

IDENTIFIKACIJA I KARAKTERIZACIJA BAKTERIJE *PSEUDOMONAS SYRINGAE* PATOGENA BRESKVE

VELJKO GAVRILOVIĆ *, NENAD DOLOVAC, NENAD TRKULJA,
MILOŠ STEVANOVIĆ, SVETLANA ŽIVKOVIĆ,
DOBRIVOJ POŠTIĆ, ŽARKO IVANOVIĆ

Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Beograd, Srbija
*e-mail: vgavrilo@yahoo.com

Pseudomonas syringae ekonomski značajan biljni patogen širokog kruga domaćina koji uključuje voćke, ratarske, povrtarske i ukrasne biljke. Ova fitopatogena bakterija naročitu pažnju privlači kao patogen voćaka prouzrokujući sve veće štete. Do sada je eksperimentalno potvrđen kao parazit kruške, jabuke, kajsije, trešnje, višnje, šljive i maline. *Pseudomonas syringae* je identifikovan kao patogen breskve u Srbiji. Detekcija *syrB* gen je korišćena za identifikaciju fitotoksina karakterističnog za *P. syringae* pv. *syringae*. Naš je eksperiment pokazao da se detekcijom *SyrB* gena kao dijagnostičkog alata može identifikovati patogeni varijetet patogen breskve.

Ključne reči: *Pseudomonas syringae*, breskva, siringomicin.

UVOD

Pseudomonas syringae je bakterija koja pripada gama subklasi *Proteobacteria* identifikuje se kao Gram-negativna bakterija koja je striktni aerob, štapićastog je oblika, polarnog raspodela flagela, produkuje fluorescentni pigment, negativna je na aktivnost oksidaze i arginin dehidrolaze i ne izaziva trulež krompira (Doudoroff and Palleroni, 1974). Ova bakterija je veoma rasprostranjena i parazit je mnogih drvenastih i zeljastih biljaka, redukuje nitrate do nitrita, stvara levan i izaziva hipersenzibilnu reakciju na listovima duvana (Arsenijević, 1997). Kao patogenom voćaka je veoma rasprostranjen i smatra se ekonomski štetnim u

čitavom svetu. Prema patogenu su se osetljivim naročito pokazale trešnja, kruška, kajsija i višnja (Arsenijević, 1997; Sobiczewski, 1984; Sobiczewski and Jones, 1992; Scortichini, 2003). Bakterija je u Srbiji eksperimentalno potvrđena kao patogen kruške, jabuke, kajsije, trešnje, višnje, šljive i maline, a njeni patogeni sojevi su izolovani i iz džanarike i breskve (Gavrilović i sar., 2009).

Pseudomonas syringae je dosta heterogena grupa koju čini oko 57 patogenih varijeteta (Gardan et al., 1997). Jedan od relativno lakih a pouzdanih metoda u identifikaciji patogenih varijeteta zasniva se na njihovoj produkciji različitih fitotoksina na osnovu kojih je moguće izvršiti detekciju gena odgovornih za produkciju pojedinih toksina, te je na ovaj način moguće utvrditi o kom se patogenom varijetetu radi (Gross, 1991). Ovim putem moguće je relativno lako utvrditi o kom je patogenom varijetetu reč čak iako dva različita patogena varijeteta mogu da izazovu slična oboljenja na istim biljkama, što je slučaj kod patogenih varijeteta *syringae* i *morsprunorum* koji izazivaju rak rane na drvenastim delovima koštičavog voća (Bultreys and Gheysen, 1999).

Siringomicin, siringotoksin i siringostatin su fitotoksini koje proizvode *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* kao sekundarne metabolite. Ovi molekuli su ciklični lipodepsipeptidi koji su toksični za širok spektar različitih vrsta biljaka (Bultreys and Gheysen, 1999). Siringomicin je po strukturi ciklični lipodepsipeptid sačinjen od polarne peptidne glave i hidrofobnog repa sačinjenog od 3-hidroksi masne kiseline sa 10, 12 ili 14 ugljeničnih jedinica (Fukuchi et al. 1992; Zhang et al. 1995). Siringomicin je fitotoksičan usled formiranja pora u plazmamembrani biljnih ćelija koje postaju potpuno propustljive za katjone kao što je Ca^{2+} (Zhang et al. 1997). Pretpostavlja se da su četiri gena odgovorna za produkciju siringomicina. *SyrB* i *syrC* geni učestvuju u sintezi siringomicina, *syrD* u njegovoj sekreciji, a *syrP* u regulaciji (Bultreys and Gheysen, 1999; Quigley et al. 1993).

