

Zaštita bilja
Vol. 65 (4), N°290, 146-154, 2014, Beograd
Plant Protection
Vol. 65 (4), N°290, 146-154, 2014, Belgrade

UDK: 635.14-248.231(497.11)"2005/2014"
632.934:546.56
Naučni rad
Scientific paper

PEGAVOST I SUŠENJE LISTA – ZNAČAJNA BOLEST PERŠUNA U SRBIJI

IVANA STANKOVIĆ, KATARINA MILOJEVIĆ, ANA VUČUROVIĆ,
DUŠAN NIKOLIĆ, BRANKA KRSTIĆ, ALEKSANDRA BULAJIĆ

Univerzitet u Beogradu-Poljoprivredni fakultet, Beograd
e-mail: aleksandrabulajic@yahoo.com

REZIME

U periodu od 2005. do 2014. godine, sakupljeno je 19 izolata *Alternaria petroselini* poreklom iz lista, korena i semena peršuna, kao i infestiranog zemljišta i analizirano na osnovu morfoloških, patogenih i molekularnih osobina. Svi izolati formirali su tamnosive kolonije na PDA i supstratno obrazovali mikrosklerocije, kao i obojene, elipsoidno okruglaste, feodiktiosporne konidije pojedinačno na kratkim konidioforama. Ispitujući patogenost i krug domaćina inokulacijom suspenzijom spora, svi ispitivani izolati ispoljili su patogenost za peršun, paštrnak, celer i korijander, slabu patogenost za mrkvu, morač i anis, a nisu bili infektivni za crni luk, kupus, papriku, paradajz i krastavac. Molekularna detekcija korišćenjem prajmera specifičnih za detekciju *A. radicina* nije uspela da napravi razliku između izolata dve srodne, ali različite vrste, *A. radicina* i *A. petroselini*. Dalja karakterizacija izolata *A. petroselini* poreklom iz Srbije, obavljena je sekvenciranjem različitih genskih segmenata uključujući ITS rDNK, kao i Alt a1 i EF1a gene. BLAST analiza pokazala je da su sekvence Alt a1 i EF1a gena najpouzdanije za razlikovanje *A. petroselini* od drugih blisko srodnih vrsta (25-27 odnosno 10-12 nukleotida razlike od izolata *A. radicina*). Sekvence ITS rDNK regiona bile su korisne, ali ne i potpuno informativne za identifikaciju izolata *A. petroselini*.

Ključne reči: *Alternaria petroselini*, morfološka identifikacija, sekvenciranje, ITS rDNK, Alt a1, EF1a

UVOD

Peršun (*Petroselinum crispum* (Mill.) Nym.) je dvogodišnja biljka iz familije Apiaceae koja se uglavnom gaji kao jednogodišnja zbog zadebljalog korena ili lišća i najčešće koristi kao začim, sveža ili osušena. Osim toga, osušeni koren, esencijalna ulja i ekstrakt peršuna imaju široku primenu u narodnoj medicini kao sredstvo protiv nadimanja, diuretik i za izlučivanje štetnih materija iz organizma.

Brojni patogeni kao što su *Septoria petroselini*, *Rhizoctonia solani*, *Erysiphe heraclei*, *Cercospora* spp., *Puccinia* spp. i drugi mogu da ugroze proizvodnju peršuna (Minchinton et al., 2006). Ipak, različite vrste iz roda *Alternaria*, među kojima su *A. petroselini* (Neergaard) E.G.Simmons, *A. smyrnii* (Crouan) E.G.Simmons i *A. selini* E.G.Sim-

mons, smatraju se najznačajnijim u proizvodnji peršuna u mnogim regionima gajenja. *A. petroselini* prouzrokuje pegavost i sušenja lista peršuna je najrasprostranjenija, i često ekonomski najznačajnija (Minchinton et al., 2006). Početni simptomi oboljenja uočavaju se u vidu sitnih, tamnih, nekrotičnih pega na listovima i lisnoj peteljci i to prvo na starijim, a kasnije na skoro svim listovima. Usled razvoja bolesti pege se šire i međusobno spajaju i mogu zahvatiti veći deo lista koji žuti i propada. U slučaju visokog intenziteta oboljenja može doći i do potpune defolijacije. Iako su mlade tek iznikle biljke i starije lišće osetljiviji, do infekcije može doći u svim fazama razvoja peršuna. Razvoju bolesti pogoduje toplo i kišovito vreme, dok se spore najefikasnije prenose vetrom.

