

OTPORNOST VAŽNIJIH SORATA PŠENICE PREMA PROUZROKOVAČIMA LISNE RĐE I PEPELNICE

SLAVIŠA GUDŽIĆ, NEBOJŠA DELETIĆ, NEBOJŠA GUDŽIĆ,
MIROLJUB AKSIĆ, KATARINA NIKOLIĆ

Poljoprivredni fakultet, Kosovska Mitrovica-Zubin Potok

Rezultati proučavanja otpornosti važnijih sorti ozime pšenice prema *Puccinia triticina* i *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*, dva patogena koji su redovno prisutni na području severnog Kosova i Metohije, lokalitet u Leposaviću u uslovima prirodnih infekcija tokom 2005. i 2006. godine prikazani su u ovom radu. Prosečan intenzitet zaraze lisne rđe u 2005. godini bio je 16,3 %, a u 2006. godini 9,2 %. Prosečan intenzitet zaraze pepelnice je u 2005. godini iznosio 10,4%, a u 2006. godini 8.0%. Rezultati ukazuju da su uslovi za ostvarenje infekcije za navedene patogene bili povoljniji u 2005. godini. Kao najotpornija sorta prema *Puccinia triticina* pokazala se takovčanka, dok je sorta danica bila najotpornija prema *Blumeria graminis tritici* obe godine istraživanja.

Ključne reči: pšenica, lisna rđa, pepelnica, otpornost, osetljivost sorata.

UVOD

Patogeni pšenice predstavljaju važan ograničavajući faktor u stabilnoj i visoko produktivnoj proizvodnji ove gajene kulture. Iz tih razloga nameće se potreba da se svake godine utvrđuje pojava i intenzitet zaraze oboljenja prouzrokovanih biljnim bolestima. Lisna rđa (prouzročivač *Puccinia triticina*) i pepelnica (prouzročivač *Blumeria graminis tritici*) pšenice su dve najrasprostranjenije i najštetnije bolesti pšenice u Srbiji. Ovi patogeni smanjuju prinos u velikoj meri i utiču na pogoršanje tehnološkog i biološkog kvaliteta zrna pšenice. Lisna rđa i pepelnica pšenice prisutne su svake godine, u manjem ili većem intenzitetu, u

zavisti od otpornosti gajenih sorti, klimatskih uslova i virulentnosti patotipova patogena.

Lisna rđa pšenice je prisutna u svim lokalitetima gajenja pšenice (Kostić i sar., 1966). Jevtić i sar., (1995) ističu da se nao vom području gajenja pšenice ovo oboljenje javlja redovno u visokom procentu zaraze, što je naročito bilo izraženo tokom 1994. godine. Takođe, i pepelnica je često oboljenje pšenice na teritoriji Kosova i Metohije (Stojanović i sar., 1994; Gudžić i sar., 2008).

S obzirom na značaj ova dva oboljenja u proizvodnji pšenice većina dosadašnjih istraživanja bila su uglavnom usmerena na stvaranje sorata otpornih prema prouzročivačima ova dva oboljenja pšenice u Srbiji (Jerković i sar., 1994). Međutim, pre nego što se pristupi selekciji na otpornost sorata prema bolesti, potrebno je prikupiti što više podataka o reakciji pojedinih sorata prema ovim oboljenjima. Iz tih razloga preduzeta su istraživanja *in situ* sa ciljem da se u prirodnim uslovima utvrdi otpornost komercijalnih sorti pšenice prema ovim patogenima u Srbiji tokom dve godine.

MATERIJAL I METODE

Istraživanja su obavljena tokom 2005. i 2006. godine u uslovima prirodnih infekcija u lokalitetu Leposavić. Proučavana je otpornost 15 sorti pšenice: NS-Rana 5, Renesansa, Lasta, Takovčanka, Studenica, Srbijanka, Žitnica, Fortuna, Rodna, Evropa, Proteinka, Kg 56, Danica, Zvezda i Pobeda. Seme proučavanih sorti sejano je po principu sorta na red. Dužina redova je iznosila 1 m sa međurednim rastojanjem od 30 cm. U periodu maksimalnog razvoja patogena ocenjivan je način reakcije ispitivanih sorti pšenice određivanjem tipova infekcije (0-4) i procenta zaraze (0-100%). Tipovi infekcije imaju sledeća značenja: 0-vrlo otporan, 1-otporan, 2-srednje otporan, 3-srednje osetljiv i 4-vrlo osetljiv. Intenzitet zaraze *Puccinia triticina* i *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* određivan je po skali Peterson *et al.*, (1948).

Na osnovu utvrđenih tipova infekcije i intenziteta zaraze izračunat je koeficijent infekcije, tako što je intenzitet napada množen odgovarajućim vrednostima tipova infekcije (0-0; 1-0,2; 2- 0,4; 3-0,8 i 4-1). Sorte kod kojih je utvrđen koeficijent infekcije 0-5, smatraju se vrlo otpornim, 6-10 otpornim, 11-25 srednje otpornim, 26-40 srednje osetljivim, 41-65 osetljivim i 66-100 vrlo osetljivim (Stojanović, 2004).

REZULTATI I DISKUSIJA

Iz podataka prikazanih u tabeli 1. može se videti da je prosečan intenzitet zaraze *Puccinia triticina* bio veći u 2005. godini (16,31%) nego u 2006. godini (9,23%). Takođe, i intenzitet zaraze *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* je u 2005. godini bio veći i iznosio je 10,38%, a u 2006. godini 8,00%. Ovo pokazuje da su uslovi za ostvarenje infekcije i razvoj patogena lisne rđe i pepelnice pšenice bili povoljniji u 2005. godini.

Visok stepen otpornosti prema prouzročivaču lisne rđe i u 2005. i 2006. godini ispoljila je sorta Takovčanka sa koeficijentom infekcije 0%. Takođe, u 2006. godini najotpornijom se pokazala i sorta Kg-56. Vrlo osetljiv tip infekcije 4 i intenzitet zaraze u tragovima u 2006. godini je utvrđen kod sorata Studenica, Žitnica, Fortuna, Proteinka i Pobeda. Visoku otpornost, čiji se koeficijent infekcije kretao do 10% u 2005. godini ispoljile su sorte Studenica, Kg-56 i Pobeda, a u 2006. godini Renesansa, Lasta, Srbijanka, Rodna i Zvezda. Srednje otporne u 2005. godini su bile sorte Renesansa, Lasta, Žitnica, Fortuna, Proteinka i Zvezda, a u 2006. godini NS-rana 5 i Danica i kod njih se koeficijent infekcije kretao od 11 do 25%. Intenzitet zaraze kod najosetljivije sorte Evropa je u 2005. godini iznosio 40%, a u 2006. godini 30%. O dobroj otpornosti Takovčanke prema prouzročivaču lisne rđe pšenice izvestili su Stojanović i sar., (2006) i Gudžić i sar., (2007). Stojanović i sar., (1997) su utvrdili da su prema ovom patogenu otporne sorte Žitnica, Lasta, Nova banatka, Rana niska i Sremka. Prema rezultatima Jerkovića i Jevtića (2002) sorta Renesansa reaguje parcijalnom otpornošću.

Visok stepen otpornosti prema *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* u 2005. godini ispoljile su sorte Rodna i Danica, a u 2006. godini Lasta, Srbijanka, Fortuna, Proteinka i Danica. Nizak intenzitet zaraze (do 5%) je u 2005. godini utvrđen kod sorte Takovčanka, koja je reagovala srednje otpornim tipom infekcije 2. U 2006. godini intenzitet zaraze do 5% je evidentiran kod sorti NS-Rana 5 i Studenica, mada su one reagovala vrlo osetljivim tipom infekcije 4. Srednje osetljivim tipom infekcije 3 u 2005. godini reagovala su sorte Lasta, Srbijanka, Žitnica, Proteinka i Kg 56. Vrednosti intenziteta zaraze kod ovih sorti je bila 10%. Renesansa je bila najosetljivija sorta, jer je kod nje intenzitet zaraze u 2005. godini iznosio 50%, a u 2006. godini 30%. Rezultati koji su dobijeni za 2005. godinu su pokazali da je većina ispitivanih sorti reagovala otpornim tipom infekcije i niskim intenzitetom zaraze. Tokom 2006. godine veći broj sorti je reagovao niskim intenzitetom zaraze (0-10%) i osetljivim tipom infekcije 4. Na ovakvu reakciju sorti pšenice u 2006. godini, što je u saglasnosti sa dobijenim rezultatima ukazali su i mnogi drugi istraživači (Stojanović i sar., 2006; Gudžić i sar., 2008). Jerković i Jevtić (2000) su izvestili da je umanjen intenzitet zaraze prouzročivačem pepelnice, zbog produženog latentnog perioda i slabije uspešnosti infekcije.

Tabela 1. - Otpornost sorti pšenice prema *Puccinia triticina* i *Blumeria graminis tritici* tokom 2005. i 2006. godine
Table 1. - Resistance of some winter wheat cultivars to *Puccinia triticina* and *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* in 2005 and 2006

Sorta -Cultivar	<i>Puccinia triticina</i>						<i>Blumeria graminis</i> f. sp. <i>tritici</i>					
	2005		2006		2006		2005		2006		2006	
	T ¹	I ²	K ³	T	I	K	T	I	K	T	I	K
Ns-Rana 5	4	30	30	4	20	20	2	10	4	4	5	5
Rensansa	4	20	20	4	10	10	4	50	50	4	30	30
Lasta	4	20	20	4	10	10	3	10	8	0	0	0
Takovčanka	0	0	0	0	0	0	2	5	2	4	TB	TB
Studenica	4	10	10	4	TB ⁴	TB	2	TB	TB	4	5	5
Srbijanka	4	30	30	4	10	10	3	10	8	0	0	0
Žitnica	4	20	20	4	TB	TB	3	10	8	2	TB	TB
Fortuna	4	20	20	4	TB	TB	2	10	4	0	0	0
Rodna	4	30	30	4	10	10	0	0	0	4	10	10
Evropa	4	40	40	4	30	30	1	TB	TB	4	10	10
Proteinka	4	20	20	4	TB	TB	3	10	8	0	0	0
Kg 56	4	10	10	0	0	0	3	10	8	4	TB	TB
Danica	4	30	30	4	20	20	0	0	0	0	0	0
Zvezda	4	20	20	4	10	10	2	TB	TB	4	TB	TB
Pobeda	4	10	10	4	TB	TB	2	10	4	4	20	20
Prosek-Average	16,31			9,23			10,38			8,00		

- 1 Tip infekcije - Type of infection
- 2 Intenzitet zaraze - Severity of infection
- 3 Koefficient infekcije - Coefficient of infection
- 4 Bolest u tragovima - Disease in trace

LITERATURA

- Gudžić, S., Staletić Mirjana, Nikolić Katerina, Gudžić, N., Deletić, N., Knežević, B. (2007): Resistance of some commercial winter wheat cultivars to *Puccinia triticina* in Serbia. *Plant Protection*, Volume XVIII, No 18, 28-30, Skopje.
- Gudžić, S., Deletić, N., Gudžić, S., Nikolić Katerina, Aksić, M. (2008): Otpornost nekih sorti prema prouzročivaču pepelnice pšenice. *Agroznanje*, Vol. 9., br. 1, 67-73, Banja Luka.
- Jevtić, R., Jerković, Z., Pribaković, M. (1995): Uzroci epifitocije lisne rđe na pšenici i ječmu u 1993/94. godini. *Biljni lekar*, 1:42-45.
- Jerković, Z., Jevtić, R., Momčilović, V. (1994): Trenutno stanje u jugoslovenskom oplemenjivanju na otpornost pšenice i ječma prema prouzročivačima lisne rđe i pepelnice. *Zbornik radova sa III Jugoslovenskog Kongresa o zaštiti bilja*, 20, Vrnjačka Banja.
- Jerković, Z., Jevtić, R. (2000): Rezultati oplemenjivanja pšenice na otpornost prema prouzročivačima bolesti. *Zbornik rezimea radova sa XI Jugoslovenskog Simpozijuma o zaštiti bilja i Savetovanja o primeni pesticida*, 32, Zlatibor
- Jerković, Z., Jevtić, R. (2002): Razlike između novosadskih sorti ozime pšenice po genima za otpornost prema *Puccinia triticina*. *Zbornik rezimea sa XII Simpozijuma o zaštiti bilja i Savetovanja o primeni pesticida*, 45, Zlatibor.
- Kostić, B., Smiljaković, H., Tešić, T. (1966): Bolesti i štetočine pšenice u našoj zemlji. *Savremena poljoprivreda*, 9: 779-791.
- Peterson, R. F., Campbell, A. B., Hannah, A. E. (1948): A diagramic scale for estimating rust intensity on leaves of cereals. *Can. J. Res.*, 26: 496-500.
- Stojanović, S., Gudžić, S., Božović, D., Deletić, N. (1994): Reakcija važnijih sorata pšenice prema prouzročivaču pepelnice u agroekološkim uslovima Kosova i Metohije. *Zaštita bilja danas i sutra*, 53-60, Beograd.
- Stojanović, S., Stojanović, J., Gudžić, S., Deletić, N., Aksić, M. (1997): Resistance of some Yugoslav wheat cultivars to *Puccinia recondita* tritici. *Yearbook of the symposium „50 Years Faculty of agriculture“*, 39-43, Skopje.
- Stojanović, S., Mirjana Staletić, Milovanović, M., Pešić, V., Gudžić, S. (2006): Otpornost nekih genotipova pšenice prema prouzročivačima pepelnice, lisne rđe i sive pegavosti lišća. *Zbornik radova sa XI Savetovanja o biotehnologiji*, Vol. 11.(11-12), knjiga I, 325-330, Čačak.
- Stojanović, S. (2004): *Poljoprivredna fitopatologija*. Srpsko biološko društvo, Kragujevac, str.182-183.

