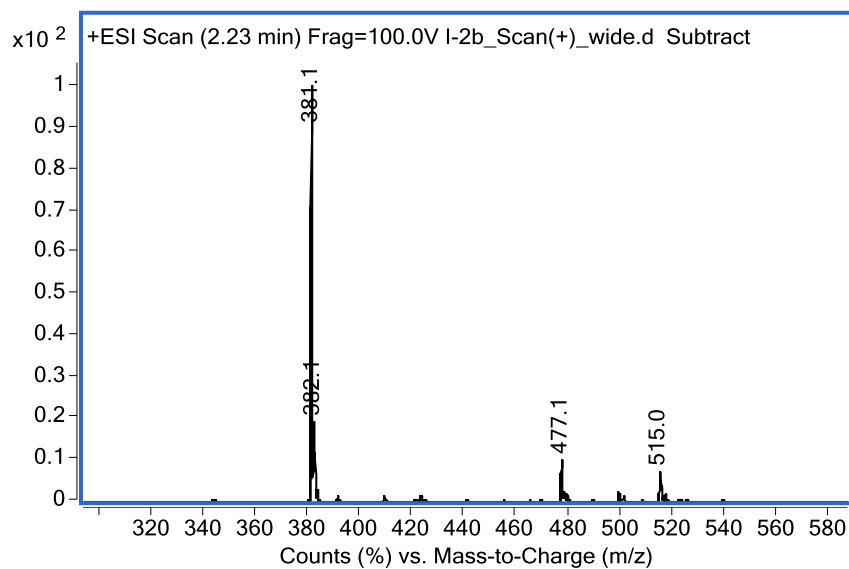


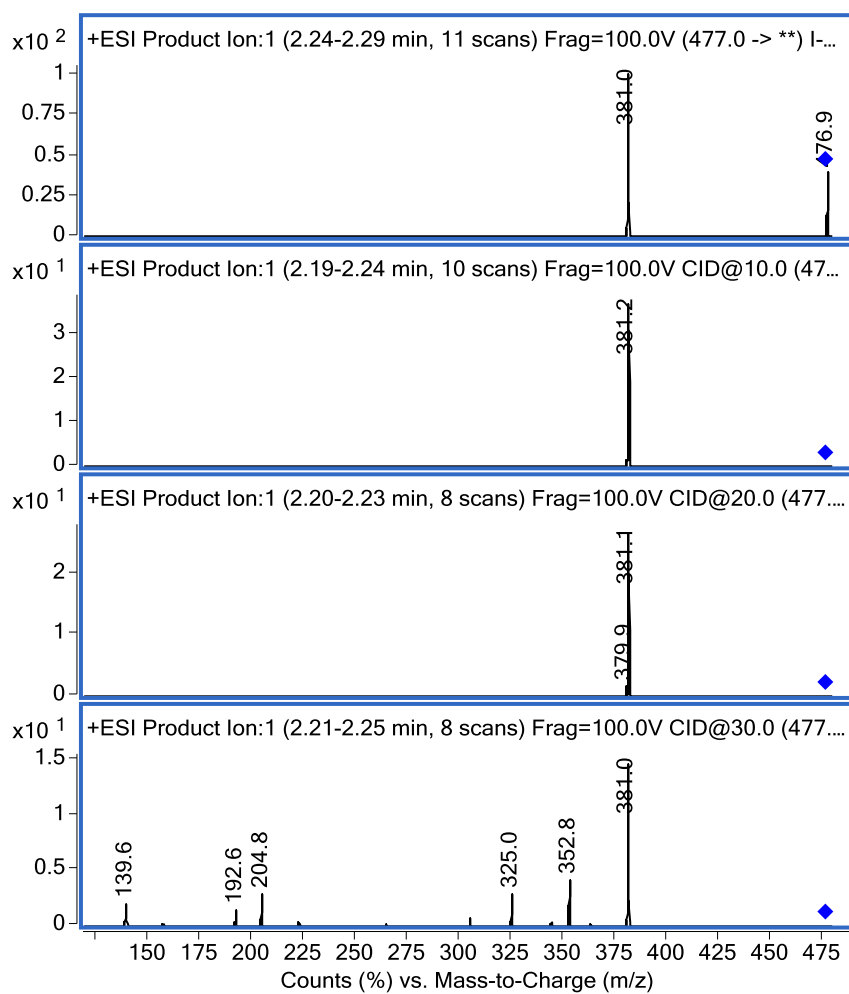
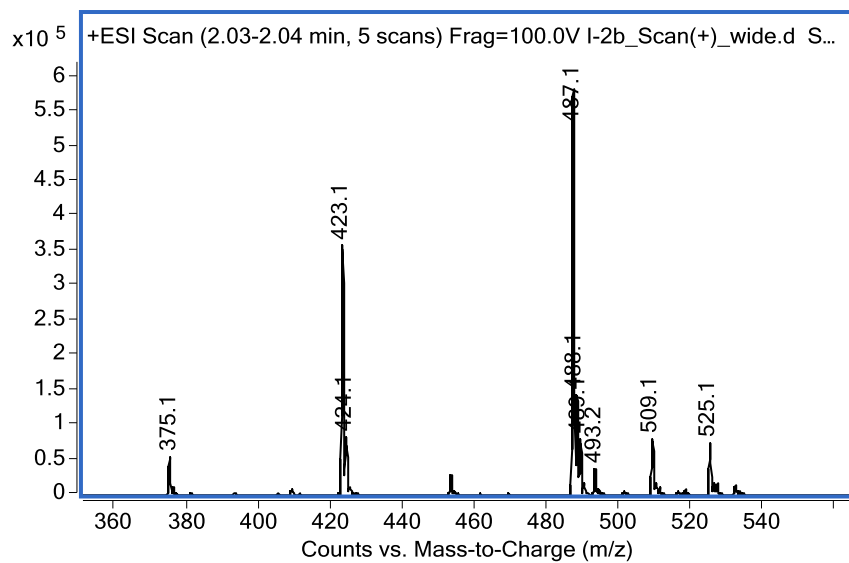
U MS<sup>1</sup> spektru pika **P311**, sa  $t_R=0,95$  min uočavaju se joni  $m/z$  312 [M+H]<sup>+</sup>, 334 [M+Na]<sup>+</sup>, 350 [M+K]<sup>+</sup> i 623 [2M+H]<sup>+</sup>, kao i jon fragmenta  $m/z$  176. Molekulska masa odgovara **fomaliginu A** ili **vasabidienonu E**.

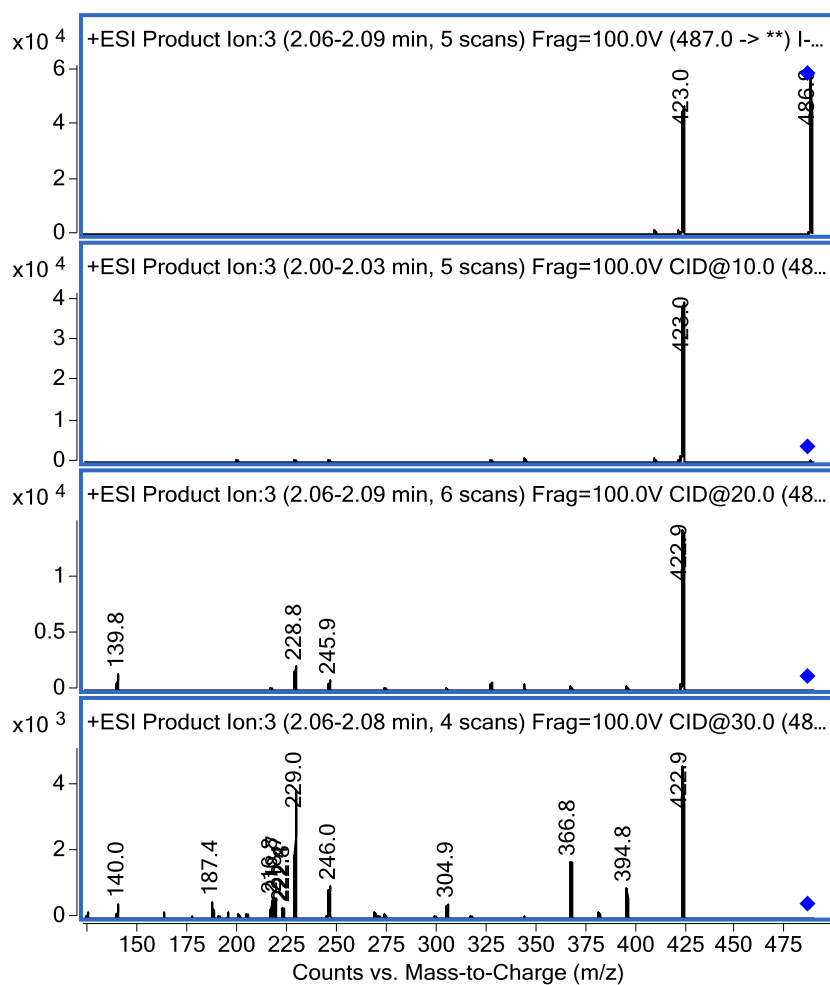
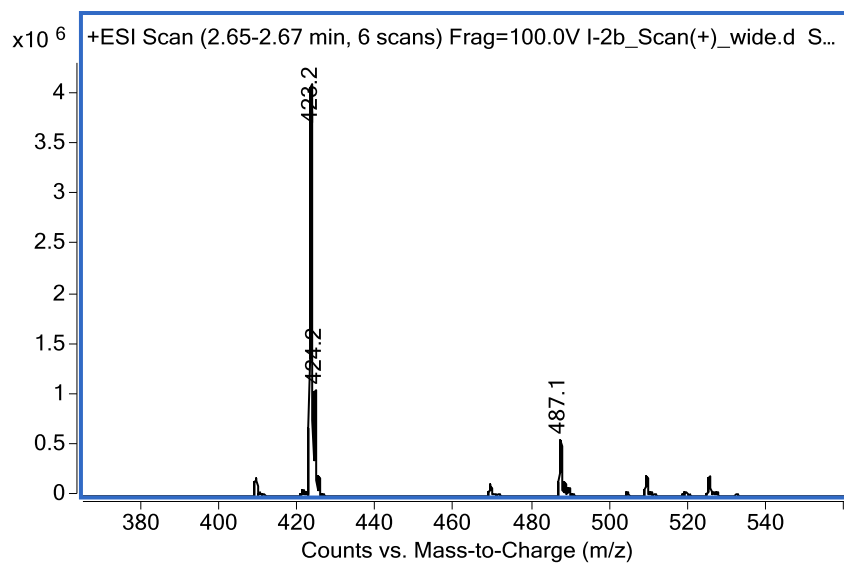


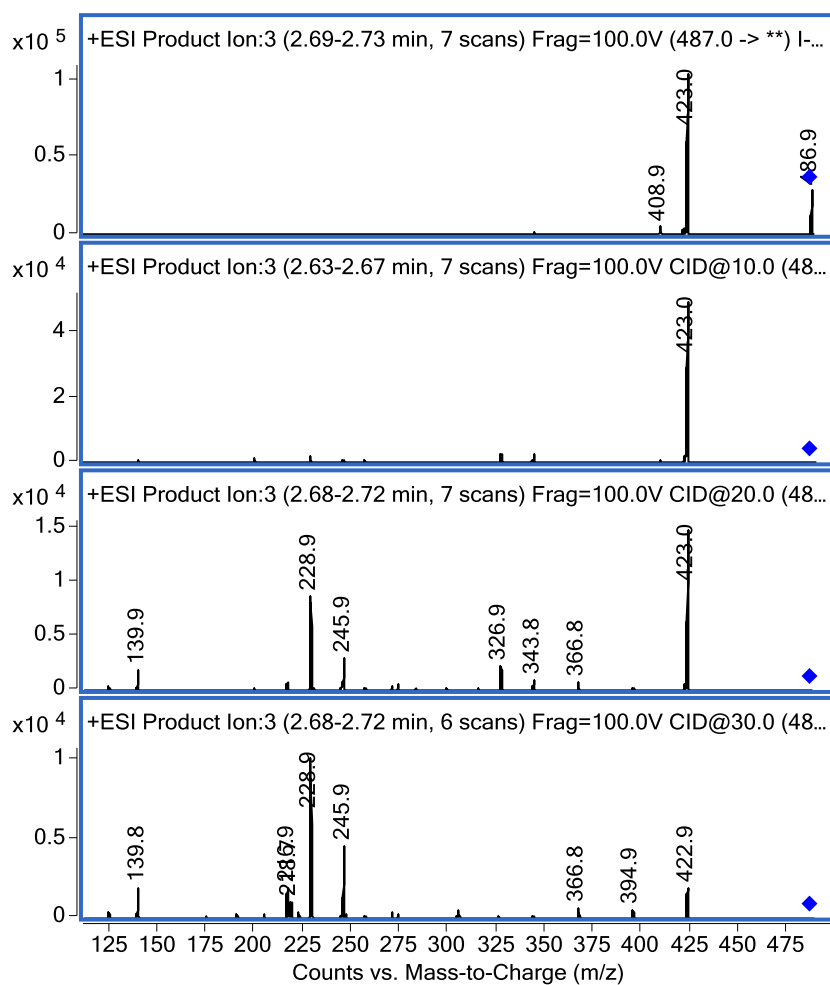
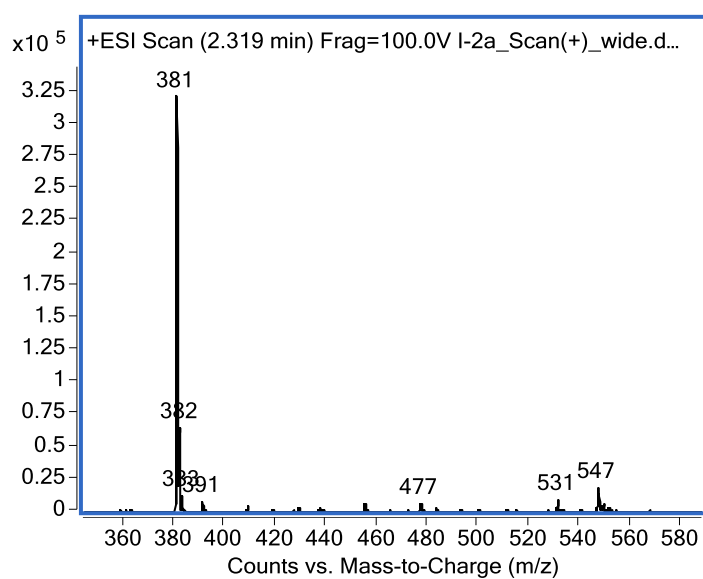
Slika 25. MS<sup>1</sup> spektar pika P444

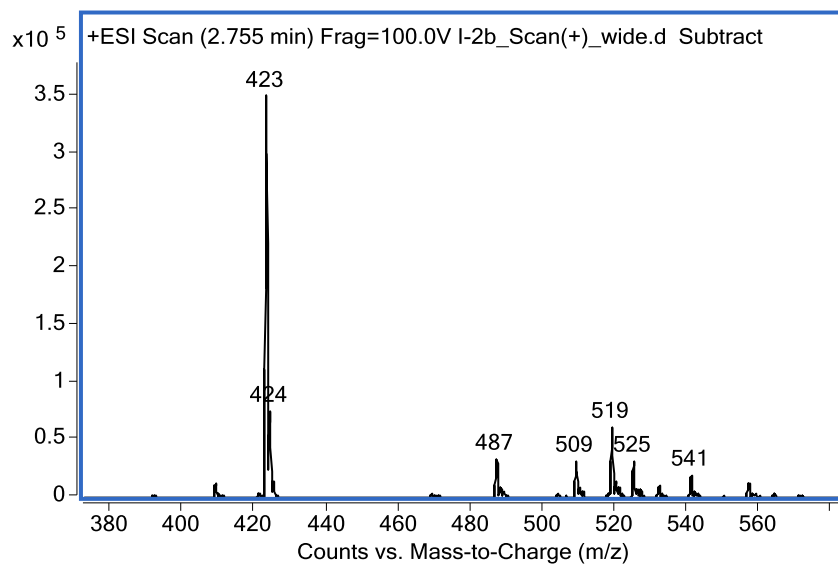
Slika 26. MS<sup>2</sup> spektri pika P444, kolizione energije 0–30 VSlika 27. MS<sup>1</sup> spektar pika P454

Slika 28. MS<sup>2</sup> spektri pika P454, kolizione energije 0–30 VSlika 29. MS<sup>1</sup> spektar pika P476

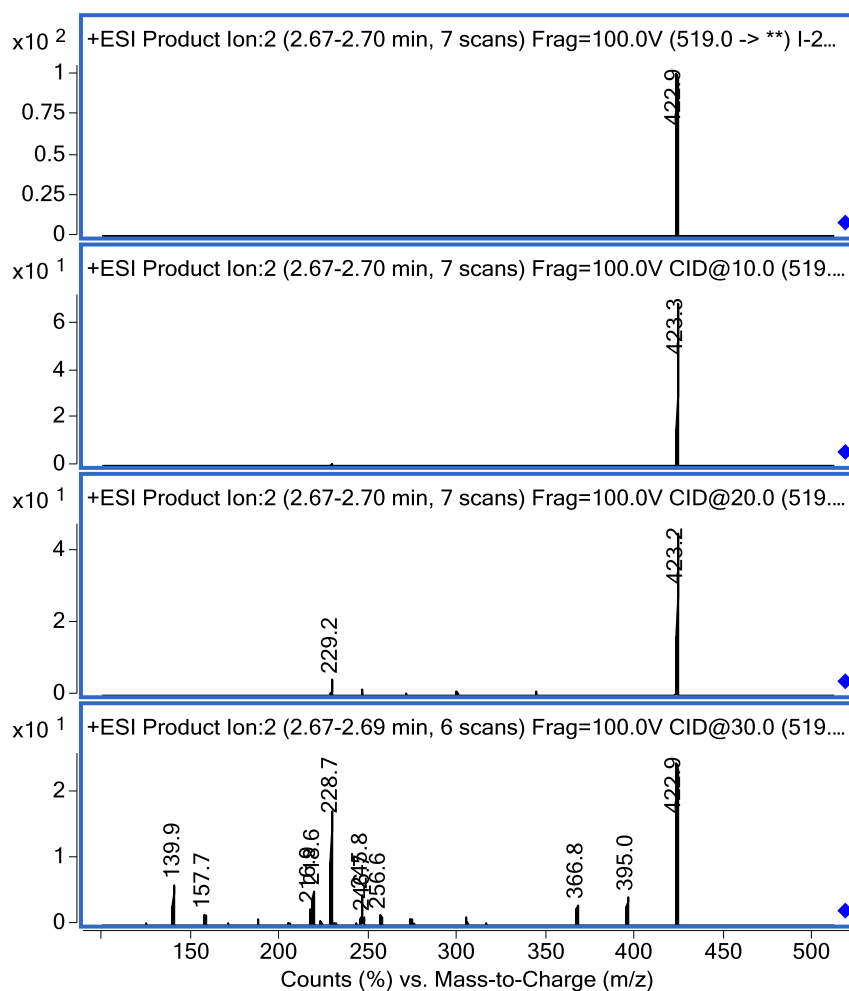
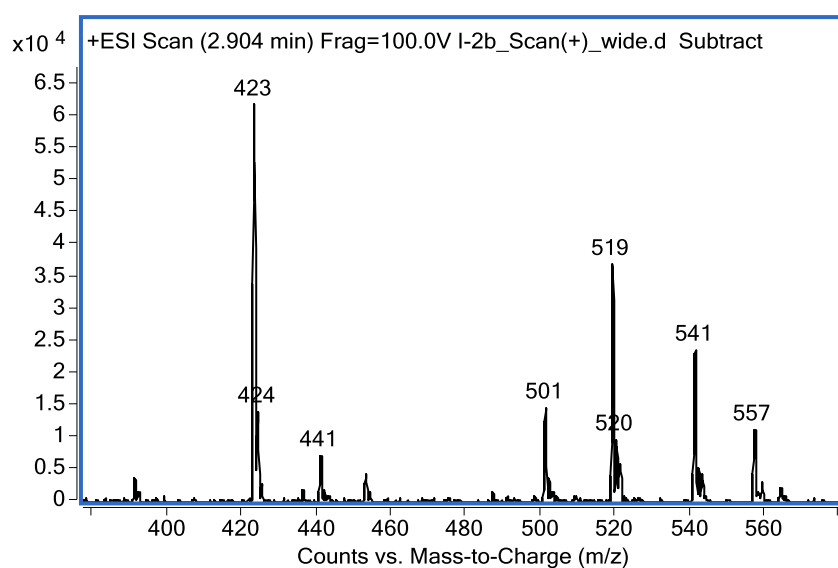
Slika 30. MS<sup>2</sup> spektri pika P476, kolizije energije 0–30 VSlika 31. MS<sup>1</sup> spektar pika P486a

Slika 33. MS<sup>2</sup> spektri pika P486a, kolizione energije 0–30 VSlika 32. MS<sup>1</sup> spektar pika P486b