A. petroselini održava se i širi zaraženim se-

menom (Pryor, 2002; Bulajić et al., 2009). Pored toga, može zadržati vitalnost duži vremenski period i u biljnim ostacima u zemljištu. *A. petroselini* ima uzak krug domaćina koji pored peršuna uključuje samo još nekoliko vrsta iz familije Apiaceae, kao što su paštrnak, celer i morač (Pryor, 2002). Njeno prisustvo zabeleženo je na peršunu u Australiji (Cunnington et al., 2006), Japanu (Nishikawa and Nakashima, 2013), Velikoj Britaniji (Jones and Baker, 2007) i Srbiji (Bulajić i sar., 2005), na moraču u Holandiji (Pryor and Asma, 2007), Italiji (Infantino et al., 2009) i Španiji (Bassimba et al., 2012) i na *Carya cathayensis* u Kini (Liu et al., 2013).

A. petroselini pripada *radicina* grupi roda *Alternaria* zajedno sa još nekoliko srodnih vrsta uključujući tipične predstavnike grupe *A. radicina* i *A. carotiincultae* patogene uglavnom za mrkvu. Velika sličnost i preklapanje morfoloških i patogenih karakteristika izolata različitih vrsta otežavaju pravilnu identifikaciju (Pryor and Gilbertson, 2002; Farrar et al., 2004). Za razlikovanje ovih vrsta upotrebljavaju se brojne molekularne osobine uključujući stepen sličnosti sekvenci određenih genskih segmenata (Pryor and Gilbertson, 2002; Park et al., 2008).

Nakon prve detekcije u Srbiji (Bulajić i sar., 2005) *A. petroselini* postala je jedan od najvažnijih patogena peršuna u našoj zemlji. Osnovni cilj ovih istraživanja bio je da se: (i) ispituju glavne morfološke karakteristike i njihova pogodnost da posluže kao taksonomski kriterijumi, (ii) utvrdi eksperimentalni krug domaćina izolata poreklom iz Srbije, (iii) ispita mogućnost molekularne detekcije specifične za vrstu i (iv) izvrši molekularna identifikacija izolata sekvenciranjem većeg broja genskih regiona uključujući ITS rDNK, Alt a1 i EF1a gene.

MATERIJAL I METODE

Izolacija patogena i dobijanje izolata

U periodu od 2005. do 2014. godine, prikupljeno je 76 uzoraka lista, korena i semena peršuna i infestiranog zemljišta i dobijeno je ukupno 19 izolata *A. petroselini*. Izolacija patogena obavljena je na podlogu od krompir-dekstroznog agara (potato dextrose agar, PDA) primenom standardnog fitopatološkog postupka nakon čega su izolati održavani na ravnoj ili kosoj PDA podlozi na temperaturi od 22°C odnosno 8°C.

Morfološke karakteristike

Preliminarna identifikacija svih dobijenih

izolata obavljena je na osnovu proučavanja morfoloških makroskopskih i mikroskopskih osobina monosporijalnih kultura starih 10 dana, odgajenih na PDA i podlozi od lista mrkve (carrot leaf agar, CLA) na temperaturi od 24°C. Proučavanje makroskopskih osobina obuhvatilo je praćenje brzine porasta, izgleda i boje kolonije, lučenja pigmenata, obrazovanja kristala i mikrosklerocija i drugih tvorevina. Od mikroskopskih osobina proučavane su oblik, boja i dimenzije konidija, izgled konidiofora i prostorni raspored formiranih konidija, prisustvo i dužina kljuna, kao i katenulacija, odnosno prostorni način sporulacije (Pryor and Gilbertson, 2002; Park et al., 2008). Prosekom obračunatim za najmanje 100 ponovljenih merenja, određivane su dimenzije svih tvorevina.

Provera patogenosti i određivanje kruga domaćina

Test provere patogenosti i određivanje kruga domaćina svih izolata uključenih u istraživanja obavljen je inokulacijom po pet biljaka peršuna (*Petroselinum crispum*), mrkve (*Daucus carota*), paštrnka (*Pastinaca sativa*), celera (*Apium graveolens*), morača (*Foeniculum vulgare*), anisa (*Pimpinella anisum*), korijandera (*Coriandrum sativum*), crnog luka (*Allium cepa*), kupusa (*Brassica oleracea*), paprike (*Capsicum annum*), paradajza (*Solanum lycopersicum*) i krastavca (*Cucumis sativus*). Sve biljke inokulisane su u fazi 2-4 prava lista prskanjem suspenzijom konidija pripremljenom od kultura starih 10 dana, odgajenih na PDA u mraku na temperaturi od 24°C. U razvijene kolonije nalivana je potrebna količina sterilne destilovane vode i konidije su odvajane od podloge staklenim štapićem, a koncentracija dobijene suspenzije podešena je hemocitometrom na 2×10^3 konidija/ml. Kao negativna kontrola korišćeni su sejanci istih biljaka, prskani sterilnom vodom. U cilju obezbeđivanja uslova povišene vlažnosti, biljke su po inokulaciji pokrivane plastičnim kesama koje su nakon dva dana uklonjene. Pojava simptoma praćena je svakodnevno do 14 dana posle inokulacije.