(Primljeno: 14.04.2009.)
(Prihvaćeno: 29.06.2009.)

RESISTANCE OF IMPORTANT WINTER WHEAT CULTIVARS TO THE CAUSAL AGENTS OF LEAF RUST AND POWDER MILDEW

SALVIŠA GUDŽIĆ, NEBOJŠA DELETIĆ, NEBOJŠA GUDŽIĆ,
MIROLJUB AKSIĆ, KATARINA NIKOLIĆ

Faculty of Agriculture, Kosovska Mitrovica-Zubin Potok

SUMMARY

This paper gives the results of the study on resistance of important winter wheat cultivars to *Puccinia triticina* and *Blumeria graminis tritici* during 2005 and 2006, at the location of Leposavić, in the conditions of natural infections.

The observed average infection intensity for leaf rust was higher in 2005 (16.31%) than in 2006 (9.23%). Average infection intensity for the causal agent of powder mildew in 2005 was 10.38%, while in 2006 it was 8.00%. These results point to the existence of better conditions for infection by the studied pathogens in 2005 than in 2006. In both studied years the most resistant cultivar to *Puccinia triticina* was Takovčanka, and the most resistant one to *Blumeria graminis tritici* was cultivar Danica. The investigation showed that leaf rust and powder mildew were winter wheat diseases regularly present at wheat crops in northern parts of Kosovo and Metohia.

Key words: wheat, leaf rust, powder mildew, resistance, susceptibility, cultivars.

(Received: 14.04.2009.)

(Accepted: 29.06.2009.)

Zaštita bilja
Vol. 60 (1), № 267, 11-17, 2009, Beograd

UDK 582.573.36:632.482](497.11)
Naučni rad

PRVI NALAZ *ERYSIPHAE CICHORACEARUM* VAR. *CICHORACEARUM* NA KANTARIONU U SRBIJI

SNEŽANA PAVLOVIĆ¹, SAŠA STOJANOVIĆ², MIRA STAROVIĆ²

¹ Institut za proučavanje lekovitog bilja »Dr J. Pančić«, Beograd

² Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Beograd

Tokom maja i juna 2006. godine primećena je jaka pojava pepelnice na kantarionu (*Hypericum perforatum* L.) koji se plantažno gaji na komercijalnim zasadima Instituta za proučavanje lekovitog bilja u Pančevu. Tokom septembra iste godine zapažene su brojne kleistotecije teleomorfa patogena na spontanim biljkama kantariona na Vlasini (Vlasinsko jezero). Bela micelijska navlaka javlja se na listovima, lisnim drškama i stablu. Krajem leta micelija pokriva celu površinu lišća, koje nekrotira, suši se i otpada, tako da su obolele biljke kantariona potpuno neupotrebljive kao biljna droga. Na osnovu morfologije patogena gljiva je determinisana kao *Erysiphe cichoracearum* var. *cichoracearum*. Prouzrokovajući pepelnice na kantarionu do sada nisu bili opisani u Srbiji.

Key words: kantarion, *Hypericum perforatum* L., pepelnica, *Erysiphe cichoracearum* var. *cichoracearum*

UVOD

Kantarion (*Hypericum perforatum* L.) je jedna od najviše proučenih i najtraženijih vrsta lekovitog bilja. Koristi se još od antičkog doba, o čemu svedoče originalni dokumenti starogrčkih lekara Hipokrata, Teofrasta, Dioskorida i Galena (Radanović i sar., 2006). Proizvodi od kantariona su vekovima korišćeni za lečenje oboljenja žučne kese, gastritisa, bronhitisa, astme, glavobolje, gihta, reume, proliva i psihičkih poremećaja i zaceljenje površinskih rana (Dobrić i sar., 2006). Ulje pripremljeno od cvetova kantariona u maslinovom ulju je i danas efikasno sredstvo za lečenje rana, opekotina i čireva. Preparati na bazi ekstrakata

herbe kantariona koriste se kao blagi antidepresivi za lečenje psihovegetativnih poremećaja.

Potražnja za farmaceutskim derivatima kantariona drastično se povećala poslednjih nekoliko godina. Trenutno, kantarion je jedna od najbolje prodavanih biljnih droga u svetu, sa godišnjom svetskom prodajom koja dostiže 570 mil. \$ (Becker 2000).

Fitofarmaceutska industrija zahteva uniformnu sirovinu visokog kvaliteta, koja se može dobiti samo kultivacijom. Danas se kantarion plantažno gaji na nekoliko stotina hektara u Europi (Gaudin et al., 2003, loc cyt. Conceição et al, 2006).

Kantarion je veoma zastupljena biljna vrsta u Srbiji (Menković i sar., 2002; Šavikin-Fodulović i sar., 2003), ali je zbog prekomerne eksploatacije svrstana u vrste čije se sakupljane i promet kontrolišu prema Uredbi o stavljanju pod kontrolu, korišćenje i promet divlje flore i faune u Srbiji (»Službeni glasnik RS« 31/2005), da bi se osiguralo i sprečilo ugrožavanje njenog trajnog opstanka.

Na kantarionu su do sada opisane brojne vrste gljiva (Ellis et Ellis, 1985, 1997; Schwarczinger and Vajna, 1998; Keinath et al., 1999; Radaitienė et al., 2002; Glawe, 2004; Frużyńska-Jóźwiak and Andrzejak, 2007), koje su usko specifične za ovog domaćina ili su polifagne vrste.

Pet vrsta gljiva iz roda *Fusarium* uzrokuju uginuće semena ili uvenuće sejanaca kantariona u Srbiji (Pavlović et al., 2000). Sa biljaka kantariona, koje su ispoljavale simptome crvenila, izolovani su *Fusarium* spp. i *Colletotrichum gloeosporioides* (Ivanović i sar., 2002). Nedavno je na stablu registrovana i vrsta *Phomopsis* sp. (Pavlović i sar., 2007).

Tokom 2006. godine registrovano je prisustvo pepelnice u lokalitetima Pančevo i Vlasinsko jezero. Simptomi oboljenja na organima kantariona, morfološke odlike potrebne za identifikaciju patogena dati su u ovom radu.

MATERIJAL I METODE RADA

Prikupljanje uzoraka obolelih biljaka je obavljeno mesečno u periodu od marta do novembra 2006. godine. Posmatrane su morfološke karakteristike reproduktivnih organa patogena, a biometričke vrednosti su dobijene merenjem po 50 organa u svakom uzorku.

Za ispitivanje inicijalnih hifa konidije su odvajane sa staklenim ljuspicama, po dva za svaki uzorak. Svaka ljuspica je postavljena u Petri posudu sa vlažnim filter papirom. Petri kujtije su inkubirane 24h na 20°C uz stalno osvetljenje pod dve 20 W Osram lampe (340-750 nm), postavljene 40 cm iznad Petri kutija.

Identifikacija patogena obavljena je na osnovu morfoloških karakteristika teomorfa i anamorfa, uz poređenje sa odgovarajućom literaturom (Braun, 1987).

REZULTATI I DISKUSIJA

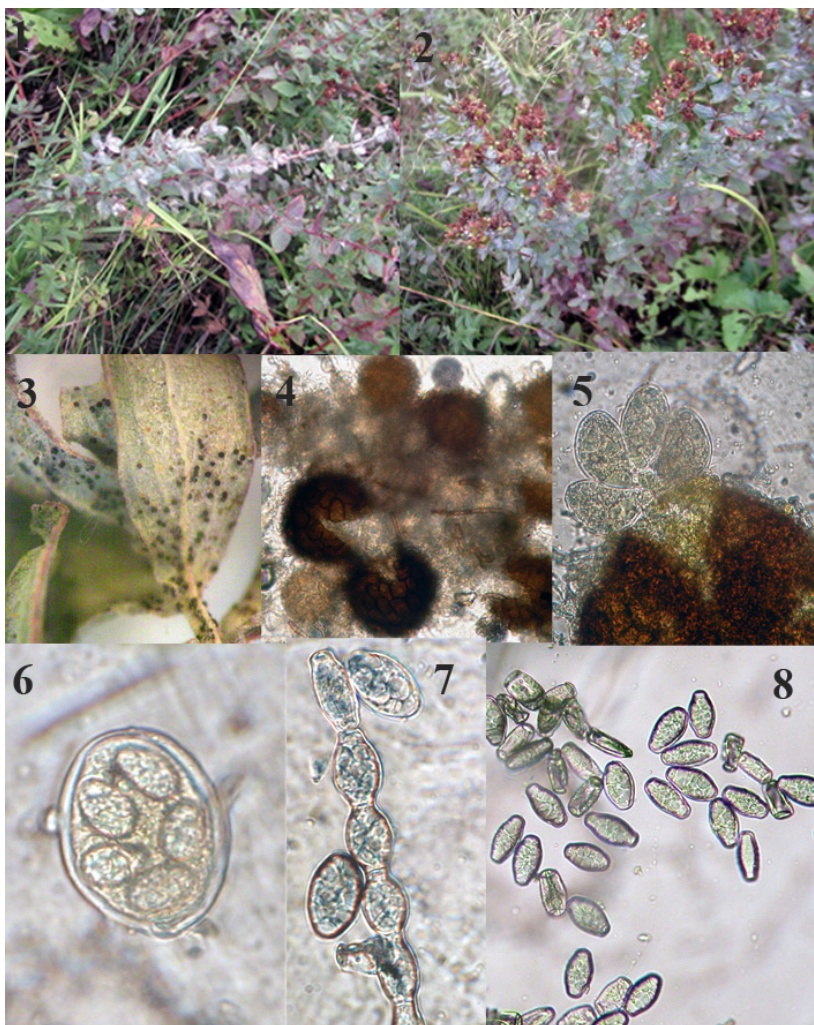
Patogen parazitira sve zelene organe domaćina. Beličaste micelijske navlake obrazuju se sa obe strane lista, lisnim drškama i stablu kantariona (sl. 1-2). Micelija u početku formira pojedinačne okruglaste kolonije, koje se kasnije spajaju i formiraju gustu micelijsku prevlaku, koja potpuno pokriva lisnu površinu, izazivajući nekrozu lišća, koje se suši i otpada. Takve biljke su potpuno neupotrebljive kao biljna droga.

Telemorf gljive konstatovan je samo na samoniklom kantarionu tokom oktobra (lokalitet Vlasinsko jezero, planina Vlasina). *Askomata* se obrazuju na listu, lisnim drškama i stablu, pojedinačne su ili u grupama, uronjene u miceliju, paraplektehimatične građe, sa retkim apendicesima na donjoj polovini kleistotecije, tamno mrke do crne boje, prečnika 92-135 μm (sl. 3-4). *Askusi*, kojih u kleistoteciji ima više, najčešće po četiri, su sa kratkom drškom, ali su prisutni i bez nje, hijalinski, veličine 60-72 x 37 μm . U askusima se obično formiraju četiri *askospore* koje su eliptične, glatkih zidova, hijalinske, 20-22,5 x 11,5-12,5 μm (sl.5-6).

Anamorf je registrovan i na plantažno gajenom kantarionu. *Konidiofore* su prave, jednostavne, sa cilindričnom bazalnom ćelijom na koju se nastavljaju dve kraće ćelije koje su približno iste dužine. Na osnovu tipa konidiofora određeno je da su one tipa »euoidium«. *Konidije* tipa »cichoracearum« se formiraju na vrhu konidiofore, po nekoliko u nizu, obično četiri do pet, hijalinske su, elipsoidne do izduženo cilindrične, dimenzija 24,2-36,5 x 17.5-32.6 μm (sl. 7-8). Konidije klijaju sa jednom dugom subapikalnom inicijalnom hifm.

Kao prouzročivači pepelnice na kantarionu u literaturi se navode *Erysiphe cichoracearum* var. *cichoracearum* (Frużyńska-Józwiak and Andrzejak, 2007), *Erysiphe hyperici* (Radaitienė et al., 2002), *Microsphaera hypericacearum* i *M.hyperici* (Braun, 1987; Glawe, 2004). Morfološke odlike patogena odgovaraju opisima koje navodi Braun (1987) za gljivu *Erysiphe cichoracearum* DC var. *cichoracearum*, koja do sada nije bio registrovan na kantarionu u Srbiji. Pored kantariona, ova vrsta gljive je registrovana i na lišću *Carum carvi*, *Levisticum officinale*, *Menta piperita* (Frużyńska-Józwiak i Andrzejak, 2007) i *Echinacea purpurea* (Sholberg et al., 1999).

Pošto do kraja vegetacije patogen zahvata skoro svo lišće obolelih biljaka, dalja istraživanja mogla bi biti korisna u određivanju uticaja infekcije na proizvodnju farmakološki aktivnih sastojaka kantariona u plantažnoj proizvodnji.



