

## ETIOLOŠKA PROUČAVANJA RAKA OLEANDERA U CRNOJ GORI

VELJKO GAVRILOVIĆ<sup>1</sup>, SVETLANA ŽIVKOVIĆ<sup>1</sup>

JELENA LATINOVIĆ<sup>2</sup>, NEDELJKO LATINOVIĆ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Beograd

<sup>2</sup> Biotehnički Fakultet, Podgorica

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

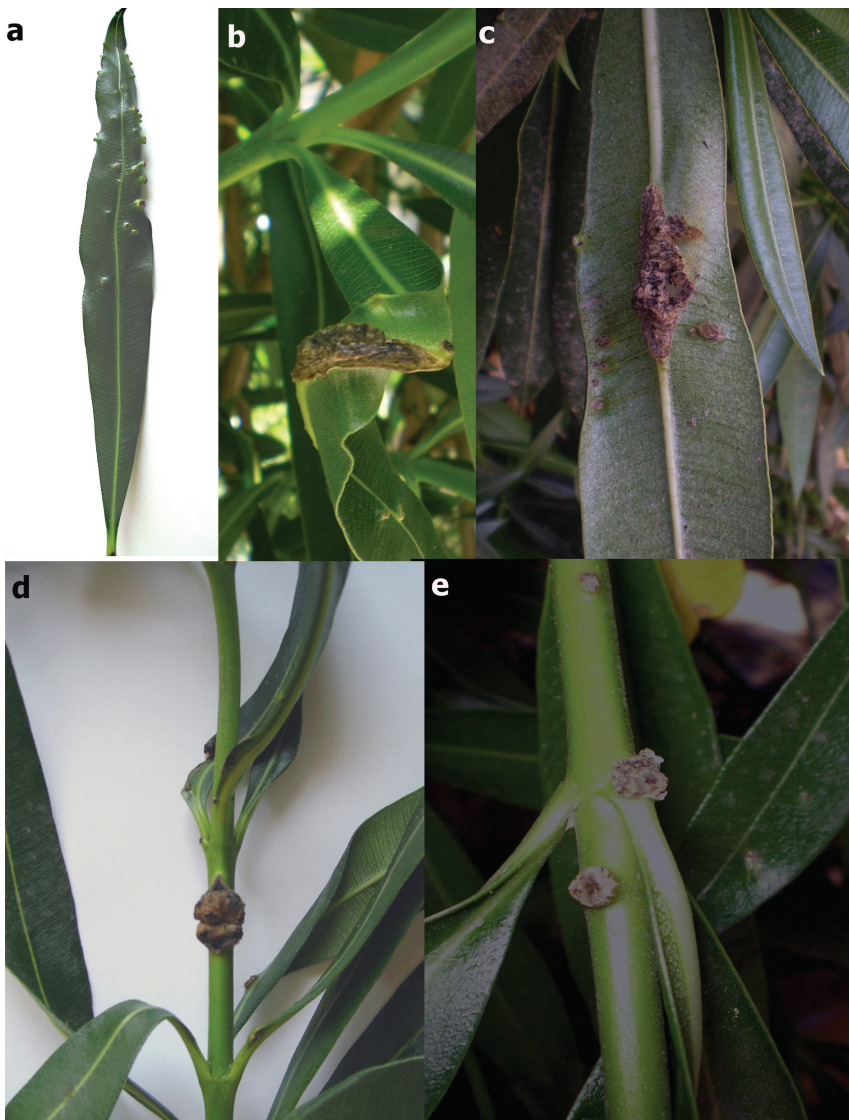
*Ključne reči:* oleander, tumori, *Pseudomonas savastanoi* pv. *nerii*, patogenost, biohemijske odlike, identifikacija

### UVOD

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

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

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



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

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

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

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

## MATERIJAL I METODE

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

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

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

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

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

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

## REZULTATI

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

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

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

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

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

b pozitivan rezultat – positive result

c negativan rezultat – negativen result

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

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

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

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

b negativan rezultat – negativen result

c pozitivan rezultat – positive result

## DISKUSIJA

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

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

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

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

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

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

**LITERATURA**

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

(Primljeno: 15.11.2008.)

(Prihvaćeno: 26.02.2009.)



## ETIOLOGICAL STUDY ON OLEANDER KNOT IN MONTENEGRO

VELJKO GAVRILOVIĆ<sup>1</sup>, SVETLANA ŽIVKOVIĆ<sup>1</sup>  
JELENA LATINOVIĆ<sup>2</sup>, NEDELJKO LATINOVIĆ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute for Plant Pathology and Environment, Belgrade

<sup>2</sup> Biotechnic Fakulty, Podgorica

### SUMMARY

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

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

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

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

(Received: 15.11.2008.)

(Accepted: 26.02.2009.)