

UTICAJ PH VREDNOSTI PODLOGE I SVETLOSTI NA RAST I SPORULISANJE KOLONIJA *VENTURIA INAEQUALIS*

GORAN ALEKSIĆ¹, SAŠA STOJANOVIĆ¹, MIRA STAROVIĆ¹, SLOBODAN KUZMANOVIĆ¹,
NENAD DOLOVAC¹, TATJANA POPOVIĆ²

¹ Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Beograd

² „EDUCONS“, Sremska Kamenica

Uticaj pH podloge i difuzne i veštačke svetlosti na porast i sporulaciju *Venturia inaequalis* ispitivan je *in vitro*. Optimalna pH vrednost za porast kolonija je pH 5,9 a na pH 8,0 utvrđena je najintenzivnija sporulacija patogena. Kiselost podloge utiče i na morfološki izgled kolonija.

Svetlost stimulatивно deluje na porast i sporulaciju patogena u odnosu na tamu, ali između veštačke i difuzne svetlost i dužine trajanja osvetljenja nema zakonitosti.

Ključne reči: *Venturia inaequalis*, pH vrednost podloge, svetlost, razvoj kolonija, intenzitet sporulacije.

UVOD

Proučavanje pojave smanjene osetljivosti patogena prema upotrebljavanim fungicidima je proces od izuzetne važnosti u uslovima sve intenzivnije zaštite poljoprivrednih kultura. Jedan od najznačajnijih patogena jabuke kao najintenzivnije gajene voćarske kulture, koji može izazvati ogromne štete na ovoj biljnoj vrsti, je *Venturia inaequalis* (Cooke) Winter, prouzrokovatelj čađave krastavosti ploda (Ivanović, 1992). Prema ovom patogenu sprovode se veoma intenzivne mere hemijske zaštite u cilju smanjenja šteta koje može izazvati u proizvodnji plodova ove voćne vrste. Ovakav pristup suzbijanju prouzrokovatelja čađave krastavosti jabuke rezultirao je pojavom smanjenje osetljivosti patogena prema upotrebljavanim fungicidima. U cilju proučavanja ove pojave u laboratorijskom

uslovima veoma je važno pored optimalne temperature i najpovoljnije podloge (Aleksić i sar. 2005; Borić i sar., 1994) utvrditi i optimalnu pH vrednost podloge i uticaj svetlosti radi jednostavnijeg i efikasnog gajenja i proizvodnje inokuluma patogena u uslovima *in vitro*.

MATERIJAL I METODE

Uticaj pH vrednosti podloge

Ispitivanje uticaja pH vrednosti podloge na porast i morfološke odlike kolonija gljive, vršeno je na čvrstoj hranljivoj podlozi od slada, dok je za utvrđivanje intenziteta sporulacije korišćena i ista kosa podloga u epruvetama. Vrednosti pH regulisane su metodom pH-metrijske titracije, dodavanjem hranljivoj podlozi 0,1 N HCl ili 0,1 N NaOH. Po završenoj sterilizaciji podloge, univerzalnim papir indikatorom (Advantec), vršeno je merenje novonastalih vrednosti na očvrslim podlogama, i tako izmerene vrednosti uzimane su za konačne tokom ispitivanja. One su iznosile: 3,0; 4,0; 4,5; 5,1; 5,9; 7,0; 8,0 i 9,0. Podloga sa pH 3,0 i 4,0 očvrsla je tek sa povećanim dodatkom agara i smanjenjem perioda sterilizacije sa 15 na 7 minuta, dok su podloge sa pH vrednostima 8,0; 9,0 i 10,0 posle sterilizacije uvek, ponovo imale pH vrednost 7,0. Da bi se održale pH vrednosti na nivou 7,0; 8,0 i 9,0 odustalo se od sterilisanja podloge u autoklavu, pa je sterilizacija vršena samo iskuvavanjem podloge u zatvorenim epruvetama u trajanju od 15 minuta. Podloga sa pH 10,0 je i posle sterilizacije otkuvavanjem ponovo imala pH vrednost 9,0 pa je to i ostala zadnja vrednost u skali pH vrednosti oglada.

Hranljive podloge su zasejavane fragmentom vazdušnog dela kolonije *V. inaequalis* koja potiče od monosporne kulture sa podloge od slada (Korhonen and Hintikka, 1980) i ostavljene su 6 nedelja u tami pri temperaturi od 20°C. Razvoj kolonija meren je svakih 7 dana (merenjem njihovog prečnika – najvećeg i najmanjeg), dok je za konačan porast uzet prečnik izmeren 42. dana od zasejavanja podloga (Borić, 1985 a, b, c). U tom vremenskom periodu utvrđivan je početak razvoja kolonije, praćeno je i obrazovanje reproduktivnih organa putem svakodnevnih pregleda kolonija i utvrđen intenzitet sporulacije odnosno gustina spora u 1 ml suspenzije (Aleksić i sar., 2005). Ogled je postavljen u 5 ponavljanja. Za ispitivanje je korišćen izolat iz Leskovca.

Uticaj svetlosti

Ispitivanje uticaja svetlosti vršeno je na čvrstoj hranljivoj podlozi od slada (u Petri kutijama prečnika 6 cm) pri temperaturi od 20°C. Kolonije su izlagane

uticaju veštačke i difuzne svetlosti u tarjanju od 8, 16, 24, 48 i 72 sata, a ukupan razvoj kolonija je trajao šest nedelja. Kontrolne kulture su držane u tami. Vrednosti intenziteta veštačke i difuzne svetlosti utvrđivane su luks-metrom.

Intenzitet svetlosti meren je luks-metrom u intervalima od 15 minuta, a po završenom ogledu izračunat je prosečan intenzitet osvetljenosti tokom izlaganja kolonija. Kulture koje su izlagane svetlosti, kao i one u marku, bile su pod približno istim uslovima temperature.

Intenzitet sporulacije, odnosno gustina spora u 1 ml suspenzije utvrđivana je posle 30 dana od zasejavanja podloga pomoću hemocitometra (Aleksić i sar., 2005).

Hranljive podloge su pojedinačno zasejavane fragmentom vazdušnog dela kolonije *V. inaequalis*, koji potiču od monosporne kulture sa podloge od slada. Oglad je postavljen u 5 ponavljanja.

REZULTATI

Dejstvo pH podloge na porast kolonija i sporulaciju *V. inaequalis*

Najveći porast kolonija je na slabo kiseloj podlozi (pH 5,9) (tabela 1). Međutim, i na umereno kiseloj (pH 5,1), kao i na neutralnoj (pH 7,0) podlozi, a takođe i na slabo baznoj (pH 8,0) i umereno baznoj (pH 9,0), patogen se dobro razvija, mada je na ovim podlogama ukupan porast kolonija vidno manji nego na slabo kiseloj podlozi (pH 5,9). Najmanji porast kolonija je na podlozi sa pH 9,0.

Kiselost podloge ima uticaja i na morfološke odlike kolonija *V. inaequalis*. Na nižim (pH 5,1 i 5,9), kao i na višim pH vrednostima podloge (pH 8,0 i 9,0), kolonije su tamno maslinaste boje bez vidljivo izraženog prstena po obodu. Na neutralnoj pH vrednosti, središnji deo kolonija ima svetlomaslinastu boju i rub tamnije nijanse. Kolonije na svim pH vrednostima su skoro pravilno kružnog oblika sa difuznom ivicom.

Tabela 1 – Uticaj različitih pH vrednosti podloge na porast kolonija *V. inaequalis*

Table 1 – Effect of medium pH on colony growth of *V. inaequalis*

pH podloge ^a	Početak razvoja kolonije (h)	Porast (mm) ^b	Dnevni porast kolonija (mm)
Medium pH	Start of colony growth (hr)	Growth (mm)	Daily colony growth (mm)
3,0	- ^c	-	-
4,0	-	-	-
4,5	-	-	-
5,1	48	33,1 b ^d	0,79
5,9	48	36,6 a	0,87
7,0	48	33,4 b	0,80
8,0	48	33,1 b	0,79
9,0	48	31,9 b	0,76

a Podloga od slada je podešena dodavanjem 0,1 N HCl ili 0,1 N NaOH na pH nakon sterilizacije na 3,0, 4,0, 4,5, 5,1, 5,9, 7,0, 8,0 i 9,0. – Malt extract agar was adjusted by 0,1 N HCl or 0,1 N NaOH to pH 3,0, 4,0, 4,5, 5,1, 5,9, 7,0, 8,0 and 9,0.

b Porast kolonija držanih u mraku pri 20°C meren nakon 6 nedelja. Podaci predstavljau proseke pet ponavljanja. – Colony growth at 20°C in darknes after 6 weeks

c Nema porasta – No colony growth

d Vrednosti u koloni obeležene istim slovom nisu statistički značajne na osnovu Dankanovog testa (P005) – Data in column marked with the same letter are not different significantly accordin Dunncan's multiple range test (P005)

Intenzitet sporulacije kolonija *V. inaequalis* takođe zavisi od kiselosti podloge. Najbolje sporulišu kulture na podlozi sa pH vrednošću 8. Na ostalim pH vrednostima intenzitet sporulacije kolonija je znatno slabiji. Kolonije na podlogama sa pH vrednošću 5,9 i 7,0 imaju u proseku skoro 3 puta slabiju sporulaciju nego one na podlozi sa pH vrednošću 8,0. Najslabiju sporulaciju imaju kolonije koje se razvijaju na podlozi sa pH vrednošću 9,0. (tabela 2)

Tabela 2 – Uticaj različitih pH vrednosti podloge na sporulaciju *V. inaequalis***Table 2** – Effect of medium pH on sporulation of *V. inaequalis*

pH podloge ^a	Br. konidija po mm ²	Gustina konidija u 1 ml (x 10 ⁴)
Medium pH	No og conidia on mm ²	Conidial density in 1 ml (x 10 ⁴)
3,0	-	-
4,0	-	-
4,5	-	-
5,1	-	-
5,9	8,81	44 062,5
7,0	7,56	37 812,5
8,0	27,31	136 562,5
9,0	4,44	22 187,5

Uticaj svetlosti na razvoj i sporulaciju patogena

U ispitivanjima uticaja svetlosti, čiste kulture *V. inaequalis*, uzgajane na podlozi od slada, izlagane su dejstvu veštačke i difuzne svetlosti i držane u tami. Kolonije *V. inaequalis* ispitivane tokom ovog oglada, izložene su približno istim uslovima temperature. Vrednosti intenziteta difuznog osvetljenja bile su od 220 do 940 lux-a (u proseku 638 luxa), a intenzitet veštačke svetlostio iznosio je 940 luksa.

Uslovi osvetljenja ne utiču značajno na početak razvoja micelije. Utvrđeno je da je kod svih tretmana micelija počela da se razvija posle 24 časa od zasejavanja podloga. Poredeći ukupan porast kolonija gljive pri različitim uslovima osvetljenja, uočava se da su najmanji porast imale kolonije gajene u tami (39,8 mm), dok su kolonije izlagane uticaju svetlosti imale veći porast (tabela 3). I pored toga, na osnovu dobijenih rezultata ne može se sa sigurnošću tvrditi koji uslovi osvetljenja i dužina ekspozicije stimulatивно deluju na porast kolonija, jer su razlike među tretmanima minimalne, a statističko poređenje podataka ukazuje na nepostojanje funkcionalne zavisnosti među njima. Međutim, generalno se može zaključiti da svetlost stimuliše razvoj micelije u odnosu na tamu, što se može videti i iz rezultata statističkog poređenja podataka.

Različiti uslovi osvetljenja nisu značajnije uticali na izgled, boju i strukturu kolonija *V. inaequalis*. Sve kolonije pa i one koje su se razvijale u tami približno

su iste boje, kružnog oblika sa difuznom ivicom. Takođe je utvrđeno da različiti uslovi osvetljenja nisu značajno uticali ni na početak i intenzitet sporulacije u kulturi. Početak sporulacije u svim varijantama utvrđen je posle 72 sata od početka razvoja micelije.

Tabela 3 – Uticaj svetlosti na razvoj kolonija *V. inaequalis*

Table 3 – Effect of artificial and diffuse light on colony growth of *V. inaequalis*

Period izlaganja (h)	Poč. razvoja	Porast kolonija – Colony growth (mm)	
Exposition (hr)	micel. (h)	Veštačka svetlost Artificial light	Difuzna svetlost Diffuse light
0		39,8 c	39,0 bc
8	24	40,7 bc	42,2 a
16	24	42,2 a	39,9 bc
24	24	40,0 c	39,5 c
48	24	41,7 ab	41,1 ab
72	24	41,2 ab	41,5 ab

Gustina spora utvrđena pomoću hemocitometra po Thom-u, kretala se od 312,5 spora/ml u kontroli i nekim varijantama ogleđa izlaganim uticaju svetlosti pa do 937,5 u drugim varijantama izlaganim veštačkoj (48^h) i difuznoj (72^h) svetlosti (tabela 4). Međutim, nema pravilnosti u intenzitetu sporulacije patogena među varijantama, pa se ne može sa sigurnošću tvrditi koji uslovi osvetljenja i u kom trajanju stimulatивно deluju na sporulaciju, ali je u globalu gustina spora veća u varijantama izlaganim uticaju svetlosti nego u kontroli u tami.

Tabela 4 – Uticaj svetlosti na intenzitet sporulacije (broj konidija u 1 ml) kultura *V. inaequalis***Table 4** – Effect of light on sporulation (no of conidia in 1 ml) of *V. inaequalis*

Izlaganje svetlosti (h) Exposition to light (hr)	Difuzna svetlost Diffuse light	Veštačka svetlost Artificial light
0	312	312
8	312	625
16	469	625
24	312	312
48	937	625
72	625	937

DISKUSIJA

Proučavajući porast na podlogama sa različitim pH vrednošću, ustanovljeno je da je najbolji porast kultura *V. inaequalis* na slabo kiseloj podlozi (pH = 5,9). Porasta nema na pH vrednostima podloge 3,0; 4,0 i 4,5, dok su ostale pH vrednosti, na kojima je bilo porasta kolonije (5,1; 7,0; 8,0; 9,0), slično uticale na porast kolonija i među njima nisu utvrđene statistički značajne razlike. Identične rezultate saopštili su Raa i Overeem (1968), prema kojima je optimalna za porast kolonija *V. inaequalis* *in vitro* pH vrednost oko 6,0 (loc.cyt. Mac Hardy, 1996). Iako je ispitivao različite izolate *V. inaequalis* na drugim vrstama hranljivih podloga, Wiesmann (1931) je takođe utvrdio da se u kiselijoj sredini, kulture bolje razvijaju nego na neutralnoj ili baznoj.