Sl. 1-8. - *Erysiphae cichoracearum* var. *cichoracearum*: obolele biljke kantariona u plantažnoj proizvodnji (Sl. 1. i 2); formirane kleistotecije na listu i lisnim drškama kantariona (Sl. 3.); izgled kleistotecija (Sl. 4.); kleistotecija sa izbačenim askusima (Sl. 5.); izgled askusa sa askosporama (Sl. 6.); konidije formirane u kratkom nizu (Sl. 7) i izgled konidija (Sl. 8.)

Fig. 1-8. - *Erysiphae cichoracearum* var. *cichoracearum*: diseased plants of cultivated St John's wort (Fig. 1-2); cleistothecia formed on leaves and leaf petioles of St John's wort (Fig. 3); appearance of cleistothecia (Fig. 4); cleistothecium with ejected asci (Fig. 5.); appearance of ascus with ascospores (Fig. 6.); conidia formed in a short chain (Fig. 7.) and appearance of conidia (Fig. 8.)

LITERATURA

- Becker H. (2000): Boosting the quality and potency of St. John's wort. *Agric. Res.* 48: 12-13.
- Braun, U. (1987): A monograph of the *Erysiphales* (powdery mildews). *Beihefte zur Nova Hedwigia* 89, J.Cramer, Berlin, 700 p.
- Conceição L.F.R., Franklin G., Ribeiro Catarina, Dias A.C.P. (2006): *Hypericum perforatum* Cultures as a Tool to Study Plant Defence Mechanisms Against Anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*). *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology Volume III*, 483-487, <http://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/8960/1/HypericumColletotrichumBookChapter2006.pdf>.
- Dobrić Silva., Popov V., Runjajić-Antić D. (2006): Farmakološka dejstva i terapijska primena kantariona. U: *Kantarion (Hypericum perforatum L.)*. Eds. Radanović D., Nastovski T., Menković N. *Monografska studija, IPLB »Dr. Josif Pančić«*, Beograd, 103-125.
- Frużyńska-Józwiak D. and R. Andrzejak (2007): The incidence of diseases and pathogenic fungi on selected medicinal and spice plant in the regia of Poznań. *Phytopathol. Pol.* 46: 47-51
- Glawe, D. A. 2004. First report of powdery mildew of *Hypericum perforatum* (St. John's-wort) caused by an anamorphic *Microsphaera* species in the Pacific Northwest. Online. *Plant Health Progress* , <http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/brief/2004/stjohns/>.
- Ivanović M., Duduk B., Radanović D., Lević Jelena., 2002 - The first report on St. John-s wort anthracnose in Serbia. II Conference on Medicinal and Aromatic Plant of Southeastern European Countries, Chalkidiki, Greece, 29.9- 03.10, 2002. Book of abstracts, pp 212.
- Keinath A.P., Rushing J. W., and Dufaul R. J.: First Report of Southern Blight Caused by *Sclerotium rolfsii* on St.-John's-Wort., *Plant Dis.* 83:696, 1999.
- Menković, N., Šavikin-Fudulović, K., Gojgić-Cvijović, G., Tasić, S., Vajs, V., Milosavljević. S. (2002): Antibacterial activiti of *Hypericum atomarium* Boiss. *Aerial arts*, 50th CA, Barselona.
- Pavlović Snežana, 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, Eds: Dragana Sekulović, Srboljub Maksimović, Jan Kišgeci, Institute for Medicinal Plant Research "Dr Josif Pančić" and FPAGRI, Belgrade, pp 339-346.
- Pavlović Snežana, Stojšin Vera, Stojanović S. (2007): *Hypericum perforatum* L. novi domaćin *Phomopsis* spp. XIII Simpozijum sa savetovanjem o zaštiti bilja sa međunarodnim učešćem, Zlatibor, 26-30.11., *Zbornik rezimea*, 130-131.
- Radaitienė D., Kačergius A., Radušienė J. (2002): Fungal diseases of *Hypericum perforatum* L. and *H. maculatum* Crantz. in Lithuania. *Biologija*, Nr. 1:35-37.

- Radanović D., Stepanović B., Jevđović, R. (1998): Mogućnost zasnivanja kulture kan-tariona (*Hypericum perforatum* L.) u uslovima suvog rataranja u ravničarskim regionima Srbije. V manifestacija “ Dani lekovitog bilja” Banja Koviljača (98). Zbornik izvoda, str. 123-124.
- Schwarczinger I. and Vajna L. (1998): First Report of St. John's-Wort Anthracnose Caused by *Colletotrichum gloeosporioides* in Hungary. Plant Disease, vol. 82 (6):711
- Sholberg P. L., Ginns J. H. and Li T. S. C.: First Report of Powdery Mildew, Caused by *Erysiphe cichoracearum*, on Coneflowers. Plant Dis. 83:694, 1999.
- Službeni glasnik RS« 31/2005
- Šavikin-Fudulović, K., Aljančić, I., Vajs, V., Menković, N., Macura, S. Gojgić, G., Milosavljević, S. (2003): Hyperatomarin, an antibacterial prenilated phloroglu-cinol from *Hypericum atomarium* s. Degenni, J. Nat. Prod. 66, 1236-1238.

(Primljeno: 11.05.2009.)

(Prihvaćeno: 29.06.2009.)

THE FIRST REPORT OF *ERYSIPHAE CICHORACEARUM* VAR. *CICHORACEARUM* ON ST. JOHN'S WORTH IN SERBIA

SNEŽANA PAVLOVIĆ¹, SAŠA STOJANOVIĆ², MIRA STAROVIĆ²

¹ Institute for Medicinal Plant Research »Dr J. Pančić«, Belgrade, Serbia

² Institute for Plant Protection and Environment, Belgrade, Serbia

SUMMARY

In May and June 2006 severe incidence of powdery mildew symptoms in a plantation of St. John's-wort (*Hypericum perforatum* L.) that has been cultivated as a medicinal plant at experimental fields of Institute for Medicinal Plant Researchin (Pančevo, Serbia) was observed. In September of the same year numerous clestothecia of the pathogen were formed on spontaneous plants of St. John's-wort at Vlasina Mounti (locality Vlasina Lake). White mycelial patches (approximately 5 mm in diameter) were observed on leaves, leaves petals and stems. At the end of summer mycelia covered leveas completely which and necroted and falldown before the end of vegetation, so such diseased plants were comlitletly unussefull as herb drug.

According to morphological features the fungus was determinated as *Erysiphe cichoracearum* var. *cichoracearum*. Powdery mildew pathogens have not previously been reported on St. John's-wort in Serbia.

Key words: St. John's-wort, *Hypericum perforatum* L., powdery mildew, *Erysiphe cichoracearum* var. *cichoracearum*

(Received: 11.05.2009.)

(Accepted: 29.06.2009.)

PRIMENA REP-PCR I NEKIH KLASIČNIH METODA U DETEKCIJI *XANTHOMONAS ARBORICOLA* PV. *PRUNI*

KATARINA GAŠIĆ, ALEKSA OBRADOVIĆ
Poljoprivredni fakultet, Beograd – Zemun

Xanthomonas arboricola pv. *pruni* spada u ekonomski veoma značajne fitopatogene bakterije u svetu. Njeno prisustvo u našoj zemlji nije do sada utvrđeno pa se s toga nalazi na nacionalnoj A1 listi karantinskih patogena. Karantinski status nameće potrebu kontrole zdravstvenog stanja biljnog materijala kojim bi se ovaj patogen mogao proširiti iz zaraženih područja u nove predele pa i u našu zemlju. Stoga su razrađene i od strane Evropske organizacije za zaštitu bilja (European Plant Protection Organization - EPPO) preporučene laboratorijske metode kojima se na standardizovan način može izvršiti detekcija i indentifikacija patogena (EPPO Standards PM 7/64 (1)). Odsustvo patogena u Srbiji imalo je za posledicu nedostatak praktičnog iskustva u prepoznavanju karakterističnih simptoma bolesti i detekciji navedenog patogena. Stoga smo u saradnji sa bakteriolozima na Univerzitetu Modena i Reggio Emilia, Italija, savladali najčešće korišćene laboratorijske tehnike neophodne za preliminarnu dijagnozu i detekciju patogena procedurama propisanim od strane EPPO i tako omogućili njihovu rutinsku primenu u Laboratoriji za fitobakteriologiju Poljoprivrednog fakulteta u Beogradu. Ovim radom prenosimo domaćoj naučnoj javnosti praktična iskustva u primeni pojedinih procedura.

Ključne reči: *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*, simptomatologija, detekcija, Rep-PCR

UVOD

Xanthomonas arboricola pv. *pruni* (Vauterin i sar., 1995, sin. *X. campestris* pv. *pruni* (Smith)) (u daljem tekstu *X. a.* pv. *pruni*), prouzrokovač je bakterioz-
ne pegavosti i rešetavosti lišća i rak-rana koštičavih voćaka (Arsenijević, 1997).
Otkrivena je početkom XX veka na japanskoj šljivi u Severnoj Americi (Smith,

1903) i do danas je njeno prisustvo utvrđeno na svim kontinentima gde se gaje koštičave voćke (EPPO Standards PM 7/64 (1)). Ova bakterija napada isključivo *Prunus* vrste, od kojih su najznačajnije šljiva (*P. domestica*, L.), nektarina (*P. persica*, var. *nectarina* (Ait.) Maxim.) i breskva (*P. persica*, L.) (Stefani i sar., 1989), mada je registrovana i na kajsiji (*P. armeniaca*, L.) (Scortichini i Simeone, 1997), bademu (*P. amygdalus*, L.) (Young, 1977; Panić i sar., 1998), trešnji (*P. avium*, L.) i višnji (*P. cerasus*, L.) (Scortichini i sar., 1996). Dokazano je da su vrste kinesko-japanske grupe (*P. japonica*, L. i *P. salicina*, L.) osetljivije prema ovom patogenu u poređenju sa evropskim vrstama (Bazzi i Mazzucchi, 1984; Topp i sar., 1989).

Bakterija se održava u granama i pupoljcima breskve i šljive tokom cele godine (Ritchie, 1995; Shepard i Zehr, 1994). Zaraženi pupoljci mogu služiti kao izvor inokuluma i njihovim korišćenjem u procesu kalemljenja dolazi do unošenja patogena u nove krajeve (Goodman i Hattingh, 1986; Zaccardelli i sar., 1998).

Parazit spada u ekonomski veoma štetne, gde se procenat obolelih plodova kreće od 25 – 74% (Arsenijević, 1997). U sezonama kada vremenski uslovi pogoduju širenju bolesti, gubici u prinosu osetljivih biljaka mogu biti i 100% (Ritchie, 1999). Patogen je prisutan na svim kontinentima, dok je u Evropi njegova pojava potvrđena u Bugarskoj, Italiji, Rumuniji, Ukrajni i Sloveniji pa se s toga nalazi na EPPO A2 listi karantinskih organizama (EPPO/CABI, 1997). Prisustvo *X. a. pv. pruni* nije do sada zabeleženo u našoj zemlji, pa se smatra karantinskim patogenom. Usled duge tradicije gajenja šljive u našoj zemlji i sve intenzivnije proizvodnje breskve i nektarine, pojava ovog patogena u nas bi u velikoj meri mogla ugroziti proizvodnju ovih kultura i naneti velike ekonomske gubitke, posebno imajući u vidu činjenicu da je ova bakterija prisutna u nama susednim državama sa kojima postoji intenzivna razmena sadnog materijala.

Detekcija i identifikacija patogena se uglavnom zasnivaju na korišćenju tradicionalnih metoda izolacije patogena (Schaad, 2001) na poluselektivne (Dhanvantari i sar., 1978) i selektivne podloge (Civerolo i sar., 1982), gde se nakon izdvajanja čistih kultura vrši karakterizacija na osnovu biohemijsko-fizioloških osobina i testova patogenosti (Lelliott i Stead, 1987; Randhawa i Civerolo, 1985; Vauterin i sar., 1990). U cilju skraćivanja vremena neophodnog za dobijanje rezultata, a takođe i povećanja osetljivosti metoda detekcije, primena molekularnih metoda postaje nezaobilazna. Pagani (2004) je dizajnirala specifične prajmere Y17CoF i Y17CoR, kojima se metodom lančanog umnožavanja fragmenata DNK (Polymerase Chain Reaction - PCR) umnožava deo genoma *X. a. pv. pruni* veličine 943 bp. Osim toga u primeni je i usko specifična metoda kojom se mogu diferencirati sojevi bakterija istog patogenog varijeteta i označena je kao Rep-PCR (Repetitive sequence-based PCR) (Louws i sar., 1994, 1995; Weingart i Volksch, 1997). Ova metoda se zasniva na umnožavanju fragmenata DNK koji se

nalaze između specifičnih, ponovljivih sekvenci u genomima prokariota (Louws i sar., 1998). Ove ponovljive sekvence su označene kao REP (Repetitive Extragenic Palindromic), ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergeneric Consensus) i BOX (Box elements) sekvence, za čije umnožavanje su dizajnirani istoimeni prajmeri. Umožavanjem delova DNK ograničenih ovim prajmerima, stvara se veliki broj DNK fragmenata različite veličine. Njihovim razdvajanjem na agaroznom gelu dobija se visoko specifičan genetski profil (Versalovic i sar., 1994; Louws i sar., 1998). Rep-PCR omogućava poređenje genetskog profila nepoznatog patogena sa sekvencama genoma poznate bakterije, kao i poređenje genoma različitih sojeva iste bakterije (Louws i sar., 1994, 1995) i može ukazati na raznovrsnost izolata unutar jednog patovara ili rase (Woods i sar., 1993; Louws i sar., 1994).