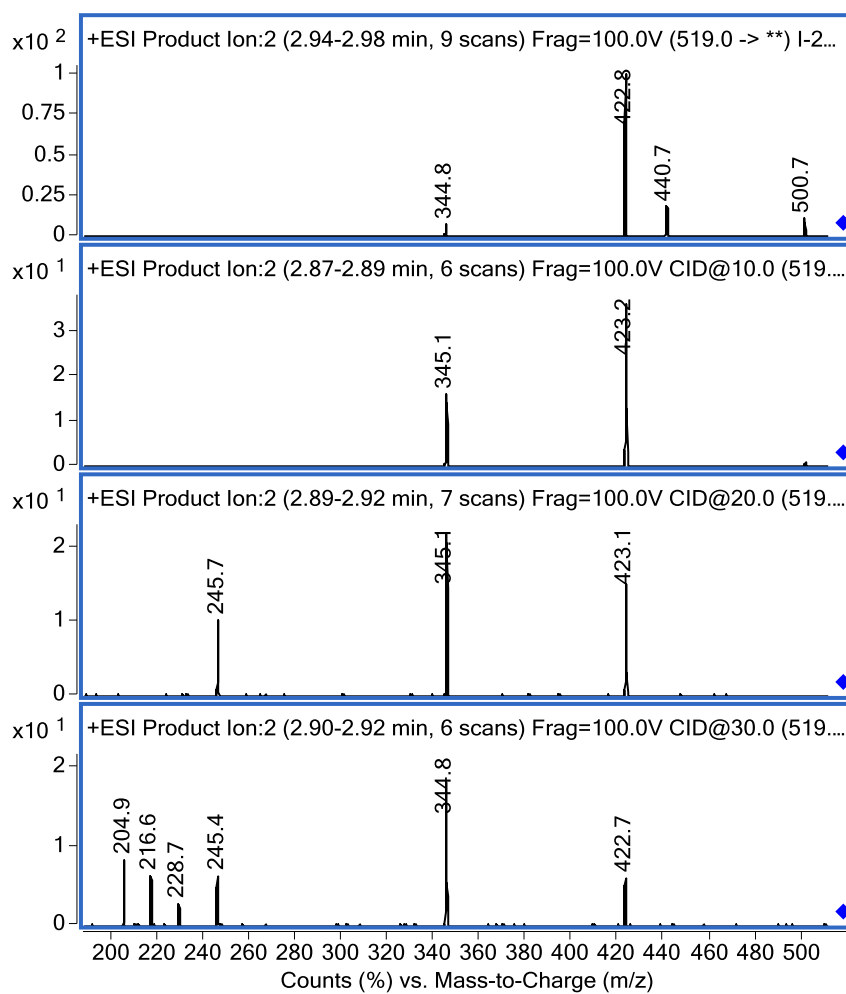
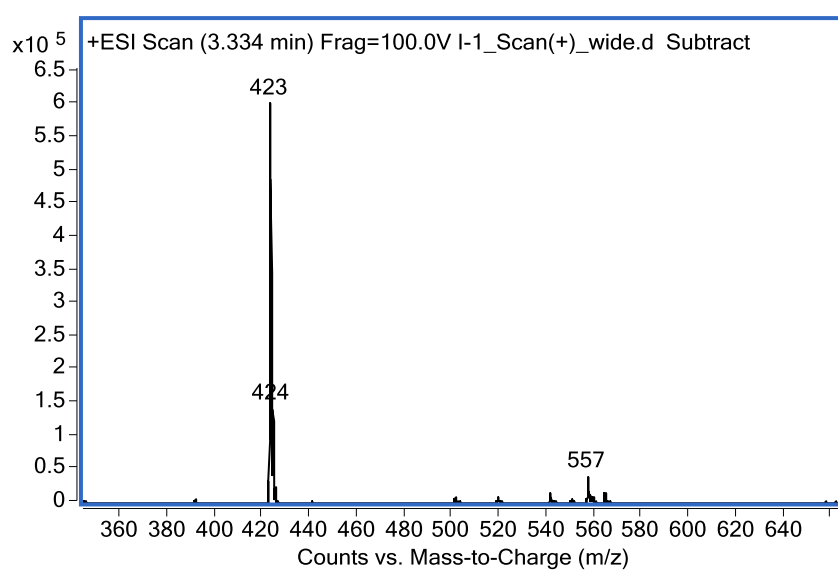
Slika 34. MS<sup>2</sup> spektri pika P486b, kolizione energije 0–30 VSlika 35. MS<sup>1</sup> spektar pika P508

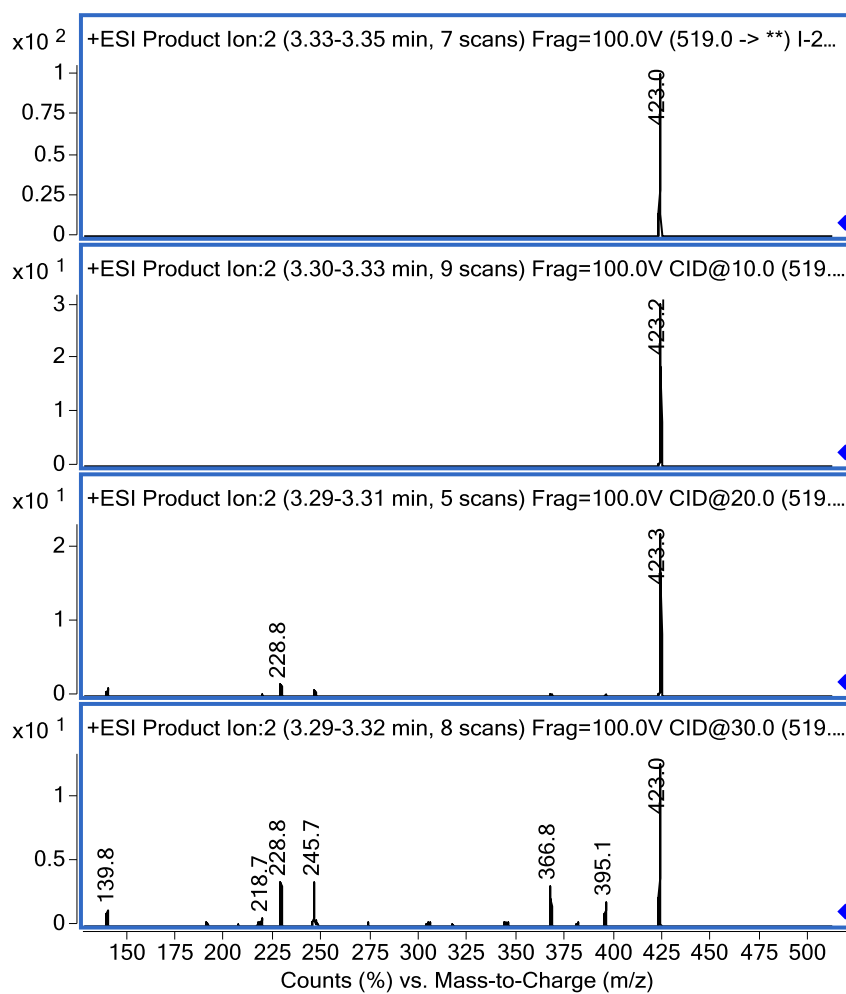
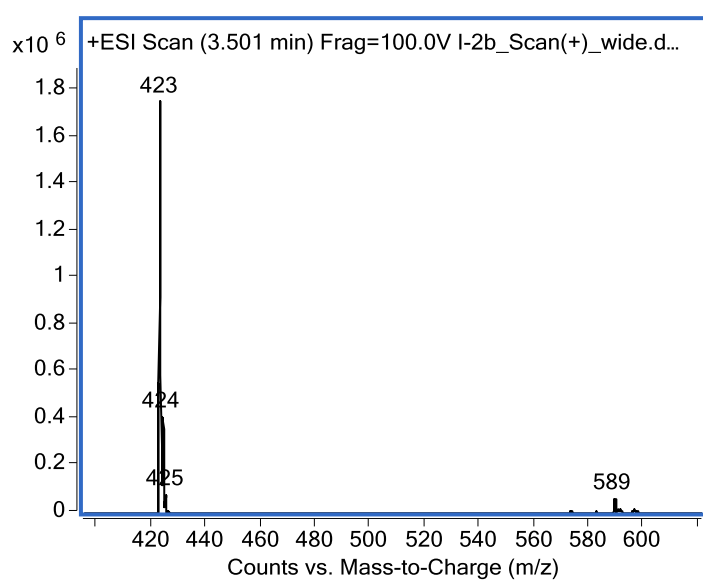


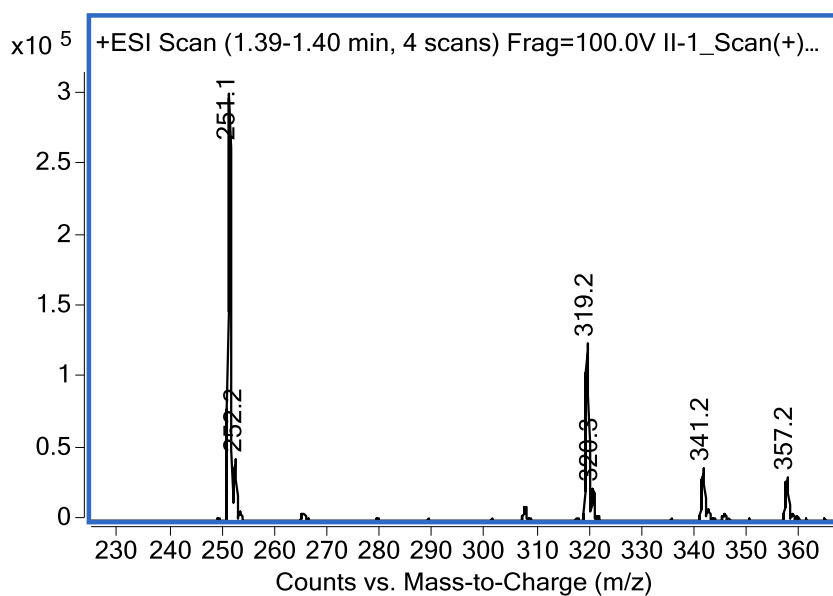
Slika 36. MS<sup>1</sup> spektar pika P518a

Slika 39. MS<sup>2</sup> spektri pika P518a, kolizione energije 0–30 VSlika 40. MS<sup>1</sup> spektar pika P518b



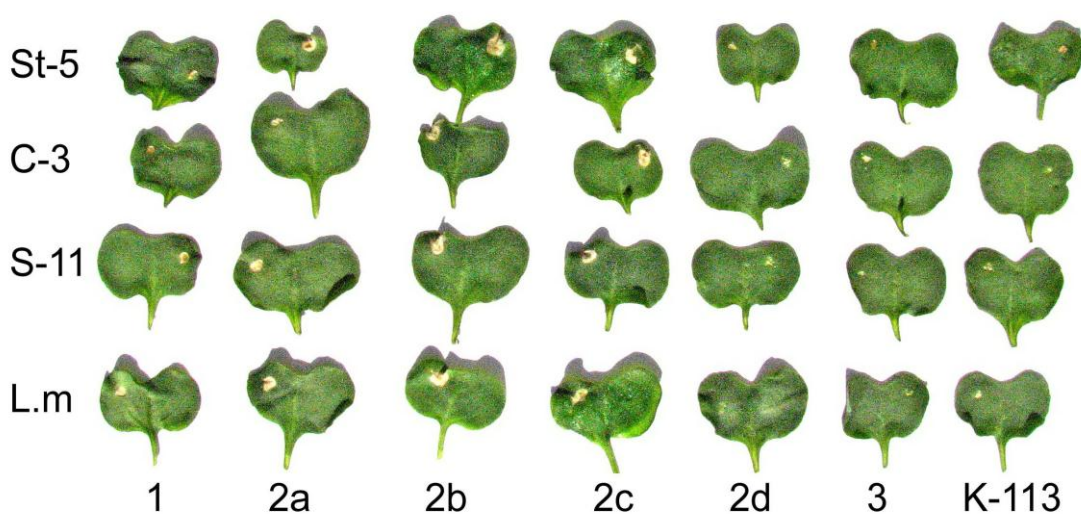
Slika 39. MS<sup>2</sup> spektri pika P518b, kolizione energije 0–30 VSlika 41. MS<sup>1</sup> spektar pika P518c

Slika 41. MS<sup>2</sup> spektri pika P518c, kolizione energije 0–30 VSlika 42. MS<sup>1</sup> spektar pika P550

Slika 43. MS<sup>1</sup> spektar pika P318.

## 6. 8. Test fitotoksičnosti

Na osnovu LC–MS–MS analize utvrđeno je prisustvo različitih fitotoksina u frakcijama označenim sa 1, 2a, 2b, 2c i dr. Frakcija 2b i 2c su prouzrokovale najveću fitotoksičnost (+ + +) na kotiledonima kod sva četiri izolata (C-3, S-11, St-5 i L.m). Frakcija 2a pokazuje srednji stepen fitotoksičnosti (+ +) izuzev izolata C-3 koja je ocenjena kao slaba fitotoksičnost (+).



Slika 44. Fitotoksičnost sirodezmina detektovana u frakcijama 1, 2a, 2b i 2c

Slaba fitotoksičnost je zapažena kod frakcije 1 kod svih izolata. Frakcija 2d i 3 kod svih izolata (*L. maculans*), kao i izolat K-113 (*L. biglobosa*) nisu prouzrokovale fitotoksičnost na ispitivanim kotiledonima.

Beličaste pege na ovim kotiledonima (frakcija 2d, 3 i izolat K-113) su posledica oštećenja epidermisa iglom. Fitotoksična aktivnost (sl. 44) je u saglasnosti sa rezultatima LC-MS analize i prisustvo fitotoksičnih sirodezmina u frakciji 1, 2a, 2b i 2c su ovom analizom jasno potvrđene.

## 6. 9. Određivanje patogenih grupa

Određivanje patogenih grupa je vršeno na osnovu patogenosti prema setu diferencijalnih sorti (Westar, Glacier i Quinta). Ukupno je ispitivano 119 izolata gljiva sakupljenih tokom 2009. i 2010. godine na području Vojvodine - Srbija. Patogenost prema određenim sortama je ocenjivana na osnovu ispoljenih simptoma na kotiledonima.

Na osnovu obavljenih ispitivanja 8 izolata pripada PG1, 5 izolata pripada PG2, 22 izolata pripada PG3 i 84 izolata PG4. Različita patogenost izolata *L. maculans* i *L. biglobosa* na diferencijalnim sortama uljane repice omogućuje razlikovanje slabo virulentnih (neagresivnih) i virulentnih (agresivnih) izolata, kao i dalju podelu virulentnih izolata u tri patogene grupe (Tab. 4). Izolati PG1 (patogena grupa *L. biglobosa*) prouzrokuju male nekrotične pege oko povređenog mesta na kotiledonu kod svih diferencijalnih sorti (sl. 45). Izolati koji pripadaju PG2 prouzrokuju velike nekrotične pege na sorti Westar u okviru kojih micelija gljive ima izraženu sporulaciju. Na sorti Quinta izazivaju različite pege, u okviru kojih micelija ne sporuliše (sl. 45). Pegе na sorti Glacier su slične po veličini koje prouzrokuju slabo virulentni izolati, ali pokazuju manju nekrozu oko inokulisanog dela. Izolati koji pripadaju PG3 imaju povećanu sporulaciju na sorti Westar i Glacier, a na sorti Quinta prouzrokuju braon pege bez sporulacije (sl. 45). Izolati u okviru PG4 prouzrokuju velike nekrotične pege na svim sortama i obilno sporulišu (sl. 45).



Slika 46. Simptomi prouzrokovani izolatima gljiva *L. maculans* i *L. biglobosa* koji pripadaju patogenim grupama PG2, PG3 i PG4 *L. maculans* i PG1 *L. biglobosa* na kotiledonima diferencijalnih sorti Westar, Glacier i Quinta u odnosu na kontrolnu varijantu (sorta Glacier)

Tabela 4. Patogenost izolata *L. maculans* i *L. biglobosa* na diferencijalnim sortama (Westar, Quinta i Glacier)

Izolat	Poreklo	Westar	Quinta	Glacier	PG
		Index oboljenja na osnovu skale (Koch et al., 1989)			
l. b.	V. Britanija	1,0	1,3	1,0	PG1
K – 111	Srbija	1,8	1,5	1,0	PG1
K – 112	Srbija	1,2	1,0	1,0	PG1
K – 113	Srbija	2,5	1,6	1,9	PG1
K – 114	Srbija	2,1	1,3	1,6	PG1
K – 115	Srbija	1,8	1,5	1,3	PG1
K – 116	Srbija	1,9	1,5	1,4	PG1
K – 117	Srbija	2,2	2,0	0,9	PG1
K – 118	Srbija	1,7	1,0	0,8	PG1
K – 21	Srbija	7,0	4,9	2,3	PG2
S – 5	Srbija	8,6	6,3	2,5	PG2
S – 9	Srbija	7,6	5,0	2,3	PG2
L – 4	Srbija	8,3	5,6	2,8	PG2
L – 8	Srbija	8,0	7,5	2,6	PG2
l. m.	V. Britanija	9,0	5,9	8,5	PG3
K – 5	Srbija	8,8	5,8	8,3	PG3
K – 6	Srbija	8,1	5,3	8,5	PG3
L – 1	Srbija	8,3	5,5	7,8	PG3
L – 2	Srbija	8,5	5,1	7,6	PG3
L – 3	Srbija	8,5	4,6	7,0	PG3
L – 5	Srbija	8,8	4,3	7,8	PG3
Lj – 2	Srbija	7,6	6,0	7,0	PG3
Lj – 3	Srbija	8,0	5,8	7,5	PG3
St – 23	Srbija	8,3	5,5	8,0	PG3
St – 24	Srbija	8,3	4,6	7,1	PG3
St – 25	Srbija	7,8	2,6	6,5	PG3
St – 26	Srbija	8,6	4,3	8,1	PG3
St – 27	Srbija	8,5	4,0	8,3	PG3
Gs – 4	Srbija	8,3	6,1	8,0	PG3
Gs – 8	Srbija	8,8	6,0	8,3	PG3
Gs – 9	Srbija	8,8	6,0	7,3	PG3
Gs – 11	Srbija	8,6	5,8	8,0	PG3
K – 9	Srbija	9,0	3,6	9,0	PG3
K – 11	Srbija	9,0	5,6	8,6	PG3
K – 13	Srbija	9,0	3,8	7,5	PG3
K – 15	Srbija	9,0	4,6	8,0	PG3
St – 1	Srbija	9,0	8,6	8,1	PG4

Izolot	Poreklo	Westar	Quinta	Glacier	PG
St – 2	Srbija	9.0	8.6	8.3	PG4
St – 3	Srbija	9.0	8.5	7,6	PG4
St – 4	Srbija	8.0	8,6	8,6	PG4
St – 5	Srbija	9,0	9,0	8,5	PG4
St – 6	Srbija	9,0	9,0	9,0	PG4
St – 7	Srbija	8,6	7,5	8,5	PG4
St – 8	Srbija	8,6	8,5	8,5	PG4
St – 9	Srbija	8,8	8,3	8,8	PG4
St – 10	Srbija	8,3	8,1	8,0	PG4
St – 11	Srbija	9,0	8,1	9,0	PG4
St – 12	Srbija	8,5	8,3	8,6	PG4
St – 13	Srbija	8,8	8,1	7,6	PG4
St – 14	Srbija	9,0	7,5	9,0	PG4
St – 15	Srbija	9,0	8,3	8,6	PG4
St – 16	Srbija	8,8	8,5	8,3	PG4
St – 17	Srbija	8,6	7,5	8,3	PG4
St – 18	Srbija	9,0	9,0	8,5	PG4
St – 19	Srbija	8,8	8,6	7,8	PG4
St – 20	Srbija	8,8	7,6	7,0	PG4
St – 21	Srbija	8,6	7,8	7,8	PG4
St – 22	Srbija	8,7	7,3	7,0	PG4
St – 28	Srbija	9,0	8,1	8,6	PG4
K – 1	Srbija	8,6	8,6	7,8	PG4
K – 2	Srbija	8,5	7,8	8,6	PG4
K – 3	Srbija	8,6	8,0	8,0	PG4
K – 4	Srbija	8,6	7,6	8,3	PG4
K – 7	Srbija	8,6	8,8	8,5	PG4
K – 8	Srbija	9,0	8,1	9,0	PG4
K – 10	Srbija	9,0	8,6	8,1	PG4
K – 12	Srbija	9,0	8,5	7,5	PG4
K – 14	Srbija	9,0	9,0	7,8	PG4
K – 16	Srbija	9,0	8,3	8,5	PG4
K – 17	Srbija	8,6	7,8	7,5	PG4
K – 18	Srbija	9,0	7,8	8,5	PG4
K – 19	Srbija	9,0	8,8	8,1	PG4
K – 20	Srbija	9,0	8,6	8,1	PG4
K – 22	Srbija	9,0	8,6	9,0	PG4
K – 23	Srbija	9,0	8,8	8,5	PG4
K – 24	Srbija	9,0	8,0	8,3	PG4
K – 25	Srbija	9,0	8,5	8,8	PG4
C – 1	Srbija	8,6	7,5	8,3	PG4
C – 2	Srbija	8,6	8,8	8,1	PG4

Izolot	Poreklo	Westar	Quinta	Glacier	PG
C – 3	Srbija	8,3	7,9	7,5	PG4
C – 4	Srbija	8,6	8,6	8,1	PG4
C – 5	Srbija	8,6	8,6	8,0	PG4
C – 6	Srbija	8,8	8,5	7,5	PG4
L – 6	Srbija	8,8	7,8	8,0	PG4
L – 7	Srbija	8,8	7,6	7,0	PG4
L – 9	Srbija	8,6	8,5	8,3	PG4
L – 10	Srbija	9,0	8,0	8,8	PG4
Lj – 1	Srbija	8,0	7,0	7,3	PG4
Lj – 4	Srbija	7,8	8,0	8,1	PG4
Lj – 5	Srbija	8,6	8,1	7,5	PG4
Lj – 6	Srbija	8,0	8,3	7,1	PG4
S – 1	Srbija	8,6	8,5	7,3	PG4
S – 2	Srbija	8,1	7,6	7,0	PG4
S – 3	Srbija	8,5	8,1	7,5	PG4
S – 4	Srbija	8,8	8,6	8,5	PG4
S – 6	Srbija	8,5	8,8	8,3	PG4
S – 7	Srbija	8,8	8,1	8,1	PG4
S – 8	Srbija	8,8	8,6	8,5	PG4
S – 10	Srbija	8,6	8,2	8,5	PG4
S – 11	Srbija	9,0	8,5	7,6	PG4
Gs – 1	Srbija	9,0	8,5	8,1	PG4
Gs – 2	Srbija	8,0	8,0	7,0	PG4
Gs – 3	Srbija	9,0	8,1	8,1	PG4
Gs – 5	Srbija	8,6	7,0	7,6	PG4
Gs – 6	Srbija	8,2	7,5	7,0	PG4
Gs – 7	Srbija	8,6	7,0	7,3	PG4
Gs – 10	Srbija	8,6	7,1	8,1	PG4
Gs – 12	Srbija	8,8	7,5	7,6	PG4
Gs – 13	Srbija	9,0	7,5	7,5	PG4
Gs – 14	Srbija	8,8	8,0	7,8	PG4
Gs – 15	Srbija	8,8	8,8	8,3	PG4
Gs – 16	Srbija	8,5	8,1	7,5	PG4
Gs – 18	Srbija	8,6	8,0	7,3	PG4
Gs – 19	Srbija	8,5	8,3	7,5	PG4
Gs – 21	Srbija	9,0	8,6	8,1	PG4
Gs – 22	Srbija	9,0	8,5	8,0	PG4
Gs – 23	Srbija	9,0	8,0	8,1	PG4
Gs – 24	Srbija	9,0	9,0	8,5	PG4
Gs – 25	Srbija	8,3	8,5	8,3	PG4
Gs – 26	Srbija	8,8	8,0	7,5	PG4
Gs – 27	Srbija	9,0	8,0	7,6	PG4



Podaci prikazani u tabeli 4 ukazuju da su u Srbiji prisutne sve patogene grupe (PG 1, PG2, PG3 i PG4). Osim toga može se zapaziti da najviše izolata pripada PG4 grupi, a najmanje PG2 u okviru vrste *L. maculans*. Svi izolati (K-111, K-112, K-113, itd.) pripadaju PG1 grupi odnosno vrsti *L. biglobosa*. Ovom analizom kao i prethodnim analizama se potvrđuje da u okviru istog lokaliteta mogu biti izolovani izolati koji pripadaju različitim patogenim grupama odnosno patogenim vrstama gljive (*L. maculans* i *L. biglobosa*).

