MORFOLOŠKA I PATOGENA KARAKTERIZACIJA *Pestalotiopsis* spp. PATOGENA LESKE U SRBIJI

Tanja Vasić¹, Darko Jevremović², Sonja Filipović¹, Jordan Marković³, Sanja Živković¹, Aleksandar Leposavić²

¹Poljoprivredni fakultet Kruševac, Univerzitet u Nišu,
Kosančićeve 4, 37000 Kruševac

²Institut za voćarstvo, Kralja Petra I br. 9, 32000 Čačak

³Institut za krmno bilje, 37251 Globoder, Kruševac

E-mail: vasic.tanja@ni.ac.rs

Izvod

Leska (*Corylus avellana* L.) je ekonomski veoma značajna voćna vrsta koja se gaji u velikom broju zemalja. Najveći svetski proizvođač i izvoznik plodova lešnika je Turska. U Srbiji se leska, u odnosu na druge vrste voćaka, gaji na značajno manjim površinama. U poslednjoj deceniji leska sve više dobija na značaju i prisutan je trend rasta površina pod ovom kulturom. Leska je domaćin brojnih patogena i štetočina koji mogu da izazovu značajne ekonomske štete u zasadima. U Srbiji do danas nije bilo sveobuhvatnih istraživanja prouzrokovaca bolesti leske i cilj našeg rada je bio determinacija uzročnika nekih od gljivičnih bolesti.

U periodu od 2017. do 2020. godine sa većeg broja plantaža u Srbiji prikupljeni su uzorci listova i grana leske sa simptomima nekrotične pegavosti. Iz sakupljenih uzoraka izolovan je veliki broj izolata gljive za dalju determinaciju. Na osnovu morfoloških i patogenih osobina izdvojenih izolata utvrđeno je prisustvo fitopatogenih gljiva iz roda *Pestalotiopsis*.

Ključne reči: *Corylus avellana* L., nekrotična pegavost, *Pestalotiopsis* spp.

UVOD

Leska (*Corylus avellana* L.) je jedna od najznačajnijih vrsta jezgrastog voća u celom svetu i njeno uzgajanje datira još iz perioda starih Rimljana. Veruje se da vodi poreklo iz Male Azije. Najveći svetski proizvođači leske su u 2019-2020. godini bili: Turska (75%), Italija (7%), SAD (3%), Azerbejdžan (3%), Čile (3%), Gruzija (2%) i Iran (2%) (INC, 2020). Prema procenama, u Srbiji se leska gaji na preko 2.200 ha (Keserović i sar., 2014). Proizvedene količine ne mogu da zadovolje potrebe naše konditorske industrije, pa se značajne količine plodova lešnika uvoze. Površine pod leskom u Srbiji se iz godine u godinu povećavaju i proizvodnja lešnika postaje značajan segment voćarstva. Međutim, brzo širenje površina pod leskom potencijalno može izazvati pojavu i širenje bolesti i štetočina koje mogu ugroziti proizvodnju. Ekonomski značajne štete u proizvodnji lešnika mogu prouzrokovati brojni patogeni: bakterije, virusi i gljive.

Najznačajnije bakterioze leske su: bakteriozna plamenjača leske (*Xanthomonas arboricola* pv. *corylina*), bakterijski rak leske (*Pseudomonas syringae* pv. *avellanae*) i bakteriozni rak korenovog vrata (*Agrobacterium tumefaciens*) (Obradović i sar., 2010). Ekonomski značajni virusi leske su: virus mozaika jabuke (apple mosaic virus, ApMV) i virus nekrotične prstenaste pegavosti prunusa (prunus necrotic ring spot virus, PNRSV) (Anonymous, 2004). Osim bakterijskih i virusnih prouzrokovaca bolesti leske značajne štete mogu da nanesu i fitopatogene gljive. Najznačajnije su: *Armillaria* spp., *Cytospora corylicola*, *Erysiphe corylacearum*, *Fusarium lateritium*, *Microsphaera coryli*, *Monilinia coryli*, *Mycosphaerella punctiformis*, *Pestalotiopsis* spp., *Piggotia coryli*, *Phomopsis* spp., *Phyllactinia guttata*, *Pucciniastrum coryli*, *Sp-haceloma coryli* i druge (Teviotdale i sar., 2002; Sezer i Dolar, 2015; Wei i sar., 2007).