Obzirom da *X. a.* pv. *pruni* nije bio predmet detaljnijih proučavanja u nas, ukazala se potreba da se neophodno iskustvo u prepoznavanju simptoma, koje prouzrokuje na različitim domaćinima, kao i u primeni metoda detekcije, stekne u nekoj od istraživačkih ustanova evropskih zemalja učesnica projekta COST Action 873: Bakterioze koštičavih i jezgrastih voćaka (http://www.cost873.ch/0_home/index.php). Ovaj rad ima za cilj da domaćoj naučnoj javnosti prenesu naša iskustva u prepoznavanju simptoma i primeni metoda detekcije *X. a.* pv. *pruni*.

SIMPTOMI

Simptomi bakterioza često predstavljaju informacije od izuzetnog dijagnostičkog značaja. Iskustvo u prepoznavanju karakterističnih simptoma i njihovom razlikovanju od sličnih promena prouzrokovanih drugim faktorima biotske ili abiotske prirode u nekim situacijama može pružiti osnov za postavljanje preliminarne dijagnoze već prilikom njihovog posmatranja golim okom. Naše iskustvo u prepoznavanju simptoma infekcije bakterijom *X. a.* pv. *pruni* potiče od posmatranja simptoma u zasadima japanske šljive, breskve i nektarine u Italiji, zapažanja italijanskih bakteriologa (Stefani, lična komunikacija) i opisa simptoma u literaturi (Arsenijević, 1997; EPPO/CABI (1997); Jami i sar., 2005; EPPO Standards PM 7/64 (1)). Istočni deo regije Emilia Romagna u Italiji jedna je od najznačajnijih evropskih oblasti za proizvodnju breskve, šljive i kajsije. Obilazak terena je izvršen tokom juna 2008. godine. Tom prilikom simptomi su uočeni na japanskoj šljivi (*Prunus salicina* L.) sorte Sun i Angeleno, dok su se simptomi na breskvi i nektarini pojavili nešto kasnije, tokom jula meseca (Stefani, lična komunikacija).

Breskva

Na listovima breskve simptomi koje stvara *X. a. pv. pruni* se najpre zapažaju na naličju lista u vidu sitnih, svetlo-zelenih zona kružnog ili nepravilnog oblika sa svetlijim centrom. Uvećanjem, zone postaju vidljive i na licu lista, menjajući boju u tamno-smeđu do crnu. Vremenom nekrotične zone ispadaju prouzrokujući šupljakavost listova. Pege se najčešće nalaze na vrhu lista obzirom da je u tim delovima, usled zadržavanja kapljica kiše ili rose, najveća koncentracija bakterija. Često listovi poprimaju žutu boju i opadaju (EPPO Standards PM 7/64 (1)). Fenofaza u kojoj dolazi do infekcije je obično neposredno pre nego što listovi dostignu svoj puni razvoj. Na još nesazrelim plodovima breskve dolazi do pojave smeđih pega po površini, koje vremenom postaju ulegnute, sa vodenastim ivicama i često svetlo-zelenim oreolom. Usled prirodnog uvećavanja plodova dolazi do pucanja tkiva u blizini pega, koje se u početku slabije zapažaju ali kod jačih infekcija mogu znatno oštetiti površinu ploda. Veoma često se može zapaziti pojava smole koja ističe iz rana nastalih aktivnošću bakterija (EPPO Standards PM 7/64 (1)). U vršnim delovima mladara breskve i nektarine, u fenofazi cvetanja se zapažaju rak-rane, nakon čega vrhovi grana izumiru, dok je tkivo, neposredno ispod izumrlog dela, karakteristične tamne boje i u njemu su prisutne bakterije. Ovakve promene na granama su poznate pod nazivom „crni vrh“. Ukoliko do infekcija mladara dođe u toku sezone, stvaraju se tzv. letnje rak-rane u vidu vodenastih, tamno-ružičastih pega oko lenticela (EPPO Standards PM 7/64 (1)).

Šljiva

Na listovima šljive početni simptomi su nepravilne vodenaste pege, koje veoma brzo postaju crvenkasto-smeđe, zatim mrke nakon čega sledi nekroza zaraženih delova. Nekrotične zone ispadaju stvarajući perforacije na listovima (EPPO Standards PM 7/64 (1)). Simptomi na plodu šljive mogu biti različiti, od krupnih, ulegnutih pega crne boje koje su karakteristične za određene sorte, do sitnih rupičastih oštećenja na ostalim. Simptomi se pojavljuju 3-5 nedelja nakon precvetavanja i razvijaju se dok se menja boja ploda, tj. do početka procesa zrenja. Veoma često se simptomi pojavljuju nakon povreda nastalih kao posledica grada (EPPO Standards PM 7/64 (1)). Za razliku od breskve, rak-rane na mladarima šljive su višegodišnje i nastavljaju sa razvojem i na granama starim dve i tri godine. Obično dolazi do oštećenja unutrašnje kore što za posledicu ima razvoj dubokih rak-rana koje dovode do deformacije i izumiranja mladara (EPPO Standards PM 7/64 (1)).

Osetljivost biljaka prema *X. a. pv. pruni* se razlikuje u zavisnosti od vrste biljke domaćina i sorte. Kod veoma osetljivih sorti breskve, pri povoljnim uslo-

vima spoljašnje sredine, može doći do potpune redukcije prinosa. Pored breskve i nektarine, japanska šljiva, kajsija i badem spadaju takođe u veoma osetljive domačine. Evropska šljiva, koja dominira u našoj voćarskoj proizvodnji, spada u red manje osetljivih vrsta, što je jedan od razloga zbog čega ova bakterija nije prisutna kod nas.

MATERIJAL I METODE

Pregledom voćnjaka u rejonu provincije Ravenna i Forli-Casena, prikupljen je biljni materijal, pretežno listovi i plodovi japanske šljive sa simptomima pegavosti i nekroze. Uzorci su stavljeni u plastične vreće, obeleženi i čuvani u ručnom frižideru kako bi se zaštitili od visoke spoljne temperature i mehaničkih oštećenja. Ovako sakupljen zaražen biljni materijal iskorišćen je za laboratorijsku analizu i primenu testova detekcije *X. a. pv. pruni*.

Izolacija i izdvajanje čistih kultura

U cilju izolacije patogena, prikupljeni uzorci su obrađeni u fitobakteriološkoj laboratoriji primenom standardnih postupaka. Radi otklanjanja nečistoća sa površine, uzorci su oprani pod mlazom tekuće vode i prosušeni na filter-papiru pri sobnoj temperaturi. Izolacija patogena je vršena direktno iz obolelog biljnog tkiva, prethodno površinski dezinfikovanog 96% etanolom, uzimanjem fragmenata veličine 1-2 mm sa prelaza između zdravog i obolelog tkiva lista i ploda. Fragmenti su macerirani u nekoliko kapi sterilne destilovane vode u avanu pomoću tučka i posle nekoliko minuta macerat je razmazom pomoću petlje zasejan na GYCA podlogu (glukoza 10.0 g; kvaščevek ekstrakt 5.0 g; kalcijum karbonat 30.0 g; agar 20.0 g; destilovana voda do 1.0 L) radi dobijanja karakterističnih, ispupčenih, glatkih i sjajnih kolonija, svetlo žute boje. Petri posude sa zasejanom podlogom postavljene su u termostat pri 27°C. Umesto GYCA podloge može se koristiti i YDC podloga (kvaščevek ekstrakt 10.0 g; glukoza 20.0 g; kalcijum karbonat 20.0 g; agar 15.0 g; destilovana voda do 1.0 L). Pojava karakterističnih kolonija posmatrana je narednih 2-3 dana.

U cilju izdvajanja čistih kultura vršen je odabir kolonija karakterističnih za *X. a. pv. pruni* i njihovo dalje presejavanje na podlogu. Prethodno su bakteriološkom petljom pojedinačne kolonije ponaosob prenete u epruvetu sa sterilnom destilovanom vodom, zatim je suspenzija promešana pomoću rotacione tresilice i kap suspenzije razmazana na novu GYCA podlogu. Nakon 24h inkubacije u termostatu, ponovo su pojedinačne kolonije presejane na hranljivi agar (hranljivi bujon

23.0 g; agar 15.0 g; destilovana voda 1.0 L) i dalje korišćene u testovima za identifikaciju patogena.

Test patogenosti

Za proveru patogenosti izolata korišćeni su nesazreli plodovi japanske šljive. Suspenzija bakterija koncentracije 10^7 bakterija/ml je pipetom uneta u bunarčice napravljene na plodu šljive. Inokulisani plodovi su postavljeni u uslove povišene vlažnosti pri sobnoj temperaturi. Rezultati su očitavani nakon 7 dana.

Hipersenzitivna reakcija

Sposobnost testiranih sojeva da prouzrokuju hipersenzitivnu reakciju proverena je infiltracijom suspenzije bakterija u sterilnoj destilovanoj vodi, koncentracije oko 10^8 bakterija/ml medicinskim špricom i iglom u mahune boranije u fazi tehnološke zrelosti. Inokulisane mahune su zatim postavljene u vlažne uslove pri sobnoj temperaturi i nakon 1-2 dana su očitavani rezultati.

Rep-PCR

Za ekstrakciju DNK i Rep-PCR primenjena je modifikovana metoda Hennessy (1997). Korišćeni su REP, ERIC i BOX prajmeri. DNK je izolovana iz bakterija gajenih 24 h na hranljivom agaru u termostatu pri temperaturi od 27°C . Pojedinačna kolonija bakterija je petljom prenetu u mikroeprovetu sa $100\ \mu\text{l}$ $50\ \text{mM}$ NaOH i promešana pomoću tresilice pri maksimalnom broju obrataja u trajanju nekoliko sekundi. Zatim su mikroeprove postavljene u grejne blokove pri 100°C u trajanju 5 min nakon čega su prenete na led. Ovim postupkom dobijen je tzv. bazni lizat. Umesto grejnih blokova može se koristiti i vodeno kupatilo pri istoj temperaturi i vremenskom intervalu. Nakon 5 min hlađenja na ledu, u svaki bazni lizat dodato je po $900\ \mu\text{l}$ sterilne destilovane vode i nakon blagog mešanja suspenzije su stavljene u frižider pri temperaturi -20°C do sledeće upotrebe.

Sekvence prajmera (Louws i sar., 1999) korišćenih u radu su:

1. REP1R-I (5'-III ICG ICG ICA TCI GGC-3') i REP2-I (5'-ICG ICT TAT CIG GCC TAC-3');
2. ERIC1R (5'-ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C-3') i ERIC2 (5'-AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G-3');
3. BOXAIR (5'-CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G-3').

Umnožavanje fragmenata DNK vršeno je u $50\ \mu\text{l}$ reakcione smeše koja sadrži $1.5\ \text{mM}$ MgCl_2 , $200\ \mu\text{l}$ dNTPs, $50\ \text{pmol}$ prajmera, $2.0\ \text{U}$ *Taq* polimeraze i $5\ \mu\text{l}$ uzorka. Kao pozitivna kontrola korišćen je referentni soj *X. a. pv. pruni*

(IPV-BO 69VR) poreklom iz Verone, Italija, a kao negativna kontrola sterilna destilovana voda.

U zavisnosti od vrste prjmera koji se koriste, postoje tri programa PCR reakcije:

REP-PCR:

1 ciklus
početna denaturacija DNK (95°C - 7 min)
35 ciklusa
denaturacije DNK (94°C - 1 min)
vezivanja prajmera (40°C - 1 min)
sinteze fragmenata DNK - elongacija (65°C - 8 min)
1 ciklus
finalna sinteza (65°C - 16 min)

ERIC-PCR

1 ciklus
početna denaturacija DNK (95°C - 7 min)
30 ciklusa
denaturacije DNK (94°C - 1 min)
vezivanja prajmera (52°C - 1 min)
sinteze fragmenata DNK - elongacija (65°C - 8 min)
1 ciklus
finalna sinteza (65°C - 16 min)

BOX-PCR

1 ciklus
početna denaturacija DNK (95°C - 7 min)
30 ciklusa
denaturacije DNK (94°C - 1 min)
vezivanja prajmera (53°C - 1 min)
sinteze fragmenata DNK - elongacija (65°C - 8 min)
1 ciklus
finalna sinteza (65°C - 16 min)

Analiza PCR proizvoda

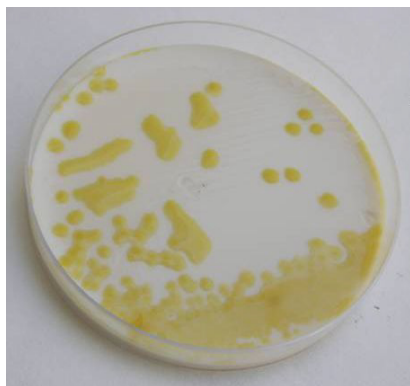
Umnoženi fragmenti DNK su razdvojeni procesom elektroforeze u 1.5% agaroznom gelu i 0.5 x TAE puferu pri naponu 80 V. Fragmenti su obojeni potapanjem gela u rastvor etidijum-bromida (100 µg/ 100 ml) u trajanju 20 min i posmatrani pod UV svetlom na transiluminatoru.