## 6. 10. Prenošenje patogena semenom

Broj inficiranih (propalih) i zdravih biljaka bio je glavni kriterijum za ocenu nivoa patogenosti (prenošenje parazita semenom) kod ispitivanih izolata. Nakon 7 dana svi izolati (L.m, C-5, L-5, K-7, LJ-3, S-11, St-1, GS-3) su pokazali određenu patogenost na biljkama uljane repice (Graf. 1). Ova patogenost se ogledala u broju izniklih biljaka, poleganju biljaka (sl. 47) i (sl. 48).

Kod L.b (referentni izolat *L. biglobosa*) K-113 i K-115 izolata nakon 7 dana nije zapažena patogenost na biljkama uljane repice. Broj izniklih biljaka kod ovih izolata je sličan kontrolnoj varijanti (Graf. 1). Ni pri posmatranju nakon 14 dana (L.b, K-113 i K-115 izolati) nije priemećena pojava simptoma na izniklim biljkama

Tabela 5. Stepenn patogenosti izolata gljive u odnosu na kontrolu primenom Dunett-ovog testa

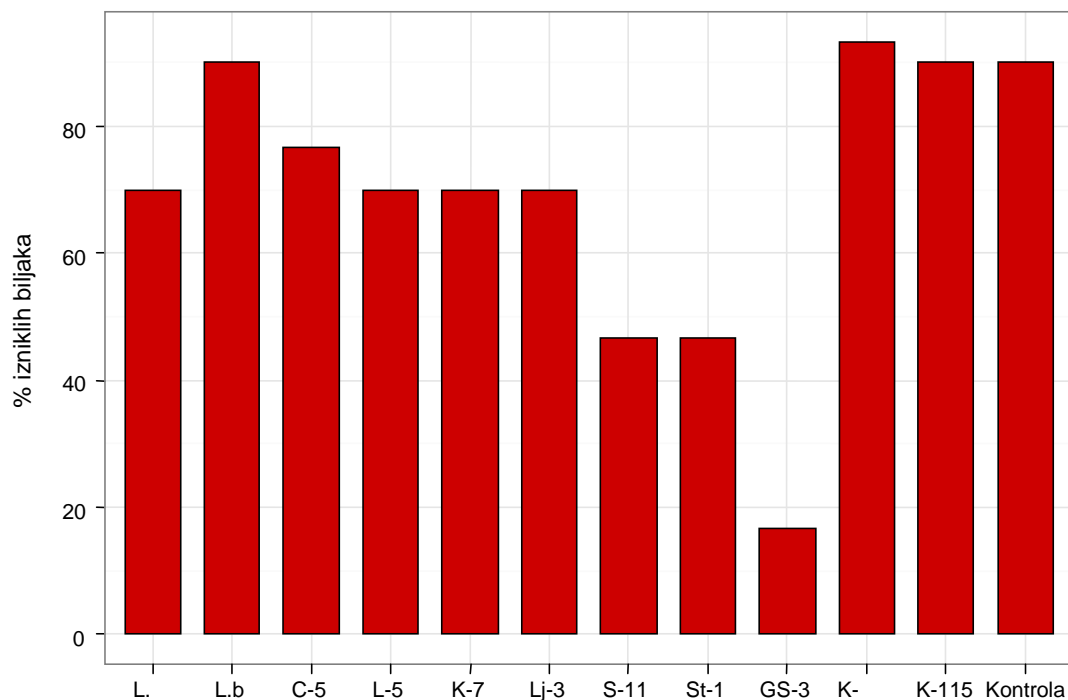
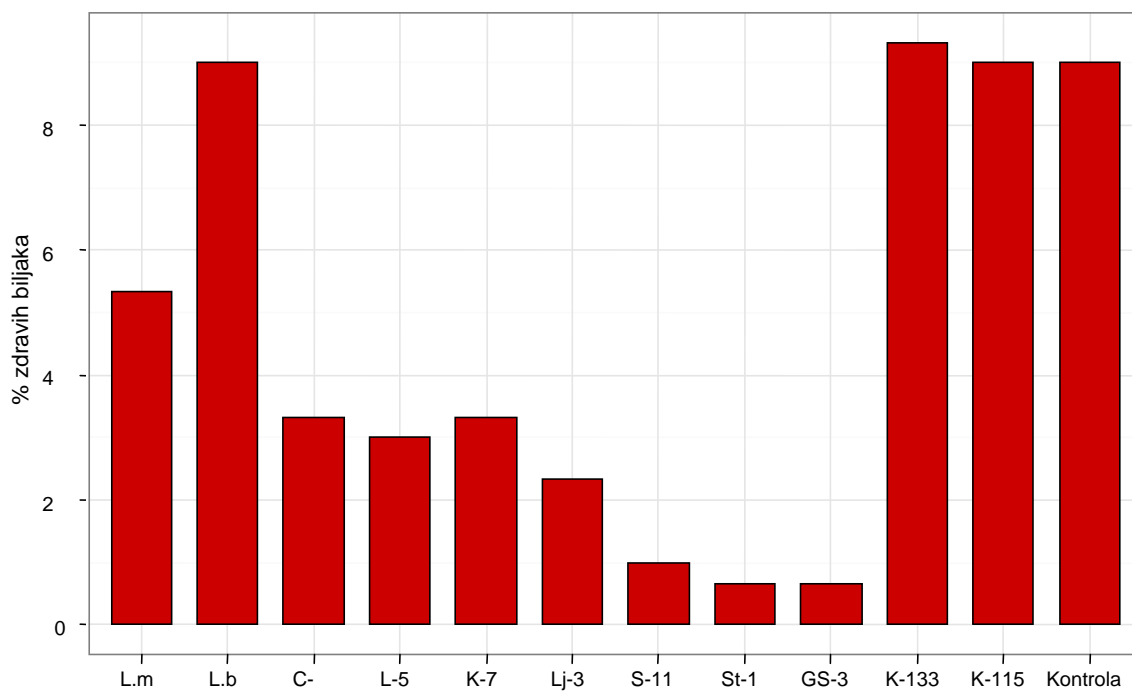
Izolat	% izniklih biljaka Nakon 7 dana	% zdravih biljaka Nakon 14 dana
L.m	nz <sup>a</sup>	*
L.b	nz	nz
C-5	nz	**
L-5	nz	**
K-7	nz	**
Lj-3	nz	**
S-11	**	**
St-1	**	**
GS-3	**	**
K-113	nz	nz
K-115	nz	nz
nz – nije značajno; * $P < 0.05$ ; ** $P < 0.01$		
<sup>a</sup> sva poređenja su urađena na <i>arcsin</i> transformisanim podacima		



Slika 47. Polegle i svenule biljke uljane repice nastale iz semena inokulisanog sa *L. maculans*

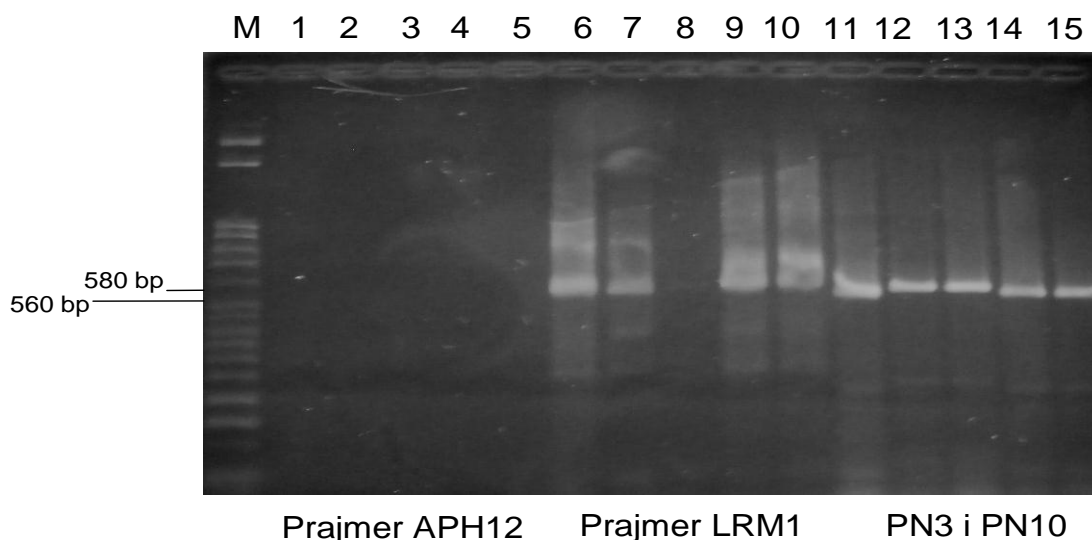


Slika 48. Simptomni na hipokotili i kotiledonima biljaka uljane repice nastale iz zaraženog semena *L. maculans* (levo: zaražena biljaka, desno – zdrava biljka)

Graf. 1. Mogućnost prenošenja gljiva *L. maculans* i *L. biglobosa* semenom. Stepen patogenosti izolata na biljkama uljane repice posle 7 dana nakon inokulacije semenaGraf. 2. Mogućnost prenošenja gljiva *L. maculans* i *L. biglobosa* semenom. Stepen patogenosti izolata na biljkama uljane repice posle 14 dana nakon inokulacije semena

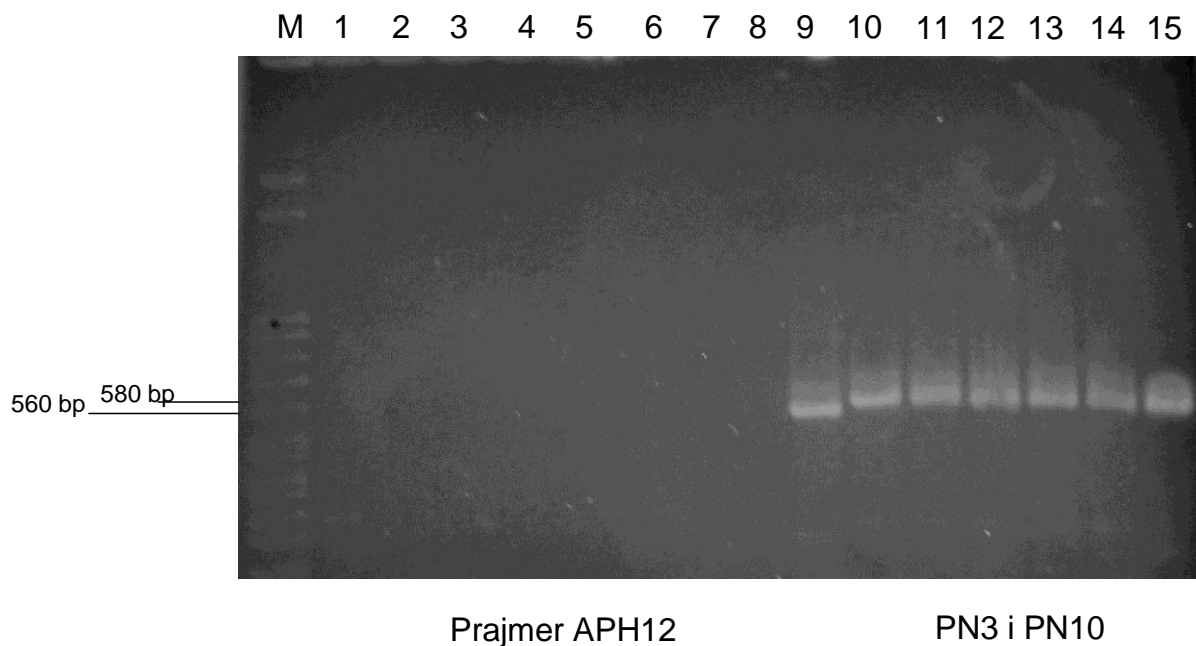
### 6. 11. Molekularna karakterizacija

Kao što je već navedeno u poglavlju materijal i metode rada za molekularnu identifikaciju izolata su korišćeni sledeći prajmeri: APH12, LRM1, PN3 i PN10).



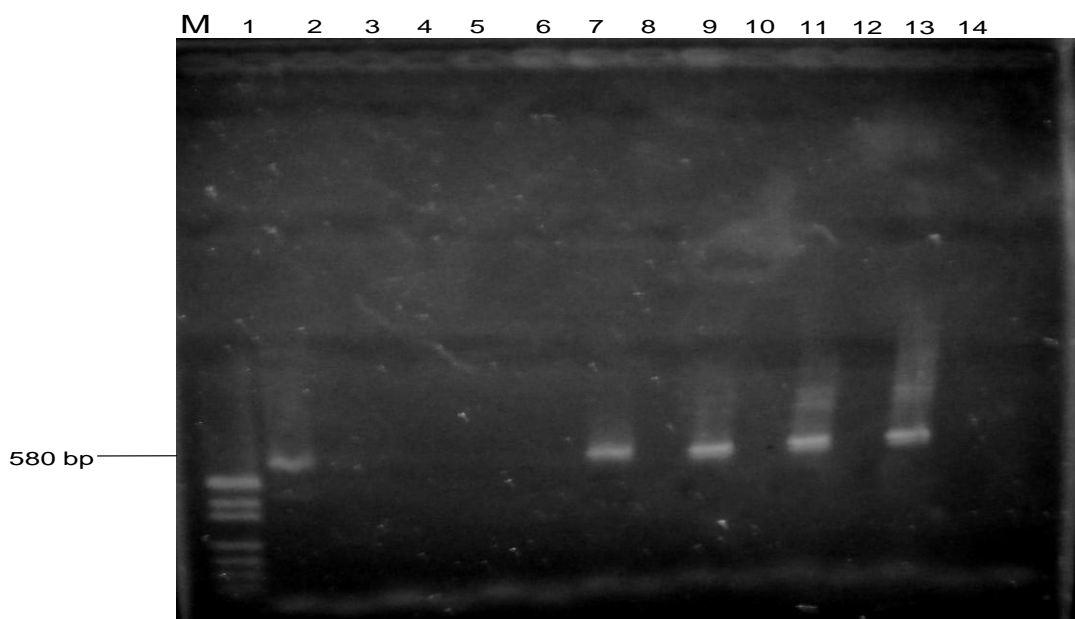
Slika 49. Amplifikacija DNK korišćenjem APH12, LRM1, PN3 i PN10 prajmera

DNK je amplifikovana korišćenjem APH12, LRM1, PN3 i PN10 prajmerima. Na slici 49 se može zapaziti da nije došlo do amplifikacije DNK kod ispitivanih izolata upotrebom APH12 prajmera. Dužina traka korišćenjem LRM1 prajmera za L.m. (referentni izolat *L. maculans*), L. b. (referentni izolat *L. biglobosa*), St-16 i K-6 je 580 bp, dok kod izolata K-115 nije došlo do umnožavanja DNK. Dužina traka korišćenjem PN3 i PN10 prajmera kod L.m, St-16 i K-6 je 560 bp, a kod L.b. i K-115 580 bp. Traka 1 L.m, 2 L.b, 3 K-115, 4 St-16, 5 K-6, APH12 prajmeri, 6 L.m, 7 L.b, 8 K-115, 9 St-16, 10 K-6, LRM1 prajmeri, 11 L.m, 12 L. b, 13 K-115, 14 St-16, 15 K-6, PN3 i PN10 prajmeri.



Slika 50. Amplifikacija DNK korišćenjem APH12, PN3 i PN10 prajmera

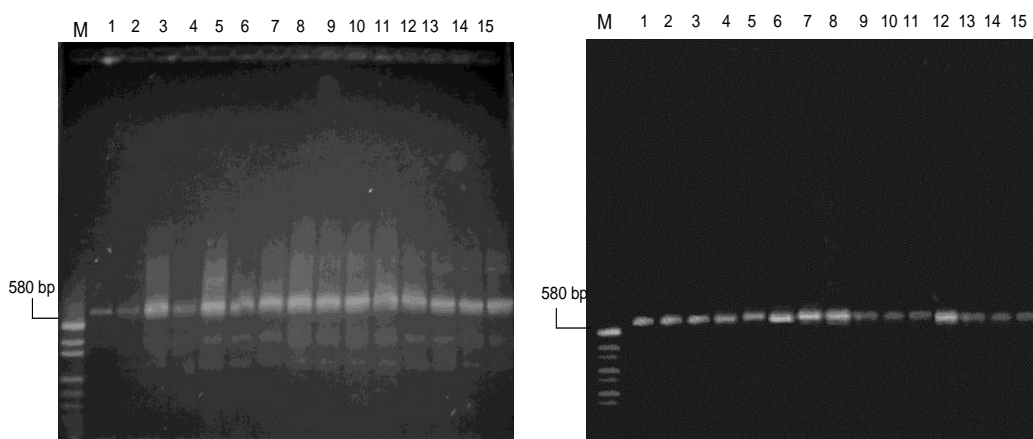
Na slici 50 su prikazani rezultati amplifikacije DNK korišćenjem APH12, PN3 i PN10 prajmera. Kao što se vidi i u drugom slučaju, APH12 prajmeri nisu umnožili DNK kod ispitivanih izolata, dok je dužina traka sa PN3 i PN10 prajmerima ista kao kod prethodne PCR analize. Traka 1 L.m, 2 L.b, 3 K-111, 4 K-112, 5 K-113, 6 K-116, 7 K-114, 8 K-115, 9 L.m, 10 L.b, 11 K-112, 12 K-113, 13 K-116, 14 K-114, 15 K-115.



Slika 51. Amplifikacija DNK korišćenjem APH12 i LRM1 prajmera

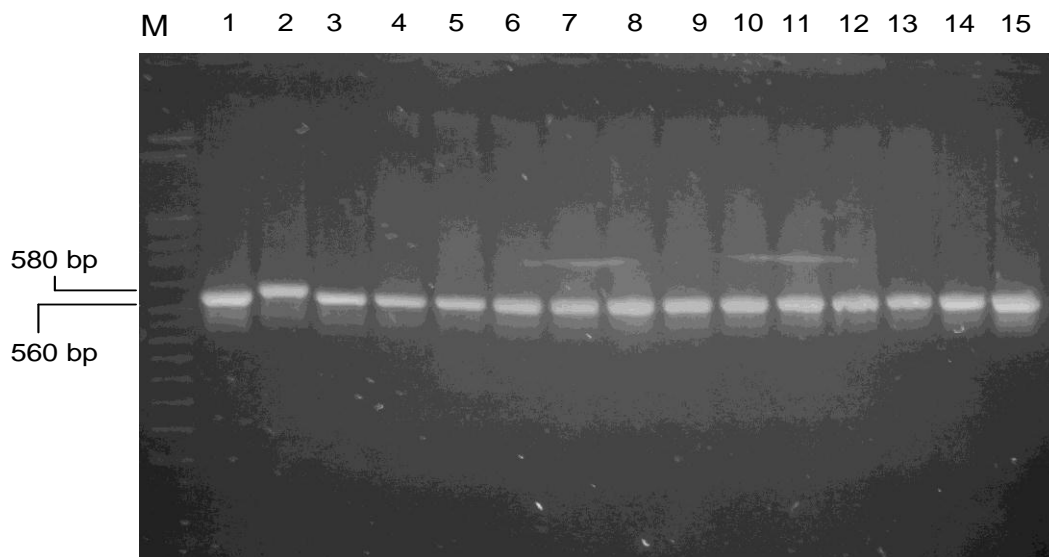
Na slici 51. su prikazani rezultati amplifikacije DNK korišćenjem APH12 i LRM1 prajmera. I u ovoj PCR analizi APH12 nisu amplifikovali DNK ispitivanih izolata. Amplifikacija DNK sa LRM1 prajmerima je dobijena samo kod L.m, GS-25, St-5, S-11 i C-3 izolata a dužina traka je 580 bp. U ovoj PCR analizi korišćena je DNK ekstrahovana po O'Gorman et al. (1994) modifikovana po Kuusk-u et al. (2002).

