

MORFOLOŠKA I MOLEKULARNA IDENTIFIKACIJA *CERCOSPORA APII* NA CELERU U SRBIJI

ANJA MILOSAVLJEVIĆ¹, ERIKA PFAF DOLOVAC¹, MILANA MITROVIĆ¹, JELENA JOVIĆ¹,
IVO TOŠEVSKI¹, NATAŠA DUDUK², NENAD TRKULJA¹

¹Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Beograd

²Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Beograd

e-mail: anjamilosavljevic@yahoo.com

REZIME

C. apii predstavlja jednu od najštetnijih fitopatogenih gljiva celera. Tokom 2012. god na teritoriji Velikog Gradišta su prikupljeni uzorci celera sa karakterističnim simptomima pegavosti lista i njihova identifikacija je izvršena pomoću morfoloških i molekularnih metoda. Test patogenosti je obavljen na zdravim biljkama i svi ispitivani izolati prouzrokuju karakteristične simptome nakon inokulacije. Konidiofore iz stroma formiraju zbijene fascikule ili su pojedinačne, prave do blago zakrivljene, smeđe boje. Konidije su pojedinačne, hijalinske i septirane (5-13 septi), cilindrične do blago sužene na jednoj strani ili prave do blago zakrivljene i zatupaste na vrhu. U osnovi su zasečene, skoro kvadratnog oblika i stanjene. Amplifikovani su fragmenti očekivanih dužina za internal transcribed spacer (ITS1/ITS4), kalmodulin (CAL-228F/CAL2Rd) i histon (CYLH3F/CYLH3R) genima i dobijene sekvence su pokazale 100% identitet sa sekvencama *C. apii* u bazi gena.

Ključne reči: *Cercospora apii*, *Apium graveolens* var. *dulce*, identifikacija

UVOD

Celer (*Apium graveolens* var. *dulce*) pripada familiji *Apiaceae* koja obuhvata oko 300-450 rodova i preko 3500 vrsta (Constance, 1971; Downie, 2000). Familija obuhvata grupu začinskih i lekovitih biljnih vrsta koje se gaje širom sveta. Najznačajniji predstavnici su šargarepa (*Daucus carota*), celer (*Apium graveolens*), peršun (*Petroselinum crispum*), mirođija (*Anethum graveolens*), komorač (*Foeniculum vulgare*) (Koike, 2006). Celer je dvogodišnja biljka koja se gaji zbog hranljivog korena, sočnog lista i lisne drške. Proizvodi se širom sveta, a najviše u Americi (Nonnecke, 1989) dok se kod nas najviše gaji u istočnoj i južnoj Srbiji.

Jedno od najznačajnijih i najštetnijih oboljenja celera je pegavost lista koju prouzrokuje fitopatogena gljiva *Cercospora apii* Fresen., (Koike, 2007; Raid, 2003). Rod *Cercospora* obuhvata preko 650 vrsta od kojih je 281 takson bilo nemoguće identifikovati pa su oni svrstani u grupu *Cercospora apii*

sensu lato (Crous i Braun, 2003). Vrste koje pripadaju ovoj grupi su morfološki slične i izazivaju veoma slične simptome pegavosti biljaka. Pored fitopatogenih, ovoj grupi pripadaju i neke saprofitne vrste koji se razvijaju na nekrotiranom biljnom tkivu, kao i sekundarni patogeni koji prodiru u biljno tkivo nakon ulaska drugih patogena, što kompleks *C. apii* s.l. čini taksonomski nestabilnim (Crous and Braun, 2003). S obzirom da morfološka identifikacija do nivoa vrste u okviru roda *Cercospora* nije pouzdan taksonomski kriterijum, razvojem savremene molekularne metodologije, istraživanja su orjentisana na iznalaženje genskih markera za identifikaciju i detekciju ovih vrsta. Analizom sekvenci ITS regiona (internal transcribed spacer), različiti autori su utvrdili da ovaj marker nije pogodan za identifikaciju bliskih vrsta unutar roda *Cercospora* (Stewart et al., 1999; Goodwin et al. 2001; Taylor et al., 2003). U cilju pronalaženja odgovarajućeg genetičkog markera Groenewald et al. (2005) su pored ITS regiona analizirali i nekoliko drugih gena: aktin (ACT), fak-

tor elongacije (EF), kalmodulin (CAL) i histon (H3).