REZULTATI

U cilju savlađivanja metoda kojima se efikasno može izvršiti laboratorijska analiza materijala sumnjivog na prisustvo *X. a. pv. pruni*, prikupljeni su uzorci lišća i plodova japanske šljive i izvršena izolacija bakterija, proverena patogenost dobijenih izolata i njihova sposobnost izazivanja HR, a takođe je testirana i mogućnost preliminarne dijagnoze poređenjem genetskog otiska izolovanih sojeva sa poznatim sojem *X. a. pv. pruni*.

Izolacija

Kao rezultat izolacije bakterija direktno iz tkiva lišća i ploda japanske šljive došlo je do razvoja mnoštva bakterijskih kolonija na GYCA podlozi dva dana posle izolacije. Kako su kolonije bile još nedovoljno razvijene i neke od njih ispoljavale različite odgajivačke odlike, nije bila moguća pouzdana diferencijacija tipičnih kolonija patogena. Sledećeg dana uočeno je da na podlozi preovlađuju ispupčene, glatke i sjajne kolonije, svetlo žute boje, prečnika 2-3 mm, karakteristične za bakteriju *X. a. pv. pruni*. Daljim prečišćavanjem dobijene su čiste kulture (Slika 1) koje su održavane na hranljivom agaru i dalje korišćene u testovima za identifikaciju patogena.



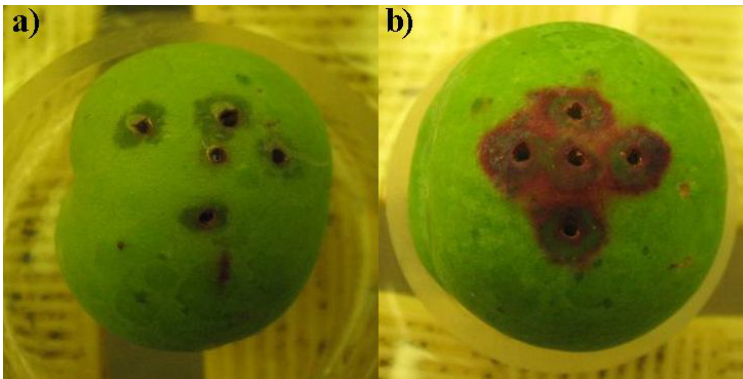
Sl. 1. - *X. a. pv. pruni*. Izgled pojedinačnih kolonija na GYCA podlozi.

Fig. 1. - *X. a. pv. pruni*. Single colonies on GYCA medium.

Za izolaciju patogena je poželjno koristiti materijal sa karakterističnim simptomima i to u ranijim fazama razvoja. Najpogodniji delovi biljke su listovi sa karakterističnim vodenastim pegama nepravilnog oblika, zatim nesazreli plodovi koji ispoljavaju simptome bolesti kao i mladari i grane sa rak-ranama. Izolacija iz plodova u procesu zrenja je veoma otežana, dok iz potpuno zrelih plodova nije moguća. Ukoliko na testiranom materijalu nema vidljivih simptoma bolesti, za izolaciju se koriste fragmenti mladara sa pupoljkom. Ovakav postupak se primenjuje prilikom testiranja sadnog materijala na prisustvo *X. a.* pv. *pruni* (EPPO Standards PM 7/64 (1)).

Patogenost

Patogene karakteristike proučavanih sojeva proverene su inokulacijom nezrelih plodova japanske šljive. Nakon 7 dana na mestu inokulacije pojavile su se vodenaste zone, svetlo-zelene boje (Slika 2a), dok je 5 dana kasnije došlo do nekroze tkiva i pojave tamno mrke boje oko bunarčića ispunjenih suspenzijom bakterija (Slika 2b).



Sl. 2. - *X. a.* pv. *pruni*. Test patogenosti na japanskoj šljivi sorte Angeleno, a) promene nakon 7 dana i b) nakon 12 dana (Foto: Enrico Biondi).

Fig. 2. - *X. a.* pv. *pruni*. Pathogenicity test on Japanese plum, cultivar Angeleno, a) symptoms after 7 days and b) symptoms after 14 days (Photo: Enrico Biondi).

Hipersenzitivna reakcija

Osim inokulacije delova biljaka domaćina, kao indikator patogenosti sojeva može poslužiti i test hipersenzitivnosti. Njegova prednost može biti u tome što se može izvesti na materijalu poreklom od različitih vrsta biljaka koje su na raspolaganju tokom cele godine za razliku od materijala biljaka *Prunus* spp. Ovom prilikom korišćene su mahune boranije. Pojava nekrotičnih zona tamno mrke boje, na mestu infiltracije suspenzije bakterija, uočena je nakon 24-48 h, što je predstavljalo znak pozitivne reakcije (Slika 3).



Sl. 3. - *X. a. pv. pruni*. Hipersenzitivna reakcija mahuna boranije (Foto: Emilio Stefani)

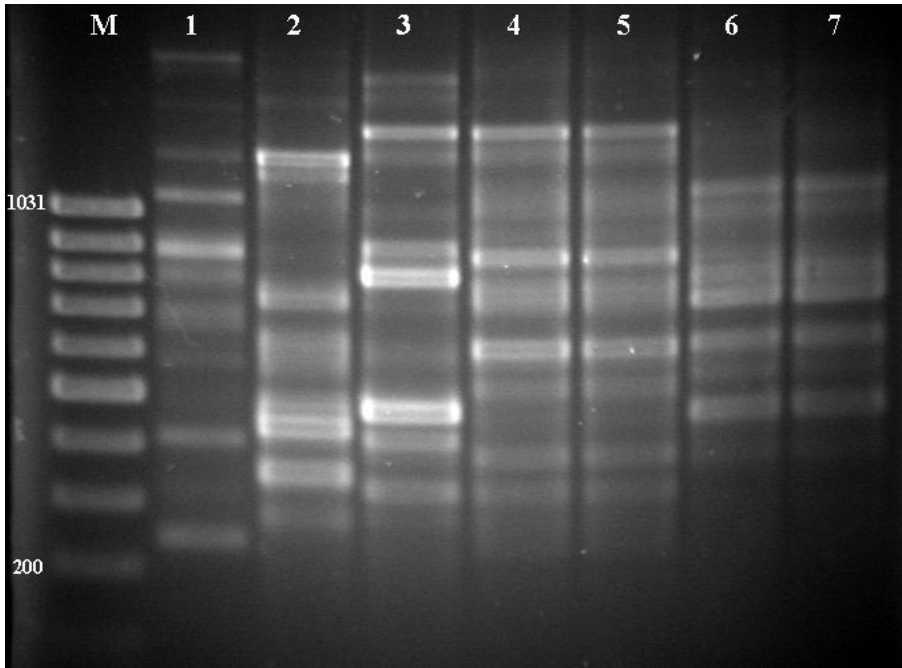
Fig. 3. - *X. a. pv. pruni*. Hypersensitive reaction of bean pods (Photo: Emilio Stefani)

Rep-PCR

Primena modernih metoda proučavanja takozvanog genetskog otiska ulazi u rutinsku upotrebu i predstavlja veoma efikasano i pouzdano sredstvo u determinaciji mikroorganizama. Njihova uloga u detekciji *X. a. pv. pruni* još uvek nije iskorišćena u potpunosti zbog nedovoljne specifičnosti ali ih svakako ne treba zanemariti. Jedan od univerzalnih metoda je Rep-PCR koji omogućava poređenje genetskog otiska nepoznatog soja sa referentnim i determinaciju bakterija do nivoa vrste, podvrste a u nekim slučajevima i patogenog varijeteta. Proučavani sojevi, izolovani iz japanske šljive su imali identičan genetski otisak kao i referentni soj *X. a. pv. pruni* (IPV-BO 69VR), čime je potvrđena pripadnost vrsti *X. a. pv. pruni*.

Ovaj test primenjen je i prilikom proučavanja izolata poreklom iz Srbije, gde su testirani sojevi izolovani iz plodova i lišća višnje i nektarine. Kao kontole, pored *X. a. pv. pruni*, korišćeni su i *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* i

Pseudomonas syringae pv. *morsprunorum*, poznati patogeni košičavih voćaka prisutni u nas. Na Slici 4 prikazan je genetski otisak sojeva testiranih u Srbiji uz korišćenje BOX prajmera.



Sl. 4. - Genetski otisak dobijen Rep-PCR metodom, korišćenjem BOX prajmera. (M – marker (Low Range, Fermentas); veličina fragmenata je izražena u baznim parovima. 1 - *X. a.* pv. *pruni* (KFB0104); 2 - *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* (KFB0101); 3 - *P. s.* pv. *syringae* (KFB0103); 4, 5, 6, 7 - pručavani sojevi izolovani iz višnje i nektarine (RKFB123, RKFB124, RKFB130, RKFB131).

Fig. 4. - PCR Fingerprinting patterns from genomic DNA obtained by using BOX primer sets. M: molecular size marker (Low Range, Fermentas); the sizes are indicated in base pairs. 1 - *X. a.* pv. *pruni* (KFB0104); 2 - *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* (KFB0101); 3 - *P. s.* pv. *syringae* (KFB0103); 4, 5, 6, 7 - strains isolated from sour cherry and nectarine (RKFB123, RKFB124, RKFB130, RKFB131).

DISKUSIJA

X. a. pv. pruni spada u ekonomski veoma značajne fitopatogene bakterije koje mogu u potpunosti ugroziti proizvodnju *Prunus* spp. Od do sada poznatih domaćina izdvajamo šljivu, breskvu, kajsiju i višnju, kao vodeće vrste koštičavih voćaka gajenih u Srbiji. Iako prisustvo ove bakterije nije do sada zabeleženo u nas, njeno poznavanje je od izuzetnog značaja zbog potencijalne opasnosti koju predstavlja. Ako bi se procenjivao rizik od pojave ovog patogena svakako bi trebalo uzeti u obzir podatak da areal rasprostranjenja obuhvata neke naše susedne zemlje, a takođe i brojnost potencijalnih domaćina na našoj teritoriji. Okolnosti u kojima je pri zasnivanju novih zasada u prošlosti dominirao domaći sadni materijal, kao i sortiment smanjene osetljivosti prema patogenu (npr. *P. domestica*), odnosno nezatno prisustvo japanske šljive (*P. salicina*) i ukrasne vrste *P. japonica* kao osetljivih domaćina, predstavljale su prirodne prepreke za *X. a. pv. pruni* i tako umanjile rizik od prodora i širenja u rejonima gajenja koštičavih voćaka u nas.

Zaraženi sadni materijal predstavlja jedan od glavnih načina prenošenja ovog patogena (Zaccardelli i sar., 1998). Kako bi se sprovele efikasne mere u održavanju karantinskog statusa *X. a. pv. pruni*, neophodno je koristiti specifične, brze i osetljive metode detekcije kako bi se bolest pravovremeno otkrila i preduzele odgovarajuće mere.

Prisustvo *X. a. pv. pruni* se može potvrditi tradicionalnim testovima koji podrazumevaju izolaciju patogena uz korišćenje selektivnih hranljivih podloga (Civerolo i sar., 1982) i proučavanje biohemijsko-fizioloških osobina (Gitaitis i sar., 1988; Schaad, 2001). Prema literaturi (Fahy i Persley, 1983, Schaad, 1988) bakterija je Gram-negativna, ne stvara oksidazu, ispoljava oksidativan metabolizam glukoze, vrši hidrolizu eskulina i želatina, ne hidrolizuje skrob i ne proizvodi ureazu, razvija se pri temperaturi od 35°C i u prisustvu 2% NaCl ali ne i u podlozi sa 5% NaCl. Bakterija stvara kiselinu iz arabinoze, galaktoze, saharoze i dekstrina dok je reakcija stvaranja kiseline iz laktoze, sorbitola, maltoze, glicina, triptofana i rafinoze negativna (Jami i sar., 2005). Kao pogodna podloga za izolaciju patogena pokazala se GYCA, na kojoj *X. a. pv. pruni* formira ispupčene, glatke i sjajne kolonije, svetlo žute boje. Slične kolonije može formirati i dosta rasprostranjena bakterija *Pantoea agglomerans* (sin. *Erwinia herbicola*), ali se dilema otklanja testom patogenosti i hipersenzitivnosti. Za izolaciju je poželjno koristiti materijal sa karakterističnim simptomima i to u ranijim fazama razvoja. Kasnije tokom vegetacije opada koncentracija bakterija u biljnom tkivu do nivoa koji se ne može detektovati. Ako je u pitanju sadni materijal u fazi mirovanja, neophodno je primeniti nešto drugačiji postupak ekstrakcije i izolacije (EPPO Standards PM7/64 (1)). Posebnu pažnju treba obratiti na adekvatnu veličinu uzorka za testi-

ranje i postupak koncentrovanja patogena kako bi se omogućila njegova detekcija u niskoj koncentraciji.

