

ANTIFUNGALNA AKTIVNOST *PSEUDOMONAS CHLORORAPHIS* Q16 PREMA *SCLEROTINIA SCLEROTIORUM* POREKLOM SA RAZLIČITIH LEKOVITIH BILJAKA

ZORICA LEPŠANOVIĆ¹, MIRA STAROVIĆ², SNEŽANA PAVLOVIĆ, DRAGANA JOŠIĆ³

¹Institut za epidemiologiju, Vojnomedicinska akademija, Beograd

²Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Beograd

³Institut za zemljište, Beograd

e-mail: josicdragana@yahoo.com

REZIME

Fitopatogena gljiva *Sclerotinia sclerotiorum* je veoma destruktivni patogen stabla brojnih vrsta lekovitih biljaka. Kako u proizvodnji lekovitih biljaka nije dozvoljena upotreba pesticida, prisustvo ovog patogena prouzrokuje ozbiljne štete. Primena PGP (Plant Growth Promoting) bakterija, kao antagonista *S. sclerotiorum*, omogućuje zaštitu lekovitih biljaka. U ovim istraživanjima je ispitana aktivnost soja *Pseudomonas chlororaphis* Q16, pripadnika vrste koja spada među najefikasnije antagoniste *S. sclerotiorum*. Antifungalna aktivnost različitih frakcija kulture *P. chlororaphis* Q16 ispitivana je na 6 reprezentativnih izolata *S. sclerotiorum* poreklom sa različitih lekovitih biljaka: koprive, kima, belog sleza, odoljena i 2 vrste *Echinacea*. Najefikasnija je bila primena termostabilnih antifungalnih metabolita, frakcije koja je inhibirala porast micelije od 52,75% (izolata sa belog sleza) do 83,36% (izolata sa *E. purpurea*). Najujednačenija inhibicija porasta micelije ispoljena je primenom kultura starih 24^h: od 60,28% (izolata sa kima) do 76,47% (izolata sa koprive).

Ključne reči: *Pseudomonas chlororaphis*, *Sclerotinia sclerotiorum*, antifungalna aktivnost, lekovite biljke

UVOD

Gajenje lekovitih biljaka, kao i svih drugih biljaka, neminovno prati prisustvo različitih patogena. Imajući u vidu značaj lekovitih biljaka u lečenju ljudi, naročito je važno proizvesti ih bez prisustva patogena, posebno gljiva, jer one u velikoj meri redukuju prinos i remete sintezu sekundarnih metabolita (Singh i Dubez, 2012). Bolesti lekovitih biljaka su nedovoljno proučavane i pored značajnih šteta koje uzrokuju. Promene načina gajenja i berbe uvođenjem plantažne proizvodnje lekovitih biljaka dodatno su uticale na intenzivniju pojavu postojećih patogena, posebno onih sa širokim spektrom domaćina, kao što je *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, koja parazitira preko 400 biljnih vrsta (Gamlieel i sar., 1996; Pavlović i Stojanović, 2001; Szceponiek i Maruz, 2006). *S. sclerotiorum*, prouzrokovatelj bele truleži je najdestruktivniji patogen stabla

brojnih vrsta lekovitih biljaka. Velike štete nanosi naročito na *echinacea*, koprivi, odoljenu, kimu, a na belom slezu je 2000. godine u Banatu zabeležen napad koji je prepolovio prinos belog sleza (Stojanović i sar., 2006). Imajući u vidu ozbiljne štete koje uslovljava prisustvo ovog patogena, kao i činjenicu da u proizvodnji lekovitih biljaka nije dozvoljena upotreba pesticida, velike nade ulažu se u primenu antagonista u njihovoj zaštiti.

Rod *Pseudomonas* sadrži brojne vrste bakterija koje zauzimaju različite ekološke niše i ispoljavaju raznovrsne metaboličke osobine (Clarke, 1982). Među vrstama izolovanim iz zemljišta, mnoge funkcionišu kao rizobakterije koje stimulišu rast biljaka (PGPR – plant growth-promoting rhizobacteria). Ove vrste kolonizuju rizosfere biljaka i stimulišu rast svojih domaćina. Mehanizmi kojima to čine su različiti. Neke rizobakterije produkuju antibiotike

koji sprečavaju infekcije izazvane biljnim patogenima ili su antagonisti fitopatogenih organizama, dok druge direktno pomažu rast biljaka u odsustvu patogena, tako što fiksiraju azot, ili rastvaraju neke nutrijente kao što su mineralni fosfati.