U svim sledećim PCR analizama ekstrakcija DNK je rađena po Day i Shattock (1997).

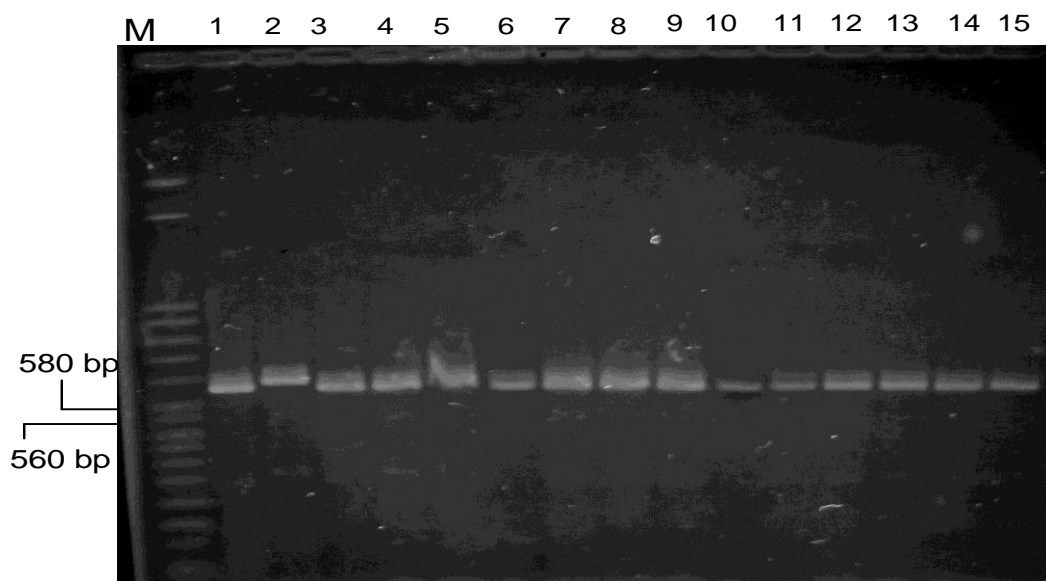


Slika 52. i 53. Amplifikacija DNK korišćenjem LRM1 prajmera

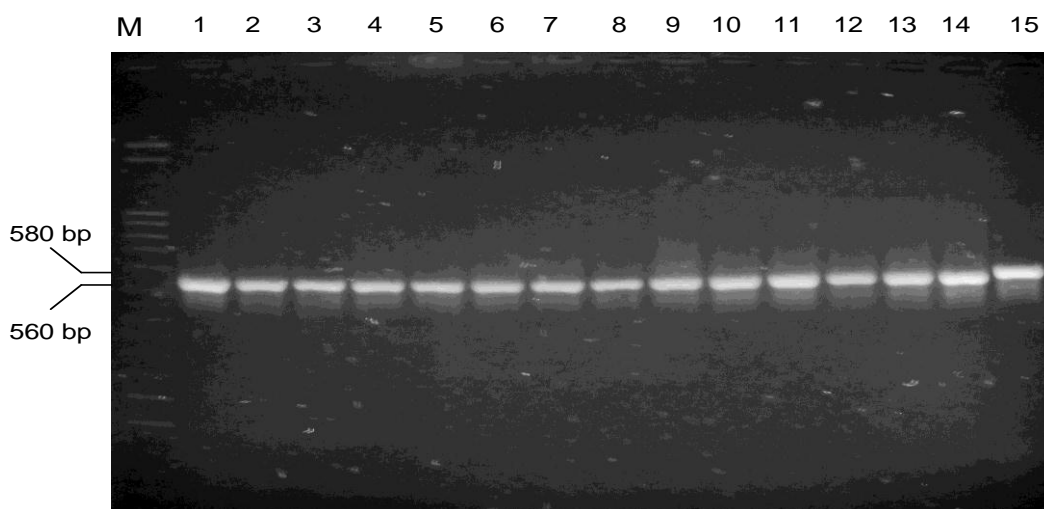
Na slikama 52 i 53 DNK je amplifikovana korišćenjem LRM1 prajmera. Kod svih ispitivanih izolata, kao i referentni izolat (L.m.), dužina traka je 580 bp što pokazuje da svi izolati pripadaju vrsti *L. maculans*. Na slici 52 traka M 500 bp marker 1 L.m, 2 St-1, 3 St-2, 4 St-3, 5 St-4, 6 St-5, 7 St-6, 8 St-7, 9 St-8, 10 St-9, 11 St-10, 12 St-11, 13 St-12, 14 St-13, 15 St-14. Na slici 53 traka M 500 bp marker, 1 L.m, 2 St-15, 3 St-16, 4 St-17, 5 St-18, 6 St-19, 7 St-20, 8 St-21, 9 St-22, 10 St-23, 11 St-24, 12 St-25, 13 St-26, 14 St-27, 15 St-28.



Slika 54. Amplifikacija DNK korišćenjem PN3 i PN10 prajmera



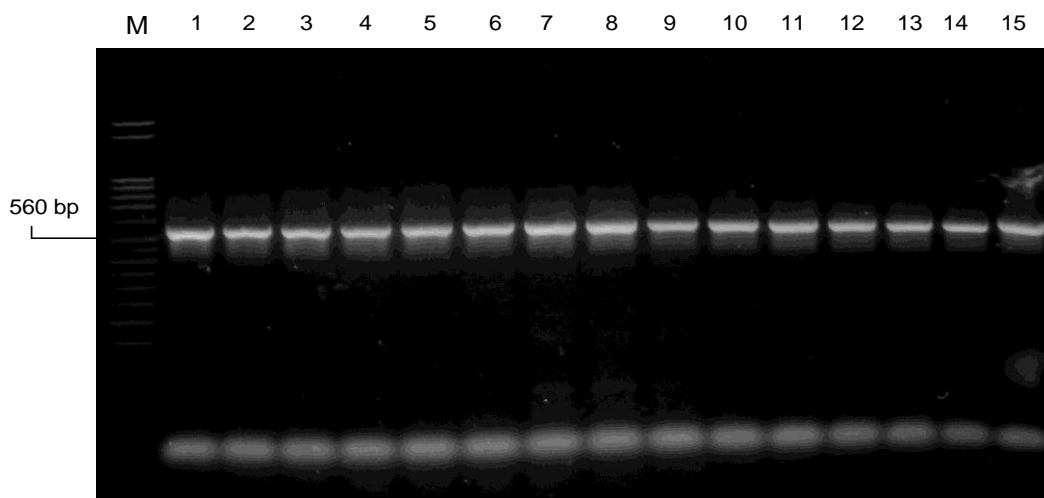
Slika 55. Amplifikacija DNK korišćenjem PN3 i PN10 prajmera



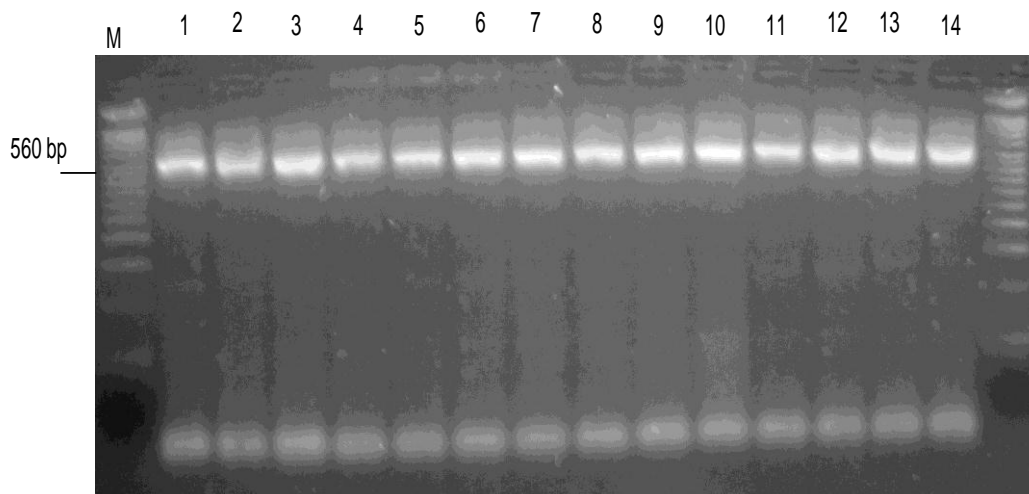
Slika 56. Amplifikacija DNK korišćenjem PN3 i PN10 prajmera

Na slikama 54, 55 i 56 DNA je amplifikovana korišćenjem PN3 i PN10 prajmera. Kod svih ispitivanih izolata, plus referentni izolat L.m. (*L. maculans*), dužina traka je 560 bp, dok je kod referentnog izolata L.b. (*L. biglobosa*) 580 bp. Na slikama 54, 55 i 56 traka M 3000 bp marker. Na slici 54 traka 1 L.m., 2 L.b, 3 GS-1, 4 GS-2, 5 GS-4, 6 GS-5, 7 GS-9, 8 GS-10, 9 GS-12, 10 GS-15, 11 GS-18, 12 GS-19, 13 GS-21, 14 GS-22, 15 GS-23. Na slici 55 traka 1 L.m, 2 L.b, 3 S-1, 4 S-2, 5 S-3, 6 S-4, 7 S-5, 8 S-6, 9 S-7, 10 S-8, 11 S-9, 12 S-10, 13 LJ-1, 14 LJ-2, 15 LJ-4. Na slici 56 traka 1 L.m, 2 K-1, 3 K-2, 4 K-3, 5 K-4, 6 K-5, 7 K-6, 8 K-7, 9 K-8, 10 K-9, 11 K-10, 12 K-23, 13 K-24, 14 K-25, 15 L.b. Na osnovu dužine traka sl 54,55 i 56 svi ispitivani izolati pripadaju vrsti *L. maculans* izuzev L.b. izolata.



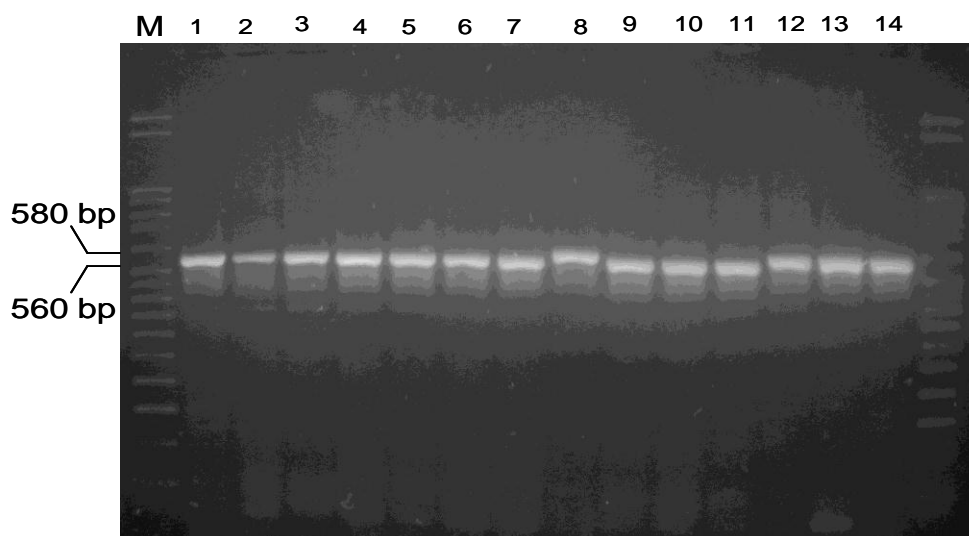


Slika 57. Amplifikacija DNK korišćenjem PN3 i PN10 prajmera



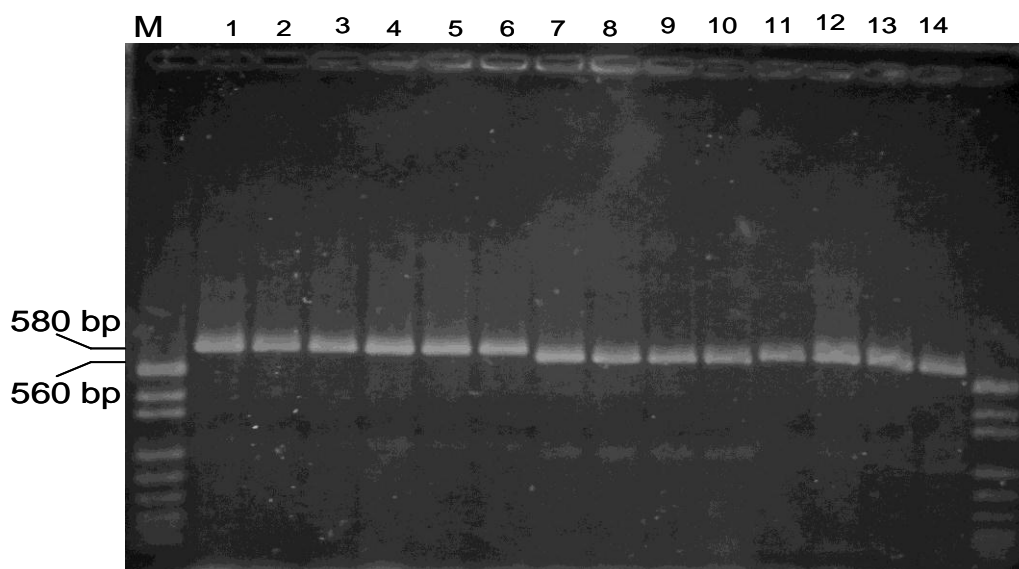
Slika 58. Amplifikacija DNK korišćenjem PN3 i PN10 prajmera

Na slici 57 i 58 DNK je amplifikovana korišćenjem PN3 i PN10 prajmera. Kod svih ispitivanih izolata plus referentni izolat L.m. (*L. maculans*) dužina traka je 560 bp. Na slici 57 traka M 3000 bp marker, 1 L.m, 2 K-11, 3 K-12, 4 K-13, 5 K-14, 6 K-15, 7 K-17, 8 GS-3, 9 GS-6, 10 GS-7, 11 GS-8, 12 GS-11, 13 GS-13, 14 GS-14, 15 GS-16. Na slici 58 traka M 3000 bp marker, 1 L.m, 2 L-1, 3 L-2, 4 L-3, 5 L-4, 6 L-5, 7 L-6, 8 L-7, 9 L-8, 10 L-9, 11 L-10, 12 LJ-3, 13 LJ-5, 14 LJ-6. Svi ispitivani izolati prikazani na slikama 57 i 58, a na osnovu dužine traka pripadaju vrsti *L. maculans*.



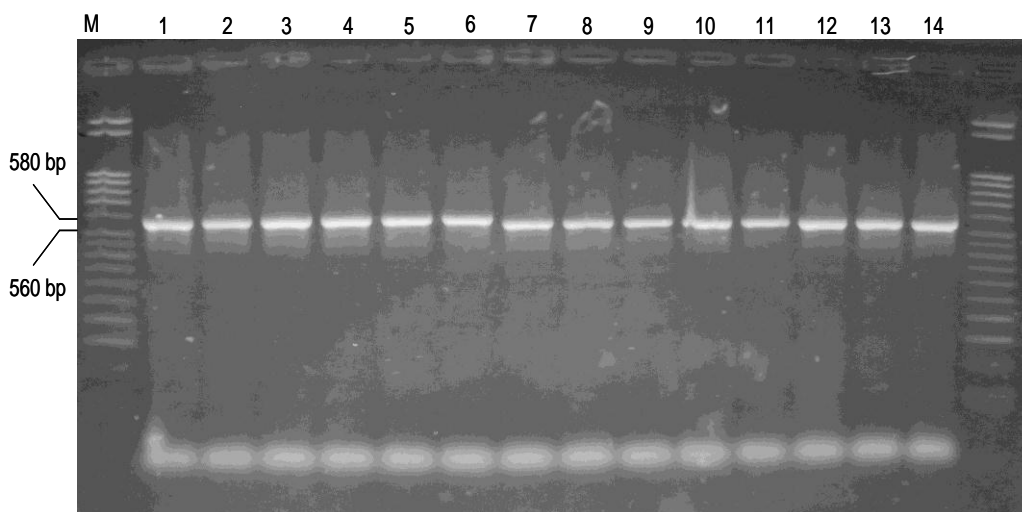
Slika 59. Amplifikacija DNK korišćenjem PN3 i PN10 prajmera

Na slici 59. DNK je amplifikovana sa PN3 i PN10 prajmerima. Traka M 3000 bp marker, 1 C-1, 2 C-2, 3 C-3, 4 C-4, 5 C-5, 6 C-6, 7 L.m, 8 L.b, 9 GS-24, 10 GS-26, 11 GS-27, 12 K-112, 13 K-117, 14 K-118. Kod izolata C-1, C-2, C-3, C-4, C-5, C-6, GS-24, GS-26, GS-27 i L.m. dužina traka je 560 bp, dok je kod L.b, K-112, K-117 i K-118 580 bp. Na osnovu PCR analize svi izolati označeni sa C, GS i L.m pripadaju vrsti *L. maculans*, a L.b, K-112, K-117 i K-118 pripadaju vrsti *L. biglobosa*.

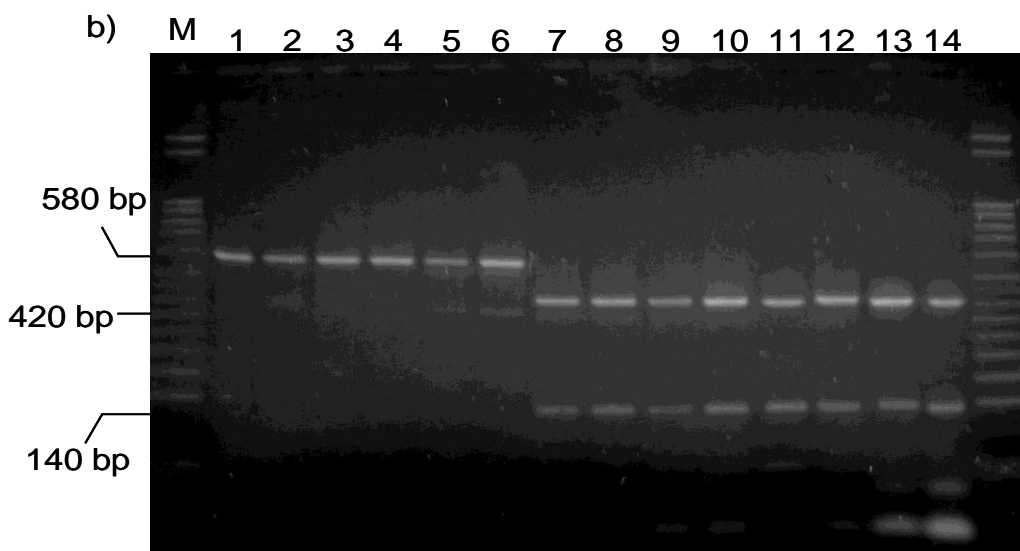


Slika 60. Amplifikacija DNK korišćenjem PN3 i PN10 prajmera

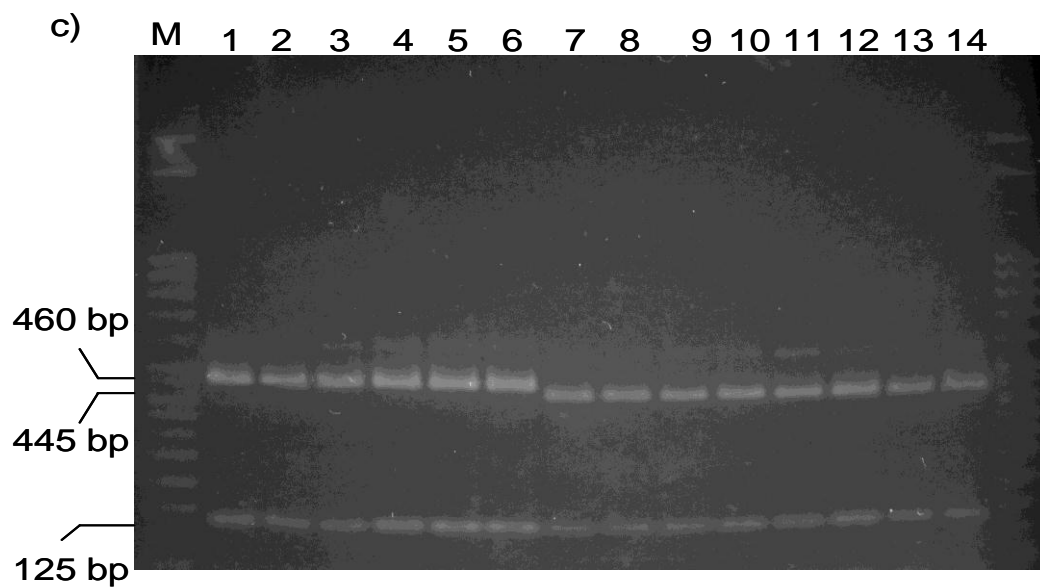
Na slici 60. DNK je amplifikovana sa PN3 i PN10 prajmerima. Traka M 3000 bp marker, 1 L.b, 2 K-111, 3 K-112, 4 K-113, 5 K-115, 6 K-116, 7 K-18, 8 GS-25, 9 K-16, 10 K-19, 11 K-20, 12 K-21, 13 K-22, 14 L.m. Kod izolata L.m (referentni izolat), K-18, GS-25, K-16, K-19, K-20, K-21, K-22 dužina traka je 560 bp, dok je kod izolata L. b. (referentni izolat) K-111, K-112, K-113, K-115, K-116 580 bp. Na osnovu dužine traka svi izolati L.m, K-18, GS-25, K-16, K-19, K-20, K-21, K-22 pripadaju vrsti *L. maculans*, dok L.b. K-111, K-112, K-113, K-115 pripadaju vrsti *L. biglobosa*.



