



Epicoccum nigrum novi patogen semena sirka u Srbiji

Danijela Ristić • Ivana Stanković • Ana Vučurović • Janoš Berenji •
Slobodan Krnjajić • Branka Krstić • Aleksandra Bulajić

received: 10 April 2012, accepted: 3 July 2012

© 2012 IFVC

doi:10.5937/ratpov49-1793

Izvod: U periodu 2009-2011. godine na lokalitetima Bački Petrovac i Čantavir prikupljeno je i analizirano 16 uzoraka zaraženog semena gajenog sirka (*Sorghum bicolor* (L.) Moench.) sorti Alba, Gold, Prima i Reform na prisustvo fitopatogenih gljiva. U pojedinačnim i mešanim zarazama ustanovljeno je prisustvo vrsta iz rodova *Epicoccum*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Aspergillus* i *Penicillium*. Iz zaraženog semena izolovane su monosporne kulture i na osnovu morfoloških osobina identifikovane su kao *Epicoccum nigrum*. Patogenost izolata ove gljive potvrđena je pojavom simptoma na veštački inokulisanim sejancima sirka. Molekularna identifikacija obavljena je primenom PCR i amplifikacije ITS regiona ribozomalne DNK. Sekvence gena odabranih izolata 291-09 (JQ619838) i 315-09 (JQ619839) pokazale su 99-100% nukleotidne identičnosti sa sekvencama 31 izolata *E. nigrum* deponovanih u GenBank bazi podataka. Dobijeni rezultati predstavljaju prvu detaljnu karakterizaciju *E. nigrum* u Srbiji. Prisustvo većeg broja vrsta gljiva na semenu sirka zahteva dalja ispitivanja njihovih međusobnih odnosa i značaja.

Ključne reči: *Epicoccum*, karakterizacija, sekvencioniranje, seme, sirak

Uvod

Gajeni sirak (*Sorghum bicolor* (L.) Moench.) se po površinama i proizvodnji ubraja među pet najvažnijih gajenih biljaka u svetu. Tolerantnost prema suši i visokim temperaturama, kao i manja probirljivost u pogledu tipa zemljišta i skromniji zahtevi u pogledu hraniva jesu najvažnije prednosti sirka za zrno u odnosu na druge gajene biljke. U svetskim razmerama sirak za zrno je značajan kao ljudska hrana, pre svega u nerazvijenim zemljama Afrike, Azije i centralne Amerike. Ukupna svetska proizvodnja dostigla je oko 54 miliona tona u 2003. godini (FAO 2004). Zrno sirka je visokokvalitetna stočna hrana čijom se preradom dobija skrob, glukoza, sirup, ulje, gluten i alkohol (Komlaga et al. 2001, Murty & Renard 2001).

U Srbiji gajeni sirak sve više poprima na značaju zbog različitih načina upotrebe zrna, zelene mase ili njihove kombinacije za ljudsku i stočnu ishranu, industriju i specifične namene (Sikora & Berenji 2005). U agroekološkim uslovima Srbije u sortnim ogledima postižu se veoma visoki prinosi zrna, koji kod pojedinih hibrida premašuju 10 t ha⁻¹ (Sikora & Berenji 2005). Prisustvo različitih patogenih gljiva na semenu sirka, koje je poslednjih godina sve češće utvrđeno, može biti značajno sa stanovišta smanjenja prinosa i kvaliteta zrna, u pogledu kontaminacije štetnim mikotoksinima, a takođe može dovesti i do indirektnih gubitaka smanjujući klijanje semena (Dawson & Bateman 2001, Singh & Navi 2001, Erpelding & Prom 2006). Više fitopatogenih gljiva koje se prenose semenom kao što su *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler, *Aspergillus flavus* van Tieghem, *A. fumigatus* Fresenius, *A. niger* Link, *Cladosporium* sp., *Colletotrichum sublineolum* P. Henn., Kabát & Bub. (sin. *C. graminicola* (Ces.) Wils. f. sp. *sorghii* Messaien, Lafon & Malot), *Curvularia* spp., *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenb (sin. *F. moniliforme* Sheld.), *F. oxysporum* Schlecht., *F. semitectum* Berk. & Rav. (sin. *F. palldoroseum* (Cooke) Sacc.), *Drechslera tetramera*

D. Ristić • I. Stanković • A. Vučurović • K. Milojević • B. Krstić • A. Bulajić*
University of Belgrade, Faculty of Agriculture, Nemanjina 6, 11080 Belgrade-Zemun, Serbia
e-mail: aleksandrabulajic@yahoo.com

J. Berenji
Institute of Field and Vegetable Crops, Maksima Gorkog 30, 21000 Novi Sad, Serbia

S. Krnjajić
Institute for Plant Protection and Environment, Banatska 33, 11080 Belgrade

Supported by Ministry of Education and Science of the Republic of Serbia, Projects No. III-43001 and TR-31073

(McKinney) Subram. & B.L. Jain (sin. *Bipolaris spicifera* (Bainier) Subram., *Nigrospora* sp., *Penicillium* spp., *Phoma* sp. i *Rhizopus* sp. često su izolovane iz zrna sirka (Fakhrunnisa & Ghaffar 2006, Gwary et al. 2006).