Poslednjih godina značajne ekonomske štete na leski izazivaju gljive iz roda *Pestalotiopsis* (Maharachchikumbura i sar., 2011). Do sada je opisano više od 220 vrsta iz roda *Pestalotiopsis* na velikom broju biljaka. Na leski je prisustvo *Pestalotiopsis* vrsta zabeleženo u Italiji, Iranu, Čileu, Kini, Turskoj i Srbiji (Karaca i Erper, 2001; Liu i sar., 2007; Arzanlou i sar., 2012; Cappelli i sar., 2015; Vasić i sar. 2017). Na osnovu morfološkog izgleda konidija *Pestalotia* obuhvata tri roda: *Pestalotia*, *Pestalotiopsis* i *Truncatella* (Maharachchikumbura i sar., 2014). Za vrste roda *Pestalotiopsis* je utvrđeno da imaju 5-čelijske konidije, vrste roda *Truncatella* imaju 4-čelijske konidije, dok je rod *Pestalotia* opisana kao monotipski rod sa 6-čelijskim konidijama. U okviru roda *Pestalotiopsis* je opisano više vrsta koje su najviše raširene u tropskim i umerenim regionima. Većini vrsta iz ovog roda nedostaje polni stadijum, a do sada u svetskoj literaturi zabeleženo samo 13 seksualnih formi (Maharachchikumbura i sar., 2011; Maharachchikumbura i sar., 2014). Vrste roda *Pestalotiopsis* su fitopatogene i izazivaju različite simptome bolesti kao što su: rak rane, odumiranje izdanaka, nekroza lišća, plamenjača, siva pegavost, krastavost, hlороza, trulež plodova u polju i u skladištima.

Cilj našeg istraživanja bio je identifikacija uzročnika nekrotične pegavosti lišća i grana leske u Srbiji na osnovu morfoloških i patogenih karakteristika.

MATERIJAL I METODE

Izolacija patogena. Uzorci leske sa simptomima nekroze listova, plamenjače i sušenja grančica su sakupljeni u periodu 2017–2020. godine na plantažama leske iz više lokaliteta (Čačak, Gornji Milanovac, Kraljevo i Sombor). Izolacija patogena obavljena je sa grančica leske. Delovi grančica ispirani su u tekućoj vodi 20 min., a zatim isečeni na fragmente dužine 1 cm. Fragmenti grana su isečeni na prelazu nekrotičnog i zdravog tkiva, pa su površinski dezinfikovani pet minuta u 5% rastvoru natrijum hipohlorita (NaOCl) i isprani tri puta po pet minuta u sterilnoj destilovanoj vodi. Nakon ispiranja fragmenti su preneti na sterilan filter papir, a zatim je 5 fragmenata stavljeno na hranljivu podlogu u Petri kutije. Za izolaciju patogena korišćena je podloga krompir dekstrozni agar (KDA) u kojoj je dodato 300 µl/l gentamicin sulfata (Dhingra i Sinclair, 1995). Zasejane Petri kutije inkubirane su u termostatu na temperaturi od $24\pm 2^{\circ}\text{C}$, u uslovima mraka. Posle 3–5 dana mikroskopirana je micelija gljive oko zasejanih fragmenata, a zatim je isečak kolonije presejan radi dobijanja čiste kulture od koje su formirani monosporijalni izolati. Monosporijalni izolati su presejani na kosi agar u epruvetama i čuvani na $+4^{\circ}\text{C}$ do momenta ispitivanja.

Morfološke odlike odabranih izolata (boja, oblik i brzina rasta) posmatrane su nakon 7 dana inkubacije na KDA podlozi pri 25°C u mraku. Takođe, proučavan je izgled, struktura, boja i porast micelije kao i prisustvo i veličina vršnih i bazalnih apendicesa, gde je to moguće. Proučavanje oblika konidija obavljeno je tako što je iz kultura ispitivanih izolata starih 10 dana posmatrano po 30 potpuno razvijenih nasumično izabranih konidija. Prosečne dimenzije konidija određene su merenjem dužine i širine 30 konidija proučavanih izolata gajenih na KDA podlozi. Merenje i fotografisanje proučavanih izolata obavljeno je pomoću svetlosnog mikroskopa marke Olympus CX31 i kamere SC100 (Olympus, Japan).