Pseudomonas chlororaphis je nepatogena bakterija, koja ima važnu ulogu u supresiji patogena i stimulaciji rasta biljaka. Svoju biokontrolnu ulogu vrši tako što kolonizuje koren biljke i proizvodi razna inhibitorna jedinjenja koja deluju kao antifungalni metaboliti. Litički enzimi (proteaze, hitinaze, lipaze), N-acil-homoserin laktoni kao quorum-sensing molekuli, cijanovodonik, siderofore i antibiotici su najefikasniji metaboliti koji suprimiraju rast fitopatogena. Antibiotici fenazin-1-karboksilna kiselina (PCA) i 2-hidroksi-fenazin (2-OH-PHZ), 2,4 -DAPG, pirolinitrin i pioletorin ispoljavaju širok spektar aktivnosti prema raznim fitopatogenima koji napadaju biljke važne za ljudsku ishranu, kao što su žitarice, voće, povrće i lekovito bilje (Chin-A-Woeng, 2001; Haas i De'fago, 2005; Liu et al., 2007). Primena *P. chlororaphis* u borbi protiv fitopatogena smanjuje upotrebu hemijskih pesticida i doprinosi zaštiti okoline i ljudskog zdravlja.

Ohrabrujući rezultati su postignuti u biološkoj kontroli *S. sclerotiorum* na korenu pasulja, tretiranjem antagonistima iz roda *Erwinia* i *Bacillus* (Godoy et al., 1990; Huang et al., 1993; Yuen et al., 1994; Tu, 1997). Vrsta *P. chlororaphis* ispoljila je značajno inhibitorno dejstvo prema porastu micelije *S. sclerotiorum* i klijanju sklerocija i askospora u *in vitro* uslovima (Savchuk, 2002). U *in vivo* uslovima Fernando i saradnici (2007) su pokazali da *P. chlororaphis* sojevi inhibiraju klijanje askospora *S. sclerotiorum* na laticama uljane repice.

U ovom radu ispitano je delovanje različitih frakcija kulture autohtonog izolata *P. chlororaphis* Q16 na porast micelije *S. sclerotiorum* izolovane sa šest lekovitih biljaka: *Ehinacea angustifolia*, *E. purpurea*, kima, odoljena, koprive i belog sleza.

MATERIJAL I METODE

Izolacija *Sclerotinia sclerotiorum*

Uzorci obolelih biljaka koprive (*Urtica dioica*), kima (*Carum carvi*), belog sleza (*Althea officinalis*), odoljena (*Valeriana officinalis* L.) i dve vrste ehinacea (*Ehinacea angustifolia* i *E. purpurea*) kolekcionisani su iz plantažnog zasada Instituta za proučavanje lekovitog bilja "Dr Josif Pančić" u lokalitetu Pančevo, u periodu 2011-2013. god. Odabrano je 6 reprezentativnih izolata *S. sclerotiorum*, koji su

korišćeni u daljem radu (Tabela 1).

Izolati *S. sclerotiorum* korišćeni u ovim ispitivanjima izolovani su iz sklerocija obolelih biljaka, koje su prethodno površinski dezinfikovane potapanjem u 50% v/v natrijum hipohloritu i 70% alkoholu u trajanju od 4 minuta, a zatim jedan minut u sterilnoj vodi. Sklerocije su zatim nanošene na podlogu od krompir dekstroznog agara (PDA) i inkubirane 4 nedelje na 20°C. Sklerocije formirane u kulturi su izdvojene i čuvane na temperature od 10°C kao zalihe za dalja istraživanja.

Antagonizam *P. chlororaphis* Q16 prema *S. sclerotiorum*

Antagonistička aktivnost *P. chlororaphis* Q16 na porast micelije *S. sclerotiorum* ispitivana je na Waksmannovim pločama (WA). Ispitivan je efekat kulture *P. chlororaphis* Q16 posle kultivacije 24^h u koncentraciji 1x10⁷ cfu/ml („puna“ kultura-pk) (i), kao i pojedinačnih frakcija: ćelija bez ekstracelularnog sadržaja (tzv. „opranih“ ćelija-oc) (ii) i termostabilnih antifungalnih metabolita u supernatantu (tam) (iii). Bakterijske ćelije su izdvojene iz kulture standardizovane koncentracije centrifugiranjem na 13000 rpm u trajanju od 10 min, „oprane“ sukcesivnim resuspendovanjem u sterilnom fiziološkom rastvoru i centrifugiranjem (3 puta), i resuspendovane u početnoj zapremini sterilnog fiziološkog rastvora. Ekstracelularni termostabilni antifungalni metaboliti sadržani u supernatantu dobijeni su posle filtracije i inkubacije 30 min na 70°C.