Patogenost sojeva se uglavnom proverava na biljci domaćinu i u tu svrhu korišćenje nesazrelih plodova japanske šljive ili breskve, gde se simptomi pojavljuju u vidu vodenastih, svetlo-zelenih zona oko udubljenja ispunjenih suspenzijom, predstavlja veoma pouzdan metod (Stefani, lična komunikacija). Osim plodova mogu se koristiti i listovi osetljivih sorti breskve i šljive (Randhawa i Civerolo, 1985). Inokulacija se vrši infiltracijom suspenzije bakterija koncentracije 10^7 bakterija/ml, medicinskim špricom bez igle, u tkivo lista sa naličja, nakon čega se biljke postavljaju u vlažne uslove pri sobnoj temperaturi i posmatra se razvoj bolesti. Hipersenzitivna reakcija mahuna boranije prema *X. a.* pv. *pruni* pokazala se veoma pouzdanim indikatorom patogenosti izolovanih sojeva, gde se na osnovu jasnih promena u vidu nekroze i mrke boje tkiva na mestu infiltracije suspenzije bakterija, može izvršiti diferencijacija patogenih sojeva od saprofita.

Navedeni klasični bakteriološki testovi su još uvek nezamenljiv sastavni deo identifikacije bakterija, ali zbog trajanja nisu uvek pogodni za detekciju gde je bitan faktor i brzina kojom se donose zaključci.

Pored konvencionalnog PCR testa gde se za detekciju *X. a.* pv. *pruni* koriste specifični prajmeri, danas posebno mesto zauzima Rep-PCR metoda koja uključuje korišćenje tri vrste prajmera, REP, ERIC i BOX. Ovaj metod se pokazao kao veoma efikasan za brzu identifikaciju fitopatogenih bakterija (Louws i sar., 1994; Opgenorth i sar., 1996). Pored toga što omogućava utvrđivanje genetske raznovrsnosti bakterijskih vrsta i diferencijaciju izolata u okviru istog patovara, posebna pogodnost je što se nekoliko prajmera može koristiti za različite rodove bakterija (Louws i sar., 1998). U radovima Dallai i Stefani (2007) prilikom proučavanja populacije *X. a.* pv. *pruni* u Italiji, Rep-PCR sa REP i BOX prajmerima dao je potpuno identičan genetski profil svih izolata uključujući i referentni soj IPV-BO 69VR. Za razliku od njih, ERIC prajmerima je izdvojeno nekoliko izolata koji su ispoljili izvesne razlike u genetskom otisku i na taj način potvrđeno je postojanje subpopulacija u okviru ovog patovara. Sam postupak izvođenja Rep-PCR se ne razlikuje od konvencionalnog PCR testa, s tim što je usled korišćenja tri vrste prajmera neophodno uraditi tri odvojene PCR reakcije što produžava vreme potrebno za dobijanje rezultata. Za razliku od klasičnog PCR-a gde sama pojava signala predstavlja pozitivnu reakciju, u Rep-PCR reakciji je neophodna komplikovanija i detaljnija analiza dobijenog genetskog otiska, što s druge strane omogućava pouzdano razlikovanje vrsta i patovara.

Štete koje *X. a.* pv. *pruni* stvara mogu dovesti do 100% gubitaka u prinosu, dok nastanak epidemije zavisi od više faktora. Kontinuirano kvašenje lišća najmanje 8 sati i temperatura vazduha viša od 24°C pozitivno utiču na razvoj bolesti. Primarna infekcija na listovima može nastati nakon kiše, pri temperaturi vazduha

od 18 do 20°C (Scortichini, 2007). Od ostalih faktora koji utiču na nastanak epidemije treba istaći veću gustinu sadnje u voćnjaku, površinsko navodnjavanje, peskovito zemljište i preteranu upotrebu đubriva. Bujne podloge takođe mogu povećati osetljivost biljaka. Lisni ožiljci, pupoljci i opalo lišće mogu poslužiti kao mesto za održavanje bakterije u zimskom periodu i doprineti širenju patogena narednog proleća (Scortichini, 2007).

Kontrola ovog patogena je znatno otežana. Standardna zaštita na bazi bakra stvara veoma jaku fitotoksičnost koja se ispoljava na lišću u periodu od proleća do jeseni. Pored toga, ustanovljena je rezistentnost sojeva *X. a. pv. pruni* na bakarne preparate (Dallai i Stefani, 2007), pa je s toga neophodan novi pristup u suzbijanju ovog patogena. Kao alternativa hemijskim sredstvima, posebna pažnja se posvećuje biološkoj kontoli gde se kao biološki agensi koriste bakteriofagi, virusi koji inficiraju bakterije, zatim bakterije antagonisti i različita hemijska jedinjenja koja indukuju otpornost biljaka. Civerolo i Kiel su još 1969. godine tretiranjem krošnje breskve fagima, sat vremena pre inokulacije bakterijom *X. a. pv. pruni*, umanjili intenzitet zaraze na 22% u poređenju sa 58% na kontrolnim biljkama. Saccardi i sar. (1993) su izolovali 8 faga aktivnih protiv ovog patogena, proučili njihovu litičku sposobnost i izdvojili one sa najširim spektrom dejstva (Zaccardelli i sar., 1992; Saccardi i sar., 1993). U Italiji su tokom 2008. godine proučavane bakterije antagonisti (*Pseudomonas fluorescens*, biovar 1) kao i acibenzolar-S-metil kao aktivator sistemične otpornosti u cilju biološkog suzbijanja ovog patogena. U eksperimentima *in vitro* i u poljskim uslovima dobijeni su ohrabrujući rezultati u suzbijanju patogena.

ZAHVALNICA

Ovaj rad je rezultat boravka prvog autora na Univerzitetu Modena i Reggio Emilia u Italiji, u okviru projekta COST Action 873 i programa Short - Term Scientific Mission pod nazivom: "Proučavanje populacije i biološka kontrola *Xanthomonas arboricola pv. pruni* u zasadima breskve"

Ovom prilikom zahvaljujemo se prof. dr Stefani Emili-ju, Dallai Davide-u i Biondi Enrice-u na pomoći tokom realizacije ovog programa.

LITERATURA

- Arsenijević, M. (1997): Bakterioze biljaka. S-print, Novi Sad.
- Bazzi, C., Mazzucchi, U. (1984): Update on the most important bacterial diseases of fruit crops in the nursery. *L'informatore Agrario* 34, 51–62 (in Italian).
- Civerolo, E. L., Kiel, H. L. (1969): Inhibition of bacterial spot of peach foliage by *Xanthomonas pruni* bacteriophage. *Phytopathol.* 63: 1279-1284.
- Civerolo, E. L., Sasser, M., Helkie, C., Burbage, D. (1982): Selective medium for *Xanthomonas campestris* pv. *pruni*. *Plant Dis.* 66: 39-43.
- Dallai, D., Stefani, E. (2007): Variability of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* population in peach orchards. Diagnostic and monitoring of bacterial disease of stone fruits and nuts. Joined meeting of working groups 1 and 2, Angers, France, COST Action 873.
- Dhanvantari, B. N., Dirks, V. A., Brown, R. J. (1978): Effectiveness of antibiotics for control of bacterial spot of peach in southwestern Ontario. *Can. J. Plant Sci.* 58: 953-959.
- EPPO Standards PM 7/64 (1) (2006): *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*. Diagnostic protocols for regulated pests. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 36, 129–133.
- EPPO/CABI (1997): *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*. In: *Quarantine Pests for Europe*, 2nd edn, pp. 1096–1100. CAB International, Wallingford (GB).
- Fahy, P. C., Persley, G. J. (1983): *Plant Bacterial Diseases. A Diagnostic Guide*. Academic Press, New York (US).
- Gitaitis, R. D., Hamm, J. D., Bertrand, P. F. (1988): Differentiation of *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* from other yellow-pigmented bacteria by the refractive quality of bacterial colonies on an agar medium. *Plant Dis.* 72: 416-417.
- Goodman, C. A., Hattingh, M. J. (1986): Transmission of *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* in plum and apricot nursery trees by budding. *HortScience* 21:995-996.
- Hennnessy, J. (1997): Repetitive sequences and polymerase reaction (rep-PCR) to fingerprint genomic DNA of bacteria. SOP No: PLH7-15.
- Jami, F., Kazempour, M. N., Elahinia S. A., Khodakaramian G. (2005): First Report of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* on Stone Fruit Trees from Iran. *J. Phytopathol.* 153, 371–372.
- Lelliott, R. A., Stead, D. E. (1987): *Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK.
- Louws, F. J., Rademaker, J. L. W., De Bruijn, F. J. (1999): The three Ds of PCR-based genomic analysis of phyto-bacteria: diversity, detection and disease diagnosis. *Annu. Rev. Phytopathol.* 37: 81-125.
- Louws, F. J., Bell, J., Medina-Mora, C. M., Smart, C. D., Opgenorth, D., Ishimaru, C. A., Hausbeck, M. K., De Bruijn, F. J., Fulbright, D. W. (1998): Rep-PCR-mediated

- genomic fingerprinting: A rapid and effective method to identify *Clavibacter michiganensis*. *Phytopathol.* 88: 862-868.
- Louws, F. J., Fulbright, D. W., Stephens, C. T., De Bruijn, F. J. (1995): Differentiation of genomic structure by rep-PCR fingerprinting to rapidly classify *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Phytopathol.* 85:528-536.
- Louws, F. J., Fulbright, D. W., Stephens, C. T., De Bruijn, F. J. (1994): Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathogens and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2286-2295.
- Opgenorth, D. C., Smart, C. D., Louws, F. J., De Bruijn, F. J., Kirkpatrick, B. C. (1996): Identification of *Xanthomonas fragariae* field isolates by rep-PCR genomic fingerprinting. *Plant Dis.* 80: 868-873.
- Pagani, M. C. (2004): An ABC transporter protein and molecular diagnoses of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* causing bacterial spot of stone fruits. Dissertation. Faculty of North Carolina State University.
- Panić M., Jovanović O, Antonijević D., Miladinović Z. (1998): The first appearance of bacterial plant pathogen *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* in Yugoslavia. *Zaštita bilja* 49: 285-94.
- Randhawa, P. S., Civerolo, E. (1985): A detached-leaf bioassay for *Xanthomonas campestris* pv. *pruni*. *Phytopathol.* 75: 1050-1063.
- Ritchie, D. F. (1999): Sprays for control of bacterial spot of peach cultivars having different levels of disease susceptibility. 1998. *Fung. Nematic. Tests* 54: 63.
- Ritchie, D.F. (1995): Bacterial Spot. Pages 50-52 in: *Compendium of Stone Fruit Diseases*, Ogawa, J. M., Zehr, E. I., Bird, G. W., Ritchie, D. F., Uriu, K., Uyemoto, J. K., eds. APS Press, St. Paul, MN.
- Saccardi, A., Gambin, E., Zaccardelli, M., Barone, G., Mazzucchi, U. (1993): *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* control trials with phage treatments on peaches in the orchard. *Phytopathologia Mediterranea* 32: 206-210.
- Schaad, N. W. (1988): *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*, 2nd edn, pp. 81-94. APS Press, St Paul (US).
- Schaad, N. W. (2001): *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*. 3rd. Ed. APS Press, St. Paul, USA.
- Scortichini, M. (2007): Present status of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* on stone fruits in Italy. Diagnostic and monitoring of bacterial disease of stone fruits and nuts. Joined meeting of working groups 1 and 2, Angers, France, COST Action 873.
- Scortichini, M., Simeone, A. M. (1997): Review of the bacterial diseases of apricot. *Rivista di Frutticoltura e di Ortofloricoltura* 59, 51-57 (na italijanskom).
- Scortichini, M., Janse, J. D., Rossi, M. P. Derks J. H. J. (1996): Characterization of *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* strains from different hosts by pathogenicity tests and analysis of whole-cell fatty acids and whole-cell proteins. *J. Phytopathol.* 144, 69-74.

- Shepard, D. P., Zehr, E. I. (1994): Epiphytic persistence of *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* on peach and plum. *Plant Dis.* 78: 627-629.
- Stefani, E., Bazzi, C., Mazzucchi, U., Colussi, A. (1989): *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* in Friuli peach orchards. *Informatore Fitopatologico* 39 (7-8), 60-63 (na italijanskom).
- Topp, B. L., Heaton, J. B., Russell, D. M., Mayer, R. (1989): Field susceptibility of Japanese-type plums to *Xanthomonas campestris* pv. *pruni*. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 29, 905-909.
- Vauterin, L., Hoste, B., Kersters, K., Swings, J. (1995): Reclassification of *Xanthomonas*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 45, 472-489.
- Vauterin, L., Swings, J., Kersters, K., Gillis, M., Mew, T. W., Schroth, M. N., Palleroni, N. J., Hildebrand, D. C., Stead, D. E., Civerolo, E. L., Hayward, A. A. C., Maraite, H., Stall, E. E., Vidaver, A. K., Bradbury, J. F. (1990): Towards an improved taxonomy of *Xanthomonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 40: 312-316.
- Versalovic, J., Schneider, M., De Bruijn, F. J., Lupski, J. R. (1994): Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods Mol. Cell. Biol.* 5: 25-40.
- Weingart H., Volksh, B. (1997): Genetic fingerprinting of *Pseudomonas syringae* pathovars using ERIC, REP and IS50 PCR. *J. Phytopathol.* 145:339-345.
- Woods, C., Versalovic, J., Koeuth, T., Lupski, J. R. (1993): Whole-Cell Repetitive Element Sequence-Based Polymerase Chain Reaction Allows Rapid Assessment of Clonal Relationships of Bacterial Isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 7: 1927-1931.
- Young, J. M. (1977): *Xanthomonas pruni* in almond in New Zealand. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 20, 105-107.
- Zaccardelli, M., Saccardi, A., Gambin, E., Mazzucchi, U. (1992): *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* bacteriophages on peach trees and their potential use for biological control. *Phytopathologia Mediterranea*, 31: 133-140.
- Zaccardelli, M., Malaguti, S., Bazzi, C. (1998): Biological and epidemiological aspects of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* on peach in Italy. *J. Plant Pathol.* 80:125-132.