Breskva je u mnogim zemljama sveta veoma osetljiv domaćin bakterije *P. syringae*. U SAD je intenzivno proučavana pojava iznenadnog izumiranja stabala breskve, koja je prouzrokovana delovanjem biotskih i abiotskih činilaca, među kojima važno mesto pripada bakteriji *P. syringae* (Ritchie i Clayton, 1982). *P. syringae* pv. *persicae* je opisana kao ekonomski značajan parazit breskve u Francuskoj i Novom Zelandu, prouzrokujući njeno sušenje i izumiranje (Young, 1991; Young et al., 1996).

Poslednjih godina *P. syringae* u Srbiji privlači sve veću pažnju kao patogen breskve. Ova bakterija može da prouzrokuje sušenje grana, što je naročito štetno u mladim zasadima. Utvrđivanje koji od dva patogena varijeteta *P. syringae* pv. *persicae* ili *P. syringae* pv. *syringae* je prisutan kao patogen breskve u Srbiji je od velikog značaja za proučavanje ove bakterije. Stoga je izolovanje bakterije, provera patogenosti i primena laboratorijskih testova za identifikaciju patogena neophodno za njeno dalje izučavanje.

Simptomi se ispoljavaju u vidu iznenadnog sušenja lišća i cvetova breskve, a tkivo grane oko baze pupoljka nekrotira u vidu elipsodnih ulegnutih pega. Uklanjanjem kore uočava se nekroza koja prstenasto zahvata tkivo kambijuma onemogućavajući protok hranljivih materija što dovodi do izumiranja čitave grane. Procenat obolelih pupoljaka može biti izrazito visok, što rezultira velikim štetama i gubitkom prinosa (Gavrilović et al, 2009).

S obzirom da patogen postaje sve rasprostranjeniji u Srbiji prouzrokujući sve značajnije štete, cilj rada je bio da se opišu simptomi bolesti, opišu karakteristike izolata bakterije i prikaže metoda identifikacije fitotoksina siringomicina koja se može koristiti za pouzdanu identifikaciju patogena.

MATERIJAL I METODE

Bakterijski izolati i hranjive podloge

Bakterija *P. syringae* je izolovana i iz nekrotičnih pupoljaka breskve tokom 2009 i 2010. godine u regionu Smedereva, u kome je breskve od velikog ekonomskog značaja i zastupljena je na velikim površinama.

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

U radu su korišćene sledeće hranjive podloge: King B (KB) (2% pepton, 0.15% K_2HPO_4 , 0.15% $MgSO_4 \times 7H_2O$, 1% Glicerol, 1.5% agar), NAS (4.13% hranljivi agar, 5% saharoza), Hugh-Leifson podloga (0.2% pepton, 0.5% NaCl, 0.3% agar, 0,003% bromtimol plavo), podloga za dokazivanje aktivnosti arginindehidrolaze (0.3% pepton, 0.5% NaCl, 0.03% K_2HPO_4 , 1% arginin, 0,001% fenol crveno, 0.3% agar), podloga za hidrolizu želatina (0.3% kvašičev ekstrakt, 0.5% pepton, 12% želatina), podloga za hidrolizu eskulina (1% pepton, 0.5% NaCl, 0.05% feriamonijum citrat, 1.2% agar), podloga za aktivnost tirozinaze (0.5% glicerol, 1% kazein hidrolizat, 0.05% K_2HPO_4 , 0.0125% $MgSO_4 \times 7H_2O$, 0.1% L-tirozin, 1.5% agar), podloga za razgradnju tartarata (0.1% K_2HPO_4 , 0.02% $MgSO_4 \times 7H_2O$, 0.15% $NaNH_4HPO_4$, 0.15% natrijumtartarata, 0.005% bromtimol plavo)

Izolacija i izdvajanje čistih kultura

U cilju izolacije patogena, prikupljeni uzorci su obrađeni u 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 dezinfikovano 96% etanolom, uzimanjem fragmenata veličine 1-2 mm sa prelaza između zdravog i obolelog tkiva na grani. Fragmenti su macerirani

u nekoliko kapi sterilne destilovane vode u avanu pomoću tučka i posle nekoliko minuta macerat je razmazom pomoću petlje zasejan na NAS podlogu radi dobijanja karakterističnih, ispupčenih, glatkih i sjajnih kolonija, sivo bele boje. Petri posude sa zasejanom podlogom postavljene su u termostat pri 25°C. Pojava karakterističnih kolonija posmatrana je narednih 2 dana.

