

Zaštita bilja  
Vol. 65 (3), N°289, 111-116, 2014, Beograd  
Plant Protection  
Vol. 65 (3), N°289, 111-116, 2014, Belgrade

UDK: 633.887-153  
632.482.31  
Naučni rad  
Scientific paper

## **FUSARIUM SPP. - PATOGENI SEMENA NEVENA (*Calendula officinalis* L.) U SRBIJI**

DANIJELA RISTIĆ, SNEŽANA PAVLOVIĆ, NENAD TRKULJA,  
ERIKA PFAF DOLOVAC, NENAD DOLOVAC, MIRA STAROVIĆ

Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Beograd  
e-mail: risticdaca@yahoo.com

### REZIME

Tokom 2013. godine, na dva lokaliteta komercijalne proizvodnje nevena u Pančevu i Plandištu, prikupljeno je 14 uzoraka zaraženog semena gajenog nevena i analizirano na prisustvo fitopatogenih gljiva. U svim uzorcima semena, ustanovljena je slabija klijavost i značajan stepen zaraze fitopatogenim gljivama iz roda *Fusarium*, 2-8%. Iz zaraženog semena izolovane su monosporijalne kulture, čija je patogenost potvrđena pojavom simptoma na veštački inokulisanim klijancima nevena, a na osnovu morfoloških svojstava identifikovane su kao *Fusarium verticillioides* i *Fusarium* cf. *incarnatum*. Molekularna detekcija obavljena je primenom PCR i amplifikacije proteinskog gena TEF-1 $\alpha$ . Dalja istraživanja obuhvatiće primenu molekularne identifikacije, do nivoa vrste uz određivanje tačnog taksonomskog mesta izolata iz Srbije patogenih za neven poređenjem sa drugim izolatima i vrstama roda *Fusarium* spp. u svetu.

**Ključne reči:** *Fusarium* spp., molekularna detekcija, morfološke osobine, test patogenosti, neven

### UVOD

Neven (*Calendula officinalis* L., fam. Asteraceae) je poznata lekovita biljka mediteranskog područja koja se, kao ukrasna biljka, često gaji i širom Evrope. Neven od davnina ima višestruku upotrebu u narodnoj medicini gde se koristi kao lekovito sredstvo, ispoljavajući značajno antibakterijsko i antivirno dejstvo. Upotreba biljnih ekstrakata nevena u biološkoj kontroli mnogih biljnih patogena intenzivno se ispituje i pokazuje obećavajuće rezultate. Iako se neven koristi kao lekovito sredstvo, kao i svaka biljna vrsta, osetljiv je na više prouzrokovala biljnih bolesti. Mnoge biljne bolesti mogu značajno smanjiti kvalitet i prinos cvetova nevena, ali najznačajnije su fitopatogene gljive iz rodova: *Alternaria*, *Fusarium*, *Sphaerotheca*, *Botryotinia*, *Peronospora* i *Phytophthora*. Mikopopulacija semena lekovitih biljaka je brojna, a vrste iz rodova *Alternaria* i *Fusarium* uglavnom prevladavaju (Pavlović i Dražić, 2000; Pavlović i sar., 2000; Pavlović, 2001; Pavlović i sar., 2006; Pavlović i sar., 2007; Starović i sar., 2012). Međutim, za razliku od široko gajenih poljoprivrednih, ukrasnih i drugih biljaka, o bolestima nevena ima malo podataka u literaturi. Na nevenu u Srbiji ustanovljeno je prisustvo

*Alternaria alternata* (Ristić i sar., 2011) i *Fusarium* cf. *incarnatum* (Ristić i sar., 2011a).

Osnovni cilj sprovedenih istraživanja bio je da se izolati iz semena nevena identifikuju primenom konvencionalnih metoda, proučavanjem morfoloških svojstava, kao i primenom molekularnih metoda detekcije, amplifikacijom kodirajućeg proteinskog gena TEF-1 $\alpha$ , što predstavlja uvođenje novih perspektiva u proučavanje fitopatogenih gljiva iz semena nevena u Srbiji.