(Primljeno: 04.05.2009.)

(Prihvaćeno: 29.06.2009.)

**PRIMENA REP-PCR I NEKIH KLASIČNIH METODA U DETEKCIJI
*XANTHOMONAS ARBORICOLA PV. PRUNI***

KATARINA GAŠIĆ, ALEKSA OBRADOVIĆ
Poljoprivredni fakultet, Beograd – Zemun

SUMMARY

Xanthomonas arboricola pv. *pruni* represents economically very important pathogen of stone fruits worldwide. This bacterium has not been detected in Serbia, and therefore is considered quarantine pathogen in this country. Its status in European countries and in Serbia requires inspection of imported planting material at the border check points, in order to protect introduction of the pathogen in our country. Therefore, methods for detection and identification of this pathogen were proposed and established by European Plant Protection Organization (EPPO). Absence of the bacterium in Serbia consequently resulted in lack of practical experience in symptomatology of the disease as well as detection methods. Thus, in collaboration with the colleagues from University of Modena and Reggio Emilia, Italy, we acquired common laboratory techniques recommended by EPPO for preliminary diagnosis and detection of the pathogen and enabled their routine use in Laboratory for phytobacteriology, Faculty of Agriculture, Belgrade. In this paper we presented our practical experience in applying some of these methods.

Key words: *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*, symptomatology, detection, Rep-PCR

(Received: 04.05.2009.)

(Accepted: 29.06.2009.)

PROUČAVANJE PROTEINSKIH PROFILA BAKTERIJE *PSEUDOMONAS SYRINGAE* IZOLOVANE SA RAZLIČITIH VRSTA VOĆAKA

ŽARKO IVANOVIĆ¹, SVETLANA ŽIVKOVIĆ¹, VELJKO GAVRILOVIĆ¹, MIRKO VESELIĆ²

¹Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Beograd,

²Visoka Poljoprivredna škola, Šabac

Bakterija *Pseudomonas syringae* ima veliki broj varijeteta sa različitim osobinama i sa velikom genetičkom raznovrsnošću. *Pseudomonas syringae* u Srbiji je eksperimentalno potvrđen kao parazit kruške, jabuke, breskve, trešnje, višnje, šljive i maline. Cilj ove studije bio je da utvrdi postojanje eventualnih razlika između sojeva izolovanih sa različitih vrsta voćaka u Srbiji proučavanjem elektroforetskih profila ukupnih ćelijskih proteina. Proučavane su takođe patogene i biohemijske odlike sojeva poreklom sa raznih vrsta voćaka. Dobijeni rezultati pokazali su da su populacije bakterije *Pseudomonas syringae* poreklom sa voća u Srbiji raznovrsne, ali da ne pokazuju razlike u elektroforetskim profilima ukupnih ćelijskih proteina.

Ključne reči: *Pseudomonas syringae*, voćke, proteinski profili

UVOD

Pseudomonas syringae postaje sve rasprostranjeniji patogen voćaka u Srbiji, prouzrokujući sve značajnije štete (Gavrilović, 2004; Gavrilović i Ivanović, 2008).

Na osnovu testova patogenosti i diferencijalnih (GATT) testova izolati poreklom sa voćaka u Srbiji su svrstani u tri grupe: I grupu čine tipični predstavnici patogenog varijeteta *syringae*; II grupu čine sojevi koji ispoljavaju karakteristike pv. *morsprunorum*; III grupa izolata poreklom iz mladara maline i plodova višnje

ispoljavaju karakteristike oba varijeteta ali i između sebe se značajno razlikuju. Stoga je neophodno, pored patogenosti i biohemijskih testova, pristupiti razradi novih metoda za pouzdanu identifikaciju patogena, pošto se samo na taj način mogu razraditi mere uspešnog suzbijanja.

Bakteriju *Pseudomonas syringae* je prvi put izolovao iz obolelog jorgovana (*Syringa vulgaris* L.) M. W. Beijerinck 1899. godine, a opisao njene karakteristike i dao naziv C. J. J. van Hall 1902. godine (Young, J. M. 1991). *Pseudomonas syringae* je aerobna, gramnegativna, asporogena i štapičasta bakterija sa lofotrihnim ili amfitrihnim rasporedom cilija (Arsenijević, 1997). Bakterije sa sličnim osobinama koje su kasnije izolovane iz velikog broja različitih biljnih vrsta, označene su kao patogeni varijeteti bakterije *Pseudomonas syringae*. Danas postoji 50 različitih patogenih varijeteta na različitim domaćinima (Sarkar i Guttman, 2004).

Prilagodavanjem na veliki broj domaćina *Pseudomonas syringae* ima veliki broj varijeteta sa različitim osobinama i sa velikom genetičkom raznovršnošću. U cilju opisivanja različitih patogenih varijeteta korišćeni su odgajivački, biohemijski i fiziološki testovi, kao i testovi nukleinskih kiselina (DNK hibridizacija, polimorfizam dužine restrikcionih fragmenata, PCR fingerprinting) (Legard i sar., 1993, Little i sar., 1998, Louws i sar., 1994, Scholz i sar., 1994, Young i sar., 1994). Rezultati testova generalno se slažu sa podelom napravljenom na osnovu biljke domaćina. Izuzetak je varijetet *syringae* izolovan sa jorgovana koji se još može naći na preko 80 različitih biljnih domaćina. Neke biljke mogu biti domaćini za dva ili više patogenih varijeteta od kojih je jedan varijetet *syringae*. *Pseudomonas syringae* je takođe pronađen da raste epifitno i endofitno na listu pri tom ne prouzrokujući nikakve simptome bolesti (Hirano i Upper, 2000).

Istraživanja u oblasti evolucije i sistematike bakterije *Pseudomonas syringae* otežana su nedovoljnim razumevanjem njihove raznovrsnosti (Sawada i sar., 1997). U ovakvoj situaciji cilj našeg istraživanja bio je traženje razlika između varijeteta na osnovu poređenja profila ukupnih ćelijskih proteina.

Pseudomonas syringae u Srbiji je eksperimentalno potvrđen kao parazit kruške, jabuke, kajsije, trešnje, višnje, šljive i maline, ispoljavajući simptome u vidu sušenja grana, plamenjače mladara i cvasti, nekroze pupoljka i plodova (Gavrilović, 2004, Gavrilović i sar., 2004). Našim istraživanjem napravljen je pokušaj utvrđivanja postojanja eventualnih razlika sojeva *Pseudomonas syringae* izolovanih sa raznih vrsta voćaka na osnovu analize ukupnih ćelijskih proteina.

MATERIJAL I METODE

U istraživanjima je proučeno 6 izolata poreklom sa kruške, jabuke, trešnje, šljive, višnje i maline (tab.1) sa različitih lokaliteta u Srbiji koji su izolovani u periodu 2005 - 2007 godine.

Kao kontrolni soj korišćen je izolat CFBP 11 (*P.s. pv syringae*) i izolat CFBP 1528 (*P.s. pv morsprunorum*) iz francuske kolekcije fitopatogenih bakterija (Angers).

Patogenost

Patogene odlike proučavanih izolata su proverene veštačkim inokulacijama plodova kruške, trešnje, limuna, listova jorgovana i mahuna boranije, prema uobičajenoj proceduri (Gavrilović, 2004). U cilju provere hipersenzitivne reakcije inokulisano je lišće duvana i muškatle infiltracijom bakterijske suspenzije koncentracije 10^7 cfu/ml (Arsenijević, 2004).

Tabela 1. - Broj izolata, domaćini, lokaliteti i godina izolacije
Pseudomonas syringae

Table 1. - Isolate number, host, locality and year of isolation
Pseudomonas syringae strains

Izolat – Strain	Domaćin - Host	Lokalitet – Locality	Godina - Year
IZB-193	Jabuka (Apple)	Bela Crkva	2007
IZB-26	Kruška (Pear)	Šabac	2008
IZB-8	Malina (Raspberry)	Arilje	2006
IZB-29	Trešnja (Cherry)	Šabac	2008
IZB-135	Višnja (Sour cherry)	Bela Crkva	2007
IZB-156	Šljiva (Plum)	Šabac	2004
CFBP-111			
CFBP-15821			

1 Kontrolni sojevi iz Francuske kolekcije fitopatogenih bakterija, CFBP - Reference strains from the French collection of plant pathogenic bacteria, CFBP

REZULTATI

Patogenost

Proučavani izolati su ispoljili značajnu heterogenost u pogledu patogenih odlika. Svi prouzrokuju HR duvana, ali u pogledu ostalih testova patogenosti sojevi ispoljavaju razlike.

Izolati sa kruške, jabuke i maline prouzrokuju nekroze na inokulisanim nezrelim plodovima kruške, trešnje, limuna, listova jorgovana i mahuna boranije što su tipične odlike bakterije *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*

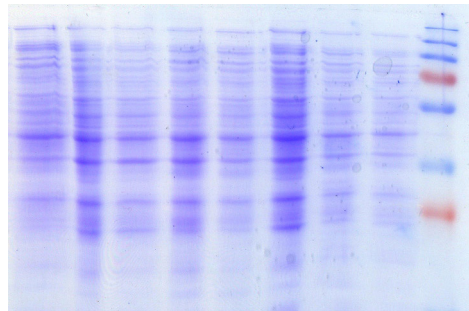
Tabela 2. - Biohemijske karakteristike izolata *P.syringae* poreklom sa različitih vrsta voćaka

Table 2. - Biochemical characteristics of *P. syringae* strain originated from different fruit trees

Biohemijske karakteristike - Biochemical characteristics	Izolati - Strains							
	IZB-26	IZB-193	IZB-29	IZB-135	IZB-156	IZB-8	CFBP-11	CFBP-1582
Fluorescencija - Fluorescent	+	+	+	+	+	+	+	+
O/F metabolizam glukoze - Glucose (O/F) metabolism	O	O	O	O	O	O	O	O
Stvaranje levana - Levan produc- tion	+	+	+	+	+	+	+	+
Aktivnost oksidaze - Oxidase activity	-	-	-	-	-	-	-	-
Aktivnost arginindehidrolaze - Arginidehidrolase activity	-	-	-	-	-	-	-	-
Aktivnost pektinaze - Pectinase activity	-	-	-	-	-	-	-	-
Hidroliza želatina - Gelatin hydrolysis	+	+	-	+	-	-	+	-
Hidroliza eskulina - Aesculin hy- drolysis	+	+	-	-	-	+	+	+
Stvaranje tirozinaze - Tyrosinase production	-	-	+	+	+	+	-	+
Metabolizam tartarata - Tartarte metabolism	-	-	+	-	+	+	-	+

Sojevi poreklom iz nekrotičnih pupoljaka trešnje i šljive i plodova višnje prouzrokuju nekrozu plodova trešnje a negativno reaguju pri ostalim testovima patogenosti što je karakteristično za bakteriju *P.s. pv morsprunorum*.

Na osnovu testova patogenosti proučavani izolati su svrstani u dve jasno izdiferencirane grupe. Prvu čine izolati poreklom iz kruške, jabuke i maline a drugu sojevi iz trešnje, višnje i šljive.



Sl. 1. - Proteinski profili ukupnih ćelijskih proteina poreklom sa kruške 1., jabuke 2., trešnje 3., višnje 4., šljive 5., maline 6. i referentni izolati CFBP 11, CFBP 1582, prestained protein ladder: 24, 33, 40, 55, 72, 100, 130, 170 kDa.

Fig. 1. - Protein profiles of whole cell proteins of pear 1., apple 2., cherry 3., sour cherry 4., plum 5., raspberry 6, referent strains CFBP 11, CFBP 1582, prestained protein ladder: 24, 33, 40, 55, 72, 100, 130, 170 kDa.

Bakteriološke odlike

Proučene su sledeće morfološke, odgajivačke i biohemijske odlike: bojenje po Gramu, korišćenjem metoda sa 3% KOH, stvaranje fluorescentnog pigmenta na King-ovoj podlozi B, metabolizam glukoze (O/F test) korišćenjem Hugh-Leifson podloge; stvaranje levana, aktivnost oksidaze, arginin dehidrolaze, pektinaze (LOPAT) testovi. Pored ovih odlika izvršeni su i diferencijalni biohemijski testovi za patogene varijetete *syringae* i *morsprunorum*: hidroliza želatina i eskulina, stvaranje tirozinaze i metabolizam tartarata (GATT) (Arsenijević, 1997; Kendrick - Brown i Sands, 2001; Gavrilović, 2004).