Test patogenosti. Pet odabranih izolata *Pestalotiopsis* spp. (Le-1, Le-2, Le-3, Le-4 i Le-5) podvrgnuta su testu patogenosti. Test je urađen inokulacijom nepovređenih delova biljaka leske, nanošenjem fragmenata kolonije proučavanih izolata *Pestalotiopsis* spp.

Pre inokulacije listovi i nezreli plodovi lešnika su površinski sterilisani 70% etanolom. Nepovređeni listovi i nezreli plodovi lešnika su inokulisani postavljanjem malih fragmenata kolonije proučavanih izolata, tako da je micelijska površina okrenuta prema delovima test biljaka. Inokulisani biljni delovi su postavljeni u plastične kutije (190x130x73 mm) sa poklopcem na filter papir koji je nakvašen sterilnom destilovanom vodom. Kutije sa biljnim delovima su držane u termostatu na temperaturi od $20\text{--}25^{\circ}\text{C}$ sa 12-časovnim fotoperiodom (Sezer i Dolar, 2015). Kao kontrola korišćeni su listovi i mladi plodovi leske koji su na isti način pripremljeni, nakon čega su inokulisani fragmentima KDA podloge (5x5 mm). Ogled je postavljen u pet ponavljanja sa po pet biljnih delova (50 biljnih delova po izolatu). Ocena testa patogenosti vršena je nakon 14 dana od inokulacije.

REZULTATI I DISKUSIJA

Tokom leta i jeseni u periodu od 2017. do 2020. godine na većem broju plantaža leske u Čačku, Gornjem Milanovcu, Kraljevu i Somboru primećene su nekrotične promene i sušenje lišća i grančica. Početne infekcije manifestovale su se sitnim nekrotičnim pegama na listovima. Sa napredovanjem bolesti sitne nekrotične pege su se uvećavale i spajale što je dovelo do sušenja delova lista, celih listova i grančica. Na grančicama su se simptomi javljali u vidu sivo-braon lezija. Identifikacija prisutnih gljiva je urađena na osnovu morfološkog izgleda dobijenih čistih kultura ispitivanih izolata, prisustva i izgleda reproduktivnih struktura uočenih na privremenim mikroskopskim preparatima napravljenim od čistih kultura proučavanih izolata.

Gajenjem odabranih izolata na KDA podlozi utvrđeno je da su svi ispitivani izolati za sedam dana na sobnoj temperaturi ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$) razvili kulture prečnika 55 mm. Svi izolati su na ovoj podlozi formirali glatke, bele kulture sa vuneno-pamučastom micelijom. Sa starenjem kultura, na licu su se uočavala crna plodonosna tela (acervule) u kojima se nalazilo mnoštvo konidija. Kolonije su sa naličja bele do bež boje, sa supstratnom micelijom. Ivice kolonija su blago talasaste (slika 1. a, b). Identične rezultate za rod *Pestalotiopsis* u svojim istraživanjima navode Karaca and Erper (2001), Arzanlou et al. (2012) i Vasić et al. (2017).

Slika 1. Izgled kultura izolata Le-4 na KDA podlozi starih 10 dana, lice (a) i naličje (b)

Mikroskopskim pregledom privremenih preparata napravljenih od čistih kultura proučavanih izolata, uočeno je da su konidiofore bile hijalinske i razgranate. Konidiogene ćelije su bile anelidne, hijalinske i glatke. Ćelije su se sastojale od tri obojene srednje ćelije i apikalnih i bazalnih hijalinskih ćelija sa apendiksima. Konidije su bile talasaste, petočelijske, ravne ili blago zakrivljene (slika 2. a, b).