Rod *Epicoccum* sadrži više od 70 opisanih vrsta, čija se klasifikacija svodi na samo jednu visoko varijabilnu vrstu *Epicoccum nigrum* Link (syn. *E. purpurascens* Ehrenb. ex Schlecht.) (Schol-Schwarz 1959, Fávoro et al. 2011). *E. nigrum* je anamorfná vrsta razdela Ascomycota i proizvodi karakteristične muriformne konidije tamnog pigmenta (Mims & Richardson 2005). Rasprostranjena je širom sveta kao primarni razlagač organskih materija u prirodi, vezuje se za različite tipove zemljišta, ali detektovana je i kao patogen na brojnim biljkama domaćinima (Yassin et al. 2010, Fávoro et al. 2011). *E. nigrum* je opisana kao endofit vinove loze (Martini et al. 2009), patogen uskladištenih dinja kantalupe (Bruton et al. 1993), ali i kao patogen semena sirka (Yassin et al. 2010). Pojedini izolati *E. nigrum* proizvode niz sekundarnih metabolita koji se primenjuju za biološku kontrolu *Monilinia* spp. na breskvi i nektarini (Larena et al. 2005, Mari et al. 2007), *Sclerotinia sclerotiorum* na suncokretu (Pieckenstein et al. 2001) i *Pythium* sp. na pamuku (Hashem & Ali 2004).

Podaci o prisustvu *E. nigrum* u Srbiji su malobrojni. Ova vrsta opisana je na kori američke crne topole (*Populus canadensis* L.) (Keča 2000), na listovima i stablu žute gencijane (*Gentiana lutea* L.) (Pavlović et al. 2011), kao i na semenu sirka (Lević et al. 2008). Tokom ispitivanja zdravstvenog stanja semena sirka 2009. je ustanovljeno prisustvo gljiva koje su preliminarno identifikovane kao *Epicoccum* spp., koje su ispoljile patogenost na sejancima sirka. Osnovni cilj sprovedenih istraživanja bio je da se detektovani izolati iz semena sirka identifikuju primenom konvencionalnih i molekularnih metoda, amplifikacijom ITS regiona rDNK i na taj način započne prva detaljna karakterizacija vrsta roda *Epicoccum* u Srbiji.

Materijal i metod rada

Sakupljanje uzoraka semena sirka i izolacija patogena

Tokom trogodišnjeg perioda 2009-2011. na dva lokaliteta gajenja sirka u Vojvodini, Bačkom Petrovcu (okrug Južna Bačka) i Čantaviru (okrug Severna Bačka), prikupljeno je 16 uzoraka semena gajenog sirka, četiri sorte Alba, Gold, Prima i Reform. Seme svakog uzorka (četiri ponavljanja po 100 semena) ispirano je 2 h pod mlazom česmenске vode, površinski sterilisano u 2% rastvoru natrijum-hipohlorita (NaOCl, komercijalna varikina) u

trajanju od 2 min (Singh et al. 1991). Površinski sterilisano seme nanošeno je na podlogu krompir-dekstrozni agar (PDA) i inkubirano pet dana na 25°C i fotoperiodu od 12 h. Identifikacija prisutnih gljiva do nivoa roda obavljena je na osnovu makroskopskih i mikroskopskih osobina, a kolonije koje su po izgledu odgovarale vrstama roda *Epicoccum* odabrane su za dalji rad. U cilju dobijanja čistih kultura, nakon sedam dana razvoja inicijalnih kolonija izvršena je monosporna izolacija gljiva na novu PDA podlogu.

Provera patogenosti

Test provere patogenosti svih dobijenih monospornih izolata *Epicoccum* spp. obavljen je veštačkom inokulacijom sejanaca sirka (sorta Prima) u fenofazi bokorenja. Inokulacija biljaka obavljena je injektiranjem suspenzije konidija pripremljene od kultura odabranih izolata starih sedam dana, koje su odgajane na PDA podlozi pri temperaturi od 25°C i fotoperiodu u trajanju od 12 h. Injektiranje je obavljeno sterilnim špricom na stablu sejanca 1 cm iznad površine zemlje. Koncentracija dobijene suspenzije podešena je na 1×10^3 konidija/ml pomoću hemocitometra. Sa 2-3 ml tako pripremljene supenzije od svakog izolata inokulisano je po 5 biljaka, a ogled je ponovljen dva puta. Inokulisane biljke su potom održavane u uslovima staklenika. Kao negativna kontrola korišćeni su sejanci sirka inokulisani sterilnom vodom. Pojava simptoma posmatrana je do četiri nedelje po inokulaciji. Sa prizemnog dela stabla na kojima su se razvili simptomi, izvršena je reizolacija korišćenjem istih metoda kao pri izolaciji.