Kultura *P. chlororaphis* Q16 i njene pojedinačne frakcije su zasejani po obodu, a micelija *S. sclerotiorum* u centar Petri kutuje. Ogled je postavljen u 8 ponavljanja. Kontrolne varijante su sadržale samo miceliju na WA.

Zona inhibicije porasta micelije merena je posle 5 i 10 dana od zajesavanja i inkubacije na 25°C (Nair and Anith, 2009). Procenat inhibicije micelije *S. sclerotiorum* izračunat je po formuli: Inhibicija = Š(Kontrola -Tretman)/Kontrola x 100 (Ogbebor and Adekunle, 2005).

Statistička analiza je izvršena putem analize varijanse (ANOVA) primenom softvera Statistica 12 (StatSoft, Tulsa). Poređenja između parova proseka su urađena pomoću Duncan-ovog ili Fisher-ovog testa na nivou značajnosti od 5% (Sokal and Rohlf, 1995). Različitim malim slovima su obeleženi tretmani koji se razlikuju po značajnosti.

REZULTATI

Prvi znaci bolesti u vidu bele truleži nadzemnih organa pojavili su se polovinom jula 2011.

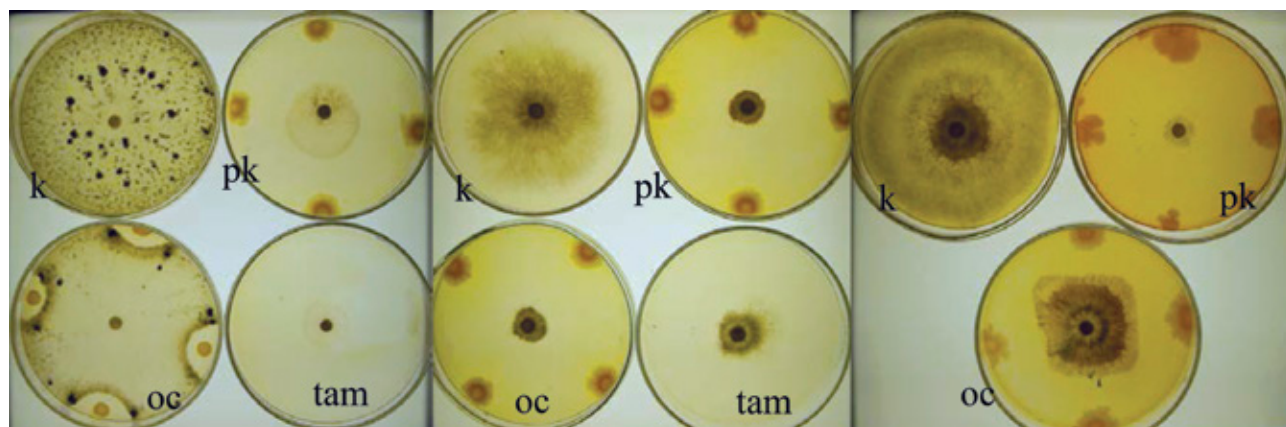
Tabela 1. Spisak reprezentativnih izolata *S. sclerotiorum*.
Table 1. List of representative isolates of *S. sclerotiorum*.

Izolati Isolate	Poreklo izolacije/ Origin of isolation		Godina Year
	Biljka domaćin Plant host	Biljni organ Plant organs	
<i>S. sc-Ko</i>	Kopriva (<i>Urtica dioica</i>)	Stablo	2011
<i>S. sc-Ki</i>	Kim (<i>Carum carvi</i>)	Stablo	2011
<i>S. sc-Bs</i>	Beli slez (<i>Althea officinalis</i>)	Cela biljka	2012
<i>S. sc-Od</i>	Odoljen (<i>Valeriana officinalis</i>)	Korenov vrat	2012
<i>S. sc-Ea</i>	Ehinacea (<i>Ehinacea angustifolia</i>)	Stablo i list	2013
<i>S. sc-Ep</i>	Ehinacea (<i>Ehinacea purpurea</i>)	Cela biljka	2013



Slika 1. *S. sclerotiorum*: bela trulež na *E. purpurea* (a), nekroza i izumiranje stabla i bočnih grana sa pojavom crnih sklerocija (b), i trulež korena i prizemnog dela stabla na belom slezu (c).