### MATERIJAL I METODE

#### Sakupljanje uzoraka semena nevena i izolacija patogena

Tokom 2013. godine, na dva lokaliteta komercijalne proizvodnje nevena u Vojvodini, Pančevu i Plandištu (Južno Banatski okrug), prikupljeno je 14 uzoraka zaraženog semena gajenog nevena. Seme svakog uzorka (100 semena x četiri ponavljanja) ispirano je 2 h pod mlazom česmenske vode, površinski sterilisano u 2% rastvoru natrijum-hipohlorita (NaOCl, komercijalna varikina) u trajanju od 2 min i ispirano dva puta u sterilnoj vodi (Singh et al. 1991). Površinski sterilisa-

no seme nanošeno je na podlogu krompir-dekstrozni agar (potato dextrose agar, PDA) i inkubirano sedam dana pri 25°C i fotoperiodu od 12 h. Kolonije koje su se razvile oko semena nakon inkubacije preliminarno su identifikovane do nivoa roda na osnovu makroskopskih i mikroskopskih svojstava, što je poslužilo za određivanje nivoa zaraze i učestalosti njihovog prisustva. U cilju dobijanja čistih kultura, nakon sedam dana razvoja inicijalnih kolonija izvršena je monosporijalna izolacija gljiva na novu PDA podlogu.

### Provera patogenosti

Test provere patogenosti svih dobijenih monosporijalnih izolata obavljen je u uslovima staklenika na klijancima nevena u fazi nicanja. Inokulacija biljaka obavljena je zalivanjem suspenzijom konidija ( $1 \times 10^6$  konidija/ml) pripremljene od kultura odabranih izolata starih sedam dana, koje su odgajane na PDA podlozi pri temperaturi od 25°C i fotoperiodu od 12 h. Sa 10 ml tako pripremljene supenzije od svakog izolata inokulisano je po 5 biljaka, a kao negativna kontrola korišćeni su klijanci nevena u sterilnom zemljištu bez supenzije spora. U cilju obezbeđenja uslova povišene vlažnosti, biljke su po inokulaciji pokrivane PVC folijom koja je nakon dva dana uklonjena. Pojava simptoma praćena je svakodnevno do 14 dana posle inokulacije.

### Morfološke karakteristike

Identifikacija na osnovu morfoloških makroskopskih i mikroskopskih svojstava obavljena je na hranljivim podlogama prema kriterijumima Summerell et al. (2003). Proučavanje makroskopskih svojstava obuhvatilo je praćenje brzine rasta, izgleda kolonije, lučenje pigmenata na PDA podlozi i formiranje plodonosnih tela. Ispitivanje mikroskopskih svojstava reproduktivnih organa obuhvatilo je utvrđivanje tipa konidiofora ili fialida, oblika i dimenzija makrokonidija, kao i prisustva ili odsustva mikrokonidija i hlamidospora prema metodi Burgess et al. (1994). Kulture izolata starosti 10-14 dana, odgajane na selektivnu podlogu sa sterilnim fragmentima lista karanfila (carnation leaf piece agar, CLA) pri 25°C i fotoperiodu od 12 h direktno su mikroskopirane i prosekom obračunatim za najmanje 100 ponovljenih merenja, određivana je dužina i širina konidija.