Morfološke karakteristike

Proučavanje makroskopskih svojstava obuhvatilo je praćenje intenziteta rasta i izgleda kolonije, boju i lučenje pigmenata. Ispitivanje mikroskopskih osobina obuhvatilo je utvrđivanje oblika i dimenzija konidija i drugih reproduktivnih organa na kulturama starih sedam dana, odgajenim na PDA podlozi na 25°C i fotoperiodu od 12 h (Burgess et al. 1994). Prosekom obračunatim za najmanje 100 ponovljenih merenja, određivana je dužina i širina konidija.

Molekularna detekcija i identifikacija

Metoda lančane reakcije polimeraze (*polymerase chain reaction*, PCR) primenjena je u cilju molekularne detekcije i identifikacije *E. nigrum* poreklom iz semena sirka, kao potvrda identifikacije na osnovu konvencionalnih metoda. Za ova ispitivanja odabrani su izolati 291-09 i 539-10 dobijeni iz semena zaražene metlice sirka

i izolat 315-09 poreklom iz komercijalnog semena. Ekstrakcija ukupne DNK obavljena je iz micelije čiste kulture patogena odgajenog na tečnoj PB (*potato broth*) podlozi, koja je čuvana na -80°C , i iz vazdušne micelije sakupljene direktno iz sedam dana starih kolonija odgajenih na PDA podlozi, korišćenjem komercijalnog kita DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany), po uputstvu proizvođača. PCR reakcija obavljena je sa parom univerzalnih prajmera ITS1/ITS4 (Konstantinova et al. 2002) koji omogućavaju umnožavanje i kasnije sekvencioniranje ITS regiona (Internal transcribed spacer) ribozomalne DNK eukariota. PCR reakcija obavljena je u radnoj zapremini od 25 μl , korišćenjem 12,5 μl 2X PCR Master miksa (Fermentas, Lithuania), 9 μl RNase-free vode, po 1,25 μl svakog prajmera (100 pmol/ μl) i 1 μl ekstrahovane ukupne DNK. Kao negativna kontrola korišćena je RNase-free voda koja je dodata u pripremljenu PCR smešu umesto ciljane DNK. PCR reakcija je izvedena pri sledećim uslovima: inicijalna denaturacija nukleinskih kiselina 2 min na 94°C ; 35 ciklusa koji se sastoje od denaturacije 2 min na 94°C , hibridizacije 30 s na 57°C , elongacije 1 min na 72°C , praćeno finalnom elongacijom na 72°C u trajanju od 10 min.

Vizuelizacija dobijenih produkata izvršena je nakon elektroforetskog razdvajanja u 1% agaroznom gelu, koji je posle bojenja u rastvoru etidijum-bromida finalne koncentracije 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ posmatran pod UV transiluminatorom. Za određivanje veličine umnoženog amprikona korišćen je marker MassRuler™ DNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences GmbH, Lithuania).

Umnoženi fragmenti izolata 291-09 i 315-09, nakon prečišćavanja pomoću QIAquick PCR Purification Kit-a (Qiagen, Hilden, Germany) poslani su na uslužno sekvencioniranje u oba smera na ABI 3730XL Automatic Sequencer u Macrogen, Inc (<http://dna.macrogen.com>, Korea). Dobijene sekvence obrađene su u programu FinchTV Version 1.4.0. a konsenzus nukleotidne sekvence podnete su u GenBank bazu podataka, gde im je dodeljen pristupni broj (GenBank Accession Number). BLAST analizom i višestrukim poređenjem sa dostupnim sekvencama u GenBank bazi podataka (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) pomoću CLUSTAL *W* programa (Thompson et al. 1994), obavljena je potvrda identifikacije. Za proračun genetičke udaljenosti i najvišeg stepena nukleotidne sličnosti dobijenih sekvenci odabranih izolata sa odgovarajućim sekvencama izolata iz drugih delova sveta, upotrebljen je softverski paket MEGA verzija 5.0. (Tamura et al. 2011).