Molekularna detekcija

U cilju molekularne detekcije 19 izolata *A. petroselini* poreklom iz Srbije, kao i potvrde rezultata dobijenih konvencionalnim mikološkim metodama primenjena je metoda lančane reakcije polimeraze (polymerase chain reaction, PCR). Estrakcija ukupnih DNK obavljena je iz micelije čistih kultura patogena starih sedam dana odgajenih u tečnoj krompir-dekstroznoj čorbi (potato dextrose

broth, PDB) na temperaturi od 24°C, korišćenjem DNeasy Plant Mini Kit-a (Qiagen, Hilden, Germany), a prema uputstvu proizvođača. Molekularna detekcija obavljena je korišćenjem specifičnih prajmera za detekciju *A. radicina*, ARF2/ARR3 (Konstantinova et al., 2002) i Pa2071/Pa2072 (Pryor and Gilbertson, 2001).

Sve PCR reakcije obavljene su u radnoj zapremi od 25 µl, korišćenjem 12,5 µl 2X PCR Master miksa koji sadrži 2 mM MgCl₂ (Fermentas Life Sciences GmbH, Lithuania), 6,5 µl RNase-free vode, po 2,5 µl svakog prajmera (finalne koncentracije 0,6 µM) i 1 µl ekstrahovane ukupne DNK uzorka. Kao pozitivna kontrola korišćen je referentni izolat *A. petroselini* BMP139 (izolat iz kolekcije profesora B. M. Pryor, Univerzitet u Arizoni, Tucson, Arizona, USA), a kao negativna kontrola RNase-free voda koja je dodata u pripremljenu PCR smešu umesto ciljane DNK. Kao referentni izolati za vrste *A. radicina*, *A. dauci* i *A. alternata* korišćena su po dva izolata iz kolekcije Katedre za fitopatologiju, Instituta za fitomedicinu, Univerziteta u Beogradu-Poljoprivrednog Fakulteta, kao i referentni izolat *A. radicina* BMP79 (iz kolekcije profesora B. M. Pryor). Uslovi trostrukog koraka i očekivana veličina amplikona za svaki par korišćenih prajmera nalaze se u Tabeli 1.

Vizuelizacija dobijenih produkata izvršena je elektroforezom u 1% agaroznom gelu, bojenjem u rastvoru etidijum-bromida finalne koncentracije 0,5 µg/ml i posmatranjem pod UV transiluminatorom. Za određivanje veličine umnoženog amplikona korišćen je marker, MassRuler™ DNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences).

Molekularna identifikacija

Dalja molekularna identifikacija dva odabrana izolata Ap69 poreklom sa semena i Ap95 poreklom iz zemljišta i iznalaženje najpogodnijeg regiona genoma za razlikovanje *A. petroselini* i blisko srodnih vrsta obavljena je umnožavanjem i sekvenciranjem ITS regiona rDNK, korišćenjem prajmera ITS5/ITS4 (White et al., 1990), kao i Alt a1 i EF1a gena korišćenjem prajmera Alt-for/Alt-rev odnosno EF1-728F/EF1-986R (Park et al., 2008) prikazanih u Tabeli 1. Sve PCR reakcije obavljene su u 25 µl reakcione smeše na napred opisan način, a uslovi trostrukog koraka i očekivane veličine amplikona dobijene korišćenjem odgovarajućeg para prajmera prikazani su u Tabeli 1.

Umnoženi fragmenti ITS regiona rDNK, Alt a1 i EF1a gena ispitivanih izolata poslani su na uslužno sekvenciranje u oba pravca sa prajmerima korišćenim za amplifikaciju na ABI 3730XL auto-

matskom kapilarnom sekvencatoru u MACROGEN Inc. (<http://dna.macrogen.com>, Korea). Dobijene sekvence obrađene su u programu FinchTV Version 1.4.0. i međusobno upoređene pomoću CLUSTAL W programa (Thompson et al., 1994) integrisanog u MEGA5 softver (Tamura et al., 2011). Tako dobijene konsenzus sekvence podnete su u GenBank bazu podataka, gde su im dodeljeni pristupni brojevi (GenBank Accession Number) i analizirane upotrebom BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) algoritma, kao i proračunom nukleotidne sličnosti dobijenih sekvenci sa sekvencama odgovarajućeg regiona genoma izolata *Alternaria* sp. dostupnih u GenBank bazi podataka.