### Molekularna detekcija

Metoda lančane reakcije polimeraze (polymerase chain reaction, PCR) primenjena je u cilju molekularne detekcije i identifikacije *Fusarium* spp. poreklom iz semena nevena i potvrde rezultata dobi-

jenih konvencionalnim metodama. Za ova ispitivanja odabrana su dva izolata N1 (Pančevo) i N2 (Plandište) dobijena iz zaraženog semena nevena kojima je potvrđena patogenost, a koja su prethodno okarakterisana na morfološkom nivou. Ekstrakcija ukupne DNK obavljena je iz micelije čiste kulture patogena odgađenog na tečnoj PB (potato broth) podlozi, korišćenjem komercijalnog kita DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany), po uputstvu proizvođača. PCR reakcija obavljena je sa parom prajmera EF1/EF2 (Geiser et al. 2004) koji omogućavaju selektivno umnožavanje kodirajućeg proteinskog gena TEF-1 $\alpha$ . PCR reakcija obavljena je u radnoj zapremini od 25  $\mu$ l, korišćenjem 12,5  $\mu$ l 2X PCR Master miksa (Fermentas, Lithuania), 9  $\mu$ l RNase-free vode, po 1,25  $\mu$ l svakog prajmera (100 pmol/ $\mu$ l) i 1  $\mu$ l 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 1 min na 94°C, hibridizacije 1 min s na 55°C, elongacije 2 min na 72°C, praćeno finalnom elongacijom na 72°C u trajanju od 10 min.

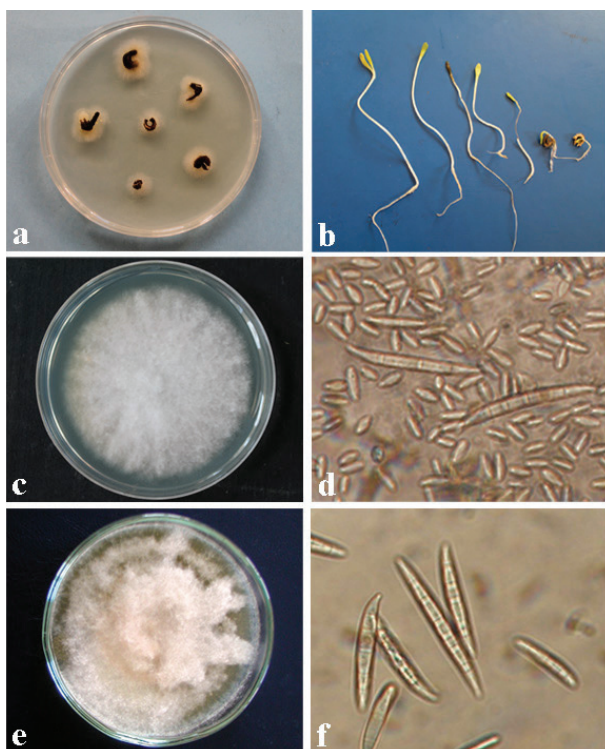
Vizuelizacija umnoženih produkata PCR reakcija obavljena je elektroforetskim razdvajanjem nukleinskih kiselina u 1% agaroznom gelu u 1 x TBE puferu, bojenjem Midori Green DNA Stain (Nippon Genetics) i posmatranjem pod UV-transiluminatorom. Za određivanje veličine umnoženog amplikona korišćen je marker MassRuler™ DNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences GmbH, Lithuania). Pozitivnom reakcijom smatrana je pojava traka produkta očekivane veličine oko 700 bp.

## REZULTATI I DISKUSIJA

### Izolacija patogena, provera patogenosti i konvencionalna identifikacija

Tokom pregleda 14 uzoraka semena poreklom iz komercijalnih useva nevena u Pančevu i Plandištu 2013. godine, ustanovljen je značajan stepen zaraze fitopatogenim gljivama iz roda *Fusarium*, 2-8%. Sličan nivo zaraze semena nevena sa *Fusarium* (2-6%) zabeležen je od strane Ristić i sar. (2011b). Prilikom izolacije, na osnovu morfoloških karakteristika izdvojeno je 19 monosporijalnih izolata (Slika 1a), poreklom iz svih 14 uzoraka semena, a koji su po morfološkim karakteristikama odgovarali vrstama roda *Fusarium*.