Rezultati i diskusija

Simptomi bolesti i konvencionalna identifikacija

Tokom pregleda oglednih parcela sirka u Bačkom Petrovcu i u Čantaviru u periodu 2009-2011. na zaraženim metlicama i zrnu gajenog sirka sorti Alba, Gold, Prima i Reform uočena je nekroza tkiva prekrivena micelijском prevlakom tamnožute do narandžaste ili crvenkaste boje. Zaražena zrna su smežurana i prožeta micelijom i slabije klijavosti. U 16 pregledanih uzoraka semena ustanovljene su mešane zaraze gljivama iz rodova *Epicoccum*, *Fusarium* i *Alternaria* koji su bili prisutni u svim uzorcima, dok je prosečan nivo zaraze bio 2,0%, 8,82% odnosno 5,03% (Tab.1). U po pet uzoraka detektovane su i vrste iz rodova *Aspergillus* u prosečnom nivou zaraze od 0,78% i *Penicillium* 1,62%. Zaraza semena sirka sa *Epicoccum* spp. kretala se od 0,6-3,0%, u proseku 2%, što je u skladu sa nivom zaraze zabeleženim od strane Lević et al. (2008), koji su ustanovili i značajno viši nivo zaraze drugim fitopatogenim gljivama. Sličan nivo zaraze semena sirka sa *E. nigrum* zabeležen je i u Saudijskoj Arabiji (1,76-2,44%) (Yassin et al. 2010) i Etiopiji naročito posle perioda skladištenja (u proseku 2,46%) (Dejene et al. 2004).

Prilikom izolacije, na osnovu morfoloških karakteristika izdvojen je 21 monosporni izolat, poreklom iz svih 16 uzoraka semena, a koji su po morfološkim karakteristikama odgovarali *E. nigrum*. U uslovima veštačke inokulacije sejanaca sirka reprodukovani su simptomi prirodne infekcije. Prve promene tkiva na stablu inokulisanih biljaka, uočene su već 3-5 dana po inokulaciji, u vidu crvenkastosmedih nekrotičnih pega oko mesta inokulacije u osnovi stabla (Sl. 1d). Jasno vidljive promene boje vaskularnog tkiva, primarnog korena i čvora bokorenja uočene su sedam dana nakon inokulacije. Iz svih inokulisanih biljaka sirka sa simptomima, uspešno je izvršena reizolacija patogena. Na biljkama koje su inokulisane kao negativna kontrola, nije došlo do pojave simptoma, niti bilo kakvih promena. Ispitujući krug domaćina *E. nigrum* u uslovima veštačke inokulacije, Bruton et al. (1993) ustanovili su osetljivost većeg broja biljaka domaćina, kao što su dinja, krastavac, jabuka, kruška, grašak i paradajz na kojima se po inokulaciji razvila smeđa ili crvena trulež koja nije bila vlažnog tipa.

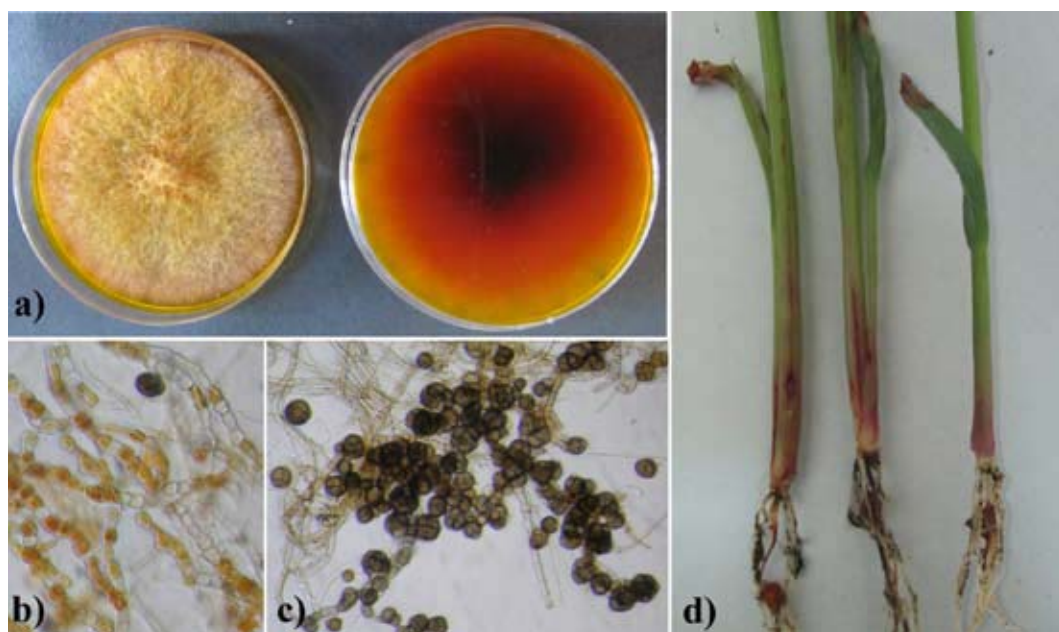
Za detaljno proučavanje morfoloških osobina *E. nigrum* odabrana su tri reprezentativna izolata, 291-09, 315-09 i 539-10. Ispitivani izolati formirali su gustu vazdušnu miceliju na PDA sa uravnoteženim prosečnim dnevnim porastom koji se kretao od 0,75 do 1,41 cm (u proseku 0,87 cm). Ovi rezultati su u saglasnosti sa navodima Fávoro et al. (2011) za Grupu 1 izolata *E. nigrum*, koji