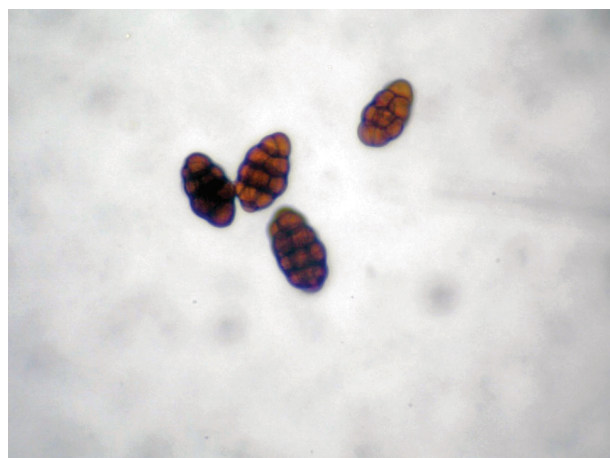
REZULTATI I DISKUSIJA

Simptomi bolesti i konvencionalna identifikacija

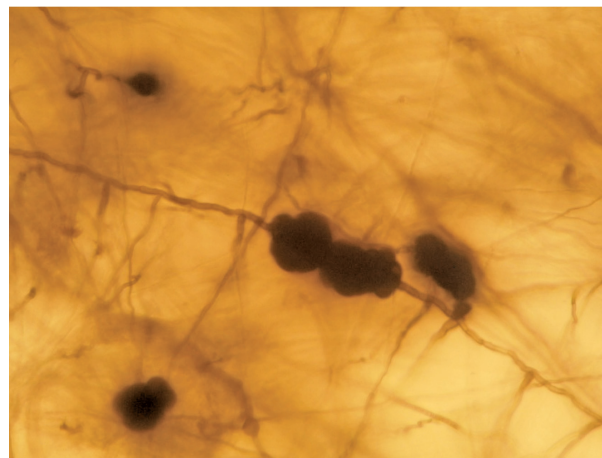
Pregledom useva peršuna u Srbiji u periodu 2005-2014. godina u skoro svim pregledanim usevima primećena je pojava pegavosti i sušenja lišća. U početnim fazama razvoja bolesti primećeni su simptomi u vidu sitnih, brojnih, tamnih pega na lišću. Kasnije, usled širenja i spajanja pega, nekrozom je bila zahvaćena veća površina listova koji su se sušili i propadali. Osim na listu, simptomi izduženih, nekrotičnih pega zabeleženi su i na lisnoj dršci. Iz lišća sa opisanim simptomima, dobijena su dva izolata gljive koje su na osnovu izgleda kolonije i konidija preliminarno identifikovane kao *A. petroselini*. Osim toga, iz komercijalno dostupnog semena peršuna izolovano je još 14 izolata, iz korena i korenovog vrata peršuna sa simptomima nekroze još dva izolata, a iz infestiranog zemljišta metodom mamaka jedan izolat. Od prve detekcije ovog patogena 2005. godine (Bulajić i sar., 2005), izdvojeno je ukupno 19 izolata *A. petroselini* poreklom iz lista, korena i semena peršuna, kao i infestiranog zemljišta, koji su međusobno upoređivani. Mada se peršun ubraja u grupu useva koji se gaje na manjim površinama, u Srbiji se tradicionalno gaji kao značajna začinska i povrtarska biljna vrsta i *A. petroselini* kao prourokovač pegavosti i sušenja lista svake godine nanosi štete u proizvodnji ove kulture (Bulajić i sar., 2005). Pegavost listova dovodi do značajnih ekonomskih gubitaka u proizvodnji peršuna u svetu, jer listovi biljaka koje se koriste kao začinske moraju biti besprekornog izgleda da bi bile iznete na tržište (Agnew, 2001; Raid and Roberts, 2004). Osim toga, usled oslabljene vitalnosti biljaka prisustvo *A. petroselini* obično je praćeno i visokim intezitetom zaraze drugim bolestima lista koje zajedno dovode do potpunog propadanja listova.

Tabela 1. Prajmeri korišćeni za detekciju i identifikaciju izolata *Alternaria petroselini*.
Table 1. Primers used for detection and identification isolates of *Alternaria petroselini*.