Simptomi koje prouzrokuje *C. apii* prvi put su zabeleženi sredinom 19. veka u zapadnoj Evropi (Fresenius, 1863), a potom je prisustvo ovog patogena utvrđeno u svim područjima gde se celer gaji (Raid and Sui, 2012). Danas pegavost lista celera predstavlja ozbiljan problem u proizvodnji ove važne začinske biljke (Kucharek, 2004). Štete nastale od ove bolesti mogu u pojedinim zemljama dostići i 100%, što je zabeleženo na Floridi (Berger, 1973; Sherf and MacNab, 1986).

S obzirom da je u Srbiji takođe konstatovan veoma visok intenzitet zaraze, na nekim lokalitetima i 80% (Milosavljević et al., 2014), cilj ovog rada bio je identifikacija uzročnika pegavosti celera pomoću morfoloških i molekularnih metoda u cilju potvrde njegovog prisustva u Srbiji.

MATERIJAL I METODE

Uzorkovanje i izolacija

Tokom avgusta i septembra 2012. godine, prilikom pregleda useva celera u okolini Velikog Gradišta uočene su biljke sa simptomima karakterističnim za *C. apii*. Uzorci stabla i lišća sa biljaka zahvaćenih pegavošću pakovani su u papirne kese i u ručnom frižideru transporovani do laboratorije Instituta za zaštitu bilja u cilju izolacije patogena. Monosporijalna izolacija je izvršena direktno sa simptomatičnog lišća celera (Gams et al., 1988) u Petri kutije sa krompir-dekstroznim agarom (KDA), (Dhingra and Sinclair, 1986). Kulture su postavljene u termostat na temperaturu od 25°C, bez svetlosti u trajanju od 2-5 dana. Novoformirana micelija je presejana na novu KDA podlogu i ovakve kulture čuvane su na 25°C, u mraku u trajanju od 14 dana. Reprezentativni monosporijalni izolati su dalje korišćeni u cilju morfološke i molekularne identifikacije patogena (Crous and Braun, 2003). Izolati koji su dobijeni se čuvaju presejavanjem na epruvete sa zakošenom KDA podlogom u frižideru na temperaturi od 4°C.

Provera patogenosti

Patogenost izolata ispitivna je na zdravim, dve nedelje starim biljkama celera sorte Yuta. Na svakoj biljci su odabrana po tri lista, koja su najpre dezinfikovana 70% etanolom. Epidermis svakog lista je zagreban sterilnom iglom radi pospešivanja infekcije i nakon toga inokulisan. Isečci micelije patogena sa KDA podlogom (Ø5 mm) postavljeni su na površinu lista celera. Kontrolne biljke su inokulisane

isečcima čistog KDA mediuma. Ukupno 12 biljka je inokulisano isečcima sa micelijom izolata, dok je 12 biljaka iskorišćeno kao kontrola. Sve biljke su čuvane u vlažnoj komori 48 h, a zatim su prenete u staklenik na 20°C (Milosavljević et al., 2014). Nakon dve nedelje pojavili su se prvi simptomi, nakon čega je patogen reizolovan radi potvrđivanja Kohovih postulata.

Morfološke karakteristike

Ispitivanjem morfoloških karakteristika izolata sa celera obrađene su i proučene mikroskopske osobine. Mikroskopski preparati pripremani su tako što je na predmetno staklo naneta kap vode, a zatim su u nju preneseni fragmenti micelije i konidiofora sa konidijama direktno sa pege na zaraženoj biljci. Materijal je nakon toga prekriven pokrovnom ljusticom i odmah se pristupalo mikroskopiranju (Olympus BX51). Pri mikroskopiranju su određivane veličina, dužina, boja, oblik konidija i konidiofora (Crous and Braun, 2003).

