

Zaštita bilja
vol. 57 (1-4), No 255-258, 5-55, 2006
Beograd

UDK 634.1/.7:632.35
Naučni rad

PATOGENE I BIOHEMIJSKO FIZIOLOŠKE ODLIKE BAKTERIJA RODA *PSEUDOMONAS* PATOGENA VOĆAKA

VELJKO GAVRILOVIĆ

Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Beograd

U radu su proučene patogene i biohemijske odlike sojeva bakterija roda *Pseudomonas*, izolovanih sa kajsije, šljive, višnje, džanarike, jabuke, kruške i dunje, kao i epifitnih sojeva poreklom sa trešnje, jabuke i kruške. Svi proučavani izolati su gram negativni, fluoresciraju na King-ovoj podlozi B i glukozu metabolišu isključivo u aerobnim uslovima (oksidativno). Oni takođe prouzrokuju HR duvana i stvaraju levan, ali ne i oksidazu, pektinazu i arginin dehidrolazu. Na osnovu preliminarnih i LOPAT testova zaključeno je da izolovani sojevi pripadaju bakteriji *Pseudomonas syringae*.

Proučavani sojevi, izuzimajući isolate sa višnje iz Šapca i dunje iz Leskovca, prouzrokuju nekroze na inokulisanim plodovima kruške, trešnje, paprika i paradajza, mahunama boranije, listovima jorgovana, sejancima kruške i kotiledonim listovima breskve.

Rezultati diferencijalnih (GATT) testova su pokazala da u populaciji fitopatogene bakterije *P. syringae* u Srbiji dominira patogeni varijetet *syringae*. Samo grupa izolata izolovanih iz plodova višnje iz Šapca pokazuju pri ovim testovima odlike pv *morsprunorum*.

Ključne reči: *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum*, koštičave i jabučaste voćke, patogene, biohemijske i fiziološke osobine.

UVOD

Voćarstvo je privredna grana sa veoma dugom tradicijom u Srbiji i od velikog je ekonomskog značaja za našu zemlju. Proizvodnja i plasman svežih i sušenih plodova voćaka više od jednog veka predstavlja zaštitni znak naše zem-

Skraćena verzija doktorske disertacije odbranjene na Poljoprivrednom fakultetu u Novom Sadu 2003. godine

lje na stranom tržištu. Prema površinama koje zauzimaju i značaju koje imaju u ishrani stanovništva, koštičave i jabučaste voćke spadaju u najvažnije voćne vrste u nas.

Poslednjih godina svedoci smo povećanja površina pod voćkama. Podižu se novi zasadi jabuke, kruške, breskve, kajsije, šljive, višnje, trešnje, naročito u privatnom sektoru.

Nove površine i želja za povećanjem prinosa omogućile su gajenje novih, visoko produktivnih sorti voćaka. To zahteva intenzivnu primenu najsavremenijih agrotehničkih mera, kao što su đubrenje, navodnjavanje itd.

Posledica toga je pojava novih, ekonomski veoma značajnih bolesti voćaka, a među njihovim prouzrokovateljima značajno mesto pripada fitopatogenim bakterijama. Otuda smo, polazeći od iskustava i rezultata drugih istraživača u svetu i kod nas, pristupili proučavanju bakterioza kao posebne grupe bolesti voćaka.

Ekonomski najznačajnije bakterije, paraziti voćaka su *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al. i *Pseudomonas syringae* van Hall 1902. *E. amylovora* je u našoj zemlji prisutna 12 godina i ozbiljno ugrožava uspešnu proizvodnju jabučastih voćaka (Gavrilović et al., 2001).

Bakterija *P. syringae* je znatno duže prisutna u nas. Parazitira jabučaste i koštičave vrste voćaka. Prouzrokuje sušenje grana, na kojima stvara rak-rane, nekrozu plodova, palež cvetova, pa i izumiranje čitavih voćaka. Znači, može naneti velike štete što je poslednjih godina kod nas zabeleženo naročito u proizvodnji kajsije i nekih sorti višnje (Arsenijević, 1976, 1980; Balaž i Arsenijević, 1989).

Međutim, slične patološke promene na ovim vrstama voćaka mogu prouzrokovati i brojne fitopatogene gljive, tako da se uspešna identifikacija prouzrokovaca bolesti može izvršiti samo primenom odgovarajućih laboratorijskih testova (Arsenijević, 1997).

Četiri patogena varijeteta bakterije *P. syringae* parazitiraju voćke i mogu naneti velike štete. Zbog toga je utvrđivanje spektra domaćina ove bakterije i identifikacija do nivoa patogenog varijeteta od velikog značaja za proučavanje epidemiologije patogena i razrade mera za njegovo suzbijanje.

Bakterija *Pseudomonas viridiflava* je u nekim regionima takođe utvrđena kao parazit voćaka (kajsije, breskve) prouzrokujući patološke promene slično kao i *P. syringae* (Arsenijević, 1997; Scortichini i Morone, 1997).

Stoga je cilj ovog rada da se prouči simptomatologija bolesti voćaka prouzrokovanih bakterijama roda *Pseudomonas*, mogućnosti izolacije njihove kao i patogene odlike, biohemijsko-fiziološke odlike izolovanih sojeva.

MATERIJAL I METODE

Izolacija patogena

Uzorci obolelog tkiva sa simptomima rak-rana na granama, plamenjače cvasti, nekroze plodova jabučastih i koštičavih voćaka, prikupljeni su na teritoriji zapadne i južne Srbije, Šumadije i Republike Srpske u periodu 1999-2002. godine i dopremani u laboratoriju za fitopatologiju Instituta za zaštitu bilja i životnu sredinu u Beogradu, gde je vršena izolacija patogena.

Izolovanje bakterije obavljeno je standardnom metodom razmaza na hranljivu podlogu, u Petri kutijama prečnika 9 cm (Klement 1990; Arsenijević, 1997). U ove svrhe korišćene su dve podloge: mesopeptonska podloga obogaćena saharozom (5%) (NAS) i King-ova podloga B. Pojedinačne kolonije su nakon 2-3 dana razvoja pri temperaturi od 25°C, prenošene na zakošenu mesopeptonsku podlogu s 2% glicerola (NAG), radi dobijanja čistih kultura bakterija (Klement 1990).

U cilju dobijanja pouzdanijih rezultata pri identifikaciji patogena, paralelno je vršena i izolacija gljiva iz obolelih uzoraka. Za utvrđivanje prisustva gljiva, korišćen je standardni metod nanošenja fragmenata, sa granice obolelog i zdravog tkiva na krompir-glukoznu podlogu (Dhingra i Sinclair, 1987).

Sojevi bakterija *Pseudomonas* sp. izolovani sa voćaka, korišćeni u ovim istraživanjima prikazani su u tabeli 1.

Tabela 1 – Lista proučavanih izolata

Table 1 – The list of investigated strains

Domaćin – Host	Broj izolata Nº of strains	Lokalitet Locality	Godina izolacije Year of isolation	Kolekcija Collection
Kajsija – Apricot	6	Šabac	1998	V. Gavrilović
Šljiva – Plum	6	Šabac	2000	V. Gavrilović
Džanarika – Mirobilan	10	Šabac, Topola	2000	V. Gavrilović
Višnja – Sour cherry	15	Leskovac, Šabac	2001	V. Gavrilović
Trešnja – Sweet cherry	5	Šabac	2002	V. Gavrilović
Kruška – Pear	4	Šabac	1999	V. Gavrilović
Jabuka – Apple	8	Topola, Gradiška	2001, 2002	V. Gavrilović
Dunja – Quince	3	Leskovac	1993	M. Arsenijević

Testovi za identifikaciju *P. syringae*

Razlikovanje bakterija po Gramu

Korišćen je metod s 3% KOH. Drvenom čačkalicom zahvati se deo kulture bakterije starosti 24 časa i emulguje u kapi 3% rastvora KOH na mikroskopskoj pločici. Podizanjem čačkalice uočava se pojava končića koji nastaje razgradnjom bakterijskih ćelija pod dejstvom KOH. Kod Gram pozitivnih bakterija izostaje obrazovanje končića. Kao kontrola korišćen je grampozitivan soj *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cor-19) (Suslow et al., 1982; Arsenijević i Jovanović, 1995).

Metabolizam glukoze (O-F test)

Korišćena je Hugh-Leifson-ova podloga, kojoj je nakon sterilizacije i hlađenja do 50° C dodat filtrom sterilisan rastvor glukoze do krajnje koncentracije 1%. Zasejavana je podloga u po 4 epruvete svakim proučavanim izolatom ponosob, od kojih je po dve zaliveno sterilnim parafinskim uljem, radi stvaranja anaerobnih uslova. Rezultati su očitani nakon tri dana razvoja u termostatu pri temperaturi od 27° C.

Pojava žute boje u podlozi, nastala kao rezultat razgradnje glukoze i promene pH vrednosti, označava pozitivnu reakciju. Kao kontrole su korišćene neza-sejana podloga i podloga zasejana bakterijom *Erwinia amylovora* (Ea-595), koja glukozu razlaže oksidativno i fermentativno (Arsenijević, 1997).

LOPAT TESTOVI

Stvaranje levana

Levan je složeni polisaharidni makromolekul koji nastaje razgradnjom saharoze. Bakterije koje stvaraju levan na podlogama obogaćenim saharozom, formiraju izrazito ispupčene, krupne kolonije, sjajne, glatke i sluzasta izgleda (levan tip). Za dokazivanje stvaranja levana korišćena je mesopeptonska podloga s 5% saharoze. Kao kontrola upotrebljeni su sojevi *P. syringae* pv. *syringae* (2905) i *Erwinia amylovora* (Ea-595) koji stvaraju levan (Lelliott i Stead, 1987; Arsenijević, 1997).

Stvaranje oksidaze

Primenjen je Kovacs-ev metod (Sands, 1990; Arsenijević, 1997). Filter papir je navlažen rastvorom tetra-metil-para-fenildiamin-dihidrohlorida (1%). Staklenim štapićem je zahvatan manji deo kolonije izolata bakterije sa zakošene podloge i nanošen na filter papir u obliku kruga. U slučaju pozitivne reakcije preneti deo bakterijske kolonije dobija tamnoljubičastu boju u vremenu od 10-15 sekundi. Slabo pozitivna reakcija nastaje u vremenu od 30-40 sekundi. Kao pozitivna kontrola korišćen je soj *Pseudomonas marginalis* (C-1) poreklom sa celera, a kao negativne kontrole sojevi *P. s. pv. syringae* (2905) i *E. amylovora* (Ea-595) (Sands, 1990; Arsenijević, 1997).

Trulež kriški krompira

U udubljenja na kriškama krompira nalivana je suspenzija bakterija koncentracije 10^8 cfu/ml, starosti 24 časa. Očitavanje rezultata vršeno je nakon 24 sata. Razmekšavanje tkiva znak je aktivnosti pektolitičkih fermenta. Kao kontrole su korišćeni sojevi *E. carotovora* ssp. *carotovora*, (Ku-40) kao pozitivna kontrola i *P. s. pv. syringae*, (2905 kao negativna kontrola) (Arsenijević, 1997).

Aktivnost arginin dehidrolaze

Primenjen je metod Thornley-a (1960). Odgovarajuća podloga zasejavana je ubodom, četiri epruvete svakim izolatom ponaosob. Posle zasejavanja, dve epruvete su zalivene sterilnim parafinskim uljem, radi stvaranja anaerobnih uslova. Promena boje podloge u crveno-ljubičastu u epruvetama sa anaerobnim uslovima znak je stvaranja ovog enzima i označava pozitivnu reakciju. Kao pozitivna kontrola korišćen je soj *Pseudomonas marginalis* (C-1) (Arsenijević, 1997).

Hipersenzibilna reakcija duvana

Šest do osam nedelja staro lišće duvana (*N. tabacum*, samsun), inokulisano je infiltracijom suspenzije bakterija, koncentracije 10^7 cfu/ml, u tkivo mezofila lista između dva bočna nerva. Kao pozitivne kontrole korišćeni su sojevi *P. syringae* pv. *syringae*, poreklom s višnje (2905) i *Erwinia amylovora* (Ea-595). U kontrolne liske duvana infiltracijom je uneta destilovana voda. Rezultati su očitavani nakon 24 časa. Pojava nekroze inokulisanog tkiva mezofila lista duvana u vremenu od 18-24 časa, označava pozitivnu reakciju (Arsenijević, 1997).

Patogene odlike proučavanih izolata *P. syringae*

Provera patogenosti korišćenjem nesazrelih plodova voćaka

Mladi, nesazreli plodovi kruške (viljamova), šljive (čačanska rana), trešnje (samberst), višnje (Hajmanov rubin), kajsije (mađjarska najbolja), veštački su inokulisani, nanošenjem suspenzije bakterija koncentracije 10^8 cfu/ml ubodom. Kontrolni plodovi povređeni su na isti način, a na ozleđeno mesto postavljena je kap sterilne vode. Kao kontrola korišćeni su sojevi Ea –595 (*Erwinia amylovora*) i 2905 (*P. s. pv. syringae*) (Arsenijević, 1997).

Inokulacija listova kruške, jorgovana i kotiledona breskve

Korišćeni su sveži listovi kruške (sorta viljamova) i jorgovana, odvojeni sa mladara iz tekuće vegetacije. Sterilnim skalpelom je odsečen vršni deo lisne peteljke koja je potom uranjana u suspenziju bakterija koncentracije 10^8 cfu/ml. Tako inokulisani listovi su postavljeni u sterilne Petri kutije, sa navlaženim filter papirom radi održavanja visoke vlažnosti. Pozitivna reakcija se ispoljava nekrozom lisne peteljke, glavnog i bočnih lisnih nerava, koja kasnije zahvata i tkivo mezofila lista. Kontrolni listovi su tretirani sterilnom vodom (Young, 1991; Yessad et al., 1992).

Kotiledoni listovi breskve su pre inokulacije oprani tekućom vodom, a sa njih je uklonjen perikarp. Posle sušenja na sobnoj temperaturi, inokulisani su ubodom bakteriološkom iglom, pri čemu je korišćena suspenzija bakterija koncentracije 10^8 cfu/ml. Kotiledoni listići su potom odlagani u sterilne Petri kutije, sa navlaženim filter papirom, a rezultati su očitavani posle 5 dana. Kontrolni kotiledoni listovi tretirani su sterilnom vodom. Okrugle, mrke pege prečnika 3-5 mm oko mesta inokulacije, označavaju pozitivnu reakciju (Endert i Ritchie, 1984). Kontrolni listovi su takođe, kao i u prethodnim slučajevima tretirani sterilnom vodom.

PROVERA PATOGENOSTI INOKULACIJOM PLODOVA PAPRIKE, PARADAJZA I LIMUNA

U ovim testovima korišćeni su nesazreli plodovi paradajza (sorta lustro), paprike (kalifornijsko čudo) i limuna nepoznate sorte. Inokulacija je izvršena ubodom istim postupkom kao i u testu provere patogenosti na plodovima raznih vrsta voćaka. Rezultati su očitavani 3-5 dana posle inokulacije. Ulegnute, mrke crne pege oko mesta inokulacije, označavaju pozitivnu reakciju (Arsenijević, 1997; Arsenijević i Obradović, 1996).

INOKULACIJA SEJANACA KRUŠKE

Seme kruške (sorte krasanka), prikupljano je iz zrelih, uskladištenih plodova tokom oktobra meseca. Seme je odlagano u najlonske kese i dezinfikovano sa 0,2% rastvorom kaptana (Merpan 50 WG, Magteshim Agan, Israel) i naredna 2-3 meseca držano pri temperaturi 2-5°C, u frižideru. Po pojavi klica, seme je sejano u saksije sa sterilnim peskom. Inokulisani su sejanci visine oko 5 cm, ubodom pomoću bakteriološke igle, u stabaoce neposredno ispod kotiledonih listića, suspenzijom bakterija 10⁸ cfu/ml. Inokulisani sejanci su održavani u vlažnoj komori 3-4 dana, kada su očitani rezultati. (Endert i Ritchie, 1984). Kao pozitivna kontrola korišćen je soj Ea-595 (*Erwinia amylovora*).

Provera patogenosti korišćenjem mahuna boranije

Sveže ubrane mahune boranije (sorta palanačka žuta) inokulisane su infiltracijom suspenzije bakterija 10⁸ cfu/ml. Kontrolne su na isti način tretirane vodom. Mahune su odlagane u petri kutije sa navlaženim filter papirom, radi održavanja visoke vlažnosti vazduha. Očitavanje rezultata vršeno je posle 24 časa od inokulacije, a pojava narandžasto mrkih pega oko mesta inokulacije označava pozitivnu reakciju (Arsenijević, 1997).

Diferencijalni testovi za patogene varijetete *morsprunorum* i *syringae*

Patogeni varijeteti *syringae* i *morsprunorum* se međusobno razlikuju na osnovu sledećih testova: hidroliza želatina i eskulina, stvaranje tirozinaze i korišćenje tartarata (Arsenijević, 1997).

Hidroliza želatina

Po 5 ml podloge razliveno je u epruvete 16 x 160 mm i sterilisano u autoklavu pri temperaturi od 121°C u trajanju od 15 minuta. Podloga je zasejana u tri ponavljanja proučavanim izolatima ponaosob. Kao kontrola korišćena je neza-sejana podloga.

Rezultati su očitavani nakon 3, 7, 14 i 21 dan. Pre očitivanja rezultata, epruvete s podlogom su postavljene u frižider pri 4°C u trajanju od 30 minuta. Ukoliko nakon tog perioda ne dođe do očvršćavanja podloge, bakterija razlaže želatin (Lelliott i Stead, 1987).

Hidroliza eskulina

Podloga sa eskulinom je posle sterilizacije zakošena i nakon očvršćavanja zasejavana kulturom bakterije starom 24 sata. Rezultati su očitavani nakon 4 dana razvoja pri temperaturi od 27°C. Pojava tamnomrke boje podloge označava pozitivnu reakciju. Kao pozitivna kontrola korišćen je soj *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* (Or-13). Izolat *Erwinia amylovora* (Ea-595) korišćen je kao negativna kontrola (Lelliott i Stead, 1987; Arsenijević, 1997).

Stvaranje tirozinaze

Podloga od saharoze, kazein-hidrolizata, L-tirozina i mineralnih soli, steriliše se u autoklavu 15 minuta pri 121°C i potom razliva u sterilne Petri kutije prečnika 9 cm. Po četiri izolata se zasejava po površini podloge i pojava crvenkastomrkog obojenja podloge u vremenu 3-4 dana, označava pozitivnu reakciju. Izolati *P. s* pv. *morsprunorum* pozitivno reaguju pri ovom testu, a sojevi *P. s* pv. *syringae* negativno (Arsenijević, 1997).

Korišćenje tartarata

Upotrebljena je tečna podloga od kvašćevog ekstrakta, mineralnih soli (YS) i natrijumtaratarata, pri čemu konačna koncentracija kiseline u obliku pomenute soli iznosi 0,15%, uz dodatak brom timol plavo (brome thumol blue) kao indikatora. Podloga je zasejavana kulturom bakterije starosti 24 sata, a rezultati očitavani tokom 21 dana, pri čemu promena boje podloge od zelene u plavu označava pozitivnu reakciju. Kao kontrola korišćena je nezasejana podloga (Dye, 1968; Arsenijević, 1997).

Odgajivačke odlike proučavanih izolata

Karakteristike kolonija na hranljivim podlogama

Proučene su karakteristike kolonija na mesopeptonskoj podlozi obogaćenoj saharozom (NAS) i na King-ovoj podlozi B. Zasejavanje bakterija vršeno je na dobro prosušenu podlogu razlivenu u Petri kutije. Za zasejavanje podloge korišćena je 24 sata stara kultura bakterije na zakošenoj podlozi, kojoj se do vrha zakošenog dela podloge dodaje sterilna voda. Potom se tako pripremljena suspenzija dodirnom bakteriološke petlje nanosi razmazom na podlogu radi dobijanja što većeg broja pojedinačnih kolonija čiji se izgled proučava (Billing et al., 1961). Posmatrani su

oblik i veličina kolonija, sjaj, izgled oboda kolonija, boja, ispupčenost i površinska struktura (Burkovicz i Rudolph, 1994; Arsenijević, 1997).

Razvoj pri temperaturi od 4°C i 41°C

Razvoj pri pomenutim temperaturama, praćen je u podlozi od kvašćevog ekstrakta i mineralnih soli (YS) (Dye, 1968; Sands, 1990). Po 5 ml podloge razliveno je u epruvete 16x160 mm i sterilisano u autoklavu pri temperaturi od 115° C i pritisku od 1,2 atm. u trajanju 20 minuta. Nakon zasejavanja podloge, epruvete su postavljene u vodeno kupatilo pri temperaturi od 4 C° odnosno 41C° u tokom 14 dana. Kao znak razvoja pri spomenutoj temperaturi nastaje zamućenje podloge. Kao kontrola korišćena je nezasejana podloga (negativna kontrola) i *Burkholderia cepacia* (2227, kao pozitivna kontrola) (Sands, 1990; Saddlerr, 1994).

Razvoj bakterija u prisustvu 3 i 5 % NaCl

Epruvete sa zasejanom podlogom od kvašćevog ekstrakta i mineralnih soli (YS) održavane su u termostatu pri temperaturi od 27° C u vremenu od 14 dana, radi proučavanja razvoja *P. syringae* u prisustvu 3% i 5% NaCl. Zamućenje podloge ukazuje na pozitivan rezultat. Soj *Erwinia amylovora* (Ea-595), koja se razvija pri ovim koncentracijama NaCl, i nezasejana podloga su korišćene kao kontrole (Sands, 1990; Arsenijević, 1997).

Karakteristike razvoja izolata u tečnoj podlozi sa saharozom

Tečna mesopeptonska podloga obogaćena saharozom (NAS), zasejavana je kulturom bakterija starosti 24 časa i održavana u termostatu pri 27°C tokom 5 dana, posle čega je vršeno očitavanje rezultata. Žuta boja podloge karakteriše izolate pv. *syringae*, a bela boja odlikuje izolate pv. *morsprunorum* (Garrett et. al., 1966), tako da se ovaj test koristi i kao diferencijalni za pripadnike ovih patogenih varijeteta.

Vitalnost bakterija na podlozi obogaćenoj saharozom

Izolati bakterija su zasejavani po površini čvrste mesopeptonske podloge obogaćene saharozom (NAS), u 48-časovnim intervalima. Izolati *P. s.* pv. *syringae* na pomenutoj podlozi vitalnost održavaju 8-14 dana, a izolati pv. *morsprunorum* 2-5 dana (Garrett et al., 1966). Ovaj test se u literaturi takođe navodi kao diferencijalni za ove patogene varijetete *P. syringae*.

Stvaranje čestica leda

Dva dana stare kulture, odgajene pri 25°C na podlozi od kvašćevog ekstrakta, peptona i glukoze, upotrebljene su za pripremu suspenzije bakterija koncentracije 10⁹cfu/ml. Suspenzija se potom prenosi u vodeno kupatilo čija je temperatura podešena na -4°C u kome se drže potopljene 5 minuta. U slučaju pozitivnog rezultata suspenzija se zamrzava u toku 5 minuta. Kao kontrola služe epruvete sa destilovanom vodom (Paulin i Luisetti, 1978; Arsenijević, 1997)

Proučavanje biohemijsko-fizioloških odlika izolata

Proučene su sledeće odlike: korišćenje azotnih jedinjenja, stvaranje kiselina iz ugljnih hidrata, enzimska aktivnost, stvaranje baza iz organskih kiselina, stvaranje siringomicina, kao i osetljivost prema antibioticima (Lelliott i Stead, 1987; Sands, 1990; Arsenijević, 1997).

Korišćenje azotnih jedinjenja

Stvaranje indola – Epruvete sa po 5ml podloge vode sterilisane su u autoklavu i nakon zasejavanja održavane u termostatu pri temperaturi od 27°C. Očitavanje rezultata vršeno je nakon 5 dana dodavanjem nekoliko kapi Kovačevog reagensa. Pojava crvenoljubičaste boje označava pozitivnu reakciju. Kao kontrole su korišćeni sojevi *Erwinia chrysanthemi* (Ar-2), pozitivna kontrola i *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica*, (Kr-20), negativna kontrola (Lelliott i Stead, 1987).

Stvaranje amonijaka – Po 5 ml podloge razliveno je u epruvete i sterilisano u autoklavu. Podloga je nakon zasejavanja održavana u termostatu pri 27°C. Rezultati su očitavani nakon tri dana, dodavanjem nekoliko kapi Nessler-ovog reagensa. Pojava crvenonaranđastog taloga označava pozitivnu reakciju. Kao kontrola korišćen je amonijum hidroksid (Shaffer, 1975).

Stvaranje ureaze – Korišćena je podloga od peptona, glukoze i mineralnih soli, uz dodatak indikatora fenol crveno (prilog 1). Podlozi je, nakon sterilizacije u kolbama (100 ml) i hladjenja do 50°C, dodat filtracijom sterilisan 20% rastvor uree do konačne koncentracije 1%. Nakon toga, u epruvete razliveno je po 5ml podloge i zakošeno. Svaki izolat je zasejavan u tri ponavljanja. Očitavanje rezultata vršeno je nakon 5 dana razvoja pri temperaturi od 27°C a pojava ružičaste boje u podlozi ukazuje na aktivnost ureaze. Kao pozitivna kontrola korišćen je soj *Proteus vulgaris* (Pv-1) (Arsenijević, 1997).

Redukcija nitrata – Tečna podloga sa 2 % peptona i KNO_3 zasejana je 24 časa starom kulturom bakterije i održavana u termostatu pri 27°C . Posle 5 dana razvoja bakterije, podlozi je dodano nekoliko kapi rastvora sulfanilne kiseline, a potom i nekoliko kapi α -naftil amina u rastvoru glacijalne sirćetne kiseline. Pojava crvene boje u podlozi označava pozitivnu reakciju, odnosno prisustvo nitrita (Shaffer, 1975). Kao kontrole korišćene su: nezasejana podloga i podloga zasejana sojem *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* (Ku-40) koji stvara nitrite.

Korišćenje L-leucina kao izvora C i N – Filtracijom sterilisana aminokiselina dodata je osnovnoj podlozi od mineralnih soli, agara i fenol crvenog kao indikatora. Zakošena podloga je zasejana 24 sata starom kulturom bakterija, a očitavanje rezultata vršeno je posle 28 dana. Razvoj bakterije u podlozi i promena pH vrednosti podloge, što se manifestuje promenom boje indikatora, označava pozitivnu reakciju (Garrett et al., 1966).

Hidroliza kazeina -Osnovna podloga sa 0,1% kazeina, sterilisana je u autoklavu i razlivena u Petri kutije prečnika 9 cm. Izolati bakterije zasejavani su razmazom po površini podloge. Pojava providne zone, koja se stvara oko razvijenih kolonija, u periodu 7-14 dana, znak je pozitivne reakcije. (Arsenijević, 1997).

Metabolizam ugljenih hidrata

Stvaranje kiselina iz ugljenih hidrata – Upotrebljavana je podloga od mineralnih soli i odgovarajućeg ugljenog hidrata, kao jedinog izvora ugljenika (ARJ) (Ayers et al, 1919; loc. cit. Lelliott and Stead, 1987). Podlozi je, nakon sterilizacije u autoklavu, dodat filtracijom sterilisan rastvor odgovarajućih ugljenih hidrata do konačne koncentracije 1%. Promena boje podloge u žuto tokom 21 dana razvoja označava pozitivnu reakciju. Kao kontrola korišćena je nezasejana podloga (Lelliott i Stead, 1987). U ovim proučavanjima korišćeni su sledeći ugljeni hidrati: D(+) glukoza, D (-) fruktoza, saharoza, D (+) trehaloza, rafinoza, D (-) riboza, laktoza, maltoza, D (+) melequitoza, D (-) sorbitol, glicerol, mesoinozitol, i (-) eritritol, dulcitol i D (-) manitol.

Metil red i VP test (stvaranje acetoina)– Korišćena je gotova Vogues-Prosquauer-ova podloga (Torlak, Beograd). Ova reakcija služi za dokazivanje acetoina koji stvaraju neke bakterije razgradnjom glukoze. Očitavanje rezultata vršeno je nakon 2 i 5 dana dodavanjem nekoliko kapi 5% rastvora α -naftola i nekoliko kapi 40% rastvora KOH. Pojava crvene boje podloge u vremenu od 2 sata označava pozitivnu reakciju. Kao kontrola korišćena je *E. coli*, koja ne

stvara acetoin (Dye, 1968; Arsenijević, 1997). *Erwinia amylovora*, (soj Ea-595), korišćena je kao pozitivna kontrola.

Test metil crveno (methyl red test) korišćen je kao indikator konačne pH vrednosti produkata koji nastaju razgradnjom glukoze. Dodavanjem pomenutog indikatora podloga dobija crvenu boju pri pH vrednosti 4,2 i nižoj. Kao kontrola korišćena je *E. coli*, kod koje je rezultat ovog testa pozitivan. *Erwinia amylovora* je poslužila kao negativna kontrola (Dye, 1968; Arsenijević, 1997).

Oksidacija glukonata– Stvaranje 2-ketoglukonata iz kalijum glukonata proučavano je u odgovarajućoj tečnoj podlozi. Izolati su gajeni u podlozi 48 sati, a posle je ista zapremina Benediktovog reagenasa dodata u epruvete koje su postavljane u vodeno kupatilo sa ključalom vodom. Pojava narandžastomrkog taloga, posle 10 minuta kuvanja označava pozitivnu reakciju (Arsenijević, 1997).

Enzimska aktivnost proučavanih izolata

Hidroliza skroba (Aktivnost amilaze) – Korišćena je mesopeptonska podloga s dodatkom rastvorljivog skroba, koja je nakon sterilizacije u autoklavu razlivena u Petri kutije i po prosušivanju zasejavana bakterijskom kulturom starom 24 sata. Nakon sedam dana razvoja na mesto porasta bakterije dodato je nekoliko kapi Lugolovog rastvora; nestanak plave boje označava pozitivnu reakciju. Kao pozitivna kontrola korišćen je *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* (Or-13) (Lelliott i Stead, 1987).

Hidroliza estra oleinske kiseline (Aktivnost lipaze) – Posle sterilizacije, podlozi je dodat Tween 80 do krajnje koncentracije 1%. Nakon toga podloga je razlivena u Petri kutije (90 mm) i zasejana kulturom bakterije starom 24 sata. Rezultati su očitavani nakon 7 dana razvoja od 27°C. Pojava beličastog oreola oko kolonija bakterije, koji ukazuje na stvaranje kristala kalcijum-oleata, označava pozitivnu reakciju. Kao kontrolni soj korišćen je izolat bakterije *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* (Or-13), koji hidrolizuje Tween 80 (Sands, 1990; Arsenijević, 1997).

Stvaranje lecitinaze – Korišćena je mesopeptonska podloga kojoj je nakon sterilizacije u autoklavu i hladjenja na 45°C dodato 10 ml emulzije žumanceta kokošijeg jajeta. Nakon toga podloga je razlivena u Petri kutije prečnika 90 mm i posle očvršćavanja zasejavana kulturom bakterije starom 24 sata. Pojava svetlog oreola oko kolonija bakterije označava pozitivnu reakciju. Kao kontrola korišćeni su sojevi *E. chrysanthemi* (soj Ar-2, pozitivna kontrola) i *E. carotovora* ssp. *carotovora*, (soj Ku-40, negativna kontrola) (Arsenijević, 1997).

Stvaranje katalaze – Kao reagens za dokazivanje stvaranja katalaze korišćen je 20% rastvor H_2O_2 . Bakteriološkom petljom je zahvatan manji deo kolonije izolata starosti 24 sata i emulgovan u kapi H_2O_2 na mikroskopskoj pločici. Pojava mehurića gasa označava pozitivnu reakciju, odnosno nastajanje slobodnog kiseonika (Arsenijević, 1997).

Aktivnost fosfataze – Mesopeptonska podloga (MPP) je sterilisana u kolbama od 100 ml pri temperaturi 121°C u trajanju od 10 minuta. Podlozi ohlađenoj do 60°C je dodat rastvor fenoltaleindifosfata, sterilisan filtracijom, do konačne koncentracije 0.05%. Zatim je podloga razlivena u Petri kutije i posle očvršćavanja zasejana dodirnom i postavljena u termostatski inkubator 18-24 časa pri temperaturi od 27°C.

Nakon završenog perioda razvoja, kolonije bakterije su izlagane dejstvu pare amonijum hidroksida. Obojavanje kolonija u crvenoružičasto označava pozitivnu reakciju. Kao kontrole korišćeni su sojevi *E. chrysanthemi*, (soj Ar-2 pozitivna kontrola) i *E. carotovora* ssp. *carotovora*, (soj Ku-40, negativna kontrola) (Arsenijević, 1997).

Stvaranje baza iz organskih kiselina

Upotrebljena je tečna podloga (Ayers et al., 1919) od mineralnih soli i proučavane organske kiseline, čija konačna koncentracija u podlozi iznosi 1%, uz dodatak brom timol plavog (bromothymol blue) kao indikatora. Podloga je zasejavana sojevima starosti 24 sata, a rezultati očitavani tokom 21 dan, pri čemu promena boje podloge u plavu označava pozitivnu reakciju (Arsenijević, 1997). Kao kontrola korišćena je nezasejana podloga. U ovim testovima korišćene su sledeće organske kiseline: limunska (u obliku Na soli), oksalna, vinska, mravlja, sirćetna, mlečna.

Stvaranje siringomicina

Sveža, 24 sata stara kultura bakterija zasejavana je po površini krompir-glukozne podloge. Kao test organizam korišćena je gljiva *Geotrichum candidum*. Rezultati su očitavani posle 5 dana, odsustvo razvoja gljive oko kolonije bakterije, označava pozitivnu reakciju. Podloga zasejana samo sporama gljive, u odsustvu bakterije, korišćena je kao kontrola (Duvellier, 1998).

OSETLJIVOST PROUČAVANIH IZOLATA PREMA ANTIBIOTICIMA

Suspenzija bakterija razlivena je po površini mesopeptonske podloge obogaćene saharozom u petri kutijama prečnika 9 cm. Diskovi sa različitim koncentracijama antibiotika postavljeni su u centar Petri kutije, nakon prosušivanja podloge a prisustvo zone inhibicije oko diska sa antibiotikom označava osetljivost proučavanog soja prema upotrebljenom antibiotiku (Psallidass, 1993). U ovim istraživanjima korišćeni su streptomycin i hloramfenikol.

REZULTATI

Simtomi bolesti

Simptomi koje bakterija *P. syringae* prouzrokuje na voćkama zavise od vrste domaćina i vremena kada se ostvarila infekcija.

Prvi znaci bakteriognog izumiranja kajsije pojavljuju se u vidu uvelosti lišća, a potom i sušenja pojedinačnih grana ili čitave krune voćaka. Lišće obolelih grana se blago opušta i vene, zadržavajući u početku zelenu boju.

Vremenom lišće izumire i postaje mrko po čemu se tokom vegetacije obolele grane lako uočavaju u odnosu na zdrave (sl. 1a). Na granama obolelih voćaka dolazi do nekroze kambijuma, ksilema i floema, usled čega nastaju rak-rane.

Uklanjanjem površinskog sloja kore nekroza tkiva se jasno uočava. Parazit takođe može prstenasto zahvatiti deblo kajsije, usled čega izumire čitava voćka. Međutim, ponekad podloga na koju je kajsija kalemljena ostaje zdrava, što rezultira izbijanjem brojnih izdanaka. Simptomi se takođe ispoljavaju na mladcima vertikalnog porasta u kruni voćke (vodopija), na kojima se uočava nekroza ksilema, floema i kambijuma. U graničnoj zoni obolelog i zdravog tkiva obrazuju se rak-rane usled neravnomernog razvoja obolelog i okolnog, zdravog tkiva.

U ovim istraživanjima zapaženi su takođe i simptomi nekroze korenovih izdanaka džanarike, korišćene kao podloge za kalemljenje kajsije i šljive (Šabac, Topola). Etiološkim proučavanjem uzročnika ove pojave posvećena je posebna pažnja zbog velikog značaja koji džanarika ima kao podloga u rasadničkoj proizvodnji. Nekroza izdanka počinje od vrha i postepeno se spušta ka korenu (sl. 1b).

Vrh izdanka se često lučno savija, što donekle podseća na simptome koje prouzrokuje *Erwinia amylovora*, prouzrokovač bakterijske plamenjače jabučastih voćaka. Međutim, izolacije bakterija iz korenovih izdanaka džanarike sa pomenutim simptomima nisu uvek bile uspešne, što možda ukazuje da slične patološke promene mogu biti prouzrokovane i nekim drugim agensima.



Sl. 1 – *Pseudomonas syringae*. Sušenje grana kajsije (a); sušenje korenovog izdanka džanarike (b) i nekroza cvasti kruške (c) (prirodna zaraza).

Fig. 1 – *Pseudomonas syringae*. Branch decay of apricot (a); shoot blight of myrobalan (b) and pear blossom blast (c) (natural infection)

Početne promene na plodovima višnje (sorte hajmanove kolekcije) ispoljavaju se u vidu tamnozelenih, vlažnih i elipsastih pega koje se vremenom povećavaju i postaju crnomrke.

Tkivo u okviru pega postaje ugnuto i naborano. Vremenom, ceo plod postaje nekrotičan. Nekrotični plodovi ne otpadaju sa grana. U Šapcu su pri vlažnom vremenu u okviru takvih nekrotičnih pega na plodovima višnje pomenutih sorti uočene svetlomrke gomolice reproduktivnih organa gljive. To ukazuje na prisustvo gljiva kao mogućeg prouzrokovaca oboljenja. Procenat obolelih plodova može dostići i 80%, što se dogodilo tokom 2001. godine, koja se odlikovala veoma kišovitim prolećem. Na peteljkaма plodova višnje se obrazuju mrke pege sa ljubičastim oreolom koje se šire zahvatajući je u celosti.

Na stablima breskve je primećeno sušenje grana, mladara i čitavih stabala, kao i obrazovanje rak-rana. Pojava bolesti često je praćena obilnim lučenjem smole, što je često karakterističan znak infekcije bakterijama. Uklanjanjem površinskog sloja kore uočava se nekroza ksilema, floema i kambijuma. Nekrotirana tkiva su vlažnog izgleda, što takođe podseća na infekcije bakterijama. Međutim, na potpuno suvim stablima breskve takođe se uočavaju i reproduktivni organi gljiva, što ukazuje da i one mogu biti uzročnik pomenutih patoloških promena na stablima breskve.

Plamenjača cvasti praćena obilnom produkcijom smole je simptom koji je zapažen tokom 2002. godine na trešnji ali slabog intenziteta. Nekrotični proces se ne širi dalje kroz grane trešnje. Na lišću se zapažaju nekrotične, mrke pege sa hlorotičnim oreolom. Tkivo u okviru pega postepeno ispada, što listu daje rešetav izgled.

