

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

KATARINA GAŠIĆ, ALEKSA OBRADOVIĆ
Poljoprivredni fakultet, Beograd – Zemun

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

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

UVOD

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

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

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

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

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

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

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

SIMPTOMI

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

Breskva

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

Šljiva

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

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

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

MATERIJAL I METODE

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

Izolacija i izdvajanje čistih kultura

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

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

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

Test patogenosti

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

Hipersenzitivna reakcija

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

Rep-PCR

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

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

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

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

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

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

REP-PCR:

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

ERIC-PCR

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

BOX-PCR

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

Analiza PCR proizvoda

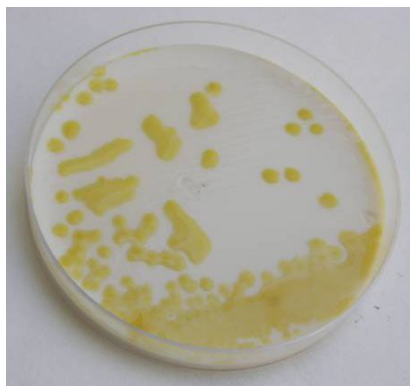
Umnoženi fragmenti DNK su razdvojeni procesom elektroforeze u 1.5% agaroznom gelu i 0.5 x TAE puferu pri naponu 80 V. Fragmenti su obojeni potapanjem gela u rastvor etidijum-bromida (100 µg/ 100 ml) u trajanju 20 min i posmatrani pod UV svetlom na transiluminatoru.

REZULTATI

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

Izolacija

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



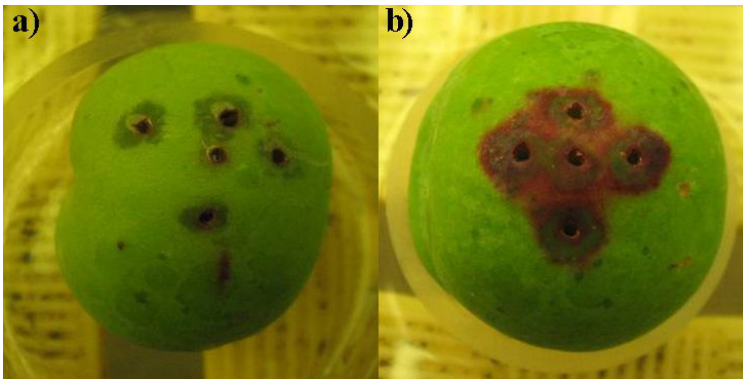
Sl. 1. - *X. a. pv. pruni*. Izgled pojedinačnih kolonija na GYCA podlozi.

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

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

Patogenost

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



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

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

Hipersenzitivna reakcija

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



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

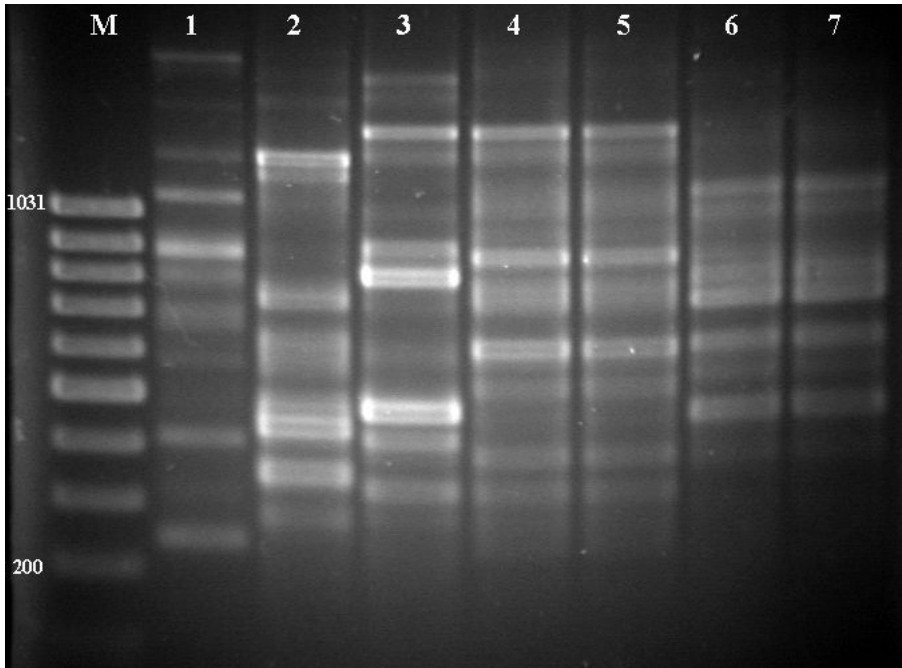
Fig. 3. - *X. a. pv. pruni*. Hypersensitive reaction of bean pods (Photo: Emilio Stefani)

Rep-PCR

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

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

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



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

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

DISKUSIJA

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ZAHVALNICA

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

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

LITERATURA

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

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

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

(Primljeno: 04.05.2009.)

(Prihvaćeno: 29.06.2009.)