DNA ekstrakcija, amplifikacija i sekvencioniranje

Tri izolata CAC4-1, CAC-24 i CAC-30 odabrana su za molekularnu identifikaciju vrste. Izolati su gajeni na KDA podlozi na 25°C u mraku. Pomoću sterilne igle sa površine kulture stare 14 dana uzeto je 100 mg micelije svakog izolata, a potom je ona zamrznuta pomoću tečnog azota i usitnjena u sterilnim tubicama pomoću mikrotučka. DNK je zatim ekstrahovana pomoću DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) prema uputstvu proizvođača i čuva se na -20°C.

U cilju molekularne identifikacije korištena su tri različita para prajmera koji umnozavaju tri genska regiona; ITS1/ITS4 (ITS region) (White et al., 1990), CAL-228F/CAL2Rd (calmodulin gen) (Carbone and Kohn, 1999; Groenewald, 2013) i CYLH3F/CYLH3R (histon H3 gen) (Crous et al., 2004).

Vizuelizacija umnoženih produkata PCR reakcije (lančana reakcija polimeraze) obavljena je elektroforetskim razdvajanjem nukleinskih kiselina u 1% agaroznom gelu u 1x TBE puferu, bojenjem etidijumbromidom i posmatranjem pod UV-transiluminatorom. Elektroforeza je obavljena pri konstantnoj struji od 40 mA u trajanju od približno 40 min u aparatu za elektroforezu (BluePower 500, Serva electrophoresis GmbH, UK). Za određivanje veličine amplifikovanih produkata PCR korišćen je marker MassRuler™ DNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences GmbH, Lithuania). Pozitivnom reakcijom smatrana je pojava traka očekivanih veličina

za određeni par prajmera koja je unapred poznata.

Svi amplifikovani produkti su prečišćeni pomoću komercijalnog QIAquick PCR purification kit (QIAGEN) prema uputstvu proizvođača. Sekvenciranje je urađeno na automatskom kapilarnom sekvencionatoru u Macrogenu (Seul, Južna Koreja) koristeći iste prajmere kao i za umnožavanje gena.

Za prevođenje sekvenci korišćen je program FinchTV v.1.4.0. Sekvence su ručno poravnate u MEGA 5.0 softveru pomoću *ClustalW* programa (Tamura et al., 2011). DNK sekvence svih izolata u okviru jednog regiona (ITS, CAL ili H3) su upoređene kako međusobno tako i sa dostupnim sekvenca-

ma u NCBI bazi podataka za određeni region i vrstu. Sekvence su zatim deponovane u banci gena pod šiframa od KJ210596 do KJ210604.

REZULTATI

Simptomi bolesti

Simptomi se prvo javljaju na listu u vidu sitnih žućkastih pega koje se brzo razvijaju u kružne sivo-smeđe pege. Lezije se vremenom povećavaju i spajaju i praćene su pojavom nekrotičnih zona koje dovode do slabljenja celokupne biljke (Slika 1).



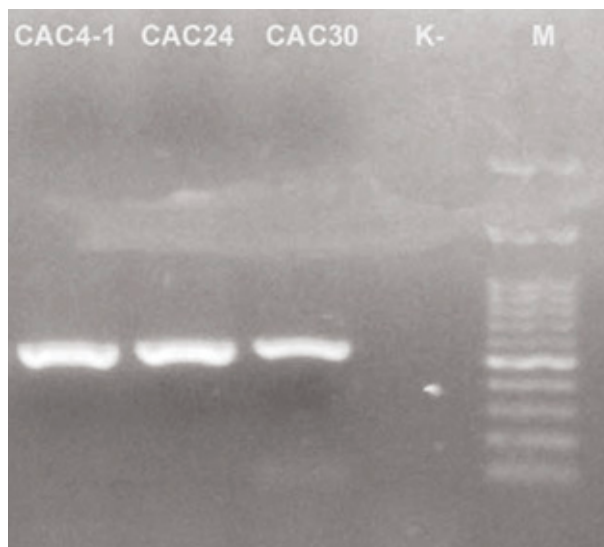
Slika 1. Simptomi *C. apii* na celeru u polju.
Figure 1. Symptoms of *C. apii* on celery in the field.