Kiselost podloge utiče i na morfološki izgled kolonija, a takođe i na intenzitet sporulacije *V. inaequalis*. Najbolje sporulišu kulture na podlozi sa pH vrednošću 8,0. Na ostalim ispitivanim pH vrednostima, intenzitet sporulacije patogena je znatno manji.

Različiti uslovi osvetljenja ne utiču značajnije na porast, morfološke osobine kolonija i sporulaciju *V. inaequalis*. Međutim generalno se može zaključiti da svetlost stimuliše porast kolonija u odnosu na uslove kontinuirane tame. Isti efekat svetlost ispoljava i na sporulaciju kolonija, koja je u ovom slučaju veća u varijantama izlaganim uticaju svetlosti nego u kontroli, u tami. Ovi rezultati se u potpunosti slažu sa rezultatima koje navodi Mac Hardy (1996), da različita dužina dana (osvetljenja) ne utiče na obrazovanje konidija, ali je u uslovima kontinuirane tame sporulacija redukovana za 32%.

LITERATURA

- Aleksić, G., Stojanović, S., Starović Mira, Kuzmanović, S., Trkulja, N. (2005): Porast i sporulisanje kolonija *Venturia inaequalis* na različitim temperaturama i podlogama. *Zaštita bilja*, Vol. 56 (1-4), N° 251-254, 77-86.
- Borić, B. (1985a): Uticaj visokih temperatura na klijavost konidija *Venturia inaequalis* (Cooke) Winter. *Zaštita bilja*, Vol. 36 (2), Br.172: 143-148.
- Borić, B. (1985b): Uticaj temperature na klijavost spora *Venutira inaequalis* (Cooke) Winter i uticaj starosti na njihovu vitalnost. *Zaštita bilja*, Vol. 36 (3), Br. 173: 295-302.
- Borić, B. (1985c): Rast kultura i obrazovanje reproduktivnih organa *Plesospora herbarum* (Pers. ex Fr.) Rabenh. na različitim temperaturama i pH vrednostima. *Zaštita bilja*, Vol. 36 (4), Br.174: 371-377.
- Borić, B., Draganić, M., Aleksić, G. (1994): Morfološke karakteristike izolata *Venturia inaequalis* sa teritorije Jugoslavije i odgajivačke vrednosti nekih hranljivih podloga. Treći jugoslovenski kongres o zaštiti bilja (Zbornik rezimea (38),48, Vrnjačka Banja).
- Ivanović, M. (1992): Mikoze biljaka. Nauka, Beograd, 1-521.
- Korhonen, K., Hintikka, V. (1980): Simple isolation and inokulation methods for fungal cultures. *Karstenia* 20: 19-22.
- MacHardy, E. W. (1996): Apple scab – biology, epidemiology and management. American Phytopathological Society, ST. Paul, Minnesota, 1-545.
- Wiesmann, R. (1931): Untersuchungen über Apfel und Birnenschofpilz *Fusicladium dendriticum* (Wallr.) Fckl. Und *Fusicladium pirinum* (Lib.) Fckl. sowie die Schorfanfälligkeit einzelner Apfel und Birnensorfen. *Landw. Jahrb. Schweiz.* 45: 109-156.

(Primljeno: 15.10.2009.)

(Prihvaćeno: 15.01.2009.)

**THE EFFECT OF PH AND LIGHT ON COLONY GROWTH AND
SPORULATION OF *VENTURIA INAEQUALIS***

GORAN ALEKSIĆ¹, SAŠA STOJANOVIĆ¹, MIRA STAROVIĆ¹, SLOBODAN KUZMANOVIĆ¹,
NENAD DOLOVAC¹, TATJANA POPOVIĆ²

¹Institute for Plant Protection and Environment, Belgrade, Serbia

²“EDUCONS”, Sremska Kamenica, Serbia

SUMMARY

The effect of medium pH and artificial and diffuse light on growth and sporulation of *Venturia inaequalis* was studied *in vitro*. Optimal pH for colony growth was 5,9 and at pH 8,0 the best sporulation of pathogen was detected. Morphology of coloneis depends on pH of medium. Both diffuse and artificila light stimulated colony growth and sporulation compared to the darkness, but there no regularities between sourece of light and exposure period.

Key words: *Venturia inaequalis*, coliny growth, sporulation, pH, light

(Received: 15.10.2009.)

(Accepted: 15.01.2009 .)

KARAKTERISTIKE IZOLATA *PSEUDOMONAS SYRINGAE* IZOLOVANIH SA KRUŠKE U SRBIJI

VELJKO GAVRILOVIĆ¹, ŽARKO IVANOVIĆ¹, SVETLANA ŽIVKOVIĆ¹, DUŠAN SAVIĆ²

¹Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Beograd
²„Agromarket“ d.o.o., Kragujevac

U radu su prikazani rezultati proučavanja fitopatogene bakterije *Pseudomonas syringae*, kao patogena kruške u Srbiji. Bolest se ispoljava u dva vida simptoma: palež cvasti i nekroza grana i debla mladih stabala kruške praćena obrazovanjem rak rana. Izolovani sojevi bakterije su Gramnegativni, fluorescentni, glukozu metabolišu isključivo u aerobnim uslovima (oksidativno). Stvaraju levan i prouzrokuju HR duvana ali ne stvaraju oksidazu, arginin dehidrolazu i pektinazu (LOPAT + - - - +).

Prouzrokuju nekrozu inokulisanih plodova kruške, trešnje, limuna, listova jorgovana i mahuna boranije. Proučavani izolati hidrolizuju želatin i eskulin ali negativno reaguju pri testovima stvaranja tirozinaze i metabolizma tartarata (GATT). Na osnovu patogenih i biohemijskih odlika zaključeno je da proučavani izolati ispoljavaju izrazitu sličnost sa *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, široko rasprostranjenim i ekonomski štetnim patogenom kruške.

Primenom PCR analize korišćenjem BOX prajmera potvrđena je izrazita homogenost sojeva poreklom sa kruške, izolovanih u Srbiji, ali izvesne razlike u odnosu na kontrolne sojeve, što potvrđuje ranije dokazanu raznolikost sojeva ove bakterije u zavisnosti od lokaliteta i područja iz kog su izolovani.

Na osnovu rezultata istraživanja dat je i predlog za uspostavljanje standardne procedure na bazi patogenih, biohemijskih i molekularnih metoda (primenom PCR) u cilju što brže i pouzdanije detekcije ove bakterije u biljnom materijalu, što je od velikog značaja pri proizvodnji sadnog materijala, proučavanja epidemiologije patogena i razrade mera njegovog suzbijanja.

Ključne reči: *Pseudomonas syringae*, kruška, patogene odlike, biohemijske odlike, PCR.

UVOD

Kruška (*Pyrus communis* L.) je domaćin brojnih fitopatogenih organizama ali se poslednjih godina po značaju kao paraziti ove voćne vrste posebno izdvajaju fitopatogene bakterije. Bakteriozna plamenjača jabučastih voćaka koju prouzrokuje *Erwinia amylovora*, eksperimentalno potvrđena u Srbiji 1989. godine, prouzrokovala je velike štete zasadima kruške, što je za posledicu imalo krčenje čitavih zasada. (Gavrilović i sar., 2001; Arsenijević i Gavrilović, 2007).

Poslednjih godina proizvodnja kruške se ponovo intenzivira u Srbiji, a u zasadima se pored simptoma bakteriozne plamenjače koju prouzrokuje *E. amylovora*, uočavaju i simptomi paleži cvasti i nekroze višegodišnjih grana i debla kruške koju prouzrokuje fitopatogena bakterija *Pseudomonas syringae* (Gavrilović i sar., 2003; Gavrilović, 2006; Gavrilović i sar., 2008).

S obzirom da se ova bakterija sve češće izoluje iz obolelih uzoraka kruške, cilj rada je da se detaljno opiše simptomatologija *P. syringae*, prouče patogene i bakteriološke odlike izolovanih sojeva i razrade metode njene pouzdane detekcije u biljnom materijalu. Tim pre, što pored navedenih fitopatogenih bakterija slične simptome na stablima kruške mogu prouzrokovati i drugi fitopatogeni organizmi (gljive, fitoplazme i dr.) (Starović i sar., 2006).

Namera je i da se postavi osnova za ustanovljenje standardnog protokola za pouzdanu i u što kraćem vremenskom roku moguću detekciju *P. syringae* u biljnom materijalu, radi pravovremenog preduzimanja mera suzbijanja. Od velikog značaja je i pozdana detekcija bakterije u reproduktivnom biljnom materijalu pošto je zaražen sadni materijal jedan od razloga sve intenzivnijeg širenja bakterije.

MATERIJAL I METODE

Uzorci sa karakterističnim simptomima na stablima kruške prikupljeni su iz više rejonu u Srbiji gde se kruška intenzivno gaji, u periodu 2003-2008. godine.

Izolovanje patogena vršeno je standardnom metodom razmaza na mesopeptonsku podlogu obogaćenu sharozom (NAS) i King-ovu podlogu B, koje se široko koriste za izolovanje bakterija roda *Pseudomonas* iz obolelih voćaka. Izdvojene pojedinačne kolonije, koje stvaraju levan i fluoresciraju na King podlozi B su zasejavane na mesopeptonsku podlogu obogaćenu sa 2 % glicerola radi čuvanja u kolekciji (Arsenijević, 1997; Gavrilović, 2006).

Patogenost proučavanih izolata proverena je infiltracijom suspenzije bakterija (10^7 cfu/ml) u mezofil lisnog tkiva duvana (sorte samsun) u cilju provere prouzrokovanja hipersenzitivne reakcije (HR) i inokulacijom nesazrelih plodova kruške, trešnje i limuna, mahuna boranije i listova jorgovana (Arsenijević, 1997; Klement, 1990; Gavrilović, 2006).

Od bakterioloških odlika proučene su najznačajnije za identifikaciju *P. syringae*: razlikovanje po Gramu stvaranje fluorescentog pigmenta na King-ovoj podlozi B, metabolizam glukoze; stvarnje levana, aktivnost oksidaze, pektinaze i arginin dehidrolaze (LOPAT); hidroliza želatina i eskulina, stvaranje tirozinaze i metabolizam tartarata (GATT).

BOX PCR

DNA izolacija

Ukupna genomaska DNK je izolovana iz bakterije korišćenjem modifikovane procedure koju je opisao Ausubel, 1992. Kulture bakterija su gajene na NAS mediumu 48 h na 25°C. Bakterijske ćelije su isprane sa sterilnom vodom i centrifugirane na 4,000 × g, 10 min na 4°C. Talog je resuspendovan dva puta sa 0.85% NaCl i jednom sa 0.1 M NaPO₄ puferom (pH 6.8). Ćelije su zatim tretirane sa 10% natrijum dodecil sulfatom (SDS) i pomešane sa 20 mg proteinaze K na 37°C, 1 h. Zatim je dodat NaCl do finalne koncentracije od 5 M i DNA je prečišćena korišćenjem rastvora 10% hexadecyltrimethyl ammonium bromida (CTAB) u 1 M NaCl na 65°C, 10 min. Ceo postupak je praćen sa fenol-hloroform i hloroform ekstrakcijom. DNA je nakon toga prečišćena pomoću izopropanolske precipitacije. Prečišćena DNK je rastvorena u Tris-EDTA (TE, 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0) i njena količina je izmerena spektrofotometrijski na 260 nm.

Umnožavanje DNA traka

Umnožavanje DNK traka je izvedeno u 25 µl reakcione smeše koja je se sastojala iz 67 mM Tris-HCl (pH 8.8), 25 mM MgCl₂, 125 µM dNTP, 2 U *Taq* DNA polimeraze (Fermentas, Lithuania) and 100 pmol of BOXAIR prajmera. Sterilna destilovana voda je korišćena kao negativna kontrola. BOX A prajmer sekvencu (BOXAIR [5'-CTAC GGCAAGGCGACGCTGACG-3']) (Lupski, 1992). PCR program za umnožavanje je izveden na aparatu model Mastercycler personal (Eppendorf, Hamburg, Germany.) prema sledećoj proceduri (de Bruijn, 1992): 1 inicijalni ciklus 7 min na 95°C; zatim 30 ciklusa denaturacije na 94°C po 1 min, hibridizacija prajmera 1 min na 52°C i polimerizacija 8 min na 65°C i nakon toga 1 završni ciklus polimerizacije od 16 min na 65°C. 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

Kao kontrolni sojevi u ovim istraživanjima korišćeni su CFBP 1582 (*P. s. pv. syringae*), CFBP 2119 (*P. s. pv. morsprunorum*) i CFBP 1430 (*E. amylovora*), svi poreklom iz Nacionalne kolekciji fitopatogenih bakterija, Angers, Francuska.

REZULTATI

Simptomi bolesti

Simptomi na krušci se ispoljavaju u dve forme: paleži cvasti i nekroze grana i debla. Palež cvasti se uočava rano s proleća, naročito posle kišovito i prohladnog vremena pred cvetanje i u fazi cvetanja a ispoljavaju se vidu nekroze cvasti koje postaju crne boje. Daljim širenjem bakterija zahvata i kratke grančice na čijim se vrhovima formira cvast, ali se ne širi dalje u višegodišnje grane. Ovo je značajna simptomatološka razlika između *P. syringae* i *E. amylovora* koja takođe prouzrokuje plamenjaču cvasti, ali se dalje intenzivno širi kroz višegodišnje grane. Simptomi paleži cvasti kruške prouzrokovani infekcijom ovom bakterijom zapaženi su na sortama Abate fetel, Santa Marija i Viljamova. Iako se palež cvasti iz godine u godini pojavljuje u sve većem intenzitetu za sada se ne može smatrati ekonomski značajnim, za razliku od nekroze grana i debla koje takođe prouzrokuje ova *P. syringae*.

Drugi tip simptoma koji ova bakterija prouzrokuje u zasadima kruške u nas, ispoljava se u vidu nekroze višegodišnjih grana i debla kruške (sl.1). Patološke promene ovog tipa se na stablima kruške uočavaju tokom maja i juna meseca sa značajnijim porastom temperatura, najpre u vidu izduženih, elipsoidnih nekroza Vremenom se epidermis odvaja od obolelog tkiva u vidu tankog, kao papir sloja, narandžaste boje po čemu se bolest u anglosaksonskoj literaturi naziva „paperous canker of pear“ (sl.2). Pojava ovakvih simptoma na deblu kruške često rezultira izmiranjem čitavog stabla, pošto nekroza debla zahvata prstenasto, čime se potpuno prekida dotok hranljivih materija, što je zabeleženo u zasadima sorata „Košija“ i „Santa Marija“ i „Viljamova“. Uklanjanjem površinskog sloja obolelog tkiva, uočava se nekroza ksilema i kambijuma crne boje. Na obolelim granama o deblu kruške *P. syringae* na formira bakterijski eksudat, što je takođe značajna razlika u odnosu na *E. amylovora* koja ga pri vlažnom vremenu obilato proizvodi, što se ispoljava u vidu kapi žute ili mrke (ćilibarne) boje. Identični simptomi na cvastima i granama kruške zapaženi su i u drugim područjima širom sveta gde se kruška intenzivno gaji, s tim što nekroza listova i plodova kruške te plamenjača mladara za sada nije primećena u našoj zemlji, što je u nekim područjima gajenja kruške u svetu značajan problem.