Genski region Genomic region	Prajmer Primer	Trostruki korak (temperatura/vreme) Cycling (temp./time)				Veličina amplikona (bp) Amplicon size (bp)	Literaturni izvor Reference
		Denaturacija Denaturation	Hibridizacija Annealing	Elongacija Extension	Broj ciklusa No. of cycles		
ITS <i>A. radicina</i>	ARF2 ARR3	94°C/60 s	57°C/40 s	72°C/60 s	35	~251	Konstantinova et al., 2002
ITS <i>A. radicina</i>	Pa2071 Pa2072	94°C/60 s	60°C/90 s	72°C/120 s	40	~900	Pryor and Gilbertson, 2001
ITS Eucariota	ITS5 ITS4	95°C/30 s	50°C/30 s	72°C/60 s	35	500-600	White et al., 1990
Alt a1	Alt-for Alt-rev	94°C/40 s	57°C/40 s	72°C/60 s	35	512-513	Park et al., 2008
EF1a	EF1-728F EF1-986R	94°C/40 s	55°C/40 s	72°C/60 s	35	279-280	Park et al., 2008



Slika 1. *Alternaria petroselini*: Pojedinačne, tamno smeđe, feodiktiosporne konidije.
Figure 1. *Alternaria petroselini*: Solitary, dark brown, feodictiosporic conidia.



Slika 2. *Alternaria petroselini*: Mikrosklerocije.
Figure 2. *Alternaria petroselini*: Microsclerotia.



Slika 3. *Alternaria petroselini*: Nekrotične pege na veštački zaraženim biljkama peršuna.
Figure 3. *Alternaria petroselini*: Necrotic spots on artificially inoculated parsley plants.

Svi izolati analizirani u ovom radu pokazali su uniformne morfološke osobine koje su po karakteristikama odgovarale opisu za vrstu *A. petroselini* (Pryor and Gilbertson, 2002; Pryor and Asma, 2007; Nishikawa and Nakashima, 2013). Na PDA podlozi, svi ispitivani izolati formirali su tamnosive, skoro crne kolonije sa ravnim ili blago talasastim ivicama i gustom somotastom vazdušastom micelijom. Kolonije svih izolata rasle su brzo na PDA, bez zaustavljanja i nakon sedam dana na temperaturi od 24°C dostizale su prečnik od oko 80 mm. Ni kod jednog ispitivanog izolata nije došlo do lučenja pigmenta.

Na CLA podlozi svi ispitivani izolati su obilno sporulisali nakon sedam dana pri temperaturi od 24°C i formirali su pojedinačne tamno smeđe, feodiktiosporne konidije elipsoidno okruglastog

Tabela 2. BLAST analiza dobijenih sekvenci izolata *Alternaria petroselini* poreklom iz Srbije sa sekvencama iz GenBank baze podataka.

Table 2. Comparison of sequences of Serbian *Alternaria petroselini* isolates to a sequence database using BLAST analysis.

Ciljna sekvenca Genomic region	Izolat Isolate	
	Ap69	Ap95
ITS rDNK Pokrivenost 100%	EU781948 BLAST: <i>A. petroselini</i> 100% <i>A. radicina</i> 99% (5-6 nt ^a)	EU807868 BLAST: <i>A. petroselini</i> 100% <i>A. radicina</i> 99% (5-6 nt)
Alt a1 Pokrivenost 100%	KM102530 BLAST: <i>A. petroselini</i> 100% <i>A. radicina</i> 95% (25 ili 27 nt)	KM102531 BLAST: <i>A. petroselini</i> 100% <i>A. radicina</i> 95% (25 ili 27 nt)
EF1a Pokrivenost 94%	KM102533 BLAST: <i>A. petroselini</i> i <i>A. selini</i> 100% <i>A. radicina</i> 94% (12 nt)	KM102532 BLAST: <i>A. petroselini</i> 100% <i>A. radicina</i> 95% (10 nt)

^a – razlika u broju nukleotida; ^a – number of nucleotide substitutions.

oblika bez kljuna (Slika 1), veličine 17,5–45 x 12,5–27,5 μm (u proseku 29,9 x 19,92 μm). Konidije su se najčešće formirale na kratkim i nerazgranatim konidioforama, dok se granjanje retko uočavalo. Svi izolati *A. petroselini* poreklom iz Srbije formirali su mikrosklerocije (Slika 2). Pryor and Gilbertson (2002) prvi su uočili da izolati *A. petroselini* mogu formirati mikrosklerocije što je kasnije potvrđeno od strane drugih autora (Pryor and Asma, 2007; Infantino et al., 2009), dok Nishikawa and Nakashima (2013) nisu precizirali da li njihovi izolati formiraju mikrosklerocije.