Slika 2. Lezije na peteljckama celera.
Figure 2. Lesions on the stalk of celery.

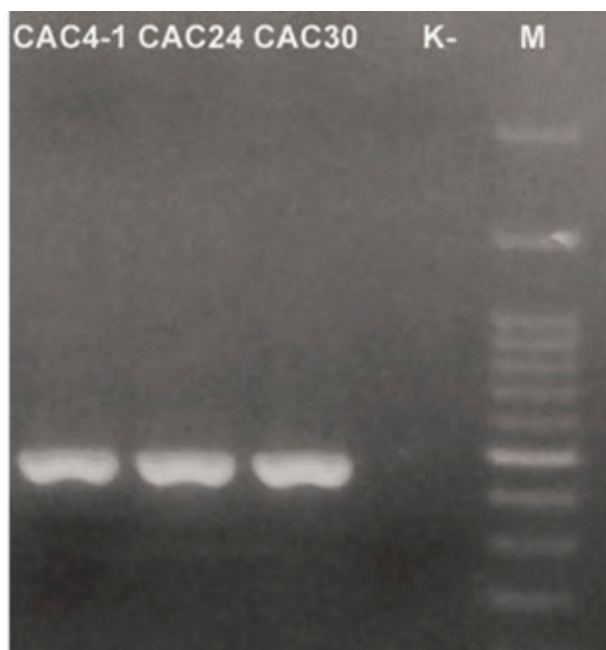


Slika 3. Izgled konidiofora i konidija *C. apii*.
Figure 3. Conidiophores and conidia of *C. apii*.



Slika 4. Amplifikacija DNK fragmenta *C. apii* izolata sa celera parom prajmera ITS1/ITS4. Uzorci sa celera - CAC4-1, CAC24 i CAC30; negativna kontrola - K-; marker - M.

Figure 4. Amplification of DNA fragment of *C. apii* isolates from celery with ITS1/ITS4 pair of primers. Isolates - CAC4-1, CAC24 and CAC30; negative control - K; marker - M.



Slika 5. Amplifikacija DNK fragmenta *C. apii* izolata sa celera parom prajmera CAL-228F/CAL2Rd. Uzorci sa celera - CAC4-1, CAC24 i CAC30; negativna kontrola - K-; marker - M.

Figure 5. Amplification of DNA fragment of *C. apii* isolates from celery with CAL-228F/CAL2Rd pair of primers. Isolates - CAC4-1, CAC24 and CAC30; negative control - K; marker - M.

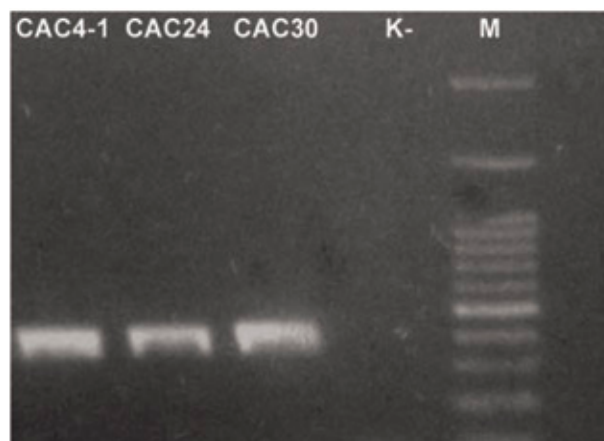
Kada su uslovi povoljni za sporulaciju, lezije poprimaju beličastu boju. Spore se dalje lako raznose vetrom i doprinose brzom širenju bolesti. Patogen takođe zahvata i peteljku gde su lezije žuto-mrke boje i blago ulegnute i izdužene (Slika 2).

