

KARAKTERISTIKE IZOLATA *PSEUDOMONAS SYRINGAE* IZOLOVANIH SA KRUŠKE U SRBIJI

VELJKO GAVRILOVIĆ¹, ŽARKO IVANOVIĆ¹, SVETLANA ŽIVKOVIĆ¹, DUŠAN SAVIĆ²

¹Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Beograd

²„Agromarket“ d.o.o., Kragujevac

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

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

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

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

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

UVOD

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

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

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

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

MATERIJAL I METODE

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

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

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

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

BOX PCR

DNA izolacija

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

Umnožavanje DNA traka

Umnožavanje DNK traka je izvedeno u 25 µl reakcione smeše koja je se sastojala iz 67 mM Tris-HCl (pH 8.8), 25 mM MgCl₂, 125 µM dNTP, 2 U *Taq* DNA polimeraze (Fermentas, Lithuania) and 100 pmol of BOXAIR prajmera. Sterilna destilovana voda je korišćena kao negativna kontrola. BOX A prajmer sekvencu (BOXAIR [5'-CTAC GGCAAGGCGACGCTGACG-3']) (Lupski, 1992). PCR program za umnožavanje je izveden na aparatu model Mastercycler personal (Eppendorf, Hamburg, Germany.) prema sledećoj proceduri (de Bruijn, 1992): 1 inicijalni ciklus 7 min na 95°C; zatim 30 ciklusa denaturacije na 94°C po 1 min, hibridizacija prajmera 1 min na 52°C i polimerizacija 8 min na 65°C i nakon toga 1 završni ciklus polimerizacije od 16 min na 65°C. Umnoženi fragmenti DNK su razdvojeni procesom elektroforeze u 1.5% agaroznom gelu i 0.5 x TAE puferu pri naponu 80 V. Fragmenti su obojeni potapanjem gela u rastvor etidijum-bromida (100 µg/ 100 ml) u trajanju 20 min i posmatrani pod UV svetlom na transiluminatoru

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

REZULTATI

Simptomi bolesti

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

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



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

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

Izolovanje bakterije i provera patogenosti

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

d Pozitivan rezultat - Positive result

e Negativan rezultat - Negative result

f Stvaranje eksudata - Oozing

g Nije testirano - Not tested

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

Bakteriološke odlike

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

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

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

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

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

c Negativan rezultat - Negative result

d Pozitivan rezultat - Positive result

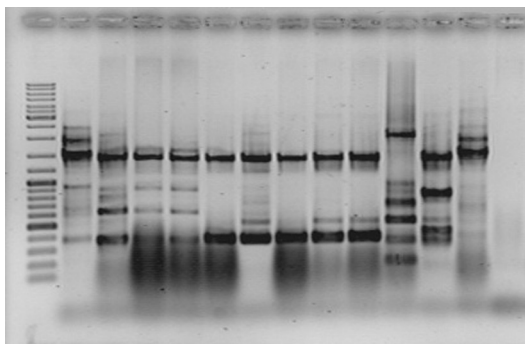
Kontrolni soj CFBP 1582 (*P. s.* pv. *syringae*) se pri navedenim testovima ponaša identično načinom proučavanih sojevima izolovanih sa kruške, dok kontrolni soj CFBP 2119 (*P. s.* pv. *morsprunorum*) ne razlaže želatin i eskulin, ali stvara tirozinazu i metabolizuje tartarate (tab. 2).