Sl. 1-2 - *P. syringae*. Nekroza debla kruške - prirodna zaraza (Sl. 1); Nekroza grana praćena ljuštenjem epidermisa (Sl. 2).

Fig. 1-2 - *P. syringae*. Pear tree trunk necrosis - natural infection (Fig. 1); Necrosis pear branch followed by epidermis peeling off (Fig. 2)

Izolovanje bakterije i provera patogenosti

Bakterija na mesopeptonskoj podlozi obogaćenoj sa 5 % saharoze (NAS) formira bledo sive kolonije levan tipa, prečnika 2-2,5 mm, a na King-ovoj podlozi B intenzivno stvara fluorescentni pigment.

Izolovani sojevi prouzrokuju HR duvana i nekrozu inokulisanih, nesazrelih plodova kruške (sorte viljamova, santa marija), trešnje (sorte burlat, van i sambarst) i limuna (nepoznate sorte) ispoljenih u vidu crnih nekrotičnih ulegnutih pega prečnika 3-5 mm. Simptomi se na plodovima trešnje pojavljuju već posle 24 časa od inokulacije, a na plodovima kruške i limuna posle 2-3 dana. Nekroza listova jorgovana započinje od lisnih drški, uronjenih u suspenziju bakterija i vrlo brzo zahvata lisne nerve prožimajući list u celosti, koji postaje crne boje. Na inokulisanim mahunama boranije oko mesta infiltracije suspenzije bakterija uočavaju se karakteristične mrke pege sa uočljivim narandžastim oreolom.

Identično njima se pri testovima patogenosti ponaša kontrolni soj CFBP 1582 (*P. s. pv. syringae*), dok kontrolni soj CFBP 2119 (*P. s. pv. morspruno-*

rum), prouzrokuje HR duvana i nekrozu plodova trešnje, dok na inokulisanim mahunama boranije prouzrokuje bledomrke pega oko mesta infiltracije, što je okarakterisano kao negativan rezultat. Na inokulisanim plodovima kruške, limuna i listovima jorgovana ovaj soj ne prouzrokuje nekrotične promene (tab. 1). Na osnovu rezultata testova patogenosti zaključeno je da se izolati sa kruške odlikuju patogenim odlikama karakterističnim za *P. s. pv. syringae*.

Tabela 1 - Patogene odlike sojeva *P. syringae* izolovanih iz kruške

Table 1 - Pathogenic characteristics *P. syringae* strains originated from pear

Patogenost Pathogenicity		Izolati - Isolates		
		CFBP 1582 ^a	CFBP 2119 ^b	CFBP 1430 ^c
Hr duvana- HR in tobacco	+ ^d	+	+	+
Plodovi kruške-Pear fruits	+	+	+	O ^f
Plodovi trešnje- Cherry fruits	+	+	+	O
Plodovi limuna- Lemon fruits	+	+	+	NT ^g
Listovi jorgovana-Syringae leaves	+	+	- ^e	NT
Mahune boranije- Bean pods	+	+	-	NT

a Kontrolni soj *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* - Check strain of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*.

b Kontrolni soj *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* - Check strain of *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum*

c Kontrolni soj *Erwinia amylovora* - Check strain of *Erwinia amylovora*

d Pozitivan rezultat - Positive result

e Negativan rezultat - Negative result

f Stvaranje eksudata - Oozing

g Nije testirano - Not tested

Kontrolni soj CFBP 1430 (*E. amylovora*) na inokulisanim plodovima kruške i trešnje prouzrokuje nekroze praćene obilnom produkcijom bakterijskog eksudata. Ovim sojem nisu inokulisani plodovi limuna, mahune boranije i listovi jorgovana, pošto ove biljke nisu domaćini *E. amylovora*.

Bakteriološke odlike

Proučavani izolati su gramnegativni, fluoresciraju na King-podlozi B a glukozu metabolizuju isključivo u aerobnim uslovima (oksidativno); stvaraju levan ali negativno reaguju pri testovima aktivnosti oksidaze arginindehidrolaze i pektinaze; hidrolizuju želatin i eskulin ali negativno reaguju pri testovima stvaranja tirozinaze i metabolizma tartarata. (tab. 2)

Tabela 2 - Biohemijsko-fiziološke odlike proučavanih izolata**Table 2** - Biochemical-physiological characteristics of investigated strains

Test Tests	Proučavani izolati Investigated strains	Kontrolni izolati Check strains	
		CFBP 1582 ^a	CFBP 2119 ^b
Gram-Gram	- ^c	-	-
Fluorescentnost- Fluorescens	+ ^d	+	+
O/F test	O	O	O
LOPAT			
Levan-Levan	+	+	+
Oksidaza-Oxidase	-	-	-
Pektinaza-Pectinase	-	-	-
Arginindehidrolaza-Arginindehidrolase	-	-	-
Hidroliza-Hidrolyses			
Želatin-Gelatine	+	+	-
Eskulin – Esculine	+	+	-
Stvaranje-Production			
Tirozinaze-Tyrosinase	-	-	+
Korišćenje- Utilization			
Tartarata-Tartrate	-	-	+

a Kontrolni soj *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* - Check strain of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*.

b Kontrolni soj *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* - Check strain of *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum*

c Negativan rezultat - Negative result

d Pozitivan rezultat - Positive result

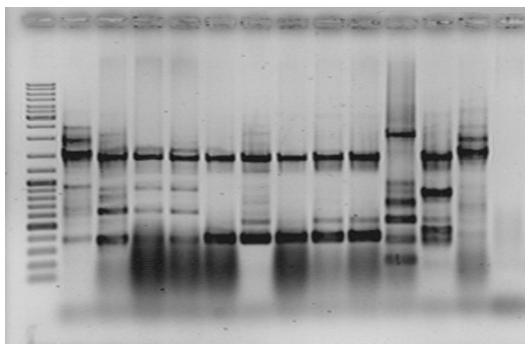
Kontrolni soj CFBP 1582 (*P. s.* pv. *syringae*) se pri navedenim testovima ponaša identično način proučavanim sojevima izolovanih sa kruške, dok kontrolni soj CFBP 2119 (*P. s.* pv. *morsprunorum*) ne razlaže želatin i eskulin, ali stvara tirozinazu i metabolizuje tartarate (tab. 2).

Na osnovu rezultata diferencijalnih biohemijskih testova za *P. s.* pv. *syringae* i *P. s.* pv. *morsprunorum* (GATT) proučavani sojevi izolovani iz nekrozom zahvaćenih grana i cvasti kruške svrstani u pv. *syringae*.

BOX - PCR

Mogućnost upotrebe BOX prajmera u identifikaciji *P. syringae* poreklom sa kruške nije razmatrana u nas. Naša hipoteza je bila, da će repetitivne DNK sekvence kod bakterije *P. syringae* poreklom sa kruške biti identične kod svih izolata bez obzira na poreklo. Ove repetitivne sekvence će se pokazati u vidu DNK fragmenata koji variraju u veličini.

Umnožavanjem ukupne DNK izolovane iz bakterija *P. syringae* poreklom sa kruške pomoću BOX prajmera dobijaju se nizovi DNK fragmenata veličine od 100 bp do 4000 bp koje zajedno čine „otisak“, karakterističan za svaki izolat. Dobijeni otisci su upoređivani sa otiscima dobijenim iz izolata poreklom sa jabuke, višnje, maline i šljive, kao i sa kontrolnim izolatima CFBP 1582 (*P. s. pv. syringae*) i CFBP 2119 (*P. s. pv. morsprunorum*). Otisci referentnih i ispitivanih izolata dati su na slici 3. Repetitivne BOX DNK sekvence dobijene iz izolata *P. syringae* poreklom iz kruške sa različitih lokaliteta dale su identične otiske na gelu. Otisci su pokazali jasnu razliku u odnosu na kontrolne izolate kao i u odnosu na izolate poreklom sa drugih voćaka (sl. 3).



Sl. 3 - *P. syringae*. Agarozna gel elektroforeza BOX-PCR repetitivnih sekvenci dobijenih iz izolata *P. syringae*. Kolona 1 pokazuje DNA marker (GeneRuler™ DNA Ladder Mix), CFBP-2119 (Kolona 2), CFBP-1582 (Kolona 3), *P. syringae* izolati sa višnje (Kolone 4 i 5), *P. syringae* izolati sa kruške (Kolona 6-10), *P. syringae* izolat sa maline (Kolona 11), *P. syringae* izolat sa jabuke (Kolona 12); *P. syringae* izolat sa šljive (Kolona 13) i negativna kontrola (Kolona 14).

Fig. 3 - *P. syringae*. Agarose gel electrophoresis of BOX-PCR fingerprint patterns obtained from *Pseudomonas syringae*. Lane 1 show the DNA molecular size marker (GeneRuler™ DNA Ladder Mix), CFBP-2119 (lanes 2), CFBP-1582 (lanes 3), *P. syringae* isolates from sour cherry (lane 4-5), *P. syringae* isolates from pear (lane 6-10), *P. syringae* isolate from raspberry (lane 11), *P. syringae* isolate from apple (lane 12); *P. syringae* isolate from plum (lane 13) and negative control (lane 14).

DISKUSIJA

Pseudomonas syringae parazitira brojne vrste jabučastih i koštičavih voćaka širom sveta i ubraja se u ekonomski značajne patogene ovih biljaka (Arsenijević, 1997; Scortichini i sar., 2003, Natalini i sar., 2006; Kenelly i sar., 2007). Kruška se svakako ubraja među osetljivije domaće ove bakterije, a štete koje nastaju kao posledice infekcije bakterijom zavise od ekoloških faktora, osetljivosti sorte, starosti stabla kruške i dr.

Spots i Cervantes (1994) navode masovnu pojavu izumiranja stabala kruške prouzrokovane ovom bakterijom, posle ekstremno niskih temperatura tokom zimskih meseci. Pojava paleži cvasti i listova kruške visokog intenziteta zabeležena u Južnoj Africi je takođe rezultirala velikim štetama (Mansvelt i Hatingh, 1986).

Proučavajući *P. syringae* kao parazita kruške (Natalini i sar., 2006) takođe ukazuju na široku rasprostranjenost ove bakterije kao patogena kruške i značajne gubitke koje pojedinih godina može prouzrokovati.

Bakterija je kao parazit kruške u Srbiji po prvi put opisana početkom sedamdesetih godina prošlog veka, prouzrokujući sušenje grana, plamenjaču mladara, te nekrozu listova i cvetova (Arsenijević, 1970). Intenziviranjem proizvodnje i podizanjem novih zasada kruške u prethodnoj deceniji, utvrđene su masovnije infekcije stabala kruške ovom bakterijom i zabeležene značajnije štete koje ona prouzrokuje. Naročito na mladim stablima starosti 3-6 godina, kalemljenim na dunji kao vegetativnoj podlozi (Gavrilović i sar., 2003, 2008).

Zapažena su dva tipa simptoma bolesti: nekroza i sušenje višegodišnjih grana i debla kruške, praćena obrazovanjem rak-rana i palež cvasti (Gavrilović i sar., 2003; Gavrilović, 2006). Međutim prilikom obilaska zasada kruške nisu zapaženi simptomi nekroze plodova, listova i mladara kruške, što se na osnovu literaturnih podataka smatra čestim simptomima bolesti (Mansvelt i Hatingh, 1986).

Simptomi bolesti su vizuelno veoma slični onima koje prouzrokuje *E. amylovora*, prouzrokovatelj bakterijske plamenjače jabučastih voćaka, ali postoje i neke vrlo značajne razlike i specifičnosti. Palež cvasti koju prouzrokuje *P. syringae* ograničena je na cvasti i cvetne drške, bakterije se ne širi dalje kroz grane već ostaje lokalizovana u regionu cvetnih grančica na kojima se obrazuju rak rane. Druga veoma važna razlika je odsustvo bakterijskog eksudata, koji se u slučaju infekcije bakterijom *E. amylovora* obilno pojavljuje na obolelim organima voćaka. Dalje, *P. syringae* na obolelim granama prouzrokuje nekrozu praćenu ljuštenjem epidermisa, a *E. amylovora* ne.

Ipak i pored navedenih razlika za pouzdanu detekciju prouzrokovaca obojenja neophodno je izvršiti izolovanje bakterije i proučiti njegove karakteristike. Tim pre što slične simptome na krušci mogu prouzrokovati i fitopatogene gljive

ali i fitoplazme (Starović i sar., 2006), ali i združene infekcije kruške bakterijama *P. syringae* i *E. amylovora* (Panić i Arsenijević, 1996, Gavrilović, 1998).

Izolovanje *P. syringae* moguće je tokom proleća i leta, a najuspešnije je odmah po pojavi simptoma bolesti, pošto je tada njena aktivnost najveća. U ove svrhe su se pogodnim pokazale mesopeptonska podloga obogaćena saharozom (NAS) i Kingova podloga B, a karakteristike kolonija bakterije (stvaranje levana i fluorescentnost) na ovim podlogama imaju važan dijagnostički karakter (Arsenijević, 1997; Kiernick-Brown and Sands, 2001; Gavrilović, 2006).

Primenjeni testovi za proveru patogenosti su veoma pouzdani, lako ostvarivi i široko se koriste u ove svrhe (Burkowitz i Rudolph, 1994; Scortichini i sar., 2003; Natalini i sar., 2006; Gavrilović, 2006). Prednost bi smo ipak dali onim testovima pri kojima se pouzdan rezultat dobija posle 1 - 3 dana od inokulacije a to su prema našim rezultatima provere patogenosti na nesazrelim plodovima trešnje, kruške i limuna te mahunama boranije (Gavrilović, 2006). Ukoliko se izolovanje *P. syringae* obavlja tokom jesenjih i zimskih meseci za proveru patogenosti se mogu koristiti klijanci kruške i kotiledoni listovi breskve koji su dostupni tokom čitave godine (Endert and Ritchie, 1984; Gavrilović, 2006).