Provera patogenosti

Svi izolati su na test biljkama prouzrokovali karakteristične simptome, slične onima u polju. Simptomi su se pojavljivali u vidu pegavosti lista nakon dve nedelje. Kohovi postulati su potvrđeni postupkom reizolacije patogena iz inokuliranih biljaka. Oblik i veličina konidiofora i konidija su se kretali u istim intervalima u oba testa. Na kontrolnim test biljkama nije došlo do pojave simptoma bolesti.

Morfološke karakteristike

Konidiofore koje izbijaju iz stroma i formiraju zbijene fascikule, ponekada se pojavljuju pojedinačno. Prave su do blago zakrivljene, pri osnovi su smeđe boje, pri vrhu svetlije. Dimenzije konidiofora su se kretale u opsegu 40-90 × 5-8 μm. Konidije su



Slika 6. Amplifikacija DNK fragmenta *C. apii* izolata sa celera parom prajmera CYLH3F/CYLH3R. Uzorci sa celera - CAC4-1, CAC24 i CAC30; negativna kontrola - K-; marker - M.

Figure 6. Amplification of DNA fragment of *C. apii* isolates from celery with CYLH3F/CYLH3R pair of primers. Isolates - CAC4-1, CAC24 and CAC30; negative control - K; marker - M.

pojedinačne, hijalinske i septirane, sa 5-13 poprečnih septi, veličine 45-160 × 4-5 μm. Po obliku mogu biti cilindrične do blago sužene na jednoj strani, ili prave do blago zakrivljene i zatupaste na vrhu. U osnovi su zasečene, skoro kvadratnog oblika i stanjene (Slika 3).

Molekularna identifikacija

Amplifikovani su fragmenti očekivanih dužina za internal transcribed spacer (ITS1/ITS4), kalmodulin (CAL-228F/CAL2Rd) i histon (CYLH3F/CYLH3R) gene (Slike 4, 5 i 6). Negativne kontrole nisu dale amplifikaciju.

Nakon sekvencioniranja PCR produkata tri odabrana izolata dobijene su sekvence delova gena koje su prijavljene u GenBank bazu podataka, svaka pod određenim pristupnim brojem (KJ210596 sve do KJ210604). Blast analiza ITS sekvenci pokazala je 100% identitet sa nekoliko vrsta roda *Cercospora* (*C. apii* (Acc. No. JX143532), *C. beticola* (JX143556), *C. zebrina* (KC172066)). Sekvence dobijene pomoću CAL i H3 su pokazale 100% identitet samo sa sekvencama *C. apii* koje su u bazi deponovane pod rednim brojevima JX142794 i JX142548.

DISKUSIJA

Pegavost lista celera koju prouzrokuje fitopatogena gljiva *C. apii* primećena je tokom obilaska polja celera u okolini Velikog Gradišta 2012. godine. Prisustvo fitopatogene gljive *C. apii* prvi put je potvrđeno na području Srbije 2014. godine. (Milosavljević et al., 2014). U ovom radu prikazana je metodologija korišćena za identifikaciju vrste *C. apii* pomoću morfoloških karaktera i molekularnih markera.