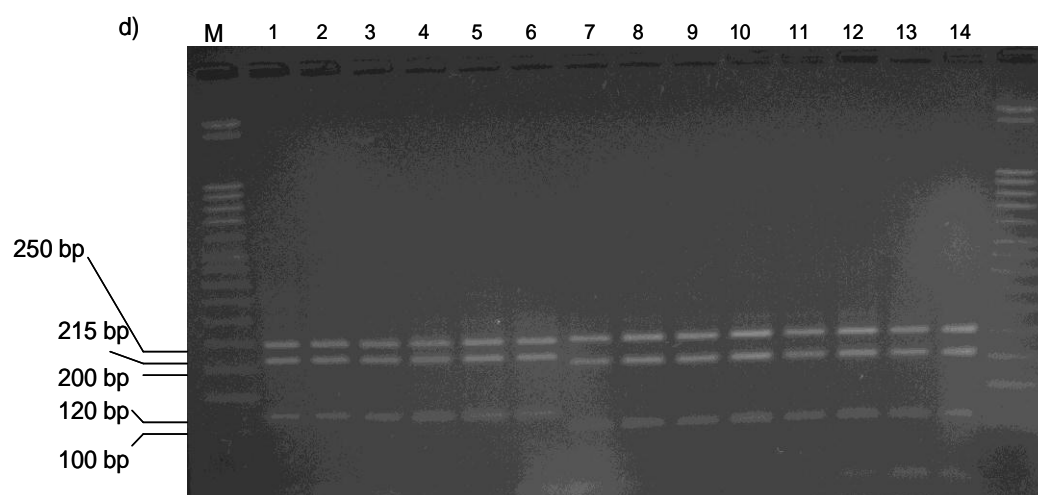
Slika 61a. Polimorfizam dobijen amplifikacijom DNK korišćenjem PN3 i PN10 prajmera



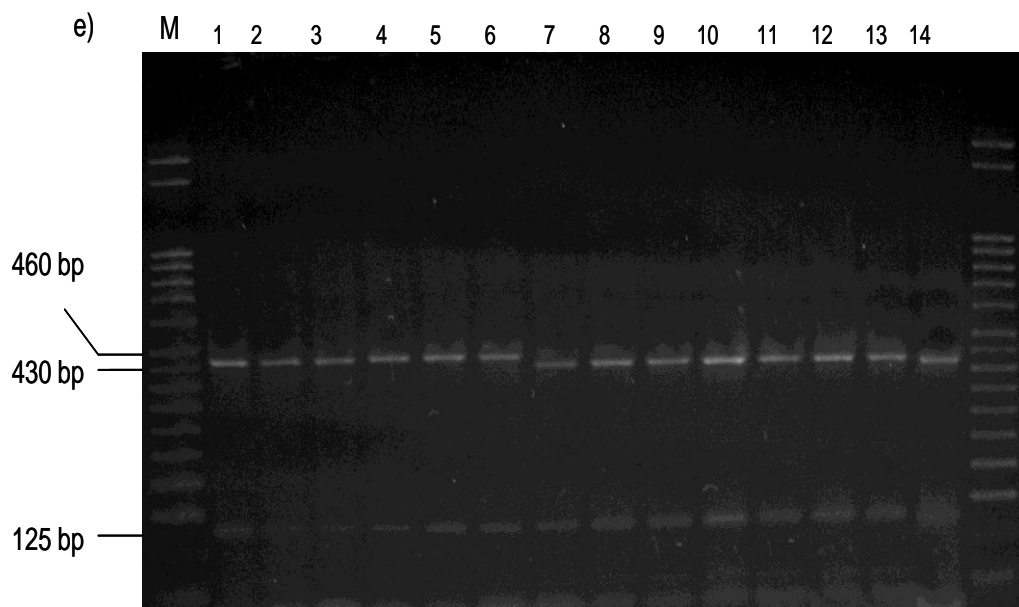
Slika 61 b. Profil dobijen digestijom amplifikovanog regiona sa BamHI



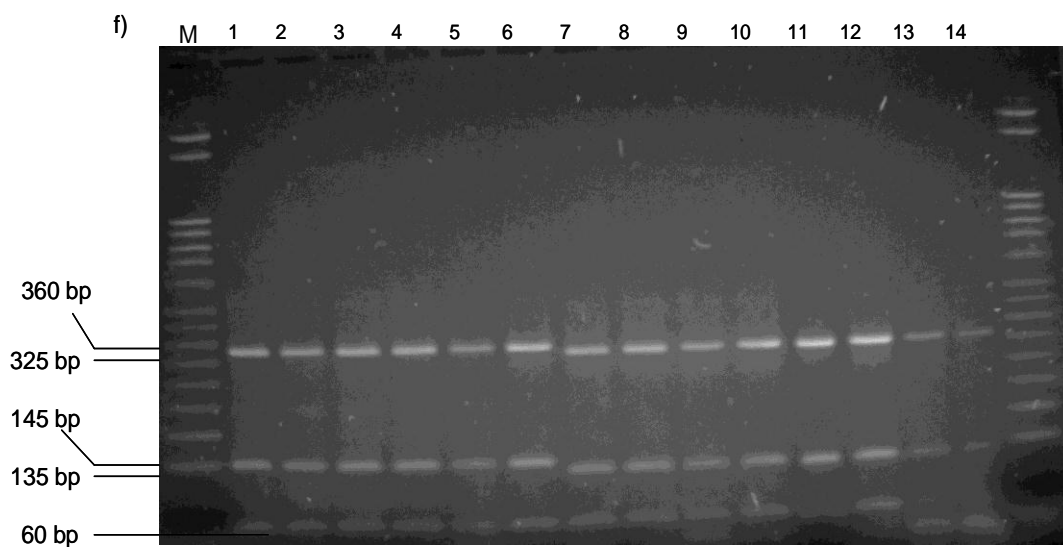
Slika 61 c. Profil dobijen digestijom amplifikovanog regiona sa HaeIII



Slika 61 d. Profil dobijen digestijom amplifikovanog regiona sa RsaI



Slika 61 e. Profil dobijen digestijom amplifikovanog regiona sa EcoRII



Slika 61 f. Profil dobijen digestijom amplifikovanog regiona sa AluI

Slika 61a. Polimorfizam dobijen amplifikacijom DNK korišćenjem PN3 i PN10 prajmera. Traka M 3000 bp marker, 1 L.b, 2 K-111, 3 K-112, 4 K-113, 5 K-115, 6 K-116, 7 K-2, 8 St-16, 9 GS-25, 10 L-5, 11 C-3, 12 LJ-2, 13 S-11, 14 L.m. Nakon PCR reakcije, DNK ispitivanih izolata (Sl. 61a) je korišćena za PCR-RFLP analizu. Profili

dobijeni digestijom amplifikovanog regiona sa 61b) *Bam*HI, 61c) *Hae*III, 61d) *Rsa*I 61e) *Eco*RII i 61f) *Alu*I.

Restrikcioni enzim *Bam*HI kod L.b, K-111, K-112, K-113, K-114, K-115 i K-116 seče DNK na 580 bp, dok kod K-2, St-16, GS-25, L-5, C-3, LJ-2, S-11 i L.m. izolata seče DNK na 420 i 140 bp (sl. 61b). Restrikcioni enzim *Hae*III kod L.b, K-111, K-112, K-113, K-114, K-115 i K-116 izolata seče DNK na 460 i 125 bp dok kod K-2, St-16, GS-25, L-5, C-3, LJ-2, S-11 i L.m. izolata seče DNK na 445 i 125 bp (sl. 61c). Na osnovu dobijenog polimorfizma svi ispitivani izolati (L.b, K-111, K-112, K-113, K-114, K-115 i K-116) pripadaju vrsti *L. biglobosa* NA1 ili NA3 podgrupi.

Restrikcioni enzim *Rsa*I kod L.b, K-111, K-112, K-113, K-114, K-115 i K-116 izolata seče DNK na 120, 215 i 250 bp dok kod K-2, St-16, GS-25, L-5, C-3, LJ-2, S-11 i L.m. izolata seče DNK na 100, 200 i 250 bp (sl.61d). Na osnovu dužine fragmenata svi ispitivani izolati (L.b, K-111, K-112, K-113, K-114, K-115 i K-116) pripadaju vrsti *L. biglobosa* dok izolati K-2, St-16, GS-25, L-5, C-3, LJ-2, S-1 i L.m. pripadaju vrsti *L. maculans*.

Restrikcioni enzim *Eco*RII kod L.b, K-111, K-112, K-113, K-114, K-115 i K-116 seče DNK na 125 i 460 bp (sl.61e). Na osnovu dobijenog polimorfizma svi ispitivani izolati (L.b, K-111, K-112, K-113, K-114, K-115 i K-116) pripadaju vrsti *L. biglobosa* NA1 podgrupa dok ostali izolati pripadaju vrsti *L. maculans*.

Restrikcioni enzim *Alu*I kod L.b, K-111, K-112, K-113, K-114, K-115 i K-116 seče DNK na 60, 145 i 360 bp dok kod K-2, St-16, GS-25, L-5, C-3, LJ-2, S-11 i L.m. izolata seče DNK na 60, 135 i 325 bp (sl.61f). Na osnovu RFLP analize svi ispitivani K-111, K-112, K-113, K-114, K-115 i K-116, poreklom iz Srbije kao i referentni izolat L.b. pripadaju vrsti *L. biglobosa* NA1 podgrupa, dok K-2, St-16, GS-25, L-5, C-3, LJ-2, S-11, takođe poreklom iz Srbije, kao i referentni izolat L.m. vrsti *L. maculans*. Prikazane dužine traka su izražene u bp (bazni parovi).

## VII. DISKUSIJA

Uljana repica (*Brassicae napus var. napus* L.) je industrijska biljka od velikog privrednog značaja, a u oko 30 zemalja sveta je najvažnija uljana biljna vrsta. U našoj zemlji površine pod ovom biljnom vrstom su se menjale, imale tendenciju pada i porasta, a poslednjih godina se sve više povećavaju. U poslednje dve decenije površine pod uljanom repicom variraju i kreću se od 2.000–7.000 ha (Crnobarac i Marinković, 2006). Uljana repica se gaji zbog semena, koje sadrži 40–48% ulja i 18–25% belančevina (Marjanović-Jeromela Ana et al, 2002).

Limitirajući faktor u proizvodnji uljane repice, koja se poslednjih godina sve više širi u proizvodnim reonima naše zemlje, predstavlja veliki broj fitopatogenih gljiva. Među brojnim oboljenjima, rak prizemnog dela stabla je ekonomski važna bolest uljane repice u svetu (Fitt et al., 2006), a verovatno u skorijoj budućnosti i kod nas. Parazit prouzrokuje simptome oboljenja od fenofaze kotildona pa sve do fenofaze zrenja (Petrie, 1979; Paul and Rawlinson, 1992). Gljiva se u prirodi održava pomoću piknida, micelija i pseudotecija (Williams, 1992).

### 7. 1. Morfološke karakteristike proučavanih izolata

Na PDA podlozi u početnim fazama razvoja, a i kasnije, svi ispitivani izolati (L.m, L-10, LJ-3, K-8, GS-27, St-12, S-2, C-5, L.b, K-112, K-113, K-114, K-115, K-117), stvaraju vazдушnu miceliju sivobeke boje dok je supstratna micelija u početku mlečnobeke boje, što je u skladu sa Williams & Fitt (1999) i Fitt et al. (2006). Vremenom dolazi do stvaranja bledocrnog pigmenta u podlozi kod izolata (L.m, L-10, LJ-3, K-8, GS-27, St-12, S-2, C-5) (Pound 1947; Humpherson-Jones, 1986; Williams & Fitt 1999; Mitrović i Marinković 2007), dok izolati (L.b, K-112, K-113, K-114, K-115, K-117) stvaraju i na PDA podlozi žutomrki pigment (Fitt et al. 2006; Hony et al. 2009).

Izolati (L.m, L-10, LJ-3, K-8, GS-27, St-12, S-2, C-5) imaju spor i nepravilan porast na PDA podlozi, sa rubom koji je često sa režnjevitim ivicama, što je u skladu sa Pound (1947), Koch et al. (1989), Mitrović i Marinković (2007), Williams & Fitt (1999), dok L.b, K-112, K-113, K-114, K-115, K-117, imaju brz porast sa dosta pravilnim rubom (McGee & Petrie 1978, Humpherson-Jones 1983, 1986). Brun et al. (1997) navode da u odsustvu RFLP analize a na osnovu virulentnosti, produkcije pigmenta i stvaranja fitotoksina sirodezmin Pl svi izolati se mogu svrstati u dve grupe: grupa A i B. Koch et al. (1989) navodi da izolati A grupe (*L. maculans*) imaju spor i nepravilan porast na nizu agarizovanih podloga, dok izolati B grupe (*L. biglobosa*) imaju brz i pravilan porast.

Međutim, postoji saopštenje da neki izolati A grupe (*L. maculans*) imaju brži porast od B grupe (*L. biglobosa*) izolata, te na bazi brzine porasta na podlogama ih je teško razlikovati (Delwiche 1980 cit. loc. Williams 1992, Kharbanda & Stevens 1993, Salisbury et al. 1995). Ipak, na osnovu morfoloških i biohemijskih karakteristika Koch et al. (1989), Petrie (1988), Hill et al. (1984) su izolate podelili u dve grupe agresivne i neagresivne sojeve.

Svi ispitivani izolati na PDA podlozi formiraju okruglaste piknide, mrke boje, pojedinačno ili u stromatičnim tvorevinama. Prečnik piknida kod L.b, K-112, K-113, K-114, K-115, K-117 izolata se kreće od 240 do 480  $\mu\text{m}$ , a kod izolata L.m, L-10, LJ-3, K-8, GS-27, St-12, S-2, C-5 od 220 do 510  $\mu\text{m}$  što je u skladu sa (Punithalingam and Holliday 1972, Hong et al. 2009). Piknospore iz piknida se oslobađaju u vidu jedne želatinozne mase krem do ružičaste boje. Piknospore su bezbojne kratko cilindrične jednoćelijske uglavnom prave neke malo povijene sa ili bez kapi ulja na krajevima veličine 1,30–2,20x2,80–5,40  $\mu\text{m}$ . Slične rezultate navode i drugi autori (Punithalingam i Holliday 1977; Williams 1992; Mitrović i Marinković 2007; Hong et al. 2009).

## 7. 2. Dokazivanje savršenog stadijuma

Pored piknida, gljiva formira i teleomorfni stadium. Kao i u drugim zemljama Australija, Kanada, Francuska, Nemačka, Švedska, Poljska, itd. (Kuusk et al. 2002, Bokor et al. 1975, Petrie 1978, Gladders & Musa 1980, Hall 1992, Mahuku et al. 1996, McGee 1974, West et al. 1999, Pérés & Poisson 1997, Korolewski et al. 2002,



Thürwächter et al. 1999, Jedryczka et al. 1999b) tako i kod nas, na žetvenim ostacima (stablo) micelija gljive obrazuje pseudotecije sa askusima i askosporama.

Osim prisutva patogena u stablu repice, za obrazovanje savršenog stadijuma je neophodna temperatura (15–20°C) i češća pojava kiše (Biddulph et al. 1999, Hammond 1985, Pérés & Poisson 1997, Huang et al. 2001, Toscano-Underwood et al. 2003). U našim klimatskim uslovima, u pojedinim godinama (visoke temperature i odsustvo atmosferskog taloga) često izostane obrazovanje pseudotecija krajem leta i tokom jeseni. Zbog toga infekcije uljane repice u jesen u našim uslovima često izostanu ili su veoma retke.

Retke infekcije i kad se dese rezultat su kontaminiranog semena ili prisustva insekatskih vrsta (buvači: *Phyllotreta* spp.). Veoma je čest slučaj da nakon žetve proizvođači ne zaoravaju žetvene ostatke. Na takvim parcelama tokom jula i avgusta često se može zapaziti regeneracija lisnih pupoljaka na pojedinim stablima. Ta mesta naseljavaju insekti koji se hrane mladim listom. Nakon nicanja novog useva insekti se sele sa starih strnjišta na nove parcele i tom prilikom na nogama prenose piknospore koje su se oslobodile iz piknida na starim stablima. Ova žapažanja su u skladu sa rezultatima (West et al. 2001, Barbetti & Khangura 2000 cit loc West et al. 2001, Wood & Barbetti 1977a).

U Srbiji (Vojvodina) se askospore *L. maculans* i *L. biglobosa* osim u jesen oslobađaju i tokom proleća, najčešće aprila i maja meseca, što je u skladu sa rezultatima (Gladolers & Musa 1980, Fitt et al. 2006). Oslobodene askospore preko povrede ili stoma inficiraju listove (Hammond et al. 1985) a u proleće pored lista inficiraju stabla, grane, cvetove i ljuske prodikujući na njima karakteristične simptome bolesti (sl. 1, 1a, 1b, 2a, 2b, 3, 4, 5, 6).

Posle žetve na ostacima obolelih delova stabla uljane repice tokom jeseni ili narednog proleća na izumrlim biljnim delovima gljive se razvijaju kao saprofiti i u biljnim delovima stvaraju pseudotecije. One su okruglastog oblika mrke boje sa kratkom ostiolom prečnika 313 do 532 µm što se slaže sa podacima (Punithalingam & Holliday 1972, Williams 1992). Askusi su cilindrični do topuzasti sa kratkom drškom, hijalni, veličine 16,72–21,39 x 90–160 µm. U svakom askusu se nalazi po 8 askospora. Askospore su prave do slabo povijene i sužene na krajevima u početku svetložute boje

sa 5 septi veličine 6–10,5 x 42–74 µm. Sa starenjem spore postaju žutomrke. Slične podatke navode i Punithalingam i Holliday (1972); Williams (1992); Magyar et al. (2006).

Simptomi na kotiledonima inficirani askosporama se javljaju u početku u vidu zelenkastobledih pega (West et al. 1999, 2001). U kasnijem periodu, inficirano tkivo nekrotira i u središnjem delu pege dolazi do obrazovanja piknida. Nakon pojave piknida, izvršena je izolacija iz inficiranog tkiva na PDA podlogu i dobijen je konidijski stadijum gljive (Smith 1956) opisan pod nazivom *Phoma lingam* (Tode: Fr.) Desmaz. S obzirom da je gljiva heterotalusna (Venn 1979 cit. Loc Petrie & Lewis 1985), pored obrazovanja pseudotecija i askospora u prirodnim uslovima, veći broj autora (Petrie & Lewis 1985, Mengistu et al. 1993, 1995) je dobio teleomorfni stadijum i u laboratorijskim uslovima. Mengistu et al. (1995) su uočili da na različitim podlogama je potreban različit vremeski priod za formiranje pseudotecija (7 ili 4 nedelje) i oslobađanje zrelih askospora. U našim ispitivanjima kod pojedinih sparivanih izolata (Tab. 3) takođe je dobijen savršeni stadijum gljive. Kod većine drugih izolata nije došlo do obrazovanja pseudotecija i askospora, a kod određenog broja izolata su se samo obrazovale pseudotecije bez askusa i askospora što je u skladu sa rezultatima (Petrie & Lewis 1985).

Verovatno da, podloga koja je korišćena nije imala uticaja na odsustvo formiranja pseudotecija i askospora već nekompatibilnost izolata, mada Mengistu et al. (1995) navodi da procenat vlage u podlozi utiče na broj i zrelost pseudotecija.

Obrazovanje pseudotecija između L.m. (referentni izolat *L. maculans* iz Velike Britanije) i C-2 i L.m i L-8 pokazuje da virulentni izolati su visoko kompatibilni, iako potiču iz različitih regiona, odnosno država, što je u saglasnosti sa (Petrie & Lewis 1985). Iako Schoemaker & Brun (2001) navode da kod sparivanja izolata iz grupe A i B ili Tox<sup>+</sup> i Tox<sup>0</sup> nema obrazovanja savršenog stadijuma, te na osnovu toga, kao i morfoloških molekularnih i virulentnih osobina, sve virulentne izolate su svrstali u vrstu *L. maculans*, a slabovirulentne i avirulentne u novu vrstu označena kao *L. biglobosa*. U ovim ispitivanjima, takođe, nisu dobijene pseudotecije kod sparivanja K-112 i K-118 izolata sa L.m (referentni izolat *L. maculans*) GS-13, C-2, LJ-1, St-1, K-11.

Međutim, navedeni podaci na osnovu samo ovih ispitivanja ne mogu biti relevantni zato što i kod nekih drugih izolata nije dobijen savršeni stadium. Ipak, na osnovu morfoloških i molekularnih ispitivanja produkcije pigmenta i virulentnosti, izolati K-112 i K-118 pripadaju drugoj vrsti i sasvim je logično da prilikom ispitivanja nije dobijen savršeni stadium, što je u saglasnosti, kao što je već navedeno, sa istraživanjima (Somda et al. 1997; Schoemaker & Brun, 2001).