Figure 1. *S. sclerotiorum*: white stem rot on *E. purpurea* (a), necrosis of steem and root and formed sclerotinia (b), and necrosis of root and root crown on marshmallow (c).



Slika 2. Uticaj *P. chlororaphis* Q16 na porast *S. sclerotiorum* izolovane sa kima (*Carum carvi*) (a), belog sleza (*Althea officinalis*) (b) i odoljena (*Valeriana officinalis*) (c). k- kontrola; pk- „puna“ kultura (kultivacija 24^h); oc- „oprane“ ćelije; tam- termostabilni antifungalni metaboliti supernatanta.

Figure 2. Effects of *P. chlororaphis* Q16 on growth of *S. sclerotiorum* isolated from *Carum carvi* (a), *Althea officinalis* (b) and *Valeriana officinalis* (c). k- control; pk- „whole“ culture (cultivation 24^h); oc- „washed“ cells; tam- heat stable antifungal factors.

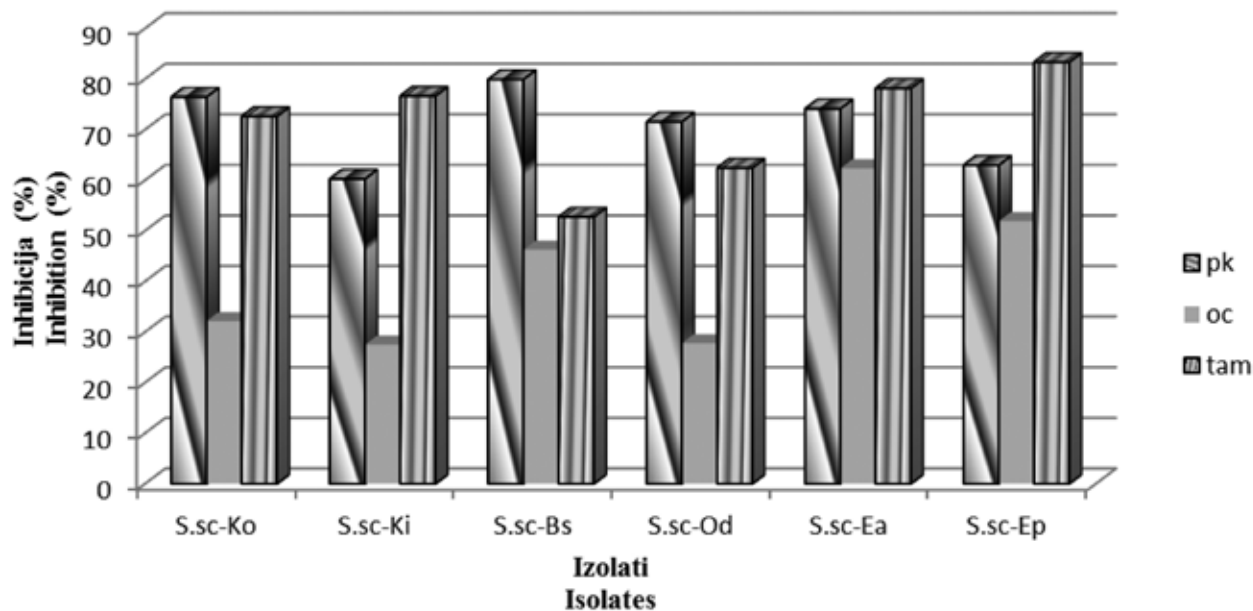
Tabela 2. Inhibicija porasta micelije *S. sclerotiorum* (%) poreklom sa različitih biljaka-domaćina delovanjem različitih frakcija kulture bakterije *Pseudomonas chlororaphis* Q16.

Table 2. Activity of various fractions of bacterial culture *Pseudomonas chlororaphis* Q16 on mycelial growth inhibition of *S. sclerotiorum* originating from different plant hosts.