Morfološki veoma slične vrste roda *Cercospora* Crous and Braun (2003), su izdvojili u zasebnu grupu *Cercospora apii* s. l., jer nije bila moguća njihova pouzdana morfološka identifikacija. U ovom istraživanju morfološkom identifikacijom izolata sa biljaka celera, zasnovanoj na mikroskopskim karakteristikama (dimenzije i izgled konidiofora i konidija), zaključeno je da se se radi o *C. apii*. Fresen. Izolati *C. apii* sa celera su se pokazali patogenim na test biljkama nakon čega su i reizolovani, čime su potvrđeni Kohovi postulati. Morfološke mikroskopske osobine izolata, uzetih direktno sa biljaka iz polja kao i sa biljaka u testu, ne pokazuju razliku, što potvrđuje da patogen ne gubi na sposobnosti infekcije u testu *in vivo*. Simptomi na inokulisanim test biljkama su identični simptomima koji su prisutni na biljkama u polju.

Pre razvoja savremenih metoda istraživanja, identifikacija vrsta iz roda *Cercospora* se zasnivala na produkciji toksina cercosporina, specifičnosti prema biljci domaćinu i morfološkim karakteristikama (Chupp, 1954; Ellis, 1971; Fajola, 1978). Međutim, navedene karakteristike ne mogu biti pouzdan taksonomski karakter za determinaciju vrsta roda *Cercospora*, jer su varijabilne (Jenns et al., 1989), a izgled i veličina konidija i kondiofora su veoma slične za mnoge vrste roda *Cercospora* (Welles, 1933). Pored toga, mnoge vrste ovog roda mogu kolonizirati tkiva primarno parazitirana od strane drugih vrsta, pri čemu se mogu izolovati sa atipičnih biljaka domaćina (Berger and Hanson, 1963; Groenewald et al., 2005; Groenewald et al., 2006). Ovakvi nalazi su ukazali

da identifikacija vrsta u okviru roda *Cercospora* ipak nije moguća samo klasičnim metodama na osnovu morfoloških karakteristika, već je iziskivala nove metode. Razvojem nauke u primenu se uvode nove molekularne metode putem analiza različitih genskih markera u cilju pronalazaženja pouzdanog metoda identifikacije do nivoa vrste. Analiza sekvenci ITS, CAL i H3 gena korišćenih u ovom istraživanju, izabrana je kao metod za potvrdu identifikacije *C. apii* (White et al., 1990; Carbone and Kohn, 1999; Groenewald, 2013, Crous et al., 2004). Na osnovu BLAST analize sekvenci ITS regiona utvrđeno je da izolati sa celera pokazuju 100% identitet sa više vrsta iz roda *Cercospora* i to sa *C. apii* (JX143532), *C. beticola* (JX143556), *C. zebrina* (KC172066). Sekvencijiranjem nekoliko konzervativnih regiona (ITS, ACT, EF, CAL i H3), u cilju određivanja adekvatnog genetičkog markera za identifikaciju bliskih vrsta roda *Cercospora*, Groenewald et al. (2005) su utvrdili da su vrste *C. apiiicola*, *C. apii* i *C. beticola* veoma slične i da u sekvencama ITS, ACT, EF, i H3 gena nema razlika značajnih za diferencijaciju na nivou vrste. ITS region nije dovoljno specifičan za identifikaciju, što jasno ukazuje da vrste koje pripadaju kompleksu *C. apii* s. l. pored morfološke imaju i visok stepen sličnosti i na molekularnom nivou (Goodwin et al., 2001). Analizom fragmenata ITS gena utvrđeno je da patogen pripada rodu *Cercospora* spp., ali nije utvrđena i vrsta. Ovo potvrđuje tezu da je ITS region nespecifičan za precizno određivanje vrsta unutar roda *Cercospora*. Analizom CAL i H3 gena utvrđen je 100% identitet samo sa sekvencama *C. apii* depozitiranim u bazi gena (JX142794 i JX142548) (Milosavljević et al., 2014).

Na osnovu sveobuhvatnih morfoloških i molekularnih analiza, patogen – prouzrokovatelj pegavosti lista celera identifikovan je kao *C. apii*.