### 7. 3. Obrazovanje pigmenta u tečnoj Czapek-ovoj podlozi

Kada se radi o formiranju pigmenta, pri gajenju gljiva na Czapek-ovoj tečnoj podlozi, rezultati pokazuju da svi (L.m, St-5, C-3, S-11) izolati ne stvaraju žutomrki pigment u odnosu na K-113 i K-115 izolate. Odsustvo žutomrkog pigmenta kod ispitivanih izolata (L.m, St-5, C-3, S-11) ih svrstava u grupu virulentnih (agresivnih) izolata u odnosu na K-113 i K-115 koji obrazuju pigment, što je u skladu sa navodima (Bonman et al. 1981, Koch et al. 1989, Williams & Fitt 1999, Kuuska et al. 2002).

### 7. 4. Dokazivanje fitotoksina

Za ispitivanje formiranja fitoksina u ovim istraživanjima korišćeno je 5 izolata (L.m, St-5, C-3, S-11, K-113). Svi izolati su gajeni na tečnoj Czapek-ovoj podlozi. Filtrat tečne podloge na kojoj su gajeni izolati gljiva su korišćeni za dokazivanje fitotoksina. S obzirom da između izolata K-113 i K-115 nije primećena razlika u boji pigmenta na tečnoj Czapek podlozi, kao i zbog njihovih istih morfoloških i molekularnih karakteristika u ovim ispitivanjima je korišćen samo K-113, kao predstavnik slabovirulentnih izolata.

Na TLC ploči (sl. 20) izolati koji su produkovali fitotoksine, izuzev izolata K-113, a na osnovu pregleda pod UV lampom i izračunatih R<sub>f</sub> vrednosti (0,11, 0,17, 0,27, 0,34, 0,42 i 0,51) ukazuju na sličnost rezultata (Koch et al. 1989, Badaway & Hoppe 1989). U ovim ispitivanjima na TLC ploči (sl.20) nije vršeno razdvajanje frakcije (mrlje) pod oznakom 5 na 5a i 5b zbog kompatibilnosti frakcije što nije slučaj kod navedenih autora.

Nakon preparativnog izolovanja frakcije pod oznakom 2, a na osnovu Rf vrednosti (0,44), ponovo je naneto na TLC ploču i nakon razdvajanja frakcija izračunate su Rf vrednosti 2a (Rf=0,49), 2b (Rf=0,40), 2c (Rf=0,32) i 2d (Rf=0,22). Navedene Rf vrednosti su identične sa navodima (Koch et al. 1989) u frakciji 2a i 2c, odnosno navedene Rf vrednosti se nalaze u opsegu izračunatih Rf vrednosti sirodezmina (Badaway & Hoppe 1989). Rf vrednost frakcije 4 u tankoslojnoj hromatografiji (sl.20) je identična deacetilsirodezminu PL (sintetizovan iz sirodezmina PL – Badaway & Hoppe 1989). Badaway & Hoppe (1989) frakciju 5a na osnovu Rf vrednosti označavaju sirodezminom B a 5b sirodezminom C. S obzirom da u ovim istraživanjima nije razdvojena frakcija 5 na 5a i 5b prisustvo sirodezmina B i C je potvrđena LC-MS-MS analizom, što je u skladu sa rezultatima (Pedras et al. 2008a, 2008b).

Pik sa retencionim vremenom  $t_R=1,57$  min (označen sa **P444**) pripada jedinjenju molekulske mase 444 Da, što odgovara **sirodezminu J** (de-*O*-acetilsirodezmin A) ili njegovom **1-epimeru** (de-*O*-acetilsirodezmin PL). Oba izomera ranije su već identifikovana u kulturama *L. maculans* (Badaway & Hoppe 1989, Pedras & Seguin-Swarts 1992, Pedras et al. 2007, Pedras et al. 2008a, Pedras et al. 2008b).

U MS<sup>1</sup> spektru (sl. 26) uočavaju se slabi signali  $m/z$  445 [M+H]<sup>+</sup>, 467 [M+Na]<sup>+</sup> i 483 [M+K]<sup>+</sup> i fragment  $m/z$  381 [M+H-S<sub>2</sub>]<sup>+</sup> kao osnovni jon. Profil izotopskih pikova: A (100%), A+1 (22,9%) i A+2 (12,3%), slično sa teorijskim profilom za bruto-formulu C<sub>18</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>S<sub>2</sub> (100%, 22,9%, 12,8%). U MS<sup>2</sup> spektru (sl. 27) dominira fragment  $m/z$  381 [M+H-S<sub>2</sub>]<sup>+</sup>. Gubitak neutralne čestice S<sub>n</sub> saglasan je sa ponašanjem sirodezminâ i drugih epipolitiiodioksopiperazina (Howlett et al. 2001, Wu et al. 2008).

Pik sa  $t_R=1,42$  min (**P454**) pripada jedinjenju molekulske mase 454, što odgovara **sirodezminu H** (monosulfidni homolog 1-epi-sirodezmina A), koji je ranije već pronađen u kulturama *L. maculans* (Pedras et al. 2008a Pedras et al. 2008b). U MS<sup>1</sup> spektru (sl. 28) uočavaju se joni (čega?) 455 [M+H]<sup>+</sup>, 477 [M+Na]<sup>+</sup>, 493 [M+K]<sup>+</sup>, kao i fragmenti 437 [M+H-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> i 393 [M+H-H<sub>2</sub>O-CO]<sup>+</sup>. Profil izotopskih pikova: A (100%), A+1 (22,6%), A+2 (8,4%) saglasan je sa teorijskim profilom za C<sub>20</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>S (100%, 24,4%, 8,9%).

U MS<sup>2</sup> spektru (sl. 29) uočava se niz fragmenata koji odgovaraju gubitku alkoholne OH grupe acetil-grupe (u vidu ketena C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O) i neidentifikovane grupe

$m/z=78$ : 437  $[M+H-H_2O]^+$ , 413  $[M+H-C_2H_2O]^+$ , 393  $[M+H-CO_2]^+$ , 377  $[M+H-78]^+$ , 351  $[M+H-CO_2-C_2H_2O]^+$ , 315  $[M+H-CO_2-78]^+$ , itd. U  $MS^1$  spektru pika sa  $t_R=2,22$  min (**P476**) prikazanom na sl.30 uočavaju se joni niskog intenziteta na  $m/z$  477  $[M+H]^+$ , 499  $[M+Na]^+$  i 515  $[M+K]^+$ , kao i intenzivan (osnovni jon u spektru) fragment 381  $[M+H-S_3]^+$ .

Na osnovu molekulske mase i gubitka  $S_3$ , može se zaključiti da je u pitanju **deacetil derivat sirodezmina C ili F**. (Badaway & Hoppe 1989) su saopštili o prisustvu deacetil sirodezmina C u filtratu *L. maculans* koja je dosta slična frakciji označenoj sa 3 na TLC ploči (sl.20) Zbog nedostatka informacija o ponašanju njegovog epimera jedinjenje 476 može biti uslovno identifikovano samo kao deacetil sirodezmin C. Profil izotopskih pikova: A (100%), A+1 (25,0%), A+2 (17,2%) u saglasnosti je sa pretpostavljenom formulom  $C_{18}H_{24}N_2O_7S_3$  (teorijski profil 100%, 23,7%, 17,4%).

U  $MS^2$  spektru (sl.31 ) kao osnovni jon javlja se fragment 381  $[M+H-S_3]^+$ , a pored njega prisutni su i joni 353  $[M+H-S_3-CO]^+$  i 325  $[M+H-S_3-2CO]^+$ . Isti fragmenti uočeni su i u  $MS^2$  spektrima pika P444 (koji se razlikuje samo po broju atoma sumpora u mostu), što ide u prilog pretpostavljenoj strukturi. Zatim su detektovana dva pika koja odgovaraju jedinjenjima molekulske mase 486: **P486a** ( $t_R=2,03$  min) i **P486b** ( $t_R=2,66$  min). Dva poznata jedinjenja ove mase – **sirodezmin A** i **sirodezmin G** (ili **PL**) – predstavljaju epimere i nije ih moguće razlikovati isključivo na osnovu MS spektra. Na osnovu njihovog relativnog odnosa i činjenice da je sirodezmin PL glavni fitotoksin *L. maculans* (Pedras et al. 2008a, Pedras et al. 2008b, Howlett et al. 2001, Elliott et al. 2007.) može se pretpostaviti da pik P486a odgovara sirodezminu A dok P486b predstavlja PL. Rf vrednost frakcije 6 (Rf=0,51) (sl.20) u tankoslojnoj hromatografiji je veoma slična koju navodi Badaway & Hoppe (1989) za sirodezmin PL standard (Rf=0,50)

U  $MS^1$  spektrima oba pika (sl. 32 i 34) prisutni su joni 487  $[M+H]^+$ , 509  $[M+Na]^+$ , 525  $[M+K]^+$ , kao i intenzivan fragment 423  $[M+H-S_2]^+$  što je u skladu sa literaturnim podacima (Elliott et al. 2007). Profil izotopskih pikova A, A+1 i A+2 kod pika P486a (100%, 25%, 14,0%) odn. (100%, 23,6%, 14,2%) kod pika P486b saglasan je sa bruto formulom  $C_{20}H_{26}N_2O_8S_2$  (teorijski profil: 100%, 25,2%, 13,5%).

Najznačajniji fragmenti u MS<sup>2</sup> spektrima oba pika (sl. 33 i 35) su: 423 [M+H-S<sub>3</sub>]<sup>+</sup>, 395 [M+H-S<sub>3</sub>-CO]<sup>+</sup>, 367 [M+H-S<sub>3</sub>-2CO]<sup>+</sup>, 246 i 229.

Pik sa retencionim vremenom 2,32 min, označen kao **P508**, u MS<sup>1</sup> spektru (sl. 36) sadrži jone  $m/z$  531 [M+Na]<sup>+</sup> i 547 [M+K]<sup>+</sup> slabog intenziteta i  $m/z$  381 [M+H-S<sub>4</sub>]<sup>+</sup> kao osnovni jon. Na osnovu molekulske mase i gubitka 4 atoma sumpora, može se pretpostaviti da je u pitanju **tetrasulfidni homolog deacetilsirodezmina A**, odnosno deacetil-derivat sirodezmina B, E ili K. Sirodezmin K je takođe pronađen u ekstraktu *L. maculans* (Pedras & Seguin-Swarts 1992). Detektovana su tri pika jedinjenja molekulske mase 518: slabo zastupljeni **P518a** ( $t_R=2,71$  min) i **P518b** ( $t_R=2,92$  min) i intenzivni **P518c** ( $t_R=3,34$  min).

U MS<sup>1</sup> spektrima ovih pikova (sl. 37, 39 i 41) uočavaju se joni  $m/z$  519 [M+H]<sup>+</sup>, 541 [M+Na]<sup>+</sup> i 557 [M+K]<sup>+</sup> kao i intenzivan jon fragmenta  $m/z$  423 [M+H-S<sub>3</sub>]<sup>+</sup>. Poznata su dva izomerna trisulfidna sirodezmina mase 518: **sirodezmin C i F**. Verovatno je da 518 C predstavlja sirodezmin C, koji je poznat kao glavni sirodezmin patogene gljive *L. maculans* (Badaway & Hoppe 1989), dok je 518a sirodezmin F. Rf vrednost frakcije 5 u tankoslojnoj hromatografiji je identičan sirodezminu C, koji je determinisan od strane (Badaway & Hoppe 1989). Teorijski izotopski profil za ova jedinjenja bruto-formule C<sub>20</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>S<sub>3</sub> dat je kao A (100%), A+1 (26,0%), A+2 (18,1%) i u dobroj je saglasnosti sa eksperimentalnim podacima: 100%, 26,5% i 17,2% za P518a 100%, 26,3% i 16,3% za P518b i 100%, 26,6% i 18,8% za P518c.

Budući da su sirodezmini C i F 1-epimeri, može se očekivati da će imati slične ili identične MS<sup>2</sup> spektre. Zaista, MS<sup>2</sup> spektri pikova P518a i P518c (sl. 38 i 42) pokazuju veoma sličan obrazac fragmentacije: osnovni jon na  $m/z$  423 [M+H-S<sub>3</sub>]<sup>+</sup> i niz fragmenata:  $m/z$  395 [M+H-S<sub>3</sub>-CO]<sup>+</sup> 367 [M+H-S<sub>3</sub>-2CO]<sup>+</sup> 246, 229 i 140. MS<sup>2</sup> spektar trećeg pika (sl. 40), P518b, značajno se razlikuje – dok je i u ovom slučaju osnovni jon 423, javlja se i više fragmenata odsutnih kod P518a i P518c – intenzivni fragment  $m/z=345$  [M+H-S<sub>3</sub>-78]<sup>+</sup> kao i joni 501 [M+H-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> i 441 [M+H-78]<sup>+</sup>. Moguće je da ovaj pik predstavlja izomer sirodezmina C i F sa različitim položajem acetil-grupe (na C2a-OH grupi ili bočnoj hidroksimetil-grupi).

Pik sa retencionim vremenom 3,51 min označen sa **P550**, u MS<sup>1</sup> spektru (sl. 43) sadrži slab signal na  $m/z$  589 [M+K]<sup>+</sup> i intenzivan signal na  $m/z$  423 [M+H-S<sub>4</sub>]<sup>+</sup>. Na

osnovu molekulske mase i gubitka 4 atoma sumpora, može se pretpostaviti da je u pitanju tetrasulfidni homolog sirodezmina A, odnosno **sirodezmin B, D, E ili K**. Sirodezmin K ranije je već detektovan u kulturama *L. maculans* (Pedras et al. 2008a, Pedras et al. 2008b). Oba sirodezmina B i K su pronađeni u kulturi *L. Maculans*, dok sirodezmin E je identifikovan u *Sirodesmium diversum* (Badaway & Hoppe 1989, Pedras et al. 2008a, Pedras et al. 2008b, Buckingham, 2007).

Samo u frakcijama II/1 i III/1 detektovan je pik **P318** na  $t_R=1,39$  min. U MS<sup>1</sup> spektru (sl. 44) se, pored jonâ  $m/z$  319 [M+H]<sup>+</sup>, 341 [M+Na]<sup>+</sup>, 357 [M+K]<sup>+</sup> i 659 [2M+Na]<sup>+</sup>, zapaža i intenzivan fragment  $m/z$  251 (osnovni jon). Molekulskoj masi od 318 odgovara **fomamid**, jedinjenje već identifikovano u kulturama *L. maculans* (Pedras et al. 2008a, Pedras et al. 2008b). Fragment  $m/z$  251 u tom slučaju odgovara gubitku O-vezane prenil-grupe kao C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>. Profil izotopskih pikova: A (100%), A+1 (18,0%), A+2 (2,8%) saglasan je sa pretpostavljenom formulom C<sub>17</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (teorijski profil 100%, 20,1%, 2,7%).

U MS<sup>1</sup> spektru pika **P311** sa  $t_R=0,95$  min uočavaju se joni  $m/z$  312 [M+H]<sup>+</sup>, 334 [M+Na]<sup>+</sup>, 350 [M+K]<sup>+</sup> i 623 [2M+H]<sup>+</sup> kao i jon fragmenta  $m/z$  176. Molekulska masa odgovara **fomaliginu A** ili **vasabidionu E** ranije pronađenima u nekim kulturama *L. maculans* (Pedras et al. 2007).

Fomalid, leptomakulini, polanrazini, fomaligoli i makulansini A i B, ranije pronađeni u kulturama *L. maculans* (Pedras et al. 2007, Pedras et al. 2008a, Pedras et al. 2008b, Howlett et al. 2001) gajenim na određenim podlogama, nisu u ispitivanim uzorcima prisutni u detektabilnim količinama.

Dobijeni rezultati na tankoslojnoj i preparativnoj hromatografiji sa izračunatim Rf vrednostima i LC-MS analizom ukazuju da ispitivani izolati (L.m, C-3, S-11, St-5) na Czapek-ovoj podlozi stvaraju sirodezmine (fitotoksin). Na osnovu LC-MS analize je utvrđeno da je koncentracija sirodezmina PL i C najveća u frakciji 2b i 2c (Sl. 17–21). Ove dve frakcije su ispoljile i najjaču fitotoksičnost na ispitivanim kotiledonima u odnosu na frakciju 1 i 2a (sl. 45). Međutim, ovde treba navesti da prilikom ispitivanja fitotoksičnosti nije vršeno razdvajanje dobijenih sirodezmina, odnosno cela frakcija (5 µl) je naneta na povređeni deo kotiledona.

Na slikama od 17 do 21 može se zapaziti da su u frakcijama 1, 2a, 2b, 2c, LC-MS analizom otkriveni i drugi sirodezmini (deacetil sirodezmin PI i deacetil sirodezmin C) koji takođe izazivaju fitotoksičnost, što je u skladu sa navodima Badaway & Hoppe (1989). Ako je već poznato da sirodezmin PI i C predstavljaju glavne fitotoksine (Badaway & Hoppe 1989), sasvim je logičan zaključak zašto su frakcija 2b i 2c kod ispitivanih izolata pokazale najveću fitotoksičnost (sl. 17–21). Fitotoksičnost ispitivanih sirodezmina na kotiledonima se ispoljavala u početku hlorozom, a kasnije je inficirani deo nekrotirao što je u skladu sa (Fox & Howlett 2008). Propadanje tkiva prouzrokuju polisulfidni mostovi u diketopiperazinskom prstenu (Gardiner et al. 2005). Diketopiperazinski prsten potiče od cikličnog dipeptida i sumporni mostovi prenose sve poznate toksičnosti ovih molekula (Mullbacher et al. 1986). Gardiner et al. (2005) navodi da disulfidni mostovi predstavljaju ključnu strukturu za stvaranje različitih reakcija kiseonika i spajanja sa ostacima cisteina iz proteina za koje se smatra da stvaraju toksičnost kod ćelija. Iako se zna da disulfidni mostovi izazivaju toksični efekat, ipak pravi mehanizam toksičnosti još uvek nije dovoljno razjašnjen (Gardiner et al. 2004, 2005).

## 7. 5. Određivanje patogenih grupa

Od ukupno 119 izolata izolovanih tokom 2009. i 2010. godine u Srbiji (Vojvodina), a na osnovu patogenog testa na diferencijalnim sortama (Westar, Quinta i Glacier), 8 izolata pripada PG1, odnosno 6,7%, 5 izolata pripada PG2, odnosno 4,3%, 22 izolata pripada PG3, odnosno 18,4% i 84 izolata PG4 odnosno 70,5%. Ovim ispitivanjima je utvrđeno da su sve patogene grupe prisutne u proizvodnim regionima (Vojvodine) Srbije. Slične rezultate o prisustvu PG (patogena grupa) u drugim zemljama navode Mengistu et al. 1991, Kuusk et al. 2002, Chen & Fernando 2006.

Patogene grupe u okviru populacije grupe A nisu jednako zastupljene u svim regionima. U (Ontario) Kanadi, Mahuku et al. (1997) je pronašao da je PG4 bila zastupljena sa 80%, PG3 sa 11% i pod pretpostavkom da preostalih 9% pripada novoj grupi označena sa PG5. Za razliku od Mahuku et al. (1997), izolati iz zapadne Kanade uglavnom pripadaju PG2 (Mengistu et al. 1991). U Francuskoj preko 90% ispitivanih



izolata pripada PG3, preostali deo su uglavnom bili izolati iz PG4, i manji broj iz PG2 (Ansan–Melayah et al. 1997, Penaud et al. 1999a). U severnoj Dakoti (USA) i Manitoba (zapadna Kanada) u ispitivanjima koja su sproveli Chen & Fernando (2006) 76,6% izolata je pripadalo PG2 i 21,3% PG1 a preostali deo izolata je pripadao PG3, PGT i PG4.

Na osnovu dobijenih simptoma na kotiledonima diferencijalnih sorti i skali (Koch et al. 1991) nije konstatovana PGT u našim istraživanjima, što je u skladu sa navodima Chena & Fernanda (2006) da je nova PG otkrivena, za sada u SAD i Kanadi. U Švedskoj su dominantne PG3 i PG4, dok PG2 nije uopšte konstatovana a PG 1 je prisutna u veoma niskom procentu (Kuusk et al. 2002). Isti autori navode da nema korelacije između patogene grupe i mesta infekcije i da je PG1 uglavnom posmatrana na gornjem delu stabla, dok je PG1 u Srbiji izolovana sa vrata korena. U Australiji odnos PG3 i PG4 je izjednačen, PG2 je prisutna, ali u dosta niskom procentu, dok PG1 nije otkrivena (Mengistu et al. 1991). Ako procentualno uporedimo podatke, procenat zastupljenosti patogenih grupa PG4 i PG3 u Srbiji je dosta sličan sa podacima za ove patogene grupe u Kanadi (Mahuku et al. 1997). S obzirom da su u Srbiji od pet postojećih otkrivene četiri patogene grupe, izuzev PGT, naši podaci o zastupljenosti patogenih grupa su slični sa navodima Chen & Fernando (2006).

Istraživanja o prisustvu patogenih grupa mogu obezbediti važne informacije o nivou patogenosti *L. maculans* u proizvodnim regionima gajenja uljane repice.

## 7. 6. Prenošenje patogena semenom

Pored ispitivanja patogenosti askospora na kotiledonima i određivanja patogenih grupa na osnovu virulentnosti piknospora, izvršena su ispitivanja mogućnosti prenošenja parazita semenom. Svi izolati: L.m, C-5, L-5, K-7, LJ-3, S-11, St-1, GS-3 su prouzrokovali simptome bolesti na klijancima uljane repice, izuzev izolata L.b, K-113 i K-115, što znači da se prenose semenom uljane repice (gr.1) Nakon 14 dana procenat propalih biljaka, koje su nastale iz zaraženog semena je uvećan kod većine ispitivanih izolata, što se slaže sa rezultatima (Bonman et al. 1981).