Izolat <i>S.sclerotiorum</i> Isolate <i>S.sclerotiorum</i>	Frakcija kulture <i>P. chlororaphis</i> Q16 Fraction of <i>P. chlororaphis</i> Q16 culture		
	„Puna“ kultura (kultura stara 24 ^h) Whole culture (24 ^h grown culture)	„Oprane“ ćelije „washed“ cells	Termostabilni antifungalni metaboli Heat Stable Antifungal Factors
<i>S. sc-Ea</i>	74.14b	62.36a	78.16 b*
<i>S. sc-Ep</i>	62.99b	51.92a	83.36c
<i>S. sc-Ko</i>	76.47c	32.16a	72.65c
<i>S. sc-Ki</i>	60.28b	27.5a	76.67c
<i>S. sc-Bs</i>	79.94c	46.28a	52.75b
<i>S. sc-Va</i>	71.58c	27.8a	62.45b

*Vrednosti obeležene istim slovima po redovima ne razlikuju se statistički značajno ($P>0.05$).

* Means followed by a common letter within a rows are not significantly different ($P>0.05$).



Slika 3. Upporedna antifungalna aktivnost kulture (24^h) i njenih pojedinačnih frakcija bakterije *Pseudomonas chlororaphis* Q16 prema miceliji *Sclerotinia sclerotiorum* poreklom sa koprive, kima, belog sleza, odoljana i dve vrste ehinacea.

Figure 3. Comparative antifungal activity of 24^h old bacterial culture and its separate fractions of *Pseudomonas chlororaphis* strain Q16 to *Sclerotinia sclerotiorum* mycelia originating from nettle, cumin, marsh-mallow, caraway, valerian, and two types of Echinacea.

na koprivi i kimu, 2012. na belom slezu i odoljenu i 2013. na ehinacea vrstama u lokalitetu Pančevo. Stabljike zaraženih biljaka reaguju pojavom ovalnih, vlažnih pega koje su pokrivena bujnom belom

pamučnom micelijom. Nakon dve nedelje od pojave prvih simptoma, u okviru pega dolazi do formiranja lako uočljivih crnih sklerocija. Micelija gljive prstenasto obavija stabljiku, što dovodi do sušenja

bočnih grana. Vrlo brzo cela biljka se suši. Gljiva napada stabljiku, lišće i seme, a sklerocije su nađene i u korenovom vratu i srži stabla obolelih biljaka. U polju je lako prepoznati obolele biljke, jer su suve i pri dodiru biljka pada, tkivo u okviru pega postaje trulo, što prouzrokuje uništavanje sprovodnih sudova i prekid sprovođenja hranljivih materija (Slika 1).

Inhibitorno delovanje *P. chlororaphis* Q16 detektovano je kod svih reprezentativnih izolata *S. sclerotiorum*, nezavisno od njihovog porekla (Slika 2.). Stepenn supresije rasta detektovan posle 5 dana inkubacije zadržao se do kraja inkubacionog perioda.

Primenom ekstracelularne frakcije koja sadrži termostabilne antifungalne metabolite ostvaren je najviši stepen inhibicije porasta micelije izolata *S.sc-Ep* od 83,36%. Najslabiju efikasnost ispoljila je frakcija opranih ćelija, koja je ostvarila procenat inhibicije porasta micelije *S. sclerotiorum* od 27,5 (izolata sa kima) – 62,26% (izolata sa *E.angustifolia*). Najviša efikasnost ispoljena je primenom frakcije supernatanta sa termostabilnim antifungalnim metabolitima, koja je inhibirala porast micelije od 52,75 (izolata sa belog sleza) – 83,36% (izolata sa *E. purpurea*). Najjednačena inhibicija porasta micelije ispoljena je primenom kultura starih 24^h, sa vrednostima od 60,28 kod izolata sa kima do 76,47% kod izolata sa koprive.

Poređenjem razlika stepena inhibicije porasta micelije poreklom sa svih kultura ispoljene su statistički značajne i vrlo značajne razlike primenom frakcije termostabilnih antifungalnih metabolita i opranih ćelija u odnosu na primenu kultura starih 24^h (Tabela 2, Slika 3).