U pogledu biohemijskih karakteristika proučavani izolati sa kruške ispoljavaju izrazitu uniformnost i pokazuju tipične odlike *P. s. pv. syringae*. Iako se izolati *P. syringae* odlikuju visokom biohemijskom aktivnošću, za pouzdanu identifikaciju su od najvećeg značaja rezultati GATT testova, koji su do pojave PCR metoda bili od velikog značaja za diferenciranje *pv. syringae* i *pv. morsprunorum*, kao dva najrasprostranjenija patogena varijeteta ove bakterije (Latorre i Jones, 1979; Burkowitz i Rudolph, 1994; Arsenijević, 1997). Nedostatak ove grupe testova je relativno dug period do dobijanja validnih rezultata. Takođe izolovani su i sojevi koji se odlikuju intermedijarnim svojstvima u pogledu ove grupe biohemijskih karakteristika. Raznolikost populacije sojeva *P. syringae* pri ovim testovima utvrđena je na onim izolovanim sa nekih vrsta koštičavih voćaka. U pogledu rezultata ovih testova proučavani izolati sa kruške ispoljavaju izrazitu uniformnost hidrolizuju želatin i eskulin, ne stvaraju tirozinazu i ne metabolišu tartarate (Sobiczevski, 1984; Balaž i sar., 1988; Gavrilović 2006).

Primena metode lančane reakcije polimeraze (PCR) primenom BOX prajmera se pokazale veoma pouzadane za detekciju *P. syringae* ali i drugih vrsta bakterija. Korišćenjem pak ERIC i REP prajmera moguće je utvrditi potencijalne razlike među sojevima, što je od velikog značaja za proučavanje fitopatogenih bakterija. Utvrđivanje razlika među sojevima je od značaja za proučavanje epidemiologije bakterije, razrada mera njenog suzbijanja ali je značajna i za potrebe fitosanitarnih službi odnosno pouzdane detekcije patogena, naročito karantinskih (Scortichini, 2005; Gašić i Obradović, 2009).

Primenom ovih metoda utvrđene su razlike kako među sojevima *P. syringae* poreklom sa različitih domaćina, a potvrđeno je postojanje diverziteta među izolatima iz različitih geografskih lokaliteta.

Little i sar. (1998) su primenom ERIC PCR metode su utvrdili da se sojevi *P. s. pv. syringae* poreklom sa koštičavih voćaka u Kaliforniji, značajno razlikuju od sojeva ove bakterije izolovanih sa drugih domaćina i da u okviru populacije predstavljaju posebnu grupu (klaster). Natalini i sar. (2006) ističu da je primenom REP PCR i BOX A1 prajmera utvrđene tri različite grupe sojeva *P. s. pv. syringae* poreklom sa kruške iz Grčke, Italije, Španije i Engleske.

Primenom BOX prajmera utvrđene su značajne razlike među sojevima *P. syringae* poreklom sa različitih vrsta voćaka u Srbiji. Izolati sa kruške su pokazali izrazitu uniformnost među sobom, ali se delimično razlikuju od kontrolnog soja *P. s. pv. syringae* poreklom iz Francuske. To ukazuje da je pri daljem proučavanju ove bakterije kao patogena kruške u nas neophodno koristiti i ERIC i REP prajmere a proučavanjem 16SrRNK regiona naših sojeva što preciznije ih pozicionirati u odnosu na izolate sa kruške poreklom iz drugih lokaliteta (Ivanović i sar., 2009).

LITERATURA

- Arsenijević, M. (1970): Prilog proučavanju *Pseudomonas syringae* van Hall kao parazita kruške u Jugoslaviji. Zaštita bilja, Vol. XXI, Br. 110-111: 301-307.
- Arsenijević, M. (1997): Bakterioze biljaka. III izmenjeno i dopunjeno izdanje. S-Print, Novi Sad, 576 p.
- Arsenijević, M., Gavrilović, M. (2007): Praktični priručnik o bakterioznoj plamenjači jabučastih voćaka i ukrasnih biljaka, Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu Beograd, pp 80
- Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl. (1992): Current protocols in molecular biology, vol. I. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York.
- Balaž, J., Arsenijević, M., Vojvodić, Đ. (1988): Etiološka proučavanja bakteriozne nekroze plodova i lišća višnje i mogućnost suzbijanja parazita. Zaštita bilja, Vol. 39 (3), Br.185: 311-321.
- Brown-Kiewnick, A., Sands D.C. (2001): *Pseudomonas*. In: Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. (Eds. N. Schaad, J. B. Jones, and W.Chun), 84-117. APS PRESS The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota.
- Burkowicz, A., 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.

- de Bruijn, F. J. (1992): Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergeneric consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:2180–2187.
- Endert Elke, Ritchie, D. F. (1984): Detection of pathogenicity, measurement of virulence, and determination of strain variation in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Plant Disease* 68: 677-680.
- Gašić, K., Obradović, A. (2009): Primena REP-PCR i nekih klasičnih metoda u detekciji *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*. *Zaštita bilja*, Vol. 60 (1), N° 267: 19-37.
- Gavrilović, V., (1998): Bakteriološke odlike *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al. različitog porekla, *Zaštita bilja*, Vol. 49 (2), Br. 224: 121-167.
- Gavrilović, V., Arsenijević, M., Panić, M., Jovanović, Gordana (2001): Rasprostranjenost *Erwinia amylovora* u SR Jugoslaviji i mere suzbijanja. *Zaštita bilja*, Vol. 52 (3), N° 237:141-158.
- Gavrilović, V. (2006): Patogene i biohemijsko fiziološke karakteristike bakterija roda *Pseudomonas* parazita voćaka, *Zaštita bilja*, Vol. 57 (1-4), N° 255-258: 5-55.
- Gavrilović, V., Milijašević, S., Arsenijević, M. (2003): Bakteriozna nekroza debla i izumiranje mladih stabala kruške. VI Savetovanje o Zaštiti bilja, Zlatibor, 24-28. novembar, 2003, Zbornik rezimea: 83.
- Gavrilović, V., Ivanović, Ž., Živković, S. (2008) : *Pseudomonas syringae* – patogen kruške u Srbiji, XIII Kongrs voćara i vinogradara Srbije sa međunarodnim učešćem, Novi Sad, 27-30. 10. 2008. Knjiga abstrakata : 59.
- Ivanović, Ž., Živković, S., Starović, M., Jošić, D., Stanković, S., Gavrilović, V. (2009): Diversity among *Pseudomonas syringae* strains originating from fruit trees in Serbia. *Archives of Biological Science*, 61 (4): 863-870.
- Ivanović, M., Gašić Katarina, Čalić Anđelka, Obradović, A. (2009): Analiza genoma sojeva *Erwinia amylovora* elektroforezom u pulsirajućem električnom polju. VI Kongres o zaštiti bilja sa simpozijumom o biološkom suzbijanju invazivnih organizama, Zlatibor, 23-27.11. 2009. Zbornik rezimea, str. 57-58
- Kenelly, M., K., Cazorla, F., M, deVicente, A., Ramos, C., Sundin, G.,W.(2007): *Pseudomonas syringae* disease of fruit trees. Progress toward understanding and control. *Plant Disease*: 91: 4-17.
- Klement, Z (1990): Inoculation plant tissues. Canker and dieback disease. In: *Methods in Phytobacteriology*. (Eds. Z. Klement, K. Rudolph, and D. Sands), 105-106. Akademiai Kiado, Budapest, 1990.
- Latorre, B., A., Jones A.L. (1978): *Pseudomonas morsprunorum*, the Cause of Bacterial Canker of Sour Cherry in Michigan, and its Epiphytic Association with *P. syringae*. *Phytopatholog*, 69: 335-339.

- Little, E. L., Bostock, R. M., Kirkpatrick, B. C. (1998): Characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Strains from Stone Fruits in California, Applied and Environmental Microbiology, 64: 3818-3823.
- Louws, F. J., Fulbright, D. W., Stephens, C. T., De Bruijn, F. J. (1994): Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. Appl. Environ. Microbiol. 60: 2286-2295.
- 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.
- Lupski, J. R., G. M. Wetnstock (1992): Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genotnes. J. Bacteriol, 174: 4525-4529.
- Mansvelt, L. E., Hattingh, M. J. (1986): Blossom blast in South Africa caused by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. Plant Pathology 35: 337-343.
- Natalini, E., Rossi, M., P., Barionovi, D., Scortichini, M. (2006): Genetic and pathogenic diversity of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* isolates associated with bud necrosis and leaf spot of pear in a single orchard. Journal of Plant Pathology: 88 (2): 219-223.
- Panić, M., Arsenijević, M. (1996): Bakteriozna plamenjača voćaka i ukrasnih biljaka – *Erwinia amylovora*. Monografska studija. Zajednica za voće i povrće Beograd, D. D. i Poljoprivredni fakultet, Novi Sad. S-Print, Novi Sad, pp. 419.
- Scortichini, M., Marchesi, U., Dettori, M. T., and Ross, M. P. (2003): Genetic diversity, presence of *syrB* gene, host preference and virulence of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains from woody and herbaceous host plants. Plant Pathology, 82: 277-286.
- Scortichini, M. (2005): The population structure of some plant pathogenic bacteria: an ecological and adaptive perspective. Journal of Plant Pathology, 87: 5-12.
- Sobiczewski, P. (1984): Etiology of sour cherry bacterial canker in Poland. Fruit Science Reports XI, No. 4: 169-179.
- Spotts, R. A., Cervantes, L. A. (1994): *Pseudomonas* canker of pear trees in Oregon, cultivar resistance and effect of trunk guards in canker incidence and bacteria survival on bark. Plant Disease 78: 907-910.
- Starović, M., Ivanović, Ž., Aleksić, G., Kuzmanović, S., Stojanović, S., Živković, S., Gavrilović, V. (2006): Identifikacija prouzrokovala propadanja kruške u Srbiji. Zaštita bilja, Vol. 57 (1-4), N° 255-258: 57-67.

(Primljeno: 10.12.2009.)

(Prihvaćeno: 15.01.2009.)

CHARACTERISTICS OF *PSEUDOMONAS SYRINGAE* STRAINS ORIGINATING FROM A PEAR FRUIT TREES IN SERBIA

VELJKO GAVRILOVIĆ¹, ŽARKO IVANOVIĆ¹,
SVETLANA ŽIVKOVIĆ¹, DUŠAN SAVIĆ²

¹Institutute for Plant Protection and Environment, Belgrade, Serbia

²„Agromarket“ d.o.o., Kragujevac, Serbia

SUMMARY

The test results of *Pseudomonas syringae* strains, isolated by a pear trees are as given. The symptoms of disease, caused by this bacterium, appeared in two types: a blossom blast, a trunk necrosis and a branch followed by canker formation. All strains are Gram negative, fluorescent on a King medium B and oxydative (O/F test). The tested strains are HR positive, producing a levan, but don't oxydase, arginindehydrolase and pectinase (LOPAT +---+).

Strains originated from a pear trees caused necrosis on an artificial inoculated pear, cherry and lemon fruits, as well as a syringae leaves and bean pods. The results of differential tests for *P. syringae* pv. *syringae* and *P. syringae* pv. *morsprunorum* (GATT) revealed that the tested strains hydrolyse gelatin and esculin, but the negative results are recorded in tyrosinase production and tartrate utilization tests.

The PCR analysis, by using a BOX primer, shows the high level of similarity among the Serbian *P. syringae* strains, isolated from a pear fruit trees, but also within a slice differences, compared with a check strain CFBP 1582. These results confirm a previous data about genetic diversity among *P. syringae* strains originated from a different areas all around the world.

Based on the obtained results, it's concluded that the tested strains belong to *P. syringae* pv. *syringae*. Further characterization of *P. syringae* strains, isolated from pear in Serbia use the ERIC and REP PCR and it's still underway.

Key words: Pear, *Pseudomonas syringae*, symptomatology, pathogenicity, bacteriological characteristics, BOX PCR.

(Received: 10.12.2009.)

(Accepted: 15.01.2009.)

KARAKTERISTIKE SOJEVA *ERWINIA AMYLOVORA* POREKLOM S GLOGA NA PODRUČJU SJENICE

MILIĆ VOJINOVIĆ¹, VELJKO GAVRILOVIĆ²

¹ Viša poljoprivredno-prehrambena škola, Prokuplje

² Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Beograd

U radu su proučene karakteristike izolata *Erwinia amylovora* poreklom sa gloga na području Sjenice. Ovaj region se karakteriše veoma nepovoljnim agroekološkim uslovima za gajenje jabučastih voćaka, pa je pojava simptoma plamenjače gloga posebno privukla našu pažnju.

Standardnim metodom izolacije dobijeno je više izolata koji formiraju kolonije levan tipa, prouzrokuju HR duvana i nekrozu inokulisanih plodova kruške pračenu obilnom produkcijom bakterijskog eksudata, što je karakteristično za *E. amylovora*. U pogledu biohemijskih odlika ponašaju se identično kao i identifikovani sojevi bakterije, izolovani iz jabučastih voćaka. Detekcija bakterije je izvršena i primenom IF i BIOLOG testa.

Pojava *E. amylovora* na području Sjenice ukazuje na konstantno širenje bakterije u Srbiji, što će svakako dodatno otežati njeno suzbijanje.

Cljučne reči: *Erwinia amylovora*, glog, patogenost, biohemijske odlike, IF, BIOLOG test.

UVOD

Glog (*Crateagus* spp.) je široko rasprostranjena biljka spontane flore ume-nog klimata u celom svetu. U Srbiji je takođe zastupljen kako u ravničarskim predelima gde se koristi u formiranju vetrozaštitnih pojaseva, tako i u brdskim predelima gde ima ulogu u sprečavanju erozije zemljišta.

Rad je realizovan u okviru Projekta 20051 Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije.

Ubraja se u veoma osetljive domačine fitopatogena bakterije *Erwinia amylovora*, prouzrokovala bakteriozne plamenjače jabučastih voćaka. Prvi nalazi ove bolesti su opisani na glogu 20-ih godina prošlog veka i smatra se da su oko 13 vrsta roda *Crataegus* domačini ove bakterije (van der Zwet i Keil, 1979; van der Zwet i Beer, 1995; Panić i Arsenijević, 1996). U Srbiji, ali i na teritoriji bivše Jugoslavije glog je opisan među prvim domaćinima *E. amylovora* (Mitrev, 1993; Panić i Arsenijević, 1996; Jovanović, 1999). Međutim, prve pojave bakterije na glogu su zabeležene u područjima sa intenzivnom voćarskom proizvodnjom.

Tokom 2007 godine našu pažnju su privukli simptomi bakteriozne plamenjače na stablima gloga u regionu Sjenice, na nadmorskim visinama od preko 1000 metara. Ovo područje se odlikuje nepovoljnim ekološkim uslovima za gajenje jabučastih voćaka, osnovnih domaćina ove bakterije. Stoga je cilj rada bio da se utvrdi da li pomenute simptome prouzrokuje *E. amylovora*, a u slučaju pozitivnog nalaza proučiti karakteristike izolovanih sojeva i uporediti ih sa odlikama sojeva poreklom sa jabučastih voćaka iz voćarskih rejona u Srbiji (Šumadija, Podunavlje).