Plamenjača cvasti je karakterističan simptom koji ova bakterija prouzrokuje na krušci. Cvasti su potpuno nekrotirale (krunični i čašični listovi kao i okolne liske) i crne su boje. Nekrotični proces je ograničen na cvasti i ne širi se dalje (sl. 1c).

Na obolelim stablima kruške zapaženo je i sušenje grana praćeno obrazovanjem rak-rana i plamenjača mladih letorasta. Dakle, pomenute patološke promene slične su onima koje prouzrokuje *E. amylovora*, te je pouzdana identifikacija patogena moguća jedino primenom odgovarajućih laboratorijskih metoda.

Nekrotične, mrkoljubičaste pege zapažaju se na granama jabuke. One se vremenom šire, spajaju i dovode do sušenja grana. Uklanjanjem površinskog sloja kore, uočava se nekroza ksilema, floema i kambijuma. Ovakve patološke promene primećene su pretežno na mladim stablima jabuke, dok na starijim one nisu zapažene. Sušenje dvogodišnjih grana, od vrha naniže, praćeno defolijacijom, takođe je simptom koji se zapaža na terenu, naročito na fiziološki oslabljenim stablima. Ovakve promene su primećene na stablima jabuke, na čijim su deblima i ramenim granama primećena oštećenja od insekata.

Simptomi na dunji se ispoljavaju u vidu plamenjače mladara i lišća, koji dobijaju mrku boju. Patološke promene su slične onima koje prouzrokuje *Erwinia amylovora*. Na granama se takođe obrazuju rak rane, što dovodi do sušenju grana i izumiranja čitavih voćaka.

Izolovanje patogena iz obolelih uzoraka

Opis pojedinačnih kolonija bakterije, izolovane iz kajsije, šljive, višnje, trešnje, džanarike, jabuke, kruške, i dunje, na mesopeptonskoj podlozi obogaćenoj saharozom i Kingovoj podlozi B, posle dva-tri dana razvoja pri temperaturi od oko 27°C, prikazan je u tabeli 2.

Tabela 2 – Izgled kolonija bakterije na mesopeptonskoj podlozi s 5 % saharoze (NAS) i King-ovoj podlozi B (KB)

Table 2 – Colonies appearance on sucrose nutrient agar (SNA) and King's medium B

Podloga Medium	Karakteristike kolonija – Colony characteristics			
	Boja kolonije Colony colour	Izgled kolonije Colony appearance	Dimenzije kolonija Colony size	Pigmentacija Pigmentation
Mesopeptonska + saharoza	bledo sive	levan tipa		nema
NAS	pale gray	levan type	3-4	none
King-ova B	bela	blago ispupčene, sjajne		fluorescentna
King's B	white	slightly convex, glow	2-2,5	fluorescent

Iz obolelih jednogodišnjih mladara i višegodišnjih grana kruške sa simptomima plamenjače, sušenja grana na kojima se obrazuju rak-rane, poreklom iz više lokaliteta u Srbiji izolovani su sojevi bakterija koji na podlozi obogaćenoj saharozom (NAS) formiraju bele, sjajne, izrazito ispupčene (levan tipa) glatke kolonije. Na King-ovoj podlozi B ne stvaraju fluorescentni pigment.

Ovi nefluorescentni izolati su gramnegativni, prouzrokuju hipersenzitivnu reakciju duvana i nekrotične promene praćene pojavom bakterijskog eksudata

na inokulisanim plodovima kruške. Oni takođe pozitivno reaguju sa serumom *E. amylovora* u testu aglutinacije. Na osnovu ovih rezultata smatramo da pomenuti izolati pripadaju vrsti *Erwinia amylovora*, koja je poslednjih godina postao rasprostranjen i ekonomski veoma štetan patogen kruške, ali i ostalih jabučastih voćaka u nas u nas. Takođe, značajno je istaći da su izolacije bakterija iz višegodišnjih grana kruške, sa simptomoma bolesti, često ostale neuspešne, što ukazuje da bi prouzrokovao pomenutih patoloških promena ispoljenih u vidu sušenja grana na kojima se obrazuju rak– rane mogle biti i druge prirode.

Nanošenjem reproduktivnih organa gljive, koji se obrazuju na nekrotičnim plodovima višnje iz Šapca, na krompir-glukoznu podlogu, obrazuje se micelija sive boje posle 3-4 dana razvoja pri temperaturi od 25°C. Na miceliji se vremenom formiraju telašca koja se sastoje od velikog broja jednoćelijskih, hijalinih konidija. Izolovanu gljivu smo na osnovu njenih morfoloških odlika svrstali u rod *Phoma*. Veštačkom inokulacijom plodova višnje uspešno su reprodukovani simptomi bolesti ispoljeni u vidu mrkocrnih nekrotičnih pega koje pokrivaju čitavu površinu inokulisanog ploda.

Iz obolelih grana kajsije sa simptomima rak rana i nekroze drvenastog tkiva, osim bakterija, na krompir-glukoznoj podlozi često se izoluju i gljive. Nanošenjem fragmenata iz granične zone obolelog i zdravog tkiva, kao i reproduktivnih organa gljive obrazovanih na suvim granama kajsije na pomenutu podlogu, razvoj micelije gljive uočava se posle 3-4 dana, pri 25°C. Formirana micelija je sivo-zelenkaste boje. Na njoj se posle desetak dana formiraju plodonosna tela gljive, piknidi crne boje, u kojima se nalaze brojne jednoćelijske, hijaline, blago povijene konidije. Na osnovu morfoloških odlika gljive, zaključili smo da je reč o fitopatogenoj vrsti roda *Leucostoma*, čestom parazitu koštičavih voćaka.

Sa grana obolelih, mladih stabala šljive u Šapcu, sa simptomima nekroze drvenastog dela tkiva, izolovana je gljiva koja na podlozi od krompira obrazuje miceliju bele boje, u okviru koje se kasnije obrazuju crna plodonosna tela u kojima se nalazi mnoštvo jednoćelijskih, hijalinih konidija sa dve gutacione kapi. Na osnovu ovih odlika, zaključeno je da je u pitanju gljiva iz roda *Phomopsis*.

Izolacija bakterija iz uzoraka obolele breskve sa simptomima sušenja grana, na kojima se u zoni obolelog i zdravog tkiva uočava obilna produkcija smole, ostala je neuspešna. Laboratorijskoj analizi podvrgnuti su uzorci breskve iz svih voćarskih rejona u Srbiji. Međutim, na podlozi od krompira izolovana je gljiva iz roda *Leucostoma*, koja na podlozi obrazuje kolonije sive boje, a sadržaj plodonosnih tela – piknida čine jednoćelijske, hijaline, blago savijene konidije.

Uspešne izolacije bakterija sa koštičavih voćaka ostvarene su u jesen, zimu i rano proleće, pri čemu smo najviše uspeha imali u aprilu mesecu. Fluorescentne bakterije na jabučastim voćkama se mogu izolovati tokom cele godine.

Identifikacija bakterija

Preliminarni testovi za identifikaciju izolovanih sojeva

Izolati poreklom iz nekrotiranih letorasta kajsije, grana šljive, korenovih izdanaka džanarike kao i kontrolni sojevi patogenih varijeteta *P. syringae* (izuzev *P. s. pv. persicae* i *Erwinia amylovora*) su gramnegativni, fluoresciraju na kinkovoj podlozi B i metabolišu glukozu samo u oksidativnim uslovima. Rezultati preliminarnih testova za identifikaciju prikazani su u tabeli 3.

Tabela 3 – Rezultati preliminarnih i LOPAT testova pri identifikaciju proučavanih sojeva

Table 3 – Results of preliminary and LOPAT tests in detection of investigated strains

Domaćin – Host	Gram	King-B	O/F	Levan Levan	Oksidaza Oxidase	Trulež krompira Potato rot	Arginin dehidrolaza Arginine dehydrolase	HR duvana HR in tobacco
Kajsija – Apricot	– ^f	+ ^g	O	+	–	–	–	+
Šljiva – Plum	–	+	O	+	–	–	–	+
Džanarika – Mirobilan	–	+	O	+	–	–	–	+
Višnja – Sour cheery	–	+	O	+	–	–	–	+
Trešnja – Sweet cherry	–	+	O	+	–	–	–	+
Kruška – Pear	–	+	O	+	–	–	–	+
Jabuka – Apple	–	+	O	+	–	–	–	+
Dunja – Quince	–	+	O	+	–	–	–	+
2905 ^a	–	+	O	+	–	–	–	+
CFBP 11 ^b	–	+	O	+	–	–	–	+
4048 ^c	–	+	O	+	–	–	–	+
7079 ^d	–	+	O	+	–	–	–	+
NCPPB 595 ^e	–	+	O/F	+	–	–	–	+

a kontrolni soj *P.s. pv.syringae* poreklom sa višnje – check strain of *P.s. pv.syringae* from sour cherry

b kontrolni soj *P.s. pv. syringae* poreklom sa kruške – check strain of *P.s. pv.syringae* from pear

c kontrolni soj *P.s. pv. papulans* – check strain of *P.s. pv. papulans*

d kontrolni soj *P.s. pv. persicae* – check strain of *P.s. pv. persicae*

e kontrolni soj *Erwinia amylovora* – check strain of *Erwinia amylovora*

f negativan rezultat – negativ result

g pozitivan rezultat – positive result;

Sojevi bakterija poreklom iz nekrotičnih plodova i peteljki višnje iz Šapca i Leskovca kao i oni poreklom iz obolelih cvasti i listova trešnje su takođe gram-negativni, stvaraju fluorescentni pigment na King-ovoj podlozi B i odlikuju se mogućnošću samo oksidativnog metabolizma glukoze (tab 3).

Na osnovu podataka iz tabele 3 zapažamo da svi izolati poreklom sa koštičavih voćaka stvaraju fluorescentni pigment na King-ovoj podlozi B, gramnegativni su i glukozu metabolišu samo u oksidativnim uslovima. Jedino kontrolni sojevi *P. s. pv. persicae* i *E. amylovora* ne fluoresciraju na King-ovoj podlozi B. Na osnovu toga smo zaključili da proučavani izolati pripadaju fluorescentnim bakterijama roda *Pseudomonas*, čestog patogena ovih vrsta voćaka.

Slične rezultate u pomenutim preliminarnim testovima identifikacije bakterija ispoljili su i izolati poreklom sa jabučastih voćaka (kruške, jabuke i dunje, tab. 3).

Na osnovu podataka iz tabele 3 može se zaključiti da i proučavani izolati poreklom sa jabučastih voćaka pripadaju rodu *Pseudomonas*, i to grupi fluorescentnih bakterija.

Stoga je identifikacija bakterija do nivoa vrste izvršena na osnovu LOPAT testova (stvaranja levana – L; aktivnosti oksidaze – O; aktivnosti pektolitičkih fermenata u testu inokulacije kriški krompira – P; aktivnosti arginindehidrolaze – A; hipersenzitivne reakcije duvana – T).

LOPAT testovi

Izolati poreklom s kajsije, šljive i većina sa džanarike stvaraju levan, ne stvaraju oksidazu i arginin dehidrolazu, niti poseduju pektolitičke fermente da bi prouzrokovali trulež kriški krompira. Prouzrokuju hipersenzitivnu reakciju inokulisanih liski duvana. Rezultati ovih testova prikazani su u tabeli 3.

Na osnovu podataka iz tabele 3 može se sa sigurnošću tvrditi da izolati poreklom sa kajsije, šljive i džanarike pripadaju vrsti *Pseudomonas syringae*. Iz nekih uzoraka obolele džanarike izolovani su sojevi koji stvaraju oksidazu i arginin dehidrolazu i ne prouzrokuju HR duvana, te prema tim karakteristikama pripadaju vrsti *Pseudomonas fluorescens*, koja se često sreće prilikom izolacije fitopatogenih bakterija.

Izolati sa višnje i trešnje takođe stvaraju levan, oksidazno su negativni, ne stvaraju arginin dehidrolazu i ne prouzrokuju trulež kriški krompira, ali prouzrokuju HR duvana (tab. 3).

Prema rezultatima iz tabele može se zaključiti da izolati poreklom iz nekrotičnih plodova i peteljki plodova višnje iz Leskovca i Šapca takođe pripadaju vrsti *Pseudomonas syringae*.

Sojevi poreklom s jabučastih voćaka u LOPAT testovima reaguju kao i oni poreklom sa koštičavih voćaka, odnosno ne stvaraju oksidazu, arginin dehidrolazu i pektolitičke fermente, a stvaraju levan i prouzrokuju HR duvana. Na osnovu ovih rezultata možemo tvrditi da i oni pripadaju vrsti *Pseudomonas syringae* (tab3).

Patogene odlike proučavanih izolata *Pseudomonas syringae* poreklom sa koštičavih i jabučastih voćaka

Izolati poreklom sa kajsije, šljive i džanarike prouzrokuju nekrotične promene na plodovima kruške (viljamova) i trešnje (samberst).

Prve promene na inokulisanim plodovima trešnje uočavaju se već posle 24 sata od inokulacije i ispoljavaju se u vidu nekrotičnih, crnih, ulegnutih pega, prečnika oko 3-4 mm. Iste pege uočavaju se na plodovima kruške posle tri dana od inokulacije i one dostižu prečnik oko 5 mm. U svim testovima inokulacije na plodovima voćaka izostaje pojava kapi bakterijskog eksudata bleđožute boje u okviru pega, što bi u suprotnom bila karakteristika bakterije *Erwinia amylovora*. Izolati D-3 i D-5 (džanarika, Šabac) na plodovima trešnje prouzrokuju nekroze prečnika oko 1 cm, a izolat D-1 (džanarika, Šabac) sitne pege oko 2,5 mm. To ukazuje na različit stepen virulentnosti proučavanih izolata.

Kontrolni sojevi 4048 (*P. s. pv. papulans*) i 7079 (*P. s. pv. persicae*) negativno reaguju u testovima provere patogenosti na inokulisanim nesazrelim plodovima voćaka. S obzirom i na odstupanja ovih izolata u preliminarnim i LOPAT testovima (odsustvo fluorescencije za *P. s. pv. persicae*) i nemogućnost stvaranja levana (*P. s. pv. papulans*), oni su usključeni iz daljih istraživanja.

U pogledu patogenih odlika na plodovima voćaka izolate sa višnje možemo podeliti u dve grupe: prva, koju čine izolati poreklom sa ploda višnje iz Leskovca i koji prouzrokuju nekroze na plodovima trešnje, višnje, kruške i šljive. Drugu čine izolati sa ploda i peteljke ploda višnje iz Šapca koji nekrotične promene prouzrokuju samo na plodovima trešnje, dok na inokulisanim plodovima ostalih vrsta voćaka nema pojave simptoma.

Na osnovu podataka iz tabele 4 uočava se da izolati s ploda višnje iz Leskovca (V-21, V-22, V-25, V-26, V-30, V-31) poseduju patogene odlike karakteristične za *pv. syringae*. Nasuprot njima, izolati poreklom s ploda i peteljke višnje iz Šapca (V-32, V-33, V-34, V-35, V-36, Vp-1, Vp-2, Vp-3, Vp-4) poseduju patogena svojstva tipična za *pv. morsprunorum*. Takođe treba napomenuti da su patološke promene na inokulisanim plodovima trešnje, slabije izražene od onih koje prouzrokuju izolati sa višnje iz Leskovca, ali i onih sa kajsije, šljive i džanarike.

Prema izolatima bakterije poreklom sa višnje iz Leskovca osetljivim su se pokazale i sorte erdibotero, keleris 14, mont mamut i hajmanova konzerv-

na, na čijim se plodovima posle inokulacije uočavaju mrkocrne nekrotične pege prečnika do 3-5 mm. Na inokuliranim plodovima oblačinske višnje izostaje pojava nekroze. Izolati sa trešnje poreklom iz nekrotiranih cvasti i pega na listovima prouzrokuju nekrozu plodova trešnje i kruške.

Razlike u patogenim svojstvima na plodovima voćaka zapažene su i među izolatima poreklom s jabučastih voćaka (jabuke, kruške i dunje) (tab 4).

Tabela 4 – Patogene karakteristike proučavanih izolata.

Table 4 – Pathogenicity of investigated strains

Domaćin – Host	Plodovi kruške Pear fruits	Plodovi trešnje Cherry fruits	Listovi jorgovana Lilac leaves	Plodovi limuna Lemon fruits	Sejanci kruške Pear seedlings	Kotiledoni breskve Peach cotyledons	Tomato fruits Plodovi paradajza	Plodovi paprika Pepper fruits	Mahunе boranije Bean pods
Kajsija – Apricot	+ ^f	+	+	+	+	+	+	+	+
Šljiva – Plum	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Džanarika – Mirobilan	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Višnja – Sour cheery	+/- ^g	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
Trešnja – Sweet cherry	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Kruška – Pear	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Jabuka – Apple	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Dunja – Quince	- ^h	+	-	-	-	-	-	-	-
2905 ^a	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CFBP 11 ^b	+	+	+	+	+	+	+	+	+
895 ^c	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4048 ^d	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7079 ^e	-	-	-	-	-	-	-	-	-

a kontrolni soj *P.s. pv.syringae* poreklom sa višnje – check strain *P.s. pv.syringae* from sour cherry

b kontrolni soj *P.s. pv. syringae* poreklom sa kruške– check strain *P.s. pv.syringae* from pear

c *P.s. pv. morsprunorum* poreklom sa trešnje– check strain *P.s. pv.syringae* from sweet cherry

d kontrolni soj *P.s. pv. papulans* – check strain of *P.s. pv. Papulans*

e kontrolni soj *P.s. pv. persicae* – check strain of *P.s. pv. persicae*

f pozitivan rezultat – positive result

g varijabilni rezultati – variable results

h negativan rezultat – negativ result

Izolati sa kruške iz Šapca (K-11, K-12, K-13, K-14, K-15) prouzrokuju tipične nekrotične promene na inokuliranim plodovima voćaka, ispoljene u vidu crnih ulegnutih pega u okviru kojih se ne obrazuju kapi bakterijskog eksudata,

prečnika 3-5 mm. Izolati poreklom iz suvih letorasta jabuke (J-1, J-2, J-3, J-4, J-5, Gradiška), mrkoljubičastih pega na granama jabuke (J-100, J-101, J-102, J-103, J-104, Topola) i nekrotičnih mladara dunje (Du117, Du 222, Du-525, Leskovac), prouzrokuju nekrotične promene samo na plodovima trešnje, dok se na inokulisanim plodovima ostalih vrsta voćaka ne zapažaju nekroze. Kada uporedo razmotre patogene odlike proučavanih izolata, na inokulisanim plodovima voćaka onda se jasno zapaža velika sličnost ili skoro potpuna istovetnost proučavanih izolata poreklom sa kajsije, šljive, džanarike, plodova višnje iz Leskovca i kruške. Izolati sa višnje (Šapca), jabuke (Gradiške i Topole) i dunje (Leskovac) pak, pri ovim testovima ispoljavaju slabiju patogenost.

Sojevi poreklom sa kajsije, šljive i džanarike prouzrokuju nekrozu inokuliranih listova jorgovana i kruške, kotiledonih listova breskve i sejanaca kruške (tab. 4).

Nekroza lisnih peteljki, koja se postepeno širi i zahvata glavni i bočne lisne nerve, uočava se na listovima jorgovana i kruške inokulisanim izolatima bakterija poreklom sa kajsije, šljive i džanarike. Prve promene na lisnim peteljkama pojavljuju se dva dana posle inokulacije, a nekroza većeg dela lista nastaje posle 5 dana.

Patološke promene ispoljene na inokulisanim kotiledonima breskve, manifestuju se u vidu okruglih, mrkih pega, prečnika oko 5 mm koje se zapažaju 3 dana posle inokulacije.

Nekroza sejanaca kruške uočava se posle 3 dana od inokulacije, a ispoljava se crnilom kotiledona koja se dalje širi i zahvata tkivo hipokotila.

Kontrolni sojevi *P. s. pv. syringae* (2905 i CFBP-11) u testovima patogenosti reaguju kao i naši izolati, dok kontrolni soj *P. s. pv. morsprunorum* (895) ne prouzrokuje nekrotične promene na listovima jorgovana i kruške, kotiledona breskve i sejanaca kruške.

Na osnovu podataka iz tabele 4 zaključili smo da se izolati sa ploda i peteljke višnje na osnovu svojih patogenih odlika mogu svrstati u dve jasno diferencirane grupe: prva sojevi poreklom iz Leskovca koji se odlikuju izraženom patogenošću; i druga iz Šapca koja osim što prouzrokuje HR duvana, na inokulisanim plodovima voćaka (izuzev trešnje), listovima jorgovana i kruške, kotiledonima breskve i sejanaca kruške ne prouzrokuju patološke promene.

Izolati sa kruške prouzrokuju nekrozu listova jorgovana i kruške, kotiledona breskve i sejanaca kruške. Nasuprot njima izolati sa jabuke i dunje negativno reaguju pri ovim testovima (tab 4).

Prema podacima iz tabele takođe vidimo da izolate poreklom sa kruške karakteriše izraženija patogenost nego izolate sa jabuke i dunje. Oni su u pogledu patogenih karakteristika slični onima sa kajsije, džanarike, šljive, trešnje i ploda višnje iz Leskovca.

Plodovi limuna, mahune boranije, nesazreli plodovi paradajza i paprike, veoma su pogodni za proveru patogenosti izolata *P. syringae*. Izolati poreklom sa kajsije, šljive i džanarike prouzrokuju mrkocrne, nekrotične ulegnute pege, na inokulisanim plodovima limuna, paradajza sorte lustro i paprike sorte kalifornijsko čudo, a narandžastomrke pege na inokulisanim mahunama boranije sorte palanačka bela (tab. 4).

Nekroze na inokulisanim plodovima paradajza i paprike uočavaju se posle 3 – 4 dana i crne su boje. Pege na plodovima limuna su mrke boje, ulegnute, prečnika do 5 mm. Patološke promene na mahunama boranije primetne su već posle 24 časa. Kontrolni izolati *P. s. pv. syringae* (2905 i CFBP-11) takođe prouzrokuju nekroze na inokulisanim plodovima limuna, paradajza i paprike i mahunama boranije. Kontrolni soj 895 *P. s. pv. morsprunorum* na mahunama boranije prouzrokuje nekrotične mrke pege koje se razlikuju od onih na mahunama inokulisanim našim i kontrolnim sojevima *P. s. pv. syringae*. Ovaj soj takođe ne prouzrokuje nekroze na plodovima paradajza, paprike i limuna.

Kao i pri prethodnim testovima patogenosti, izolate sa višnje možemo i ovde podeliti u dve jasno diferencirane grupe. Tako izolati poreklom sa ploda višnje iz Leskovca (V-21, V-22, V-25, V-26, V-30 i V-31) prouzrokuju nekrotične promene na plodovima limuna, paradajza i paprike i mrkonarandžaste nekroze na inokulisanim mahunama boranije. Izolati sa ploda i peteljke višnje iz Šapca (V-32, V-33, V-34, V-35, V-36, Vp-1, Vp-2, Vp-3, Vp-4), pak negativno reaguju pri ovim testovima izuzev na mahunama boranije na kojima se posle 24 sata od inokulacije pojavljuju nekrotične pege mrke boje. Izolati poreklom sa nekrotičnih cvasti trešnje i pega na listu trešnje takođe prouzrokuju nekroze plodova paradajza, paprike, limuna i mahuna boranije (tab. 4).

Izolati sa kruške iz Šapca (K-11, K-12, K-13, K-14, K-15) prouzrokuju nekrozu inokulisanih plodova limuna, paradajza i paprike. Proučavani sojevi poreklom sa kruške prouzrokuju mrkonarandžaste, blago ugnute nekroze na inokulisanim mahunama boranije. Izolati poreklom sa jabuke iz Gradiške i Topole (J-1, J-2, J-3, J-4, J-5, J-100, J-101, J-102, J-103, J-104) i dunje iz Leskovca (Du-117, Du-222, Du-525, Leskovac) ne prouzrokuju nekroze na inokulisanim plodovima paradajza, paprike i limuna. Međutim, na inokulisanim mahunama boranije prouzrokuju svetlo mrke nekroze.

Proučavani izolati *P. syringae* poreklom sa kajsije, šljive i džanarike odlikuju se patogenim odlikama karakterističnim za *pv. syringae*. Identično njima se u testovima patogenosti ponašaju i sojevi izolovani sa višnje u Leskovcu (V-21, V-22, V-25, V-26, V-30 i V-31). Izuzetak predstavlja grupa izolata poreklom sa ploda i peteljke višnje iz Šapca (V-32, V-33, V-34, V-35, V-36, Vp-1, Vp-2, Vp-3, Vp-4), koji svojim patogenim odlikama podsećaju na pripadnike patogenog varijeteta *morsprunorum*. Sojevi izolovani iz cvetova i listova trešnje odlikuju

se patogenim svojstvima karakterističnim za pv. *syringae*. Izolati poreklom sa kruške se odlikuju patogenim odlikama tipičnim za *P. s. pv. syringae*. Nasuprot njima, sojevi poreklom sa jabuke i dunje se odlikuju izrazito slabim patogenim svojstvima pri sprovedenim testovima patogenosti.

Na osnovu patogenih svojstava naših izolata, proučenih inokulacijom brojnih zeljastih i organa drvenastih biljaka, možemo zaključiti da se sojevi poreklom sa kajsije, šljive, džanarike, trešnje, višnje iz Leskovca (V-21, V-22, V-25, V-26, V-30 i V-31) i kruške odlikuju izraženom homogenošću u pogledu patogenih svojstava. Nasuprot njima izolati poreklom sa ploda i peteljke višnje iz Šapca, jabuke i dunje karakterišu slabijim stepenom patogenosti, pri čemu i njih odlikuje izražena homogenost u ovom pogledu.

Determinacija *P. s. pv. syringae* i *P. s. pv. morsprunorum*

Hidroliza želatina, eskulina, stvaranje tirozinaze, metabolizam tartarata

Proučavani izolati poreklom sa kajsije, šljive i džanarike hidrolizuju želatin i eskulin ali ne stvaraju tirozinazu i ne metabolišu (D+) tartarate (tab. 5).

Potpuna hidroliza želatina ispoljava se nemogućnošću očvršćavanja osnovne podloge pri temperaturi od 4°C posle 6-10 dana. Promena boje podloge u tamnomrku, u periodu od 2 – 3 dana označava pozitivnu reakciju hidrolize eskulina. Izolati poreklom sa kajsije, šljive i džanarike ne stvaraju tirozinazu, pošto ni u periodu od 7 dana ne dolazi do pojave crvenomrke boje podloge, što je karakterističan znak pozitivne reakcije. Ovi izolati ne metabolišu tartarate u periodu od 14 dana, što se ispoljava odsustvom pojave plave boje zasejane osnovne podloge. Kontrolni sojevi 2905 i CFBP-11 (pv. *syringae*) takođe hidrolizuju želatin i eskulin ali ne stvaraju tirozinazu i ne metabolišu tartarate. Nasuprot njima, kontrolni soj 895 (pv. *morsprunorum*) ne razlaže želatin i eskulin ali metaboliše tartarate. Intresantno je da ovaj soj ne stvara tirozinazu, a prema podacima iz literature pozitivna reakcija u ovom testu je odlika pv. *morsprunorum*.

Izolati poreklom sa ploda višnje iz Leskovca (V-21, V-22, V-25, V-26, V-30 i V-31) takođe hidrolizuju želatin i eskulin za razliku od sojeva izolovanih sa ploda i peteljke višnje iz Šapca (V-32, V-33, V-34, V-35, V-36, Vp-1, Vp-2, Vp-3, Vp-4). Sojevi iz Leskovca ne metabolišu tartarate, dok oni iz Šapca pozitivno reaguju pri ovom testu. Izolati sa ploda i peteljke višnje iz Šapca varijabilno se ponašaju pri testu aktivnosti tirozinaze. Grupa izolata poreklom sa ploda višnje iz Leskovca negativno reaguje pri ovom testu. Izolati sa trešnje hidrolizuju želatin i eskulin, ali ne stvaraju tirozinazu i ne metabolišu tartarate (tab. 5).

Sojevi bakterija izolovani sa jabučastih voćaka (kruške, dunje i jabuke), kao i većina izolata poreklom sa koštičavih voćaka hidrolizuju želatin i eskulin ali ne stvaraju tirozinazu i ne metabolišu tartarate (tab. 5)

Tabela 5 – Rezultati diferencijalnih testova za *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* i *morsprunorum***Table 5** – The results of differential tests for *Pseudomonas syringae* pvs. *syringae* and *morsprunorum*

Domaćin – Host	Hidroliza želatina Gelatin hydrolysis	Hidroliza eskulina Esculin hydrolysis	Aktivnost tirozinaze Tyrosinase activity	Korišćenje tartarata Tartrate utilization	Hidroliza kazeina Casein hydrolysis	Korišćenje L-leucina L-leucine utilization	Korišćenje DL-laktata DL-lactate utilization	Korišćenje laktoze Lactose utilization
Kajsija – Apricot	+ ^d	+	- ^e	-	+	+	+	-
Šljiva – Plum	+	+	-	-	+	+	+	-
Džanarika – Mirobilan	+	+	-	-	+	+	+	-
Višnja – Sour cheery	+/- ^f	+/-	-/+	-/+	+/-	+/-	+	+/-
Trešnja – Sweet cherry	+	+	-	-	+	+	+	-
Kruška – Pear	+	+	-	-	+	+	+	-
Jabuka – Apple	+	+	-	-	+	+	+	-
Dunja – Quince	+	+	-	-	+	+	+	-
2905 ^a	+	+	-	-	+	+	+	-
CFBP 11 ^b	+	+	-	-	+	+	+	-
895 ^c	-	-	+	+	-	+	+	+

a kontrolni soj *P.s. pv.syringae* poreklom sa višnje – check strain *P.s. pv.syringae* from sour cherry;

b kontrolni soj *P.s. pv. morsprunorum* poreklom sa trešnje – check strain *P.s. pv.syringae* from sweet cherry

c kontrolni soj *P.s. pv. syringae* poreklom sa kruške – check strain *P.s. pv.syringae* from pear;

d pozitivan rezultat – positiv result;

e negativan rezultat – negativ result

f varijabilni rezultati – variable result

Ostali diferencijalni testovi za patogene varijetete *syringae* i *morsprunorum*

Karakteristike razvoja bakterija u tečnoj mesopeptonskoj podlozi obogaćenoj saharozom, vitalnost izolata na čvrstoj podlozi istog sastava, metabolizam DL laktata, hidroliza kazeina, korišćenje L– leucina kao jedinog izvora C i N i stvaranje kiseline iz purpurne podloge sa laktozom se prema literaturnim podacima takođe smatraju diferencijalnim testovima za pv. *syringae* i pv. *morsprunorum*.

Ponašanje izolata poreklom sa kajsije, šljive i džanarike u nekim od ovih testova prikazano je u tabeli 5.

Rezultati prikazani u tabeli 5 ukazuju da izolati poreklom sa kajsije, šljive i džanarike hidrolizuju kazein, koriste L-leucin kao jedini izvor C i N, metabolišu DL-laktate i ne stvaraju kiselinu iz purpurne podloge sa laktozom .

Izolati bakterija poreklom sa plodova višnje iz Leskovca (V-21, V-22, V-25, V-26, V-30 i V-31) hidrolizuju kazein, koriste L-leucin kao jedini izvor ugljenika i azota, metabolišu laktate a različito reaguju pri testu stvaranja kiseline na purpurnoj podlozi sa laktozom. Identično se u pogledu ovih testova ponašaju sojevi izolovani sa trešnje. Izolati sa ploda i peteljke višnje iz Šapca (V-32, V-33, V-34, V-35, V-36, Vp-1, Vp-2, Vp-3, Vp-4) ne hidrolizuju kazein i ne koriste L-leucin, metabolišu DL-laktate i takođe, varijabilno stvaraju kiselinu na purpurnoj podlozi sa laktozom.

Na osnovu podataka iz tabele 5 vidimo da izolati poreklom sa višnje iz Leskovca (V-30, V-31) i sojevi V-33 i V-34, V-35, V-36, Vp-1 i Vp-3, poreklom sa ploda i peteljke višnje iz Šapca, stvaraju kiselinu iz purpurne podloge sa laktozom. Ostali izolati sa višnje ne koriste laktozu gajeni na ovoj podlozi. Kontrolni izolati *P. s. pv. syringae* (2905 i CFBP-11) ne stvaraju kiselinu iz laktoze, dok kontrolni soj 895 (*P. s. pv. morsprunorum*) pozitivno reaguje pri ovom testu.

Izolati poreklom sa jabučastih voćaka razlažu kazein, koriste L-leucin kao jedini izvor ugljenika i azota, metabolišu DL laktate i ne stvaraju kiselinu na purpurnoj podlozi sa laktozom (tab 5).

Izolati poreklom s kajsije, šljive, džanarike, trešnje i ploda višnje iz Leskovca (V-21, V-22, V-25, V-26, V-30 i V-3), kao i kontrolni sojevi 2905 i CFBP 11 (*P. s. pv. syringae*) boje podlogu sa saharozom u žuto. Belu boju ove podloge, posmatrane pod direktnim svetlom, stvaraju izolati poreklom sa ploda i peteljke višnje iz Šapca (V-32, V-33, V-34, V-35, V-36, Vp-1, Vp-2, Vp-3, Vp-4), kao i kontrolni soj 895 (*P. s. pv. morsprunorum*). Sojevi poreklom sa jabučastih voćaka (kruške, jabuke i dunje), mesopeptonsku podlogu sa saharozom (NAS), takođe boje u žuto. Svi proučavani sojevi sa koštičavih i jabučastih voćaka (kajsije, šljive, džanarike, višnje, trešnje, kruške, jabuke i dunje) zadržavaju vitalnost duže od 15 dana na čvrstoj mesopeptonskoj podlozi obogaćenoj saharozom (NAS).

Ostale biohemijsko-fiziološke odlike

Korišćenje azotnih jedinjenja

Proučavani izolati poreklom sa koštičavih i jabučastih voćaka ispoljavaju slabu aktivnost u pogledu korišćenja azotnih jedinjenja (tab 6).

Na osnovu rezultata iz tabele 6 vidimo da naši izolati stvaraju amonijak i ureazu, dok su negativni rezultati zabeleženi u testovima redukcije nitrata i stvaranja indola. Ovi testovi nemaju značaja u identifikaciji izolata *P. syringae* do nivoa patogenog varijeteta.

Tabela 6 – Ostale biohemijskofiziološke odlike proučavanih izolata.
Korišćenje azotnih jedinjenja i enzimska aktivnost

Table 6 – Other biochemical characteristics of investigated strains.
Utilization of nitrogen compounds and enzym activity.

Domaćin – Host	Stvaranje amoniaka Amonia production	Stvaranje indola Indol production	Redukcija nitrata Nitrate reduction	Stavljanje ureaze Urease activity	Stvaranje katalaze Catalase production	Lipaza Lipase	Amilaza Amilase	Fosfataza Phosphatase	Lecitinaza Lecitinase
Kajsija – Apricot	+ ^h	– ⁱ	–	+	+	–	–	–	–
Šljiva – Plum	+	–	–	+	+	–	–	–	–
Džanarika – Mirobilan	+	–	–	+	+	–	–	–	–
Višnja – Sour cheery	+	–	–	+	+	–	–	–	–
Trešnja – Sweet cherry	+	–	–	+	+	–	–	–	–
Kruška – Pear	+	–	–	+	+	–	–	–	–
Jabuka – Apple	+	–	–	+	+	–	–	–	–
Dunja – Quince	+	–	–	+	+	–	–	–	–
2905 ^a	+	–	–	+	+	–	–	–	–
CFBP 11 ^b	+	–	–	+	+	–	–	–	–
895 ^c	+	–	–	+	+	–	–	–	–
Pv-2 ^d				+					
Ar-2 ^e		+		–				+	+
C-1 ^f			+						
Or-13 ^g						+	+		

a kontrolni soj *P.s. pv.syringae* poreklom sa višnje – check strain *P.s. pv.syringae* from sour cherry

b kontrolni soj *P.s. pv. syringae* poreklom sa kruške– check strain *P.s. pv.syringae* from pear;

c kontrolni soj *P.s. pv. morsprunorum* poreklom sa trešnje– check strain *P.s. pv.syringae* from sweet cherry

d kontrolni soj *Proteus vulgaris* – check strain of *Proteus vulgaris*

e kontrolni soj *Erwinia chrysanthemi* – check strain of *Erwinia chrysanthemi*

f kontrolni soj *Pseudomonas marginalis* – check strain of *Pseudomonas marginalis*

g kontrolni soj *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* – check strain of *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*

h pozitivan rezultat – positive result;

i negativan rezultat – negativ result

Enzimsko aktivnost

Izolati poreklom sa jabučastih i koštičavih voćaka, korišćeni u ovim istraživanjima ne stvaraju amilazu, lipazu, lecitinazu i fosfatazu ali stvaraju katalazu (tab.6).

Na osnovu podataka iz tabele vidimo da naše izolate karakteriše veoma slaba enzimsko aktivnost. Međutim oni bez izuzetka razlažu vodonikperoksid pri čemu dolazi do oslobađanja slobodnog kiseonika, što je znak stvaranja katalaze a ispoljava se pojavom mehurića gasa na mikroskopskoj pločici. U ovim testovima uniformno se ponašaju svi izolati uključujući i referentne sojeve, pripadnike *pv. syringae* i *pv. morsprunorum*

Metabolizam ugljenih hidrata

Na osnovu rezultata iz tabele 7 zapaža se da izolati sa kajsije, šljive, džanarike, jabuke, kruške i dunje, kao i kontrolni sojevi 2905 i CFBP 11 uniformno reaguju u testu korišćenja mono i disaharida: metabolišu glukozu, fruktozu, saharozu i ribozu, što se manifestuje obojenjem podloge u žuto usled promene pH vrednosti podloge; kiselinu ne stvaraju iz maltoze i laktoze. Kontrolni izolat 895 metaboliše, fruktozu, saharozu i laktozu ali ne i maltozu.

Izolati poreklom sa kajsije, šljive, džanarike, jabuke, kruške i dunje u svojim metabolitičkim procesima koriste glicerol, sorbitol, manitol, inozitol ali ne i dulcitol, što se takođe ispoljava promenom boje zasejane podloge u žuto, kao znak promene pH vrednosti.

Izolati sa višnje (Šabac, Leskovac) metabolišu rafinozu, ribozu i eritritol, a negativno reaguju pri testovima korišćenja melezitoe i dulcitola. Ova grupa testova je primenjena samo za izolate sa višnje, pošto se oni međusobno značajno razlikuju u ostalim biohemijskim testovima.

Proučavani izolati sa višnje takođe metabolišu glukozu, fruktozu, saharozu, manitol, sorbitol i inozitol dok su u testu korišćenja maltoze zabeleženi varijabilni rezultati. Tako izolati V-25, V-33, V-35 ne stvaraju kiselinu iz maltoze dok ostali izolati pozitivno reaguju pri ovom testu.