DISKUSIJA

Antifungalna aktivnost nekoliko autohtonih *Pseudomonas* izolata, uključujući i *P. chlororaphis* Q16, dokazana je *in vitro* prema fitopatogenoj gljivi *Alternaria tenuissima* izolovanoj sa artičoke (*Cynara cardunculus* L., Asteraceae) (Jošić i sar., 2012a) i *Echinacea purpurea* (Protolipac et al., 2012). Među antifungalnim metabolitima soja *P. chlororaphis* Q16 detektovana je značajna količina fenazinskih antibiotika (PCA i 2-OH-PCA) (Jošić i sar., 2012a). Ovaj soj proizvodi indol-sirćetnu kiselinu (IAA) koja je jedan od važnih činioca u stimulaciji rasta biljaka (Poštić i sar., 2013).

Brojni pripadnici vrste *P. chlororaphis* inhibiraju rast različitih fitopatogena, naročito gljiva. Soj *P. chlororaphis* YL-1, koji je izolovan iz korena soje, suprimira rast fitopatogena od velikog agronomskog značaja. Ovaj soj inhibira *in vitro*

kako bakterije- *Burkholderia glumae*, *Clavibacter michiganensis*, *Erwinia amylovora*, tako i gljive - *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani* i *Fusarium oxysporum*. Analizom genoma ovog soja utvrđeno je prisustvo gena uključenih u sintezu fenazina, pirolnitrina i cijanovodonika koji imaju važne uloge u biološkoj kontroli patogena (Liu et al., 2014). *P. chlororaphis* soj PA23 takođe vrši supresiju bolesti izazavane fitopatogenom gljivom *S. sclerotiorum*. Iako PA23 proizvodi difuzibilne antibiotike fenazin-1-karboksilnu kiselinu, 2-hidroksifenazin i pirolnitrin (PRN), koji suprimiraju *S. sclerotiorum*, primarni antibiotik odgovoran za biokontrolu ovog patogena je PRN, koji se sintetisuje u dvostruko većoj koncentraciji kod PHZ(-) mutanta, ali ne učestvuje u produkciji biofilma. PHZ, pored antibiotskog delovanja na rast *S. sclerotiorum*, deluju stimulatивно na formiranje biofilma (Poritsanos et al., 2006; Selin et al., 2010). Među sekundarnim metabolitima koje ovaj soj sintetisuje su litički enzimi- lipaze i proteaze, cijanovodonik i siderofore koji doprinose antagonizmu prema *S. sclerotiorum* (Poritsanos et al., 2006; Zhang et al., 2006; Selin et al., 2010). Eksperimenti u polju su potvrdili da *P. chlororaphis* PA23 efikasno sprečava trulež stabljike uljane repice izazvanu *S. sclerotiorum* (Fernando et al., 2007; Savchuk and Dilantha Fernando, 2004).

U *in vivo* eksperimentima sa *P. chlororaphis* Q16, izvedenim u gnotobiotičkim uslovima, potvrđena je supresija bolesti izazvana gljivom *A. tenuissima* na različitim lekovitim biljkama. Redukcija infekcije tretiranjem biljaka sojem *P. chlororaphis* Q16 kod artičoke iznosila je 43.33% (Jošić i sar., 2012a), dok je kod bosiljka (*Ocimum basilicum* L.) dostizala 86,5% (Jošić i sar., 2012b). Ovi rezultati ukazuju na različit stepen osetljivosti svakog izolata *A. tenuissima* prema antifungalnim metabolitima istog antagonista.

Efekat inhibicije rasta micelija 6 izolata *S. sclerotiorum* različitog porekla uslovljen delovanjem PGP bakterije *P. chlororaphis* Q16, a naročito primena termostabilnih antifungalnih metabolita sa intervalom inhibicije od 52,75 (*S. sc-Bs*) do 83,36% (*S. sc-Ep*), otvara mogućnosti za dalje testiranje ovog soja u kontrolisanim uslovima i pri pojavi infekcije *S. sclerotiorum* u polju.