Tabela 1. Intenzitet zaraze semena različitih sorti gajenog sirka u periodu 2009-2011.

Table 1. The intensity of seed infection of different sorghum cultivars in the period 2009-2011

Lokalitet Locality	Sorta Cultivar	Godina Year	<i>Alternaria</i> spp.	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>Epicoccum</i> spp.	<i>Fusarium</i> spp.	<i>Penicillium</i> spp.
Bački Petrovac	Alba	2009	2,0*	0	2,0	3,6	0
Bački Petrovac	Gold	2009	2,0	0	2,0	6,0	0
Bački Petrovac	Prima	2009	4,0	0	2,4	17,9	0
Bački Petrovac	Reform	2009	5,0	0	3,0	7,5	0
Čantavir	Alba	2009	12,6	1,5	2,6	8,8	6,9
Čantavir	Gold	2009	6,4	1,8	2,1	6,0	11,2
Bački Petrovac	Alba	2010	1,3	0	1,2	2,3	0
Bački Petrovac	Gold	2010	2,7	0	2,0	13,8	0
Bački Petrovac	Prima	2010	6,2	0	2,0	3,0	0
Bački Petrovac	Reform	2010	5,3	0	1,7	2,5	0
Čantavir	Alba	2010	2,0	2,4	2,1	3,6	0,9
Čantavir	Gold	2010	3,0	3,8	1,9	12,2	2,7
Bački Petrovac	Alba	2011	8,8	0	2,0	19,7	0
Bački Petrovac	Gold	2011	7,6	0	0,6	15,2	0
Čantavir	Prima	2011	2,4	3,0	2,0	11,3	4,2
Čantavir	Reform	2011	9,2	0	2,4	7,8	0

* Prosečan % zaraze semena sirka određen iz četiri ponavljanja po 100 semena po uzorku / Average % of seed infection calculated from four replicates of 100 seeds per sample



Slika 1. *Epicoccum nigrum*: a) izgled kolonije na PDA podlozi; b) konidiofore; c) konidije; d) veštački zaraženi sejanci sirka i negativna kontrola (desno)

Fig. 1. *Epicoccum nigrum*: a) colony appearance on PDA media; b) conidiophores; c) conidia; d) artificially inoculated sorghum seedlings with negative control (right)

su opisani kao izolati koje karakteriše brz porast. Kolonija sva tri izolata je gusta, vunasta, intenzivno žute boje sa lica i narandžaste do tamno crvene boje sa naličja, okružena belom kompaktnom

micelijom nepravilnih margina (Sl. 1a). Izgled kolonije ponekad se može dovesti u vezu sa izgledom kolonija vrsta *Fusarium* spp., a često i pogrešno identifikovati kao *Ustilaginales* (Navi

et al. 1999). Konidije su formirane na kratkim konidioforama koje se uzdižu sa diskretnih sporodohija (Sl. 1b). Konidije su gusto zbijene u sporodohijama, sferičnog oblika i sužene pri osnovi. Potpuno razvijene konidije su smeđe boje, neravne epispорије sa slabо izraženim brojnim septama (Sl. 1c), dimenzija 12,5-27,5 x 12,5-30 μm. Sve morfolоške makroskopske i mikroskopske osobine u potpunoj su saglasnosti sa rezultatima navedenim u literaturi (Mims & Richardson 2005, Pitt & Hocking 2009).

Molekularna detekcija i identifikacija

Kod odabranih reprezentativnih izolata (291-09, 315-09 i 539-10) bez obzira da li je ekstrakcija obavljena iz micelije odgajene na tečnoj podlozi ili iz vazdušne micelije sa površine kolonije, uspešno je došlo do amplifikacije. Kod sva tri ispitivana uzorka, u svim ponavljanjima, utvrđeno je prisustvo trake procenjene veličine oko 550 bp (Sl. 2) što odgovara opisanoj veličini ITS regiona *E. nigrum* (Arenal et al. 2000). Do amplifikacije nije došlo kod uzorka koji je predstavljao negativnu kontrolu (PCR smeša sa RNase-free vodom).