U uslovima veštačke inokulacije klijanaca nevena reprodukovani su simptomi prirodne infekcije. U početku razvoja simptoma uočene su jasno vidljive promene boje vaskularnog tkiva i primarnog kore-

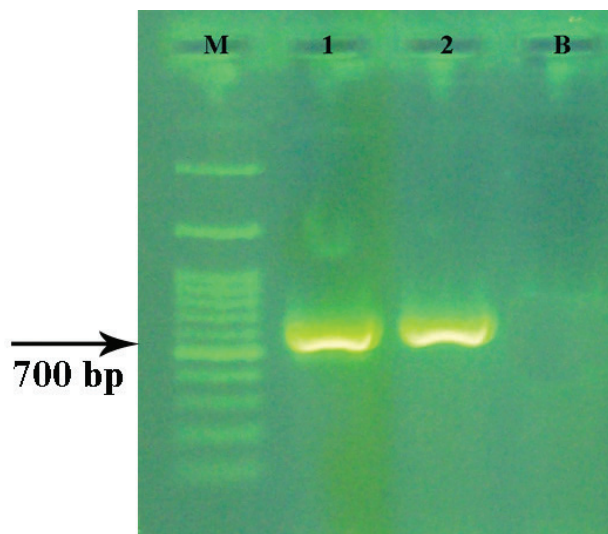


**Slika 1.** *Fusarium* spp: a) izolacija patogena iz semena na PDA; b) veštački zaraženi klijanci nevena; c) Izolat N1: izgled kolonije; d) makro- i mikrokonidije; e) Izolat N2: izgled kolonije; f) makrokonidije.

**Figure 1.** *Fusarium* sp p: a) isolation of the pathogen from seed on PDA media; b) artificially inoculated calendula seedlings; c) isolate N1: appearance of colonies; d) macro- and microconidia; e) isolate N2: appearance of colonies; f) macroconidia.

na i to 3-5 dana nakon inokulacije. Već nakon pet dana od inokulacije došlo je do sušenja kotiledona, usporenog rasta i zakržljavanja klijanaca (Slika 1b). Iz svih inokulisanih biljaka nevena sa simptomima, uspešno je izvršena reizolacija patogena primenom istih metoda kao i pri izolaciji. Na biljkama koje su kao negativna kontrola tretirane sterilnom vodom umesto suspenzijom konidija, nije došlo do pojave simptoma, niti bilo kakvih promena.

Nakon provere patogenosti, pristupilo se preliminarnoj morfološkoj karakterizaciji svih monosporijalnih izolata koji su ispoljili različita svojstva. Proučavana morfološka svojstva izolata *Fusarium* spp. izolovanih iz semena nevena u Srbiji, pružila su stabilnu mogućnost za njihovo razlikovanje. Kako vrste roda *Fusarium* variraju u morfološkim svojstvima, naročito po obliku i veličini makrokonidija, načinu obrazovanja mikrokonidija, obrazovanju hlamidospora ili boji kolonija, u istraživanja su uključene dve hranljive podloge u cilju proučavanja njihove promenljivosti. Za detaljno proučavanje morfoloških svojstava odabrana su dva reprezentativna



**Slika 2.** Elektroforetska analiza PCR proizvoda dobijenih korišćenjem para prajmera EF1/EF2. Kolone: M- MassRuler™DNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences GmgH, Lithuania); 1- izolat N1; 2- izolat N2; B-negativna kontrola (PCR smeša sa Rnase-free vodom).