ZAHVALNICA

Istraživanja su realizovana u okviru projekta TR31018 Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

LITERATURA

- Berger, R.D., and Hanson, E.W. (1963): Pathogeny, host-parasite relationship, and morphology of some forage legume *Cercosporae*, and factors related to disease development. *Phytopathology*, 53: 500-508.
- Berger, R.D. (1973): Early blight of celery: Analysis of disease spread in Florida. *Phytopathology*, 63: 1161-1165.
- Berger, R.D. (1973): Disease progress of *Cercospora apii* resistant to benomyl. *Plant Dis. Repr.*, 57: 837-840.
- Carbone, I. I., and Kohn, L.M. (1999): A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia*, 91: 553-556.
- Chupp, C. (1954): A monograph of the fungus genus *Cercospora*. Itacha, New York. Constance, L. (1971): History of the classification of *Umbelliferae* (*Apiaceae*). Heywood, V.H. Šed.Č. The biology and chemistry of the *Umbelliferae*, 1-11. Academic Press, London.
- Crous, P.W., and Braun, U. (2003): *Mycosphaerella* and its anamorphs: 1. Names published in *Cercospora* and *Passalora*. CBS Biodiversity Series, 1: 1-571.
- Crous P.W., Groenewald J.Z., Risède J.M., Simoneau P., Hywel-Jones N.L. (2004): *Calonectria* species and their *Cylindrocladium* anamorphs: species with sphaeropedunculate vesicles. *Studies in Mycology*, 50: 415-430.
- Dhingra, O.D., and Sinclair, J.B. (1986): Basic plant pathology methods. 3.ed. Boca Raton: CRC Press. pp. 119-178: Establishment of disease and testing for resistance.
- Downie, S.R., D.S. Katz-Downie, M.F. Watson (2000): A phylogeni of the flowering plant family *Apiaceae* based on chloroplast DNA *rpl16* and *rpoC1* intron sequences: towards a suprageneric classification of subfamily *Apioideae*. *American Jurnal of Botany*, 87: 273-292.
- Ellis, M.B. (1971): *Dematiaceous Hyphomycetes*. CABI Bioscience, Egham, Surrey, U.K.
- Fajola, A.O. (1978): Cultural studies in *Cercospora* taxonomy: I. Interrelationship between some species from Nigeria. *Nova Hedwigia*, 29: 912-921.
- Fresenius, G. (1863): *Beitrag zur Mykologie 3*. Heinrich Ludwig Brommer Verlag, Frankfurt, Germany.
- Gams, W., Hoekstra, E.S. i Aproot, A. (1998): CBS Course of Mycology, 4th ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, The Netherlands.
- Goodwin, S.B., Dunkley, L.D., Zismann, V.L. (2001): Phylogenetic analysis of *Cercospora* and *Mycosphaerella* based on the internal transcribed spacer region of ribosomal DNA. *Phytopathology*, 91: 648-658.
- Groenewald, M., Groenewald, J.Z., Braun, U., Crous, P.W. (2005): Distinct species exist within the *Cercospora apii* morphotype. *Phytopathology*, 95: 951-959.
- Groenewald, M., Groenewald, J.Z., Braun, U., Crous, P.W. (2006): Host range of *Cercospora apii* and *C. beticola* and description of *C. apicola*, a novel species from celery. *Mycologia*, 98: 275-285.
- Groenewald, J.Z., Nakashima, C., Nishikawa, J., Shin, H-D., Park, J-H., Jama, A-N., Groenewald, M., Braun, U., P.W. Crous (2013): Species concepts in *Cercospora*: spotting the weeds among the roses. *Studies in Mycology*, 75: 115-170.
- Jenns, A.E., Daub, M.E., Upchruch, R.G. (1989): Regulation of cercosporin accumulation in culture by medium and temperature manipulation. *Phytopathology*, 79: 213-219.