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

BOX - PCR

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

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



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

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

DISKUSIJA

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

LITERATURA

- Arsenijević, M. (1970): Prilog proučavanju *Pseudomonas syringae* van Hall kao parazita kruške u Jugoslaviji. Zaštita bilja, Vol. XXI, Br. 110-111: 301-307.
- Arsenijević, M. (1997): Bakterioze biljaka. III izmenjeno i dopunjeno izdanje. S-Print, Novi Sad, 576 p.
- Arsenijević, M., Gavrilović, M. (2007): Praktični priručnik o bakterioznoj plamenjači jabučastih voćaka i ukrasnih biljaka, Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu Beograd, pp 80
- Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl. (1992): Current protocols in molecular biology, vol. I. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York.
- Balaž, J., Arsenijević, M., Vojvodić, Đ. (1988): Etiološka proučavanja bakteriozne nekroze plodova i lišća višnje i mogućnost suzbijanja parazita. Zaštita bilja, Vol. 39 (3), Br.185: 311-321.
- Brown-Kiewnick, A., Sands D.C. (2001): *Pseudomonas*. In: Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. (Eds. N. Schaad, J. B. Jones, and W.Chun), 84-117. APS PRESS The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota.
- Burkowicz, A., Rudolph, K. (1994): Evaluation of pathogenicity and of cultural and biochemical tests for identification of *Pseudomonas syringae* pathovars *syringae*, *morsprunorum* and *persicae* from fruit trees. *J. Phytopathology* 141: 59-76.

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

- Little, E. L., Bostock, R. M., Kirkpatrick, B. C. (1998): Characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Strains from Stone Fruits in California, Applied and Environmental Microbiology, 64: 3818-3823.
- Louws, F. J., Fulbright, D. W., Stephens, C. T., De Bruijn, F. J. (1994): Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. Appl. Environ. Microbiol. 60: 2286-2295.
- Louws, F. J., Bell, J., Medina-Mora, C. M., Smart, C. D., Opgenorth, D., Ishimaru, C. A., Hausbeck, M. K., De Bruijn, F. J., Fulbright, D. W. (1998): Rep-PCR-mediated genomic fingerprinting: A rapid and effective method to identify *Clavibacter michiganensis*. Phytopathol. 88: 862-868.
- Lupski, J. R., G. M. Wetnstock (1992): Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genotnes. J. Bacteriol, 174: 4525-4529.
- Mansvelt, L. E., Hattingh, M. J. (1986): Blossom blast in South Africa caused by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. Plant Pathology 35: 337-343.
- Natalini, E., Rossi, M., P., Barionovi, D., Scortichini, M. (2006): Genetic and pathogenic diversity of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* isolates associated with bud necrosis and leaf spot of pear in a single orchard. Journal of Plant Pathology: 88 (2): 219-223.
- Panić, M., Arsenijević, M. (1996): Bakteriozna plamenjača voćaka i ukrasnih biljaka – *Erwinia amylovora*. Monografska studija. Zajednica za voće i povrće Beograd, D. D. i Poljoprivredni fakultet, Novi Sad. S-Print, Novi Sad, pp. 419.
- Scortichini, M., Marchesi, U., Dettori, M. T., and Ross, M. P. (2003): Genetic diversity, presence of *syrB* gene, host preference and virulence of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains from woody and herbaceous host plants. Plant Pathology, 82: 277-286.
- Scortichini, M. (2005): The population structure of some plant pathogenic bacteria: an ecological and adaptive perspective. Journal of Plant Pathology, 87: 5-12.
- Sobiczewski, P. (1984): Etiology of sour cherry bacterial canker in Poland. Fruit Science Reports XI, No. 4: 169-179.
- Spotts, R. A., Cervantes, L. A. (1994): *Pseudomonas* canker of pear trees in Oregon, cultivar resistance and effect of trunk guards in canker incidence and bacteria survival on bark. Plant Disease 78: 907-910.
- Starović, M., Ivanović, Ž., Aleksić, G., Kuzmanović, S., Stojanović, S., Živković, S., Gavrilović, V. (2006): Identifikacija prouzrokovaca propadanja kruške u Srbiji. Zaštita bilja, Vol. 57 (1-4), N° 255-258: 57-67.

(Primljeno: 10.12.2009.)

(Prihvaćeno: 15.01.2009.)

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

VELJKO GAVRILOVIĆ¹, ŽARKO IVANOVIĆ¹,
SVETLANA ŽIVKOVIĆ¹, DUŠAN SAVIĆ²

¹Institutute for Plant Protection and Environment, Belgrade, Serbia

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

SUMMARY

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

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

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

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

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

(Received: 10.12.2009.)

(Accepted: 15.01.2009.)