Nakon sekvencioniranja dva odabrana PCR produkta dobijenih amplifikacijom uzoraka 291-09 i 315-09, korišćenjem para prajmera ITS1/ITS4 i njihove obrade u FinchTV programu, konsenzus

nukleotidne sekvence deponovane su u GenBank bazu podataka pod pristupnim brojevima JQ619838 i JQ619839. BLAST analiza sekvenci produkata u dužini od 546 bp, pokazala je 99% do 100% nukleotidne identičnosti sa sekvencama 31 izolata *E. nigrum*.

Dalja karakterizacija obavljena je višestrukim uparivanjem i proračunom nukleotidne sličnosti odabranih sekvenci, nakon trimovanja sekvenci na dužinu od 533 bp. Proračunom genetičke sličnosti korišćenjem softverskog paketa MEGA verzija 5.0. (Tamura et al. 2011) dobijeni su precizniji rezultati i izolati 291-09 i 315-09 pokazali su najviši stepen nukleotidne identičnosti od 100% sa sekvencama 23 izolata različitog porekla prijavljena kao *E. nigrum*, od čega su 17 poreklom iz Španije (FN868456, FJ424232-37, FJ424242-45, FJ424250, FJ424251, FJ424256, FJ424257, FJ424263, FJ424264), tri izolata poreklom iz Kine (GU586847, AB470875, AB470889), dva izolata poreklom iz Italije (EU232716, EU529998), kao i sa sekvencom jednog izolata poreklom iz Kanade (JN689342).

Kilpatrick & Chilvers (1981) ispitali su varijabilnost 2000 izolata *Epicoccum* i zaključili da pripadaju genetski varijabilnoj vrsti, što je kasnije potvrđeno i analizom 5.8S i ITS regiona rDNK (Wang & Guo 2004). Na osnovu poređenja sekvenci u području ITS regiona, ustanovljena je značajna



Slika 2. *Epicoccum nigrum*: Elektroforetska analiza PCR proizvoda dobijenih korišćenjem para prajmera ITS1/ITS4. Kolone: M - MassRuler™ DNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences GmgH, Lithuania); 1 - izolat 291-09; 2 - izolat 315-09; 3 - izolat 539-10 DNK ekstrahovana iz micelije gajene u tečnoj kulturi i 4 - B negativna kontrola - PCR mix sa vodom

Fig. 2. *Epicoccum nigrum*: Electrophoretic analysis of PCR products obtained using primer pair ITS1/ITS4. Lanes: M - Mass-Ruler™ DNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences GmgH, Lithuania); 1 - isolate 291-09; 2 - isolate 315-09; 3 - isolate 539-10 DNA extracted from mycelium grown in liquid culture and 4 - B negative control - PCR mix with water

sličnost sa vrstom *Cerebella andropogonis* (Pažoutová et al. 2003) što ukazuje da su ovi rodovi sinonimi, kao što je i ranije bilo predloženo (Schol-Schwarz 1959). Na osnovu morfoloških osobina i ITS analiza predloženo je da *Phoma epicoccina*, još jedna srodna vrsta, i *E. nigrum* predstavljaju iste biološke vrste (Arenal et al. 2004), mada su izolati *E. nigrum* izgubili sposobnost da formiraju piknide za razliku od izolata *P. epicoccina*. Dalja istraživanja Fávaro et al. (2011) dokazala su genetičku povezanost između izolata *E. nigrum* na različitim biljkama domaćinima korišćenjem sekvenci ITS regiona rDNK i β -tubulin gena. Filogenetske analize pokazale su da izolati *E. nigrum* mogu biti razdvojeni u dve odvojene grupe. Grupa 1 obuhvata izolate tipične morfologije *E. nigrum* (žuta do narandžasta kolonija), sa kojom i izolati poreklom iz Srbije ispitivani u ovim istraživanjima pokazuju najveću sličnost. Grupa 2 obuhvata izolate varijabilne morfologije (siva, roze, ljubičasta, crvena ili braon kolonija) koji su bliski sa izolatima klasifikovanim kao *E. andropogonis* i *P. epicoccina*. Pomenuta istraživanja ukazuju na činjenicu da su obe grupe široko rasprostranjene u svetu. Primenjujući složenije analize, kombinujući morfološke, fiziološke i molekularne analize, Fávaro et al. (2011) razlikuju dva klastera i postavljaju hipotezu da *E. nigrum* treba da bude razdvojena u dve vrste. Dalja istraživanja ukazaće na opravdanost razdvajanja ovih izolata u zasebne vrste, a time i preciznije mesto koje pripada analiziranim izolatima sa sirka u Srbiji. U isto vreme dobijeni rezultati predstavljaju prvu karakterizaciju izolata *E. nigrum* iz Srbije, što s obzirom na specifičnu ulogu ove vrste u prirodi otvara mogućnost za dalja istraživanja naročito metabolita i njihove uloge u patogenezi i epidemiologiji.