**Figure 2.** Electrophoretic analysis of PCR products obtained using primer pair EF1/EF2. Lanes: M - Mass-Ruler™DNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences GmgH, Lithuania); 1 - isolate N1; 2 - isolate N2; 3 - negative control (PCR mix with Rnase-free water).

izolata N1 i N2 čije kolonije odgovaraju opisu fitopatogenih gljiva roda *Fusarium*. Kolonije reprezentativnog izolata N1 koji je ukazao na sličnost sa vrstom *F. verticillioides*, ispoljile su brz i ravnomeran porast na PDA podlozi dostižući prečnik od 8 cm nakon sedam dana inkubacije pri 25°C. Vazдушna micelija je gusta, pamučasta, bele ili sivkastoljubičaste boje (Slika 1c). Na CLA podlozi makrokonidije su prave do umereno srpaste, tankih zidova, duge i uske sa 3-5 poprečnih pregrada, veličine 21,5-77,0 x 4,0-4,5 μm. Vršne ćelije su neznatno sužene i savijene, dok su bazalne karakterističnog oblika stopala. Mikrokonidije su obrazovane iz monofijalida u vidu dužih ili kraćih nizova, ređe lažnih glavica. Mikrokonidije su obično jednoćelijske, hijalinske, oblika palice, najčešće neseptirane, ili sa 1-2 poprečne pregrade, veličine 11,0-17,5 x 3,7-3,8 (Slika 1d). Prisustvo hlamidospora nije ustanovljeno. Prisustvo vrste *F. verticillioides*, do sada, je utvrđeno na belom slezu, kantarionu, žutoj lincuri, žalfiji i bosiljku u Srbiji (Pavlović i sar., 2007a; Pavlović i sar., 2010; Starović i sar., 2012).

Kolonije reprezentativnog izolata N2 koji je morfološki sličan sa vrstom *F. cf. incarnatum*, ispoljile su brz i ravnomeran porast na PDA podlozi, prečnika 7 cm nakon sedam dana inkubacije pri 25°C. Vazдушna micelija je obilna, pamučasta, bela, žutosmeđa do narandžasta, blago talasastih ivica (Slika 1e). Kulture izolata su nakon pet dana razvoja na CLA podlozi formirale makrokonidije, vretenasto-kopljaste, blago savijene postepeno sužene prema krajevima sa 3-5 poprečnih pregrada, dimenzija 20,5-62,0 x 3,5-4,1 µm. Makrokonidije se formiraju na polifijalidama u narandžastim sporodohijama i na micelliji nakon četiri dana inkubacije (Slika 1f). Sve morfološke makroskopske i mikroskopske osobine u potpunoj su saglasnosti sa rezultatima navedenim u literaturi (Aoki & O'Donnell, 1999; Schmale et al., 2005, 2006; Lević, 2008).

### Molekularna detekcija

Molekularna metoda PCR uspešno je primenjena za detekciju ispitivanih izolata *Fusarium* spp. uz korišćenje prajmera EF1/EF2. Kod odabranih izolata N1 i N2 uspešno je došlo do amplifikacije proteinskog gena za TEF-1α uz prisustvo trake procenjene veličine oko 700 bp (Slika 2). U svim reakcijama do amplifikacije nije došlo kod negativne kontrole (PCR smeša sa RNase free vodom).

Zbog visoke osetljivosti i specifičnosti, molekularne metode predstavljaju značajno poboljšanje u dijagnostici oboljenja koje prouzrokuju fitopatoge-

ne gljive. PCR metoda koju odlikuje jednostavnost i velika pouzdanost postala je jedna od vodećih i najčešće korišćenih metoda u detekciji fitopatogenih gljiva. Univerzalni prajmeri EF1/EF2 koji amplifikuju barkoding region TEF-1α gena kod svih poznatih vrsta roda *Fusarium* (Summerell et al., 2003; Geiser et al., 2004; Kristensen et al., 2005), pokazali su se pogodnim za identifikaciju ispitivanih izolata, kao i kod mnogih drugih rodova fitopatogenih gljiva.