MATERIJAL I METODE

Uzorci sa simptomima bakteriozne plamenjače gloga prikupljeni su tokom 2007 godine na području Sjenice, na lokalitetima sa nadmorskom visinom od preko hiljadu metara.

Izolovanje patogena vršeno je standardnom metodom razmaza na mesopeptonsku podlogu obogaćenom saharozom (NAS). Prilikom izolovanja, korišćeni su fragmenti sa prelaza obolelog i zdravog tkiva obolelih grana gloga, koji su macerirani u prethodno sterilisanom avanu pomoću tučka uz dodatak sterilisane destilovane vode. Posle dva dana razvoja pri 27°C, prikupljane su pojedinačne kolonije karakterističnog izgleda i nanošene na zakošenu mesopeptonsku podlogu obogaćenu s 2 % glicerola u cilju dobijanja čistih kultura bakterije, koje su tokom ispitivanja održavane u frižideru pri temperaturi od 4°C (Psallidas and Dimova, 1986; Arsenijević, 1997; Gavrilović, 1998).

Patogenost proučavanih sojeva proverena je veštačkom inokulacijom nezrelih plodova kruške (viljamova). Plodovi su inokulisani pomoću bakteriološke igle, a na ozleđeno mesto je naneta kap suspenzije bakterija koncentracije 10⁷cfu/ml. Inokulisani plodovi su održavani u vlažnoj komori 2-3 dana do pojave karakterističnih znakova bolesti (Gavrilović, 1998)

Sposobnost dobijenih izolata da prouzrokuju HR duvana, kao veoma važno svojstvo nekih vrsta fitopatogenih bakterija proverena je infiltracijom lišća duvana (Samsun), pomoću medicinskog šprica, korišćenjem suspenzije bakterija koncentracije 10⁶cfu/ml. Rezultati su očitavani 24 časa od momenta inokulacije.

Od bakterioloških odlika proučeno je razlikovanje po Gramu, stvaranje levana, metabolizam glukoze, fluorescentnost, aktivnost oksidaze i katalaze, hidroliza želatina, eskulina, skroba i Tween 80, VP i MR test, prema ranije uspostavljenim procedurama (Lelliott and Stead, 1987; Sands, 1990; Arsenijević, 1997; Gavrilović, 1998; Jones and Gajder 2001) Metabolizam ugljenikovih jedinjenja proučen je primenom BIOLOG testa (EPPO standard).

Detekcija sojeva *E. amylovora* primenom BIOLOG testa bazira se na njihovoj sposobnosti korišćenja velikog broja organskih jedinjenja (ugljenih hidrata, polihidroksilnih alkohola, aminokiselina) i poređenjem dobijenih rezultata sa rezultatima metaboličke aktivnosti referentnih sojeva. U ove svrhe se koristi mikrotitarska ploča sa 96 „bunarčića“ pri čemu se ispituje mogućnost metabolizma 95 različitih organskih jedinjenja a 96 je referentni soj. Ceo sistem je povezan sa odgovarajućim softverom koji na osnovu dobijenih rezultata pokazuje sličnost proučavanih sojeva *E. amylovora* sa kontrolnim sojem, ali i međusobnu raznolikost proučavanih sojeva. Rezultat se izražava numeričkim vrednostima od (0-1) (Sands, 1990; Jones and Gajder, 2001). Test imunofluorescencije sproveden je prema metodi OEPP, 74 (7) (2004).

REZULTATI

Simptomi bolesti

Simptomi bolesti se ispoljavaju u vidu plamenjače cvasti i mladara gloga koji se na području Sjenice uočavaju tokom maja, juna i jula. Obolelo lišće postaje mrke boje i ne opada sa mladara (sl. 1). Tkivo obolelih, jednogodišnjih mladara gloga takođe nekrotira, a uklanjanjem epidermisa se uočava nekroza sprovodnih sudova (ksilema i floema). Vrh obolelih mladara se savija kukasto u vidu „pastirskog štapa“, koji je karakterističan znak bolesti kod jabučastih voćaka. Tokom dosadašnjih proučavanja simptomatologije bakteriozne plamenjače gloga, nisu zapaženi simptomi plamenjače cvasti i plodova (bobica) gloga, što se može objasniti kasnijom infekcijom usled povoljnijih ekoloških uslova.

Izolovanje patogena i provera patogenosti

Karakteristične kolonije levana tipa, uočavaju se na mesopeptonskoj podlozi obogaćeno saharozom (NAS) posle 3 dana razvoja pri 27°C. Bledo sive su boje prečnika oko 2 mm izrazito ispupčene, sjajne, ravnog oboda. Istovremeno su na ovu podlogu zasejavani i kontrolni sojevi, pri čemu nisu utvrđene razlike u pogle-



Sl. 1 - *Erwini amylovora*. Simptomi bakteriozne plamenjače gloga (prirodna infekcija)

Fig. 1 - *Erwinia amylovora*. Fire blight symptoms on hawthorn (natural infection)

du karakteristika kolonija *E. amylovora* poreklom s gloga i navedenih referentnih sojeva.

Proučavani izolati sa gloga prouzrokuju HR duvana i nekrozu inokulisanih, nesazrelih plodova kruške uz obilnu produkciju bakterijskog eksudata ispoljenog u vidu bledožutih kapi. Identično nijma se pri ovim testovima ponačaju i kontrolni izolati *E. amylovora*.

Bakteriološke odlike

Proučavani izolati *E. amylovora* sa gloga su Gramnegativni, ne fluoresciraju na King- ovoj podlozi B, a glukozu metabolišu kako u aerobnim tako i anaerobnim uslovima (oksidativno i fermentativno); hidrolizuju želatin ali ne i eskuilin, skrob i estar oleinske kiseline (Tween 80); stvaraju katalazu ali ne oksidazu; rezultat VP testa je pozitivan, a MR negativan (tab. 1). Rezultati ovih testova ukazuju da sojevi izolovani iz obolelih biljaka gloga ispoljavaju bakteriološke odlike tipične za *E. amylovora*, pošto se i kontrolni sojevi (CFBP 1430 i J i Kš) identično ponašaju pri navedenim testovima.

IF i BIOLOG test

Pri testu imunofluorescencije, korišćenjem poliklonalnih antitela je potvrđeno da izolovani sojevi sa gloga pri ovoj serološkoj reakciji ispoljavaju karakteristike *E. amylovora*, i da se ponašaju identično kao i referentni. Analizom rezultata BIOLOG testa utvrđeno je da numerički indeks izolata poreklom sa gloga varira od 0,65-0,93. To ukazuje da se oni razlikuju i međusobno ali da neki od njih ispoljavaju i razlike u odnosu na kontrolne sojeve.

DISKUSIJA

Erwinia amylovora je eksperimentalno potvrđena kao patogen gloga u nas krajem devedesetih godina prošlog veka, neposredno posle njene pojave na krušci i dunji, koje su prvi domaćini ove bakterije opisani u nas (Panić i Arsenijević, 1996). Prisustvo bakteriozne plamenjače na biljkama gloga je najpre utvrđeno u rejonu južne Srbije (Leskovac, Lebane, Bojnik), upravo na područjima gde je *E. amylovora* registrovana i kao patogen jabučastih voćaka (Jovanović, 1999). Prisustvo *E. amylovora* na biljkama gloga je uglavnom konstatovano u rejonima gde preovladava intenzivna proizvodnja voćaka.

Tabela 1 - Biohemijske odlike proučavanih izolata
Table 1 - Biochemical properties of investigated strains

Testovi Tests	Izolati - Isolates			
	glog - hawthorn	K-205 ^a	CFBP 1430 ^a	J-5 ^a
Levan -Levan	+ ^b	+	+	+
Fluorescentnost Fluorescence	- ^c	-	-	-
O/F test				
Aerobno - Aerobic	+	+	+	+
Anaerobno-Anaerobic	+	+	+	+
Aktivnost- Activity				
Oksidaze- Oxidase	-	-	-	-
Katalaze- Catalase	+	+	+	+
<i>Hidroliza- Liquefaction</i>				
Želatin- Gelatin	+	+	+	+
Eeskulin- Aesculin	-	-	-	-
Tween 80	-	-	-	-
Skrob-Starch	-	-	-	-
Razvoj pri- Growth at				
5%NaCl	+	+	+	+
7% Na Cl	-	-	-	-
34°C	+	+	+	+
36°C	-	-	-	-
MP ^d	-	-	-	-
VP ^e	+	+	+	+

a Kontrolni sojevi *E. amylovora* - Check strains of *E. amylovora*

b Pozitivan rezultat - Positive result

c Negativan rezultat - Negative result

d Metil red test - Methyl red test

e Vog Proskauerov test - Vogue Proskauer test

Međutim, simptomi bakteriozne plamenjače gloga zapaženi su u jugozapadnom delu Srbije na nadmorskim visinama od 1000-1250 m, gde zbog nepovoljnih ekoloških uslova ne postoje optimalni uslovi za uspešno gajenje jabučastih voćaka.

Simptomi bakteriozne plamenjače se ispoljavaju u vidu plamenjače mladara, lišća i cvasti, što je u punoj saglasnosti sa opisom simptoma bolesti na glogu,

saopštenim u literaturi (van der Zwet and Keil, 1979; van der Zwet and Beer, 1995; Panić i Arsenijević, 1996; Arsenijević i Panić, 1997).

Uspešna izolacija *E. amylovora* iz obolelog gloga ostavrena je korišćenjem mesopeptonske podloge obogaćene 5 % saharozom (NAS), koja se sa uspehom koristi pri izolaciji ove bakterije i iz njenih drugih domaćina (Klement, 1990; Arsenijević, 1997; Gavrilović, 1998). Na ovoj podlozi se posle 2-3 dana obrazuju karakteristične kolonije levan tipa, što je jedna od veoma značajnih dijagnostičkih odlika *E. amylovora* (Gavrilović, 1998). Izgled kolonija bakterije poreklom s gloga se ne razlikuje u poređenju sa kontrolnim sojevima CFBP 1430, J-5 i K 205 poreklom sa jabučastih voćaka.

Proučavani izolati prouzrokuju HR duvana i nekrozu inokulisanih plodova kruške uz pojavu kapi bakterijskog eksudata što je karakterističan znak *E. amylovora* prilikom njenog proučavanja u laboratorijskim uslovima (Billing et al., 1960; Arsenijević, 1997; Gavrilović, 1998).

U pogledu biohemijskih odlika utvrđena je izrazita sličnost izolata poreklom sa gloga kaoko sa kontrolnim sojem CFBP 1430, tako i sa sojevima *E. amylovora* poreklom iz jabuke i kruške, izolovanih sa ovih voćaka na nižim nadmorskim visinama i u rejonima gde je zastupljena intenzivna voćarska proizvodnja. Uniformnost sojeva u pogledu ovih karakteristika (tab.1) ističu i drugi autori (van der Zwet i Keil; 1979; Gavrilović, 1998; Vojinović, 2006).

Naši rezultati pokazuju da se BIOLOG test i test imunofluorescencije uspešno mogu koristiti za pouzdanu detekciju *E. amylovora* u obolelom biljnom materijalu, pri čemu su utvrđene i izvesne rezlike u numeričkim vrednostima dobijenim pri BIOLOG testu, što ukazuje na izvesne razlike među proučavanim sojevima *E. amylovora* poreklom s gloga. Međutim, na osnovu ovih numeričkih vrednosti ne može se dati sud o značaju ovih razlika pošto i izolati sa jabučastih voćaka pri ovom testu pokazuju slične vrednosti.

Međutim i pored ovih razlika za njihovu pouzdanu ocenu bi se morao koristiti metod elektroforeze u pulsirajućem polju (PFGE), pomoću koje je moguće utvrditi pravce širenja *E. amylovora* (Ivanović i sar, 2009). Ipak u vidu treba imati činjenicu da su simptomi bakteriozne plamenjače gloga u ovako visokim područjima primećeni tokom 2007. godine, u kojoj je zabeležena epifitotična pojava bolesti na teritoriji čitave zemlje (Gavrilović i Vojinović, 2008). Te godine utvrđena su i dva nova domaćina bakterije među ukrasnim biljkama *Sorbus domestica* i *S. aucuparia* (Gavrilović i sar., 2008).

Heterogenost populacije sojeva *E. amylovora* bi svakako trebala biti predmet daljih istraživanja, pošto je primenom molekularnih metoda, korišćenjem specifičnih prajmera ona naučno dokazana. Tako je utvrđeno da brojni sojevi *E. amylovora* iz više evropskih zemalja, sadrže poseban tip plazmida označen kao P170, koji je različite strukture od do sada uobičajenog pEA29 (Llop i sar.,

2008). U Španiji je iz nekrozom zahvaćenih cvasti kruške izolovana specifična grupa sojeva opisana kao nova vrsta *Erwinia pyriflorinigrans*. Naziv je dobila po karakterističnom crnilu cvetova kruške koju prouzrokuje (Rosello i sar., 2008).

Na osnovu navedenih, ali i rezultata ranijih istraživanja, može se zaključiti da *E. amylovora* u Srbiji postaje sve rasprostranjeniji patogen, obuhvatajući sve širi krug domaćina, čak i na terenima gde ne prevladava gajenje njenih osnovnih domaćina (jabučastih voćaka) (Balaž i Smiljanić, 2004; Vojinović, 2006; Gavrilović i sar., 2008). Ovo saznanje u znatnoj meri otežava iznalaženje izolovanih zona u kojima bi se mogla zasnovati proizvodnja zdravstveno ispravnog sadnog materijala, kao osnovne mere suzbijanja ove bakterije.

LITERATURA

- Arsenijević, M. (1997): Bakterioze biljaka. III izmenjeno i dopunjeno izdanje. S-Print, Novi Sad, 576 p.
- Arsenijević, M., Panić, M. (1997): Domaćini bakterije *Erwinia amylovora* do sada utvrđeni u Jugoslaviji. Zaštita bilja, Vol. 48 (1), N° 219: 57-66.
- Balaž, J., Smiljanić, A. (2004b): *Chaenomeles japonica* i *Cotoneaster horisontalis* novi domaćini *Erwinia amylovora* u Srbiji. Zaštita bilja, Vol. 55 (1-4), N° 247-250: 87-96.
- Billing, Eve, Crosse, J.E., Garrett, C.M.E. (1960): Laboratory diagnosis of fire blight and bacterial blossom blight of pear. Plant Pathology 9:19-25.
- Gavrilović, V. (1998): Bakteriološke odlike sojeva *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al. različitog porekla. Zaštita bilja, 49 (2), Br. 224: 121-167.
- Gavrilović, V., Vojinović, M. (2008): Osvrt na masovnu pojavu bakteriozne plamenjače jabuke 2007. godine. Biljni lekar, 2, 91-93.
- Gavrilović, V., Obradović, A., Milijašević, S., Vojinović, M. (2008): *Sorbus* sp. - New host of *Erwinia amylovora* in Serbia. Acta Horticulturae 793: 351-357.
- Ivanović, M., Gašić, K., Čalić, A., Obradović, A. (2009): Analiza genoma sojeva *Erwinia amylovora* elektroforezom u pulsirajućem električnom polju. VI Kongres o zaštiti bilja sa simpozijumom o biološkom suzbijanju invazivnih organizama. Zlatibor, 23-27 novembar, 2009, Zbornik rezimea, 57-58.
- Jones, A.L., Geider, K. (2001): Gram – negative bacteria: *Erwinia amylovora*. In : Schaad, N.W., Jones, J.B. Chun, W. (Eds): Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria, APS, St. Paul, Minnesota, USA.
- Jovanović Gordana (1999): Rasprostranjenost, značaj i biljke domaćini bakterije *Erwinia amylovora* na teritoriji južne Srbije. Zaštita bilja, Vol. 50 (2), N° 228: 115-149.