U cilju izdvajanja čistih kultura vršen je odabir kolonija karakterističnih za *P. syringae* i njihovo dalje presejavanje na novu NAS 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 NAS podlogu. Nakon 24h inkubacije u termostatu, pojedinačne kolonije su dalje korišćene u testovima za identifikaciju patogena.

Patogenost

Patogene odlike proučavanih izolata su proverene veštačkom inokulacijom bakterijske suspenzije koncentracije 10^7 bakterija/ml u mlade plodove kruške, trešnje, mahuna boranije i listove jorgovana (Klement, 1990). Inokulisani plodovi su postavljeni u uslove povišene vlažnosti pri sobnoj temperaturi. Rezultati su očitavani nakon 7 dana.

Hipersenzibilna reakcija

Sposobnost testiranih sojeva da prouzrokuju hipersenzibilnu reakciju (HR) proverena je infiltracijom suspenzije bakterija u sterilnoj destilovanoj vodi, koncentracije oko 10^8 bakterija/ml medicinskim špricom i iglom u listove duvana (Klement, 1963). Inokulisani listovi su zatim postavljeni u vlažne uslove pri sobnoj temperaturi i nakon 1-2 dana su očitavani rezultati.

Bakteriološke odlike

Proučene su sledeće morfološke, odgajivačke i biohemijske odlike: bojenje po Gramu, stvaranje fluorescentnog pigmenta na King-ovoj podlozi B (King, 1954), metabolizam glukoze (O/F test) korišćenjem Hugh-Leifson podloge (Hugh and Leifson, 1953). U cilju utvrđivanja kojoj grupi fitopatogenih bakterija izolati pripadaju korišćeni su (LOPAT) testovi: stvaranje levana (Lelliott et al., 1966), aktivnost oksidaze (Kovacs, 1956), arginin dehidrolaze, pektinaze (Thornley, 1960). Pored ovih odlika izvršeni su i diferencijalni biohemijski testovi za utvrđivanje patogenog varijeteta: hidroliza želatina i eskulina, stvaranje tirozinaze i metabolizam tartarata (GATT) (Arsenijević, 1997).

Izolacija DNK

DNK je izolovana iz bakterija gajenih 24 h na hranljivom agaru u termostatu pri temperaturi od 25°C. Pojedinačna kolonija bakterija je petljom preneti u mikrotubu i suspendovana u 100 µl destilovane vode. Bakterijska suspenzija je zagrevana 5 minuta na 95°C a zatim je centrifugirana 3 minuta na 15000 g. Supernatant je odliven u drugu mikrotubu i korišćen je kao uzorak bakterijske DNK (Stanković et al., 2005).

Umnožavanje *SyrB* gena

Sekvence prajmera (Sorensen et al., 1998) korišćenih u radu su:

B1 (5'- CTT TCC GTG GTC TTG ATG AGG -3')

B2 (5'- TCG ATT TTG CCG TGA TGA GTC -3').

Umnožavanje fragmenata DNK vršeno je u 25 µl reakcione smeše koja sadrži PCR reakcioni pufer (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl [pH 8.3]), 1.5 mM MgCl₂, 200µl dNTPs, 0.5 mM prajmera, 0.025 U *Taq* polimeraze i 1 µl DNK uzorka. Kao pozitivna kontrola korišćen je referentni CFBP 11 (*P. syringae* pv *syringae*), a kao negativna kontrola sterilna destilovana voda.

Program PCR reakcije za *syrB* gen:

početna denaturacija DNK (94°C - 7 min)

35 ciklusa:

denaturacije DNK (94°C – 1.5 min)

vezivanja prajmera (60°C – 1.5 min)

sinteze fragmenata DNK - elongacija (72°C - 3 min)

finalna elongacija (72°C - 10min)

Analiza PCR proizvoda

Umnoženi fragmenti DNK su razdvojeni procesom elektroforeze u 1% agaroznom gelu i 0.5 x TAE (.40mM Tris, 20mM Sirćetna kiselina, 1mM EDTA) puferu pri naponu 95 V. Fragmenti su obojeni potapanjem gela u rastvor etidijumbromida (100 µg/ 100 ml) u trajanju 20 min i posmatrani pod UV svetlom na transiluminatoru.