Bez obzira što je u literaturi opisano da biljke nevena ispoljavaju negativno delovanje na razvoj brojnih rodova gljiva, uključujući i neke vrste iz roda *Fusarium*, rezultati dobijeni u ovom radu pokazuju da postoje genotipovi u populaciji ovih gljiva koji mogu da ugroze semensku proizvodnju nevena. Brz razvoj simptoma na inokulisanim klijancima i propadanje biljaka ukazuju da je potrebno obratiti pažnju na zdravstveno stanje semena nevena. Mada su navodi o bolestima nevena uopšte, pa i onim izazvanim gljivama iz roda *Fusarium* malobrojni, naročito u Srbiji (Ristić i sar., 2011a,b), ipak se ove gljive nalaze na vrhu liste značajnih prouzrokovaca bolesti nevena i identifikovane su u prirodnim zaražama u svetu (Dogra et al., 1978; Narayanappa and Soli, 1985; Popenoe, 1989).

### ZAHVALNICA

Ova istraživanja finansirana su u okviru Projekta TR 31018 Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

### LITERATURA

- Aoki, T., O'Donnell, K. (1999): Morphological characterization of *Gibberella coronicola* sp. nov., obtained through mating experiments of *Fusarium pseudograminearum*. *Mycoscience*, 40: 443-453.
- Burgess, L. W., Summerell, B. A., Bullock, S., Gott, K. P., Backhouse, D. (1994): *Laboratory Manual for Fusarium Research*, 3rd ed. University of Sydney/Royal Botanic Gardens, Sydney, Australia.
- Dogra, J. V. V., Singh, P. L., Shrivastava, A. I. C. (1978): Wilt disease of *Calendula officinalis* - a new record from India. *Current Science*, 48: 120.
- Geiser, D. M., Jimenez Gasco, M. M., Kang, S., Mkalowska, I., Veeraraghavan, N., Ward, T. J., Zhang, N., Kulda, G. A., O'Donnell, K. (2004): FUSARIUM-IDv1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *European Journal of Plant Pathology*, 110: 473-479.
- Kristensen, R., Torp, M., Kosiak, B., Holst-Jensen, A. (2005): Phylogeny and toxigenic potential is correlated in *Fusarium* species as revealed by partial translation elongation factor 1 alpha gene sequences. *Mycological Research*, 109: 173-186.
- Lević, J. (2008): Vrste roda *Fusarium* u oblasti poljoprivrede, veterinarske i humane medicine. Cicero, Beograd, 1226.