Zaključak

E. nigrum javlja se redovno na semenu sirka u Srbiji, u relativno niskom procentu zaraze, koji može biti značajan zbog potencijalnog prisustva različitih toksičnih metabolita. Dobijeni izolati ispoljili su patogenost na sejancima sirka, a morfološka karakterizacija ukazuje da izolati iz Srbije pripadaju Grupi 1 *E. nigrum*. Uspesna primena protokola za molekularnu identifikaciju *E. nigrum* na osnovu sekvence ITS regiona rDNK, predstavljaju početak i osnovu proučavanja filogeografske distribucije ove vrste u Srbiji. Sekvencioniranje većeg broja izolata, uključivanje dodatnih delova genoma, njihovo poređenje i određivanje međudnosa i odnosa sa drugim izolatima doprineće boljem poznavanju strukture populacije *E. nigrum* u svetu, kao vrste sa specifičnom ulogom na svojim biljkama domaćinima.

Literatura

- Arenal F, Platas G, Peláez F (2004): Taxonomic reconsideration of *Epicoccum nigrum* and *Phoma epicoccina* based on DNA sequences and morphological observations. *Mycotaxon* 89: 465-471
- Bruton BD, Redlin SC, Collins JK, Sams CE (1993): Postharvest decay of cantaloupe caused by *Epicoccum nigrum*. *Plant Dis* 77: 1060-1062
- Burgess LW, Summerell BA, Bullock S, Gott KP, Backhouse D (1994): *Laboratory Manual for Fusarium Research*, 3rd ed. University of Sydney/Royal Botanic Gardens, Sydney, Australia
- Dawson WAJM, Bateman GL (2001): Fungal communities on roots of wheat and barley and effects of seed treatments containing fluquinconazole applied to control take-all. *Plant Pathol.* 50: 5-82
- Dejene M, Yuen J, Sigvald R (2004): The impact of storage methods on storage environment and sorghum grain quality. *Seed Sci. Technol.* 32: 511-529
- Erpelding JE, Prom L (2006): Seed mycoflora for grain mold from natural infection in sorghum germplasm grown at Isabela, Puerto Rico and their association with kernel weight and germination. *Plant Pathol. J.* 5: 106-112
- Fakhrunnisa MHH, Ghaffar A (2006): Seed-borne mycoflora of wheat, sorghum and barley. *Pak. J. Bot.* 38: 185-192
- FAO (2004): Production year book, vol 58. FAO Statistical Series, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy
- Fávaro LCdL, de Melo FL, Aguilar-Vildoso CI, Araújo WL (2011): Polyphasic analysis of intraspecific diversity in *Epicoccum nigrum* warrants reclassification into separate species. *PLoS ONE* 6 (8): e14828. doi:10.1371/journal.pone.0014828
- Gwary DM, Mailafiya DM, Jibrin TJ (2006): Survival of *Colletotrichum sublineolum* and other seed-borne fungi in sorghum seeds after twenty months of storage. *Int. J. Agri. Biol.* 8: 676-679
- Hashem M, Ali EH (2004): *Epicoccum nigrum* as biocontrol agent of *Pythium* damping-off and root rot of cotton seedlings. *Arch. Phytopathol. Plant. Prot.* 37: 283-297
- Keča N (2000): The most frequent diseases in poplar plantations in the region of R.J. Potisje. *Glasnik Sumarskog fakulteta, Univerzitet u Beogradu*, 82: 81-91
- Kilpatrick JA, Chilvers GA (1981): Variation in a natural population of *Epicoccum purpurascens*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 77: 497-508
- Komlaga GA, Johnson PNT, Atokpele DK (2001): Physico-chemical properties of four Ghanaian sorghum (*Sorghum bicolor*) varieties, A project report submitted under the IFAD/FRI/ICRISAT Sorghum Improvement Project, 18
- Konstantinova P, Bonants PJM, van Gent-Pelzer MPE, van der Zouwen P, R, 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. *Mycol. Res.* 106: 23-33
- Larena I, Torres R, De Cal MA, Liñán M, Melgarejo P, Domenichini, P. (2005): Biological control of postharvest brown rot (*Monilinia* spp.) of peaches by field applications of *Epicoccum nigrum*. *Biol. Control.* 32: 305-310
- Lević J, Kovačević T, Vukojević J, Stanković S (2008): Mikrobiota semena sirka. *Zbornik rezimea IX Savetovanja o zaštiti bilja, Zlatibor, Srbija*, 48-49
- Mari M, Torres R, Casalini L, Lamarca N, Mandrin JF, Lichou J, Larena I, De Cal MA, Melgarejo P, Usall J (2007): Control of post-harvest brown rot on nectarine by *Epicoccum nigrum* and physico-chemical treatments. *J. Sci. Food Agric.* 87: 1271-1277
- Martini M, Musetti R, Grisan S, Plizzotto R, Borselli S, Pavan F, Osler R (2009): DNA-dependent detection of the grapevine fungal endophytes *Aureobasidium pullulans* and *Epicoccum nigrum*. *Plant Dis.* 93: 993-998