Provera patogenosti i određivanje kruga domaćina

Infektivnost i patogenost svih ispitivanih izolata *A. petroselini* bila je uniformna i usmerena samo na određene biljke iz familije Apiaceae. U uslovima postavljenog eksperimenta ispitivani izolati *A. petroselini* poreklom iz Srbije ispoljili su patogenost na peršunu, paštrnaku, celeru i korijanderu, slabu patogenost na mrkvi, moraču i anisu, a nisu bili infektivni za crni luk, kupus, papriku, paradajz i krastavac. Svih 19 izolata uključenih u ispitivanja izazvalo je reakciju u vidu brojnih pega na listovima inokulisanih biljaka peršuna (Slika 3), paštrnaka, celera i korijandera šest dana po inokulaciji, dok je 8-10 dana nakon inokulacije dolazilo do potpunog sušenja biljaka. Na inokulisanim biljkama mrkve, morača i anisa zabeležena je pojava malog broja pega, što je ocenjeno kao slaba patogenost i u saglasnosti je sa rezultatima drugih autora (Pryor and Gilbertson, 2002; Nishikawa and Nakashima, 2013). Kod biljaka koje ne pripadaju

familiji Apiaceae nije došlo do pojave simptoma 14 dana po inokulaciji što ukazuje da *A. petroselini* ima uzak krug domaćina ograničen samo na biljke iz jedne familije.

Molekularna detekcija i identifikacija

Primenom molekularnih metoda i korišćenjem dva para prajmera specifičnih za detekciju *A. radicina* ARF2/ARR3 i Pa2071/Pa207 (Pryor and Gilbertson, 2001; Konstantinova et al., 2002) uspešno su amplifikovani produkti odgovarajuće veličine od oko 251 bp, odnosno 900 bp kod svih 19 ispitivanih izolata *A. petroselini* poreklom iz Srbije, kao i kod referentnog izolata *A. petroselini* BMP139. Osim toga, oba para specifičnih prajmera amplifikovali su produkt odgovarajuće veličine i kod dva srpska izolata *A. radicina*, kao i kod referentnog izolata za ovu vrstu BMP79. Mada su oba para prajmera dizajnirana na osnovu ITS regiona rDNK *A. radicina* koji kod različitih vrsta gljiva može ispoljiti razlike u veličini, dobijeni amplikoni *A. petroselini* i *A. radicina* nisu se razlikovali, verovatno jer se radi o blisko srodnim vrstama (Pryor and Gilbertson, 2002). Iako su ovi prajmeri označeni kao specifični za vrstu *A. radicina*, činjenica da su amplifikovali sve izolate *A. petroselini* i *A. radicina* pokazuje da se njihovom primenom ne može izvršiti razlikovanje ove dve srodne vrste (Pryor and Gilbertson, 2002). U saglasnosti sa ovim istraživanjima su i rezultati Pryor and Gilbertson (2001) koji su sa specifičnim prajmerima Pa2071/Pa2072 detektovali izolate obe vrste, dok Infantino et al. (2009) navode da primenom ovih prajmera nisu uspeli da amplifikuju svoje izolate *A.*

petroselini. Primenom ovih prajmera nisu amplifikovani referentni izolati *A. dauci* i *A. alternata* poreklom sa mrkve iz kolekcije Katedre za fitopatologiju, što je ukazuje na delimičnu specifičnost korišćenih prajmera i mogućnost njihovog korišćenja u rutinskim istraživanjima.

Nakon sekvenciranja i obrade sekvenci ITS regiona rDNK i Alt a1 i EF1a gena dva odabrana izolata poreklom iz Srbije (Ap69 i Ap95), sekvence su deponovane u GenBank bazu podataka, a njihovi pristupni brojevi prikazani su u Tabeli 2. Poređenje sekvenci dva izolata *A. petroselini* poreklom iz Srbije pokazalo je da su oni međusobno potpuno identični u sekvenci ITS regiona rDNK i Alt a1 gena (100% nukleotidne identičnosti), dok se na osnovu sekvence EF1a gena razlikuju u dva nukleotida (99,3% nukleotidne sličnosti).

BLAST analiza sekvenci tri genska regiona odabranih izolata *A. petroselini* iz Srbije pokazala je najveću sličnost sa izolatima *A. petroselini*, ali i izolatima nekoliko srodnih vrsta: *A. smyrnii*, *A. selini*, *A. radicina* i *A. carotiincultae*, sa kojima dele od 93% do 100% nukleotidne identičnosti (Tabela 2). Sekvence ITS regiona rDNK odabranih izolata *A. petroselini* poreklom iz Srbije najveću nukleotidnu sličnost 99–100% pokazale su sa pet izolata *A. petroselini* iz Irana (AY154685), Italije (FJ623264), Holandije (EF636901), Japana (AB678216) i SAD (AF229454), kao i sa šest izolata *A. radicina* (EU781949, FJ958190, EU807870, AY154704, DQ394074 i DQ394073) poreklom iz različitih delova sveta.