Pojava simptoma na hipokotilu i kotiledonima inficiranog semena, ukazuje da se parazit može prenositi i na ovaj način (Petrie 1979b, Hall 1992, Wood & Barbetti

1977a). Wood & Barbetti (1977a) navode da u Zapadnoj Australiji procenat inficiranog semena se kreće od 0,1–0,2% dok se u Kanadi kreće do 5% (Hall et al. 1996) Gabrielson (1983) navodi da seme može biti inficirano i do 18%. Pored uljane repice patogen se prenosi i drugim kupusnjačama (Gugel & Petrie 1992). Prisustvo *L. maculans* i *L. biglobosa* u celom svetu gde se repica gaji, odnosno na svim kontinentima, se može tumačiti i mogućnošću njihovog prenošenja semenom ove biljke (West et al. 2001). Česta pojava simptoma na kotiledonima i hipokotilu u Australiji, i pored askospora, je povezana i sa učestalom kontaminacijom semena (Barbetti & Khangura cit. loc. West et al. 2001, West et al. 2001). Iako su infekcije semena retke, mogu biti veoma važne u širenju patogena u nove regione (Jacobsen & Williams 1971), odnosno u širenju gljive u okviru istih i susednih regiona (Bonman et al. 1981). U eksperimentima u Kanadi učestale infekcije semena izazivaju, u početku pojavu pegavosti, a kasnije patogen prouzrokuje rak stabla (Hall et al. 1996). Ovi navodi potvrđuju naša ispitivanja o mogućnosti prenošenja gljive putem semena.

## 7. 7. Molekularna karakterizacija

Molekularna istraživanja su vrešena kod 119 izolata poreklom iz Srbije i dva referentna izolata iz Velike Britanije. U sprovedenim molekularnim ispitivanjima nije dobijena (ekstrakcija DNK po Day & Shattock) amplifikacija DNK sa APH12 prajmerima (sl.50) za L.b. (referentni izolat *Leptosphaeria biglobosa*) K-111, K-112, K-113, K-114, K-115 i K-116 izolate kao ni za izolat L.m. (*Leptosphaeria maculans*). (Kuusk et al. 2002) takodje, nije dobio amplifikaciju DNK sa APH12 prajmerima kod izolata (*Leptosphaeria biglobosa*) iz Kanade i Larid 2, ali je dobio amplifikaciju DNK kod izolata iz Francuske, Poljske, Švedske i IBCN 09 izolata kod kojih su APH12 prajmeri amplifikovali fragment od oko 1900 bp.

Fragmenti DNK dužine od oko 560 bp za L.m. izolat i 580 bp za L.b, K-112, K-113, K-114, K-115, K-116 (sl. 50) amplifikovani su sa PN3 i PN10 prajmerima. Slične rezultate su dobili Balesdent et al. (1998). U ponovljenoj ekstrakciji DNK po metodi (Day & Shattock 1997) APH12 prajmer nije amplifikovao fragmente kod ispitivanih izolata, dok LRM1 prajmer je amplifikovao fragmente od oko 580 bp za L.m, L.b, St-16

i K-6, osim za izolat K-115, što se slaže sa rezultatima (Taylor & Borgmann 1994). Isti autori navode da LRM1 prajmeri ne hibridizuju DNK slabo virulentnih izolata, sa izuzetkom jednog izolata – što se u sprovedenim istraživanjima pokazalo da su LRM1 prajmeri amplifikovali DNK kod referentnog izolata L.b. (*Leptosphaeria biglobosa*) od oko 580 bp kao i kod L.m. (referentni izolat *Leptosphaeria maculans*), St-16 i K-6, izuzev K-115 gde nije primećen fragment u agaroznom gelu.

Zbog nesaglasnosti rezultata istraživanja urađena je ekstrakcija DNK po (O’Gorman et al. 1994), modifikovana po (Kuusk et al. 2002). U ovoj PCR analizi su korišćeni APH12 i LRM1 prajmeri. I u ovom slučaju APH12 prajmeri nisu amplifikovali DNK ispitivanih izolata. Međutim, kada su korišćeni LRM1 prajmeri došlo je do amplifikacije DNK od oko 580 bp kod referentnog izolata L.m. (*Leptosphaeria maculans*), GS-25, St-5, S-11 i C-3. Na drugoj strani amplifikacija DNK kod L.b. (referentni izolat) i K-115 nije dobijena (sl. 51), što je u skladu sa rezultatima (Kuusk et al. 2002). U svim ostalim analizama LRM1 prajmeri (sl. 52 i 53) su amplifikovali DNK od oko 580 bp što navodi na zaključak da svi ispitivani izolati pripadaju vrsti *Leptosphaeria maculans*, a što se slaže sa rezultatima (Taylor & Borgman 1994, Kuusk et al. 2002).

PN3 i PN10 prajmeri kod ispitivanih izolata (sl. 54, 55,56 itd.) amplifikuju DNK od oko 560 bp za vrstu *Leptosphaeria maculans* odnosno 580 bp za vrstu *Leptosphaeria biglobosa* što je u skladu sa rezultatima (Balesdent et al. 1998) dok Mendes–Pereira et al. (2003) navodi vrednost od 468 bp za *Leptosphaeria maculans* (Tox<sup>+</sup> reprezentativne izolate) odnosno 496 bp za *Leptosphaeria biglobosa* NA1, NA2 i NA3 podgrupu. Na osnovu RFLP profila navedene vrste se takođe mogu razlikovati. Upotrebom restriktionog enzima EcoRI za sečenje DNK, uočeno je prisustvo trake dužine 430 bp kod agresivnih izolata (*Leptosphaeria maculans*), dok kod neagresivnih izolata (*Leptosphaeria biglobosa*) ovaj fragment nije primećen (Koch et al. 1991). U sprovedenim istraživanjima svi restrikcioni enzimi (*Bam*HI, *Hae*III, *Eco*RII, *Rsa*I i *Alu*I) kod ispitivanih izolata seku DNK na jednom, odnosno na dva mesta, dok *Alu*I i *Rsa*I seku DNK na tri mesta.

Dobijeni polimorfizam restrikcionim enzimima je omogućio identifikaciju ispitivanih izolata poreklom iz Srbije. Tako izolati K-111, K-112, K-113, K-114, K-115

i K-116 pripadaju vrsti *Leptosphaeria biglobosa* dok K-2, St-16, GS-25, L-5, C-3, S-11, LJ-2 pripadaju vrsti *Leptosphaeria maculans*. Pored razlikovanja izolata na nivou vrsta, dobijeni polimorfizam restrikcionim enzimima *HaeIII*, *EcoRII* i *AluI* svi ispitivani izolati (K-111, K-112, K-113, K-114, K-115 i K-116) pripadaju vrsti *Leptosphaeria biglobosa* podgrupa NA1 što je u skladu sa rezultatima (Balesdent et al. 1998) koja je dominantna na Evropskom kontinentu (Gall et al. 1995, Jedryczka et al. 1999, Fitt et al. 2006). Na osnovu RFLP analize i analize izoenzima utvrđeno je da agresivni izolati formiraju kompaktnu grupu koja se razlikuje od slabo virulentnih izolata.

Istim metodama je, takođe, utvrđeno da se slabo virulentni izolati mogu svrstati u tri pod grupe: NA 1 NA 2 i NA 3 (Koch et al. 1991, Gall et al. 1995). Gall et al. (1995) navode da je NA 1 podgrupa dominantna u Evropi, dok je NA 2 više zastupljena u Kanadi.

## VIII. ZAKLJUČAK

Rezultati prikazani u ovoj disertaciji donose nova saznanja o patogenim, morfološkim i molekularnim karakteristikama gljiva uzročnika raka stabla uljane repice u Srbiji što doprinosi boljem poznavanju etiologije i epidemiologije oboljenja i njegovoj lakšoj kontroli.

Istraživanja su povrdila široku rasprostranost bolesti na celoj teritoriji Srbije (Vojvodina). Zahvaljujući primerenoj metodologiji izvršena je uspešna karakterizacija dobijenih izolata u ispitivanim uzorcima. Poređenjem morfoloških, patogenih i molekularnih karakteristika može se zaključiti da su u okviru roda *Leptosphaeria* u Srbiji prisutne sledeće vrste: *L. maculans* i *L. biglobosa*.

U morfološkom pogledu od 12 ispitivanih izolata 5 izolata (K-112, K-113, K-114, K-115 i K-117) ima pravilan i brz porast na PDA podlozi u odnosu na (L-10, LJ-3, K-8, GS-27, St-12, S-2 i C-5) izolate. Micelija kod svih izolata je prljavo bele boje. Veličina oblik i boja kod svih izolata je ista s tim da je veličina piknida nešto manja kod K-112, K-113, K-114, K-115 i K-117. Izolati L-10, LJ-3, K-8, GS-27, St-12, S-2 i C-5 na PDA podlozi obilnije sporulišu u odnosu na K-112, K-113, K-114, K-115 i K-117. Pored konidijskog, gljiva obrazuje i savršeni stadium u obliku pseudotecija sa askusima i askosporama.

U tečnoj Czapek-ovoj podlozi izolati K-113 i K-115 produkuju žutomrki pigment, dok St-5, C-3 i S-11 ne produkuju pigment, ali stvaraju fitotoksine. U ovim ispitivanjima dokazano je da izolati *L. maculans* (L.m, St-5, C-3, S-11) produkuju više fitotoksina. Dobijeni rezultati na tankoslojnoj i preparativnoj hromatografiji sa izračunatim Rf vrednostima i LC-MS analizom ukazuju da ispitivani izolati (L.m, C-3, S-11, St-5) na Czapek-ovoj podlozi stvaraju sirodezmine (fitotoksine). Na osnovu LC-MS analize je utvrđeno da je koncentracija sirodezmina PL i C najveća u frakciji 2b i 2c. Ove dve frakcije su ispoljile i najjaču fitotoksičnost na ispitivanim kotiledonima u odnosu na frakciju 1 i 2a.

Na osnovu ispoljenih simptoma na diferencijalnim sortama (Wester, Quinta i Glacier) izolati K-111, K-112, K-113, K-114, K-115, K-116, K-117 i K-118 pripadaju patogenoj grupi PG1 odnosno grupa B dok izolati od K-1 do K-25, St-1 do St-28, GS-1 do GS-27, C-1 do C-6, L-1 do L-10, S-1 do S-11, LJ-1 do LJ-6 pripadaju PG2, PG3 i PG4 odnosno grupa A.

Kod veštačke inokulacije semena izolati C-5, L-5, K-7, LJ-3, S-11, St-1 i GS-3 su prouzrokovali simptome posle 7 i 14 dana, dok pojava simptoma kod K-113 i K-115 nije primećena.

Na osnovu amplifikacije DNK sa PN3 i PN10 prajmerima dužina traka kod K-111, K-112, K-113, K-114, K-115, K-116, K-117 i K-118 je 580 bp dok kod ostalih izolata (K-1 do K-25, St-1 do St-28, GS-1 do GS-27, C-1 do C-6, L-1 do L-10, S-1 do S-11, LJ-1 do LJ-6) je 560 bp.

Kod RFLP analize K-111, K-112, K-113, K-115 i K-116 se razlikuju u jednom odnosno dva restrikciona mesta od K-2 St-16 GS-25 L-5 C-3 LJ-2 i S-1 izolata. Na osnovu svih sprovedenih istraživanja se može zaključiti: da izolati K-111, K-112, K-113, K-114, K-115, K-116, K-117 i K-118 pripadaju vrsti *Leptosphaeria biglobosa* podgrupa NA1 po novoj klasifikaciji *Leptosphaeria biglobosa* brassice, dok K-1 do K-25, St-1 do St-28, GS-1 do GS-27, C-1 do C-6, L-1 do L-10, S-1 do S-11, LJ-1 do LJ-3 pripadaju vrsti *Leptosphaeria maculans* po novoj klasifikaciji *Leptosphaeria maculans* brassicae. I na kraju možemo sa sigurnošću konstatovati da su u Srbiji prisutne obe vrste (*Leptosphaeria maculans* i *Leptosphaeria biglobosa*) kao prouzrokovajući suve truleži korena i raka stabla uljane repice (*Brassica napus* var. *oleifera* L.).

---

## IX. LITERATURA

- Ansan-Melayah D, Rouxel T, Bertrand J, Letarnec B, Mendes-Pereira E, Balesdent M-H (1997): Field efficiency of *Brassica napus* specific resistance correlates with *Leptosphaeria maculans* population structure. *Eur. J. Plant Pathol.* 103 835–841.
- Antonijević D (1999): Gljivične bolesti uljane repice u SR Srbiji. Magistarski rad. Univerzitet u Beogradu Poljoprivredni fakultet Beograd-Zemun.
- Aubertot J N, West J S, Bousset-Vaslin L, Salam M U, Barbetti M J, Diggle A J (2006): Improved resistance management for durable disease control: a case study of *Phoma* stem canker of oilseed rape (*Brassica napus*). *Eur. J. Plant Pathol.* 114: 91-106.
- Badawy H M A, Hoppe H H (1989): Nonspecific Phytotoxic Effects of Sirodesmins on Host and Nonhost Plants of *Leptosphaeria maculans* *J. Phytopathology* 127: 137-145.
- Badawy H M A, Hoppe H H (1989): Production of Phytotoxic Sirodesmins by Aggressive Strains of *Leptosphaeria maculans* Differing in Interactions with Oil Seed Rape Genotypes *J. Phytopathology* 127: 146-157.
- Balesdent M H, Attard A, Kuhn M L, Rouxel T (2002): New avirulence genes in the phytopathogenic fungus *Leptosphaeria maculans*. *Phytopathology* 92: 1122-1133.
- Balesdent M H, Barbetti M J, Hua Li, Sivasithamparam K, Gout L, Rouxel T (2005): Analysis of *Leptosphaeria maculans* Race Structure in a Worldwide Collection of Isolates. *The American Phytopathological Society Vol. 95 No 9* 1061-1071.
- Balesdent M H, Gall C, Robin P, Rouxel T (1992): Interspecific variation in saluble mycelial protein and esterase patterns of *Leptosphaeria maculans* French isolates. *Mycological Research* 96: 677-684.
- Balesdent M H, Jedryczka M, Jain L, Mendes-Pereira E, Bertrand J, Rouxel T (1998): Conidia as a substrate for internal transcribed spacer-based PCR identification of

- components of the *Leptosphaeria maculans* species complex. *Phytopathology* 88: 1210-1217.
- Barbetti M J, Khangura K (1999): Managing blackleg in the disease-prone environment of Western Australia. Proc. of the 10<sup>th</sup> International Rapeseed Congress, Canberra, Australia
- Biddulph J E, Fitt B D L, Leech P K, Welham S J, Gladders P (1999): Effects of temperature and wetness duration of infection at oilseed rape leaves by ascospores of *Leptosphaeria maculans* (stem canker). *European Journal of Plant Pathol.* 105: 769-781.
- Bokor A, Barbetti M J, Brown A G P, MacNich G C, Wood P McR (1975): Blackleg of rapeseed. *J. Agric. West. Aust.* 16: 7-10.
- Bonman J M, Gabrielson R L, Williams P H, Delwiche P A (1981): Virulence of *Phoma lingam* to cabbage. *Plant Disease* 65: 865 – 867.
- Brun H, Levivier S, Eber F, Renard M, Chevre A M (1997): Electrophoretic analysis of natural populations of *Leptosphaeria maculans* directly from leaf lesions. *Plant Pathology* 46 147-154.
- Buckingham J. Dictionary of Natural Products. Version 15.1 on CD-ROM Chapman & Hall/CRC Boca Raton USA 2007.
- Chen Yu, Fernando W G D (2006): Prevalence of pathogenicity groups of *Leptosphaeria maculans* in western Canada and North Dakota USA. *Can. J. Plant Pathol.* 28: 533-539.
- Crnobarac J, Marinković R. (2006): Potencijali poljoprivrede Srbije za proizvodnju sirovina za biodizel. *Traktori i pogonske mašine*, 11(1): 33-37.
- Cvjetković B, Kišpatić J, Milatović I (1983): Morfološke i kulturalne karakteristike patogena uljane repice novog za Jugoslaviju. *Zaštita bilja* 34(4): 66.
- Davies J M L (1986): Diseases of oilseed rape. In Scarisbrick DH Daniels RW eds *Oilseed Rape*. London: Collins 195-236.
- Day J P, Shattock R C (1997): Aggressiveness and other factors relating to displacement of populations of *Phytophthora infestans* in England and Wales. *European Journal of Plant Pathology* 103 379-391.



- 
- Elliott C E, Gardiner D M, Thomas G, Cozijnsen A, Van de Wouw A, Howlett B J (2007): Production of the toxin sirodesmin PL by *Leptosphaeria maculans* during infection of *Brassica napus*. *Mol Plant Pathol* 8: 791–802.
- Fitt L D B, Brun H, Barbetti J M, Rimmer R S (2006): World-wide importance of phoma stem canker (*Leptosphaeria maculans* and *L. biglobosa*) on oilseed rape (*Brassica napus*). *European Journal of Plant Pathology* 114: 3-15.
- Fox E M, Howlett B J (2008): Biosynthetic gene clusters for epipolythiodioxopiperazines in filamentous fungi. *Mycol. Res.* 112:162-169.
- Gabrielson R L (1983): Blackleg disease of crucifers caused by *Leptosphaeria maculans* (*Phoma lingam*) and its control. *Seed Science and Technology*. 11: 749-780.
- Gall C, Balesdent M H, Desthieux I, Robin P, Rouxell T (1995): Polymorphism of Tox<sup>0</sup> *Leptosphaeria maculans* isolates as revealed by soluble protein and isozyme electrophoresis. *Mycological Research* 99 221-229.
- Gardiner D M, Cozijnsen J A, Wilson M L, Pedras M S C, Howlet B J (2004): The sirodesmin biosynthetic gene cluster of the plant pathogenic fungus *Leptosphaeria maculans*. *Mol. Microbiol.* 53 (5): 1307-1318.
- Gardiner D M, Waring P, Howlet B J (2005): The epipolythiodioxopiperazine (ETP) class of fungal toxins: distribution mode of action functions and biosynthesis. *Microbiology* 151: 1021-1032.
- Gladders P, Evans N, Marcroft S, Pinochet X (2006): Dissemination of information about management strategies and changes in farming practices for the exploitation of resistance to *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker) in oilseed rape cultivars. *European Journal of Plant Pathology* 114, 117-126.
- Gladders P, Musa T M (1980): Observations on the epidemiology of *L. maculans* stem canker in winter oilseed rape. *Plant Pathology* 29: 28-37.
- Gladders P, Musa T M (1979): The development of *Leptosphaeria maculans* in winter oilseed rape and its implications for disease control. *Pests and Diseases*: 129-136.
- Gosende S, Penaud A, Aubertat J N, Schnieder O, Pinochet X (2003): Evolution of soil surface oilseed rape stubbles and their ability to produce spores of *Leptosphaeria*

- maculans*: preliminary results 11<sup>th</sup> International Rapeseed Congress Proceeding 41166-1168 Denmark.
- Gugel R K, Petrie G A (1992): History occurrence impact and control of blackleg of rapeseed. *Canadian Journal of Plant Pathology* 14: 36–45.
- Hall R (1992): Epidemiology of blackleg of oilseed rape. *Canadian Journal of Plant Pathology* 14: 46–55.
- Hall R, Chigogora J L, Phillips L G (1996): Role of seedborne inoculum of *Leptosphaeria maculans* in development of blackleg on oilseed rape. *Canadian Journal of Plant Pathology* 18: 35–42.
- Hammond K E, Lewis B C, Musa T M (1985): A systemic pathway for the infection of oilseed rape plants by *Leptosphaeria maculans*. *Plant Pathology* 34:37-565.
- Hammond K E, Lewis B G (1987a): The establishment of systemic infection in leaves of oilseed rape by *Leptosphaeria maculans*. *Plant Pathology* 36: 135-147.
- Hammond K E, Lewis B G (1987b): Variation in stem infections caused by aggressive and non-aggressive isolates of *Leptosphaeria maculans* on *Brassica napus* var. *oleifera*. *Plant Pathology* 36:53-65.
- Hill C B, Xu X H, Williams P H (1984): Correlations of virulence growth rate pigment production and allozyme banding patterns which differentiate virulent and avirulent isolates of *Leptosphaeria maculans*. *Eucarpia. Cruciferae News* 9: 79 .
- Hogenhout S A, Van der Hoorn R A, Terauchi R, Ramoun S (2009): Emerging concepts in effector biology of plant – associated organisms. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 22: 115-122.
- Hong S K, Kim W G, Shin D B, Choi H W, Lee Y K, Lee S Y (2009): Occurrence of stem canker on rape caused by *Leptosphaeria biglobosa* in Korea. *Plant Pathol. J.* 25(3): 294-298.
- Howlett B J (2004): Current knowledge of the interaction between *Brassica napus* and *Leptosphaeria maculans*. *Can. J. Plant Pathol.* 26: 245 – 252.
- Howlett B J (2006): Secondary metabolite toxins and nutrition of plant pathogenic fungi *Curr. Opin. Plant Biol.* 9: 371-375.
- Howlett B J, Idnurm A, Pedras M S C (2001): *Leptosphaeria maculans* the causal agent of blackleg disease of Brassicas. *Fungal Genet. Biol.* 33: 1-14.