Proučavani izolati sa kajsije, šljive, džanarike, višnje, kruške, jabuke, dunje pozitivno reaguju u testu oksidacije glukonata (K-glukonata), na šta ukazuje pojava narandžasto-mrkog taloga kada se podlozi u kojoj se bakterije razvijale doda Benediktov reagens. Rezultat testa metil-red (MR) primenjen sa našim reprezentativnim, izolatima je takođe pozitivan. Proučavani izolati poreklom sa jabučastih i koštičavih voćaka ne stvaraju acetoin (VP-test).

Tabela 7 – Korišćenje ugljenih hidrata**Table 7** – Utilization of carbohydrates

Domaćin – Host	Fruktoza Fructose	Laktoze Lactose	Maltoza Maltose	Saharoza Sucrose	Riboza Ribose	Sorbitol Sorbitole	Manitol Mannitole	Inozitol Inositol	Dulcitol Dulcitol
Kajsija – Apricot	+ ^d	– ^e	–	+	+	+	+	+	–
Šljiva – Plum	+	–	–	+	+	+	+	+	–
Džanarika – Mirobilan	+	–	–	+	+	+	+	+	–
Višnja – Sour cheery	+	–	–	+	+	+	+	+	–
Trešnja – Sweet cherry	+	–	–	+	+	+	+	+	–
Kruška – Pear	+	–	–	+	+	+	+	+	–
Jabuka – Apple	+	–	–	+	+	+	+	+	–
Dunja – Quince	+	–	–	+	+	+	+	+	–
2905 ^a	+	–	–	+	+	+	+	+	–
CFBP 11 ^b	+	–	–	+	+	+	+	+	–
895 ^c	+	–	–	+	+	+	+	+	–

a kontrolni soj *P.s. pv.syringae* poreklom sa višnje – check strain *P.s. pv.syringae* from sour cherry;

b kontrolni soj *P.s. pv. syringae* poreklom sa kruške– check strain *P.s. pv.syringae* from pear;

c *P.s. pv. morsprunorum* poreklom sa trešnje– check strain *P.s. pv.syringae* from sweet cherry

d pozitivan rezultat – positive result;

e negativan rezultat – negativ result

Stvaranje baza iz organskih kiselina

Ovaj test primenjen je takođe samo sa izolatima sa višnje, pošto su oni podeljeni u dve grupe prema svojim diferencijalnim biohemijskim odlikama (GATT). Izolati poreklom sa kajsije šljive, džanarike, jabuke, kruške i dunje ispoljavaju uniformnost u svojim biohemijskim odlikama tako da oni nisu bili uključeni u ove testove.

Na osnovu rezultata primenjenih testova uočava se da izolati poreklom sa ploda i peteljke višnje baze stvaraju iz mravlje i limunske kiseline. Negativan rezultat dobijen je u testu korišćenja oksalata, dok su rezultati metabolizma acetata varijabilni. Izolati V-21, V-22, V-30, V-31, Vp-1 stvaraju baze iz acetata, dok ostali izolati negativno reaguju u ovom testu.

Odgajivačke odlike proučavanih izolata

Svi izolati poreklom sa jabučastih i koštičavih voćaka formiraju bledosive kolonije, sjajne, glatke, sluzastog izgleda, izrazito ispupčene, prečnika od 1,5 – 5 mm na mesopeptonskoj podlozi obogaćenoj saharozom (NAS). To znači da proučavani izolati stvaraju levan. Međutim i među njima su utvrđene izvesne razlike kada je površinska struktura kolonija u pitanju. Tako izolati sa džanarike formiraju krupnije kolonije od izolata sa ostalih domaćina; manje su ispupčene i stvaraju više sluzi. Izolati poreklom sa jabuke iz Topole se odlikuju prisustvom tamnije zone u centru kolonije, po čemu se oni razlikuju od ostalih. Takođe, izolati Ks-104 i Ks –108 (kajsija, Šabac) se karakterišu prisustvom radijalnih pruga po površini kolonija, što im daje hrapav izgled.

Svi proučavani sojevi poreklom sa voćaka formiraju kolonije koje izrazito fluoresciraju na Kingovoj podlozi B. One su sjajne, glatke, blago ispupčene, ravnih ivica, prečnika oko 2 mm.

Proučavani izolati bez obzira na domaćina sa koga su izolovani se razvijaju u tečnoj podlozi sa 3 i 5 % NaCl. Zamućenje podloge zasejane proučavanim izolatima ukazuje na pozitivnu reakciju pri ovim testovima, baš kao i u testu razvoja u tečnoj podlozi pri 4°C. Međutim zamućenje podloge izostaje kada se bakterije održavaju pri 41 °C, što ukazuje da se one na ovoj temperaturi ne mogu razvijati.

Izolati poreklom sa kajsije, šljive, džanarike, višnje, trešnje jabuke, kruške i dunje stvaraju čestice leda kada su u suspenziji izložene temperaturi od –4°C. Pojava kristala leda zapaža se u toku 5 – 10 minuta.

Stvaranje siringomicina i osetljivost prema antibioticima

Proučavani sojevi poreklom sa kajsije, šljive, džanarike, kruške, trešnje, jabuke i višnje iz Leskovca stvaraju siringomicin, pošto onemogućavaju razvoj test organizma, gljive *Geotrichum candidum*. To se ispoljava stvaranjem zone, u kojoj nema razvoja gljive, oko kolonija bakterije posle 5 dana razvoja na krompir-glukoznoj podlozi. Negativan rezultat pri ovom testu ispoljavaju sojevi sa ploda i peteljke višnje iz Šapca (V-32, V-33, V-34, V-35, V-36, Vp-1, Vp-2, Vp-3, Vp-4) i dunje iz Leskovca (Du-117, Du-222, Du-525)

Antibiotici streptomycin i hloramfenikol onemogućavaju razvoj izolata proučavanih bakterija, obrazujući zonu inhibicije prečnika od 20-25 mm oko diska sa antibiotikom na ravnoj hranljivoj podlozi. Referentni soj 895 (*P. s. pv. morsprunorum*) je osetljiviji prema streptomycinu od naših izolata, pošto zona inhibicije oko diska sa antibiotikom iznosi 50 mm.

DISKUSIJA

Opšte napomene

U periodu od 1998. do 2002. godine vršeni su obilasci zasada voćaka u kojima su uočeni simptomi sušenja grana, paleži cvasti, nekroze plodova, lisne pegavosti, karakteristični za infekcije fitopatogenim bakterijama. Iz prikupljenih uzoraka obolelog tkiva koštičavih i jabučastih voćaka (kajsije, šljive, džanarike, višnje, trešnje, jabuke, kruške i dunje) izolovano je 82 soja fluorescentnih bakterija.

Simptomi bolesti voćaka, sa kojima smo se susretali na terenu su u punoj saglasnosti sa podacima iz literature (Arsenijević, 1997; Klement, 1977). Međutim, uporedna izolacija gljiva ukazuje da je dijagnoza bolesti samo na osnovu simptoma nepouzdana. Jer, fitopatogene gljive, izolovane tokom ovih istraživanja, mogu prouzrokovati slične ili pak identične simptome bolesti na voćkama. Gljiva pripadnik roda *Leucostoma* izolovana je iz obolelih stabala kajsije i breskve, a *Phomopsis* sp. iz obolelih stabala šljive. Interesantno je da bakterija *P. syringae* nije izolovana iz mnogobrojnih uzoraka obolele breskve, iz većine lokaliteta u nas, mada se prema literaturnim podacima ova voćka ubraja u veoma osetljive domaćine ove bakterije (Dowler i Weaver, 1975). U nas pak, važnu ulogu u izumiranju stabala breskve ima gljiva *Leucostoma cincta*, što su ranijim istraživanjima potvrdili naši ali i strani autori (Arsenijević et al., 1973, 1983; Biggs, 1986; Balaž et al., 2000). Kao čest prouzrokovač sušenja stabala breskve navodi se i gljiva *Leucostoma persooni* (Jones i Sutton, 1996). Arsenijević i Garić (1990) su identifikovali gljivu iz roda *Phomopsis* kao jednog od prouzrokovača izumiranja stabala kajsije. Autori su potvrdili patogenost dobijenih izolata veštačkim inokulacijama stabala kajsije. Navedeni podaci ukazuju da osim bakterija i fitopatogene gljive imaju veliki značaj kao prouzrokovači izumiranja voćaka.

Vredna spomena je i činjenica da su izolacije bakterija iz obolelih grana trešanja, sa simptomima nekroze i rak-ranama, ostale neuspešne, iako su prema podacima iz literature ovo karakteristični simptomi za infekcije bakterijama roda *Pseudomonas*, a trešnja se ubraja u veoma osetljive domaćine ove bakterije (Jones, 1971; Lattore et al., 1985).

Simptomi koje bakterija *P. syringae* prouzrokuje na krušci su na osnovu naših zapažanja ograničeni na plamenjaču cvasti (engl. blossom blast). Nije zapaženo širenje patogena u grane voćke niti su primećeni simptomi nekroze plodova kruške, što je zabeleženo u Južnoj Africi (Mansvelt i Hattingh, 1986). *P. syringae* je opisan i kao prouzrokovač izumiranja grana kruške, prouzrokujući velike štete (Spots i Cervantes, 1994; Spots i Cervantes, 1996). Autori navode podatke o epifitotičnoj pojavi izumiranja stabala kruške u Oregonu (SAD), nastaloj

usled prisustva ove bakterije, čemu je prethodio period niskih temperatura tokom zime od -15° do -20° C. Ercolani (1967) i Arsenijević (1970) takođe navode ovu bakteriju kao prouzrokovača sušenja grana i plamenjače mladara kruške. Na terenu su primećeni simptomi izumiranja grana pa i čitavih stabala kruške, ali je iz obolelih uzoraka izolovana bakterija *Erwinia amylovora* koja je od mnogo većeg značaja kao patogen kruške u nas nego *P. syringae*. U Japanu je kao prouzrokovač plamenjače cvasti kruške identifikovana gljiva *Diaporthe tanakae*, tako da se pouzdana identifikacija patogena može utvrditi samo primenom laboratorijskih metoda (Sakuma et al., 1982).

Intenzivnija pojava bakteriozne plamenjače cvasti na krušci, čiji je prouzrokovač *P. s. pv. syringae*, zapažena je tokom hladnog proleća, kada temperature u periodu cvetanja padnu na 0° - 5° C. Ove, niže temperature favorizuju razvoj patogena, pa se tada mogu očekivati i veće štete.

Intenzivnija pojava sušenja stabala kajsije konstatovana je tokom 2000. i 2002. godine. Ovo se može objasniti pojavom niskih temperatura tokom zime, odnosno smenjivanjima izuzetno hladnog vremena i toplijih perioda tokom ovog godišnjeg doba, koje uslovljava povećanu osetljivost kajsije ali i povoljne uslove za razvoj bakterije *P. syringae*. U literaturi takođe nalazimo obilje podataka o uticaju ovakvih vremenskih uslova na pojavu iznenadnog izumiranja stabala kajsije (Klement, 1977; Arsenijević, 1980).

Bakterija *P. syringae* je izolovana iz nekrotičnih plodova višnje, što je i ranije opisano u nas (Veselić, 1987; Balaž i Arsenijević, 1989). Uočeni su takođe i simptomi lisne pegavosti i rešetavosti lišća višnje, ali je izolacija bakterija ostala neuspešna. Mogući uzrok ove pojave bi mogla biti gljiva *Wilsonomices (Clasterosporium) carpophyllum*, čest parazit koštičavih voćaka u nas. Prema podacima Balaž et al. (1988), lisna pegavost prouzrokovana bakterijama karakteriše se prisustvom hlorotičnog oreola, koji je odsustvovao na uzorkovanim listovima obolele višnje. Tokom ovih istraživanja iz nekrotičnih plodova višnje (Šabac) izolovana je gljiva koja je na osnovu njenih morfoloških svojstava svrstana u rod *Phoma*. Arsenijević (1984) je iz obolelih plodova višnje izolovao gljivu *Glomerella cingulata*, što znači da i fitopatogene gljive mogu parazitirati plodove višnje, nanoseći značajne štete, a prouzrokujući simptome bolesti nalik na one prouzrokovane bakterijama.

Hranljiva mesopeptonska podloga obogaćena saharozom (NAS) i Kingova podloga B su se pokazale kao pogodne za izolovanje bakterija roda *Pseudomonas*. Podaci iz literature takođe ukazuju na pogodnost pomenutih podloga u ove svrhe (Latorre et al., 1985; Rudolph, 1990; Mansvelt i Hattingh, 1986; Burkovicz i Rudolph, 1994; Arsenijević, 1997). Zbog toga primena selektivnih podloga nije neophodna za izolovanje ove grupe bakterija.

Uspesne izolacije bakterija roda *Pseudomonas* iz obolelih grana koštičavih voćaka ostvarene su u periodu novembar – april, što je u punoj saglasnosti sa literaturnim podacima (Arsenijević, 1997). Izolovanje bakterije sa obolelih jabučastih voćaka moguće je tokom cele godine. Takođe, izolacija bakterija je moguća samo sa rak rana iz tekuće vegetacije, dok je iz višegodišnjih praktično nemoguća (Klement, 1977).

Svi proučavani izolati su na osnovu LOPAT testova identifikovani kao *Pseudomonas syringae*. Bez izuzetka stvaraju levan, polisaharid visoke molekulske težine koji ima važnu ulogu pri razvoju *P. syringae* i *Erwinia amylovora*, prouzrokovaca bakteriozne plamenjače jabučastih voćaka i patogenezi bolesti (Rudolph, 1992; Gross et al., 1992). U literaturi ima podataka o sojevima *P. syringae* koji ne stvaraju levan, ali se oni karakterišu i slabijim stepenom patogenosti (Mansvelt i Hattingh, 1986). Međutim, sa sigurnošću možemo tvrditi da postoje i drugi faktori koji imaju ulogu u nastanku patološkog procesa, pošto naši izolati sa dunje stvaraju levan a negativno reaguju u većini testova patogenosti. Ova istraživanja su pokazala da među izolatima *P. syringae* postoji obrnuta korelacija između aktivnosti oksidaze i HR duvana. Samo oksidazno negativni izolati prouzrokuju HR duvana i obratno, što ističu i drugi autori (Otta i English, 1970; Latorre et al., 1985; Mansvelt i Hattingh, 1986). Prouzrokovanje HR duvana je veoma važna patogena odlika bakterije *P. syringae*. Dobijeni su i izolati koji su HR pozitivni, ali negativno reaguju u ostalim testovima patogenosti (izolati sa višnje iz Šapca i dunje iz Leskovca). Takve podatke nalazimo i u literaturi (Mansvelt i Hattingh, 1986; Burkowicz i Rudolph, 1994). Rezultati dobijeni u ovim istraživanjima, kao i oni drugih autora pokazuju da HR predstavlja prvi korak u identifikaciji bakterije *P. syringae* (Mansvelt i Hattingh, 1986; Burkowicz i Rudolph, 1994; Arsenijević, 1997).

Patogenost proučavanih bakterija

Izolati *P. syringae* poreklom sa jabučastih i koštičavih voćaka prouzrokuju nekroze inokulisanih plodova trešnje, što se u našim istraživanjima pokazalo kao veoma pogodan test za brzu proveru patogenosti izolata. Nekrotične pege oko mesta inokulacije se pojavljuju već posle 24 – 48 sati a pogodnost ovog testa ističu i drugi autori (Jones, 1971; Burkowicz i Rudolph, 1994). Inokulacija plodova višnje je takođe pogodan test za proveru patogenosti, mada je razvoj nekrotičnog procesa nešto sporiji, nego na inokulisanim plodovima trešnje. Izolati sa jabuke iz Gradiške i Topole nekrozu prouzrokuju samo na inokulisanim plodovima trešnje, ali ne i na plodovima višnje i kruške što ukazuje i na različit stepen virulentnosti proučavanih izolata. Nejednak intenzitet patogenosti se uočava i u testu inoku-

lacije nesazrelih plodova šljive, pošto neki izolati poreklom sa kajsije i šljive prouzrokuju nekrozu inokulisanih plodova ali većina negativno reaguje u ovom testu. Sve ovo ukazuje da postoje razlike među patogenim odlikama proučavanih izolata sa jabučastih i koštičavih voćaka, pa se eventualno može govoriti i o izvesnom stepenu specijalizacije među njima u pogledu patogenih svojstava. Arsenijević (1976) i Burkowicz i Rudolph, (1994) u svojim istraživanjima takođe ističu razlike u patogenosti izolata *P. syringae*, ispoljene u vidu veličine nekroza na inokulisanim test biljkama.

Izolati poreklom iz ploda višnje iz Šapca ne prouzrokuju patološke promene na inokulisanim plodovima voćaka, izuzev na plodovima trešanja na kojima se uočava pojava nekroze. Njihove patogene odlike su karakteristične za pv. *morsprunorum*. Naši rezultati potvrđuju podatke iz literature prema kojima se neki testovi patogenosti (plodovi kruške, limuna, listovi jorgovana i dr.) mogu koristiti kao diferencijalni za pv. *syringae* i pv. *morsprunorum* (Garrett et al., 1966).

Veoma podesan i relativno brz test kojim se potvrđuje patogenost izolata *P. s. pv. syringae* je inokulacija listova jorgovana. Inokulisan je vrh lisne drške i posle 3 – 4 dana bakterija sistemično zahvata glavni i bočne nerve i mezofil tkiva lista. I drugi autori navode pogodnost ovog testa za proveru patogenosti (Young, 1991; Mitrev, 2000). Ovaj test takođe ukazuje i na sposobnost sistemičnog širenja patogena u biljci, što je ranije i eksperimentalno potvrđeno (Mansvelt i Hattingh, 1987). Kontrolni soj 895 (pv. *morsprunorum*) ne prouzrokuje nekrozu lista jorgovana, što se slaže sa podacima iz literature (Young, 1991). Proučavani izolati sa džanarike takođe prouzrokuju nekrozu lista jorgovana, sistemično se šireći kroz sprovodne sudove lisnih nerava. Ovo sistemično širenje bakterije kroz ksilem biljke može predstavljati problem u rasadničkoj proizvodnji, s obzirom na veliki značaj džanarike kao podloge za koštičave voćke (kajsiju, šljivu).

Slično listovima jorgovana, listovi kruške inokulisani na isti način mogu se iskoristiti za proveru patogenosti izolata *P. syringae*. Nekroza nerava i mezofila se uočava posle 3 – 4 dana, mada se prema našim rezultatima ispostavilo da je slabijeg intenziteta nego u ogledima sa listovima jorgovana. Ipak, može se smatrati pouzdanim i jednostavnim testom za proveru patogenosti. Yessad et al. (1992) takođe navode pogodnost raznih modifikacija ovog testa pri proveru patogenosti izolata bakterije *P. syringae*.

Izolati bakterije poreklom sa kajsije, šljive, kruške i višnje iz Leskovca prouzrokuju intenzivnu nekrozu sejanaca kruške. Potpuno izumiranje inokulisanih biljčica nastaje posle 2 – 3 dana, uz pojavu mrkocrne boje stabaoaceta i kotiledona, kao što su to opisali i Endert i Ritchie (1984). Značaj ovog testa je što se može primenjivati tokom zimskih i rano prolećnih meseci kada je izolacija bakterija iz koštičavih voćaka lako ostvariva a nema plodova i listova voćaka za brzu i pouzdanu proveru patogenosti. Kontrolni soj 895 (pv. *morsprunorum*) kao

i izolati sa ploda i peteljke višnje iz Šapca, ne prouzrokuju nekrozu inokulisanih sejanaca kruške.

Pouzdan test za proveru patogenosti je i inokulacija kotiledona breskve, na kojima se uočavaju mrke okrugle pege, što je saglasno sa podacima iz literature (Endert i Ritchie, 1984). Ovaj test je kao i prethodni, pogodan za proveru patogenosti tokom zimskih i rano prolećnih meseci kada na raspolaganju nema plodova voćaka koji se koriste u te svrhe.

Proučavani izolati sa kajsije, šljive, džanarike prouzrokuju nekrotične, ulegnute pege, prečnika 3-5 mm na plodovima limuna, a pogodnost ovog testa navode i drugi autori (Arsenijević, 1997; Garrett et al., 1966). Izolati sa ploda i peteljke ploda iz Šapca, kao i kontrolni soj 895 negativno reaguju pri ovom testu, pa se i on može koristiti za diferencijaciju pv. *syringae* i pv. *morsprunorum*.

Patogenost izolata *P. syringae* se može, takođe brzo, proveriti inokulacijom plodova paradajza i paprike. Kontrolni soj 895 (pv. *morsprunorum*), kao i izolati sa višnje iz Šapca negativno reaguju pri ovim testovima koji se takođe može smatrati diferencijalnim za patogene varijete *P. syringae*, pošto sojevi pv. *syringae* na plodovima paradajza i paprike prouzrokuju karakteristične mrkocrne ulegnute nekroze.

Mrkonarandžaste pege na inokulisanim plodovima boranije znak su da su izolati patogeni i ovaj test je veoma pogodan za proveru patogenosti izolata *P. syringae* pv. *syringae*, pošto i kontrolni izolati (2905, CFBP 11 – pv. *syringae*) reaguju identično našim sojevima. Pogodnost ovog testa u cilju provere patogenosti sojeva *P. syringae* navode i drugi autori (Arsenijević i Sremac, 1993; Arsenijević, 1997).

Iznenadenje predstavlja činjenica da izolati *P. syringae* poreklom sa jabuke i dunje, prilikom provere patogenosti, prouzrokuju HR duvana i nekrozu inokulisanih plodova trešnje, dok negativno reaguju pri ostalim testovima patogenosti. Ipak, s obzirom na simptome koje prouzrokuju na mladim stablima jabuke, trebalo bi biti predmet daljih istraživanja, pošto se smatra ekonomski štetnim patogenom (Morone i Scortichini, 1997). Hattingh et al., (1989) smatraju da ova bakterija napada fiziološki oslabljene voćke, odnosno one koje su doživele stres pa bi i to moglo biti objašnjenje kako izolati slabije patogenosti mogu prouzrokovati simptome.

Na osnovu opisanih rezultata možemo zaključiti da postoji obilje testova kojima se može pouzdano proveriti patogenost *P. syringae*. Takođe, uzimajući u obzir ponašanje tipskih sojeva pv. *syringae* i pv. *morsprunorum* zaključujemo da se mnogi testovi mogu koristiti i kao diferencijalni za ove patogene varijetete. Tokom naših istraživanja nisu definitivno utvrđene razlike u patogenosti izolata poreklom sa različitih domaćina, ali se može naslutiti da među njima postoji izvesni stepen specijalizacije, što navode i drugi autori (Burkowicz i Rudolph,

1994). Kontrolni sojevi *P. s. pv. papulans* i *P. s. pv. persicae* negativno reaguju pri testovima patogenosti na inokulisanim plodovima voćaka, te su zbog tih odlika, a i nekih drugih svojstava (nestvaranja levana – *pv. papulans*, odsustvo fluorescencije – *pv. persicae*) isključeni iz daljih istraživanja.

Odgajivačke odlike

Svi proučavani izolati na hranljivim podlogama obrazuju kolonije glatke površine. To je značajna odgajivačka odlika fitopatogenih bakterija, pošto postoji veza između patogenih svojstava izolata i izgleda njihove površine. Tako, Billing et al., (1961) ističe da među izolatima *Erwinia amylovora* postoje oni sa glatkom površinom kolonija, ali i izolati sa hrapavom površinskom strukturom. Izolati glatke površine su znatno izraženijih patogenih svojstava nego oni sa hrapavom strukturom. Burkowic i Rudolph (1994) su proučavajući veći broj izolata *P. syringae* poreklom sa raznih domaćina došli do istog zaključka. Međutim i među našim izolatima su utvrđene izvesne razlike u izgledu kolonija. Tako su na podlozi sa 5% saharoze, izolati sa džanarike krupniji, više sluzasti i manje ispupčeni nego oni sa drugih domaćina. Izolati sa jabuke iz Topole, koji se odlikuju veoma slabim patogenim svojstvima, na površini kolonije imaju tamniju zonu u centru. Izolat Du-525 (dunja, Leskovac) izrazito slabih patogenih svojstava, formira kolonije levan tipa na podlozi sa saharozom, ali su one znatno manjeg prečnika nego kolonije ostalih izolata. U pogledu boje i izgleda oboda kolonija nisu primećene razlike među izolatima sa raznih domaćina. Na Kingovoj podlozi B kolonije svih izolata su glatke, blago ispupčene, ravnih ivica. Proučavanjem odgajivačkih odlika utvrđene su izvesne razlike među izolatima, poreklom sa raznih domaćina što se slaže sa podacima drugih autora (Burkowicz i Rudolph, 1994).

Proučavani izolati sa jabučastih i koštičavih voćaka, bez obzira na domaćina sa kojeg su izolovani se razvijaju u podlozi sa 3 i 5 % NaCl, kao i u tečnoj podlozi pri 4°C ali ne i pri 41°C. S obzirom da i tipski sojevi identično reaguju u ovim testovima smatramo da se ovi testovi ne mogu koristiti kao diferencijalni za patogene varijetete *syringae* i *morsprunorum*.

Svi proučavani sojevi se odlikuju sposobnošću stvaranja čestica leda u laboratorijskim uslovima. Ovo, vrlo značajno svojstvo fitopatogenih bakterija roda *Pseudomonas* se poslednjih godina intenzivno proučava. Dokazano je da bakterije koje stvaraju čestice leda, utiču na povećanu osetljivost biljaka prema niskim temperaturama tokom ranog proleća. Ova odlika je izgleda povezana i sa patogenošću izolata. Paterson i Jones (1991) ukazuju da je intenzitet nakroze inokulisanih odrvenelih letorasta trešnje veći ukoliko su posle inokulacije bivali izloženi temperaturama ispod nule. Arsenijević (1976, 1980) takođe ukazuje da

su uspješne inokulacije stabala kajsije bakterijom ostvarene tokom zimskih meseci. To bi se takođe moglo dovesti u vezu sa sposobnošću bakterija da stvaraju čestice leda. Weaver (1978) i Klement (1990) smatraju da su uspješne inokulacije dvogodišnjih grana breskve bakterijom *P. syringae* moguće jedino ako se inokulisani letorasti izvesno vreme održavaju na temperaturama ispod 0°C. Stoga se može pretpostaviti da agresivnije ponašanje patogena tokom zimskih meseci i njegova pojava s proleća posle perioda niskih temperatura u vezi sa ovom odlikom bakterija. S druge strane pak, izolat Du-525 (dunja, Leskovac) i izolati poreklom sa jabuke iz Topole, koji se odlikuju izrazito slabom virulentnošću takođe stvaraju čestice leda. Svi ovi podaci ukazuju da se ovom svojstvu mora posvetiti pažnja pri proučavanju fitopatogenih bakterija.

Biohemijsko-fiziološke odlike

Proučene fenotipske karakteristike su omogućile identifikaciju bakterije do nivoa patogenog varijeteta, što je bio i osnovni cilj istraživanja. Međutim, diferencijalnim se pokazala samo jedna grupa testova: hidroliza želatina, hidroliza eskulina, stvaranje tirozinaze i metabolizam (D+) tartarata. Tako izolati sa kajsije, šljive i džanarike hidrolizuju želatin i eskulin ali ne stvaraju tirozinazu i ne metabolišu tartarate. Na osnovu ovih rezultata izolate smo svrstali u pv. *syringae* (GATTa⁺). Ovi kriterijumi su i prema literaturnim podacima veoma pouzdani i dosta se koriste u svrhu identifikacije *P. syringae* do nivoa patogenog varijeteta (Latorre i Jones, 1979; Mansvelt i Hattingh, 1986; Burkowicz i Rudolph, 1994).

Izolati sa višnje su prema rezultatima ovih testova podeljeni u 2 grupe. Sojevi poreklom sa ploda iz Leskovca hidrolizuju želatin i eskulin; ne stvaraju tirozinazu, ne metabolišu tartarate i svrstani su u pv. *syringae*. Druga grupa izolata iz Šapca poreklom sa ploda i peteljki plodova negativno reaguju u testovima hidrolize želatina i eskulina ali koriste tartarate u svojim metaboličkim procesima. Stvaranje tirozinaze je varijabilno. Izolati Vš-35 i Vš-36 pozitivno reaguju u ovom testu a ostali ne. Stoga smo ih svrstali u pv. *morsprunorum*. Iznenađujuća je negativna reakcija ovih izolata poreklom sa višnje iz Šapca u testu stvaranja tirozinaze. Međutim i kontrolni izolat 895 (*P. s. pv. morsprunorum*) negativno reaguje u ovom testu. U literaturi takođe nalazimo podatke koji potvrđuju negativan rezultat za pv. *morsprunorum* u ovom testu (Burkowicz i Rudolph, 1994). Otta i English (1970) takođe ističu odstupanja izolata *P. syringae* u pogledu reakcije u ovim testovima, pri čemu smataju da je metabolizam tartarata najstabilniji i najpouzdaniji u ovoj grupi diferencijalnih testova. Na osnovu dobijenih rezultata i podataka iz literature izolate poreklom sa ploda višnje iz Šapca smo svrstali u patogeni varijetet *morsprunorum*. Naš stav o identifikaciji ovih izolata potvrđuju

i njihove patogene odlike. Na plodovima višnje, veštački inokulisanim, pojavljuju se sitne svetlomme pege koje se neznatno razlikuju od kontrolnih plodova tretiranih vodom. To je i prema literaturnim podacima karakteristično za izolate *P. s. pv. morsprunorum* (Burkowicz i Rudolph, 1994). Na osnovu ovih rezultata zaključeno je da važnija uloga u genezi nekroze plodova višnje, sorte Hajmanov rubin u Šapcu, pripada gljivi, koja je identifikovana kao pripadnik roda *Phoma*, što je veštačkim inokulacijama i potvrđeno. Izolati bakterija koje smo identifikovali kao *P. s. pv. morsprunorum* su možda prisutni na površini ploda višnje, a postoji i mogućnost združenih infekcija gljivom i bakterijama, o čemu podatke nalazimo i u literaturi (Klement i Rozsnyay, 1977).

Proučavani izolati poreklom sa jabučastih voćaka razlažu želatin i eskulin a negativno reaguju pri testovima stvaranja tirozinaze i metabolizma (D+) tartarata (GAT⁺). Na osnovu ovih rezultata sa sigurnošću ih možemo svrstati u patogeni varijetet *syringae*. I na osnovu rezultata iz literature zaključujemo da jabučaste voćke parazitira isključivo patogeni varijetet *syringae*.

Epifitni izolati sa trešnje hidrolizuju želatin, ne stvaraju tirozinazu i ne metabolišu (D+) tartarate ali varijabilno reaguju u testu hidrolize eskulina. Tako sojevi T-2 i T-5 ne hidrolizuju eskulin, dok ostali pozitivno reaguju pri ovom testu. Oni su stoga svrstani u *P. s. pv. syringae* ali pojedine sojeve (T-2 i T-5) možemo svrstati u intermedijarnu formu izolata koji su prema svojim fenotipskim odlikama između *pv. syringae* i *pv. morsprunorum*. I u radovima drugih autora nalazimo slične podatke (Sobiczevski, 1984; Balaž i Arsenijević, 1989). Ovo su zaključci doneti na osnovu rezultata diferencijalnih biohemijskih testova. Upotrebom molekularnih metoda, taksonomsko mesto ovih izolata bi svakako bilo jasnije. Jer, primenom metoda lančane reakcije polimeraze i korišćenjem različitih molekularnih standarda ("prajmera") na primer, utvrđeno je postojanje različitih grupa sojeva u okviru dosta homogene populacije izolata *P. syringae* izolovane sa obolelih kajsija i krušaka u Engleskoj (Stead et al., 1998; Stefani i Stead, 2002).

Naši izolati sa kajsije, šljive i višnje iz Leskovca, džanarike, jabuke, dunje i kruške hidrolizuju kazein i koriste leucin kao izvor C i N. Prema podacima iz literature to su odlike karakteristične za pripadnike patogenog varijeteta *syringae* (Garrett et al., 1966; Crosse, 1966; Arsenijević, 1997). Međutim i kontrolni soj 895 (*pv. morsprunorum*) pozitivno reaguje pri ovim testovima. U literaturi takođe nalazimo podatke da pripadnici ovog patogenog varijeteta pozitivno reaguju u ovim testovima. (Ross i Hattingh, 1987). Izolati sa višnje iz Šapca ne hidrolizuju kazein i ne koriste L-leucin kao izvor C i N, što je karakteristika *pv. morsprunorum*. Izgleda da se ova dva testa ne mogu sa sigurnošću koristiti kao diferencijalni za *pv. syringae* i *pv. morsprunorum*.

Izolati sa kajsije, šljive, džanarike, jabuke, kruške i dunje ne stvaraju kiselinu na purpurnoj podlozi sa laktozom. Ovo su odlike kojom se karakterišu pripadnici

P. s. pv. syringae (Crosse, 1966; Arsenijević, 1997). Izolati sa višnje varijabilno reaguju u ovom testu, po čemu se razlikuju od onih sa ostalih koštičavih i jabučastih voćaka. Među izolatima sa ploda višnje iz Leskovca koje smo prema njihovim biohemijskim i patogenim odlikama svrstali u *pv. syringae*, nalazimo sojeve koji pozitivno reaguju u ovom testu. Izolati sa ploda višnje iz Šapca, koji su svrstani u *pv. morsprunorum*, takođe metabolišu laktozu korišćenjem ove podloge. Ovo potvrđuje postojanje intermedijarnih formi između *pv. syringae* i *pv. morsprunorum*.

Korišćenjem laktata odlikuju se svi izolati. To je prema literaturnim podacima odlika *P. s. pv. syringae* (Crosse, 1966). Međutim Ross i Hattingh (1987) ističu da 36 % izolata pripadnika patogenog varijeteta *morsprunorum* poreklom sa različitih domaćina i lokaliteta pozitivno reaguju u ovom testu, tako da se on ne može koristiti kao pouzdan kriterijum za razlikovanje *pv. syringae* i *pv. morsprunorum*.

Karakteristike razvoja u tačnoj podlozi sa 5% saharoze se pokazao kao pogodan diferencijalni test za *pv. syringae* i *pv. morsprunorum*. Izolati sa kajsije, šljive, ploda višnje iz Leskovca, džanarike i kruške i dunje, kao i kontrolni sojevi 2905 i CFBP-11 (*pv. syringae*) pomenutu podlogu boje u žuto. Nasuprot njima izolati sa višnje iz Šapca i kontrolni soj 895 (*pv. morsprunorum*) podlogu boje u belo, koja se uz to karakteriše i većom prozračnošću. Prema podacima iz literature *P. s. pv. syringae* ovu podlogu boji u žuto a *P. s. pv. morsprunorum* podlogu boje u belo (Garrett et al., 1966; Burkowicz i Rudolph, 1994; Arsenijević, 1997).

Svi proučavani izolati zadržavaju vitalnost duže od 10 dana na hranljivoj podlozi s 5% saharoze. To je odlika pripadnika patogenog varijeteta *syringae*. Međutim i izolati poreklom sa ploda višnje iz Šapca, koji su na osnovu svojih patogenih i biohemijsko-fizioloških odlika svrstani u *P. s. pv. morsprunorum* kao i kontrolni soj 895 (*pv. morsprunorum*) takođe su vitalni duže od 10 dana na ovoj podlozi. S toga smo zaključili da ovo nije dovoljno pouzdan test za razlikovanje patogenih varijeteta *P. syringae*, o čemu nalazimo i podatke u literaturi (Burkowicz i Rudolph, 1994).

Izolati, bez obzira na domaćina sa kog su izolovani, ispoljavaju izrazito slabu aktivnost u pogledu korišćenja azotnih jedinjenja, što se slaže sa podacima iz literature (Misaghi i Grogan, 1969; Ross i Hattingh 1987). U ovim testovima se identično ponašaju predstavnici oba patogena varijeteta i oni se ne mogu koristiti kao osnova za njihovo razlikovanje.

Naši izolati poreklom sa koštičavih i jabučastih voćaka ne stvaraju amilazu, lipazu, lecitinazu, fosfatazu, dok je pozitivan rezultat zabeležen u testu aktivnosti katalaze. Ovakva relativno slabo izražena enzimska aktivnost je u punoj saglasnosti sa podacima iz literature (Garrett et al., 1966; Ross i Hattingh, 1987; Arsenijević, 1997). Aktivnost katalaze je povezana sa patogenošću izolata, pa je

pozitivna reakcija u ovom testu lako objašnjiva, što nalazimo i u radovima drugih autora (Laby i Beer, 1996).

Pozitivni rezultati su zapaženi pri testovima metabolizma glukoze, fruktoze, saharoze, riboze, manitola, sorbitola, glicerola i inozitola, a varijabilna u testu korišćenja maltoze i rafinoze, što se slaže sa literaturnim podacima (Ross i Hattingh, 1987).

Izolati poreklom sa višnje iz Leskovca i Šapca, koji se prema svojim patogenim i biohemijskim odlikama jasno razlikuju, podvrgnuti su većem broju testova. Pored već navedenih organskih jedinjenja obe grupe izolata metabolišu eritritol, rafinozu, mravlju, sirćetnu i limunsku kiselinu, dok je negativan rezultat zabeležen u testu metabolizma melezitoe, dulcitolu i oksalne kiseline. To ukazuje da među ovim testovima nema diferencijalnih za ove dve grupe izolata poreklom sa ploda i peteljke višnje.

Na kraju treba istaći da izolati ispoljavaju veliku uniformnost pri ovim testovima i da ne postoji razlika u pogledu biohemijskih testova među izolatima poreklom sa koštičavih i jabučastih voćaka.

Osetljivost bakterija prema antibioticima i stvaranje siringomicina

Proučavani izolati bez obzira na domaćina sa koga potiču su osetljivi prema streptomycinu. Ova istraživanja su sprovedena više zbog taksonomske pripadnosti izolata, nego sa stanovišta suzbijanja bakterije, pošto antibiotici nisu registrovani za suzbijanje fitopatogenih bakterija u nas. Osetljivost prema hloramfenikolu takođe karakteriše naše izolate. Zona inhibicije u testovima sa antibioticima iznosi oko 20 – 25 mm. Osetljivost izolata *P. syringae* prema ovim antibioticima navode i drugi autori (Ross i Hattingh, 1987), ali takođe, ne sa stanovišta suzbijanja već više kao taksonomsku karakteristiku.

Stvaranje siringomicina je važna odlika većine sojeva *P. syringae* pv. *syringae* (Gross et al., 1984) kojom se karakterišu i naši izolati poreklom sa kajsije, šljive, džanarike, trešnje, kruške i jabuke ali i predstavnici nekih drugih patogenih varijeteta (Vassilev et al, 1996). Mišljenja o ulozi ove supstance u patogenezi su različita. Semüeler i Arnold, (1978) i Zeller (1996) smatraju da nema korelacije između patogenosti izolata *P. syringae* i njihove sposobnosti produkcije ovog jedinjenja. Prema podacima iz literature izolati pv. *morsprunorum* ne stvaraju siringomicin već toksin koronatin (Ross i Hattingh, 1987; Li Xu et al., 1992). Intrigantno je da naši izolati poreklom sa jabuke, izrazito slabih patogenih svojstava stvaraju siringomocin.