Analiza sekvence Alt a1 gena, pokazala je da oba izolata *A. petroselini* poreklom iz Srbije najveću nukleotidnu sličnost od 100% dele sa dva izolata *A. petroselini*, poreklom iz SAD (AY563288) i Japana (AB744030). Nukleotidnu sličnost od 98% dele sa izolatom *A. smyrnii* iz SAD (AY563289), a sličnost od 94–95% sa 13 izolata *A. radicina* (AY563286, EU139330, EU139331, KJ733011, KJ733002, KJ732991, EU139346, KJ733004 i KJ732995) i *A. carotiincultae* (AY563287, EU139320, EU139321 i EU139329) poreklom iz različitih delova sveta (Tabela 2).

Poređenjem sekvence EF1a gena, dva izolata *A. petroselini* poreklom iz Srbije najveću nukleotidnu sličnost od 100% pokazala su sa izolatima *A. selini* (EU139352) i *A. petroselini* (AY563288) poreklom iz SAD, i 99% sličnosti sa izolatom *A. petroselini* nepoznatog porekla (KC584677). Nukleotidnu sličnost od 97% izolati poreklom iz Srbije pokazuju sa izolatom *A. smyrnii* (AY563289), a 93–95% sličnosti sa četiri izolata *A. radicina* (EU139398, EU139399) i *A. carotiincultae* (EU139388, EU139389) poreklom

iz različitih delova sveta (Tabela 2).

Dobijeni rezultati pokazuju da su Alt a1 i EF1a regiona najinformativniji za identifikaciju vrsta koje pripadaju *radicina* grupi roda *Alternaria*, dok su sekvence ITS rDNK regiona informativne, ali ne i dovoljne za razlikovanje srodnih vrsta. Do sličnih rezultata u svojim istraživanjima došli su i Pryor and Gilberson (2002), Park et al. (2008) i Nishikawa and Nakashima (2013).

Morfološke karakteristike poput brzog porasta kolonije i formiranja mikrosklerocija, kao i analiza sekvenci Alt a1 i EF1a gena pokazale su se pouzdanim za identifikaciju i razdvajanje *A. petroselini* od srodnih vrsta u okviru roda *Alternaria*, naročito *radicina* grupe. Zbog velikog ekonomskog uticaja, pre svega na proizvodnju lista peršuna, dalja istraživanja bi trebalo usmeriti na razvijanje pouzdanih i brzih protokola detekcije ovog patogena u biljkama i semenu peršuna. Kako je primena hemijske zaštite otežana, testiranje različitih genotipova peršuna na otpornost pokazalo bi se korisnim u izboru početnog semenskog materijala i samim tim poboljšalo proizvodnju ove kulture. Osim toga, proučavanje kruga domaćina omogućava uspešnu primenu plodoreda koji takođe predstavlja jednu od osnovnih mera borbe od *A. petroselini*.

ZAHVALNICA

Istraživanja saopštena u ovom radu realizovana su kao deo projekta III 43001 (Agrobiodiverzitet i korišćenje zemljišta u Srbiji: integrisana procena biodiverziteta ključnih grupa artropoda i biljnih patogena) koji finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, kao i EU Commission project AREA, No 316004 (Advancing Research in Agricultural and Food Sciences at Faculty of Agriculture, University of Belgrade).