REZULTATI

Izolacija

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 uočena je nekroza ksilema, floema i kambijuma. Nekrotirana tkiva su vlažnog izgleda, što podseća na infekcije bakterijama. Kao rezultat izolacije bakterija direktno iz tkiva obolelih grana breskve došlo je do razvoja mnoštva bakterijskih kolonija na NAS podlozi dva dana posle izolacije. Svi bakterijski izolati formiraju bledosive kolonije, sjajne, glatke, sluzastog izgleda, izrazito ispupčene, prečnika od 1,5 – 5 mm na mesopeptonskoj podlozi obogaćenoj saharozom (NAS). Daljim prečišćavanjem dobijene su čiste kulture koje su održavane na hranljivom agaru i dalje korišćene u testovima za identifikaciju patogena.

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.

Hipersenzibilna reakcija

Izolovani sojevi prouzrokuju hipersenzibilnu reakciju na listovima duvana ispoljenih u vidu crnih nekrotičnih zona na mestim infiltracije bakterijske suspenzije. Na kontrolnim biljkama u koje je infiltrirana destilovana voda nije došlo do nekroze tkiva.

Patogenost

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 i trešnje posle tri dana od inokulacije i one dostižu prečnik oko 5 mm.

Patogene karakteristike proučavanih sojeva proverene su inokulacijom nesazrelih plodova kruške, trešnje i plodova boranije. Izolovani sojevi prouzrokuju nekrozu inokulisanih, nesazrelih plodova ispoljenih u vidu crnih nekrotičnih ulegnutih pega prečnika 3-5 mm. Nakon 7 dana na mestu inokulacije pojavile su se vodenaste zone, svetlo-zelene boje, dok je 5 dana kasnije došlo do nekroze tkiva i pojave tamno mrke boje oko bunarčića ispunjenih suspenzijom bakterija. 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 inoku-

lisanim mahunama boranije oko mesta infiltracije suspenzije bakterija uočavaju se karakteristične mrke pege sa uočljivim narandžastim oreolom.

Proučavani izolati su ispoljili homogenost u pogledu patogenih odlika. Svi su prouzrokovali hipersenzibilnu reakciju na listovima duvana, nekroze na inokulisanim nesazrelim plodovima kruške, trešnje, mahunama boranije i listovima jorgovana što su tipične odlike bakterije *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. Identično njima se pri testovima patogenosti ponaša kontrolni soj CFBP 11 (*P. syringae* pv. *syringae*). Na osnovu rezultata testova patogenosti zaključeno je da se izolati sa breskve odlikuju patogenim odlikama karakterističnim za *P. syringae* pv. *syringae*.

Bakteriološke odlike

Izolati poreklom sa breskve stvaraju levan, ne stvaraju oksidazu i arginin dehidrolazu, niti poseduju pektolitičke fermente da bi prouzrokovali trulež kriški krompira. Prouzrokuju hipersenzibilnu reakciju inokulisanih liski duvana.

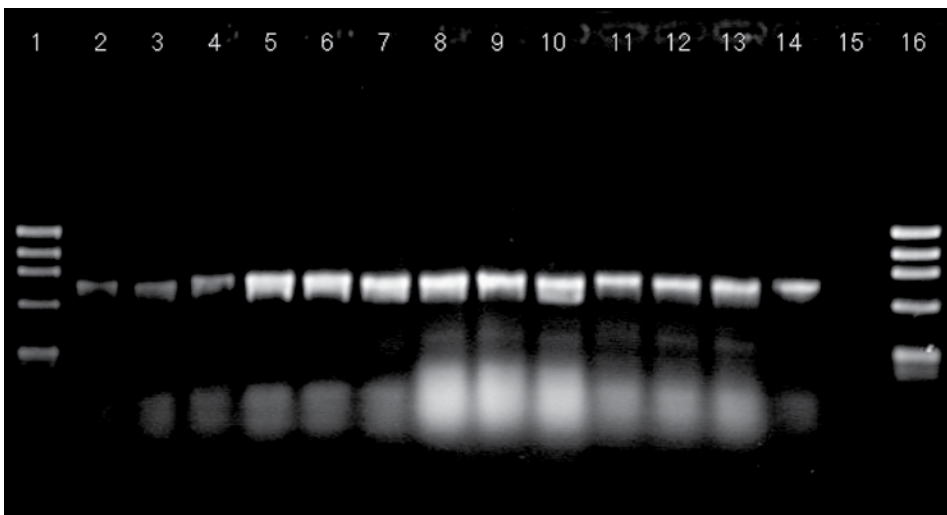
Svi proučavani izolati su Gram negativni, fluoresciraju na King-ovoj podlozi B i glukozu metabolišu isključivo oksidativno; stvaraju levan ali ne i oksidazu, arginin dehidrolazu i pektinazu. Ove karakteristike potvrdile su da je fitopatogena bakterija *P. syringae*.