Komentar

Na osnovu proučavanja izolata *P. syringae* poreklom sa raznih domaćina zaključeno je da dominiraju predstavnici patogenog varijeteta *syringae*, a da su izolati sa ploda i peteljke višnje iz Šapca svrstani u pv. *morsprunorum*. Hidroliza želatina i eskulina, stvaranje tirozinaze i metabolizam (D+) tartarata su pouzdani testovi na osnovu kojih izolati mogu svrstati u ova dva patogene varijeteta. Ostali varijeteti, *persicae* i *papulans* se prema svojim patogenim i biohemijskim odlikama znatno razlikuju od proučavanih izolata, tako da tokom ovih istraživanja njihovo prisustvo nije utvrđeno.

S obzirom da izolati poreklom sa ploda višnje i grana jabuke u pogledu patogenih i biohemijskih odlika ispoljavaju određene razlike u odnosu na sojeve poreklom sa drugih domaćina, mišljenja smo da bi primena novijih, molekularnih metoda u proučavanju ove bakterije, mogla dati odgovor na nerazjašnjena pitanja u njihovoj taksonomiji.

Bakterija *P. syringae* ozbiljno ugrožava proizvodnju kajsije, prouzrokujući sušenje skeletnih grana i čitavih stabala, naročito pri povoljnim vremenskim uslovima tokom zime (smenjivanje niskih i viših temperatura). U našoj zemlji se bakterija sporadično javlja kao patogen šljive ne prouzrokujući značajnije štete. Masovno izumiranje stabala šljive u nekim lokalitetima u Srbiji, zapaženo poslednjih godina u nas, izgleda nije bakteriozne prirode. Kao patogen džanarike *P. syringae* može predstavljati veliki problem u proizvodnji sadnog materijala.

Tokom ovih istraživanja zabeleženi su veliki gubici u proizvodnji nekih sorata višnje, naročito tokom vlažnih godina. Smatramo da ova bakterija može ozbiljno ugroziti uspešnu proizvodnju nekih sorata višnje, pretežno Hajmanove selekcije. Plamenjača cvasti trešnje je pojava koja se sporadično javlja, ali joj se mora posvetiti veća pažnja.

Takođe smatramo da sporadična pojava plamenjače cvasti kruške koju prouzrokuje ova bakterija ne može biti od velikog ekonomskog značaja, te da *Erwinia amylovora* krušci nanosi neuporedivo veće štete. Isto se može smatrati i za dunju.

Pojava nekroze na granama mladih stabala jabuke, koju prouzrokuje *P. syringae*, je interesantna i sa naučnog i stručnog aspekta, te joj se mora posvetiti puna pažnja.

LITERATURA

- Arsenijević, M. (1970): Prilog proučavanju *Pseudomonas syringae* van Hall kao parazita kruške u Jugoslaviji. *Zaštita bilja* 110-111: 301-307, Beograd.
- Arsenijević, M. (1976): Uloga bakterija u genezi "apopleksije kajsije". *Zaštita bilja* 137-138: 237-244, Beograd.
- Arsenijević, M. (1980): Bakteriozno izumiranje kajsije. *Zaštita bilja* 154: 393-404, Beograd.
- Arsenijević, M. (1980): Further investigations on *Pseudomonas syringae* van Hall as pathogen of apricot in Yugoslavia. *Zaštita bilja* 152: 121-127, Beograd.
- Arsenijević, M. (1984): *Glomerella cingulata* (Ston) Spauld et Schrenk (konidijski stadijum *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz./Sacc.) kao parazit plodova višnje. *Jugoslovensko voćarstvo* 69-70: 45-49.
- Arsenijević, M. (1992): Fitopatogene bakterije. Naučna knjiga, Beograd, 166 p.
- Arsenijević, M. (1997): Bakterioze biljaka. III izmenjeno i dopunjeno izdanje. S-Print, Novi Sad, 576 p.
- Arsenijević, M., Sremac Smiljana (1993): *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, parazit jabuke. *Zaštita bilja* 206: 283-293, Beograd.
- Arsenijević, M., Jovanović Olivera (1995): Nov postupak razlikovanja bakterija po Gramu. *Zaštita bilja* 211: 57-62.
- Arsenijević, M., Obradović, A. (1996): A pathovar of *Pseudomonas syringae* causal agent of bacterial leaf spot and blight of pepper transplants. In : K. Rudolph, T.J. Burr, J.W. Mansfield, D. Stead, A. Vivian, J. von Kietzell (eds): *Developments in Plant Pathology Vol. 9: Pseudomonas syringae Pathovars and Related Pathogens*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, pp. 61-65.
- Arsenijević, M., Jasnić, S., Balaž, J., Petrov, M. (1973): Prilog proučavanju *Cytospora cincta* Sacc. kao parazita breskve. *Zaštita bilja* 126: 337-348.
- Arsenijević, M., Jasnić, S., Balaž Jelica, Petrov Marija (1982): Razvoj *Cytospora cincta* Sacc. kao parazita breskve tokom godine. *Zaštita bilja* 159: 73-83. Beograd.
- Balaž Jelica, Arsenijević, M. (1989): Further investigations on *Pseudomonas syringae* pathovar as pathogen of sour cherry fruits in Yugoslavia. *Proc. 7th Int. Conf. Plant. Path. Bact. Budapest, Hungary, 1989*: 515-520.
- Balaž Jelica, Arsenijević, M. i Vojvodić, Đ. (1988): Etiološka proučavanja bakterijske nekroze plodova i lišća višnje i mogućnosti suzbijanja parazita. *Zaštita bilja* 185: 311-321, Beograd.
- Balaž Jelica, Popović, T., Knežević Tatjana (2000): Proučavanje uzročnika sušenja breskve u području Fruške Gore. XI Jugoslovenski Simpozijum o zaštiti bilja, Zlatibor, 4 – 9 decembar 2000. god., *Zbornik rezimeja*: 40.
- Balestra, G. M., Varvaro, L. (1997): *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* causal agent of disease on floral buds of *Actinidia deliciosa* (A.Chev) Liang et Ferguson in Italy. *J. Phytopathology* 145: 375-378.

- Biggs, A. R. (1989): Integrated approach to control *Leucostoma* canker of peach in Ontario. *Plant Disease* 73: 869-874.
- Biggs, A.R. (2001): Diagnostic keys to major tree fruit diseases in the Mid Atlantic region. *Disease Management Guides. Fruit Tree Books*. Kearneysville Tree Fruit Research and Education Center, pp.1-8.
- Billing, E., Baker, L. A. E., Crosse, J. E., Garrett, C. M. E. (1961): Characteristics of English isolates of *Erwinia amylovora* (Burr) Winslow et al. *Jour. Appl. Bact.* 24: 195-211.
- Brother, H. (1996): Bacterial canker on apple, pear and cherry during recent year in Germany. In: K. Rudolph, T. J. Burr, J. W. Mansfield, D. Stead, A. Vivian, J. von Kietzell (eds): *Developments in Plant Pathology Vol. 9: Pseudomonas syringae Pathovars and Related Pathogens*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, pp. 70-74.
- 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.
- Burr, T. J. (1990): Blister spot. In: *Compendium of apple and pear diseases*. Jones, A. L. and Aldwinckle, H. S. (eds.), APS, Sent Paul, Minesota, USA, pp. 63-64.
- Carter, M. V., Moller, W. J. (1977): *Eutypa* canker and dieback of apricot. *EPPO Bulletin* Vol.7, No.1: 85-94
- Crosse, J. E. (1963): Bacterial canker of stone fruit. A comparison of leaf-surface populations of *Pseudomonas morsprunorum* in autumn on two cherry varieties. *Ann. Appl. Biol.* 52: 97-104.
- Crosse, J. E. (1966): Epidemiological relations of the *Pseudomonad* pathogens of deciduous fruit trees. *Ann. Rev. Phytopath.* 4: 291-310.
- Crosse, J. E., Garrett, C. M. E. (1970): Pathogenicity of *Pseudomonas morsprunorum* in relation to host specificity. *Journal of General Microbiology* 62: 315-327.
- Dhingra, O. D., Sinclair, J. B. (1995): *Basic Plant Pathology methods*. Lewis Publishers Boca Raton, Florida. 432 p.
- Dinisen, I. G. (1990): Survival of pathogens. In: *Methods in Phytobacteriology*. eds. Klement, Z., Rudolph, K., Sands, D. 45-57 pp. *Akademiai Kiado, Budapest*.
- Doudoroff, M., Palleroni, N. J. (1984): *Pseudomonas*. In: *Bergey's manual of determinative bacteriology*. (eds: Buchanan, R. E., Gibbons, N. E.) pp. 217-243. *Williams and Wilkins CO, Baltimor*.
- Dowler, W. M., Weaver, D. J. (1975): Isolation and characterization of fluorescent pseudomonads from apparently healthy peach trees. *Phytopathology* 65: 233-236.
- Duveiller, E. L., Fucikovsky, L., Rudolph, K. (1997): *The Bacterial Diseases of Wheat: Concepts and Methods of Disease Management*. Mexico, D. F. CIMMYT.
- Dye, D.W. (1968): The taxonomic study of the genus *Erwinia*. I »*amylovora*« group. *N.Z.J. Sci.* 11: 590-607.

- 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.
- Ercolani, G.L. (1967): Aspetti di *Pseudomonas syringae* nei frutteti emiliani. *Informatore Fitopatologico* 9: 205-213.
- Gardan, L., Bollet, C., Abu Ghorah, Grimont, F., Grimont, P. A. D. (1992): DNA relatedness among the pathovar strains of *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. Vol. 2, No 4: 606-612.
- Garrett, C. M. E., Panagopoulos, C. G., Crosse, J. E. (1966): Comparison of plant pathogenic *Pseudomonads* from fruit trees. *J. Appl. Bact.* 29: 342-356.
- Gavrilović, V., Arsenijević, M., Panić, M., Jovanović Gordana (2001): Rasprostranjenost *Erwinia amylovora* U SR Jugoslaviji (1989-2000) i mere suzbijanja. *Zaštita bilja* 237:141-158.
- Grolms, U., Rudolph, K. (1995): Studies on bacterial lipopolysaccharides as a factor of virulence and pathogenicity. *Züchtungsforschung berichte aus der bundenstalt für Züchtungsforslhung an Kulturpflanzen*, 1 Jahrgang Heft 2: 230-233.
- Gross, D. C., Cody, Y. S., Proebsting, E. L. Jr., Radamaker, G. K., Spots, R. A. (1984): Ecotypes and pathogenicity of ice-nucleation-active *Pseudomonas syringae* isolated from deciduous fruit tree orchards. *Phytopathology* 74: 241-248.
- Gross. M., Geir, G., Rudolph, K., Geider, K., (1992): Levan and levan sucrose synthesized by the fireblight pathogen *Erwinia amylovora*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 40: 371-381.
- Hattingh, J. M., Ross, I. M. M., Mansvelt, L. E. (1989): Infection and systemic invasion of deciduous fruit trees by *Pseudomonas syringae* in South Africa. *Plant Disease* 73: 784-789.
- Hirano, S.S., Maher, E. A., Kelman, A., Upper, C.D. (1978): Ice nucleation activity of fluorescent plant pathogenic *Pseudomonas*. *Proceedings of the IV International Conference on Plant Pathogenic Bacteria*, Angers, 1978, 717-725.
- Janse, J. D., Rossi, P., Angelucci, L., Scorticcini, M., Derks, J. H. J., Ankermans, A. D. L., De Vrijer, R., Psallidas, P. G. (1996): Reclassification of *Pseudomonas syringae* pv. *avellanae* as *Pseudomonas avellanae* (spec. nov.), the bacterium causing canker of hazelnut *Corylus avellana* L.). *System Appl. Microbiol.* 19: 589-595.
- Jones, A. L. (1971): Bacterial canker of sweet cherry in Michigan. *Plant Disease Reporter* 55: 961-965.
- Jones, A. L., Sutton, T.B. (1996): Diseases of tree fruits in the east. *Mishigan State University Exstension*, NCR 45.
- Kerkoud, M., Manceau, C., Gardan, L., Samson Regine, Paulin, J. P. (2000): Epiphytic occurrence of *Pseudomonas syringae* pv. *papulans* (Rose) in France, where blister spot has never been seen. *European Journal of Plant Pathology* 106: 481-485.
- Klement, Z. (1977): Bacterial Canker and Dieback Disease of Apricots (*Pseudomonas syringae* Van Hall). *EPPO Bulletin* Vol.7, No.1: 57-69.

- 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.
- Klement, Z. Goodman, R. N. (1967): The hypersensitive reaction to infection by bacterial plant pathogens. Annual Review of Plant Pathology 5: 17-44.
- Klement, Z., Farkas, G.L., Lovrekovich, L. (1964): Hypersensitive reaction induced by phytopathogenic bacteria in the tobacco leaf. Phytopathology 54: 474-477.
- Klement, Z., Rozsnyay, Zs., Arsenijević, M. (1974): Apoplexy of apricots. II Relationship of winter frost and the bacterial canker and dieback of apricots. Acta Sci. Hung. 9, Budapest.
- Kouyeas, H. (1977): Stone fruit tree apoplexy caused by *Phytophthora collar rot*. EPPO Bulletin Vol.7, No.1: 117-124.
- Laby, R.J., Beer, S.V. (1996): Identification of an *Erwinia amylovora* gene encoding catalase. Acta Horticulturae 411: 227-228.
- Latorre, B.A., Gonzales, J.A., Cox, J.E., Vial, F. (1985): Isolation of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* from cankers and effect of free moisture on its epiphytic populations on sweet cherry trees. Plant Disease 69: 409-412.
- Latorre, B.A., Jones, A.L. (1979): *Pseudomonas morsprunorum*, the cause of bacterial canker of sour cherry in Michigan and its epiphytic association with *P. syringae*. Phytopathology 69: 335-339.
- Leben, C. (1981): How plant pathogenic bacteria survive. Plant Disease 65: 633-637.
- 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
- Lelliott, R.A., Billing, Eve, Hayward, A.C. (1966): A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic *Pseudomonads*. J. Appl. Bact. 29: 470-489.
- Liang, L.Z., Sobiczewski, P., Paterson, J.M., Jones, A.L. (1992) Variation in virulence, plasmid content and genes for coronatin synthesis between *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* and *P.s. syringae* from *Prunus*. Plant Disease 78: 389-392.
- Lindow, E.S. (1990): Bacterial ice nucleation activity. In: Methods in Phytobacteriology. eds. Klement, Z., Rudolph, K., Sands, D., Akademiai Kiado, Budapest. pp. 428-434.
- Mansvelt, L.E., Hattingh, M.J. (1986): Pear blossom blast in South Africa caused by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. Plant Pathology 35: 337-343.
- Mansvelt, L.E., Hattingh, M.J. (1986): Bacterial blister bark and blight of fruit spurs of apple in South Africa. Plant Disease 70: 403-405.
- Miladinović, Z. (1999): Bakterioze koštičavih voćaka u Crnoj Gori. Magistarska teza, Poljoprivredni fakultet, Beograd-Zemun.

- Mirchetich, S.M., Moller, W.J. (1977): Prunus stem pitting. EPPO Bulletin Vol.7, No.1: 29-36.
- Misaghi, I., Grogan, R.G. (1969): Nutritional and biochemical comparasions of plant pathogenic and saprophytic pseudomonads. Phytopathology 59: 1436-1450.
- Mitrev, S., Gardan, L., Samson, R. (2000): Characterization of bacterial strains of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* isolated from pepper leaf spot in Macedonia. Journal of Plant Pathology 82: 227-231.
- Morone, C., Scortichini, M. (1998): Danni da *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* in meleti piemontesi. L, Informatore Agrario, LIV (7).
- Morvan, G. (1977): Apricot chlorotic leafroll. EPPO Bulletin Vol. 7, No.1: 37-55.
- Otta, J.D., English, H. (1970): Serology and pathology of *Pseudomonas syringae*. Phytopathology 60: 443-452.
- Panić, M., Arsenijević, M. (1996): Bakteriozna plamenjača voćaka i ukrasnih biljaka—*Erwinia amylovora*. Monografska studija. Zajednica za voće i povrće, Beograd i Poljoprivredni fakultet, Novi Sad. pp. 419.
- Paterson, J.M., Jones, A.L. (1991): Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* on cherries in Michigan with a DNA hybridization probe. Plant Disease 75: 893-896.
- Paulin, J.P., Luisetti, J. (1978): Ice nucleation activity among phytopathogenic bacteria. Proceedings of the IV International Conference on Plant Pathogenic Bacteria, Angers, 1978, 725-731.
- Paunović, S. (1977): Apricots species, cultivars, rootstocks and environment. EPPO Bulletin Vol.7, No 11-25.
- Prunier, J.P., Luisetti, J., Gardan, L.(1970): Characterization of non fluorescent *Pseudomonas* agent of a new bacterial disease of peach tree. Ann. Phytopath. 2:181-197.
- Psallidas, P.G. (1993): *Pseudomonas syringae* pv. *avellanae* pathovar nov., the bacterium causing canker disease on *Corylis avellana*. Plant Pathology 42:358-363.
- Ritchie, D.F., Clayton, C.N. (1982): Peach tree short life: A complex of interacting factors. Plant Disease 65: 462-469.
- Ross, I.M.M., Hattingh, M. (1986a): Bacterial canker of sweet cherry in South Africa. Phytophylactica 18: 1-4.
- Ross, I.M.M., Hattingh, M. J. (1986b): Resident population of *Pseudomonas syringae* on stone fruit tree leaves in South Africa. Phytophylactica 18: 7-9.
- Ross, I.M.M., Hattingh, M. J. (1986c): Weeds in orchards as potential source of inoculum for bacterial canker of stone fruits. Phytophylactica 18: 5-7.
- Ross, I.M.M., Hattingh, M. (1987): Pathogenicity and numerical analysis of phenotypic features of *Pseudomonas syringae* strains isolated from deciduous fruit trees. Phytopathology 77: 900-907.

- Ross, I.M.M., Hattingh, M. (1987): Systematic invasion of cheery leaves and petioles by *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum*. *Phytopathology* 77:1246-1252.
- Ross, I.M.M., Hattingh, M. (1987): Systematic invasion of plum leaves and shoots by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* introduced in to petioles. *Phytopathology* 77:1253-1257.
- Rozsnyay, Zs. D. (1977): Cytospora canker and dieback of apricot. *EPPO Bulletin* Vol. 7, No.1: 69-80.
- Rozsnyay, Zs., Klement, Z. (1977): Simultaneous infection by *Pseudomonas syringae* van Hall and *Cytospora cincta* Sacc. on apricots. *EPPO Bulletin* Vol. 7, No.1: 81-84.
- Rudolph, K., (1994): Role of toxins and polysaccharides in bacterial pathogenesis. In: *Plant Pathogenic Bacteria*. Ed. Lemmatre, M. *Proceedings 8th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria*, Versailles, Paris, France pp. 447-484.
- Rudolph, K., (2001): Thirty five years of phyto bacteriology research with special emphasis on pathogenicity of *Pseudomonas syringae*. In. *Plant Pathogenic Bacteria*. Ed. S.H., De Boer. *Proceedings 10th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria*, Sharlottetown, Canada. pp. 109-117.
- Saddler, G.S. (1994): *Burkholderia*, *Acidovorax*. *IMI Description of Fungi and Bacteria*. *Mycopathologia* 128 : 41-63.
- Sakuma, T., Batra, L.R., Nakatani, F., Sawamura, K. (1982): European pear dieback (*Diaporthe*, sp.) in Japan and its comparasions with pear fire blight (*Erwinia amylovora*) *Bull. Fruit. Tree Res. Stn Japan*, ser. C No-9: 79-89.
- Sands, D.C. (1990): Physiological criteria determinative tests. In: *Methods in Phyto bacteriology*. eds. Klement, Z., Rudolph, K., Sands, D. *Akademiai Kiado*, Budapest, pp. 134-143.
- Schuster, M.L., Coyne, D.P. (1974): Survival mechanism of phytopathogenic bacteria . *Annu. Rev. Phytopathol.* 12: 199-221.
- Scortichini, M., Morone, C. (1997): Apoplexy of peach trees caused by *Pseudomonas viridiflava*. *J. Phytopathology* 145: 397-399.
- Scortichini, M., Morone, C. (1997): Bacterial blister bark of apple in Italy. *J. Phytopathology* 145: 401-403.
- Seemüller, E., Arnold, M. (1978): Pathogenicity, siringomicin production and other characteristics of *Pseudomonad* strains from deciduous fruit trees. *Proceedings of the IV International Conference on Plant Pathogenic Bacteria*, Angers, 1978, 703-710.
- Shaffer, W.H. Jr. (1975): Procedures for the identifications of bacterial plant pathogens. In R.N. Goodman (editor): *Proccedings of the first workshop on phyto bacteriology*, University of Misouri, pp. 68-73
- Sholberg, P. L., Bedford, K.E. (1997): Characterization of blister spot (*Pseudomonas syringae* pv. *papulans*) in British Columbia and its potential for spread to new tree cultivars. *Canadian Journal of Plant Pathology* 19: 347-351.

- Sobiczewski, P., (1978): Epiphytic populations of pathogenic *Pseudomonads* on sour cherry leaves. Proceedings of the IV International Conference on Plant Pathogenic Bacteria, Angers, 1978, 753-762.
- Sobiczewski, P. (1984): Etiology of sour cherry bacterial canker in Poland. Fruit Science Reports XI, No.4: 169-179.
- Sobiczewski, P. (1987): Antagonistic bacteria in relation to *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* occurring in necroses and cankers of sour cherry trees. Fruit Science Reports, XIV, No.4: 179-185.
- Sobiczewski, P., Jones, A.L. (1992): Effect of exposure to freezing temperature on necrosis in sweet cherry shoots inoculated with *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* or *P.s. morsprunorum*. Plant Disease 76: 447-451.
- 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.
- Spotts, R.A., Cervantes, L.A. (1996): Factor affecting the severity of bacterial canker of pear caused by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. Plant Pathology 44: 325-331.
- Stefani, E., Stead, D.E. (2002): Isolation and characterization of *Pseudomonas syringae* strains related to recent outbreaks of a severe decay affecting apricot trees. 6th International Conference on *Pseudomonas syringae* and Related Pathogens, Maratea, Italy, September 15-19. Book of abstract pp. 43.
- Stockwell, V.O., Johnson, K.B., Loper, J.E. (1998): Establishment of bacterial antagonists of *Erwinia amylovora* on pear and apple blossoms as influenced by inoculum preparation. Phytopathology 88: 506-513.
- Suslow, T.V., Schroth, M.N., Isaka, M. (1982): Application of a rapid method for Gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. Phytopathology 72: 917-918.
- Van der Zwet, T., Keil, H. (1979): Fire Blight. A bacterial disease of rosaceous plants. USDA, Agricultural Handbook 510, pp 200.
- Vanneste, J.L., Yu, J. (1995): Biological control of fire blight using *Erwinia herbicola* Eh-252 and *Pseudomonas fluorescens* A-506 separately or in combination. Acta horticulturae 411: 351-354.
- Vassilev, V., Lavermicocca, P., Di Giorgio, D., Iacobellis, N.S. (1996): Production of syringomicin and syringopeptins by *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*. Plant Pathology 45: 316-322.
- Veselić, M., (1987): Proučavanje uzročnika pegavosti plodova višnje sa posebnim osvrtom na mogućnosti suzbijanja. Magistarska teza. Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.
- Vicente, J.G., Roberts, S.J. (2002): Discrimination amongst *Pseudomonas syringae* isolates from *Prunus avium* and screen for resistance using micropropagated plantlets. 6th International Conference on *Pseudomonas syringae* and Related Pathogens, Maratea, Italy, September 15-19. Book of abstracts pp 31.

- Waisbluth, M.E., Latorre, B.A. (1978): Source and seasonal development of inoculum for pear blast in Chile. *Plant Disease Reporter* 62: 651-655.
- Weaver, D.J. (1978): Interaction of *Pseudomonas syringae* and freezing in bacterial canker on excised peach twigs. *Phytopathology* 68: 1460-1463.
- Wimalajeewa, S.C. (1996): Epidemiology and control of bacterial canker of apricot and cherry in Australia. In : K. Rudolph, T.J. Burr, J.W. Mansfield, D. Stead, A. Vivian, J. von Kietzell (eds): *Developments in Plant Pathology Vol. 9: Pseudomonas syringae Pathovars and Related Pathogens*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, pp. 584-589.
- Yessad, S., Manceau, C., Luisetti, J. (1992): A detached leaf assay to evaluate virulence and pathogenicity of strains of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* on pear. *Plant Disease* 76: 370-373.
- Young, J.M. (1978): Survival of bacteria on *Prunus* leaves. *Proceedings of the IV International Conference on Plant Pathogenic Bacteria*, Angers, 1978, 779-786.
- Young, J.M. (1988): *Pseudomonas syringae* pv. *persicae* from nectarine and japanese plum in New Zealand. *EPPO Bulletin* 18: 141-153.
- Young, J.M. (1991): Pathogenicity and identification of lilac pathogens *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* van Hall 1902. *Ann. Appl. Biol.* 118: 283-298.
- Young, J.M., Triggs, C.M. (1994): Evaluation of determinative tests for pathovars of *Pseudomonas syringae* van Hall 1902. *Journal of Applied Bacteriology* 118: 283-298.
- Zeller, W., Yunlu Xie, Bereswill, S., Rudolph, K (1996): Taxonomy and virulence of bacterial blight (*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*) from pome fruit and stone fruit trees. In : K. Rudolph, T.J. Burr, J.W. Mansfield, D. Stead, A. Vivian, , J. von Kietzell (eds): *Developments in Plant Pathology Vol. 9: Pseudomonas syringae Pathovars and Related Pathogens*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, pp. 465-469.
- Zeller, W., Wolf, B. (1996): Studies on biological control of fire blight. *Acta Horticulturae* 411: 341-345.

(*Primljeno: 01.09.2008.*)
(*Prihvaćeno: 26.02.2009.*)

**PATHOGENIC AND BIOCHEMICAL-PHYSIOLOGICAL
CHARACTERISTICS OF THE BACTERIA FROM GENUS
PSEUDOMONAS THE PATHOGEN OF FRUIT TREES**

VELJKO GAVRILOVIĆ

Institute for Plant Protection and Environment, Belgrade

SUMMARY

Throughout 1998-2002 diseased fruit plants i.e. cankered plant parts, fruit and blossom necrosis, shoot blight and died out branches were sampled with the objective of identifying the cause of the disease.

Among the numerous pathogenic isolates, a considerable number of strains of fluorescent bacteria were isolated. Therefore, it can be concluded that the strains belong to the genus *Pseudomonas* whose representatives often occur as fruit trees pathogens. The pathogenic, cultural, biochemical and physiological properties of the sampled isolates of fluorescent bacteria were studied in order to identify the species and pathogenic variety of the pathogen.

A total of 83 gram-negative, aerobe strains were studied known to produce levan and hypersensitive reaction in tobacco. However, they did not provoke the formation of oxidase, argininediase and pectic ferments. Based on these properties the studied isolates were identified as *Pseudomonas syringae*.

The pathogenic varieties were determined using pathogenicity proving tests and some biochemical differential tests (GATT).

Thus isolates originating from apricot, plum, cherry, apple, pear and quince were classified as pathogens of the *syringae* variety. The strains originating from sour cherry were classified into two groups: 1) *P.s. pv. syringae* and 2) *P.s.pv. morsprunorum*.

Key words: *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum*, stone and pome fruits, isolates, pathogenic, biochemical and physiological properties

(Received: 01.09.2008.)

(Accepted: 26.02.2009.)

Zaštita bilja
vol. 57 (1-4), No 255-258, 57-67, 2006, Beograd

UDK 632.35:634.13
Naučni rad

IDENTIFIKACIJA PROUZROKOVAČA PROPADANJA KRUŠKE U SRBIJI

MIRA STAROVIĆ, ŽARKO IVANOVIĆ, GORAN ALEKSIĆ, SLOBODAN KUZMANOVIĆ,
SAŠA STOJANOVIĆ, SVETLANA ŽIVKOVIĆ, VELJKO GAVRILOVIĆ
Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu

Simptomi propadanja kruške su prisutni u Srbiji od sedamdesetih godina prošlog veka. Mnogo godina kasnije, dokazano je da je prouzrokovac ovog propadanja fitoplazma kruške (PD). Ova pojava vrlo je raširena u Evropi i u Severnoj Americi, prisutna je i u susednim zemljama bivše Jugoslavije, Bosni i Hercegovini i Hrvatskoj. Prisustvo ove fitoplazme utvrđivano je primenom elektronske mikroskopije i molekularnom analizom uzoraka poreklom iz više lokaliteta u Srbiji, u periodu od 2004-2007 godine. Na ultratankim presecima floemskog tkiva glavnih lisnih nerava obolelih stabala kruške, utvrđeno je prisustvo organizama, koji po obliku, veličini (350-480 x 600-700nm) i strukturi, odgovaraju fitoplazmama. Rezultati PCR analiza, sa univerzalnim R16F2n/R16R2 i specifičnim prajmerom fO1/rO1 ukazali su na prisustvo fitoplazme Pear decline.

Cljučne reči: kruška, fitoplazma, elektronska mikroskopija, molekularna detekcija

UVOD

Propadanje kruške je vrlo ozbiljno oboljenje koje je prisutno u Evropi, Aziji i Severnoj Americi. Prvi nalaz propadanja kruške potiče iz Severne Amerike iz pedesetih godina prošlog veka (Woodbridge et al., 1957), ali sa velikim izgledima da je bolest introdukovana iz Evrope (Shalla et al., 1961; Seemüller et al., 1998, cyt. Seemüller and Schneider, 2004). Ovi podaci ukazuju na činjenicu da je bolest bila prisutna u Evropi mnogo godina pre nego što su objavljeni prvi radovi o njoj. Slična je situacija bila i kod nas. Prvi simptomi koji su ukazivali na prisustvo ove fitoplazme na krušci u plantažnim zasadima u Vojvodini potiču iz davne 1969. godine (Vojvodić i Grbić, 1969), da bi tek posle 35 godina Duduk i saradnici (2005b), primenom PCR metode prvi dokazali prisustvo ove fitoplazme PD u stablima kruške sa simptomima propadanja.

Prouzrokovatelj ove bolesti je fitoplazma *Pear decline* (PD), koja pripada Apple proliferation (AP) fitoplazma grupi (Seemüller et al., 1998). Novija istraživanja, naročito analiza sekvence 16S rDNA, ukazuju na to da fitoplazme čine koherentni taksonomski rod u privremenom taksonomskom statusu *Candidatus* (Seemüller and Schneider, 2004), a u skladu sa preporukama Taksonomske grupe za fitoplazme (Phytoplasma/Spiroplasma Working Team-Phytoplasma Taxonomy Group / IRPCM Phytoplasma/, 2004). Fitoplazme su mali, intracelularni mikroorganizmi koji nastanjuju ćelije sitastih cevi floema biljke domaćina.

Prenose ih sa biljke na biljku insekti vektori (Blomquist and Kirkpatrick, 2002). Vektor PD je kruškina buva psylla, *Cacopsylla pyricola* u Sevenoj Americi (Jensen et al., 1964) i Velikoj Britaniji (Davies et al., 1992), a verovatno *C. pyri* u Španiji (Avinent et al., 1997) i Italiji (Carraro et al., 1998).

Štete koje nanosi PD zavisi od podloge na koju je kruška kalemljena. U skladu sa tim su i poznata dva tipa oboljenja, i to brzo i sporo sušenje (decline) kruške. Štete mogu varirati kod stabla različite starosti, kao i u različitim lokalitetima.

Simptomi propadanja kruške su u vidu lisnog uvijanja i prevremenog crvenjenja, koji se ispoljavaju tokom avgusta meseca, zatim preranog opadanja lišća, koje počinje u našim uslovima, već krajem avgusta i početkom septembra. Ovi simptomi su naročito intenzivni u uslovima stresa, u toku i posle kraćih ili dužih sušnih perioda tokom vegetacije. Obolela stabla kruške u narednoj godini mogu ispoljiti smanjen vršni porast, proređenu lisnu masu, smanjeno cvetanje i vrlo često su bez plodova. Intenzitet simptoma može varirati iz godine u godinu. Neka stabla mogu ispoljiti oporavak, odnosno prikriti simptome, a neka progresivno slabe i suše se. Kod oba tipa razvoja bolesti, može se uočiti braon linija na mestu kalemljenja.

Do sada, su prisustvo ove fitoplazme na krušci, utvrdili Duduk i saradnici (2005b) u centralnoj Srbiji, primenom PCR metode. U republikama bivše Jugoslavije, u oblasti Dalmacije utvrđeno je prisustvo simptoma na krušci 1976. godine (Cvetković, 1976), a primenom PCR metode potvrđeno je njeno prisustvo na krušci i u području Republike Srpske 2003. godine (Trkulja i saradnici, 2004), na kojoj su simptomi tipa fitoplazmi prisutni od 1990. godine.

Prisustvo fitoplazmi u biljnom tkivu može se dokazati posmatranjem ultratankih poprečnih preseka iz zone sprovodnih tkiva (floem) obolelih biljaka (McCoy, 1979, Caudwell et al., 1981, Quaroni et al., 1991, Credi, 1994, Lherminier et al., 1999, Kuzmanović i sar., 2003) na elektronskom mikroskopu. Daleko više, danas su pristupačnije tehnike lančne reakcije polimeraze, koje su vrlo osetljive za dokazivanje fitoplazmi (Lee et al., 1998; Garcia-Chapa et al., 2002; Duduk et al., 2005a,b).

U ovom radu su prikazani rezultati obe metode dokazivanja prisustva fitoplazmi u sprovodnim tkivima obolelih stabala kruške u Srbiji.

MATERIJAL I METODE

Biljni materijal

Biljni materijal je uzorkovan sa dve sorte kruške Vilijamovka i Abata fetel, u lokalitetu Deč, tokom avgusta 2004., sa obolelih stabala kruške starosti dve godine, zatim u lokalitetu Crvenka početkom septembra 2007 godine, sa kruške starosti 10-15 godina i 2008. godine u lokalitetu Tržac i Ljubava sa obolelih stabala kruške, starosti dve godine. Na većem broju stabala utvrđeno je vizuelnim pregledom prisustvo simptoma tipa crvenila. Ova stabla su obeležena i sa njih je uzorkovan polazni i materijal za analize. Lišće je uzorkovano sa više grana, da bi uzorak bio reprezentativniji, a mogućnost dokazivanja prisustva patogena veća zbog, već dokazanog, neravnomernog prisustva fitoplazmi u biljci domaćinu. Istovremeno je uzorkovano lišće sa zdravih stabala istih sorti, koje je poslužilo kao kontrola. Sa uzorkovanih listova isečeni su glavni lisni nervi koji su korišćeni za elektronsku mikroskopiju i PCR analizu.

Elektronska mikroskopija

Polazni materijal za analizu uzoraka na elektronskom mikroskopu, bile su lisne peteljke sa listova koji su ispoljavali simptome crvenila. Oni su sečeni u fiksativu (2,5% glutaraldehyd u kakodilatnom puferu pH 7,2), a potom čuvani na temperaturi od 4° C, u trajanju od 24^h. Fragmenti tkiva za histopatološka ispitivanja isecani su iz zone sporvodnih sudova i obrađeni po metodi koju su opisali Hopkins i saradnici (1973). Fiksirani isečci su potapani u 1% osmijum tetroksidu 3^h u mraku, na 4°C, zatim dehidrirani 2 puta po 15' u 25% etanolu i 2 puta po 15' u 50% etanolu, dalje bojeni u 1% uranilacetatu u 75% etanolu, preko noći na 4°C, pa ponovo dehidrirani u 100% etanolu 4 puta na sobnoj temperaturi, isečci su zatim potapani u propileno-ksid 15-20', pa u mešavini propilen oksida i epona (1:1) u trajanju od 1^h i na kraju u epon 3^h. Uorci su zatim preneti u kapsule sa smolom radi polimerizacije u trajanju od 48^h pri temperaturi od 55° C, pa potom sečeni na ultramikrotomu i nanošeni na mrežice gde su bojeni olovoacetatom. Ovako spremljeni uzroci su posmatrani na elektronskom mikroskopu pod uvećanjem od 16000 x.

Elektronska mikroskopija pripremljenih preseka obavljena je u Laboratoriji za elektronsku mikroskopiju na Vojnomedecinskoj Akademiji u Beogradu.

PCR tehnika u dokazivanju PD

Korišćena je PCR tehnika u dokazivanju PD u uzorkovanom biljnom materijalu. DNA je izolovana iz jednog grama lisnih nerava svežeg biljnog mate-

rijala, po proceduri koje je opisana u EPPO PM7/62. Lisni nervi su isitnjeni u ekstrakcionom puferu (1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH 8) i dobijeni ekstrakt je inkubiran 30 minuta na 65°C i centrifugiran 2 minuta na 2000 g. Supernatant je prečišćen sa jednakom zapreminom hloroform-isoamilalkohola (24 : 1) i centrifugiran 5 minuta na 13000 g. Supernatant je prebačen u nove tubice i pomešan sa 0.8 zapremine hladnog etanola, sve je centrifugirano 10 minuta na 15000 g. Talog je ispran sa 70 % etanolom i rastvoren u 100 µl destilovane vode.

PCR reakcija je uradjena sa parom univerzalnih prajmera R16F2n i R16R2 (Lee et al.,1998) i parom specifičnih prajmera fO1 i rO1 (Lorenz et al.,1995).