ZAHVALNICA

Ova istraživanja finansirana su u okviru Projekta III46007 Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

LITERATURA

- Chin-A-Woeng, T. F. C., van den Broek, D., de Voer, G., van der Drift, K. M., Tuinman, S., Thomas-Oates, J. E., Lugtenberg, B. J. J., Bloemberg, G. V. (2001): Phenazine-1-carboxamide production in the biocontrol strain *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 is regulated by multiple factors secreted into the growth medium. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 14: 969–979.
- Clarke, P. H. (1982): The metabolic versatility of pseudomonads. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 48(2): 105-130.
- Fernando Dilantha, W. G., Nakkeeran, S., Zhang, Y., Savchuk, S. (2007): Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary by *Pseudomonas* and *Bacillus* species on canola petals. *Crop Protection*, 26: 100-107.
- Gamliel, A., Katan, T., Yunis, H., Katan, J. (1996): Fusarium wilt and crown rot of sweet basil: Involvement of soilborne and airborne inoculum. *Phytopathology*, 86: 56-62.
- Godoy, G., Steadman, J. R., Yuen, G. (1990): Bean blossom bacteria have potential for biological control of wite mold disease cauded by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Annu. Rep. Bean. Improv.Coop.*, 33: 45-46.
- Haas, D., De' fago, G. (2005): Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nat. Rev. Microbiol.*, 3: 307-319.
- Huang, H. C., Kokko, E. G. I., Yanke, J., Phillippe, R. C. (1993): Bacterial suppression of basal pod rot and end rot of dry peas caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Can. J. Microbiol.*, 39: 227-233.
- Jošić, D., Protolipac, K., Starović, M., Stojanović, S., Pavlović, D., Miladinović, M., Radović, S. (2012a): Phenazines Producing *Pseudomonas* Isolates Decrease *Alternaria tenuissima* Growth, Pathogenicity and Disease Incidence on Cardoon. *Arch. Biol. Sci., Belgrade*, 64(4): 1495-1503.
- Jošić, D., Pavlović, S., Starović, M., Stojanović, S., Stanojković-Sebić, A., Pivić, R. (2012b): Biocontrol of *Alternaria tenuissima* originated from *Ocimum basilicum* L using indigenous *Pseudomonas* spp. Strains. 7th CMAP-SEEC, Subotica, Sebia, 27th-31th May, 2012. Proceedings, 195-200.
- Liu, H., He, Y., Jiang, H., Peng, H., Huang, X., Zhang, X., Thomashow, L. S., Xu, Y. (2007): Characterization of a phenazine-producing strain *Pseudomonas chlororaphis* GP72 with broad-spectrum antifungal activity from green pepper rhizosphere. *Current Microbiology*, 54: 302-306.
- Liu, Y., Lu, S-E., Baird, S. M., Qiao, J., Du, Y. (2014): Draft genome sequence of *Pseudomonas chlororaphis* YL-1, a biocontrol strain suppressing plant microbial pathogens. *Genome Announc.*, 2(1): e01225-13. doi:10.1128/genomeA.01225-13.
- Nair, C. B., Anith, K. N. (2009): Efficacy of acibenzolar-S-methyl and rhizobacteria for the management of foliar blight disease of amaranth. *Journal of Tropical Agriculture*, 47: 43-47.
- Ogbebor, N., Adekunle, A. T. (2005): Inhibition of conidial germination and mycelial growth of *Corynespora cassicola* (Berk and Curt) of rubber (*Hevea brasiliensis* muell. Arg.) using extracts of some plants. *African Journal of Biotechnology*, 4: 996-1000.
- Pavlović, S., Stojanović, S. (2001): First report of occurrence *Sclerotinia* blight on marshmallow (*Althae officinalisi* L.) in Serbia. VII Meeting Days of medicinal plants, Belgrade, Book of abstracts, pp. 45.
- Poritsanos, N., Selin, C., Fernando, W. G. D., Nakkeeran, S., de Kievit, T. R. (2006): A GacS deficiency does not affect *Pseudomonas chlororaphis* PA23 fitness when growing on canola, in aged batch culture or as a biofilm. *Can. J. Microbiol.*, 52: 1177-1188.

Postic, D., Starovic, M., Popovic, T., Bosnic, P., Stanojkovic-Sebic, A., Pivic, R., Josic, D. (2013): Selection and RAPD analysis of *Pseudomonas* spp. isolates able to improve biological viability of potato seed tubers. *Genetika*, 45(1): 237-249.

Protolipac, K., Pavlović, S., Starović, M., Stojanović, S., Lepšanović, Z., Jošić, D. (2012): Antifungal activity of indigenous *Pseudomonas* isolates against *Alternaria tenuissima* isolated from *Echinacea purpurea*. 7th CMAP-SEEC, Subotica, Serbia, 27th-31th May, 2012. Proceedings, pp. 187-191.

Savchuk, S.C. (2002): Evaluation of biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* on Canola (*Brassica napus*) in the lab, in the greenhouse, and in the field. Msc. thesis, University of Manitoba, pp. 49-83.