Razlike u pogledu biohemijskih odlika utvrđene su pri diferencijalnim (GATT) testovima. Svi izolati su bili pozitivni prilikom hidrolize želatina i eskulina, ali negativni na aktivnost tirozinaze i metabolizam tartarata, ukazujući na tipične karakteristike za bakteriju Ia grupe, *P. syringae* pv. *syringae*.

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 breskve 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 sojev CFBP-11 takođe hidrolizuje želatin i eskulin ali ne stvara tirozinazu i ne metaboliše tartarate.

Detekcija *syrB* gena

Produkcija siringomicina, cikličnog lipodepsinonapeptida, glavnog faktora virulencije bakterije *P. syringae* pv. *syringae* može biti detektovana korišćenjem PCR reakcije i specifičnih prajmera za *syrB* gen koji kodira ovaj metabolit (Sorensen et al., 1998). Pojava trake na gelu na poziciji od 752-bp kod svih ispitivanih izolata ukazuje na prisustvo *syrB* gena kod njih i samim tim potvrđuje da ispitivani izolati pripadaju vrsti *P. syringae* pv. *syringae* (Slika 1).



Slika 1 - PCR umnožavanje *syrB* gena na poziciji 752-bp. Kolone 1) i 16) DNA molecular size marker (Φ X174 DNA/BsuRI); Kolona 2) CFBP-11;) Kolone 3 - 14) *P. syringae* izolati sa breskve 15) negativna kontrol.

Figure 1 – PCR amplification of the 752-bp fragment of *syrB*. Lane 1) i 16) DNA molecular size marker (Φ X174 DNA/BsuRI); Lane 2) CFBP-11;) Lane 3 - 14) *P. syringae* isolate from peach 15) negative control.

DISKUSIJA

P. syringae parazitira brojne vrste voćaka širom sveta i ubraja se u ekonomski značajne patogene (Arsenijević, 1997; Scortichini et al., 2003, Natalini et al., 2006). Breskva se svakako ubraja među osetljivije domaće ove bakterije, a štete koje nastaju kao posledice infekcije bakterijom zavise od ekoloških faktora, osetljivosti sorte i starosti stabla. Fitopatogena bakterija *P. syringae* postaje sve rasprostranjeniji patogen breskve u Srbiji prouzrokujući sušenje grana pa i čitavih stabala. Izolovanje *P. syringae* iz obolelog tkiva 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 na ovim podlogama imaju važan dijagnostički karakter (Arsenijević, 1997; Braun-Kiewnick and Sands, 2001). Na podlozi obogaćenoj saharozom, kolonije bakterije su krupne, izrazito ispupčene, sjajne, glatke, sluzasta izgleda, prečnika 3-5 mm (levan tip kolonija). Odlika *P. syringae* da na pomenutoj podlozi stvara levan je od velikog značaja u identifikaciji fluorescentnih bakterija roda

Pseudomonas (Lelliott et al., 1966; Arsenijević, 1997). Na King-ovoj podlozi B kolonije su glatke, blago ispupčene, sa izraženom sposobnošću stvaranja fluorescentnog pigmenta (Arsenijević, 1997).

Rezultati dobijeni u ovim istraživanjima, kao i oni drugih autora pokazuju da HR predstavlja prvi korak u identifikaciji bakterije *P. syringae* (Mansvelt and Hattingh, 1986; Burkowicz and Rudolph, 1994; Arsenijević, 1997). Jedno od najvažnijih patogenih svojstava ove bakterije je sposobnost prouzrokovanja hipersenzibilne reakcije duvana. Takođe je veoma pogodan metod za diferencijaciju patogenih i saprofitnih sojeva koji se često zajedno pojavljuju na hranljivim podlogama prilikom izolacije bakterija. Pozitivan rezultat testa je nekroza infiltriranog tkiva duvana 18-24 časa posle inokulacije, i pouzdan je znak patogenosti bakterije (Klement et al., 1964; Klement, 1990; Arsenijević, 1997).