- Koike, S.T., Gladders, P., Paulus, A.O. (2006): *Vegetable diseases: A color handbook*. Boston: Academic Press.
- Koike, S.T., Gladders, P., Paulus, A. (2007): *Vegetable diseases: A color handbook*. Academic press, Burlington, MA.
- Kucharek, T. (2004): *Florida Plant Disease Management Guide: Carot*. 2004 Florida Plant Disease Management Guide. University of Florida Institute of Food and Agricultural Sciences. Online publication PDMG-V3-35.
- Milosavljević, A., Pfaf-Dolovac, E. Mitrovic, M., Jovic, J., Tosevski, I., Duduk, N., Trkulja, N. (2014): First report of *Cercospora apii* causal agent of *Cercospora* early blight of celery in Serbia. *Plant Disease*. Accepted for publication. Posted online on 13 Mar 2014.
- Nonnecke, I.L. (1989): *Vegetable production*. New York: Van Nostrand Reinhold.
- Raid, R.N. (2003): Early blight of celery. P.20-21. In: R.M. Davis and R.N. Raid (eds.). *Compendium of umbelliferous crop diseases*. APS Press. St. Paul, MN.
- Raid, R.N., and Sui, D.D. (2012): Management of Celery Early Blight Using Low-risk Chemistries. *Proc. Fla. State Hort. Soc.*, 125: 222-225.
- Sherf, A.F., and Mac.Nab, A.A. (1986): *Cercospora blight*. *Vegetable diseases and their control*. 2nd edition. John Wiley & Sons, New York. pp.,162-166.
- Stewart, E. L., Liu, Z., Crous, P.W., Szabo, L.J. (1999): Phylogenetic relationships among some cercosporoid anamorphs of *Mycosphaerella* based on rDNA sequence analysis. *Mycological Research*, 103: 1491-1499.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. (2011): MEGA 5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28: 2731-2739.
- Taylor, J.E., Groenwald, J.Z., Crous, P.W. (2003): A Phylogenetic analysis of *Mycosphaerellaceae* leaf spot pathogens of *Proteaceae*. *Mycological Research*, 107: 653-658.
- Welles, C.G. (1933): Taxonomic studies on the genus *Cercospora* in the Phillipine Islands. *American Journal of Botany*, 12: 195-218.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. , Taylor, J. (1990): Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Chapter 38. Pages 315-322. In: *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications* (M. Innis, D. Gelfand, J. Sninsky and T. White, eds.). Academic Press, Orlando, Florida.

(Priljeno: 04.06.2014.)
(Prihvaćeno: 08.07.2014.)

MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR IDENTIFICATION OF *CERCOSPORA APII* ON CELERY IN SERBIA

ANJA MILOSAVLJEVIĆ¹, ERIKA PFAF DOLOVAC¹, MILANA MITROVIĆ¹,
JELENA JOVIĆ¹, IVO TOŠEVSKI¹, NATAŠA DUDUK², NENAD TRKULJA¹

¹Institut for Plant Protection and Environment, Belgrade

²University of Belgrade, Faculty of Agriculture, Belgrade
e-mail: anjamilosavljevic@yahoo.com

SUMMARY

C. apii is one of the most damaging plant pathogenic fungi of celery. During the 2012, samples of celery with typical symptoms of leaf blight were collected on the territory of Veliko Grdaište and their identification is performed using morphological and molecular methods. The pathogenicity test was conducted on healthy plants and all tested isolates caused typical symptoms after inoculation. Conidiophores arising from the stromata formed dense fascicles or single, straight to slightly curved, brown. Conidia are solitary, hyaline and septate (5-13 septa), cylindrical to obclavate, or straight to slightly curved, obtuse at the apex. Truncated and thickened at the base. Fragments of the expected length for the internal transcribed spacer (ITS1/ITS4), calmodulin (CAL-228F/CAL2Rd) and histone (CYLH3F/CYLH3R) gene were amplified and the obtained sequences showed 100% identity with the *C. apii* sequences deposited in GenBank.

Key words: *Cercospora apii*, *Apium graveolens* var. *dulce*, identification

(Received: 04.06.2014.)

(Accepted: 08.07.2014.)