REZULTATI

Simptomi

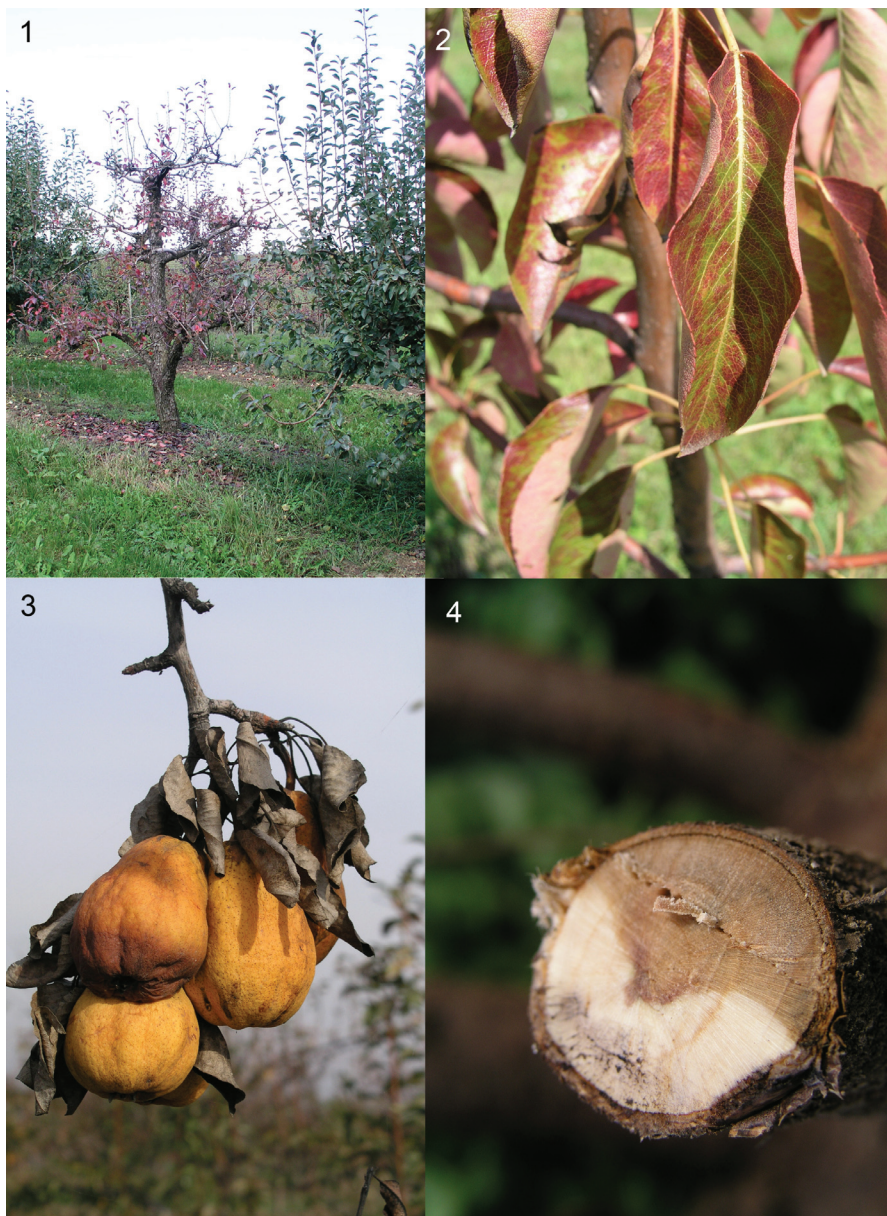
Utvrđeno je prisustvo oba tipa simptoma propradanja kruške u pregledanim voćnjacima. Prvi tip simptoma ispoljava se u vidu brzog sušenja, takva stabla su bila prisutna u lokalitetu Crvenka na obe sorte. Ova stabla su bila zahvaćena intenzivnim crvenilom, već u mesecu julu, vrlo brzo, naročito mlade sadnice često pognu u zoni kalemljenja usled nekroze, i vrlo brzo stablo se na tom mestu prelomi, kod starijih stabala, nakon pojave prvih simptoma na listu do potpunog uvenuća može proći i manje od mesec dana (Sl. 1).

Sporiji tip sušenja uočen je u sva tri lokaliteta na obe sorte. Kod ovih stabala prvi simptomi su bili vidljivi na lišću, u vidu intenzivnog crvenjenja i uvijeno-sti ka licu liske, sto je karakterističan simptom za crvenilo kruške (Sl. 2), već početkom avgusta meseca. Ove biljke su donosile plodove, sitnije, kamene i komercijlno neupotrebljive (Sl. 3).

U oba tipa simptoma, brzom i sporom, vidljiva je delimična nekroza stabla na poprečnom preseku, kao i crna linija u zoni kalemljenja (Sl. 4).

Elektronska mikroskopija

Na ultratankim presecima floemskog tkiva glavnih lisnih nerava obolelih stabala kruške, utvrđeno je prisustvo organizama, koji po obliku, veličini i strukturi, odgovaraju fitoplazmama (sl.5). Vidljive strukture su bez organizovanog jedra sa ćelijskom organizacijom sličnom bakterijama, bez ćelijskog zida su, ali sa vidljivom troslojnom membranom. Prisustvo ovih struktura dokazano je u svim presecima ukalupljenih lisnih nerava uzorkvanih sa stabala kruške sa simptomima crvenila. Ove strukture nisu utvrđene u uzorcima koji su poticali sa zdravih stabala kruške. Dimenzija struktura je različita i iznosila je od 350-480 x 600-700nm.

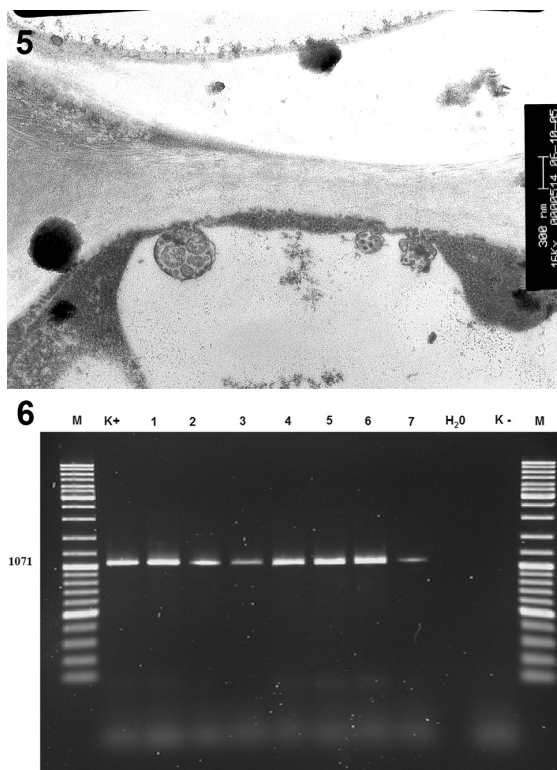


Sl. 1-4 – Crvenilo kruške: sasušeno stablo kruške (Sl. 1); prevremeno crvenilo i uvijenost liske (Sl. 2); neupotrebljivi plodovi (Sl. 3) i poprečni presek obolelog stabla kruške (Sl. 4).

Fig. 1-4 – Pear decline: quick decline (Fig. 1); premature reddening and leaf rolling (Fig. 2); useless fruits (Fig. 3) and cross section of the trunk (Fig. 4)

PCR analiza

Primenom para univerzalnih prajmera R16F2n i R16R2, u testiranim uzorcima dokazano je prisustvo fragmenta molekulske težine 1200 bp, što je ukazivalo na prisustvo fitoplazmi. Dalja primena specifičnog prajmera fO1/rO1 omogućila je prepoznavanje fragmenta molekulske težine 1071 bp, čime je i identifikovana fitoplazma do grupe 16SrX, kojoj pripada i fitoplazma PD (slika 6).



Sl. 5-6. – Fitoplazme u sprovodnim sudovima kruške (Sl. 5); Identifikacija PD fitoplazme primenom specifičnih prajmera fO1/rO1, u uzorcima lišća poreklom sa različitih stabala kruške sa simptomima crvenila. M, marker (DNA Ladder Mix, Fermentas), K+ referentni izolat 16SrX-C *Candidatus* Phytoplasma pyri iz kolekcije Univerziteta u Bolognji, dobijen ljubaznošću prof. Bertaccini (Sl. 6)

Fig. 5-6. – Phytoplasmas present in sieve tube of pear (Fig. 5); Identification of pear decline phytoplasma by specific primers fO1/rO1 in the collected samples from pear with redness symptoms. M, marker (DNA Ladder Mix, Fermentas), K+ reference phytoplasma strain 16SrX-C *Candidatus* Phytoplasma pyri from the University of Bologna, cordially obtain from prof. Bertaccini (Fig. 6).

DISKUSIJA

Rezultati prikazani u ovom radu potvrđuju davno postavljenu pretpostavku da su uočeni simptomi tipa propadanja kruške u vezi sa mikoplazmama sličnim organizmima (Vojvodić i Grbić, 1969), ali i skorije utvrđenim prisustvom ove fitoplazme na krušci u Srbiji (Duduk i saradnici, 2005b) i u Bosni i Hercegovini (Duduk et al., 2005a), koji su primenom molekularnih metoda dokazali ovu fitoplazmu na krušci. Ovi rezultati ukazuju na činjenicu da je bolest prisutna u Srbiji mnogo pre nego što su objavljeni prvi rezultati o njenom prouzrokovacu.

Opisani simptomi na krušci odgovaraju u potpunosti promenama koje su opisali mnogi istraživači vezano za propadanje kruške (Schneider, 1970; Del Serrone, et al., 1988; Davies et al., 1992; Jarausch et Dosba, 1995; Avineent et al., 1997; Duduk et al., 2005a,b; Garcia-Chapa et al., 2003).

Fitoplazme utvrđene u floemu sprovodnih sudova u lisnim nervima kruške od bolesti propadanja, imale su okruglast do blago izdužen oblik, dimenzija 350-480 x 600-700 nm, što je u skladu sa podacima koje su utvrdili Hibino and Schneider (1970), koji su opisali čestice izduženog i sferičnog oblika, veličine od 50 do 800 nm.

Rezultati PCR analize, dobijeni primenom para univerzalnih prajmera R16F2n i R16R2, u svim testiranim uzorcima ukazuju na prisustvo fragmenta molekulske težine 1200 bp. Ovaj podatak ide u prilog činjenici da su u biljnom tkivu prisutne fitoplazme, jer se navedeni prajmeri uobičajeno koriste u detekciji fitoplazmi (Deng and Hiruki, 1991; Alma et al., 1993; Seemüller et al., 1998; D'Ascenzo et al., 2003). Daljom primenom specifičnog seta prajmera fO1/rO1 (Lorenz et al., 1995) omogućena je identifikacija do grupe fitoplazme 16SrX kojoj pripada i fitoplazma PD (slika 6).

Propadanje kruške je poslednjih godina sve učestalija pojava u Srbiji. Ova činjenica je i ukazala na potrebu da se tom problemu posveti veća pažnja stručnjaka i istraživača. Simptomi propadanja kruške primećeni su u više lokaliteta širom Srbije u manjim zasadima, ili na pojedinačnim stablima, obzirom da je broj većih komercijalnih zasada kruše poslednjih godina znatno smanjen. Rezultati dobijeni u ovim istraživanjima povrdili su njeno prisustvo u nekoliko lokaliteta u Vojvodini (Deč i Crvenka) i u području Južne Srbije (Ljubava i Tržac).

Ovu fitoplazmu u prirodi širi cikada *Cacopsylla pyricola* (Davies et al., 1992; Jensen et al., 1964) i *C. pyri* (Avinent et al., 1997; Carraro et al., 1998). Zbog te činjenice, kao prva i osnovna mera borbe protiv propadanja kruške, preporučuje se uredno suzbijanje vektora. Hraneći se sisajući pupoljke, mladice i mlado lišće zaražene kruške samo nekoliko sati, vektor može usvajati fitoplazmu na perzistentan način za sledeće tri nedelje.

Jedna od mera borbe mogla bi biti i uvođenje sistema za navodnjavanje, čime bi se izbegli stresni uslovi za biljku tokom sušnih perioda u vegetaciji.

Drugi način prenošenja PD je kalemljenje. Ovu činjenicu treba imati u vidu, naročito ako se kruška kalemi na dunju, pa je neophodno pre obavljenog kalemljenja obaviti detaljan pregled i analizu podloge i plemke. U literaturi su podaci o osetljivosti podloga i plemki kruške prema fitoplazmi PD, vrlo oskudni, za razliku od dobro proučenog ovog odnosa kada je u pitanju *Candidatus Phytoplasma mali*, prouzrokovaca proliferacije jabuke. Kao jedan od ciljeva budućih istraživanja u ovoj oblasti moglo bi se definisati kao proučavanje međuodnosa plemki kruške i podloga na koje su kalemljene. Rezultati tih istraživanja dala bi odlične preporuke za praksu.

LITERATURA

- Alma, A., Arzone, A., Bosco, D. (1993): Grapevine MLO transmission by insects. Extended Abstract of 11th Meeting ICVG, 6-9 September, 1993. Montreux, Switzerland, 84-85.
- Avinent, L., Llacer, G., Almacellas, J., Tora, R. (1997): Pear decline in Spain. *Plant Pathol.* 46:694-698.
- Ascenzo, D., Botti, S., Paltrinieri, S., Di Giovanni, R., Di Silvestro, D., Bertaccini, A. (2003): Identification of phytoplasmas associated with grapevine yellows in Abruzzo region (Italy). Extended abstract of 14th Meeting of ICVG, Locorotondo, Bary, p. 89-90.
- Blomquist, C.L., Kirkpatrick, B.C. (2002): Frequency and Seasonal Distribution of Pear Psylla Infected with the Pear Decline Phytoplasma in California Pear Orchards. *Phytopathology*, 92 (11): 1218-1226.
- Carraro, L., Loi, N., Ermacora, A., Gregoris, A., Osler, R. (1998): Transmission of pear by using naturally infected *Cacopsylla pyri* L. *Acta Hort.* 472:665-668.
- Caudwell, A., Meignoz, R., Kuszala, C., Schneider, C., Larrue, J., Fleury, A., Boudon, E. (1981): Observation de l'agent pathogène (MLO) de la flavescente dorée de la vigne en milieu liquide par immunosorbant électromicroscopie (ISEM). *Progress agricole et viticole* 98: 835-838.
- Credi, R. (1994): Occurrence of anomalous mycolasma-like organisms in grapevine yellows-diseased phloem. *J. Phytopathology*, 142, 310-316.
- Cvetković, B. (1976): Decay of pears in Dalmatia. Propadanje krušaka u Dalmaciji. *Biljna zaštita*, 3: 104-105.
- Davies, D., L., Guise, C.M., Clark, M., F, Adams, A.N. (1992): Parry's disease of pears is similar to pear decline and is associated with mycoplasma-like organisms transmitted by *Cacopsylla pyricola*. *Plant Pathol.*, 41: 195-203.

- Del Serrone, P., Starza, S.L., Krystai, L., Kolber, M., Barba, M. (1998): Occurrence of apple proliferation and pear decline phytoplasmas in diseased pear trees in Hungary. *Journal of Plant pathology*, 89: 53-58.
- Deng, S., Hiruki, C. (1991): Amplification of 16S rRNA genes from culturable and non-culturable mollicutes. *J. Microbial. Meth.* 14: 53-61.
- Duduk, B., Botti, S., Trkulja, V., Ivanović, M., Stojčić, J., Bertaccini, A. (2005a): Occurrence of pear decline phytoplasmas in Bosnia and Hercegovina. *Journal of Plant Pathology*, 87: 75.
- Duduk, B., Ivanović, M., Obradović, A. (2005b): First Report of Pear Decline Phytoplasmas on Pear in Serbia. *Plant Disease*, 89, 774.
- Garcia-Chapa, M., Medina, V., Viruel, M.A., Lavina, A., Batlle, A. (2003): Seasonal detection of pear decline phytoplasma by nested-PCR in different pear cultivars. *Plant Pathology*, 52: 513-520.
- Hibino, H., Schneider, H. (1970): Mycoplasma-like Bodies in Sieve Tubers of Pear Trees Affected with Pear Decline. *Phytopathology*, 60: 499-501.
- Hopkins, D.L., Mollenhauer, H.H., French, W.J. (1973): Occurrence of a Rickettsia-like Bacterium in the Xylem of Peach Trees with Phony Disease. *Phytopathology*, 63: 1422-1423.
- IRPCM Phytoplasma / Spiroplasma Working Team – Phytoplasma Taxonomy Group. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54:1243, 2004.
- Jarausch W., Dosba, F. (1995): First Report of Pear Decline Phytoplasmas on Nashi Pears (*Pyrus pyrifolia*) in France. *Journal of Phytopathology*, 147: 47-54. *Plant Disease*, 79: 1250.
- Jensen, D.D., Griggs, W.H., Gonzales, C.Q., Schneider, H. (1964): Pear decline virus transmission by pear psylla. *Phytopathology* 54: 1346-1351.
- Kuzmanović, S., Starović, M., Tošić, M., Stojanović, S., Tomić, T. (2003): Detekcija fitoplazmi u vinovoj lozi u Srbiji elektronskom mikroskopijom VI savetovanje o zaštiti bilja, Zlatibor, Zbornik rezimea: 95.
- Lee I. M., Gundersen-Rindal D. E., Davis R. E., and Bartoszyk I. M. (1998) Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48: 1153-1169.
- Lherminier, J., Bongiglioli, R.G., Daire, X., Symons, R.H., Boudon-Padieu, E. (1999): Oligodeoxynucleotides as probes for in situ hybridization with transmission electron microscopy to specifically localize phytoplasma in plant cells. *Molecular and cellular probes*, 13: 41-47.
- Lorenz K. H., Shneider B., Ahrens U. and Seemuller E. (1995) Detection of apple proliferation and pear decline phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and non ribosomal DNA. *Phytopathology* 85: 771-776.

- McCoy, R.E. (1979): Mycoplasmas and yellows diseases. In: The Mycoplasmas. Vol. III. Plant and insect mycoplasmas. (eds. By Whitcomb, R.F., Tully, J.G.). Academic Press, Ins., New York, pp. 229-265.
- OEPP/EPPO *Bulletin* 36 :121-125
- Quaroni, S., Saracchi, M., Fortusini, A., Belli, G. (1991): Investigations by scanning electron microscopy on grapevines affected by «Flavescende dorée». Proceedings of the 10th Meeting of ICVG, Volos, Greece, 446-449.
- Schneider, H. (1970): Graft transmission and host range of pear decline causal agent. *Phytopathology*, 60: 204-207.
- Seemüller, E., Marcone, C., Lauer, U., Ragozzino, A., Göschl, M. (1998): Current status of molecular classification of the phytoplasmas. *J. Plant Pathol.* 80, 3-26.
- Seemüller, E., Schneider, B.(2004): „*Candidatus* Phytoplasma mali“, „*Candidatus* Phytoplasma pyri“ and „*Candidatus* Phytoplasma prunorum“, the causal agents of apple proliferation, pear decline and European stone fruit yellows, respectively. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54, 1217-1226.
- Trkulja, V., Duduk, B., Botti, S., Ivanović, M., Stojčić, J., Bertaccini, A.(2004): Pear decline phytoplasma – novi patogen kruške u Bosni i Hercegovini. *Zbornik rezi-meja V Kongresa o zaštiti bilja, Zlaibor*, 140-142.
- Vojvodić i Grbić, (1969): Pear decline in Vojvodina plantations. Propadanje kruške u plantažnim zasadima Vojvodine. I Kongres mikrobiologa Jugoslavije, Beograd, 1: 722-726.
- Woodbridge, C.G., Blodgett, E.C., Diener, T.O. (1957): Pear decline in the Pacific Northwest. *Plant Dis. Rep.* 41, 569-572.

(Primljeno: 24.10.2008.)
(Prihvaćeno: 26.02.2009.)

THE IDENTIFICATION OF THE CAUSAL AGENT OF THE PEAR DECLINE IN SERBIA

MIRA STAROVIĆ, ŽARKO IVANOVIĆ, GORAN ALEKSIĆ, SLOBODAN KUZMANOVIĆ,
SAŠA STOJANOVIĆ, SVETLANA ŽIVKOVIĆ, VELJKO GAVRILOVIĆ

¹Institute for Plant Protection and Environment, Belgrade

SUMMARY

The symptoms of pear decline are present in Serbia since 1970s. Thirty years later it was proved that the causal agent of this decline is a phytoplasma. This parasite is widespread in Europe and the USA as well as the countries of former Yugoslavia like Bosnia and Herzegovina and Croatia.

The presence of the phytoplasmas was confirmed using electron microscopy and the molecular analysis of the pear samples from a number of localities in Serbia between 2004-2007. The phytoplasma was observed on the ultrathin sections of the main leaf vascular bundle from the diseased pear tree. The shape, structure and size of 350-480 x 600-700nm, are typical ones for the phytoplasmas. PCR analysis using the universal primer R16F2n/R16R2 as well as the specific primer fO1/rO1 also confirmed phytoplasmas as the causal agent of pear decline.

Key words: pear, phytoplasma, electron microscopy, molecular analysis.

(Received: 24.10.2008.)

(Accepted: 26.02.2009.)

Plant Protection, vol. 57 (1-4), No 255-258, 57-67, 2006, Belgrade

Zaštita bilja
vol. 57 (1-4), No 255-258, 69-79, 2006, Beograd

UDK 632.38:634.8
Naučni rad

DTBA AND ELISA METHODS IN DETECTION OF GRAPEVINE LEAFROLL – 1 VIRUS

ŽARKO IVANOVIĆ, SLOBODAN KUZMANOVIĆ, NENAD TRKULJA, SVETLANA ŽIVKOVIĆ,
SAŠA STOJANOVIĆ, MIRA STAROVIĆ
Institute for Plant Protection and Enviroment, Belgrade

Grapevine leafroll syndrome is caused by a complex of up to nine different *Grapevine leafroll-associated viruses* (GLRaV-1–9). Many methods, including indexing, serological and molecular procedures, have been developed for the detection of GLRaV. However, due to the low concentration of the virus in plants a method with improved sensitivity and with the capacity to detect is required. In this study plants were tested for *Grapevine leafroll virus* (GLRaV) by visual examination, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and direct tissue-blotting assay (DTBA). Tissues were homogenized for use in a double-antibody sandwich ELISA system and then blotted on a nitrocellulose membrane for DTBA. Comparison of DTBA with ELISA and with visual plant symptoms suggest that DTBA can be used with the same accuracy as ELISA for detecting GLRaV-1 in leaf tissue.

Key words: grapevine, viruses, ELISA, tissue blot

INTRODUCTION

Grapevine leafroll (GLRaV) disease has been associated with yield losses of as much as 20–40% in grapevine (*Vitis vinifera*) (Goheen, 1988; Woodrum et al., 1984). This disease causes poor color development and non-uniform maturation of fruit in grapes (Goheen and Cook, 1959). Additional symptoms included downward rolling of basal leaves followed by rolling of the leaves near the shoot tips, interveinal reddening in red grape varieties and chlorosis in white grape varieties and phloem disruption (Hoefort and Gifford, 1967; Weber et al., 1993). Necrotic areas can develop in the interveinal tissue when the leaf is heavily infected (Martelli, 1993; Emmett and Hamilton, 1994). The symptoms of grapevine leafroll disease can resemble those caused by mechanical damage to the trunk,

other diseases of the phloem tissue, and arthropod damage, thereby complicating visual diagnosis (Weber et al., 1993).

The spread of grapevine leafroll disease has been assumed to occur only through infected plant material, mainly of asymptomatic American grapevine rootstocks, but during the last 20 years several pseudococcids (*Planococcus citri*, *P. ficus*, *Pseudococcus longispinus*, *P. affinis*, *P. calceolaria*, *P. comstocki*, *P. maritimus*, *P. viburni*, *Heliococcus bohemicus*, *Phenacoccus aceris*) and coccids (*Parthenolecanium corni*, *Pulvinaria vitis*) were found to be vectors of several GLRaV (Gugerli, 2003). The mechanisms underlying transmission of closteroviruses by mealybugs are still largely unknown. No alternate hosts are known and leafroll-associated closteroviruses have not been identified in any wild or cultivated plant species other than *Vitis* species (Martelli, 1993).

The etiology of GLRaV seems to be very complex and has not been definitively resolved. With recent advances in molecular characterization of several closteroviruses, the taxonomic relationship of this once heterogeneous group of viruses is more defined (Fauquet et al., 2005; Karasev, 2000). GLRaVs belong to the family *Closteroviridae* (Martelli et al., 2002) which is composed of three genera: (a) *Closterovirus*, e.g., GLRaV-2, (b) *Ampelovirus*, e.g., GLRaV-1, -3 and -5 and tentative members of GLRaV-4 and -9 (Alkowni et al., 2004), and (c) *Crinivirus*.

Grapevine leafroll-associated virus 1 (GLRaV-1) is one of the most important types (Martelli et al., 1997). Particles of GLRaV-1 are filamentous and contain a coat protein (CP) with an *Mr* of 39000 (Gugerli et al., 1984). A replicative form double-stranded RNA (dsRNA) species of 19 kb and several smaller dsRNAs are consistently isolated from GLRaV-1-infected tissues (Habibi and Rezaian, 1995). These smaller dsRNA species arise from infection with mixed viruses or may be subgenomic molecules. One of the smaller dsRNA species extracted from GLRaV-1-infected tissues hybridizes to a DNA probe made from the 19 kb viral genome (Habibi and Rezaian, 1995; Habibi et al., 1997). Subgenomic RNA species are considered to be part of gene expression strategies utilized by closteroviruses (Agranovsky, 1996) and have been found in *Beet yellows virus* (BYV) (Agranovsky et al., 1994), *Lettuce infectious yellows virus* (LIYV) (Klaassen et al., 1995) and *Citrus tristeza virus* (CTV) (Hilf et al., 1995).

Partial purification of some of these putative closteroviruses has allowed development of serological methods (ELISA) for their detection (Demke and Adams, 1992; Hu et al., 1990; Rowhani, 1992; Rowhani et al., 1997). Serological detection of GLRaV, however, requires the availability of multiple antibody preparations capable of detecting all of the known types of this virus (Forsline et al., 1996). Other molecular tests, such as reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR), have also been developed for their detection (Rowhani et al.,

2000). Rather than relying on antibody reactions, RTPCR specifically tests for molecular sequences that are unique to a particular pathogen.

Traditionally, detection of leafroll in grapevines is achieved by biological indexing, which requires graft-inoculation of sensitive cultivars with candidate material and observation of symptom development over an 18-month period (Goheen, 1970). Using serological techniques, rapid detection of certain GLRAVs has become possible. The detection of GLRAVs is based on bioassays, ELISA and PCR, which have a limited reliability and sensitivity. Bioassays are used widely, but are time-consuming, unreliable and require glasshouse infrastructure. The low concentration of viruses associated with GLRAVs, and their uneven distribution in infected tissues, together with the variation in seasonal titre, make detection by ELISA methods difficult to use and unreliable due to their low sensitivity.

This study was designed to determine the extent to which results of the direct tissue blotting assay (DTBA) and ELISA agree with each other and with visual diagnosis for detecting GLRAV-1 in grapevine tissues.

MATERIAL AND METHODS

Plant tissue

Plants with visible leafroll symptoms were collected from the different location (Kragujevačko, Podgorsko, Trsteničko i Župsko) in Serbia. Leaves from these plants were simultaneously tested for viruses with direct tissue blotting assay (DTBA) and with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

DTBA Methods

Tissue blotting technique was described by Lin et al., 1990 and Couceiro et al., 2006. Leaves were tightly rolled and cut with a razor blade. Cut surfaces were pressed firmly but gently onto membrane of nitrocellulose with 0.45 µm pore size (AppliChem, Darmstad). The membranes were blocked in non-fat dried milk at 1% in extraction buffer for grapevine (0.14 M NaCl, 0.01 M Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄, 2.7 mM KCl, 3.1 mM NaN₃ and 0.05% Tween-20, adjusted to pH 7.4), during one hour at room temperature or overnight at 4-6°C. Membranes were then incubated for 2-2.5 h at room temperature or overnight at 4-6°C in monoclonal antibody (1:1000 dilution) conjugated to alkaline phosphatase (Sediag, Dijon, France). After incubation the membranes were washed carefully for at least five minutes, three times, in a saline buffer (0.085% NaCl,

0.05% Tween 20 in distilled water). The membranes were then dipped directly in alkaline phosphatase streptavidin conjugated antibody solution. After incubation the membranes were washed three times for five minutes in a saline buffer. The membranes were then covered with BCIP-NBT (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate and nitroblue tetrazolium) ready to use liquid substrate (Sigma B-1911). The purple colour was developed after 30 minutes of incubation, therefore the reaction was not stopped (with distilled water) until membrane starts getting dark and the positive control is clear.

ELISA Methods

Tissue extracts were placed into microplates coated with a specific polyclonal and monoclonal antibodies against GLRaV-1. Each plate contained wells with a known GLRaV-1 infected control, wells with sample buffer only, wells with a known healthy control and wells for each unknown sample. ELISA procedures followed methods described by Clark and Adams, 1977. The plant tissue extract was prepared by powdering about 200 mg of grape leaf tissue with a mortar and pestle and ground in 2 ml of grape extraction buffer ((0.2 M Tris-HCl, 0.14 M NaCl, 2% PVP, 0.5 ml l) Tween 20, pH 8.2).). The samples were centrifuged (16,000g for 10 min) in a bench top centrifuge and 100 µl of the supernatant transferred in duplicate to a microtitre plate to which the primary antibody had been bound (1:500 dilution in coating buffer [15 mM Na₂CO₃, 35 mM NaHCO₃, pH 9.6]) at 37°C. A positive control and negative control (provided by the manufacturer) and extraction buffer alone were included. The plate was incubated for 16 h at 4°C, washed five times with PBST (140 mM NaCl, 1.5 mM KH₂PO₄, 8.09 mM Na₂HPO₄, 2.7 mM KCl, 0.5 ml Tween 20, pH 7.4), and 100 µl conjugated antibody (1:500 dilution in conjugate buffer [PBST, 2% PVP, 2 g BSA]) added. The plate was incubated for 2 h at 37°C, washed, and 100 µl freshly prepared 4-nitrophenyl phosphate (0.1 g ml) substrate buffer [100 mM Na₂CO₃, 1 mM MgCl₂, pH 9.8] added. The plate was incubated at 37°C for 1 h and the absorbance at 405 nm was read using a plate reader. The reading was repeated after a further 1 h incubation. According to manufacturer's recommendations, the sample was considered infected when absorbance readings with a spectrophotometer UNISCAN set at 405 nm was 0.3-1.2 OD, and uninfected if A₄₀₅ was 0.050-0.065 OD.

RESULTS

Grapevine samples with characteristic symptoms for virus infected plants were collected from the different location (Kragujevačko, Podgorsko, Trsteničko i Župsko) in Serbia. The presence of GLRaV-1 was correlated with leaf symptoms including vein banding, leaf deformation, line pattern and mosaic in vines collected from the field. Samples showing typical dispersed mosaic or complete leaf discoloration, typical leaf rolling and interveinal discoloration on vine leaf.



Fig. 1. – Different grapevine samples with characteristic symptoms
Sl. 1. – Uzorci vinove loze sa karakterističnim simptomima

In a further study ELISA methods was used for virus detection, sixteen samples were tested on different leafroll viruses with various combinations of antibodies in ELISA (Table 1). All tested samples were positive on Grapevine leafroll virus type 1 and were negative on the other types of GLRaV. The ELISA readings

(specific data not shown) were clean and clear with a minimum absorbance at 405 nm of over 0.550 from infected vines and an average of 0.022 from healthy controls.

Table 1 – ELISA detection of grapevine leafroll viruses in collected samples

Tabela 1 – Određivanje prisutva virusa uvijenosti ELISA testom u uzorcima lišća vinove loze

Viticultural regions Vinogradarski regioni	Samples Uzorci	Viruses – Virusi				
		GLRaV 1	GLRaV 2	GLRaV 3	GLRaV 5	GLRaV 7
Župsko	1	+	-	-	-	-
	2	+	-	-	-	-
	3	+	-	-	-	-
	4	+	-	-	-	-
Trsteničko	5	+	-	-	-	-
	6	+	-	-	-	-
	7	+	-	-	-	-
	8	+	-	-	-	-
Podgorsko	9	+	-	-	-	-
	10	+	-	-	-	-
	11	+	-	-	-	-
	12	+	-	-	-	-
Kragujevačko	13	+	-	-	-	-
	14	+	-	-	-	-
	15	+	-	-	-	-
	16	+	-	-	-	-

We were particularly interested in developing a DTBA Methods system for detection of GLRaV-1 in grapevine. To evaluate the effectiveness of DTBA Methods, comparative studies were carried out with ELISA. The experiments were repeated at least three times with similar results. Grapevine samples collected from the field were tested on Grapevine leafroll viruses types 1, 2, 3, 5

and 7, and samples were positive only on GLRaV-1. This results were confirmed results that we were got with ELISA tests.

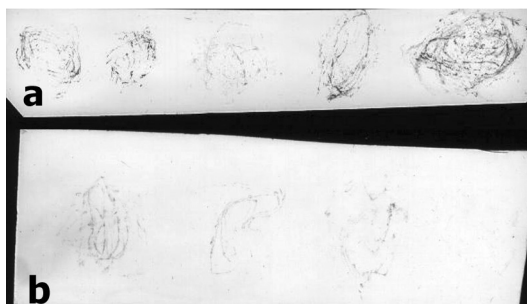


Fig. 2. – DTBA revealed that the examined grapevine samples were virus-infected (a), Healthy grapevine leaf samples (b)

Sl. 2. – DTBA pokazuje da su uzorci vinove loze pozitivni na prisustvo virusa (a), Zdravi uzorci lišća vinove loze (b)

DISCUSSION

Grapevine viruses can cause severe losses by substantially reducing yield, affecting fruit quality and shortening the lifespan of infected plants in the vineyard. Using different methods we were tried to find faster and more sensitive way in detecting grapevine lefroll viruses.

Extensive efforts have been carried out in identifying GLRaV-1 infected vines from collected plants both by DTBA Methods and by ELISA. To confirm the performance of DTBA and to test its utility for the detection of GLRaV-1 from infected field plants, comparative ELISA and DTBA detection assays were carried out using grapevine samples with typical symptoms. Vineyards inspected regularly showed considerably fewer symptoms. Serological tests revealed that this type of infection was attributed by GLRaV-1. The samples were collected from naturally infected grapevine plants in few vineyards in Serbia.

Two kinds of samples were used: samples collected in plants bearing symptoms and samples from healthy control plants. First, we tested the presence of GLRaV-1 by DAS ELISA using a commercial polyclonal antiserum that reacted specially with GLRaV-1. The samples were first tested by ELISA for the presence of different GLRaV viruses (GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GLRaV-5 and GLRaV-7) and only GLRaV-1 was detected. All samples which were positive by

ELISA were also positive by DTBA. This demonstrated its very high sensitivity for GLRaV-1 diagnosis.

Grapevine leafroll 1 is a phloem limited virus and turn purple during DTBA, making results unambiguous and easy to interpret. DTBA analysis is especially useful for non-destructively sampling large numbers of plants for GLRaV. DTBA tissue blots detect virus antigens only at the surface of the cut, thus results are inconsistent for tissues with scattered phloem concentrations. The ELISA tests used homogenized tissue extracts which potentially represent all phloem cells and any associated antigens, thereby giving ELISA an advantage over DTBA for testing leaves. The fact that tissue blots detect virus antigens present on a cut surface at any chosen location makes DTBA useful for monitoring GLRaV movement in a plant. DTBA cannot quantify virus titer, but can be used for quick detection of GLRaV in a plant. DTBA also could be useful in detection of other grapevine viruses. DTBA has also been shown to be particularly valuable in situations where there is an uneven distribution of viral antigens (Hsu and al., 1991).

Grapevine leafroll agents other than GLRaV-1 are present in Serbian vineyards (Kuzmanović et al., 2003, Starović et al., 2006, Starović et al., 2007, Paunović et al., 2007) and DTBA can be used for their detection in further investigation.

REFERENCES

- Agranovsky, A. A., Koonin, E. V., Boyko, V. P., Maiss, E., Frötschl, R., Lunina, N., A., Atabekov, J. G. (1994). Beet yellows closterovirus: complete genome structure and identification of a leader papain-like thiol protease. *Virology* 198(1): 311-24
- Agranovsky, A. A., (1996). Principles of molecular organization, expression and evolution of closteroviruses: over the barriers. *Advances in Virus Research* 47, 119-158.
- Alkowni, R., Rowhani, A., Daubert, S., Golino, D., (2004). Partial characterization of a new ampelovirus associated with Grapevine leafroll disease. *J. Plant Pathol.* 86, 123-133.
- Clark, M. F. and Adams A. N., (1977). Characteristics of the microplate method for enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J Gen Virol* 34: 475-483
- Couceiro, C., Pereira, M., Cid, M., Segura, A. and Cabaleiro, C., (2006). Detection of grapevine leafroll viruses using direct immuno-printing (DIP)-ELISA. In: *Proceedings 15th ICVG, Stellenbosch*, pp. 180-181.
- Demke, T. and Adams, R. P., (1992). The effects of plant polysaccharides and buffer additives on PCR. *Biotechniques* 12, 332-334.

- Emmett, R. W. and Hamilton, R. P., (1994). Leafroll and other virus diseases. In: Nicholas P, Magarey P & Wachtel M (eds) *Diseases and Pests, Grape Production Series* No. 1 (pp. 34–37). Winetitles, Adelaide
- Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U. and Ball, L.A. (Eds.), (2005). *Virus taxonomy*. 8th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, 1162 pp.
- Forsline, P.L., Hoch, J., Limboy, W.F., Mc Ferson, J.R., Golino, D. and Gonsalves, D., (1996). Comparative effectiveness of symptomatology and ELISA for detecting two isolates of grapevine leafroll in Cabernet Franc. *Am. J. Enol. Vitic.* 47, 239–243.
- Goheen, A.C. and Cook, J.A., (1959). Leafroll (red-leaf or rougeau) and its effect on vine growth, fruit quality and yields. *Am. J. Enol. Vitic.* 10, 78–84.
- Goheen, A.C., (1970). Grapevine leafroll. In: Frazier, N.W. (Ed.), *Virus Diseases of Small Fruits and Grapevines*. University of California, Division of Agricultural Sciences, Berkeley, California, USA.
- Goheen, A.C., (1988). Diseases caused by virus and virus-like agents. In: Pearson, R.C., Goheen, A.C. (Eds.), *Compendium of Grape Diseases*. The American Phytopathological Society, St. Paul, MN.
- Gugerli, P., Brugger, J. J. and Bovey, R., (1984). L'enroulement de la vigne: mise en évidence de particules virales et développement d'une méthode immunoenzymatiques pour le diagnostic rapide. *Rev. Suisse Viticult. Arboricult. Horticult.* 16, 299–304.
- Gugerli, P., (2003). Grapevine leafroll and related viruses. In: *Proceedings 14th ICVG*, Locorotondo, pp. 25–31.
- Habili, N. and Rezaian, M. A. (1995). Cloning and molecular analysis of double-stranded RNA associated with grapevine leafroll disease. *Annals of Applied Biology* 127, 95–103.
- Habili, N., Fazeli, C. F. and Rezaian, M. A. (1997). Identification of a cDNA clone specific to grapevine leafroll-associated virus 1 and occurrence of the virus in Australia. *Plant Pathology* 46, 516–522.
- Hoefort, L. L. and Gifford, E. M., (1967). Grapevine leafroll virus—history and anatomical effects. *Hilgardia* 38, 403–426.
- Hilf, M. E., Karasev, A. V., Pappu, H. R., Gumpf, D. J., Niblett, C. L. and Garnsey, S. M. (1995). Characterization of citrus tristeza virus subgenomic RNAs in infected tissue. *Virology* 208, 576±582.
- Hu, J.S., Gonsalves, D. and Teliz, D., (1990). Characterization of closterovirus-like particles associated with grapevine leafroll disease. *J. Phytopatol.* 128, 1–14.
- Hsu, H. T. and R.T. Lawson., (1991). Direct tissue blotting for detection of tomato spotted wilt virus in impetians. *Plant Disease* 75, 292–295.
- Karasev, A.V., (2000). Genetic diversity and evolution of closteroviruses. *Ann. Rev. Phytopathol.* 38, 293–324.