Izolati *P. syringae* poreklom sa koštičavih voćaka prouzrokuju nekroze inokulisanih plodova trešnje i kruške, 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 and Rudolph, 1994).

Jorgovan je biljka sa koje je ova bakterija prvi put izolovana i detaljnije opisana, a inokulacija listova ove ukrasne biljke je veoma pogodan test za proveru patogenosti izolata *P. syringae* pv. *syringae*. Na inokulisanim listovima se zapaža nekroza lisnih drški, koja se postepeno širi i zahvata tkivo glavnog i bočnih nerava, odakle dospeva u tkivo mezofila (Young, 1991; Mitrev et al., 2000). Ovaj test takođe ukazuje i na sposobnost sistemičnog širenja patogena u biljci, što je ranije i eksperimentalno potvrđeno (Mansvelt and Hattingh, 1987).

Na inokulisanim mahunama boranije uočavaju se narandžasto mrke pege, veoma karakterističnog izgleda (Arsenijević, 1997). 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 izolat CFBP 11 reaguje dentično kao i ispitivani izolati.

U pogledu patogenih svojstava sojevi su ispoljili patogenene odlike tipične za pv. *syringae*. Ovi rezultati su u punoj saglasnosti sa podacima iz literature koji kažu o različitim patogenim odlikama predstavnika ovog varijeteta (Arsenijević, 1997; Gavrilović, 2004; Gavrilović i sar., 2004). Primenjeni testovi za proveru patogenosti su veoma pouzdani, lako ostvarivi i široko se koriste u ove svrhe (Burkowitz i Rudolph, 1994; Scortichini et al., 2003; Natalini et al., 2006).

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

Biohemijsko-fiziološke karakteristike *P. syringae* su dosta proučavane, što je rezultiralo brojnim podacima, naročito u nešto starijoj literaturi. Osnovni cilj ovih istraživanja bio je da se utvrde razlike među patogenim varijetetima ove bakterije. Primenom biohemijsko-fizioloških odlika utvrđeni su diferencijalni testovi na osnovu kojih se mogu razlikovati patogeni varijeteti. U pogledu biohemijskih karakteristika proučavani izolati sa breskve ispoljavaju izrazitu uniformnost i pokazuju tipične odlike *P. pv. syringae*. Na osnovu rezultata testova izolati hidrolizuju želatin i eskulin ali ne stvaraju tirozinazu i ne koriste tartarate u svojim metaboličkim procesima. Ovi kriterijumi su i prema literaturnim podacima veoma pouzdani i dosta se koriste u svrhu identifikacije *P. syringae* do nivoa patogenog varijeteta (Latorre and Jones, 1979; Mansvelt and Hattingh, 1986; Burkowicz and Rudolph, 1994). Nedostatak ove grupe testova je relativno dug period do dobijanja validnih rezultata. Proučene fenotipske karakteristike su omogućile identifikaciju bakterije do nivoa patogenog varijeteta, što je bio i osnovni cilj istraživanja.

Patogeni varijetet, *persicae* koji je u svetu identifikovan kao varijetet specijalizovan za parazitiranje na breskvi se prema svojim patogenim i biohemijskim odlikama znatno razlikuje od proučavanih izolata, tako da tokom ovih istraživanja njegovo prisustvo nije utvrđeno.

Stvaranje siringomicina je važna odlika većine sojeva *P. syringae* *pv. syringae* (Gross et al., 1984) kojom se karakterišu i naši izolati poreklom sa breskve. U radu Hačinsona i Grosa (1997) pokazano je da toksin siringomicin koji produkuje *P. syringae* *pv. syringae* je glavni faktor virulentnosti ove bakterije. Poređenjem efekata koji ovaj toksin ima na plazmamembranu ćelija lista duvana, u radu Iacobelisa (1992) dobijeno je da siringomicin izaziva stvaranje pora na plazmamembrani ćelija duvana. Primena metode lančane reakcije polimeraze (PCR) primenom *syrB* prajmera se pokazale veoma pouzadane za detekciju siringomicina karakterističnog *P. syringae* *pv. syringae*, (Sorensen et al. 1997.; Bultreys and Gheysen, 1999). Nakon PCR reakcije došlo je do umnožavanja fragmenta od 752-bp što odgovara genu *syrB* odgovornog za sintezu siringomicina, kod svih ispitivanih izolata što je bila još jedna potvrda da oni pripadaju vrsti *P. syringae* *pv. syringae*.