- Mims CW, Richardson EA (2005): Ultrastructure of sporodochium and conidium development in the anamorphic fungus *Epicoccum nigrum*. Can. J. Bot. 83: 1354-1363
- Murty DS, Renard C (2001): Crop production in tropical Africa. Sorghum CTA, 78
- Navi SS, Bandyopadhyay R, Hall AJ, Bramel-Cox PJ (1999): A pictorial guide for the identification of mold fungi on sorghum grain. Information Bulletin no. 59 (In En, Summaries in En, Fr). Patancheru 502 324, Andhra Pradesh, India: International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics. 118
- Pažoutová S, Kolínská R (2003): Relationship of *Cerebella* to *Epicoccum* and their closest relatives among Dothideales. Czech Mycol. 54: 155-160
- Pavlović SP, Stojanović SD, Starović MS, Jošić DLj, Menković NR (2011): Parasitic mycobiota of yellow gentian (*Gentiana lutea* L.). Zbornik Matice Srpske za prirodne nauke 120: 177-182
- Pieckenstein FL, Bazzalo ME, Roberts AMI, Ugalde RA (2001): *Epicoccum purpurascens* for biocontrol of *Sclerotinia* head rot of sunflower. Mycol. Res. 105: 77-84
- Pitt JI, Hocking AD (2009): Fungy and Food Spoilage, 3rd Edition. Dordrecht, Springer 1-519
- Schol-Schwarz MB (1959): The genus *Epicoccum* Link. Trans. Br. Mycol. Soc. 42: 149-173
- Sikora V, Berenji J (2005): Perspektive gajenja sirka za zrno u nas. Zbornik radova Instituta za ratarstvo i povrtarstvo Novi Sad 41: 451-458
- Singh K, Frisvad JC, Thrane U, Mather SB (1991): An Illustrated Manual on Identification of Some Seed-borne *Aspergillus*, *Fusaria*, *Penicillium* and their mycotoxins. Jordbugsforlaget Frederiksberg, Denmark, 133
- Singh SD, Navi SS (2001): An *in vitro* screening technique for the identification of grain mold resistance in sorghum. Indian Phytopathol. 54: 35-39
- 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. Mol. Biol. Evol. 28: 2731-2739,
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994): CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. 22: 4673-4680
- Wang Y, Guo LD (2004): Morphological and molecular identification of an endophytic fungus *Epicoccum nigrum*. Mycosystema 23: 474-479
- Yassin MA, El-Samawaty AR, Bahkali A, Moslem M, Abd-Elsalam KA, Hyde KD (2010): Mycotoxin-producing fungi occurring in sorghum grains from Saudi Arabia. Fungal Diversity 44: 45-52

Epicoccum nigrum the New Pathogen of Sorghum Seed in Serbia

Danijela Ristić • Ivana Stanković • Ana Vučurović • Janoš Berenji •
Slobodan Krnjajić • Branka Krstić • Aleksandra Bulajić

Summary: Sixteen samples of sorghum seed (*Sorghum bicolor* (L.) Moench.) 'Albá', 'Gold', 'Prima' and 'Reform' were analyzed in the localities of Bački Petrovac and Čantavir in the period 2009-2011. The presence of species belonging to the genera *Epicoccum*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Aspergillus* and *Penicillium* was established in single and mixed infections. From the infected sorghum seed, monosporial cultures identified as *Epicoccum nigrum* based on morphology, proved their pathogenicity on artificially inoculated sorghum seedlings. Molecular identification was performed by PCR and amplification of the ITS region of ribosomal DNA. Gene sequences of selected isolates 291-09 (JQ619838) and 315-09 (JQ619839) exhibited 99-100% nucleotide identity with the sequences of 31 isolates of *E. nigrum* deposited in the GenBank. The obtained results represent the first detailed characterization of *E. nigrum* in Serbia. The presence of a large number of phytopathogenic fungi on sorghum seed should be further investigated in order to clarify their relationships and relative significance.

Key words: characterisation, *Epicoccum*, seed, sequencing, sorghum