- Klement, Z. (1990): Inoculation plant tissues. Canker and dieback disease. In: Methods in Phytobacteriology. Klement, Z., Rudolph, K., Sands, D. (eds). Akademiai Kiado, Budapest, pp. 105-106.
- Lelliott, R.A., Stead, D.E. (1987): Methods for the diagnosis of bacterial disease of plants. British Society for Plant Pathology. Blackwell Scientific Publications. Oxford, London, Edinburgh. pp. 200
- Llop, P., Gonzales, R., Pulawska, Joanna, Bultreza, A., Cabrefiga, J. Lopez, M. Maria (2008): The new plasmid pE170 is present in *E. amylovora* European strains. Acta Horticulturae, 793:
- Mitrev, V. (1993): Proučavanje bakterije *Erwinia amylovora* (Burrill 1882) Winslow et al. 1920 kao parazita voćaka u Makedoniji. Magistarska teza. Poljoprivredni fakultet, Novi Sad, pp. 1-77.
- OEPP-EPPO Standards (2004): Diagnostic protocols for regulated pests Pm 7-20(1) OEPP/EPPO *Bulletin* 34, 155 –157
- Panić, M., Arsenijević, M. (1996): Bakteriozna plamenjača voćaka i ukrasnih biljaka - *Erwinia amylovora*. Monografska studija. Zajednica za voće i povrće Beograd D.D i Poljoprivredni fakultet, Novi Sad. S-Print, Novi Sad, pp.419.
- Psallidas, P., Dimova, Maria (1986): Occurrence of disease fire blight of pomaceous trees in Cyprus. Characteristics of pathogen *Erwinia amylovora*. *Annls.Inst. Phytopath. Benaki. (N.S.)*. 15: 61-70.
- Rosello, M., Llop, P., Lopez, M.M., Gardan, L., Ferrer, S., Christen, R. (2008): Description of *Erwinia piriflorinigrans* sp.nov., Causal Agent of pear Blossom necrosis. Acta horticulturae, 793: 137-141.
- Sands, D.C. (1990): Physiological determinative tests. In: Methods in Phytobacteriology. Klement, Z., Rudolph, K., Sands, D. (eds). Akademiai Kiado, Budapest, pp. 131-141.
- Vojinović, M. (2006): Domaćini i rasprostranjenost *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al. u nišavskom okrugu. Magistrska teza. Poljoprivredni fakultet, Priština (Lešak).
- van der Zwet, T., Beer, S.V. (1995): Fire Blight-its Nature, Prevention and Control. A Practical guide to Integrated Diseases Management. U.S. Department of Agriculture. Agricultural Bulletin No 631, pp.97.
- van der Zwet, T., Keil, H. L. (1979): Fire Blight – A Bacterial Disease of Rosaceous plants. U.S. Department of Agriculture, Agriculture Handbook 510, Washington, D.C., pp. 200.

(Primljeno: 10.12.2009.)
(Prihvaćeno: 15.01.2009.)

CHARACTERIZATION OF *ERWINIA AMYLOVORA* STRAINS ISOLATED FROM HAWTHORN IN REGION OF SJENICA

MILIĆ VOJINOVIĆ¹, VELJKO GAVRILOVIĆ²

¹ College of agriculture and food technology, Prokuplje, Serbia

² Institute for Plant Protection and Environment, Belgrade, Serbia

SUMMARY

Typical fire blight symptoms were observed during 2007 on hawthorn in region of Sjenica, area with high level attitude (over 1000 m). First symptoms were recorded in late spring and early summer and appeared as shoots, blossom and leaves blight.

Levan type non fluorescent colonies developed on nutrient agar enriched with sucrose (SNA) after 3 days growth on 26°C. Investigated strains elicit HR in tobacco leaves and caused necrosis of inoculated immature pear fruits (cv. Viliams) followed by abundant oozing, typical characteristics of *Erwinia amylovora*.

Presence of *E. amylovora* in diseased hawthorn samples were confirmed using IF and BIOLOG tests (0,74-0,95).

Gelatin, catalase and VP tests were positive while negative results were recorded in oxidase, esculin, starch, TWEEN 80 and MR tests. Investigated strains growth at 34°C and in medium with 5% NaCl; growth is not recorded at 36°C and in medium with 7% NaCl.

Obtained results show that shoots, blossom and leaves blight of hawthorn is caused by *E. amylovora* and it is first report of this bacterium on high level attitude (over 1000 m) in Serbia. Differences among the isolates from hawthorn and from apple and pear as well as check strain CFBP 1430 were not observed.

Key words: hawthorn, *Erwinia amylovora*, pathogenicity, IF, BIOLOG test.

(Received: 10.12.2009.)

(Accepted: 15.01.2009.)

PRISUSTVO FITOPLAZMOZA VINOVE LOZE U NAJZNAČAJNIJIM VINOGORJIMA SRBIJE

SLOBODAN KUZMANOVIĆ¹, DRAGANA JOŠIĆ², MIRA STAROVIĆ¹, ŽARKO IVANOVIĆ¹,
NENAD TRKULJA¹, NENAD DOLOVAC¹, SAŠA STOJANOVIĆ¹

1 Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Beograd

2 Institut za zemljište, Beograd

Dat je prikaz rasprostranjenosti fitoplazmoza na vinovoj lozi u Srbiji za period od 2003. do 2005. godine. Ukupno je pregledano 505 vinograda u 25 vinogorja. Rezultati pokazuju raširenost fitoplazmoza po vinogorjima Srbije, zatim zaraženost najznačajnijih sorata vinove loze, kao i vrste patogena koji su identifikovani.

Prisustvo fitoplazmoza dokazano je u 22 od 25 vinogorja, odnosno u 354 od 505 osmatrana vinograda. Pojava fitoplazmoznih oboljenja registrovana je na čokotima svih sorata obuhvaćenih u ovom radu, ali u nejednakom intezitetu.

Visok stepen zaraze (pojedini slučajevi preko 50%) utvrđen je u Sićevačkom, Župskom, Trsteničkom i Negotinskom vinogorju. S druge strane, fitoplazmozna oboljenja na vinovoj lozi nisu nađena, odnosno dokazana u Pocerskom, Prokupačkom i Ražanjskom vinogorju.

Jak stepen zaraze utvrđen je na sortama Plovdina (90%) i Šardone (67%), srednji na Župskom bojadiseru (34%), Frankovki (29%) i Smederevki (27%), osetna zaraza dokazana je na Crnom burgundcu (20%), Rajnskom (18%) i Italijanskom rizlingu (9%) a zaraza u tragovima otkrivena je na sorti Prokupac (4%).

Prisustvo fitoplazmi u čokotima sa simptomima fitoplazmoznih oboljenja dokazana je molekularnobiološkim metodama (PCR). Utvrđeno je prisustvo dve fitoplazme i to »*Candidatus Phytoplasma vitis*« prouzrokovatelj zlatastog žutila (Flavescence dorée - FD) i »*Candidatus Phytoplasma solani*« prouzrokovatelj crnila drveta (Bois noir - BN). »*Candidatus Phytoplasma vitis*« dokazana na vinovoj lozi u nas pripada 16SrV-C soju.

Ključne reči: vinova loza, fitoplazmoze, identifikacija, FD, BN, rasprostranjenost, vinogorja Srbije.

UVOD

Fitoplazmorna oboljenja vinove loze, zadnjih decenija, privukle su pažnju kako proizvođača tako stručne i naučne javnosti. Krajem sedamdesetih godina 20. veka Babović i Perišić (1977) opisali su pojavu žutila lišća na sortama Italijanski rizling i Muskat hamburg u nekim vinogorjima severoistočne Srbije. Desetak godina kasnije, slične simptome na sorti Šardone zapazio je Kuzmanović (1986), u Župskom vinogorju. To žutilo lišća na čokotima pomenutih sorti podseća, po svojim osnovnim karakteristikama, na »zlatasto žutilo« (Flavescence dorée) – već dobro poznatu fitoplazmozu vinove loze (Levadoux, 1955. loc.cit. Bovey and Martelli, 1992., Boudin-Padieu, 2003., 2005.). I druge patološke promene karakteristične za navedenu fitoplazmozu vinove loze zapažene su i opisane u vinogorjima Srbije. Tako su, Pešić (1997), a zatim i Milosavljević (1999), na čokotima nekih obojenih sorata vinove loze, u Župskom vinogorju, zapazili pojavu crvenila lišća. Ivanović i Ivanović (2000) su, pored žutila i crvenila na vinovoj lozi u nas, opisali i pojavu skraćenosti internodija, sušenja cvasti i grozdova, kao i uginjavanje čitavih čokota, istakavši da takve patološke promene izazivaju patogeni iz grupe fitoplazmi. Isto stanovište zauzeo je i Osler (2004) posle posete Župskom vinogorju 1998. godine.

Istraživanja obavljena u nas u preteklu periodu pokazala su da napred pomenute simptome na vinovoj lozi izazivaju fitoplazme (Kuzmanović i sar., 2002, Duduk i sar., 2003a, 2003b, Kuzmanović, 2007, Kuzmanović et al., 2008b). Detaljnijim ispitivanjima utvrđeno je da su od ovih patogena u Srbiji na vinovoj lozi prisutne »*Candidatus* Phytoplasma vitis« (prouzrokovatelj zlatastog žutila – Flavescence dorée - FD), »*Candidatus* Phytoplasma solani« (prouzrokovatelj crnila drveta – Bois noir - BN) i »*Candidatus* Phytoplasma prunorum« (prouzrokovatelj evropskog žutila koštičavih voćaka - ESFY) (Duduk et al., 2004a; 2004b; Kuzmanović et al., 2004; Duduk, 2005; Jošić et al., 2005, 2006a, 2006b, Kuzmanović, 2007, Kuzmanović i sar., 2008a). Pomenute fitoplazme, registrovane su u skoro svim vinogorjima Srbije i na svim ispitivanim sortama (Jevremović i Paunović, 2005; Duduk et al., 2006b; Kuzmanović i sar., 2006a, 2006b, 2007, 2008a, Kuzmanović, 2007).

Cilj ovih naših istraživanja bio je da utvrdimo raširenost fitoplazmornih oboljenja vinove loze u najznačajnijim vinogorjima Srbije. Na taj način dobila bi se jedna potpunija slika o značaju tih bolesti vinove loze u nas.

MATERIJAL I METODE

Ova istraživanja obuhvatila su pregled i utvrđivanje broja vinograda sa simptomima fitoplazmoznih oboljenja, zatim prikupljanje uzoraka i proveravanje prisustva patogena.

Pregled terena i utvrđivanje raširenosti fitoplazmoza u vinogorjima Srbije

Pregledano je ukupno 505 vinograda u 25 vinogorja Srbije. Osmatranja su obavljena u vinogradima zasađenim sa sledećim sortama: Plovdina, Crni burgundac, Italijanski rizling, Rajnski rizling, Smederevka, Župljanka, Prokupac, Župski bojadiser, Šardone i Frankovka.

Obavljena su dva pregleda, prvi u junu a drugi krajem septembra. Ovaj drugi pregled podešen je periodu vegetacije kada se na čokotima obolelim od fitoplazmoza mogu videti karakteristični simptomi, koji čine tzv. „sindrom fitoplazmoza vinove loze“ (Levadoux, 1955, loc. cit. Bovey and Martelli, 1992, Boudon-Padieu, 1999, Kuzmanović i sar., 2002, Duduk i Ivanović, 2004c, 2006a, Martelli and Boudon-Padieu, 2006). Kao kontrolni, osmatrani su čokoti iste sorte bez simptoma fitoplazmoznih oboljenja.

Oboleli čokoti, koji su ispoljavali karakteristične simptome, obeleženi su i evidentirani radi daljeg i detaljnijeg osmatranja. Od mnogih, od tako obeleženih čokota, prikupljeni su uzorci za etiološka ispitivanja, odnosno za proveravanje prisustva patogena iz grupe fitoplazmi infektivnih za vinovu lozu.

Proveravanje prisustva i identifikacija patogena

Prisustvo fitoplazmi u kolekcionisanim uzorcima vinove loze, kao i identifikacija patogena, obavljeno je tzv. „metodom lančane reakcije polimeraze“ (PCR), kao i „izvedenom PCR metodom“ (nested PCR). Ukupne nukleinske kiseline ekstrahovane su iz biljnog materijala prema proceduri Ahrens and Seemüller (1992), koju su modifikovali Malisano et al. (1996). U cilju utvrđivanja prisustva fitoplazmi u uzorcima prikupljenim u periodu od 2003. do 2005. godine, korišćen je par prajmera P1/P7 (Deng and Hiruki, 1991; Schneider et al., 1995) univerzalnih za detekciju prisustva fitoplazmi pri čemu je umnožena sekvenca 16S-23S ribozomalnog gena DNK molekula fitoplazme veličine od oko 1800 bp (Angelini et al., 2004). Dobijeni fragment od 1800 bp je obrađen nested PCR metodom korišćenjem R16F2n/R16R2 prajmera (Lee et al., 2003) i dobijen je fragment 16S-23S ribozomalnog gena DNK molekula fitoplazme veličine od oko 1200 bp

(Angelini et al., 2004). Kao pozitivne kontrole korišćeni su identifikovani izolati fitoplazmi iz inficirane vinove loze: Elm yellows, EY1 (16SrV-A) i Stolbur, P-TV (Stol) (16SrXII-A) (Martini et al., 2002), dok je sterilna destilovana voda imala ulogu negativne kontrole.