Na osnovu svih prikazanih rezultata potvrđeno je da bakterija *P. syringae* *pv. syringae* parazitira na breskvi u Srbiji.

ZAHVALNICA

Rad je realizovan u okviru projekta “**Razrada integrisanog upravljanja i primene savremenih principa suzbijanja štetnih organizama u zaštiti bilja**” (TR 31018), koji finansira Ministarstvo prosvete i nauke Republike Srbije.

LITERATURA

- Arsenijević, M. (1997): Bacterial diseases of plants. STYLOS, Novi Sad.
- Braun-Kiewnick, A., and D. C. Sands (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.
- Bultreys, A. and Gheysen, I. (1999): Biological and Molecular Detection of Toxic Lipodepsipeptide- Producing *Pseudomonas syringae* Strains and PCR Identification in Plants. p. 1904-1908.
- 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.
- Doudoroff, M., and N. J. Palleroni. (1974): Genus I. *Pseudomonas* Migula In R. E. Buchanan and N. E. Gibbons (ed.), Bergey's manual of determinative bacteriology, 8th ed. Williams & Wilkins, Baltimore, Md. p. 217–243.
- Fukuchi, N., A. Isogai, J. Nakayama, S.T akayama, S. Yamashita, K. Suyama, J. Y. Takemoto, and A. Suzuki. (1992): Structure and stereochemistry of three phyto-toxins, syringomycin, syringotoxin and syringostatin, produced by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. J.Chem.Soc.PerkinTrans.1 1992:1149–1157.
- Gardan, L., H. Shafif, and P. A. D. Grimont. (1997): DNA relatedness among pathovars of *P. syringae* and related bacteria, p. 445–448. In K. Rudolph, T. J. Burr, J. W. Mansfield, D. Stead, A. Vivian, and J. Von Kietzell (ed.), *Pseudomonas syringae* pathovars and related pathogens. Kluwer Academic Publishers, London, United Kingdom.
- Gavrilović, V. (2004): Patogene i biohemijsko fiziološke karakteristike bakterija roda *Pseudomonas* parazita voćaka. Doktorska disertacija, Poljoprivredni fakultet, Beograd, Zemun, 104 PP.
- Gavrilović, V., Milijašević, S., and M. Arsenijević (2004): *Pseudomonas syringae* parazit maline u Srbiji (*Pseudomonas syringae* raspberry pathogen in Serbia). *Jugoslovensko Voćarstvo*, 38, 183–190.
- Gavrilović, V., Ivanović., Ž., Živković, S., and Milijašević, S.2009. Characteristics of *Pseudomonas syringae* strains isolated from necrotic peach buds in Serbia, 7th Interantional Peach Symposium, June 8–11, 2009 Leida, Spain. Book of Abstracts
- 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, D. C. (1991): Molecular and genetic analysis of toxin production by pathovars of *Pseudomonas syringae*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 29:247–278.
- Hugh, R., and E. Leifson (1953): The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram negative bacteria. *J. Bact.* 66, 24-26.
- Hutchison, M. L. and Gross, C. D. (1997): Lipopeptide Phytotoxins Produced by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*: Comparison of the Biosurfactant and Ion Channel- Forming Activities of Syringopeptin and Syringomycin. pp. 348-352.
- Iacobellis, N. S., Lavermicocca, P., Grgurina, I., Simmaco, M., and Bal- lio, A. (1992): Phytotoxic properties of *Pseudomonas syringae* pv. *sy- ringae* toxins. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 40:107-116.
- Jones, A. L. (1971): Bacterial canker of sweet cherry in Michigan. *Plant Disease Reporter* 55: 961-965.
- King, E. O., Ward, M. K., and D. E. Raney (1954): Two simple media for the demonstra- tion of pyocyanin and fluorecein. *J. Lab. Clin. Med.* 44, 301-307.
- Klement, Z. (1963): Rapid detection of the pathogenicity of phytopathogenic pseudomo- nades. *Nature.* p.199, 299-300.
- Klement, Z., Farkas, G.L., Lovrekovich, L. (1964): Hypersensitive reaction induced by phytopathogenic bacteria in the tobacco leaf. *Phytopathology* 54: 474-477.
- Klement, Z. (1990): Inoculation plant tissues. Canker and dieback disease. Pages 105- 106. In: *Methods in Phytobacteriology* (Eds. Z. Klement, K. Rudolph, and D. Sands), Akademiai Kiado, Budapest.
- Kovacs, N. (1956): Identification of *Pseudoinonas pyocyanea* by the oxidase reaction. *Nature.* p. 178, 703.
- 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.
- Lelliott, R., A., Billing, E., and A. C.Hayward (1966): A determinative Sheme fo the Fluorescent Plant Pathogenic Pseudomonadas. *J. App. Bact.* 3, 470-488.
- Mansvelt, L.E., Hattingh, M.J. (1986): Pear blossom blast in South Africa caused by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Plant Pathology* 35: 337-343.
- 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.