Izolacija ukupnih ćelijskih proteina

Bakterijske kulture su gajene na podlozi obogaćenju saharozom (NAS) (sucrose nutrient agar) 48 h na 25°C. Nakon toga su resuspendovane u 2 ml sterilne destilovane vode u tubama 160 mm x 16 mm u koncentraciji optičke gustine $A_{540} = 1$. Jedan ml suspenzije je prebačen u Eppendorf tube i centrifugiran na 6700 g 15 minuta. Dobijeni talog je resuspendovan u 0.9 ml pufera za uzorke (0.062 M Tris, 10% glicerol, 5% 2-β-mercaptoetanol, pH 6.8). Bakterijske ćelije su lizirane dodavanjem 0.1 ml 20% sodium-dodecilsulfata (SDS) i kuvanjem 10 minuta na 95°C. Nakon toga su centrifugirane 10 minuta na 10000 g.

Kvantitativno određivanje proteina (Lowry-jeva metoda)

Ova metoda se zasniva na biuretskoj reakciji peptidnih veza i jona bakra u alkalnoj sredini i reakciji fosfomolibdensko-fosfovolframskog reagensa sa tirozinom i triptofanom sadržanim u ispitivanim proteinima (Lowry i sar., 1951).

U postupku određivanja koncentracije proteina bez prethodnog taloženja u 0.2 ml uzorka dodaje se rastvor Cu_2CO_3 (3 ml) koji se dobija mešanjem 1% $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ (1 ml) i 2% K, Na-tartarata (1 ml) pa dopuni do 100 ml sa 2% NaCO_3 u 0.1 M NaOH. Nakon 15 min inkubacije uzorcima se dodaje 0.6 ml Folinovog reagensa razblaženog sa vodom u odnosu 1:2 (v/v) i ostavi 30 min. da se razvije boja. Po razvijanju boje očitava se apsorbancu rastvora proteina na talasnoj dužini svetlosti 500 nm naspram "slepe" probe u spektrofotometru Sgimatzu UV-160. Na osnovu vrednosti apsorbanci serije standardnih koncentracija albumina seruma govečeta (BSA) konstruisana je standardna kriva u funkciji koncentracije proteina. Ona je poslužila da se preko izmerenih apsorbanci uzoraka odrede koncentracije proteina koje su izražavane u $\mu\text{g/ml}$.

Elektroforetske tehnike

Za razdvajanje proteina u gelu na osnovu njihovih molekularnih masa koristi se poliakrilamidna elektroforeza u denaturišućim uslovima u prisustvu sodium-dodecilsulfata (SDS-PAGE). Jednodimenzionalno razdvajanje proteina po molekularnim masama rađeno je po modifikovanoj metodi (Sambrook i sar., 1989) koju je postavio Laemmli 1970. godine.

Poliakrilamidni gel ima funkciju inertnog matriksa kroz čije se pore proteini kreću pod uticajem električnog polja. Odnos komponenata akril- i bis-akrilamida

određuje veličinu pora i podešava se prema opsegu molekulskih masa proteina koji se razdvajaju.

Negativno naelektrisani molekuli SDS-a u puferu u kome se rastvaraju uzorci vezuju se svojim hidrofobnim delom za hidrofobne delove molekula proteina dajući im negativnu šaržu. SDS-polipeptidni kompleks migrira kroz poliakrilamidni gel u skladu sa molekulskom težinom polipeptida. Tokom elektroforeze negativno naelektrisani uzorci proteina u električnom polju kreću se ka pozitivnoj elektrodi kroz gel koji služi kao molekulsko sito.

Elektroforeze su rađene u V10 - CDC sistemu. Za elektroforetsko razdvajanje proteina korišćen je 12% poliakrilamidni gel u 0.375 M Tris-HCl, pH 8.8, 0.1% SDS, 0.05% amonijum-persulfat (AMPS) i 0.05% tetrametilendiamin (TEMED). Preko polimerizovanog gela naliva se 4% gel za skoncentrisavanje uzorka koji sadrži: 0.125 M Tris-HCl, pH 6.8, 0.1% SDS, 0.05% AMPS i 0.1% TEMED. Elektrodni pufer koji se naliva u rezervoare sadrži 0.192 M glicin, 25 mM Tris-HCl, pH 8.3, i 0.1% SDS (Laemmli 1970). Proteini se rastvoraju u puferu za uzorke: 2% SDS, 0.0625 M Tris-HCl, pH 6.8, 5% ME i 8.8% glicerol. U ovom puferu, proteini se denurišu zagrevanjem u ključaloj vodi u trajanju od 4 min. a potom se centrifugiraju na 10000 g 3 min. Pripremljeni uzorci proteina se ekvilibrišu na sobnoj temperaturi. Uzorci proteina putuju pod naponom od 0.12 kV u gelu za skoncentrisavanje, odn. 0.15 kV kroz gel za razdvajanje u trajanju od jednog sata. Po završetku elektroforeze gelovi su bojeni CBB-om (Coomassie Brilliant Blue R-250).

Bojenje gelova (Coomassie brilliant blue R-250)

Po završenoj elektroforezi gelovi se boje rastvorom Coomassie Brilliant Blue (CBB) R-250 boje u metanolu i glacijalnoj sirćetnoj kiselini u odnosu 1:0.3 radi vizuelizacije proteinskih traka. Odbojavanje se vrši u istom rastvoru metanola i sirćetne kiseline bez dodavanja boje.

DISKUSIJA

Fitopatogena bakterija *P. syringae* postaje sve rasprostranjeniji patogen voćaka u Srbiji. Pojavljuje se na novim domaćinima i prouzrokuje sve značajnije štete. Do sada je eksperimentalno potvrđena kao parazit kruške, jabuke, višnje, trešnje, šljive i maline (Gavrilović, 2004, Gavrilović i sar., 2004). Poslednjih godina ova bakterija na krušci, pored plamenjače cvasti, prouzrokuje i sušenje grana pa i čitavih stabala, kao i pegavost plodova nekih sorata višnje (Reksele,

Hajmanov rubin, Keleris), pri čemu oni nekrotiraju i otpadaju (u pojedinim godinama i do 60-70%). Plamenjača mladara i cvasti maline, prouzrokovana ovom bakterijom postaje sve rasprostranjenija bolest u centrima njenog gajenja.

Proučavani izolati su ispoljili izrazitu homogenost u testovima reakcije po Gramu, fluorescencije, oksidativnog metabolizma glukoze i LOPAT testova. Na osnovu ovih karakteristika je potvrđeno da pripadaju vrsti *Pseudomonas syringae* (Schaad, 2001; Gavrilović, 2004).

U pogledu patogenih svojstava sojevi su podeljeni u dve jasno izdiferencirane grupe. Prvu čine sojevi poreklom sa kruške, jabuke i maline koji ispoljavju patogene odlike tipične za pv. *syringae*. Drugu grupu čine sojevi izolovani iz trešnje, šljive i višnje koji ispoljavaju patogene odlike karakteristične za pv. *morsprunorum*. Ovi rezultati su u punoj saglasnosti sa podacima iz literature koji kazuju o različitim patogenim odlikama predstavnika ovih varijeteta (Arsenijević, 1997; Gavrilović, 2004; Gavrilović i Ivanović, 2008).

Tri grupe sojeva su izdiferencirane na osnovu rezultata biohemijskih testova (GATT). Prvu čine izolati sa jabuke, kruške i maline koji hidrolizuju želatin i eskulin a ne stvaraju tirozinazu i ne metabolišu tartarate. Ovo su odlike karakteristične za patogeni varijetet *syringae*. Drugu grupu čine sojevi poreklom sa trešnje i šljive koji negativno reaguju pri testovima hidrolize želatina i eskulina a stvaraju tirozinazu i koriste tartarate u svojim metaboličkim procesima. Dobijeni rezultati su u punoj saglasnosti sa literaturnim podacima (Burkowitz i Rudolph, 1994; Gavrilović, 2004). Sojevi poreklom sa ploda višnje su svrstani u treću grupu sa intermedijarnim karakteristikama koje ispoljavaju osobine pripadnika oba varijeteta, o čemu takođe ima podataka u literaturi (Sobiczevski, 1984; Gavrilović, 2004).

Vizuelnom ocenom broja i rasporeda traka u elektroforetskom profilu ukupnih ćelijskih proteina nije bilo moguće utvrditi razliku između ispitivanih bakterijskih izolata. Razlike koje postoje na genskom nivou između različitih sojeva bakterije *Pseudomonas syringae* nisu se odrazile na njihovih proteinski profil.

Dalja proučavanja u cilju pronalazjenja efikasnijih metoda za analizu proteina su u toku.

LITERATURA

- Arsenijević, M. (1997). Bakterioze biljaka Poljoprivredni fakultet Novi Sad.
- Burkowicz, A., and Rudolph, K. (1994). Evaluation of pathogenicity and of cultural and biochemical tests for identification of *Pseudomonas syringae* pathovars *syringae*, *morsprunorum* and *persicae* from fruit trees. *J. Phytopathology* 141: 59 - 76.
- Gavrilović, V. (2004). Patogene i biohemijsko fiziološke karakteristike bakterija roda *Pseudomonas* parazita voćaka. Doktorska disertacija, Poljoprivredni fakultet, Beograd, Zemun, 104 PP.
- Gavrilović, V., Milijašević, S., Arsenijević, M. (2004): *Pseudomonas syringae* parazit maline u Srbiji. *Jugoslovensko voćarstvo*, 38, 147-148: 183-190.
- Gavrilović, V., Ivanović, M. (2008): Karakteristike sojeva bakterije *Pseudomonas* izolovanih iz obolelih grana šljive. *Pesticidi i fitomedicina*, 23: 25-31.
- Hirano S. S. and Upper C. D. (2000). Bacteria in the Leaf Ecosystem with Emphasis on *Pseudomonas syringae*—a Pathogen, Ice Nucleus, and Epiphyte. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 64: 624 – 653.
- Kiewnick-Brown, A., Sands, D.C. (2001): Gram .negative bacteria: *Pseudomonas*. In : Schaad, N.W., Jonec, J.B., Chun, W. (Eds): *Laboratory Guide for Plant Pathogenic Bacteria*, APS, St. Paul, Minnesota, USA.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680 - 685.
- Legard, D. E., C. F. Aquadro, and J. E. Hunter. (1993). DNA sequence variation and phylogenetic relationships among strains of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* inferred from restriction site maps and restriction fragment length polymorphism. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 4180 – 4188.
- Lelliot , R.A., Stead, D.E. (1987) : *Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, Edinburgh
- Little, E. L., R. M. Bostock, and B. C. Kirkpatrick. (1998.). Genetic characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains from stone fruits in California. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3818 – 3823.
- Louws, F. J., D. W. Fulbright, C. T. Stephens, and F. J. de Bruijn. (1994). Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2286 – 2295.
- Lowry, O. H., Rosenbrough, W. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951). Protein measurements with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265 - 275.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*, Second edition (Cold Spring Harbor, New York: *Cold Spring Harbor Laboratory Press*).

- Sawada H, Takeuchi T., and Matsuda I. (1997). Comparative Analysis of *Pseudomonas syringae* pv. actinidiae and pv. phaseolicola Based on Phaseolotoxin-Resistant Ornithine Carbamoyltransferase Gene (*argK*) and 16S-23S rRNA Intergenic Spacer Sequences Applied and Environmental Microbiology. 63: 282 – 288.
- Sarkar S. F. and Guttman D. S. (2004). Evolution of the Core Genome of *Pseudomonas syringae*, a Highly Clonal, Endemic Plant Pathogen Applied and Environmental Microbiology, 70: 1999 – 2012.
- Sobiczewski, P. (1984). Etiology of sour cherry bacterial canker in Poland. Fruit Science Reports XI, No.4: 169 - 179.
- Scholz, B. K., J. L. Jakobek, and P. B. Lindgren. (1994). Restriction fragment length polymorphism evidence for genetic homology within a pathovar of *Pseudomonas syringae*. Appl. Environ. Microbiol. 60: 1093 – 1100.
- Young, J. M. (1991). Pathogenicity and identification of the lilac pathogen, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* van Hall 1902. Ann. Appl. Biol. 118: 283 – 298.
- Young, J. M., and C. M. Triggs. (1994). Evaluation of determinative tests for pathovars of *Pseudomonas syringae* van Hall 1902. J. Appl. Bacteriol. 77: 195 – 207.

(Primljeno: 08.05.2009.)

(Prihvaćeno: 29.06.2009.)

**STUDY OF WHOLE CELL PROTEIN PROFILES
OF *PSEUDOMONAS SYRINGAE* STRAINS ORIGINATING
FROM FRUIT TREES IN SERBIA**

ŽARKO IVANOVIĆ¹, SVETLANA ŽIVKOVIĆ¹,
VELJKO GAVRILOVIĆ¹, MIRKO VESELIĆ²

¹Institute for plant protection and environment, Belgrade

²High Agriculture School, Šabac

SUMMARY

Bacterium *Pseudomonas syringae* has numerous varieties with differentiated properties and is abundant in genetic diversity. *Pseudomonas syringae* has been experimentally identified in Serbia as a parasite of pear, apple, cherry, sour cherry, plum and raspberry. This study was designed to establish differences between the strains isolated from the fruit trees in Serbia with whole cell protein profiles analysis. The pathogenic and bacteriological characteristics of the isolates, cultivating, morphological and biochemical characteristics were studied. The obtained results demonstrate that the population of the bacterium *Pseudomonas syringae* from the fruit trees in Serbia is diverse, but do not show any difference in their whole cell protein profiles.

Key words: *Pseudomonas syringae*, fruit trees, protein profiles

(Received: 08.05.2009.)

(Accepted: 29.06.2009.)