Slika 2. Izgled konidija izolata Le-5 (a) i izolata Le-2 (b)

Merenjem po 30 konidija svih ispitivanih izolata gajenih na KDA podlozi utvrđene su sledeće dimenzije: $16,57\text{--}27,53 \times 5,05\text{--}9,13 \text{ }\mu\text{m}$ (prosek $25,66 \times 7,54$). Konidije su sa pet ćelija, od kojih su tri smeđe centralne ćelije - prve dve tamnije od treće. Bazalna ćelija je sa jednim apendicesom dužine $2,95\text{--}12,38 \text{ }\mu\text{m}$ (prosečno $7,49$). Apikalna ćelija je sa 2–3 apendicesa sa dužinama: prvi $3,67\text{--}30,39 \text{ }\mu\text{m}$ (prosek $17,14$), drugi $5,73\text{--}27,88 \text{ }\mu\text{m}$ (prosek $20,39$) i treći $10,12\text{--}33,49 \text{ }\mu\text{m}$ (prosek $17,17$). Na osnovu morfoloških karakteristika, ispitivani izolati su identifikovani kao pripadnici roda *Pestalotiopsis*. Navedeni rezultati su u saglasnosti sa navodima drugih autora (Maharachchikumbura i sar., 2014; Sezer i Dolar, 2015; Vasić i sar., 2017).

Ispitivanje patogenosti dobijenih izolata je izvršeno na lišću i mladim (nezrelim) plodovima leske. Ocena patogenosti odabranih izolata pokazala je da su svi proučavani izolati *Pestalotiopsis* spp. ispoljili patogenost u vidu pojave nekrotičnih zona na inokulisanim biljnim delovima. Na tkivu ispitivanih biljnih delova došlo je do pojave nekroze smeđe ili tamno smeđe boje (slika 3 a, b, c, d, e). Takođe u okviru nekrotiranog tkiva kod pojedinih izolata uočena su crna plodonosna tela (slika 3 d).

Slika 3. Simptomi na inokulisanim listovima i nezrelim plodovima lešnika: (a) Le-2 list, (b) Le-3 list, (c) Le-1 list, (d) Le-5 list, (e) Le-4 - plod i (f) kontrola

Dobijeni rezultati testa patogenosti su u saglasnosti sa rezultatima koje navode Sezer i Dolar (2015) i Vasić i sar. (2017). Karaca i Erper (2001) kao prouzrokovачa plamenjače na orahu i leski u Turskoj navode vrstu *Pestalotiopsis guepinii*. U Iranu, kao patogen lišća i grana leske Mir Hosseini Moghaddam i Taherzadeh (2007) opisuju vrstu *Pestalotiopsis macrospora*.

ZAKLJUČAK

U radu su prikazani preliminarni rezultati proučavanja morfoloških i patogenih osobina gljiva iz roda *Pestalotiopsis* izolovanih sa lista i grana leske. S obzirom na činjenicu da leska postaje sve značajnija kultura u voćarstvu Srbije i da se površine pod leskom rapidno povećavaju, neophodno je intenzivirati istraživanja prisutnih prouzrokovачa bolesti leske. U ovom radu opisana je jedna od fitopatogenih gljiva koja u našoj zemlji potencijalno može prouzrokovati značajne ekonomske štete na leski.

Do sada u Srbiji nije bilo značajnijih i obimnih istraživanja patogena leske i treba očekivati da buduća istraživanja obuhvate proučavanja gljivičnih prouzrokovaca bolesti leske kao i iznalaženja načina njihove efikasne kontrole.

ZAHVALNICA

Rad je finansiran sredstvima Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije – evidencioni brojevi ugovora o finansiranju: 451-03-68/2020-14/200215 i 451-03-9/2021-14/200215.