- Natalini, E., Rossi, M., P., Barionovi, D., and M. Scortichini (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.
- Quigley, N. B., Y.-Y. Mo, and D. C. Gross. (1993): SyrD is required for syringomycin production by *Pseudomonas syringae* pathovar *syringae* and is related to a family of ATP-binding secretion proteins. *Mol. Microbiol.* 9:787– 801.
- Ritchie, D.F., Clayton, C.N. (1982): Peach tree short life: A complex of interacting factors. *Plant Disease* 65: 462-469.
- Scortichini, M., Marchesi, U., Dettori, M., T., and M. P. Rossi (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.
- Sobiczewski, P. 1984. Etiology of sour cherry bacterial canker in Poland. *Fruit Science Reports* XI, No.4: 169-179.
- 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.
- Sorensen, K. N., Kwang-Hee, K, AND Takemoto, J. Y. (1998): PCR Detection of Cyclic Lipodepsinonapeptide-Producing *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and Similarity of Strains. *Applied and environmental microbiology*, 64: 226–230.
- Stanković, S., Soldo, B., Berić-Bjedov, T., Knežević-Vukčević, J., Simić, D., Lazarević, V. (2005): Subspecies-specific distribution of intervening sequences in the *Bacillus subtilis* prophage ribonucleotide reductase genes. p. 9, 10.
- Thornley, M., J. (1960): The differentiation of *Pseudomonas* from other gramnegative bacteria on the basis of arginine metabolism. *J. Appl. Bact.* p. 23, 37-52.
- Young, J.M. (1991): Pathogenicity and identification of lilac pathogens *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* van Hall 1902. *Ann. Appl. Biol.* 118: 283-298.
- Zhang, J.-H., Quigley, N. B. and Gross D. C. (1995): Analysis of the *syrB* and *syrC* Genes of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Indicates that Syringomycin Is Synthesized by a Thiotemplate Mechanism. p. 4009, 4013, 4014.

(Primljeno: 05.04.2011.)

(Prihvaćeno: 27.05.2011.)

IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF PEACH PATHOGEN *PSEUDOMONAS SYRINGAE*

VELJKO GAVRILOVIĆ *, NENAD DOLOVAC, NENAD TRKULJA,
MILOŠ STEVANOVIĆ, SVETLANA ŽIVKOVIĆ,
DOBRIVOJ POŠTIĆ, ŽARKO IVANOVIĆ

Institute for Plant Protection and Environment, Belgrade, Serbia

*e-mail: vgavriilo@yahoo.com

SUMMARY

Pseudomonas syringae is economically important plant pathogen, found on a number of hosts including fruit trees, field crops, vegetables and decorative plants. This phytopathogenic bacteria is becoming a quite widespread pathogen on the fruit trees in Serbia, causing significant economic losses. Up to now it was experimentally confirmed as a pathogen on the pear, apple, apricot, cherry, sour cherry, plum trees as well as raspberries. In this study *Pseudomonas syringae* was identified as pathogen on peach tree in Serbia. Detection of *syrB* gene was used for identification of phytotoxins typical for *P. syringae* pv. *syringae*. Our experiment showed that detection of *syrB* genes can be used as a diagnostic tool in determining pathovars of *Pseudomonas syringae* parasites on peach trees.

Key words: *Pseudomonas syringae*, peach, syringomicin.

(Received: 05.04.2011.)

(Accepted: 27.05.2011.)