- Karasev, A. V., Boyko, V. P., Gowda, S., Nikolaeva, O. V., Hilf, M. E., Koonin, E. V., Niblett, C. L., Cline, K., Gumpf, D. J., Lee, R. F., Garnsey, S. M., Lewandowski, D. J. and Dawson, W. O. (1995). Complete sequence of the citrus tristeza virus RNA genome. *Virology* 208, 511-520.
- Klaassen, V. A., Boeshore, M. L., Koonin, E. V., Tian, T., and Falk, B. W., (1995). Genome Structure and Phylogenetic Analysis of Lettuce Infectious Yellows Virus, a Whitefly-Transmitted, Bipartite Closterovirus. *Virology* 208, 99-110.
- Kuzmanović, S., Dovas, C. I., Katis, N. I., Starović, M., Tosić, M. and Rajković, S., (2003). Contribution to the study of grapevine virus diseases in Serbia. In: *Proceedings 14th ICVG, Locorotondo*, pp. 180-181.
- Lin, H. T., Hsu, Y. H. and Hsu, H. T. (1990). Immunological detection of plant viruses and a Mycoplasmas-like organism by direct tissue blotting in nitrocellulose membranes. *Phytopathology* 80, 824-828.
- Martelli, G. P. (1993). Leafroll. In: Martelli GP (ed) *Graft Transmissible Diseases of Grapevines* (pp. 37-44). Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome
- Martelli, G. P., Saldarelli, P. & Boscia, D., (1997). Filamentous viruses of the grapevine : closteroviruses. In *Filamentous Viruses of Woody Plants*, pp. 1±9. Edited by P. L. Monette. Trivandrum, India : Research Signpost.
- Martelli, G.P., Agranovsky, A.A., Bar-Joseph, M., Boscia, D., Candresse, T., Coutts, R.H., Dolja, V.V., Falk, B.W., Gonsalves, D., Jelkmann, W., Karasev, A.V., Minafra, A., Namba, S., Vetten, H.J., Wisler, G.C. and Yoshikawa, N., (2002). ICTV Study Group on closteroviruses. The family Closteroviridae revised. *Arch. Virol.* 147, 2039-2044.
- Paunović, S., Jevremović, D., Sretenović, D., Ristić, M. and Sivčev, B., (2007). Utvrđivanje prisustva virusa vinove loze u zasadima i prporištima. In: *XIII Simpozijum sa savetovanjem o zaštiti bilja, Zlatibor* pp: 58-59.
- Rowhani, A., (1992). Use of F(ab₂) antibody fragment in ELISA for detection of grapevine viruses. *Am. J. Enol. Vitic.* 43, 38-40.
- Rowhani, A., Uyemoto, J.K. and Golino, D.A., (1997). A comparison between serological and biological assays in detecting grapevine leafroll associated viruses. *Plant Dis.* 81, 799-801.
- Rowhani, A., Biardi, L., Johnson, R., Saldarelli, P., Zhang, Y.P., Chin, J. and Green, M., (2000). Simplified sample preparation method and one-tube RTPCR for grapevine viruses. In: *Proceedings of XIII International Council for the Study of Viruses and Virus-Like Diseases of the Grapevine, Adelaide*, p. 82.
- Starović, M., Kuzmanović, S., Stojanović, S., Ivanović, Ž., Aleksić, G. and Jošić, D., (2006). Fitosanitarni status autohtone sorte vinove loze plovčina u nekim vinogorjima u Srbiji. In: *VIII Savetovanje o zaštiti bilja, Zlatibor*, pp. 108-109.

- Starović, M., Kuzmanović, S., Ivanović, Ž., Aleksić, G. and Stojanović, S., (2007). Viruses of the local grapevine cultivars in Serbia. In: 5th Balkan Congress for Microbiology, p. 132
- Weber, E., Golino, D. and Rowhani, A., (1993). Leafroll disease of grapevines. Pract. Winery Vineyard 13, 21–25.
- Woodrum, R.C., Antcliff, A.J., Krake, L.R. and Taylor, R.H., (1984). Yield differences between sultana clones related to virus status and genetic factors. Vitis 23, 73–83.

(Primljeno: 20.02.2008.)

(Prihvaćeno: 26.02.2009.)

PRIMENA DTBA I ELISA METODE U DOKAZIVANJU VIRUSA UVIJENOSTI LISTA VINOVE LOZE – 1

ŽARKO IVANOVIĆ, SLOBODAN KUZMANOVIĆ, NENAD TRKULJA, SVETLANA ŽIVKOVIĆ,
SAŠA STOJANOVIĆ, MIRA STAROVIĆ
Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Beograd

REZIME

Sindrom uvijanja lista vinove loze je oboljenje koje prouzrokuje grupa virusa koja se naziva *Virusi vezani za uvijanje lista vinove loze* (GLRaV-1–9). Više različitih metoda je razvijeno za detekciju ove grupe virusa, kao što su indeksiranje, serološke i molekularno biološke metode. Zbog relativno male koncentracije virusa u zaraženoj biljci potrebno je pronaći metodu koja ima najveću osetljivost pri njenoj detekciji. U ovom radu u cilju detektovanja virusa GLRaV, ispitivane biljke su pored vizuelnog pregleda obrađivane i pomoću ELISA i DTBA metoda. Poređenjem ELISA i DTBA metode na simptomatičnim biljkama utvrđeno je da se ove dve metode sa jednakom tačnošću mogu koristiti u otkrivanju GLRaV-1 u listu vinove loze.

Ključne reči: vinova loza, vizuelni test, ELISA test, «tissue blot» test

(Received: 20.02.2008.)

(Accepted: 26.02.2009.)

Zaštita bilja

UDK 635.95:582.923.5]:632.23(497.16)

vol. 57 (1-4), No 255-258, 81-88, 2006, Beograd

Naučni rad

ETIOLOŠKA PROUČAVANJA RAKA OLEANDERA U CRNOJ GORI

VELJKO GAVRILOVIĆ¹, SVETLANA ŽIVKOVIĆ¹JELENA LATINOVIĆ², NEDELJKO LATINOVIĆ²¹Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Beograd² Biotehnički Fakultet, Podgorica

U radu su proučene bakteriološke odlike izolata bakterije izolovane iz tumora formiranih na listovima i mladima oleandera (*Nerium oleander* L.). Na osnovu rezultata testova patogenosti, odgajivačkih i biohemijskih karakteristika i njihovim poređenjem sa podacima iz literature zaključeno je da pomenute simptome bolesti na oleanderu prouzrokuje fitopatogena bakterija *Pseudomonas savastanoi* pv. *nerii*, ekonomski značajan patogen ove ukrasne biljke na području Mediterana

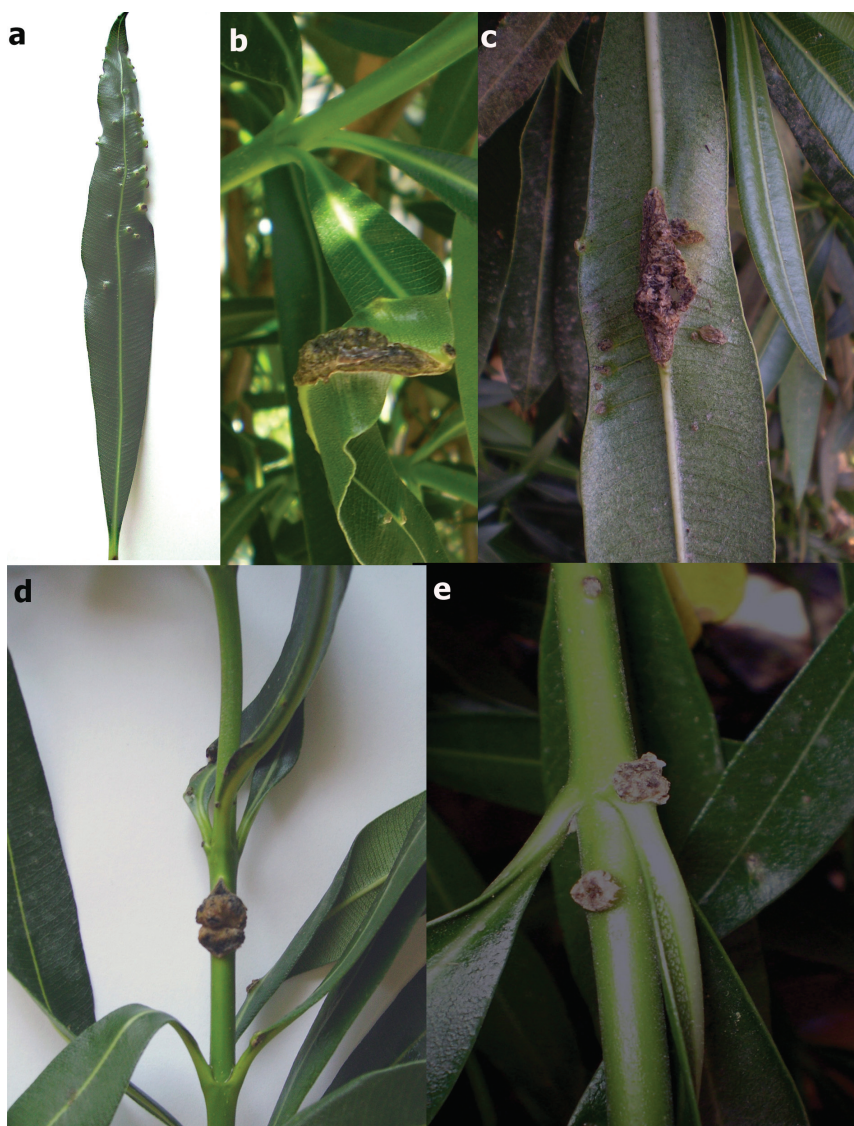
Ključne reči: oleander, tumori, *Pseudomonas savastanoi* pv. *nerii*, patogenost, biohemijske odlike, identifikacija

UVOD

Oleander (*Nerium oleander* L.) je ukrasna biljka široko rasprostranjena na Crnogorskom primorju. Tokom leta formira dekorativne cvetove bele, ružičaste ili crvene boje i time značajno doprinosi prelepom pejzažu uz morsku obalu.

Poslednjih godina se u sve većem intenzitetu primećuje bolest oleandera ispoljena u vidu tumoralnih izraštaja na listovima, mladima i granama. Prvi znaci bolesti se uočavaju na mladom lišću u vidu hlorotičnih pega, u okviru kojih tkivo vremenom postaje ispupčeno i dolazi do formiranja sitnih, okruglih tumora sivozelene boje, prečnika 1-3 mm. Oni se se mogu u većem broju javiti po obodu liske deformišući je (sl 1a).

Kрупniji tumori se mogu pojaviti na glavnom nervu liske oleandera prouzrokujući njenu deformaciju (sl. 1b,c). Daljim razvojem tumora i povećanjem njihovog broja, lišće se suši i opada.



Sl. 1 – *Pseudomonas savastanoi* pv. *nerii*. Početni simptomi na mladom lišću (a); bakterijski tumori na glavnom nervu liske oleandera (b, c); bakterijski tumori na mladima. (d, e).

Fig. 1 – *Pseudomonas savastanoi* pv. *nerii*. The first symptoms on young oleander leaves (a); bacterial knots on oleander main vein (b, c); bacterial knots on oleander shoots (d, e).

Tumori ovalnog oblika se pojavljuju i na mladarima. Mogu biti pojedinačni, krupniji ili je više sitnih raspoređeno po internodijama mladara (sl.1d i sl.1e). Izrasline se uočavaju i na višegodišnjim granama oleandera. Oni su najčešće okruglog oblika, ali njihovim spajanjem postaju izduženi. Površina tumora je hrapava a uklanjanjem površinskog sloja uočava se zelenobelo tkivo suđeraste konzistencije.

S obzirom da ovakve simptome na oleanderu prouzrokuje bakterija *Pseudomonas savastanoi*, cilj rada je bio da se na osnovu dobijenih rezultata laboratorijskih istraživanja i njihovim poređenjem sa literaturnim podacima utvrdi da li opisanu bolest na oleanderu prouzrokuje ova bakterija ili možda neki drugi biotski ili abiotski faktor.

MATERIJAL I METODE

Uzorci lišća i mladara oleandera prikupljani su na području Bečića i Herceg Novog u periodu 2005-2007 godine, a laboratorijski obrađeni u Institutu za zaštitu bilja i životnu sredinu u Beogradu.

Listovi i mladari su površinski sterilisani u 1% rastvoru natrijum hipohlorita u trajanju od jednog minuta, a potom isprani pod snažnim mlazom tekuće vode. Nakon sušenja, sterilnim skalpelom je odstranjen površinski sloj tumora, a potom su sitni fragmenti svežeg tkiva odlagani u prethodno sterilisan avan radi pripremanja macerata.

Izolovanje patogena je vršeno na mesopeptonskoj podlozi obogaćenoj saharozom (NAS) i King-ovoj podlozi B, standardnom metodom (Arsenijević, 1997). Pojedinačne kolonije su prihvatane posle tri dana razvoja pri 25°C, na zakošenu podlogu u cilju dobijanja čistih kultura bakterije.

Provera patogenosti izvršena je inokulacijom lišća oleandera, prema metodi koju su opisali (Bella et al., 2006). Fragmenti prethodno sterilisanih listova su inokulisani suspenzijom bakterija koncentracije 10^8 cfu/ml i odlagani u Petri kutije sa vodenim agarom. Centralni nervi listova su inokulisani ubodom pomoću bakteriološke igle, korišćenjem suspenzije bakterija napred navedene koncentracije (Bella et al., 2006). U cilju proučavanja patogenih svojstava dobijenih izolata izvršena je i infiltracija lista duvana suspenzijom bakterija u cilju provere hipersenzitivne reakcije (HR) duvana, kao i inokulacija nesazrelih plodova kruške, limuna i mahuna boranije, prema ranije opisanim metodama (Arsenijević, 1997; Gavrilović, 2004). Pri ovim testovima je kao kontrolni soj korišćen Ks-106 (*P.syringae* pv. *syringae*) poreklom sa kajsije.

Takođe je proučeno i razlikovanje po Gramu, stvaranje fluorescentnog pigmenta, metabolizam glukoze, LOPAT testovi kao i neki specifični testovi za

P.savastanoi (Bradbury, 1986; Gardan et al., 1992; Arsenijević, 1997; Kiewnick-Brown i Sands, 2001).

REZULTATI

Posle dva dana razvoja na hranljivoj podlozi obogaćenoj saharozom (NAS), uočavaju se blede sive kolonije, sjajne i glatke prečnika 1-2 mm. Nakon 3-4 dana razvoja obod kolonija postaje talasast, te one gube svoj prvobitni okrugao oblik. Kolonije nisu ispučene i sluzastog izgleda što znači da bakterija na ovoj podlozi ne stvara levan. Na King-ovoj podlozi B bakterija stvara zeleni fluorescentni pigment.

Sitni okrugli tumori sivo zelene boje pojavljuju se na veštački inokulisanim listovima oleandera, potopljenim u suspenziju bakterija tri nedelje posle inokulacije. Tumori se posle ovog perioda pojavljuju i na inokulisanim centralnim nervima lista. Proučavani izolati sa oleandera prouzrokuju HR duvana ali ne i nekroze inokulisanih plodova kruške, limuna i mahuna boranije. Kontrolni soj *P. s. pv. syringae* (Ks-106) pozitivno reaguje pri ovim testovima patogenosti (tab 1).

Tabela 1 – Patogenost proučavanih izolata
Table 1 – Pathogenicity of investigated strains

Test	Izolati sa oleandera	Ks-108 ^a
Tests	Oleander strains	
HR duvana – HR in tobacco	+ ^b	+
Plodovi kruške – Pear fruits	– ^c	+
Plodovi limuna – Lemon fruits	-	+
Mahune boranije – Bean pods	-	+

a kontrolni soj *P.syringae pv syringae* – check strain of *P. syringae pv. syringae*

b pozitivan rezultat – positive result

c negativan rezultat – negativen result

Izolati poreklom sa oleandera su gram negativni a glukozu metabolišu isključivo u aerobnim uslovima (oksidativno); ne stvaraju levan i ne ispoljavaju aktivnost oksidaze, pektinaze i arginin dehidrolaze (LOPAT testovi); proučavani izolati ne hidrolizuju želatin i eskulin, metabolišu sorbitol, saharozu i citrate, a u svojim metaboličkim procesima ne koriste ksilozu i laktozu i DL laktate (tab.2).

Tabela 2 – Bakteriološke odlike proučavanih izolata
Table 2 – Bacteriological characteristics of investigated strains

Test Tests	Izolati sa oleandera Oleander strains	Ks-108 ^a
Gram	– ^b	–
Fluorescencija– Fluorescence	+ ^c	+
O/F	O	O
Stvaranje levana– Levan production	–	–
Aktivnost-Activity	–	–
Oksidaza-Oxidase	–	–
Pektinaza-Pectinase	–	–
Arginin dehidrolaza-Arginin dehydrolasa	–	–
Hidroliza želatina-Gelatin hydrolysis	–	–
Hidroliza eskulina– Esculin hydrolysis	–	–
Korišćenje-Utilization		
Saharoze-Sucrose	+	+
Sorbitol-Sorbitole	+	+
Citrate– Citrate	+	+
Ksiloza-Xilose	–	–
Laktoza-Lactose	–	–
DL laktati– DL lactate	–	–

a kontrolni soj *P.syringae* pv *syringae* – check strain of *P. syringae* pv. *syringae*

b negativan rezultat – negativen result

c pozitivan rezultat – positive result

DISKUSIJA

P. savastanoi je široko rasprostranjen patogen masline i oleandera u regionu Mediterana, prouzrokujući tumore na granama i listovima ovih biljaka (Arsenijević, 1997). Poslednjih godina je zapaženo masovno širenje ove bolesti na oleanderu na području crnogorskog primorja. Tumori se obrazuju prvenstveno na lišću i mladarcima, ali su uočeni i simptomi deformacije cveta koja takođe može biti prouzrokovana ovom bakterijom (Bella et al., 2006). Međutim, uzorci biljaka oleandera sa simptomima deformisanih cvasti nisu bili uključeni u naša istraživanja.

Iz tkiva tumora na oleanderu sa lakoćom su izolovani fluorescentni sojevi bakterija koji na podlozi obogaćenoj saharozom ne stvaraju levan. Provera patogenosti je uspešno sprovedena primenom metode koja se preporučuje prilikom ispitivanja otpornih genotipova oleandera prema ovoj bakteriji (Bella et al., 2006), pri čemu se karakteristični simptomi bolesti pojavljuju posle 3 nedelje od inokulacije.

Iz tkiva tumora su sa lakoćom izolovani fluorescentni izolati bakterija koji na podlozi obogaćenoj saharozom ne stvaraju levan. Izgled kolonija na hranljivoj podlozi (bledo-sive, sjajne) i u kasnijim fazama razvoja neravnih ivica su u punoj saglasnosti sa literaturnim podacima (Gardan et al., 1992).

Proučavani sojevi su Gram negativni, oksidativno metabolišu glukozu, ne stvaraju oksidazu, pektinazu i arginin dehidrolazu; ne hidrolizuju želatin i esku-lin koriste saharozu i sorbitol ali ne i laktozu, ksilozu i DL laktate, što je u punoj saglasnosti sa podacima iz literature (Bradburry, 1986; Gardan et al., 1992).

Na osnovu dobijenih rezultata i poređenjem karakteristika izolata sa literaturnim podacima zaključeno je da patološke promene na oleanderu ispoljene u vidu tumora na lišću i mladima prouzrokuje bakterija *Pseudomonas savastanoi* pv. *nerii*. Pomenuti naziv bakterije je prihvaćen nedavno. Raniji naziv *P. syringae* pv. *savastanoi* je promenjen, a primenom metoda hibridizacije nukleinskih kiselina ustanovljena je nova vrsta *P. savastanoi* sa više patogenih varijeteta. Prema ranijoj klasifikaciji ova bakterija je u potpunosti slična *P. syringae*, pri čemu je svrstana u Ib fluorescentni bakterija roda *Pseudomonas*, na osnovu LOPAT testova pošto ne stvara levan (Bradburry, 1986; Arsenijević, 1997). Međutim primenom molekularnih metoda ustanovljene su značajne razlike među proučavanim sojevima, te su novoformiranoj vrsti *P. savasatonoi* pridodati i varijeteti *glicinea* i *phaseolicola*, prouzrokovajući bakterioza soje i pasulja odnosno boranije, koji su ranije pripadali vrsti *P. syringae* (Gardan et al., 1992). Kasnije su i izolati reklom sa masline i oleandera svrstani u dva patogena varijeteta: pv. *savastanoi* (maslina) i pv. *nerii* (oleander) (Caponero et al., 1995; Bella et al., 2006).

P. s. pv. nerii se smatra ekonomski značajnim patogenom oleandera na području Mediterana. O tome najbolje govore rezultati istraživanja u Italiji sprovedena u cilju iznalaženja otpornih genotipova oleandera prema ovom patogenu. Rezultati ovih istraživanja su pokazala da nema potpuno imunih, ali da postoje razlike u osetljivosti pojedinih genotipova prilikom veštačkih inokulacija (Bella et al., 2006). S obzirom da nema podataka o hemijskom suzbijanju patogena, gajenje otpornijih genotipova bi za sada bio osnovni način kontrole ovog patogena.

LITERATURA

- Arsenijević, M. (1992): Fitopatogene bakterije. Naučna knjiga, Beograd.
- Arsenijević, M. (1997): Bakterioze biljaka. Stylos, Novi Sad.
- Bella, P., Catara, V., Guarino, C., Cirvilleri, G. (2006). Evaluation of oleander accessions for resistance to *Pseudomonas savastanoi* pv. *nerii*. Journal of Plant Pathology 88 (3): 273-278.
- Bradbury, J.F. (1986): Guide to Plant Pathogenic Bacteria. CAB International Mycological Institute, Kew, England.
- Caponero, A., Contesini, A.M., Iacobellis. (1995): Population diversity of *Pseudomonas savastanoi* subs. *savastanoi* on olive and oleander. Plant Pathology 44: 848-855.
- Gardan, L., Bollet, C., Abu Ghorrrah, M., Grimont, F., Grimont, P.A.D. (1992): DNA relatedness among the Pathovar Strains of *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* Janse (1982) and Proposal of *Pseudomonas savastanoi* sp. nov.
- Gavrilović, V. (2004): Patogene i biohemijsko fiziološke karakteristike bakterija roda *Pseudomonas* parazita voćaka. Doktorska disertacija, Poljoprivredni fakultet, Beograd, Zemun, 104 PP.
- Kiewnick–Brown, A., Sands, D.C. (2001): Gram – negative bacteria: *Pseudomonas*. In : Schaad, N.W., Jones, J.B. Chun, W. (Eds): Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria, APS, St. Paul, Minnesota, USA

(Primljeno: 15.11.2008.)
(Prihvaćeno: 26.02.2009.)

ETIOLOGICAL STUDY ON OLEANDER KNOT IN MONTENEGRO

VELJKO GAVRILOVIĆ¹, SVETLANA ŽIVKOVIĆ¹
JELENA LATINOVIĆ², NEDELJKO LATINOVIĆ²

¹Institute for Plant Pathology and Environment, Belgrade

²Biotechnic Fakultety, Podgorica

SUMMARY

Oleander (*Oleander nerii* L.) is wide spread ornamental plant on the coast in Montenegro. Symptoms of knots appears on leaves and shoots noticed on oleander plants in Herceg Novi and Bečići during 2005-2007. A number of non levan bacterial strains were isolated on nutrient sucrose agar (SNA), from the knots on oleander leaves and shoots. Investigated strains are Gram negative, oxidative and fluorescent on King, s medium B. They are negative in oxidase, pectinase and arginine dehydrolase test, while induce HR in tobacco after 24 hours of inoculation.

Small pale white knots appear on inoculated oleander leaves three weeks after inoculation, and they are very similar to those recorded in natural infection. Investigated strains do not produce a necrosis on artificial pear and lemon fruits as well as on bean pods.

Investigated strains not hydrolysed gelatin and esculin and do not utilize lactose, xilose and DL- lactate; they utilize sucrose and sorbitol. According to obtained results and their comparing with literature data we concluded that oleander knots in Montenegro is caused by *Pseudomonas savastanoi* pv. *nerii*. It is the first record of this pathogen in Montenegro.

Key words: Oleander, knots, *Pseudomonas savastanoi* pv. *nerii*, pathogenicity, biochemical properties.

(Received: 15.11.2008.)

(Accepted: 26.02.2009.)

Zaštita bilja
vol. 57 (1-4), No 255-258, 89-98, 2006, Beograd

UDK 632.03:595.764
Naučni rad

MASOVNO IZLOVLJAVANJE RUTAVE BUBE U CILJU NJENOG SUZBIJANJA

Sivčev Lazar
Poljoprivredni fakultet, Zemun

Štetni insekti koji se hrane cvetovima, pogotovo onih biljaka koje se oprašuju polinatorima, vrlo su teški za suzbijanje. Na terenima gde se masovno javljaju, ovi insekti prave značajne probleme proizvođačima. Prvi problem je što se njihovo suzbijanje uglavnom sprovodi hemijskim merama – folijarnim insekticidima koji su nedovoljno efikasni. Pri tome u velikoj meri stradaju korisni insekti, a u odsustvu istih ne dolazi do oprašivanja i do roda voćaka. Osim toga, kod jagoda se često događa da napadnute cvetove treba zaštititi u vreme sazrevanja plodova te se ne sme prskati insekticidima, jer prilikom ovakvog suzbijanja dolazi do kontaminacije plodova. Imajući u vidu veliki ekonomski značaj rutave bube želeli smo da proučimo nove mogućnosti njenog suzbijanja. Posebno su nas interesovale metode koje su ekološki povoljne i ne zasnivaju se na pesticidima. Stoga smo odabrali da proučimo metod masovnog izlovljavanja posebno konstruisanim klopama sa mirisnim atraktantima. Za vreme masovnog izlovljavanja na lokalitetu Belarica-Batajnica ukupno je ulovljeno 4474 imaga rutave bube na pet klopki. U periodu cvetanja jabuke ulovljeno je 864 imaga ili 19,3% u odnosu na ukupan broj ulovljenih imaga tokom masovnog izlovljavanja, a u periodu cvetanja jagode ulovljeno je 3212 imaga odnosno 71,79% u odnosu na ukupan broj ulovljenih imaga.

Ključne reči: Masovno izlovljavanje, klopke, *Tropinota hirta* Poda, jagoda

UVOD

Među insektima koji oštećuju cvet gajenih biljaka najznačajnije su vrste iz podfam. *Cetoninae*. Prema domaćim literaturnim podacima (Bebić, 1954; Petrik, 1955; Bogavac, 1962; Živanović i Pavićević, 1956) kod nas najznačajnija vrsta je rutava buba (*Tropinota hirta* Poda). Rutava buba ima širok areal rasprostranjenosti koji zauzima veći deo evro-azije, mediteran, bliski istok i centralnu aziyu. Rutava buba je veoma štetna u stepskim područjima. Imago se pojavljuje

u proleće. Potrebno je da suma temperature zemljišta na dubini od 5 cm iznosi od 12,9 do 13,4 °C, pa da imago napusti sklonište (Burkova, 1962; Cit Bogavac 1962). Krajem marta i početkom aprila, dolazi do pojave prvih imaga, kada je srednja dnevna temperatura >10 °C za period do 10 dana. Masovna pojava nastupa kada je srednja dnevna temperatura preko 15 °C (Bogavac, 1962). Kako je rutava buba veliki ljubitelj toplih i sunčanih dana, najčešće je možemo naći u cvetovima u najtoplijim časovima. Iz svojih skrovišta insekti počinju da izleću oko 9:30, a napuštaju cvetove oko 14:30 časova. Već u 16 časova može se videti samo poneki zaostali imago, skriven u cvetovima. Ova štetočina je najaktivnija od 11 pa do 13 časova. Masovna ovipozicija odvija se tokom maja i početkom juna. Rutava buba je polifagna vrsta. Hrani se cvetovima skoro svih biljaka čije se cvetanje poklapa sa vremenom njenog izletanja. Od gajenih biljaka napada breskvu, badem, divlju trešnju, trešnju, višnju, kajsiju, krušku, jabuku, dunju, jagodu, kupinu, malinu, ružu, trn, glog, vinovu lozu, grahoricu, bagrem, belu detelinu, crvenu detelinu, bob, lupinu, grašak, lucerku, pšenicu, raž, njivsku gorušicu, uljanu repicu, kupus, rotkvu, lalu, kamilicu, maslačak, šafraniku, jasmin i jorgovan. (Bebić, 1954; Živanović i Pavićević, 1956)

Imago rutave bube oštećuje cvet hraneći se prašnicima i tučkom, pri čemu vrlo često oštećuje i krunične listiće. Štete na kruničnim listićima su često mehaničke prirode. Rutava buba ih, da bi došla do prašnika i tučka, ako cvet još nije otvoren, progriza i zavlaci se u unutrašnjost pupoljka. Kasnije, kada se cvet otvori gazeći po kruničnim listićima imago ih oštećuje. Usled tih mehaničkih oštećenja, listići ili otpadnu ili ostanu iskrzani. Rutava buba skuplja nektar iz svih biljaka iz spontane flore (naročito sa vrsta iz familija *Brassicaceae* i *Asteraceae*), ali i na gajenim biljkama i voćkama. U nedostatku nektara ona ispituje sve biljne organe bogate šećerom. Napada mlado lišće i pupoljke kao što je to slučaj sa vinovom lozom, suncokretom, kukuruzom, lucerkom i šećernom repom. Larva rutave bube, nasuprot imagu, nije štetna. Hrani se isključivo sitnim žilicama biljaka i humusnim materijama u zemlji (Bebić, 1954).

MATERIJAL I METODE

Mesto i objekat

Istraživanja su sprovedena u lokalitetu Belarica-Batajnica tokom 2004 godine. Ogled je postavljen u zasadu jabuke i jagode u okućnici u blizini Dunava.

Opis atraktanta

Mamac je napravljen od papirnatog tampona dužine 1 cm koji je smešten u polietilensku foliju debljine 0.02 mm. Kao atraktanti kojima je tampon natopljen, korišćene su mirisne materije cinamil-alkohol (3-pentil-2-propenil alkohol) i trans-anetol [(1-metoksi – 4 – (1-propenil) benzen] u odnosu 1:1. Tampon je prikaoen za plastičnu traku (8 x 1 cm) zbog lakšeg postavljanja na klopku. U poljskim ogledima trajanje mirisnog atraktanta je nekoliko nedelja, ali preporuka je da se dispenzeri menjaju na svake dve do tri nedelje. Mamci su pakovani pojedinačno u aluminijumske folije i skladišteni na -30°C do upotrebe (Schmera i sar., 2003).

Način postavljanja

U ogledu na jabuci klopke su bile postavljene između redova na rastojanju od 3 m. Sve klopke su bile pričvršćene za drvene štapove koji su zabodeni u zemlju. Gornji kraj klopke je bio na visini oko 50 cm.

U ogledu sa jagodom klopke su bile postavljene u redu na rastojanju od 3 m. Gornji kraj klopke je bio na visini manjoj od 50 cm dok je donji kraj bio na zemlji.

Metod pregleda biljaka i klopki

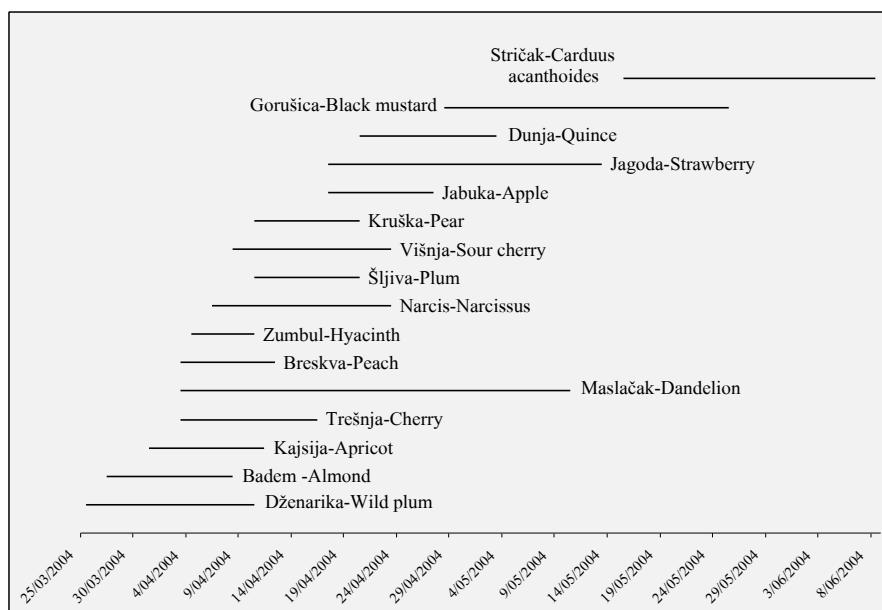
Vizuelno su pregledani cvetovi biljaka i zapisivana je brojnost imaga rutave bube. Na opisanom lokalitetu sve biljke u cvetu su pregledane od aprila do juna da bi utvrdili kada će se masovno javiti imaga i na kojim biljkama. Osim toga registrovali smo periode cvetanja svih cvetnica koje su se nalazile na oglednom lokalitetu. U ogledu sa jagodom obeležili smo 14 napadnutih i oštećenih cvetova i pratili nastajanje deformiteta na plodovima. U vreme berbe jagoda utvrdili smo ukupan broj oštećenih i neoštećenih plodova.

Klopke su pregledane od aprila do juna 2004. godine na svaka četiri dana odnosno u slučaju nepovoljnih vremenskih uslova dan ranije ili kasnije.

REZULTATI

Fenologija cvetanja biljaka

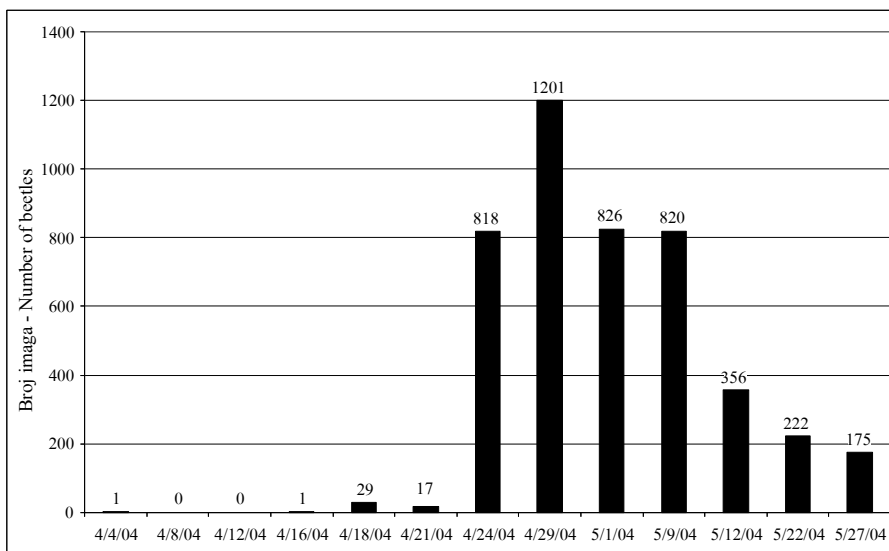
Na lokalitetu gde je postavljen ogled prvo je cvetala dženarika. Ona je bila u cvetu od 25. marta do 10. aprila. Badem je kasnije krenuo sa cvetanjem 27. marta, ali je precvetao 8. aprila. Kajsija je cvetala u periodu od 31. marta do 11. aprila. Zatim su 3. aprila počele da cvetaju trešnja, breskva i maslačak. Trešnja je precvetala 16. aprila, breskva nešto ranije 12. aprila, dok je maslačak cvetao do 10. maja. Zumbuli su cvetali od 4. do 10. aprila, a narcisi od 6. do 23. aprila. Kod višnje cvetanje je trajalo od 8. do 23. aprila. Šljiva i kruška su cvetale od 10. do 20. aprila, dok je jabuka cvetala od 17. do 27. aprila. Jagoda je cvetala od 17. aprila do 13. maja. Cvetanje dunje je trajalo od 20. aprila do 3. maja. Gorušica je cvetala od 28. aprila do 25. maja, a stričak je cvetao od 15. maja do 8. juna. (Graf. 1)



Graf. 1 – Fenologija cvetanja biljaka na lokalitetu Belarica-Batajnica
Graph 1 – Flowering phenology of plants in Belarica-Batajnica locality

Praćenje leta rutave bube

Prvi let imaga rutave bube na lokalitetu Belarica-Batajnica registrovan je 4. aprila. Od 6. do 15. aprila je došlo do naglog zahlađenja sa svakodnevnim padavinama. Zbog ovako nagle promene temperature cvetanje voćaka je bilo produženo, ali niske temperature su uticale i na smanjenu aktivnost imaga. Od 15. aprila prestale su padavine i temperatura je naglo porasla, što je uticalo i na cvetanje voćaka i na aktivnost imaga. Posle tri dana aktivnost imaga je porasla i do 21. aprila u klopama je bilo 46 imaga, dok je 24. aprila u klopama bilo 818 imaga. Maksimum leta smo registrovali 29. aprila, pri čemu je broj ulovljenih imaga od 25. do 29. aprila bio 1201. Dva dana kasnije (1. maja) bilo je 826 imaga. Od 1. do 9. maja ulovljeno je 820 imaga rutave bube. Od 12. maja kada je ulovljeno 356 imaga, aktivnost rutave bube se postepeno smanjivala tako da je u periodu od 12. do 27. maja ulovljeno 397 imaga. Posle 27. maja nije bilo cvetanja gajenih biljaka tako da nismo imali poseban interes da pratimo let pojedinačnih imaga. (Graf 2)



Graf. 2 – Let imaga rutave bube u 2004 godini.

Graph 2 – Flight of hairy beetle in 2004

Migracije rutave bube i oštećenja na biljkama

U prvoj polovini aprila imago rutave bube se povremeno javljao i nije pričinjavao vidljive štete na dženariki, bademu, kajsiji, trešnji i breskvi koje su u to vreme cvetale. Prve štete od imaga su zapažene tek na maslačku 18. aprila. Takođe, tog dana je registrovana i prva pojava imaga na cvetovima višnje, dok je sporadično posećivao cvetove jagode. Kruške i šljive su bile u fazi precvetavanja i na njima nismo zapazili ni prisustvo imaga ni oštećenja.