Sekvence DNK molekula koje su umnožene PCR reakcijama podvrgnute su digestiji specifičnih restrikcionih enzima u cilju identifikacije detektovanih fitoplazmi. Restrikcioni enzimi koji su primenjeni u analizi polimorfizma dužine restrikcionih fragmenata (RFLP) su *TaqI* (na P1/P7 amplifikatu) i *TruI* (na amplifikatima nested – PCR reakcija), (Fermentas, Vilnius, Lithuania). U gelovima su korišćeni sledeći markeri: ϕ X174 digestiran sa *HAEIII* (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania); 1Kb DNA (Ladder Amersham Biosciences); 1Kb plus (Gibco BRL); 1Kb (Gibco BRL); Gene Ruler DNA (Ladder Mix, Fermentas, Vilnius, Lithuania). Gelovi su bojeni 1% etidum bromidom 10 minuta, a zatim su posmatrani na UV transiluminatoru. Kao pozitivne kontrole u RFLP analizi korišćeni su identifikovani izolati fitoplazmi iz inficirane vinove loze: Elm yellows EY1 (16SrV-A) i Stolbur, P-TV (Stol) (16SrXII-A) (Martini et al., 2002).

REZULTATI I DISKUSIJA

Raširenost fitoplazmoza u vinogorjima Srbije

U pregledanim vinogradima, na čokotima napred pomenutih sorti, konstatovana je pojava dva osnovna simptoma, žutilo kod tz. belih sorti (sl. 1) i crvenilo lišća kod obojenih sorti (sl. 2). Brojnost vinograda sa takvim simptomima po lokalitetima i vinogorjima prikazana je u tabeli 1, kao i rezultati koji se odnose na prisustvo fitoplazmoza u pregledanim vinogradima i učestalost zaraze.

Od ukupno pregledanih 505 vinograda fitoplazmozna zaraza utvrđena je u 354 (tabela 1). Jak stepen zaraze (preko 50%) utvrđen je u Sićevačkom, Župskom, Trsteničkom i Negotinskom vinogorju (Plovdina, 90% i Šardone, 67%). Srednji stepen zaraženosti (20-50%) bio je prisutan u Fruškogorskom (Šardone, 43%), Vršačkom (Frankovka, 34%), Belocrkvanskom (Šardone, 30%) i Vinaračkom vinogorju (Šardone, 20%). Osetna zaraza (5-20%) utvrđena je vinogorju Deliblatske peščare (Župljanka, 20%), Rajačkom (Frankovka i Šardone, 20%), Levačkom (Šardone, 20%), Kutinskom (Šardone, 12%), Vlasinskom (Plovdina, 10%), Džervinskom (Šardone, 10%) i Oreovačkom vinogorju (Rajnski rizling, 10%). Fitoplazmozna zaraza u tragovina (do 5%) utvrđena je u Pirotskom (Plovdina, 4%), Paličkom (Rajnski rizling, 3%), Belopalanačkom (Rajnski rizling, 2%), Mihajlovačkom i Vrbičkom vinogorju (Plovdina, 2%). Prisustvo fitoplazmoza vinove loze nije otkriveno u Pocerskom, Prokupačkom i Ražanjskom vinogorju.



Sl. 1 - Fitoplazmozni simptomi na sorti Župljanka
Fig. 1 - Phytoplasma symptoms on cv. Župljanka



Sl. 2 - Fitoplazmozni simptomi na sorti Frankovka
Fig. 2 - Phytoplasma symptoms on cv. Frankovka

Tabela 1 - Prisustvo fitoplazmoza u pregledanim vinogorjima i intenzitet zaraze nekih sorata u Srbiji u periodu 2003-2005

Table 1 - Incidence of phytoplasmas in viewed vineyards and intensity of infection (in %) of some cultivars in Serbia during 2003-2005

Vinogorje ¹ Areal of vineyard	Mesto Locality	Broj vinog. No of vine- yards	Sorte – C u l t i v a r s									
			Plovdina	Crni Burgundac	Italijanski Rizling	Rajnski Rizling	Smederevka	Zupljanka	Prokupac	Zupski Bojadiser	Sardone	Frankovka
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1.	Tuleš	15/15	12-70	11-20	9	18	6-27	-	3-4	27-34	-	29
			(6/6) ³ FD ⁴	(3/2) FD	(3/2) FD	(2/2) BN	(3/2) FD		(2/1) FD	(6/6) FD		(2/2) BN,FD
	D.Omašnica	15/11	20-30	-	-	-	6-10	-	-	-	3	-
	Rudenice	10/9	30-50	-	-	-	-	11-20	4	-	-	-
	G. Rataje	17/14	50-71	-	-	-	6-10	-	-	-	-	-
	Drenča	13/12	30-50	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Vitkovo	19/18	30-52	-	-	-	6-10	11-20	-	-	-	-
	Stubal	15/12	30-59	-	-	11-20	-	-	-	-	-	6-10
	Šljivovo	31/25	20-67	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.	Poljna	6/5	4	-	-	-	6-10	-	-	-	-	-
			(1/1) FD									
	Ruišnik	5/2	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-
	Medveda	17/14	21-56	-	-	-	11-20	-	1	-	-	6-10
			(1/1) FD									
	Bogdanje	3/3	3-61	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			(1/1) FD									
	Ljubava	9/5	6-20	-	-	-	-	-	3	-	-	-
3.	Matejevac	11/8	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4.	Kutina	2/0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-

Nastavak - Continue

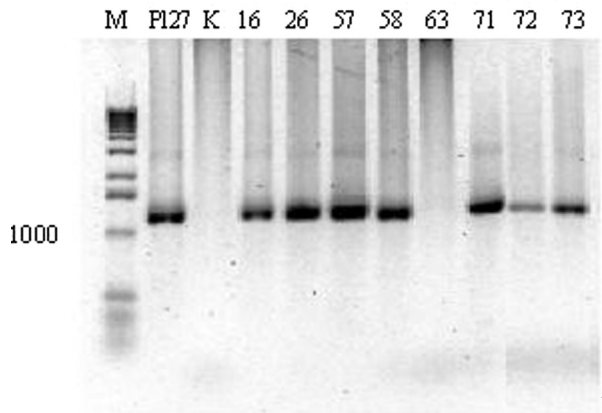
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
	Slatina	5/2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
18.	Čubra	1/1	-	-	-	-	-	-	-	-	67	-
19.	Šipina	6/5	-	-	-	-	-	-	-	-	(1/1) BN	-
	Minićevo	3/3	3	-	-	-	-	-	-	-	6-10	-
			(1/1) FD									
20.	Glogovac	5/3	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			(1/1) FD									
21.	Viteževo	3/3	3	-	-	6-10	-	-	-	-	-	-
			(1/1) FD									
22.	Rekovac	7/3	-	-	-	-	-	-	-	-	11-20	-
											(1/1) BN	
23.	Jagodina	3/2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	19
24.	Krušedol	1/1	-	-	-	-	-	-	-	-	43	-
											(1/1) BN	
	Vrdnik	1/1	-	-	-	-	-	-	-	-	28	-
											(1/1) BN	
	Rivica	11/8	6-10	-	-	-	3	-	-	-	11-20	-
			(1/1) FD									
	Grigurevci	5/5	18	-	-	-	-	3	-	-	6-10	-
			(1/1) FD									
25.	Grušić	12/0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	P.Metković	8/0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Rumska	6/0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- 1 Vinogorje – Vineyard areal: 1=Župsko, 2=Trsteničko, 3=Matejevačko, 4=Kutinsko, 5=Pirotsko, 6=Razanjisko, 7=Prokupačko, 8=Vlasotinačko, 9=Vinaračko, 10=Stičevačko, 11=Vršačko, 12=Belocerkvansko, 13=Deliblatska peščara, 14=Banatsko-potisko, 15=Palicko, 16=Rajačko, 17=Mihallovačko, 18=Negotinsko, 19=Džervinsko, 20=Vrbičko, 21=Oreovačko, 22=Levačko, 23=Jovačko, 24=Fruiškogorsko, 25=Pocersko
- 2 Broj pregledanih vinograda / broj vinograda sa simptomima – No of reviewed vineyards/No of vineyards with symptoms
- 3 Broj testiranih čokota / broj pozitivnih uzoraka – No of tested vine plants/No of positive samples
- 4 Tip fitoplazme (FD i/ili BN) – Type of phytoplasmas (FD and/or BN)

Jak stepen zaraze (preko 50%) utvrđen je na sortama Plovdina (90%) i Šardone (67%), srednji stepen zaraženosti (20-50%) na Župskom bojadiseru (34%), Frankovki (29%) i Smederevki (27%), osetna zaraza (5-20%) na Crnom burgundcu (20%), Rajnskom (18%) i Italijanskom rizlingu (9%), a zaraza u travovima na Prokupcu (4%).

Identifikacija patogena prouzrokača fitoplazmoza vinove loze u Srbiji

Dokazivanje prisustva fitoplazmi u vinovoj lozi sa simptomima fitoplazmoznih oboljenja obavljeno je metodom lančane reakcije polimeraze (PCR). Kombinovan je direktan i izvedeni (nested) postupak. Za direktan postupak primenjen je par prajmera P1/P7, koji je univerzalan za fitoplazme (sl. 3). Za izvedeni (nested)

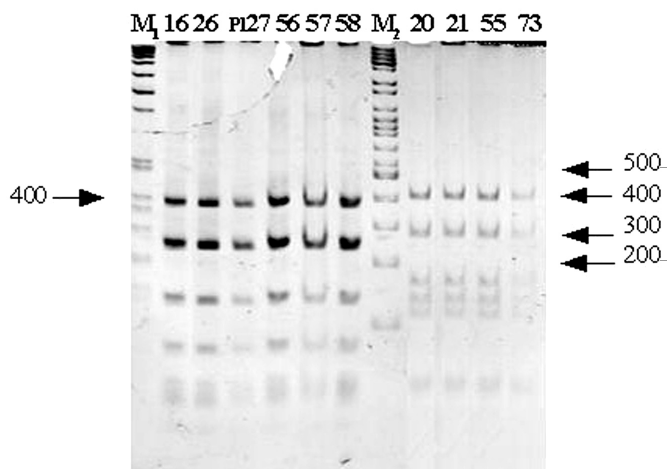


Sl. 3 - 1% agarozna gel elektroforeza nested-PCR produkata umnoženih parom prajmera P1/P7 zatim parom prajmera R16F2n/R16R2, iz uzoraka poreklom iz različitih vinograda u Srbiji i referentni soj fitoplazme FD-C Pl 27. H₂O - negativna kontrola; M - Marker, 1kb DNA Ladder (Amersham Biosciences).

Fig. 3 - Electrophoresis on 1% agarose gel of nested-PCR products amplified by P1/P7 primers, according R16F2n/R16R2 primers of grapevine samples from different vineyards in Serbia and reference strain of FD-C Pl 27. H₂O - negativ control; M - Marker, 1kb DNA Ladder (Amersham Biosciences).

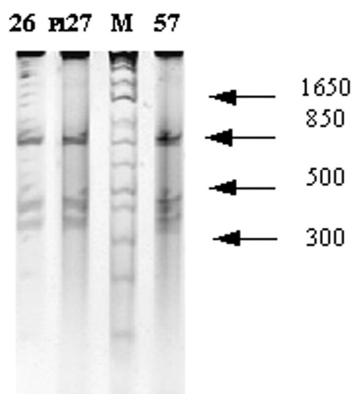
postupak, koji je izvođen po završetku direktne PCR, korišćen je par prajmera R16F2n/R16R2. Primenjenim postupcima dobijen je umnoženi produkt DNK fitoplazme od oko 1200 bp. Taj karakteristični produkt utvrđen je kod većine ispitivanih uzoraka, odnosno čokota vinove loze sa simptomima proučavanih oboljenja, kao i kod kontrolnih uzoraka – standarda. Fragmenti dobijeni nested

PCR-om su obrađeni restrikcionim enzimom *Tru*II (sl. 4). P1/P7 amplifikati pozitivnih uzoraka na FD su obrađivani restrikcionim enzimom *Taq* I, radi utvrđivanja tipa fitoplazme (sl. 5).



Sl. 4 - RFLP analiza nested-PCR produkata umnoženih parom prajmera P1/P7 zatim parom prajmera R16F2n/R16R2, iz uzoraka poreklom iz vinograda u Srbiji. PCR produkti su obrađeni *Tru*II enzimom i razdvojeni elektroforezom na 5% poliakrilamidnom gelu. M₁ – Marker 1Kb Ladder Gibco BRL; M₂ – Marker GeneRuler DNA Ladder Mix, Fermentas, Lithuania. P1 27 – Plovdina, pozitivna kontrola.

Fig. 4 - RFLP analysis of nested-PCR products amplified by P1/P7 following by R16F2n/R16R2 of grapevine samples from different vineyards in Serbia. PCR products digested with *Tru*II and separated by electrophoresis through 5% polyacrylamid gel. M₁ – 1Kb Ladder Gibco BRL; M₂ – MarkerGeneRuler DNA Ladder Mix, Fermentas, Lithuania. P1 27 – Plovdina, positiv control.



Sl. 5 - *Taq*I RFLP analiza PCR produkata umnoženih P1/P7 parom prajmera iz uzoraka vinove loze iz Srbije razdvojenih na 5% poliakrilamidnom gelu. M - Marker 1kb plus Gibco BRL ; P1 27 – Plovdina, pozitivna kontrola.

Fig. 5 - *Taq*I RFLP analysis of P1/P7 amplicon of FD detected grapevine samples from Serbia separated on 5% agarose gel. M- Marker 1 kb plus Gibco BRL; P1 27– Plovdina, positiv control.

Upoređivanjem restrikcionog profila umnoženih P1/P7 produkata, dobijenog korišćenjem *TaqI* restrikcionog enzima sa FD-C i FD-D (sl. 5), utvrđeno je da svi naši izolati pripadaju fitoplazmi 16SrV-C soja.

Analiza zaraženosti sorti vrstom fitoplazme, upućuje na činjenicu da u našim uslovima nije dokazano prisustvo fitoplazme BN na sorti Plovdina, kao ni FD na sorti Šardone.

Rezultati naših ispitivanja, obavljenih u periodu od 2003. do 2005. godine, pokazuju da su fitoplazmozna oboljenja na vinovoj lozi prisutna u 22 do 25 istraživanih vinogorja u Srbiji. Duduk i saradnici (2004a, 2006b) su dokazali prisustvo fitoplazmoza na vinovoj lozi u 15 vinogorja Srbije a Krnjajić i saradnici. (2006) otkrili su prisustvo *Scaphoideus titanus* – vektora FD u svim vinogorjima Srbije pa čak i u onim rejonima u kojima nije otkrivena pojava FD, kao što je Vršачko vinogorje. Podatak koji pokazuje da je *S. titanus* prisutan u svim vinogorjima Srbije ukazuje na mogućnost da je fitoplazmoza vinove loze, koju izaziva FD, prisutna u svim vinogorjima u nas.