Savchuk, S. C., Dilantha Fernando, W. G. (2004): Effect of timing of application and population dynamics on the degree of biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* by bacterial antagonists. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 49: 379-388.

Selin, C., Habibian, R., Poritsanos, N., Athukorala, S. N., Fernando, D., de Kievit, T. R. (2010): Phenazines are not essential for *Pseudomonas chlororaphis* PA23 biocontrol of *Sclerotinia sclerotiorum*, but do play a role in biofilm formation. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 7: 73-83.

Singh, A., Dubey, N. K. (2012): An ethnobotanical study of medicinal plants in Sonbhadra District of Uttar Pradesh, India with reference to their infection by foliar fungi. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6: 2727-2746.

Sokal, R. R., Rohlf, F. J. (1995): *Biometry: The principle and practice of statistics in biological research*, 3rd ed. New York: W.H. Freeman and Company.

Stojanović, S., Pavlović, S., Starović, M. (2006): Medicinal and aromatic plant decay caused by *Sclerotinia sclerotiorum* in Serbia. of the 4th Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries, Isai, Romania, 28-31. 05, Proceedings, pp. 240-243.

Szczeponek, A., Mazur, S. (2006): Occurrence of fungal diseases on lemon balm (*Melissa officinalis* L.) and peppermint (*Mentha piperita* L.) in the region of Malopolska. *Commun Agric Appl. Biol. Sci.*, 71(3 Pt B): 1109-1118.

Tu, J. C. (1997): Biological control of white mould in white bean using *Trichoderma viride*, *Gliocladium roseum* and *Bacillus subtilis* as protective foliar spray. In Proceedings of 49th International Symposium on Crop Protection, Gent, 62: 979-986.

Yuen, G. Y., Craig, M. L., Kerr, E. D., Steadman, J.R. (1994): Influences of antagonist population levels, blossom development stage, and canopy temperature on the inhibition of *Sclerotinia sclerotiorum* on dry edible bean by *Erwinia herbicola*. *Phytopathology*, 84: 495-501.

Zhang, Y., Fernando, W. G. D., de Kievit, T., Berry, C., Daayf, F., Paulitz, T. C. (2006): Detection of antibiotic-related genes from bacterial biocontrol agents using polymerase chain reaction. *Can. J. Microbiol.*, 52: 476-481.

(Priljeno: 23.05.2014.)
(Prihvaćeno: 27.06.2014.)

ANTIFUNGAL ACTIVITY OF *PSEUDOMONAS CHLORORAPHIS* Q16 AGAINST *SCLEROTINIA SCLEROTIUM* ISOLATED FROM DIFFERENT MEDICINAL PLANTS

ZORICA LEPŠANOVIĆ¹, MIRA STAROVIĆ², SNEŽANA PAVLOVIĆ, DRAGANA JOŠIĆ³

¹Institute of Epidemiology, Military Medical Academy, Belgrade, Serbia

²Institute for Plant Protection and Environment, Belgrade, Serbia

³Institute of Soil Science, Belgrade, Serbia

e-mail: josicdragana@yahoo.com

SUMMARY

Phytopathogenic fungi *Sclerotinia sclerotiorum* is very destructive pathogen of the stem of many medicinal plants. Because the use of pesticides is forbidden during production of medicinal plants, presence of *S. sclerotiorum* may produce serious loss. The use of PGP (Plant Growth Promoting) bacteria, for which have been demonstrated to show antifungal activity with varying degrees of antagonism, gives protection to medicinal plants.

The antifungal activity of different fractions of *P. chlororaphis* Q16 culture was examined on 6 representative isolates of *S. sclerotiorum* from medicinal plants: nettle, cumin, marshmallow, valerian and two strains of *Echinacea*. The highest efficacy of mycelial growth inhibition showed heat stable antifungal factor with growth inhibition range from 52.75% (marshmallow isolate) up to 83.36% (isolate from *E. purpurea*). The inhibition of mycelial growth was similar for all *S. sclerotiorum* isolates when 24^h culture was performed and ranged from 60.28% (cumin isolates) to 76.47% (nettle isolates).

Key words: *Pseudomonas chlororaphis*, *Sclerotinia sclerotiorum*, antifungal activity, medicinal plants

(Received: 23.05.2014.)

(Accepted: 27.06.2014.)