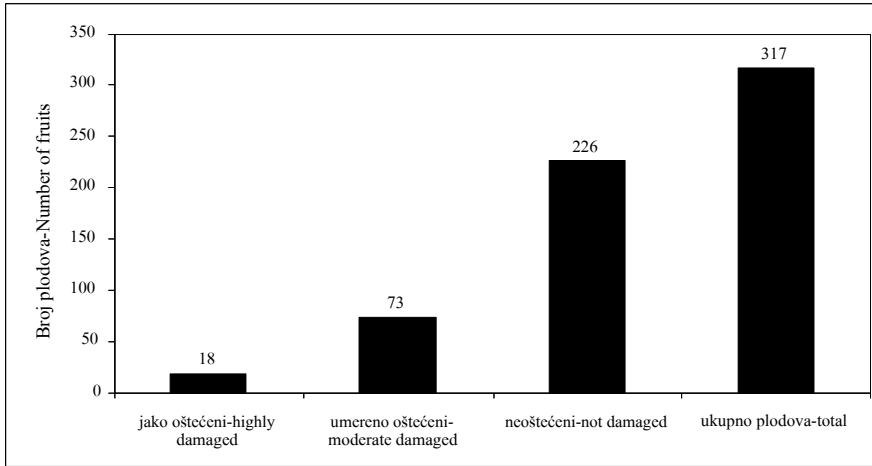
Tri dana kasnije (21. aprila) zapazili smo prva oštećenja na cvetovima višnje. Na jednom stablu višnje bilo je desetak oštećenih cvetova. Jabuka je bila u fazi početka cvetanja i na njoj smo takođe registrovali prva oštećenja cvetova.

Sledećeg dana (22. aprila), vreme je bilo sunčano i još toplije, te se broj oštećenih cvetova jabuke povećao. Imaga su bila brojna i intenzivno su se hranila tučkom i prašnicima na cvetovima jabuke koji su počeli da se otvaraju. Imaga su progrizala krunične listiće koji su pokrivali tučak i prašnike. Kada su se takvi cvetovi otvorili prašnici i tučak su bili oštećeni ili potpuno uništeni. Krunični listići ili su otpali ili su bili u savijenom položaju kao da cvet tek treba da se otvori. Na otvorenim cvetovima zapaženo da su krunični listići iskrzani obično po ivicama, prašnici su delimično oštećeni ili nedostaju. Oštećenja tučka nisu bila vidljiva golim okom.

Kako su u tom periodu cvetale i druge biljake (Graf. 1) bilo je očigledno da je cvet jabuke bio najatraktivniji za imago rutave bube. Stoga se najveći broj imaga mogao zapaziti na jabuci, posle čega su bile očekivane velike štete. Tokom maksimalnog leta zapazili smo da je imago intenzivnije posećivao osunčane cvetove. Na cvetovima koji su bili najduže izloženi suncu štete su bile mnogo veće, dok na cvetovima koji su bili u senci krošnje nismo primetili takva oštećenja, kao ni masovnije prisustvo imaga. Jačina napada je bila izuzetno velika. Na jednoj mladoj sadnici jabuke prebrojali smo koliko ima ukupno cvetova, oštećenih i neoštećenih, i broj cvetova sa imagom. Od ukupno prebrojanih 334 cvetova, oštećenih je bilo 269, neoštećenih 58, a sa prisutnim imagom bilo je 7 cvetova (Graf. 3).

Iz podataka se vidi da je imago ošteti 80,1 % cvetova, a da je neoštećenih bilo 17,4 %. Na osnovu ovih podataka, brojnost plodova kao i njihov kvalitet trebalo bi da je značajno umanjen, ali mi to nismo registrovali u polju. Iz neoštećenih cvetova formirao se dobar rod. Vrlo mali broj cvetova sa imagom koji se hranio pokazuje da su oštećeni cvetovi manje atraktivni i da imago prelazi na druge sveže izvore hrane.

Od 22. aprila imago se intenzivno hranio na cvetovima jagode i dunje koji su počeli da cvetaju. Brojnost imaga u klopama se svakodnevno povećavala i 29. aprila je dostigla maksimum. Ovaj maksimum se poklapa sa periodom cvetanja

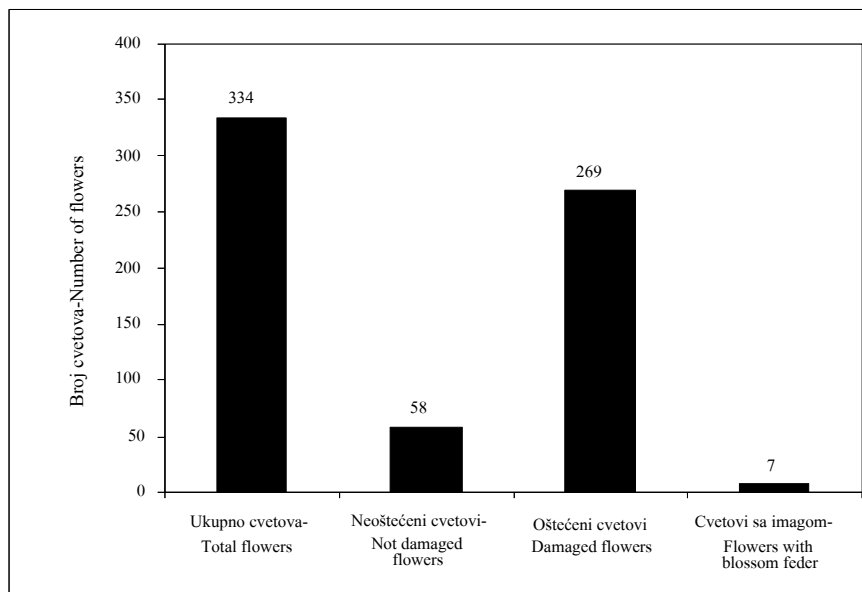
**Graf. 3 – Oštećenost cvetova jabuke****Graph 3 – Damaged apple flowers**

jagode i dunje, a pojedinačni primerci su se hranili cvetom gorušice. Gorušica je tek počela sa cvetanjem, dok je dunja bila u punom cvetu. Imago se masovno hranio cvetovima dunje i do 3. maja svi cvetovi su bili potpuno oštećeni, što je prouzrokovalo izostanak plodova. Posle 3. maja od gajenih biljaka jedino je jagoda bila u cvetu i tada su imaga rutave bube masovno nalažena samo na njima. Ovako velika brojnost imaga ukazivala nam je da će doći do vrlo velikih šteta na jagodi, jer nije bilo masovnog cvetanja drugih biljaka.

Od 1. maja smo pratili razvoj 14 plodova jagode koji su bili vidno oštećeni. Cvetovi odnosno plodovi su pregledani u 4 navrata i to između 1. i 26. maja kada su dospeli za berbu. Nijedan napadnut cvet nije bio potpuno uništen te broj formiranih plodova nije smanjen. Štetni efekat rutave bube je u izgledu, odnosno u deformitetu ploda, a može biti izražen u različitom stepenu. Deformisani plodovi imaju umanjenu komercijlnu vrednost, dok su oni najoštećeniji skoro bez upotrebne vrednosti. Iz cvetova koji su bili manje oštećeni ishranom imaga rutave bube razvili su se plodovi koji su bili neznatno deformisani. Nasuprot tome, od vrlo oštećenih cvetova razvili su se izrazito deformisani plodovi jagode.

22. maja smo ispitivali koliki je stepen oštećenja na plodovima koji su ubrani tog dana (Graf 4.).

Prema stepenu oštećenosti, plodove smo podelili u tri kategorije. Ukupno oštećenih plodova je bilo 91 (28,7%), a neoštećenih 226 (71,3%). Izrazito oštećenih plodova je bilo 18 (5,7%), umereno oštećenih 73 (23%). Oštećeni plodovi su znatno manje veličine od neoštećenih, neravnomerno sazrevaju i izgubili



Graf. 4 – Stepen oštećenja na plodovima jagode

Graph 4 – Scale of damaged strawberry fruits

su mekoću u poređenju sa neoštećenim plodovima. Svi izrazito oštećeni plodovi su po veličini mali. Dimenzije takvih plodova (visina, dužina i širina) nisu prelazile 3 cm. Mesto oštećenja je na sredini ili pri vrhu ploda. Umereno oštećeni plodovi se nisu značajno razlikovali po veličini od neoštećenih. Deformacije plodova su vidljive, ali nisu toliko izražene u odnosu na izrazito oštećene plodove.

Po završetku cvetanja jagode (od 13. maja) imago je oštećivao cvetove gorušice i cvasti strička. U ovom periodu leta imaga rutave bube njihova brojnost je znatno smanjena tako da na gorušici koja je obilno cvetala nismo primetili izrazite štete. One se mogu videti kada se na jednoj cvasti sakupi nekoliko imaga. Krajem maja i početkom juna na ispitivanom lokalitetu jedino su cvetali pojedinačni primerci strička. Iako je brojnost imaga rutave bube bila još manja ipak se na jednoj biljci moglo naći i po 20 imaga koja su se intenzivno hranila u osnovi cvasti. Stričak je precvetao 8. juna i u to vreme na lokalitetu gde je postavljen ogled nije bilo biljaka u cvetu kao ni imaga.

Od 4. Aprila do 28. maja ukupno je ulovljeno 4474 imaga rutave bube na pet klopki. U periodu cvetanja jabuke (17. aprila do 27. aprila) ulovljeno je 864 imaga ili 19,3% u odnosu na ukupan broj ulovljenih imaga tokom masovnog izlovljavanja. U periodu cvetanja jagode (od 27. aprila do 13. maja) ulovljeno je 3212

imaga odnosno 71,79% u odnosu na ukupan broj ulovljenih imaga. Pored rutave bube u klopama su ulovljene sledeće vrste: *Valgus hemipterus* (Scarabaeidae), *Bombus lapidarius* (Bombidae) i *Xylocopa violaceus* (Xylocopidae). Njihova brojnost zajedno nije prešla 50 imaga, od čega su poslednje dve vrste bile najmanje zastupljene.

LITERATURA

- Bebić, N. (1954): Prilog poznavanju biologije rutave bube. *Zaštita bilja*, vol. 34: 63-72
- Bogavac, M. (1962): Rutava buba – *Tropinota hirta* Poda (Biologija i suzbijanje). *Zaštita bilja*, vol. 69-70: 139-156
- Petrik, C. (1955): Neka zapažanja o rutavoj bubi. *Zaštita bilja*, vol. 32: 69-71
- Schmera, D., Tóth, M., Subchev, M., Sredkov, I., Szarukán, I., Jermy T. and Szentesi, Á. (2004): Importance of visual and chemical cues in the development of an attractant trap for *Epicometis (Tropinota) hirta* Poda. *Crop Protection*, Vol. 23, No 10: 939-944.
- Živanović, V. i Pavićević, B. (1956): Prilog poznavanju biologije i suzbijanja *Tropinota hirta* Poda i *Oxythyrea funesta* Poda. *Zaštita bilja*, vol. 38: 43-50

(Primljeno: 04.04.2008.)

(Prihvaćeno: 26.02.2009.)

CONTROL OF HAIRY BEETLE BY MASS TRAPPING

SIVČEV LAZAR

Faculty of Agriculture, Belgrade-Zemun

SUMMARY

Control of blossom feeding insects especially on insect polinated plants is very difficult. In many areas hairy beetles are appearing in large numbers causing problems to growers. The first problem is in insufficient efficacy of foliary applied insecticides. It is accompanied by toxic effects on beneficial insects especially on pollinators which is followed by yield reduction. Further problem is in strawberries where chemical treatment against hairy beetles should be done in a period of fruit ripening causing fruit contamination with insecticides. Having in mind economic impact of hairy beetles our goal was to investigate new means of control. We were especially interested in non chemical ecologically based methods. Therefore we choose mass trapping method of hairy beetles using blue traps baited with cinnamyl alcohol and trans-anethole. Mass trapping period lasted from April 4th to May 28th on locality Belarica-Batajnica where was trapped out 4474 beetles in five traps. During apple blossoming period from April 17th to April 27th it was trapped out 864 beetles or 19,3% of total number of caught beetles, while in strawberry blossoming period it was trapped out 3212 beetles or 71,79% of total number of caught beetles. Rate of damages on strawberry fruits was examined. There were 18 (5,7%) highly damaged strawberry fruits, moderately damaged fruits 73 (23%) and undamaged fruits 226 (71,3%), out of 317 totally examined strawberry fruits. Damaged fruits are of significantly smaller size, unevenly ripening and fruit tissue hardening.

Key words: Mass trapping, traps, *Tropinota hirta* Poda, strawberry

(Received: 04.04.2008.)

(Accepted: 26.02.2009.)

Zaštita bilja
vol. 57 (1-4), No 255-258, 99-114, 2006, Beograd

UDK 632.651.32
Naučni rad

NOVI NALAZI KOPLJASTE NEMATODE *PARALONGIDORUS SERBICUS* (NEMATODA: LONGIDORIDAE), PRVI NALAZ MUŽJAKA I IMAGA SA ZAMENOM ODONTOSTILETA

SMILJKA KRNJAIĆ¹, ĐORĐE KRNJAIĆ²

¹ Poljoprivredni fakultet, Beograd-Zemun

² Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Beograd

Srpska kopljasta nematoda, *Paralongidorus serbicus* Krnjaić et al.2002. predslavlja vrlo čestu longidoridnu nematodu u Srbiji. Pored nalaza u zoni korenovog sistema biljaka u spontanoj vegetaciji, ona se često sreće na površinama na kojima se gaje kulturne biljke (vinova loza, voćni rasadnici, prporišta, šumsko rastilo i krompir), što ukazuje na njen mogući ekonomski značaj. Pored tipskog staništa (travna zajednica u Topčiderskom parku), *P.serbicus* je nađen u 13 novih lokaliteta, od kojih je u tri utvrđeno prisustvo mužjaka (prvi nalaz) i odraslih jedinki, koje pored funkcionalnog odontostileta imaju formiranu zamenu odontostileta. U radu su prikazani morfološki i morfometrijski podaci utvrđenih populacija *P.serbicus*, opisani su mužjaci i polno zrele jedinke sa zamenom odontostileta.

Ključne reči: Kopljaste nematode, *Paralongidorus serbicus*, morfometrijske karakteristike, mužjaci i imaga sa zamenom odontostileta

UVOD

U prvom nalazu, uz opis srpske kopljaste nematode, *Paralongidorus serbicus* Krnjaić, Lamberti, Krnjaić S., Agostinelli A. and Radicci V. (2002) napomenuto je da je ova vrsta, uz tipsko stanište, utvrđena u zoni korenovog sistema, odnosno na površinama na kojima je gajena vinova loza i lozni sadni materijal (Bela Crkva i Medveđa), voćni sadni materijal (Knjaževac, Zaječar, Niš i Aleksinac) i u zoni korenovog sistema smokve u stakleničkom objektu u okolini Beograda (Jajinci).

Za ove populacije nisu dati nikakvi morfometrijski podaci i ilustracije, što se ovom prilikom čini.

U međuvremenu utvrđena su nova staništa *P.serbicus*, u kojima su, u tri slučaja, prvi put konstatovani mužjaci ove vrste i zamena odontostileta kod polno zrelih ženki i mužjaka, za koje se takođe daju morfometrijski podaci i ilustracije.

MATERIJAL I METODE

Uzorci zemljišta iz kojih je vršena ekstrakcija *P.serbicus* prikupljani su radi faunističkih ispitivanja longidoridnih nematoda u Srbiji. U ovu svrhu korišćeni su i uzorci zemljišta koje Institutu dostavljaju proizvođači biljnog reproduktionog materijala radi ispitivanja prisustva karantinskih nematoda u objektima u kojima se ovaj materijal proizvodi. U prvom slučaju, uzorci su uzimani sa vrha ašova koji je zahvatao sloj zemljišta do 30 cm dubine i to sa više desetina uboda ašovom, dok je u drugom slučaju uzorak formiran sa pedesetak uboda lopatice-sonde u površinski sloj sveže razoranog zemljišta. Na taj način prikupljeno je 1-2 kg zemlje.

Sveže prikupljeni uzorci za faunistička istraživanja ispirani su na Ostenbrink-ovom flotacionom aparatu za ekstrakciju slobodnih nematoda (Oostenbrink, 1960) ili metodom dekantacije (Krnjaić i Krnjaić S, 1987). U oba slučaja filtrat je prenošen na sita od 175 μm (bez filter papira), a potom u Petri kutije sa vodom, gde je oslobađanje nematoda u vodi trajalo 24 časa.

Izdvajanje slobodnih nematoda iz "karantinskih" uzoraka vršeno je uz istovremenu ekstrakciju cistolikih nematoda preko Spirsovog (1968) aparata, i to na taj način, što je filtrat sa slobodnim nematodama zahvatan na dva sita od 50 μm , koja su bila postavljena ispod sita od 175 mikrona, na kome su zadržavane cistolike forme nematoda. Na ovaj način moguća je istovremena ekstrakcija cistolikih i slobodnih nematoda. Talog sa sita od 175 μm dekantiran je u plastične sudove (činije) iz kojih je vršeno izdvajanje cistolikih nematoda, dok je talog sa sita od 50 μm nakon laganog propiranja prenet na manja sita od 175 μm za izdvajanje slobodnih nematoda u Petri kutije (kao i u slučaju izdvajanja preko Ostenbrinkovog aparata ili primenom dekantacije). Pregled izdvojenih slobodnih nematoda vršen je nakon 24 časa oslobađanja u Petri kutije. Longidoridne nematode iz vodene suspenzije izdvajane su u fiksacione sudiće, gde su usmrćene sa zagrejanom (na 90°C) FA 4:1, a potom laganom glicerinskom metodom dovedene do čistog glicerina. U ovom medijumu vršeno je trajno preparovanje jedinki.

Merenje jedinki vršeno je na mikroskopu mikrometarskom pločicom, a dužina (L) uz pomoć kamere lucide.

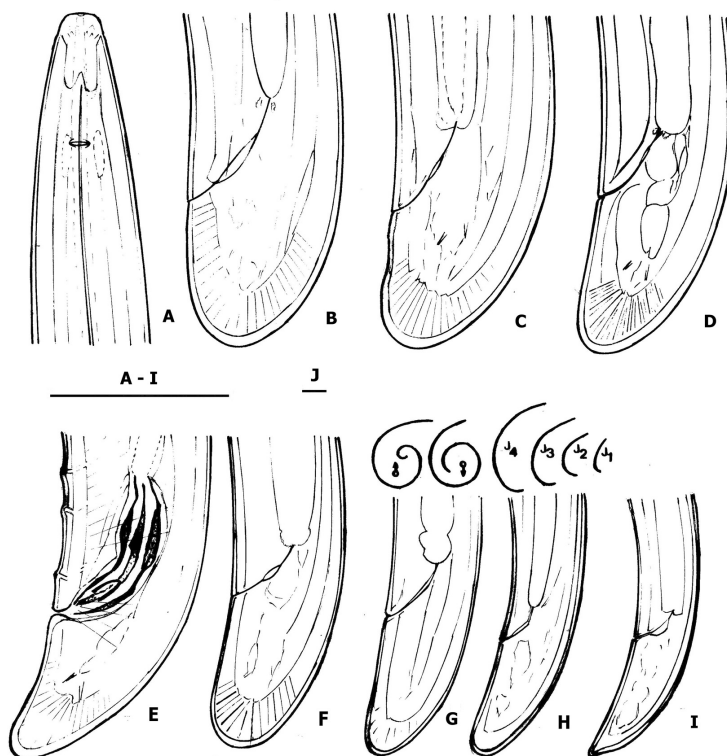
REZULTATI I DISKUSIJA

Opis populacija

Izgled i morfometrijski podaci utvrđenih populacija *P. serbicus* prikazani su na priloženim slikama, tabelama i skater dijagramima.

Ženka

Fiksirane i preparovane zenke iz svih populacija imaju izgled slova C ili su uvijene u jednostruku spiralu (Sl. 1.J.) Dužina tela varira u intervalu od 4,7 mm (Knjaževac) do 8,8 mm (Futog), šlo i nije tako neobičajeno kod longidoridnih nematoda (Tabela 1). Telo je cilindrično, sa najvećom širinom u vulvalnom regionu (oko 50 μm) od koga se postepeno sužava prema glavi (širina 11-15 μm) i prema repu (širina 17-34 μm). Kulikula je tanka (2-4 μm) i sa uzdužnim strijama. Usni region, (glava) bez ulegnuća kutikule, povezan je sa nastavkom tela. Glava je sa čeone strane blago izdignuta, bočne strane se projektuju u diskontinuitetu na taj način što je prednji deo konusno ravan a u nastavku glava je blago zaobljena. Visina glave iznosi 5-6 μm . Amfidi su u osnovi blago simetrično bilobirani i zahvataju oko jedne polovine prostora između usnog otvora i vodice odontostileta. Otvori amfida zahvataju više od jedne polovine korenspondirajuće širine tela. Kod većine ženki odontostilet, odontofora i vodica odontostileta su tipični za ovu taksonomsku grupu nematoda, uz napomenu da su među polno zrelim ženkama, u populaciji *P.serbicus* iz Loznice i Požarevca, utvrđene jedinke koje, uz funkcionalni odontostilet, imaju formiranu, zamenu odontostileta. U populaciji *P.serbicus* iz šumskog rasadnika (Topola) S.G.Boranja iz Loznice kod ženki bez zamene odontostileta (8) i kod onih sa formiranom zamenom odontostileta (5), odontostilet je gotovo jednake dužine (114,4 μm , odnosno 114,8 μm) i identičnog izgleda. Međutim, kod ovih pet ženki u ovoj populaciji u uobičajenom prostoru cevastog dela ezofagusa nalazi se potpuno formirana zamena odontostileta, koja je dugačka prosečno 123.6 μm (Tabela 3), što je u skladu sa dinamikom povećanja dužine odontostileta, koja se odvija kod larvenih oblika (J1-J4), i iznosi 10,1-13,6%. Tako, kod drugog juvenilnog stupnja odontostilet se preko zamene poveća za 16 μm (12.2%) , kod trećeg za 18,7 μm (12 %), a kod četvrtog, za buduća imaga, za 8,6 μm (10,8%). Zamena odontostileta kod polno zrelih ženki duža je od funkcionalnog odontostileta (konačne forme u presvlačenju) za 10.1 μm (10,1%), što govori o usklađenoj progresiji povećanja dužine ovog organa tokom presvlačenja jedinki. Slična situacija je i kod ženki iz populacije iz Požarevca i Bačkog Petrovog Sela, sto govori o identičnosti ovog fenomena kod geografski udaljenih populacija. Time bi se mogao isključiti



Sl. 1 – *Paralongidorus serbicus*: (A) prednji deo tela ženke; (B-D) repni deo tela ženke; (E) mužjak – repni deo tela; (F-I) repni deo tela IV-I razvojnog stupnja; (J) izgled usmrćenih jedinki (razmernik A-I = 50 µm; J = 1 mm).

Fig. 1 – *Paralongidorus serbicus*: (A) female anterior region; (B-D) female posterior region; (E) male posterior region; (F-I) tail of 4th-1st juvenile stage, respectively; (J) habitus of dead specimens (scale bar A-I = 50 µm; J = 1 mm).

eventualno negativni efekat nekog od faktora životne sredine, odnosno pre bi se moglo govoriti o recidivu evolutivnog procesa koji ukazuje na ranije postojanje petog (J5) stadijuma kod ove vrste. Inače kod longidoridnih nematoda poznato je da neke vrste imaju tri razvojna stadijuma (presvlačenja), neke 3-4, a neke četiri presvlačenja (Halbrendt and Brown 1992, Lamberti et al. 1997).

Morfološke karakteristike i morfometrijski podaci za ženke u svim populacijama (Tabele 1 -3 i Slike 1-5) uklapaju se u parametre navedene u opisu *P. serbicus* (Krnjaić et al., 2002). Morfoloska varijabilnost repnog dela tela ženki takođe je veoma prisutna (Slike 1 – 3), što se takođe odnosi i na juvenilne razvojne stadijume, što je takođe utvrđeno i u tipskoj populaciji.

Tabela 1 –Morfometrijski podaci za *Paralongidorus serbicus* u tipskom i drugim (13) loklaitetima u Srbiji**Table 1** – Morphometrics of *Paralongidorus serbicus* in type and other (13) localities in Serbia

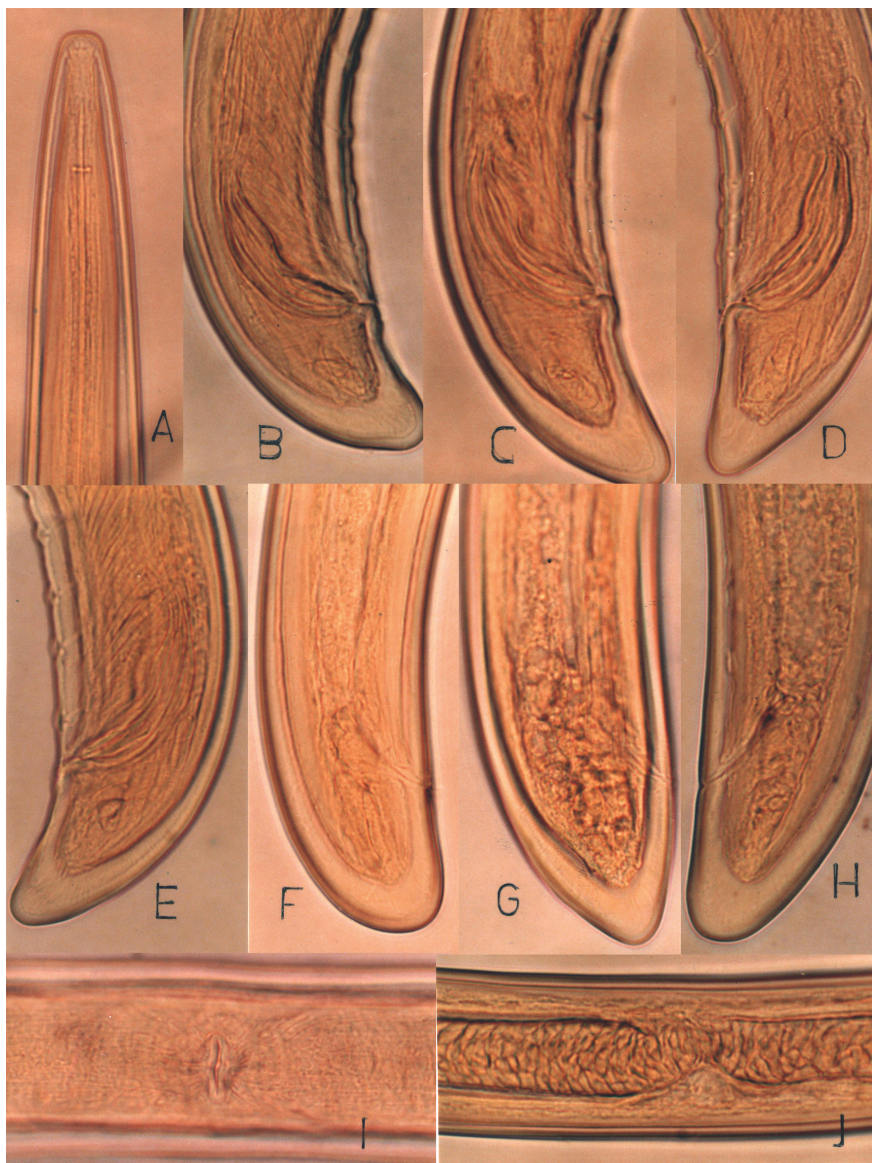
n	Knjaževac 8 ♀	Bela Crkva 4 ♀	Aleksinac 3 ♀	Niš 3 ♀	Zaječar 2 ♀
L (mm)	5,7±0,58 4,7-6,6	5,8±0,24 5,5-6,0	6,2±0,45 5,7-6,6	6,4±0,21 6,2-6,6	5,9±0,49 5,5-6,2
a	116,4±7,73 103-129	115,0±7,02 110-122	122,3±3,21 120-126	117,0±12,49 103-127	102,0±4,24 99-105
b	12,6±1,85 10-16	15,0±1,41 13-16	15,0±0,00 15-15	15,0±2,65 13-18	12,0±4,24 9-15
c	146,4±14,10 124-169	150,5±6,24 142-157	157,7±38,07 121-197	165,3±14,22 149-175	132,5±3,54 130-135
c'	1,0±0,07 0,9-1,1	1,0±0,08 0,9-1,1	1,0±0,157 0,9-1,2	1,0±0,00 1-1	1,0±0,00 1-1
V%	49,8±1,75 47-52	49,5±1,29 48-51	51,0±0,0 51-51	51±1,73 50-53	50±1,41 49-51
Odontostyle (µm)	109,6±3,96 102-115	114,5±2,38 113-118	117,3±1,15 116-118	112,3±6,03 106-118	111,5±4,95 108-115
Odontophore (µm)	55,1±3,87 52-61	56,3±3,77 51-59	53,7±5,03 49-59	67,0±3,61 64-71	51,5±3,54 49-54
Replacement of odontostyle (µm)	-	-	-	-	-
Oral aperture to guide ring (µm)	35,6±1,77 33-38	34,3±0,96 33-35	34,0±3,61 33-38	35,3±1,15 34-36	34,5±4,95 31-38
Tail (µm)	39,0±1,77 36-41	38,5±3,00 36-42	40,3±6,51 34-47	38,7±3,06 36-42	44,5± 44-48
J (hyaline portion of tail) (µm)	13,1±1,89 11-17	11,8±0,96 11-13	13,7±0,58 13-14	12,7±1,53 11-14	12,50,71 12-13
Body diam. at lip region (µm)	12,4±1,04 11-14	11,8±0,96 11-13	12,3±0,58 12-13	13,7±0,58 13-14	14,0±1,41 13-15
Body diam. at guide ring (µm)	23,0±2,00 20-26	24,3±2,87 21-28	21,0±3,00 18-24	25,3±1,53 24	25,0±1,41 27
Body diam. at base of oesoph. (µm)	42,4±1,60 41-45	37,8±5,12 31-43	45,0±2,00 43-47	44,0±4,00 40-48	49,0±1,41 48-50
Body diam. at mid-body or vulva (µm)	49,1±3,04 43-51	50,5±2,65 48-54	53,3±2,31 52-56	54,7±6,03 49-61	57,5±6,36 53-62
Body diam. at anus (µm)	38,9±0,83 38-40	37,8±2,75 35-41	36,7±3,51 33-40	40,0±2,00 38-42	44,5±4,95 41-48
Body diam. at beginning of J (µm)	36,4±2,67 23-31	24,5±3,00 21-27	25,3±2,52 23-28	28,0±0,00 28-28	25,5±0,71 25-26

Tabela 1 – nastavak
Table 1 – continuation

n	Leskovac 1 ♀	Jagodina 1 ♀	Medveda 2 ♀	Jajinci 3 ♀	Beograd 20 ♀
L (mm)	5,8	6,1	6,6±0,00 6,6	6,4±0,15 6,3-6,6	6,7±0,65 5,3-7,8
a	108	119	116,5±23,33 100-133	122,7±5,86 116-127	117,9±12,21 96-148
b	17	13	16,5±3,54 14-19	12,3±1,53 11-14	15,1±2,53 10-21
c	177	196	196,5±13,44 160-179	172,7±10,50 162-183	167,5±20,42 120-200
c'	0,9	1	0,95±0,07 0,9-1	0,9±0,06 0,9-1	1,0±0,09 0,8-1,1
V%	50	51	49,0±2,83 47-51	50,0±1,00 49-51	49,2±1,50 47-54
Odontostyle (µm)	107	123	110,5±0,71 110-11	111,7±1,53 110-113	111,6±6,06 98-121
Odontophore (µm)	61	69	59,0±4,24 56-62	58,0±3,61 54-61	56,0±4,21 48-62
Replacement of odontostyle (µm)	-	-	-	-	-
Oral aperture to guide ring (µm)	34	37	34,5±0,71 34-35	35,0±1,00 34-36	35,4±1,42 34-38
Tail (µm)	33	31	40,0±1,41 39-40	37,3±1,53 36-39	40,1±2,77 34-44
J (hyaline portion of tail) (µm)	11	10	12,5±0,71 12-13	11,7±1,15 11-13	13,0±3,03 10-20
Body diam. at lip region (µm)	13	14	12,0±1,41 11-13	14,0±1,00 13-15	13,2±0,62 12-15
Body diam. at guide ring (µm)	25	23	25,5±3,54 23-28	25,3±0,58 25-26	25,7±1,22 24-30
Body diam. at base of oesoph. (µm)	43	42	48,0±9,90 41-55	54,3±4,04 43-50	46,4±4,43 41-59
Body diam. at mid-body or vulva (µm)	54	52	58,0±11,31 50-66	52,3±1,53 51-54	56,9±5,8 51-75
Body diam. at anus (µm)	36	39	42,0±4,24 39-45	40,0±1,00 39,41	41,8±4,14 37-57
Body diam. at beginning of J (µm)	30	27	21,0±5,66 17-25	26,3±5,69 20-31	28,5±4,36 23-49

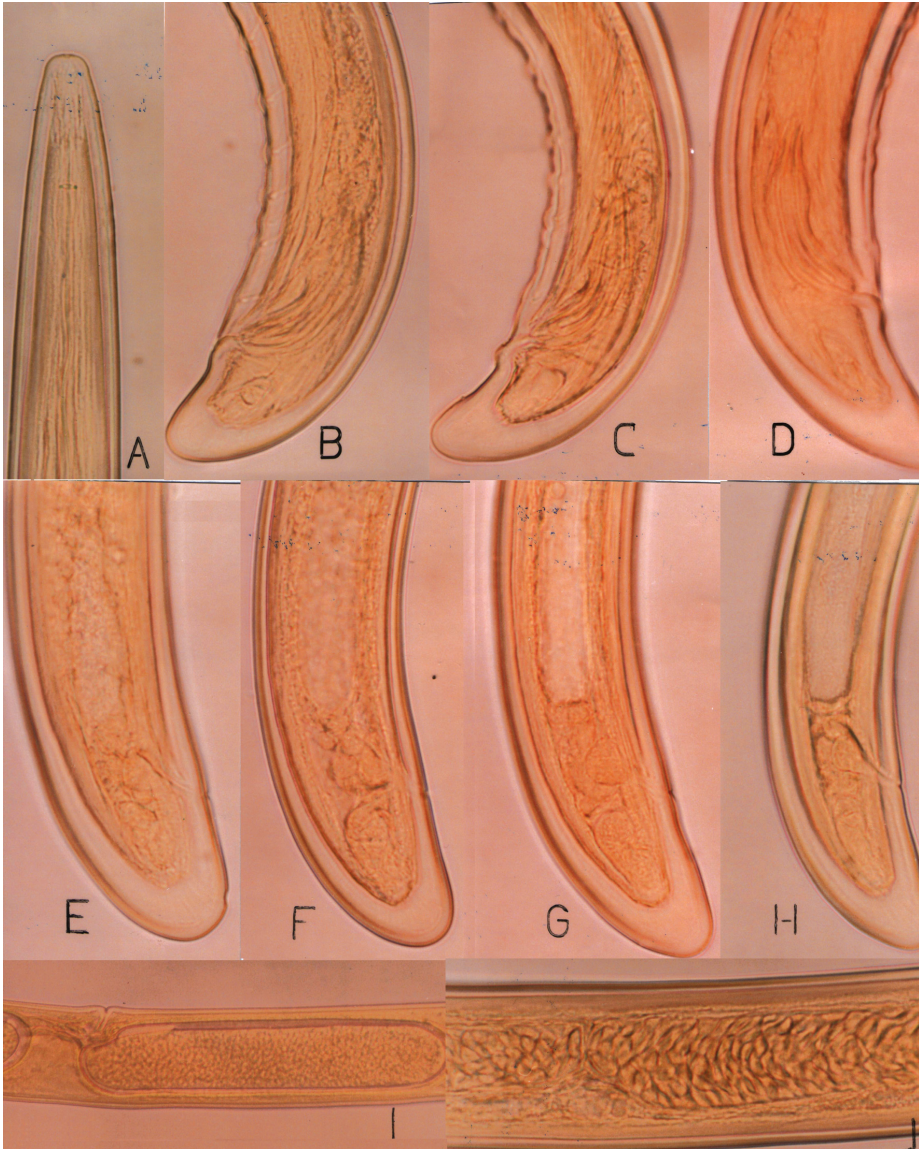
Tabela 1 – nastavak
Table 1 – continuation

n	Požarevac 18 ♀	Loznica 8 ♀	Futog 5 ♀	3 ♂	B.P. Selo 1 ♀
L (mm)	6,3±0,87 5-8	7,3±0,75 6,4-8,6	7,1±1,50 5,6-8,8	5,5±1,2 4,4-6,7	7,3
a	127,5±13,78 106-149	154,2±11,77 125-159	151,2±28,60 132-199	142,7±14,60 129-158	169
b	12,7±1,44 11-16	14,8±1,75 13-18	14,4±2,30 12-18	12,7±2,10 11-13	15
c	152,6±27,68 112-212	181,6±25,21 156-221	189,4±44,2 149-251	130,3±17,5 113-148	183
c'	1,1±0,12 0,9-1,3	1,1±0,12 0,95-1,3	1,0±0,10 0,9-1,1	1,2±0,10 1,2-1,3	0,8
V%	51,2±3,05 46-58	50,5±1,6 49-53	51,0±2,70 48-53	-	52
Odontostyle (µm)	116,2±3,57 111-122	114,4±4,41 108-118	116,8±3,90 110-120	112,3±4,50 108-117	115
Odontophore (µm)	61,7±4,54 47-68	68,8±3,2 64-74	65,8±6,20 58,75	57,0±5,60 52-63	48
Replacement of odontostyle (µm)	-	-	-	117 ²	-
Oral aperture to guide ring (µm)	34,6±1,82 31-36	34,3±2,38 31-39	35,4±1,50 33-37	33,7±2,50 31-36	40
Tail (µm)	40,7±2,51 35-46	40,0±3,02 36-41	37,6±1,50 35-39	42,0±3,00 39-45	40
J (hyaline portion of tail) (µm)	14,2±1,4 13-17	15,0±1,31 13-17	14,6±2,60 12-19	12,7±4,20 8-16	
Body diam. at lip region (µm)	12,4±0,51 12-13	12,6±0,52 12-13	12,8±0,40 12-13	12,7±0,09 12-13	
Body diam. at guide ring (µm)	23,0±1,7 20-26	22,6±1,51 21-25	22,6±2,30 21-26	21,7±1,20 21-23	15
Body diam. at base of oesoph. (µm)	41,4±2,79 36-47	41,3±1,58 39-43	41,4±4,00 38-48	36,0±4,48 32-40	14
Body diam. at mid- body or vulva (µm)	47,9±3,66 41-53	50,4±2,72 46-54	46,6±5,50 42-54	38,3±4,00 34-42	26
Body diam. at anus (µm)	37,5±3,04 33-42	35,8±1,75 33-38	37,8±2,90 33-40	34,0±1,00 33-35	48
Body diam. at begi- ning of J (µm)	25,9±3,99 17-34	27,5±1,77 26-30	27,0±3,80 23-33	19,0±2,60 16-20	32



Sl. 2 – Mikrofotografija *Paralongidorus serbicus* iz okoline Požarevca: (A) prednji deo tela mužjaka; (B-E) repni deo tela mužjaka; (F-H) repni deo tela ženke; (I) vulva; (J) semenici mužjaka.

