

IDENTIFIKACIJA PROUZROKOVAČA PROPADANJA KRUŠKE U SRBIJI

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

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

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

UVOD

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

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

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

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

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

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

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

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

MATERIJAL I METODE

Biljni materijal

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

Elektronska mikroskopija

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

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

PCR tehnika u dokazivanju PD

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

rijala, po proceduri koje je opisana u EPP0 PM7/62. Lisni nervi su isitnjeni u ekstrakcionom puferu (1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH 8) i dobijeni ekstrakt je inkubiran 30 minuta na 65°C i centrifugiran 2 minuta na 2000 g. Supernatant je prečišćen sa jednakom zapreminom hloroform-isoamilalkohola (24 : 1) i centrifugiran 5 minuta na 13000 g. Supernatant je prebačen u nove tubice i pomešan sa 0.8 zapremine hladnog etanola, sve je centrifugirano 10 minuta na 15000 g. Talog je ispran sa 70 % etanolom i rastvoren u 100 µl destilovane vode.

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

REZULTATI

Simptomi

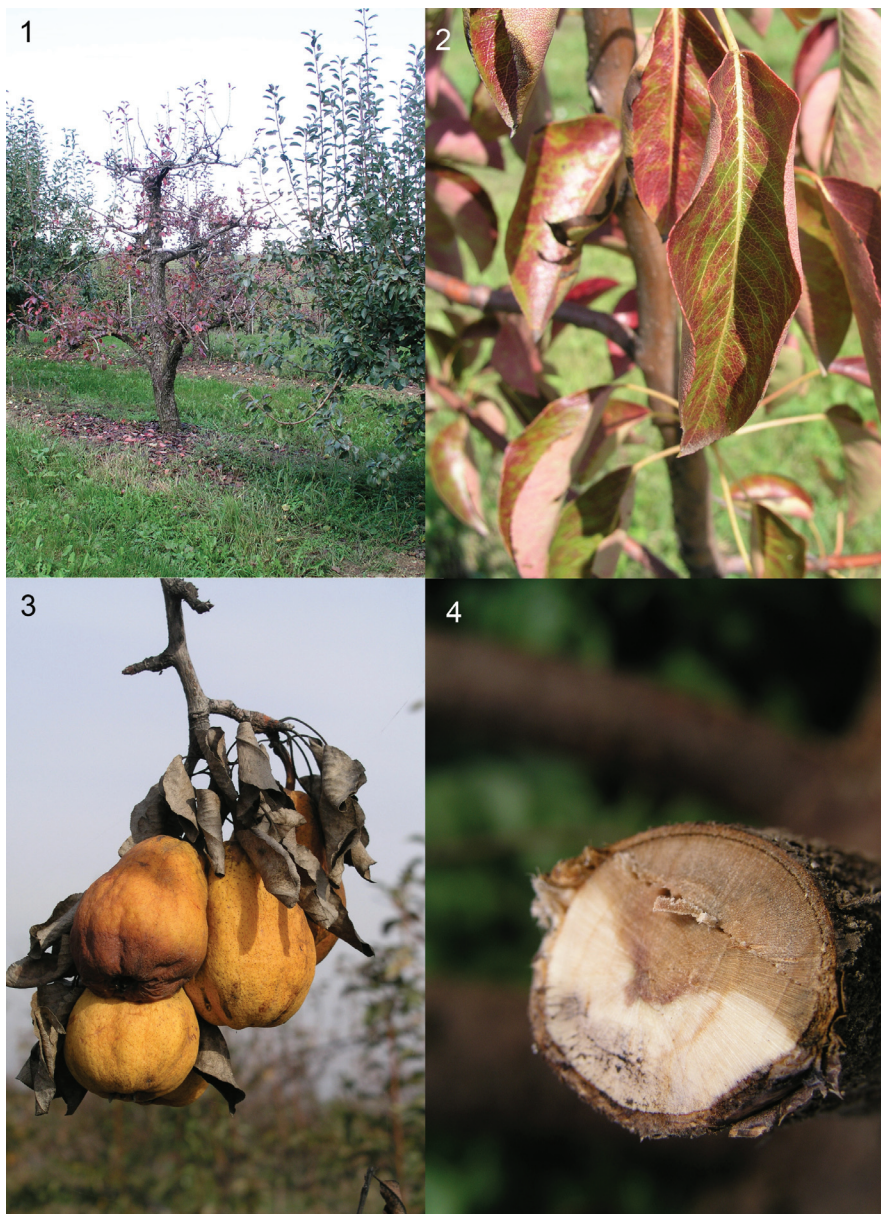
Utvrđeno je prisustvo oba tipa simptoma propradanja kruške u pregledanim voćnjacima. Prvi tip simptoma ispoljava se u vidu brzog sušenja, takva stabla su bila prisutna u lokalitetu Crvenka na obe sorte. Ova stabla su bila zahvaćena intenzivnim crvenilom, već u mesecu julu, vrlo brzo, naročito mlade sadnice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

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

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

Elektronska mikroskopija

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

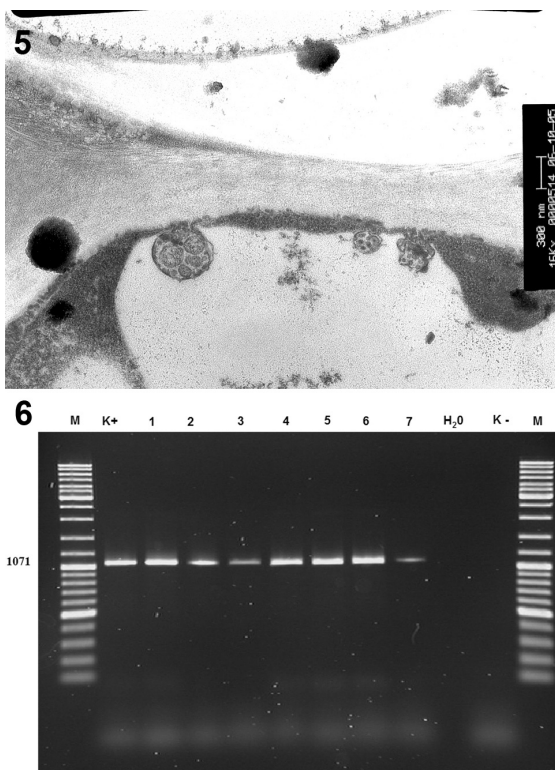


Sl. 1-4 – Crvenilo kruške: sasušeno stablo kruške (Sl. 1); prevremeno crvenilo i uvijenost liske (Sl. 2); neupotrebljivi plodovi (Sl. 3) i poprečni presek obolelog stabla kruške (Sl. 4).

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

PCR analiza

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



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

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

DISKUSIJA

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

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

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

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

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

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

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

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

LITERATURA

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

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

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

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

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

MIRA STAROVIĆ, ŽARKO IVANOVIĆ, GORAN ALEKSIĆ, SLOBODAN KUZMANOVIĆ,
SAŠA STOJANOVIĆ, SVETLANA ŽIVKOVIĆ, VELJKO GAVRILOVIĆ
¹Institute for Plant Protection and Environment, Belgrade

SUMMARY

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

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

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

(Received: 24.10.2008.)

(Accepted: 26.02.2009.)