LITERATURA

- Agnew, K. (2001): Alternaria leaf spot. Crop profile for Parsley in Arizona. <http://www.ipmcenters.org/cropprofiles/dics/AZparslez.html>.
- Bulajić, A., Đekić, I., Lakić, N., Krstić, B. (2009): The presence of *Alternaria* spp. on the seed of Apiaceae plants and their influence of seed emergence. Archives of Biological Science, 61: 871-881.
- Bulajić, A., Krstić, B., Vico, I., Dukić, N. (2005): Uperedna proučavanja izolata *Alternaria petroselini* patogena peršuna. Pesticidi i fitomedicina, 20: 43-50.
- Bassimba, D. D. M, Mira, J. L., Baixauli, C., Vicent, A. (2012): First report of *Alternaria petroselini* causing leaf blight of fennel in Spain. Plant Disease, 96: 907.
- Cunnington, J. H., Minchinton, E. J., Auer, D. P. F., Martin, H. L. (2006): First record of *Alternaria petroselini sensu lato* causing leaf blight on parsley in Australia. New Disease Reports, 14: 26.
- Farrar, J., Pryor, B. A., Davis, R. M. (2004): Alternaria disease of carrot. Plant Disease, 88: 776-784.
- Infantino, A., Di Giambattista, G., Pucci, N., Pallottini, L., Poletti, F., Bocconcelli, C. (2009): First report on *Alternaria petroselini* on fennel in Italy. New Disease Reports, 19: 26.
- Jones, D. R., Baker, R. H. A. (2007): Introduction of non-native plant pathogens in Great Britain, 1970-2004. Plant Pathology, 56: 891-910.
- Konstantinova, P., Bonants, P. J. M., van Gent-Pelzer, M. P. E., van der Zouwen, P., van den Bulk R. (2002): Development of specific primers for detection and identification of *Alternaria* spp. in carrot material by PCR and comparison with blotter and plating assays. Mycological Research, 106: 23-33.
- Liu, Y. H., Zhang, C. Q., Xu, B. C. (2013): First report of leaf blight in Chinese hickory (*Carya cathayensis*) caused by *Alternaria petroselini* in China. Plant Disease, 97: 1253.
- Minchinton, E., Auer, D., Martin, H., Tesoriero, L. (2006): Guide to Common Diseases and Disorders of Parsley. State of Victoria, Department of Primary Industries, National Library of Australia, 1-46.
- Nishikawa, J., Nakashima, C. (2013): Taxonomic characterization and experimental host ranges of four newly recorded species of *Alternaria* from Japan. Journal of Phytopathology, 161: 604-613.
- Park, M. S., Romanoski, C. E., Pryor, B. M. (2008): A re-examination of the phylogenetic relationship between the causal agents of carrot black rot, *Alternaria radicina* and *A. carotiincultae*. Mycologia, 100: 511-527.
- Pryor, B. M. (2002): *Alternaria* leaf blight of parsley. In Davis R. M. and Raid R. N. (eds.) Compendium of Umbelliferous Crop Diseases. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, 17.
- Pryor, B. M., Asma, M. (2007): First report of seedling damping-off of fennel caused by *Alternaria petroselini* in the Netherlands. Plant Disease, 91: 1688.
- Pryor, B. M., Gilbertson, R. L. (2001): A PCR-based assay for detection of *Alternaria radicina* on carrot seed. Plant Disease, 85: 18-23.
- Pryor, B. M., Gilbertson, R. L. (2002): Relationships and taxonomic status of *Alternaria radicina*, *A. carotiincultae*, and *A. petroselini* based upon morphological, biochemical, and molecular characteristics. Mycologia, 94: 49-61.

Raid, R., Roberts, P. (2004): Laternaria leaf spot (*Alternaria radicina*). Specific common diseases. In 2004 Florida Plant Disease Management Guide: Parsley. http://edis.ifas.ufl.edu/BODY_PG118.

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

Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. J. (1994): CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22: 4673–4680.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. (1990): Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, in Innis, M., Gelfand, D., Sninsky, J., White, T. (eds.) *PCR protocols: A guide to methods and applications*. Academic Press, Inc., San Diego, 315–322.

(Primljeno: 25.12.2014.)

(Prihvaćeno: 29.01.1015.)

BLACK LEAF SPOT – IMPORTANT DISEASE OF PARSLEY IN SERBIA

IVANA STANKOVIĆ, KATARINA MILOJEVIĆ, ANA VUČUROVIĆ,
DUŠAN NIKOLIĆ, BRANKA KRSTIĆ, ALEKSANDRA BULAJIĆ

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

SUMMARY

In the period 2005–2014, total of 19 isolates of *Alternaria petroselini* originating from parsley leaves, taproot and seed, as well as infested soil were collected and analyzed on the bases of morphological, pathogenic and molecular features. All isolates formed dark gray colonies on PDA and subsurface produced microsclerotia, as well as pigmented, broadly ellipsoidal, singly feodyctiosporic conidia. Pathogenicity and host range studies using spore suspension *spray inoculation*, revealed that isolates were pathogenic for parsley, parsnip, celery and coriander, weakly pathogenic for carrot, fennel and anise, and not pathogenic for onion, cabbage, pepper, tomato, and cucumber. Molecular detection utilizing *A. radicina* specific primers failed to demonstrate difference between two closely related but different species, *A. radicina* and *A. petroselini*. For further confirmation of identity of Serbian *A. petroselini* isolates, sequencing of selected genomic fragments including ITS rDNA, Alt a1 and EF1a protein coding genes was performed. BLAST search revealed that the most reliable molecular delineation between *A. petroselini* and closely related species could be achieved on the bases of sequence analysis of Alt a1 and EF1a genes (25–27, and 10–12 nucleotide differences from *A. radicina* isolates, respectively), while sequence of ITS rDNA were helpful, but not completely informative for identification of *A. petroselini* isolates.

Key words: *Alternaria petroselini*, morphological identification, sequencing, ITS rDNA, Alt a1, EF1a

(Received: 25.12.2014.)
(Accepted: 29.01.2015.)