- Narayanappa, M., Sohi, H.S. (1985): Seed mycoflora of marigold and its control. *Indian Journal of Mycology and Plant Pathology*, 15: 283-286.
- Pavlović, S. (2001): Paraziti prouzrokovajući bolesti semena matičnjaka (*Melissa officinalis* L.). *Lekovite sirovine*, 20: 51-56.
- Pavlović, S., Dražić, S. (2000): Microflora of chamomile seeds *ŠChamomila recutita* (L.) Rausch.Ć, Proceedings from the First Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries, Arandelovac, pp. 269-274.
- Pavlović, S., Dražić, S., Ivanović, M. (2000): Microflora of St. John's wort seeds. Proceedings from the First Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries, Arandelovac, pp. 339-346.
- Pavlović, S., Dražić, S., Jevdović, R., Poštić, D. (2006): Fungi on Sage seed in Serbia and their effect to seed germination. Proceedings of 4th Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries, Jasi-Romania, pp. 210-213.
- Pavlović, S., Stojšin, V., Stojanović, S. (2007): Vrste iz roda *Fusarium* na lekovitom bilju. IX Simpozijum o flori jugoistočne Srbije i susednih područja. Niš, Zbornik rezimea, str.16.
- Pavlović, S., Stojšin, V., Stojanović, S. (2007a): Mycopopulation of marshmallow (*Althaea officinalis* L.). *Zbornik Matice srpske za prirodne nauke*, 113: 193-202.
- Pavlović, S., Vuković, G., Stojanović, S., Stević, T., Starović, M. (2010): *Fusarium verticillioides* on medicinal plants in Serbia. Abstracts Book of 6<sup>th</sup> CMAPSEEC in Pharmacognosy Magazine, 6: S41-S42.
- Popenoe, J. (1989): Key Plants/Key Pests. Commercial Horticulture – Woody Ornamentals, County Extension Service.
- Ristić, D., Stanković, I., Vučurović, A., Berenji, J., Miličević, T., Krstić, B., Bulajić, A. (2011): Flower necrosis of *Calendula officinalis* L. caused by *Alternaria alternata*. Abstracts book of Symposium Power of Fungi and Mycotoxins in Health and Disease, Primošten, Croatia, pp. 52.
- Ristić, D., Stanković, I., Vučurović, A., Berenji, J., Miličević, T., Krstić, B., Bulajić, A. (2011a): Seed-borne infection of *Calendula officinalis* L. with *Fusarium* cf. *incarnatum*. Abstracts book of 7<sup>th</sup> Balkan Congress for Microbiology, Beograd.
- Ristić, D., Stanković, I., Vučurović, A., Nikolić, D., Miličević, T., Krstić, B., Bulajić, A. (2011b): Gljive iz roda *Fusarium* kao patogeni nevena (*Calendula officinalis* L.). Zbornik rezimea XI Savetovanja o zaštiti bilja, Zlatibor, str. 62-63.
- Schmale, D. G., III, Leslie, J. F., Zeller, K. A., Saleh, A. A., Shields, E. J., Bergstrom, G. C. (2006): Genetic structure of Atmospheric populations of *Gibberella zeae*. *Phytopathology* 96: 1021-1026.
- Schmale, D. G., Shah, A. A., Bergstrom, G. C. (2005): Spatial patterns of viable spore depositions of *Gibberella zeae* in wheat fields. *Phytopathology*, 95: 472-479.
- Singh K, Frisvad JC, Thrane U, Mather SB (1991): An Illustrated Manual on Identification of Some Seed-borne *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* and their mycotoxins. Jordbugsforlaget Frederiksberg, Denmark, pp. 133.
- Starović, M., Pavlović, S., Stojanović, S., Stević, T., Kuzmanović, S., Popović, T., Jošić, D. (2012): Mycopopulation of basil seeds. Proceedings of 7th Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries (7th CMAPSEEC), Subotica, Serbia, pp. 303-308.
- Summerell, B. A., Salleh, B., Leslie, J. F. (2003): A utilitarian approach to *Fusarium* identification. *Plant Disease*, 87: 117-128.

(Primljeno: 17.11.2014.)  
(Prihvaćeno: 15.12.2014.)

## **FUSARIUM SPP. - PATHOGENS OF CALENDULA SEED (*Calendula officinalis* L.) IN SERBIA**

DANIJELA RISTIĆ, SNEŽANA PAVLOVIĆ, NENAD TRKULJA,  
ERIKA PFAF DOLOVAC, NENAD DOLOVAC, MIRA STAROVIĆ

*Institute for Plant Protection and Environment, Belgrade*  
*e-mail: risticdaca@yahoo.com*

### **SUMMARY**

During 2013, 14 samples of infected seed grown calendula were collected from two commercially grown crops in the localities in Pančevo and Plandište and analyzed for the presence of plant pathogenic fungi. In all samples of seeds, weaker germination and a significant seed infection ranging from 2-8%, with phytopathogenic fungi of the genus *Fusarium*, was found. From the infected calendula seed, monosporial cultures, based on morphology, were identified as *Fusarium verticillioides* and *Fusarium* cf. *incarnatum*, and their pathogenicity proved on artificially inoculated calendula seedlings. Molecular detection was performed by PCR and amplification of the TEF-1 $\alpha$  protein gene. Further studies will include molecular identification of this isolate to the species level, a definitive taxonomic determination of the Serbian isolate and a comparison with other isolates and species of *Fusarium* genus infecting calendula worldwide.

**Key words:** *Fusarium* spp., molecular detection, morphological properties, pathogenicity test, calendula

**(Received: 17.11.2014.)**

**(Accepted: 15.12.2014.)**