Naša istraživanja pokazala su, takođe, da je sorta vinove loze Plovdina izuzetno osetljiva prema fitoplazmoznim oboljenjima, na šta je i ranije ukazivano (Kuzmanović i sar., 2003., 2006a). Visoku do srednju osetljivost prema ovim oboljenjima ispoljile su sorte Šardone, Crni burgundac i Frankovka a srednju osetljivost Župljanka, Smederevka i Italijanski rizling. Najmanju osetljivost prema fitoplazmoznim oboljenjima tokom ovih naših istraživanja ispoljila je sorta Prokupac. Slične rezultate navode i Boudon-Padieu (2005), Martelli and Boudon-Padieu (2006), koji su posebno ukazali na izraženu osetljivost sorti Šardone i Crni burgundac na bolesti tipa žutila.

Naša istraživanja pokazuju da su fitoplazmoze vinove loze opšte raširene u nas. Ta oboljenja izazivaju značajne patološke promene na vinovoj lozi, koje za posledicu imaju velike štete u vinogradarskoj proizvodnji, kako su to pokazali drugi istraživači (Martelli and Boudon-Padieu, 2006; Morone et al., 2007; Zahavi et al., 2009). Ta problematika, odnosno štetnost fitoplazmoza vinove loze u nas, biće predmet naših budućih istraživanja.

Rezultati naših istraživanja ukazuju i na izvor i širenje fitoplazmoznih oboljenja na vinovoj lozi u nas. To se veoma dobro vidi na primerima sorata Šardone i Plovdina. Zasadi sorte Šardone podizani su, uglavnom, uveženim sadnim materijalom. U tim zasadima, koji su novijeg datuma, utvrđeno je prisustvo fitoplazmoze poznate pod imenom BN. U starijim vinogradima i vinogradima podignutim sa sadnim materijalom proizvedenim u nas fitoplazmoza BN nije nađena, odnosno nije se u njima proširila. S druge strane, u zasadima sorte Plovdina, koji su podignuti kalemovima proizvedenim u nas (Trsteničko vinogorje), utvrđeno je prisustvo fitoplazmoze poznate pod imenom Flavescence dorée. Ovi podaci upućuju na zaključak da su fitoplazme patogeni vinove loze uneti u našu zemlju

sadnim materijalom i da se, takođe, šire u nas na taj način. Stoga je potrebno da se zdravstvenom stanju kalemova vinove loze posveti posebna pažnja.

LITERATURA

- Ahrens, U., Seemüller, E. (1992): Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma-like organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. *Phytopathology*, 82: 828-832.
- Angelini, A., Squizzato, F., Gianluca, L., Borgo, M. (2004): Detection of a *Phytoplasma* Associated with Grapevine Flavescence dorée in *Clematis vitalba*. *European Journal of Plant Pathology*, 110 (2): 193-201.
- Babović, M., Perišić, M. (1977): Zapažanja o pojavi viroza na vinovoj lozi u nekim vinogorjima Srbije. Savjetovanje o eskoriozi i virusnim bolestima vinove loze, 16-18. novembar, Mostar, 107-115.
- Boudon-Padieu, E. (1999): Grapevine phytoplasmas. First Internet conference on phytopathogenic mollicutes, <http://www.Uniud.it/phytoplasma/pap/boud8290.-html>.
- Boudon-Padieu, E. (2003): The situation of grapevine yellows and current research directions: distribution, diversity, vectors, diffusion and control. Extended Abstracts of 14th Meeting of ICVG, 12-17, September 2003. Locorotondo (Bary), Italy, pp. 47-53.
- Boudon-Padieu, E. (2005): Phytoplasmas associated to Grapevine yellows and potential vectors. *Bulletin O.I.V.*, 2005, vol.78, n° 891-892, pp.311-320.
- Bovey, R., Martelli, G.P. (1992): Directory of major virus and virus-like diseases of grapevine. Description, historical review and bibliography. MFCIC/ICVG, Tunis, 111 pp.
- Deng, S., Hiruki, C. (1991): Amplification of 16S rRNA genes from culturable and non-culturable mollicutes. *J. Microbial. Meth.* 14:53-61.
- Duduk, B., Ivanović, M., Dukić, N., Botti, S., Bertaccini, A. (2003a): First report of an Elm Yellows, Subgroup 16 Sr V-C *Phytoplasma* Infecting Grapevine in Serbia. *Plant Disease*, 87 (5):599.
- Duduk, B., Botti, S., Ivanović, M., Dukić, N., Bertaccini, A. (2003b): Molecular characterization of a Flavescence dorée phytoplasma infecting grapevine in Serbia, pp. 91-92. In Extended abstract of 14th Meeting of ICVG, Locorotondo, Italy. 12-17 September 2003. Department of Plant Protection and Applied Microbiology, University, Bary (Italy).
- Duduk, B., Botti, S., Ivanović, M., Krstić, B., Dukić, N., Bertaccini, A. (2004a): Identification of phytoplasmas associated with grapevine yellows in Serbia. *J. Phytopathology* 152, 575-579.

- Duduk, B., Botti, S., Ivanović, M., Bertaccini, A. (2004b): Stolbur (Bois noir) i European stone fruit yellows fitoplazme na vinovoj lozi u Srbiji. V Congress of Plant Protection, 22-26 November 2004, Zlatibor, Serbia. pp. 134-135.
- Duduk, B., Ivanović, M. (2004c): Fitoplazmoze – žutilo i crvenilo vinove loze. Biljni lekar, (2), 161.
- Duduk, B. (2005): Fitoplazme – patogeni vinove loze u Srbiji. Magistarska teza. 1-57.
- Duduk, B., Ivanović, M. (2006a): Fitoplazme vinove loze. Biljni lekar, (2), 105-111.
- Duduk, B., Botti, S., Ivanović, M., Bertaccini, A. (2006b): Status of grapevine yellows in Serbia. Extended Abstracts of the 15th Meeting of ICVG, 3-7 April 2006, Stellenbosch, South Africa, pp.193-194.
- Ivanović, M., Ivanović, D. (2000): Pojava simptoma sličnih fitoplazmozama na vinovoj lozi u Kruševačkom vinogorju. XI jugoslovenski simpozijum o zaštiti bilja i savetovanje o primeni pesticida, Zlatibor, 4-9. decembar 2000. godine, Zbornik rezimea: 42.
- Jevremović, D., Paunović, S. (2005): Rezultati praćenja *Flavescence dorée* u matičnim zasadima vinove loze. VII savetovanje o zaštiti bilja, Soko Banja, 15-18. novembar 2005, Zbornik rezimea: 91.
- Jošić, D., Kuzmanović, S., Stajković, O., Stojanović, S., Aleksić, G., Starović, M. (2005): PCR detection of *Grapevine Phytoplasma* in Serbia. 4th Balkan Conference of Microbiology, Microbiologia Balkanica, Abstracts, O7.2, Bucharest, Romania, 2005., 23-26.
- Jošić, D., Kuzmanović, S., Stojanović, S., Aleksić, G., Starović, M. (2006): Grapevine yellows of *Vitis vinifera* cv. Plovdina from various vineyards in Serbia. 2nd FEMS Congress of European Microbiologists, 4-8 July, 2006, Madrid, Spain, Abstracts book, 291.
- Krnjajić, S., Mitrović, M., Cvrković, T., Milićević, J., Toševski, I. (2006): Rasprostranjenje *Scaphoideus titanus* Ball (Auchenorrhyncha, Cicadellidae) vektora fitoplazme vinove loze *Flavescence dorée*. VIII savetovanje o zaštiti bilja, Zlatibor, 27. novembar – 1. decembar 2006, Zbornik rezimea: 116-117.
- Kuzmanović, S. (1986): Žutilo na vinovoj lozi (neobjavljeni podaci).
- Kuzmanović, S., Starović, M., Tošić, M., Stojanović, S., Tomić, T. (2002): Elektronsko-mikroskopska detekcija fitoplazme vinove loze u Srbiji. Zaštita bilja, Vol. 53 (2-3), Br. 240-241, 75-86, (štampano 2005).
- Kuzmanović, S., Starović, M., Tošić, M., Stojanović, S., Tomić, T. (2003): Phytoplasmas on grapevine in Serbia, p. 93-94. In Extended abstract of 14th Meeting of ICVG, Locorotondo, Italy. 12-17 September 2003. Department of Plant Protection and Applied Microbiology, University, Bary (Italy).
- Kuzmanović, S., Martini, M., Ferrini, F., Ermacora, P., Starović, M., Tošić, M., Osler, R. (2004): Stolbur i *Flavescence dorée* fitoplazme prisutne na vinovoj lozi u Srbiji. V Kongres zaštite bilja, Zlatibor, 22-26 novembar 2004. Zbornik rezimea, 138-139.

- Kuzmanović, S., Osler, R., Tošić, M., Martini, M., Starović, M., Stojanović, S., Aleksić, G. (2006a): Grapevine cv. Plovdina as indicator of Flavescence dorée. Extended Abstracts of 15th Meeting of ICVG, 3-7, April 2006, Stellenbosch, South Africa, pp. 99-99a.
- Kuzmanović, S., Ivanović, Ž., Starović, M., Živković, S., Jošić, D. (2006b): Sorte vinove loze domaćini Flavescence dorée fitoplazme u Srbiji. VIII savetovanje o zaštiti bilja, Zlatibor, 24. novembar - 1. decembar 2006., Zbornik rezimeza, 103-104.
- Kuzmanović, S. (2007): Fitoplazmoze vinove loze u Srbiji. Doktorska disertacija. Poljoprivredni fakultet u Novom Sadu, 1-84.
- Kuzmanović, S., Martini, M., Ivanović, Ž., Jošić, D., Živković, S., Starović, M. (2007): Detection and incidence of FD and BN phytoplasmas in vineyards of different grapevine cultivars in Serbia. Bulletin of Insectology, Vol. LX (2) Dec. 2007, pp. 371-372. Published by: Department of Agroenvironmental Sciences and Technologies *Alma Mater Studiorum* University of Bologna ISSN 1721-8861.
- Kuzmanović, S., Martini, M., Ermacora, P., Ferrini, F., Starović, M., Tošić, M., Carraro, L., Osler, R. (2008a): Incidence and molecular characterization of Flavescence dorée and stolbur phytoplasmas in grapevine cultivars from different viticultural areas of Serbia. *Vitis* 47 (2), pp. 105-111.
- Kuzmanović, S., Starović, M., Ivanović, Ž., Aleksić, G., Stojanović, S., Živković, S., Gavrilović, V. (2008b): Rasprostranjenost fitoplazmoza vinove loze u Srbiji. XXIII Savetovanje o unapređenju proizvodnje voća i grožđa, Grocka, 25. jul 2008. Zbornik naučnih radova, Beograd, Vol. 14. (5), 121-128.
- Lee, I.-M., Martini M., Bottner K.D., Dane R.A., Black M.C., Troxclair N. (2003): Ecological implications from a molecular analysis of phytoplasmas involved in an aster yellows epidemic in various crops in Texas. *Phytopathology* 93: 1368-1377.
- Malisano, G., Firrao, G., Locci, R. (1996): 16S rDNA-derived oligonucleotide probes for the differential diagnosis of plum leptonecrosis and apple proliferation phytoplasmas. *EPPO Bulletin*, 26: 421-428.
- Martelli, G.P., Boudon-Padieu, E. (2006): Directory of Infectious Diseases of Grapevines and Viroses and Virus-like Diseases of the Grapevine: Bibliographic Report 1998-2004. *Options Méditerranéennes, Série B: N.55*, p.297.
- Martini, M., Botti, S., Marcone, C., Marzachi, C., Casati, P., Bianco, P.A., Benedetti, R., Bertaccini, A. (2002): Genetic variability among Flavescence dorée phytoplasmas from different origins in Italy and France. *Molecular and Cellular Probes* 16:197-208.
- Milosavljević, D. (1999): Poljoprivredna stanica, Kruševac (lična komunikacija).
- Morone, C., Boveri, M., Giosuè, S., Gotta, P., Rossi, V., Scapin, I., Marzachi, C. (2007): Epidemiology of Flavescence Dorée in Vineyards in Northwestern Italy. *Phytopathology*, 97(11):1422-1427.

- Osler, R. (2004): Department of «Biologia Applicata alla Dipesa delle Piante», University of Udine, Italy (lična komunikacija).
- Pešić, R. (1997): „Rubin“, Kruševac (lična komunikacija).
- Schneider, B., Seemüller E., Smart, C.D., Kirkpatrick, B.C. (1995): Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasmalike organisms or phytoplasmas. In: Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology. Vol. 2 pp 369-380. Edited by S. Razin and J.G. Tully, Academic Press, New York.
- Zahavi, T., Sharon, R., Mawassi, M., Naour, V. (2009): Long term effects of stolbur phytoplasma on grapevines in Israel. Extended abstracts 16th Meeting of OCVG, Dijon, France, 31.Aug-4Sept 2009, 147-148.

(Primljeno: 08.12.2009.)

(Prihvaćeno: 15.01.2009.)

WIDESPREAD OF GRAPEVINE PHYTOPLASMAS DISEASE IN SERBIA

SLOBODAN KUZMANOVIĆ¹, DRAGANA JOŠIĆ², MIRA STAROVIĆ¹, ŽARKO IVANOVIĆ¹,
NENAD TRKULJA¹, NENAD DOLOVAC¹, SAŠA STOJANOVIĆ¹

1 Institute for Plant Protection and Environment, Belgrade, Serbia

2 Institute for Soil Science, Belgrade, Serbia

SUMMARY

The widespread of phytoplasmas of the grapevine in Serbia was investigated from 2003 to 2005. A total of 505 vineyards were examined in 25 vineyard areals. According to results geographical distribution of phytoplasmas in vineyards in Serbia was obtained, as well as the disease severity and types of pathogens that were identified. Phytoplasmas presence has been proved in 22 of 25 vineyards areals, and in 354 of 505 observed vineyards. Incidence of phytoplasmas were registered in the vines of all varieties observed and tested, but in unequal severity. High level of infection of vine (in some cases over 50%) was found in vineyard areals of Sićevo, Župa, Trstenik and Negotin. On the other hand, phytoplasmas were not found or not proved in areals of Pocerško, Prokupačko and Ražanjško.

The high severity were detected at vine cvs. Plovdina (90%) and Chardonnay (67%), medium at cvs. Župski bojadiser (34%), Frankovka (29%) and Smederevka (27%), low at Black Burgundy (20%), Rhine Riesling (18%) and Italian Riesling (9%), and in trace at cv. Prokupac (4%).

The presence of two phytoplasmas were proved by PCR: »*Candidatus* Phytoplasma vitis« (Flavescence dorée - FD) and »*Candidatus* Phytoplasma solani« (Bois noir - BN). It was proved that »*Candidatus* Phytoplasma vitis« in Serbia belongs to 16SrV-C strain.

Key words: grapevine, phytoplasmas, identification, FD, BN, distribution and the region of Serbia.

(Received: 08.12.2009.)

(Accepted: 15.01.2009.)