- 
- Huang Y J, Fitt B D L, Hall A M (2003a): Survival of A-group and B-group *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker) ascospores and micelium on oilseed rape stem debris. *Ann. of Appl. Biology* 143: 369-399.
- Huang Y J, Fitt B D L, Jedruczka M, Dakowska S, West J S, Gladders P, Steed J M, Li Z Q (2005): Patterns of ascocpora release in relation to phoma stem canker epidemiology in England (*Leptosphaeria maculans*) and Poland (*L. biglobosa*). *European Journal of Plant Pathology* 111: 263-277.
- Huang Y J, Toscano-Underwood C, Fitt B D L, Todd A D, West J S, Koopmann B, Balesdent M H (2001): Effects of temperature on germination and hyphal growth from ascospores of A-group and B-group *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker of oilseed rape). *Ann. Appl. Biol.* 139: 193-207.
- Humperson-Jones F M (1983): Pathogenicity studies on isolates of *Leptosphaeria maculans* from brassica seed production crops in south-east England. *Annals of Applied Biology* 103: 37-44.
- Humperson-Jones F M (1986): The occurrence of virulent pathotypes of *Leptosphaeria maculans* in brassica seed crops in England. *Plant Pathology* 35: 224-231.
- Jacobsen B J, Williams P H (1971): Histology and control of *Brassica oleracea* seed infection by *Phoma lingam*. *Plant Disease Reporter* 55: 934-8.
- Jedruczka M, Dakowska S, West J S, Fitt B D L (1999b): The influence of wetness and temperature on the release of ascospores of *Leptosphaeria maculans* (blackleg) from oilseed rape debris. Poznan Poland: *Materialy z Sympozjum Naukowego Polskiego Towarzystwa Fitopatologicznego 'Bioroznorodnosc w fitopatologii europejskiej na przelomie wiekow'*. 75.
- Jedruczka M, Lewartowska E, Frenzel I (1994): Properties of *Phoma lingam* (Tode ex fr.) Desm. Isolates from Poland: Pathogenicity characterisation. *Phytopathologia Polonica*. 7: 71-79.
- Jedruczka M, Nikonorenkov V A, Levitin M, Gasich E, Lewartowska E, Portenko L (2002): Spectrum and severity of fungal diseases on spring oilseed rape in Russia. *International Organisation for Biological control Bulletin* 25: 13-20.

- 
- Jedryczka M, Rouxel T, Balesdent M H (1999): Rep-PCR based genomic fingerprinting of isolates of *Leptosphaeria maculans* from Poland. *European Journal of Plant Pathology*. 105: 813-823.
- Johnson R D, Lewis B G (1990): DNK polymorphism in *Leptosphaeria maculans*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 37: 417-424.
- Karolewski Z, Kosiada T Hylak-Nowosad B, Nowacka K (2002): Changes in population structure of *Leptosphaeria maculans* in Poland. *Phytopathologia Polonica*. 25: 27-34.
- Kharbanda P D, Stevens R R (1993): Seed testing for blackleg of Canola. Vegreville AB Canada: AECV93-E1.
- Koch E, Badaway A M H, Hope H H (1989): Differences between aggressive and non aggressive single spore lines of *Leptosphaeria maculans* in cultural characteristics and phytotoxin production. *J. Phytopathol.* 124: 52-62.
- Koch E, Song R, Osborn C T, Williams P H (1991): Relationship between pathogenicity and phylogeny based on restriction fragment length polymorphism in *Leptosphaeria maculans*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 4: 341-349.
- Krüger W (1978): Über den Befall des Rapses durch *Phoma lingam* in der Bundesrepublik Deutschland. *Proc of the 5th Inter. Rapeseed Conf. Malmö Sweden*. 1: 338-341.
- Krüger W (1979): Verbreitung der Wurzelhals- und Stengelfäule (verursacht durch *Phoma lingam*) bei Raps in der Bundesrepublik Deutschland. *Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd.* 31: 145-148.
- Kutcher H R, Vandenberg C G J, Rimmer S R (1993): Variation in pathogenicity of *Leptosphaeria maculans* and *Brassica* spp. Based on cotyledon and stem reactions. *Can. J. Plant Pathol.* 15: 253-258.
- Kuusk A K, Hapstadius I, Zhou L, Steventon L A, Giese H, Dixelius C (2002): Presence of *Leptosphaeria maculans* Group A and Group B Isolates in Sweden. *J. Phytopathology* 150: 349-356.
- Macroft S J, Potter T D, Wratten N, Barbetti M J, Khangura R, Salisbury P A, Burton W A (1999): Alternative sources of resistance to Australian blackleg. *Proceedings of the 10<sup>th</sup> International Rapeseed Congress Canberra Australia*.

- Magyar D, Barasits T, Fischl G, Fernando W G D (2006): First report of the natural occurrence of the teleomorph of *Leptosphaeria maculans* on oilseed rape and airborne dispersal of ascospores in Hungary. *J. Phytopathology* 154: 428-431.
- Mahuku G S, Goodwin P H, Hall R, Hsiang T (1997): Variability in the highly virulent type of *Leptosphaeria maculans* within and between oilseed rape fields. *Canadian Journal of Botany* 75 1485-1492.
- Marinković R, Marjanović-Jeromela A, Crnobarac J, Lazarević J (2003): Path-coefficient analysis of yield components of rapeseed (*Brassica napus* L) u: Inter. Rapeseed Congres (11th) 6-10 July 2003. Copenhagen Denmark vol. III 988-991.
- Marinković R, Marjanović-Jeromela A, Mitrović P (2007): Privredni značaj osobine i tehnologija proizvodnje uljane repice. *Biljni lekar* vol. 35 br. 4 str. 377-393.
- Marjanović-Jeromela A, Marinković R, Vasić D, Škorić D (2002): Sadržaj ulja i proteina u semenu uljane repice (*Brassica napus* L) u: Savetovanje Proizvodnja i prerada uljarica (43) Budva str. 117-121.
- Marjanović-Jeromela Ana, Marinković R, Vasić D, Škorić D. 2002. Sadržaj ulja u semenu uljane repice (*Brassica napus* L.). *Zbornik radova sa 43. Savetovanja industrije ulja – Budva*: 117-122.
- McGee D C (1974): The seasonal pattern of ascospore discharge of *Leptosphaeria maculans*. *Australian Plant Pathology Society Newsletter* 3: 27.
- McGee D C (1977): Blackleg (*Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. et de Not.) of rapeseed in Victoria: sources of infection and relationships between inoculum environmental factors and disease severity. *Australian Journal of Agriculture Research* 28:53-62.
- McGee D C, Petrie G A (1978): Variability of *Leptosphaeria maculans* in relation to blackleg of oilseed rape. *Phytopathology* 68: 625 – 630.
- Mendes-Pereira E, Balesdent M H, Brun H, Rouxel T (2003): Molecular phylogeny of the *Leptosphaeria maculans* - *Leptosphaeria biglobosa* species complex. *Mycol. Res.* 107 (11): 1287-1304

- 
- Mengistu A, Hill C B, Williams P H (1995): A toothpick method for mating *Leptosphaeria maculans* the casual agent of blackleg of crucifers. *Plant Disease* 79 (7): 755-756.
- Mengistu A, Rimmer S R, Williams P H (1991): Pathogenicity grouping of isolates of *Leptosphaeria maculans* on *Brassica napus* cultivars and their disease relation profiles on rapid-cycling brassicas. *Plant Disease* 75: 1279-1282.
- Mengistu A, Rimmer S R, Williams P H (1993): Protocols for in vitro sporulation Ascospore release sexual mating and fertility in crosses of *Leptosphaeria maculans*. *Plant Disease* 77: 538-540.
- Mitrović P (1997): Paraziti kupusa. Magistarska teza Poljoprivredni fakultet Novi Sad.
- Mitrović P M, Orčić D Z, Sakač Z O, Marjanović-Jeromela A M, Grahovac N L, Milošević D M, Marisavljević D P (2012): Characterization of sirodesmins isolated from the phytopathogenic fungus *Leptosphaeria maculans*. *J.Serb.Chem.Soc.* 77(10)1363-1379.
- Mitrović P, Marinković R (2007): *Phoma lingam* – a rapeseed parasite in Serbia. Proc. of the 12th Intern. Rapeseed Congres Wuhan China. March 26-30 2007/ IV: 217-219.
- Mitrović P, Milovac Ž, Marinković R (2009): Aktuelni problemi u zaštiti ozime uljane repice (*Brassica napus* var. L.). *Zaštita bilja* 268: 127–144.
- Mitrović P, Trkulja V (2010): *Leptosphaeria maculans* i *Leptosphaeria biglobosa* – uzročnici raka stabla i suhe truleži korijena uljane repice. *Glasnik zaštite bilja* 4: 34–45.
- Mullbacher A, Waring P, Tiwari-Palni U, Eichner D R (1986): Structural relationship of epipolythiodioxopiperayines and their immunomodulating activity. *Mol. Immunol* 23: 231-236.
- Mustapić Z, Vratarić M, Rajčić L (1984): Proizvodnja i prerada uljane repice. NIRO Zadrugar Sarajevo.
- Naseri B, Davidson J A, Scott E S (2008): Survival of *Leptosphaeria maculans* and associated mycobiota on oilseed rape stubble buried in soil. *Plant Pathology* 57: 280-289.

- 
- Naseri B, Davidson J A, Scott E S (2009): Maturation of pseudothecia and discharge of ascospores of *Leptosphaeria maculans* on oilseed rape stubble. *Eur. J. Plant Pathol* 125: 525-531.
- O'Gorman D, Hue B, Hsiang T, Goodwin P H (1994): Defection of *Leptosphaeria korrae* with PCR and primers for ribosomal internal transcribed spacers *canadian Journal of Botany* 72: 342-346.
- Panjanin M (1965): Suva trulež kupusa (*Phoma lingam*). *Biljna zaštita* 617: 133-135.
- Paul V, Rowlinson C J (1992): Diseases and pests of rape. Verlag Theodore Mann Gelsenkirchen- Buer Germany.
- Pedras M S C, Biesenthal C J (2001): Secondary Metabolites from the Phytopathogenic Fungus *Phoma lingam*: Detection Isolation Structure Determination and Phytotoxicity of Unusual Dioxopiperazines. *Phytochemistry* 58: 905-909.
- Pedras M S C, Chumala P B, Yu Y (2007): The phytopathogenic fungi *Leptosphaeria maculans* and *L. biglobosa*: chemotaxonomical characterization of isolates and metabolite production in different culture media. *Canadian Journal of Microbiology* 53: 364-371.
- Pedras M S C, Sguin-Swartz G (1992): The "Blackleg" Fungus: Phytotoxins and Phytoalexins. *Canadian Journal of Phytopathology* 14: 67-75.
- Pedras M S C, Yu Y (2008): Stress-driven discovery of metabolites from the fungal plant pathogen *Leptosphaeria maculans*: structure and activity of leptomaculins. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 16: 8063-8071.
- Pedras M S C, Yu Y (2008): Structure and biological activity of maculansin A a phytotoxin from the phytopathogenic fungus *Leptosphaeria maculans*. *Phytochemistry* 69: 2966-2971.
- Pedras M S, Taylor L J, Morales M V (1996): The blackleg fungus of rapeseed: how many species. *Acta Hort.* 407: 441-446.
- Penaud A, Jain L, Poisson B, Balesdent M-H, PeÂreÂs A (1999a): Structure of populations of *Leptosphaeria maculans* in France. *Proceedings of the 10th International Rapeseed Congress 1999. Canberra Australia*  
<http://www.regional.org.au/papers/index.htm>.

- 
- Pérés A, Poisson B (1997): Phoma du colza: avances en epidemiologie. *CETIOM – Olkoscope* 40: 37-40.
- Pérés A, Poisson B, Le Sourné, Maisonneuve C (1999): *Leptosphaeria maculans*: effect of temperature rainfall and humidity on the formation of pseudothecia. Proceedings of the 10th International Rapeseed Congress Canberra Australia
- Petrie G A (1978): Occurrence of a highly virulent strain of blackleg (*Leptosphaeria maculans*). *Canadian Plant Disease Survey* 58: 21–25.
- Petrie G A (1979): Blackleg of rape. *Canadian Agriculture* 24: 22-25.
- Petrie G A (1979b): Prevalence of a highly virulent strain of *Leptosphaeria maculans* (blackleg) in seed samples of rape and turnip rape produced in western Canada in 1976 and 1977. *Canadian Journal Plant Science*, 59: 899-901.
- Petrie G A (1986): Consequences of survival of *Leptosphaeria maculans* (blackleg) in canola stubble residue through an entire crop rotation sequence. *Canadian Journal of Plant Pathology* 8: 353 (Abstract).
- Petrie G A (1988): The rapid differentiation of virulent and weakly virulent strains of *Leptosphaeria maculans* (blackleg or stem canker) and related pycnidial fungi from *Brassica* seeds and stems. *Can. J. Plant Pathol.* 10: 188-190.
- Petrie G A, Lewis P A (1985): Sexual compatibility of the rapeseed blackleg fungus *Leptosphaeria maculans* from Canada Australia and England. *Canadian Journal of Plant Pathology* 7: 253-255.
- Petrie G A, Vanterpool T C (1974): Infestation of crucifer seed in Western Canada by the blackleg fungus *Leptosphaeria maculans*. *Canadian Plant Disease Survey* 54: 119-123.
- Poisson B, Pérés A (1999): Study of rapeseed susceptibility to primary contamination of *Leptosphaeria maculans* in relation to plant vegetative stage. Proceedings of the 10th International Rapeseed Congress 1999. *Canberra Australia*.  
<http://www.regional.org.au/papers/index.htm>.
- Pound S G (1947): Variability in *Phoma lingam*. *Journal of agricultural research*. vol. 75(4): 113-133.
- Punithalingam E, Holliday E (1972): *Leptosphaeria maculans* CMI Descriptions of pathogenic fungi and Bacteria. No. 331.



- 
- Purwantara A, Barins M J, Cozijnsen J A, Ades K P, Howlett J B (2000): Genetic diversity.
- Rouxel T, Chupeau Y, Fritz R, Kollmann A, Bousquet F J (1988): Biological effects of sirodesmin PLa phytotoxin produced by *Leptosphaeria maculans* Plant Sci. 57: 45-53.
- Salisbury P A, Ballinger D J, Wratten N, Plummer K M, Howlett B (1995): Blackleg disease on oilseed *Brassica* species in Australia: a review. Australian Journal of Experimental Agriculture 35: 665-72.
- Schramm H, Hoffmann G H (1991): Biologische Grundlagen zur integrierten Bekämpfung von *Phoma lingam* (teleomorph *Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces & deNot.) dem Erreger der Wurzelhals- und Stengelhals an Winterraps. Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz 98: 581-596.
- Seidel D, Deabeler F, Amelung K, Engel H, Lücke W (1984): Auftreten, Schädigung und Bekämpfung von *Phoma lingam* an Winterraps. Nachrichtenbl. Pflanzenschutz DDR 38: 120-123. Cited from Rev. Plant Pathol. 64: 133 (1985).
- Shoemaker R A, Brun H (2001): The teleomorph of the weakly aggressive segregate of *Leptosphaeria maculans*. Canadian Journal of Botany 79: 412-419.
- Smith H C (1956): *Leptosphaeria nepi* the pericetial form of *Phoma lingam* causing dry-rot disease of *Brassicaceae*. New Zealand Science Review. 14: 116-117.
- Somda I, Harkous S, Brun H (1997): Bipolar heterothelism in group isolates of *Leptosphaeria maculans*. Plant Pathology 60: 890-896.
- Sosnowski M R, Scott E S, Ramsey M D (2004): Infection of Australian canola cultivars (*Brassica napus*) by *Leptosphaeria maculans* is influenced by cultivar and environmental conditions. Australas. Plant Pathol. 33: 401-411.
- Sosnowski M R, Scott E S, Ramsey M D (2006): Survival of *Leptosphaeria maculans* in soil on residues of *Brassica napus* in South Australia. Plant Pathology 55: 200-206.
- Sylvester-Bradley R, Makepeace R J (1985): Revision of a code for stages of development in oilseed rape (*Brassica napus* L.). Aspects of Applied Biology 10: 395-400.

- 
- Szlàvik S Z, Jedryczka M, Kiss I, Lewartowska E, Nagy G (2003): Population structure and pathogenicity grouping of *L. maculans* isolates from Hungary. *Blackleg News* 3-4.
- Taylor J L, Borgman I E (1994): An unusual repetitive element from highly virulent isolates of *Leptosphaeria maculans* and evidence at its transfer to a weakly virulent isolate. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 7: 181-188.
- Thürwächter F, Garbe V, Hoppe H H (1999): Ascospore discharge leaf infestation and variations in pathogenicity as criteria to predict impact of *Leptosphaeria maculans* on oilseed rape. *Journal of Phytopathology* 147: 215-222.
- Toscano-Underwood C, Huang Z J, Fitt L D B, Hall M A (2003): Effects of temperature on maturation of pseudothecia of *Leptosphaeria maculans* and *L. biglobosa* on oilseed rape stem debris. *Plant Pathology* 52: 726-736.
- Toscano-Underwood C, West J S, Fitt B D L, Todd A D, Jedryczka M (2001): Development of phoma lesions on oilseed rape leaves inoculated with ascospores of A-group or B-group *Leptosphaeria maculans* (stem canker) at different temperatures and wetness durations. *Plant Pathology* 50: 28-41.
- West S J, Biddulph J E, Fitt B D L, Gladders P (1999): Epidemiology of *Leptosphaeria maculans* in relation to forecasting stem canker severity on winter oilseed rape in the UK. *Ann. Appl. Biol.* 135: 535-546.
- West S J, Kharbanda D P, Barbeti J M, Fitt L D B (2001): Epidemiology and management of *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker) on oilseed rape in Australia Canada and Europe. *Plant Pathology* 50: 10-27.
- Williams H R, Fitt L D B (1999): Differentiating A and B groups of *Leptosphaeria maculans* casual agent of stem canker (blackleg) of oilseed rape. *Plant Pathology* 48: 161-175
- Williams P H (1992): Biology of *Leptosphaeria maculans*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 14: 30-35.
- Wolpert J T, Dunkle D L, Ciuffetti M L (2002): Host-selective toxins and avirulence determinants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 40: 251-285.

- Wood P McR, Barbetti M J (1977a): The role of seed infection in the spread of blackleg of rape in Western Australia. *Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry* 17: 1040-1044.
- Wu Z J, Li G Y, Fang D M, Qi H Y, Ren W J, Zhang G L (2008): Analysis of epipolythiodioxopiperazines in fungus *Chaetomium cochliodes* using HPLC-ESI-MS/MS/MS. *Anal. Chem.* 80: 217-226.
- Yu F, D J, Ludiate, Rimmer S R (2005): Identifivation at two novel genes for blackleg resistance in *Brassica napus*. *Theor. Appl. Genet.* 110: 969-979.

## BIOGRAFIJA

Petar Mitrović je rođen 28. 07. 1963. godine u Bijeljini. Osnovnu školu je završio u Crnjelovu, a srednju poljoprivrednu u Bijeljini. Poljoprivredni fakultet u Novom Sadu, smer zaštita bilja upisao je školske 1984/85. godine. Studije je okončao sa prosekom ocena 7,51, a diplomski rad “Kila kupusa pr. *Plasmodiophora brassicae* Wor. u Semberiji i mogućnost suzbijanja bolesti fungicidima” odbranio je 28.12.1990. godine sa ocenom 10. Školske 1992/1993 kandidat je upisao poslediplomske studije na grupi: Fitopatologija i nastavnim planom i programom položio sve ispite sa prosečnom ocenom 8,00. Magistarski rad pod naslovom “ Paraziti kupusa” odbranio je 1997. godine.

Kao volonter je radio u Departmanu za zaštitu bilja Poljoprivrednog fakulteta i Nacionalnoj laboratoriji za ispitivanje i kontrolu semena. Na DP „Planta” Futog, radio je kao referent za zaštitu bilja šest meseci gde se upoznao sa problemima u ratarsko-povrtarskoj proizvodnji. Od 04.05.2005. je zaposlen na određeno vreme u Naučnom institutu za ratarstvo i povrtarstvo. U zvanje istraživač saradnik izabran je 2006. U isto zvanje je reizabran 2010. god. Kao autor ili koautor objavio je 51 naučni rad.

Služi se engleskim jezikom. Oženjen je.

**Prilog 1.**

**Izjava o autorstvu**

Potpisani: **Petar M. Mitrović**

Broj prijave doktorske disertacije: 356/7-5.1.

**Izjavljujem**

da je doktorska disertacija pod naslovom:

**MORFOLOŠKA I MOLEKULARNA KARAKTERIZACIJA  
I IDENTIFIKACIJA GLJIVE UZROČNIKA RAKA STABLA  
ULJANE REPICE U SRBIJI**

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada
- da predložena doktorska disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

U Beogradu, 7. maj, 2013. godine

**Potpis doktoranda**

  
Mr Petar M. Mitrović

**Prilog 2.**

**Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije  
doktorske disertacije**

Ime i prezime autora: **Petar M. Mitrović**

Broj prijave doktorske disertacije: 356/7-5.1.

Studijski program -

Naslov doktorske disertacije: **Morfološka i molekularna karakterizacija i identifikacija gljive uzročnika raka stabla uljane repice u Srbiji**

Mentor: Dr Mirko Ivanović, redovni profesor

Potpisani: **Petar M. Mitrović**

Izjavljujem da je štampana verzija moje doktorske disertacije istovetna elektronskoj verziji koju sam predao za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

U Beogradu, 7. maj, 2013. godine

**Potpis doktoranda**

  
Mr Petar M. Mitrović

**Prilog 3.**

**Izjava o korišćenju**

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

**MORFOLOŠKA I MOLEKULARNA KARAKTERIZACIJA  
I IDENTIFIKACIJA GLJIVE UZROČNIKA RAKA STABLA  
ULJANE REPICE U SRBIJI**

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilogima predao sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence

Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovim

U Beogradu, 7. maj, 2013. godine

**Potpis doktoranda**

  
Mr Petar M. Mitrović