LITERATURA

- Anonymous (2004): Certification scheme for hazelnut. EPPO Bulletin, 34 (2), 149-153.
- Arzanlou, M., Torbati, M., Khodaei, S., Bakhshi, M. (2012): Contribution to the knowledge of pestalotioid fungi of Iran. Mycosphere, 3 (5), 871-878.
- Cappelli, R., Pisi, A., Prodi, A., Cavina, F., Vibio, M., Nipoti, P. (2015): First report of *Pestalotiopsis* in Hazelnut in Italy. Journal of Plant Pathology, 97 (Supplement), S30-S31.
- Dhingra, O.D., Sinclair, J.B. (1995): Basic Plant Pathology Methods, second edition. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, USA.
- INC (2020): Nuts and dried fruits. Statistical yearbook 2019/2020. https://www.nutfruit.org/files/tech/1594640174_INC_Statistical_Yearbook_2019-2020.pdf
- Karaca, G.H., Erper, I. (2001): First report of *Pestalotiopsis guepinii* causing twig blight on hazelnut and walnut in Turkey. Plant Pathology, 50, 415-415.
- Keserović, Z., Magazin, N., Kurjakov, A., Dorić, M., Gošić, J. (2014): Census of agriculture 2012. Fruit growing. Statistical office of the Republic of Serbia, Belgrade, Serbia.
- Liu, A.R., Xu, T., Guo, L.D. (2007): Molecular and morphological description of *Pestalotiopsis hainanensis* sp. nov., a new endophyte from a tropical region of China. Fungal Diversity, 24: 23-36.
- Maharachchikumbura, S.S.N., Guo L.D., Chukeatirote, E., Bahkali, A.H., Hyde, K.D. (2011): *Pestalotiopsis*—morphology, phylogeny, biochemistry and diversity. Fungal Diversity, 50, 167-187.
- Maharachchikumbura, S.S.N., Hyde, K.D., Groenewald, J.Z., Xu, J. and Crous, P.W. (2014): *Pestalotiopsis* revisited. Studies in Mycology, 79, 121-186.
- Mir Hosseini Moghaddam, S.A., Taherzadeh, M.R. (2007): Isolated fungi from hazelnut, their damage and economic importance in Guilan province. Iranian Journal of Forest and Range Protection Research, 5 (1), 98.
- Obradović, A., Ivanović, M., Čalić, A. (2010): Bakterioze leske u svetu i kod nas. Biljni lekar, 38 (3), 192-201.
- Sezer, A., Dolar, F.S. (2015): Determination of *Pestalotiopsis* sp. causing disease on fruit clusters in hazelnut growing areas of Ordu, Giresun and Trabzon provinces in Turkey. Agriculture & Forestry, 61: 183-188.
- Teviotdale, B.L., Michailides, T.J., Pscheidt, J.W. (2002): Compendium of nut crop diseases in temperate zones. American Phytopathological Society, USA.
- Vasić, T., Jevremović, D., Krnjaja, V., Leposavić, A., Andjelković, S., Živković, S., Paunović, S. (2017): Short communication: Morphological description and molecular detection of *Pestalotiopsis* sp. on hazelnut in Serbia. Spanish Journal of Agricultural Research, 15, 3, e10SC02.
- Wei, J.G., Xu, T., Guo, L.D., Liu, A.R., Zhang, Y., Pan, X.H. (2007): Endophytic *Pestalotiopsis* species associated with plants of *Podocarpaceae*, *Theaceae* and *Taxaceae* in southern China. Fungal Diversity, 24, 55-74.

Abstract

MORPHOLOGICAL AND PATHOGENIC CHARACTERIZATION OF *Pestalotiopsis* spp. PATHOGEN OF HAZELNUT IN SERBIA

Tanja Vasić¹, Darko Jevremović², Sonja Filipović¹, Jordan Marković³, Sanja Živković¹, Aleksandar Leposavić²

¹Faculty of Agriculture in Kruševac, University of Niš,
Kosančićeve 4, 37000 Kruševac

²Fruit Research Institute, Kralja Petra I 9, 32000 Čačak

³Institute for Forage Crops, 37251 Globoder, Kruševac

E-mail: vasic.tanja@ni.ac.rs

Hazelnut (*Corylus avellana* L.) is an economically very important fruit species cultivated in many countries. The world's largest producer and exporter of hazelnuts is Turkey. In Serbia, compared to other types of fruit, hazelnuts are grown on significantly smaller areas. In the last decade, hazelnut has become more interesting for the producers and there is a growing trend of increase of areas under this crop. Hazelnut is the host of numerous pathogens and pests that can cause significant economic damage in orchards. To date, there has been no comprehensive research on the causes of hazelnut diseases in Serbia, and the goal of our work was to determine the causes of some fungal diseases.

In the period from 2017 to 2020, samples of hazelnut leaves and branches with symptoms of necrotic spotting were collected from a large number of plantations in Serbia. A large number of isolates were isolated from the collected samples for further determination. Based on the morphological and pathogenic properties of the isolates, the presence of phytopathogenic fungi from the genus *Pestalotiopsis* was determined.

Keywords: *Corylus avellana* L., necrotic spots, *Pestalotiopsis* spp.