Fig. 2 – Photomicrographs of *Paralongidorus serbicus* from Požarevac vicinity: (A) male anterior region; (B-E) male posterior region; (F-H) female posterior region; (I) vulva; (J) testes.



Sl. 3 – Mikrofotografija *Paralongidorus serbicus* iz okoline Loznice: (A) prednji deo tela mužjaka; (B-D) zadnji deo tela mužjaka; (E-H) zadnji deo tela ženki; (I) vulvalni region sa jajima u oba uterusa; (J) semenici mužjaka.

Fig. 3 – Photomicrographs of *Paralongidorus serbicus* from Loznica vicinity: (A) male anterior region; (B-D) male posterior region; (E-H) female posterior region; (I) vulval region with eggs in utera; (J) testes.

Mužjaci

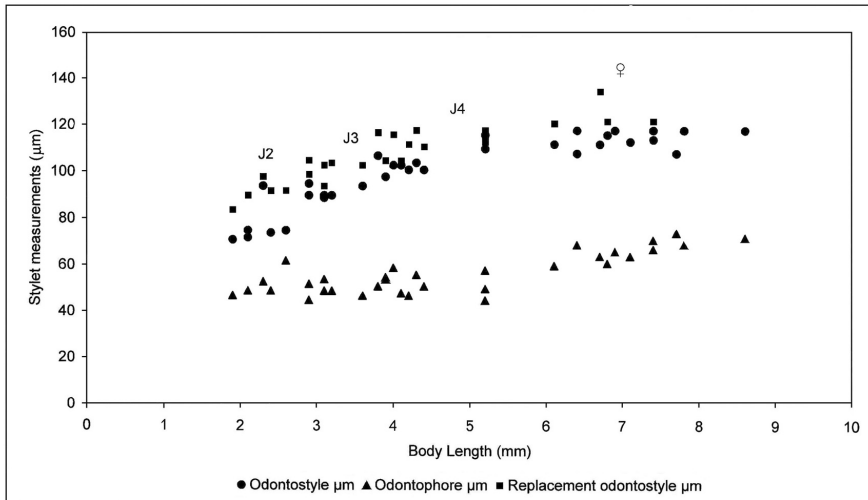
U topčiderskoj populaciji *P. serbicus*, na kojoj se zasniva opis ove vrste, prisustvo mužjaka nije utvrđeno. Od trinaest populacija *P. serbicus*, koje su navedene u ovom radu, u tri su utvrđeni i mužjaci, što predstavlja prvi nalaz mužjaka kod ove vrste. Morfoloske karakteristike i morfometrijski podaci mužjaka prikazani su na Sl. 1 A, E i J, Sl. 2 A-E i J, Sl.3 A-D. i J i Tabeli 1 (Futog) i Tabeli 2 i 3, na osnovu kojih se može konstatovati da su mužjaci slični ženkama, osim u repnom delu tela, koji je kod mužjaka ventralno povijeni i sa jasno izraženom kopulacionom armaturom (Sl. 1 E, Sl. 2 B-F i Sl. 3 B-D) i serijom suplemenarnih organa. Morfološka varijabilnost repnog dela tela mužjaka je takođe veoma česta. Reproductivni organi kod mužjaka su dobro razvijeni i funkcionalni. Testisi su ispunjeni spermom (Sl. 2 J i 3 J). Spikul je sklerotizovan, ventralno povijen i sa lateralnom vodicom u obliku sočiva. Dva para adanalnih suplemenarnih organa nastavljaju se na seriju od 8-14 ventromedijalnih. Rep je, kao i kod ženki, konusnog oblika sa široko zaobljenim vrhom (Sl. 1 E, Sl. 2 B-E i Sl. 3 B-D). Na lateralnim stranama repa nalaze se po dve lateralne pore.

Od tri jedinke mužjaka koje su utvrđene u populaciji *P. serbicus* u lokalitetu Futog (Tabela 1) kod jednog primerka, uz funkcionalni odntostilet. unrdeno je prisustvo zamene odntostileta, što znači da se ovaj fenomen javlja kod oba pola ove vrste.

Alotipski mužjak nalazi se na preparatu Pr.251196/3 i potiče iz populacije iz okoline Požarevca. Njegove karakteristike su: L=6.5 mm; a=l64; b=13; c=l58; c'=1.1; Ldst=113 µm; L. odf.=52 µm; L usni otvor-vodica= 35 µm; L rep=41 µm; LJ=17 µm; širina us. dela tela=13 µm; širina tela kod vodice =23 µm; širina tela u osnovi ezof.=37 µm; maks. šir.tela=42 µm; šir. tela kod anusa=38 µm; širina tela kod J=24 µm; L spikul=49µm; No supl.1 1+1; L bazalni bulb=114 µm; šir.baz. bulb.= 15 µm; L pred.sem.=451 µm; L zad.sem.=402 µm; spermatozoidi ovalni, dim. 3,3 x 2,5 µm.

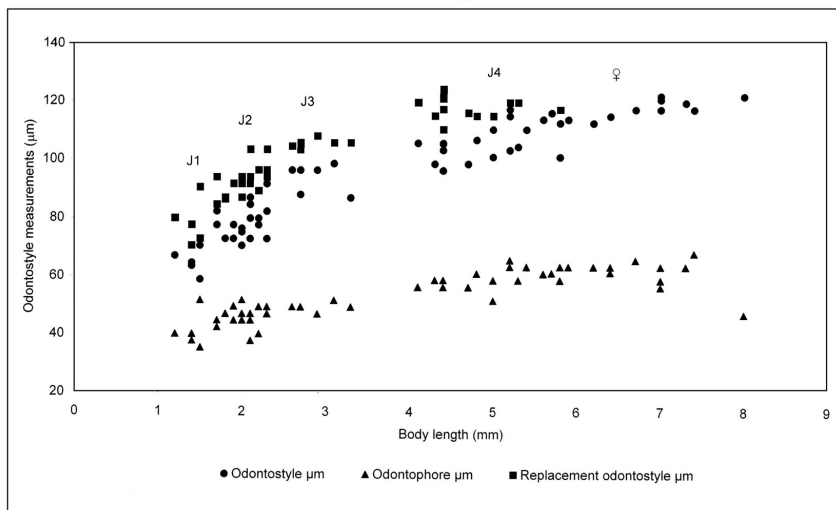
Larve

Na osnovu morfometrijskih podataka i skater dijagrama (slika 4 i 5) može se konstatovati da ova vrsta ima četiri razvojna stadijuma. Juvenilni oblici, koji su slični odraslim jedinkama, osim što su silniji (tabele 2. i 3) i imaju manje konusan repni deo tela. (Slika 1. F-I). Juvenilni oblici prvog razvojnog stadijuma nisu utvrđeni u svim ispitivanin poulacijama iz razloga što su, kao vrlo sitni, izgubljeni tokom dekantacija i ceđenja kroz sita od 50 µm. Telo larvenih oblika je igličasto i povijeno u obliku otvorenog slova C (Slika I.J).



Sl. 4 – Skater dijagram dužine tela i odontostileta *P.serbicus* iz Loznice

Fig. 4 – Scatter diagram plotting body and odontostyles lenght of juveniles and females of *P.serbicus* from Loznica



Sl. 5 – Skater dijagram dužine tela i odontostileta *P.serbicus* iz Požarevca

Fig. 5 – Scatter diagram separating females and juveniles of *P.serbicus* from Požarevac

Tabela 2 –Morfometrijski podaci za populaciju *Paralongidorus serbicus* iz okoline Požarevca

Table 2 – Morphometrics of *Paralongidorus serbicus* from Pozarevac vicinity

n	18 x ♀	9 x ♂	4 x J1	19 x J2	7 x J3	13 x J4
L mm	6,3 ± 0,87 5,0-8	6,4 ± 0,31 6,6-2008	1,4 ± 0,13 1,2-1,5	2 ± 0,21 1,5-2,3	2,8 ± 0,33 2,3-3,3	4,7 ± 0,49 4,1-5,8
a	127,5 ± 13,78 106-149	142,5 ± 10,98 129-161	59 ± 3,85 54-68	72,8 ± 6,50 54-81	90,5 ± 5,66 81-96	113,9 ± 11,04 96-138
b	12,7 ± 1,44 11,0-16	13,6 ± 1,36 12,0-17	5,6 ± 0,63 5,0-6	6,8 ± 1,12 5,0-9	7,8 ± 1,66 6,0-10	11,1 ± 1,29 9,0-13
c	152,6 ± 27,68 112-212	156 ± 10,57 141-175	37,2 ± 3,35 33-41	52,4 ± 4,06 44-61	68,1 ± 6,27 61-79	113,6 ± 9,36 104-134
c'	1,1 ± 0,12 0,9-1,3	1,1 ± 0,12 0,9-1,3	2,2 ± 0,22 2,1-2,5	2 ± 0,22 1,7-2,5	1,7 ± 0,08 1,6-1,8	1,3 ± 0,10 1,1-1,4
V%	51,2 ± 3,05 46-58					
Odontostyle	116,2 ± 3,57 111-122	113,4 ± 4,89 103-120	63,5 ± 3,44 59-67	76,9 ± 4,76 71-87	93,5 ± 4,60 87-99	102,9 ± 3,35 96-107
Odontophore	61,7 ± 4,54 47-68	61,4 ± 4,33 52-66	38,2 ± 2,25 35-40	46 ± 3,62 38-52	49,4 ± 1,36 47-52	58 ± 3,24 52-66
Replacement odontostyle			75,2 ± 4,29 71-80	92 ± 4,29 85-103	105,3 ± 1,65 103-108	118,1 ± 3,70 111-125
Oral aperture to guide ring	34,6 ± 1,82 31-36	36,1 ± 1,38 34-38	17,1 ± 1,49 15-19	21,7 ± 1,31 19-25	25,4 ± 0,94 24-26	31,8 ± 1,20 29-33
Tail	40,7 ± 2,51 35-46	41,6 ± 2,08 38-45	36,1 ± 1,12 35-38	38,3 ± 2,53 33-44	41,1 ± 2,36 38-45	41,6 ± 2,72 39-47
J (hyaline portion of tail)	14,2 ± 1,40 13-17	16,2 ± 1,92 14-19	8,8 ± 0,69 8,0-9	9,3 ± 1,11 7,0-12	11,3 ± 1,34 9,0-13	12,2 ± 1,30 11,0-14
Body diam. at lip region	12,4 ± 0,51 12,0-13	12,3 ± 0,61 11,0-13	7,9 ± 0,55 7,0-8	8,3 ± 0,78 7,0-9	9 ± 0,00 9,0-9	10,8 ± 0,67 9,0-12
Body diam. at guide ring	23 ± 1,70 20-26	23,3 ± 1,60 20-26	12,3 ± 0,70 12,0-13	15,2 ± 1,09 14-17	17,3 ± 1,29 17-20	20,6 ± 1,24 19-24
Body diam. at base of oesoph.	41,4 ± 2,79 36-47	40,2 ± 2,46 37-45	20,4 ± 2,59 17-22	25,5 ± 2,03 21-28	28,6 ± 1,77 26-31	36,6 ± 3,28 29-42
Body diam. at mid-body or vulva	47,9 ± 3,66 41-53	45,6 ± 3,54 42-52	22,9 ± 2,97 19-26	27,6 ± 2,17 22-31	30,9 ± 2,61 28-35	42,1 ± 3,42 35-47
Body diam. at anus	37,5 ± 3,04 33-42	36,6 ± 3,64 28-40	16,5 ± 1,92 14-19	19,6 ± 2,21 15-24	23,7 ± 1,73 21-26	33,6 ± 2,69 29-38
Body diam. at beginning of J	25,9 ± 3,99 17-34	21,5 ± 1,96 19-24	7,9 ± 0,55 7,0-8	12,1 ± 2,08 9,0-17	16,8 ± 1,10 15-19	21,7 ± 3,35 14-26
Spicules		51,4 ± 1,50 49-54				
No supplements		9-14 ± 1				

Tabela 3 – Morfometrijski podaci za populaciju *Paralongidorus serbicus* iz okoline Loznice**Table 3** – Morphometrics of *Paralongidorus serbicus* from Loznica vicinity

n	8 ♀	5 ♀ ¹	10 ♂	5 J2	9 J3	8 J4
L (mm)	7,3±0,75 6,4-8,6	6,4±0,83 5,2-7,4	7,1±0,71 6,1-8,5	2,2±0,28 1,9-2,6	3,2±0,52 2,3-3,9	4,4±0,53 3,8-5,2
a	145±11,77 125-159	131±10,98 120-146	146,9±7,71 133-158	77,4±5,03 70-83	96,0±1,58 82-122	115,1±10,71 93-127
b	14,8±1,75 13-18	13,2±2,39 10-16	14,9±1,29 12-17	7,8±1,92 6-11	8,1±1,17 6-10	9,5±0,76 9-11
c	181,6±25,21 156-221	174±34,21 126-206	180,2±12,98 153-197	58,6±2,97 54-62	79,4±14,10 61-105	111,6±13,48 87-133
c'	1,1±0,12 0,95-1,3	1,1±0,09 1,1-2,002	1,13±0,13 0,9-1,3	1,9±0,12 1,8-2,1	1,6±0,26 1,2-2,002	1,2±0,07 1,1-1,3
V%	50,511,60 49-53	50,611,34 49-52				
Odontostyle (µm)	114,4±4,41 108-118	114,8±2,68 112-118	115,8±3,74 112-123	73,4±1,82 71-75	93,1±3,52 89-98	104,9±3,68 101-110
Odontophore (µm)	68,8±3,20 64-74	62,8±5,07 58-71	66,8±5,47 59-72	51,216,10 47-62	50,9±3,52 45-55	50,9±4,64 45-59
Replacement odontostyle (µm)		123,6±6,58 118-135		89,6±3,29 84-92	101,8±3,90 94-105	113,5±4,24 105-118
Oral aperture to guide ring (µm)	34,3±2,38 31-39	34,8±2,95 32-38	35,1±2,02 33-38	22,2±1,10 21-23	27,2±1,72 25-30	31,4±2,39 27-35
Tail (µm)	40±3,02 36-41	37,4±3,05 33-41	39,3±4,47 31-46	38±4,24 33-44	41,4±4,93 36-49	39,3±5,37 33-47
J (hyaline portion of tail) (µm)	15,0±1,31 13-17	12,6±0,89 11-13	16±2,49 13-20	7,2±0,84 6-8	10,6±0,53 10-11	12,6±2,83 10-19
Body diam. at lip region (µm)	12,6±0,52 12-13	12,4±0,89 11-13	12,6±0,52 12-13	8,2±1,10 7-9	9,2±0,83 8-10	10±0,76 9-11
Body diam. at guide ring (µm)	22,6±1,51 21-25	23,4±2,61 20-26	23,3±1,49 21-25	14,0±1,00 13-15	17,8±2,17 15-21	20,6±1,77 18-23
Body diam. at base of oesoph. (µm)	41,3±1,58 39-43	40,8±0,84 40-42	40,2±3,01 36-45	25,4±3,21 21-30	29,6±3,97 21-33	35±2,88 32-41
Body diam. at mid-body or vulva (µm)	50,4±2,72 46-54	48,6±5,98 43-56	48±3,06 43-54	28,8±3,70 23-33	33,3±2,83 28-37	39,5±6,93 35-56
Body diam. at anus (µm)	35,8±1,75 33-38	35±2,65 31-38	4,7±1,42 33-37	20,0±1,22 18-21	26,1±2,76 22-31	32,6±3,25 28-39
Body diam. at beginning of J (µm)	27,5±1,77 26-30	25,6±2,88 21-28	23,9±1,85 21-26	11,6±1,34 10-13	18,2±2,05 15-21	22,5±2,38 21-26
Spicules (µm)			51,9±5,2 44-54			
No supplements			10-13			

¹ sa zamenom odontostileta – with replacement of odontostyle

U skladu sa nalazom i opisom mužjaka politomni ključ Escuer and Arias (1997) za određivanje ove vrste u rodu *Paralongidorus* izgleda: A 3, B 1, C 1, D 2, E1/2, F 2/3/4/5, G 3/4, H 1/2, I 2/3, J 2/3. K 2, L 2/3, M 2/3, N 1, O 1/2.

Uporednom analizom morfometrijskih podataka tipske populacije iz Topčidera sa podacima za populacije *P.serbicus* iz Požarevca i Loznice (tab. 2 i 3.), koje su detaljno obrađene, može se konstatovati da su ženke iz lozničke populacije najduže 7,3 mm (6,4-8,6 mm) u odnosu na 6,7 mm (5,3-7, 8 mm) u tipskoj populaciji i 6,3 mm (5,0 – 8,0 mm) u požarevačkoj populaciji. To se takođe odnosi i na dužinu tela ženki u ostalim populacijama, čija dužina tela je manja u odnosu na ženke iz lozničke populacije (tabela 1). Ženke iz lozničke populacije su relativno tanje ($a=145$) od ženki iz tipske populacije ($a=118$) i požarevačke populacije ($a=128$). Ostali morfometrijski parametri u svih 14 populacija nalaze se u granicama intraspecijske varijabilnosti (Tabela 1). To se takođe odnosi i na varijabilnost morfometrijskih podataka juvenilnih oblika lozničke, požarevačke i ostalih utvrđenih populacija na prostoru Srbije. Podudarnost se takođe odnosi i na skater dijagrame opisanih populacija u odnosu na tipsku populaciju. (slika 4. i 5).

Rasprostranjenost

Tipska populacija *P.serbicus* potiče iz Topčiderskog parka (Krnjaic et al.2002). Analizom morfometrijskih podataka i taksonomski neobrađenih longidoridnih vrsta utvrdili smo da su primerci, *P.serbicus* izdvojeni još 1972. god. iz uzoraka zemljišta iz matičnjaka vinove loze (podloge) PIK "Južni Banat" iz Bele Crkve. Kasnije (1992 i 1997 god.) ova vrsta je bila utvrđena u uzorcima zemljišta iz zone korenovog sistema vinove loze iz "Plantaže" Leskovac iz Donje Stopanje. Na parceli "Al-prometa" iz Aleksinca na kojoj su 1993 god. gajene gladiole takođe je utvrđeno prisustvo *P.serbicus*. U uzorcima zemljišta iz šumskih rasadnika iz Loznice i Požarevca gde je masovnost ove vrste bila izrazita uticalo je da se ovom materijalu posveti veća pažnja. Zato je kao bliži i praktičniji poslužio lokalitet u neposrednoj blizini Instituta, koji opisan kao tipsko stanište.

Pomenuti lokalitet u Loznici nalazi se desetak kilometra pre Loznice (iz pravca Šabac) označen kao Azemov prud gde je ŠG Boranja iz Loznice 1994. g. i ponovo 1997. g. bio zasnovan rasadnik topole. Isto tako ova vrsta bila je utvrđena 1996. g. u rasadniku topole Šumskog gazdinstva iz Požarevca u mestu Ostrvo. U 1997. g. ponovljeno je uzorkovanje u ovom lokalitetu.

Zona korenovog sistema topole bila je stanište ove vrste i u Šumskom rasadniku u Bačkom Petrovom Selu (1998 g.)– Iste godine *P.serbicum* izdvojen je iz uzorka zemljišta koji je uzet iz zone korenovog sistema vrbe u Futogu na parceli ZZ "Podunavlje" (kod česme).

Iz uzoraka zemljišta koji su uzeti iz zone korenovog sistema vinove loze (matični zasadi) i sa površina na kojima se proizvode lozni kalemovi, takođe su često izdvajani primerci različitih uzrasnih stadijuma *P.serbicus*. U matičnjaku vinove loze u okolini Jagodine još 1995. godine utvrđeno je prisustvo ove vrste. Potom sledi niz nalaza ove vrste u području Velike Drenove i Trstenika. To su KO Selište Ševari kp 80805, Moravište kp 8724. Štulac kp 57/1, Jasika kp 2964, Stragari kp 2835 i Medveđa kp 7824 i dr.

U prilog pretpostavci da se radi o vrsti sa širokim arealom rasprostranjenosti idu nalazi u Južnom Pomoravlju, u okolini Vranja (Vrtoroš-Butoš kp3583, rasadnik ruža u okolini Kos. Kamenice, rasadnik u Gornjoj Vržani kp.4406-4409, ruže u Pasi Poljani, semenskom krompiru na Vlasini (parcela Ovčarske farme), loznim kalemovima Centra za vinogradarstvo u Nišu. U istočnoj Srbiji ova vrsta je utvrđena u voćnom rasadniku PIK "Džervin" iz Knjaževca (zajedno sa *Longidorus euonimis*), voćnom rasadniku u Negotinu i okolini Golupca (Trigrade) na parcelama na kojima je gajena šargarepa (zajedno sa *Meloidogyne incognita*). Ovi podaci ukazuju na široku rasprostranjenost *P.serbicus* u Srbiji, što će biti predmet daljih istraživanja.

LITERATURA

- Escuer M. and Arias M. (1997): *Paralongidorus iberis* sp.n. and *P.monegreensis* sp.n. from Spain with polytomous key to the species of the genus *Paralongidorus*. Siddiqui, Hooper and Khan. 1963 (Nematoda: *Longidoridae*). Fund, and Appl. Nem. 20:135-148.
- Halbrendt. J.M. and Brown. D.J.F. (1992): Morphometric evidence for three juvenile stages in some species of *Xiphinema americanum* sensu lato. Journ. Nem. 24:505-309.
- Krnjajić, Đ, Lamberti, F., Krnjajić Smiljka, Agostinelli, A., Radicci, V. (2000): *Longidoridae* (Nematoda) occurring in Topchider park of Belgrade, Serbia, with description of *Paralongidorus serbicus* sp.n. Nematol.Medit., 30:185-200.
- Krnjajić, D., Krnjajić, Smiljka (1987): Fitonematologija. Nolit, Beograd, 434 pp.
- Lamberti, F., Ivoev,T., Choleva, B., Brown, D.J.F., Agostinelli, A. and Radicci, V. (1997): Morphometric variation and juvenile stages of some *Longidorid* nematodes from Bulgaria with comments on the number of juvenile stages of *Longidorus africanus*, *L.closefongatus* and *Xiphinema santos*. Nematol Medit. 25: 213-237.
- Oostenbrink, M.(1960): Estimating nematode population by some selected methods. In Nematology Univ.N.Car.Press.
- Spears, J.F. (1968): Golden nematode. Agr. Handbook U.S.Dep. Agr.353.81 pp.

(Primljeno: 09.07.2008.)

(Prihvaćeno: 26.02.2009.)

**NEW RECORDS OF *PARALONGIDORUS SERBICUS*,
KRNJAIĆ ET AL. (NEMATODA: LONGIDORIDAE) FROM SERBIA,
WITH DESCRIPTION OF THE MALE
AND ADULTS WITH ODONTOSTYLE REPLACEMENT**

[SMILJKA KRNJAIĆ]¹, ĐORĐE KRNJAIĆ²

¹ Faculty of Agriculture, Belgrade, Serbia

² Institute for Plant Protection and Environment, Belgrade, Serbia

SUMMARY

Females and juveniles of *Paralongidorus serbicus* Krnjaić, Lamberti, Krnjaić, S., Agosinelli A. and Radicci 2002, are found in Serbia in thirteen new localities. In three new localities of *P. serbicus*, et Loznica, Pozarevac and Futog the males of this species are founded. In population collected et Loznica and Futog besides the female with functional odontostyle has been present odontostyle replacement. In collected specimens et Futog has been one male with odontostyle replacement too.

Morphometrics for the male. L=6,5 mm; a=164; b=13; c=158; c'=1,1; L odst=113 µm; L.odf.=52 µm; L oral ap.to g.r.=35; Ltail=41 µm; L J (hyaline portion)=17 µm; b.d. (body diam.) at lip reg. =13 µm; b.d.at guide ring =23 µm; b.d. at base of oesoph.=37 µm; b.d. at mid body = 42 µm; b.d. at anus =38 µm; b.d. et beg.of J=24 µm; spicules =49 µm; numb.of supl.=1 l + l; Length of basal bulb of oesophagus=114 µm; width of basal bulb =15 µm; Length of anterior semenic = 45 µm; Length of posterior semenic =402 µm; spermatosoides dimensions = 3,3 x 2,5 µm.

The code in the key of Escuer and Arias (1997) is: A 3, B 1, C 1, D 2, F. 1/2, F 2/3/4/5, G 3/4, II 1/2.1 2/3, J 2/3, K 2, L 2/3, M 2/3, N 1,0 1/2.

Key words: *Paralongidorus serbicus*, new records, morphometrics, description of male and adults with odontostyle replacement.

(Received: 09.07.2008.)

(Accepted: 26.02.2009.)

Zaštita bilja
vol. 57 (1-4), No 255-258, 115-120, 2006, Beograd

UDK 635.64; 632.934.1
Prethodno saopštenje

EFIKASNOST PREPARATA *SERENADE*[®] (*BACILLUS SUBTILIS*) U SUZBIJANJU *XANTHOMONAS* *CAMPESTRIS* PV. *VESICATORIA* PATOGENA PAPRIKE

MLADEN ĐORĐEVIĆ, BOGOLJUB ZEČEVIĆ, MILAN DAMJANOVIĆ
Institut za povrtarstvo, Smederevska Palanka
e-mail: mladendj@cvcsp.co.yu

U cilju zaštite paprike od prouzrokovaca bakterijske pegavosti lišća paprike (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*), tokom 2007. godine postavljen je ogled na polju Instituta u Smederevskoj Palanci sa ciljem da se ispita efikasnost biološkog preparata Serenade WP (*Bacillus subtilis*) u odnosu na preparate na bazi bakra kao standard. Ispitivanja su obavljena na sorti Palanačka kapija. Za inokulaciju korišćen je soj bakterije KFB 4 (10^{-8} cfu/mol). Preparati su primenjeni u sledećim koncentracijama: Serenade WP(0,3%) i (0,4%), Blauvit (0,5%), Bordo-blue (0,5%) i Bakrocid S-50 (0,5%). Ogled je postavljen u tri ponavljanja sa sledećim tretmanima: (a) biljke tretirane preparatima, a nakon 2 sata inokulisane suspenzijom bakterija; (b) biljke inokulisane suspenzijom bakterija a posle 4 sata tretirane preparatima; (c) biljke tretirane samo preparatima; (d) biljke tretirane samo suspenzijom bakterija; (e) ne inokulisane i netretirane biljke.

Inokulacija je vršena u fenofazi 8-10 listova ručnom prskalicom. Konstantovanje prvih simptoma izvršeno je 7 dana nakon inokulacije. Ocena efikasnosti preparata 10 dana posle inokulacije, uzimanjem 100 listova po slučajnom izboru. Indeks oboljenja ocenjen je po Townsend-Heuberger-u.

Na osnovu dobijenih rezultata zaključujemo da je preparat Serenade pokazao visok stepen efikasnosti u obe koncentracije, u odnosu na standardne bakarne preparate, kako pre (70.5%, odnosno 78.6%) tako i nakon inokulacije (75.2%, odnosno 82.5%).

Ključne reči: bakarni preparati, Serenade (*Bacillus subtilis*), *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*.

UVOD

Paprika (*Capsicum annuum* L.) je jedna od najvažnijih i najzastupljenijih kultura u domaćoj proizvodnji (Zečević, 2001). Budući na važnost ove kulture, velika pažnja se poklanja njenoj zaštiti od raznih patogena, prouzrokovaca bolesti. Može se slobodno reći da je jedan od ekonomski najznačajnijih patogena paprike prouzrokovatelj bakterijske pegavosti lišća paprike *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Arsenijević, 1980; 1988; 1992; 1997, Bouzar *et al.*, 1994; Balaz, 1994; Stall, 1993). Opšte je poznato da ovaj patogen može da prouzrokuje ogromne štete u proizvodnji paprike, što je praksa, nebrojeno puta i pokazala.

Upravo iz tog razloga zaštiti paprike posvećena je velika pažnja, iz koje je proistekao priličan broj preparata na bazi bakra koji se koriste za suzbijanje bakterijskih patogena (Azaizeh et Bashan, 1984).

Primenom ovih sredstava u cilju rešavanja datog problema javio se novi problem koji savremena struka štiti bilja prepoznaje. To je problem ekologije tj. ekološke opravdanosti korišćenja datih sredstava. Naime, postavlja se pitanje da li je upotreba tih sredstava neophodna, ne dovodeći tu u pitanje važnost ovog patogena i neophodnost njegovog suzbijanja, već da li je moguća upotreba nekih drugih sredstava borbe koja će biti podjednako ili bar približno efikasna, a da u isto vreme budu i znatno manje štetna po okolinu u opšte.

Cilj ovog oglada je upravo pokušaj da se izađe u susret ovim zahtevima i utvrdi efikasnost biološkog preparata Serenade, koji kao aktivnu supstancu nosi bakteriju *Bacillus subtilis*, kao alternativa koja će zadovoljiti potrebu kako za očuvanjem prinosa paprike tako i za očuvanjem eko-sistema.

MATERIJAL I METODE

Ogled je obavljen na polju Instituta za povrtarstvo u Smederevskoj Palanci, u periodu jun-jul 2007.

U ispitivanju su korišćena bakarna sredstva Blauvit, Bordo blue i Bakrocid S-50 u koncentracijama od 0.5%, uzeta kao standard. Biološki preparat Serenade, primenjivan je u dve koncentracije 0.3% i 0.4%.

Za inokulaciju je korišćen bakterijski soj KFB4 patogena *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Xcv). Suspenzija bakterija je napravljena od 48h stare kulture (Schaad et al., 2001), spiranjem destilovanom vodom i mešanjem na električnoj mešalici u trajanju od 5 min. i pri 6000r/min. Inokulacija je izvršena prskanjem pomoću ručne prskalice (Lelliot et Stead, 1987) zapremine 5l i pri koncentraciji suspenzije od 10^8 cfu/mol. Inokulisane su biljke paprike sorte Palanačka kapija u fazi 8-10 listova.

Ogled je postavljen u tri ponavljanja sa sledećim tretmanima:

(a) biljke tretirane preparatima, a nakon 2 sata inokulisane suspenzijom bakterija;

(b) biljke inokulisane suspenzijom bakterija, a posle 4 sata tretirane preparatima;

(c) biljke tretirane samo preparatima;

(d) biljke tretirane samo suspenzijom bakterija;

(e) ne inokulisane i ne tretirane biljke.

Pojava prvih simptoma ocenjena je 7 dana nakon inokulacije. Nakon 14 dana od inokulacije vršena je ocena efikasnosti preparata procenom indeksa oboljenja (IO) analizom 100 listova, po slučajnom izboru. IO je izračunat po Townsend-Heuberger-ovoj formuli.

Skala za ocenu IO kretala se od 0-5 i imala je sledeće vrednosti: 0 = 0% ; 1 = 1-10% ; 2 = 11-25% ; 3 = 26-50% ; 4 = 51-75% ; 5 = >75%.

REZULTATI I DISKUSIJA

Kontrolom biljaka sedam dana nakon inokulacije konstatovana je pojava prvih simptoma u jačem ili slabijem intezitetu.

Nakon 14 dana od inokulacije ubrano je 100 listova paprike po slučajnom izboru kako bi se utvrdio IO. Na osnovu dobijenih rezultata utvrdili smo da je intenzitet infekcije u tretmanu d) bio 42.3%. Najveću efikasnost pokazao je Bakrocid S-50 (90.5%) u tretmanu b), dok je u tretmanu a) imao znatno manju efikasnost (73.5%). Preparat Serenade je u obe konc. pokazao dobru efikasnost 75.2% (0.3%) i 82.5% (0.4%) u tretmanu b), dok je u tretmanu a) ispoljio nešto manju efikasnost 70.5% (0.3%) i 78,6% (0.4%). Preparat Blauvit je ispoljio veću efikasnost u tretmanu a) (87,8%), dok je njegova efikasnost iznosila nešto manje (84.2%) u tretmanu b). Efikasnost preparata Bordo-blue u tretmanu b) iznosila je 85,2%, a u tretmanu a) 80,2%. Intezitet infekcije u tretmanu c) iznosio je 1,6% a u tretmanu e) iznosio je 7,8%.

Milijašević i sar. (2005) su, takođe, u kontroli koja je ekvivalent našeg tretmana d, imali sličan procenat infekcije od 41.6%, dok je kod njih efikasnost preparata Blauvit bila 78.9% na lokalitetu Kupinovo dok je na lokalitetu Dobanovci ta cifra bila 74.6%. Isti autori (Milijašević i sar., 2006) došli do efikasnosti Blauvita od 87.5% što je u saglasnosti sa našim rezultatima. Od rezultata ovog autora možemo još uporediti i preparat Cuprozin koji kao aktivnu supstancu ima bakar oksihlorid kao i preparat Bakrocid S-50 koji smo mi primenili. Prema ovim autorima preparat Cuprozin je spoljio efikasnost od 85.9%, odnosno na drugom lokalitetu 83.3%, dok je kod nas preparat sa istom aktivnom supstancom, Bakrocid S-

50 imao efikasnost 90.5% u tretmanu b) i 73.5% u tretmanu a). Razliku tumačimo drugačijim uslovima za razvoj patogena, a razlika je moguća i usled korišćenja različitih sojeva istog patogena.

Mijatović (2006) zapaža da je efikasnost preparata Serenade u koncentraciji 0.3% bila 73.2% što je u saglasnosti sa našim rezultatima.

Napomena: Preparat Serenade je dobijen u okviru međunarodnog projekta „*Redukcija upotrebe hemijskih sredstava u održivoj poljoprivrednoj praksi*“ finansiran od Ministarstva životne sredine i okoline Republike Italije. Kordinator projekta: Andrea Minuto. Rukovodilac istraživanja: dr Mirjana Mijatović.

LITERATURA

- Arsenijević M. (1980): Bakterioze paprike. Glasnik zaštite bilja 2: 42-4.
- Arsenijević M (1988): *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Doidge 1920) Dye 1978, Bakterioze biljaka , drugo izmenjeno i dopunjeno izdanje, Naučna knjiga, 322-326.
- Arsenijević M. (1992): *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, Fitopatogene bakterije, Naučna knjiga, 146-147.
- Arsenijević M. (1997): *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Doidge 1920) Dye 1978; Bakterioze biljaka, treće izmenjeno i dopunjeno izdanje, 539-543.
- Azaizeh M., Bashan Y. (1984): Chemical control of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in inoculated pepper fields in Israel; Anal of Aplied Biology 104, Suplement on Tests of Agrochemicals and Cultivars No 5, 60-61.
- Balaž Jelica (1994): Pegavost lišća paprike prouzrokovana bakterijom *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Savremena poljoprivreda, vanredni broj, 42 :341-345.
- Bouzar H, Jones J.B., Stall R.E., Hodge N.C., Minsavage G.V., Benedict A.A. and Alvarez A.M. (1994): Physiological, chemical, serological and pathogenic analyses of a worldwide collection of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* strains; Phytopathology, 84:663-671.
- Lelliot R.A.; Stead D.E. (1987): Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants, British society for plant pathology, Blackwell Scientific Publications, pp. 157
- Mijatović Mirjana (2006): Ispitivanje efikasnosti biološkog preparata Serenade (*Bacillus subtilis*) u suzbijanju prouzrokovala bakterioza na krastavcu, paprici i paradajzu, Izveštaj o radu u 2006., Institut za Povrtarstvo, Smed. Palanka, str 32
- Milijašević S., Rekanović E., Todorović B., Tanović B., Potočnik I., Stepanović M. (2006): Efikasnost suzbijanja *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* prouzrokovala bakteriozne pegavosti paprike bakarnim preparatima, VIII Savetovanje o zaštiti bilja, Zlatibor 27.11-02.12.2006, 93.

- Milijašević S., Rekanović E., Todorović B., Tanović B., Potočnik I., Stepanović M. (2005): Mogućnost hemijskog suzbijanja *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* patogena paprike, VII Savetovanje o zaštiti bilja, Soko Banja 15-18 .11.2005.,177.
- Stall R.E. (1993): *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* : cause of bacterial spot of tomato and pepper. Xanthomonas, Chapman and Hall, London/Glasgow/New York/Tokyo/Melburne/Madras, 57-60.
- Zečević Bogoljub (2001): Uticaj germplazme roditelja na kvantitativne osobine hibrida F1, F2 i F3 generacije paprike (*Capsicum annuum* L.). Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Zemun, 96 str.

(Primljeno: 28.12.2007.)

(Prihvaćeno:26.02.2009.)

**EFFICIENCY OF SERENADE (*BACILLUS SUBTILIS*)
IN CONTROLLING *XANTHOMONAS CAMPESTRIS* PV.
VESICATORIA PEPPER PATHOGEN**

MLADEN ĐORĐEVIĆ, BOGOLJUB ZEČEVIĆ, MILAN DAMJANOVIĆ
Institute for Vegetable Crops, Smederevska Palanka
E-mail: mladendj@msn.com

SUMMARY

Xanthomonas campestris pv. *vesicatoria* causes bacterial leaf spot of pepper. Control of this pathogen could be very significant, economically. During 2007, a trial has been set up at the experimental field at the Institute for Vegetable Crops, in order to investigate efficiency of preparation SERENADE® WP (*Bacillus subtilis*) and compare it to the copper preparations (standard). The researches have been performed on pepper variety PALANAČKA KAPIJA. Inoculation has been performed by using bacteria type KFB 4 (10^{-8} cfu/mol). Preparations have been applied in following concentrations: SERENADE® WP (0, 3%) and (0, 4%), BLAUVIT (0, 5%), BORDO-BLUE (0.5%) and BAKROCID (0, 5%).

Trial has been set with three replications and with following treatments: (a) Plants treated with preparations, and two hours later inoculated with bacteria suspension; (b) Plants inoculated firstly with bacteria suspension, and than, 4 hours later, with preparations; (c) Plants treated with preparations only; (d) Plants treated with bacteria suspension only; (e) Non-inoculated and non-treated plants.

Inoculation has been performed in 8-10 leaves phenophase, with hand sprayer.

The first symptoms have been observed 7 days after inoculation, while preparation efficiency has been observed 10 days after inoculation, by testing 100 random leaves. Disease index has been set by Townsend-Heuberger model.

The results show that SERENADE® WP was highly significant in both concentrations, comparing to standard copper preparations, both before (70.5% i.e. 78.6%) and after inoculation (75.2% i.e. 82.5%).

Key words: copper preparations, Serenade (*Bacillus subtilis*), *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*.

(Received: 28.12.2007)

(Accepted: 26.02.2009.)