

## CRVENILO KRUŠKE U SRBIJI

*M. Starović, Ž. Ivanović, G. Aleksić, S. Kuzmanović, S. Stojanović, S. Živković,  
V. Gavrilović\**

**Izvod:** Simptomi Pear decline fitoplazme su primećeni u komercijalnim zasadima kruške u Srbiji već izvestan broj godina. 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). U centralnoj Srbiji Duduk i saradnici su 2005. godine, primenom PCR metode dokazali prisustvo ove fitoplazme na krušci. 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. Tokom avgusta 2004. godine u lokalitetu Deč obavljen je pregled zasada kruške starosti dve godine sorti Vilijamovka i Abata fetel, i stabala istih sorti kruške, starosti 10-15 godina, u lokalitetu Crvenka, početkom septembra meseca 2007. godine. Vizuelnim pregledom utvrđeno je prisustvo simptomima tipa crvenila na većem broju stabala. Ova stabla su obeležena i sa njih je uzorkovan biljni materijal za analize. Uzorci su obradjeni za posmatranje na elektronskom mikroskopu i za PCR analizu. 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.

**Ključne reči:** kruška, fitoplazma, elektronska mikroskopija, molekularna detekcija

### Uvod

Fitoplazme su mali, intracelularni mikroorganizmi koji nastanjuju floem i to ćelije sitastih cevi različitih biljnih vrsta. Inficiraju i biljke i insekte vektore (Blomquist and Kirkpatrick, 2002). Pear decline (PD) phytoplasma prouzrokuje vrlo značajno oboljenje kruške, čije je prisustvo utvrđeno u Evropi, Aziji i Severnoj Americi. Štetnost PD zavisi od podloge na koju je kruška kalemljena, pa su u skladu sa tim poznata dva tipa oboljenja brzo i sporo sušenje (decline) kruške, zatim starosti i lokliteta. Najpoznatiji simptomi su u vidu lisnog uvijanja, prevremenog crvenjenja koji se ispoljavaju tokom avgusta meseca,

---

\* Dr Mira Starović, gavranm@yahoo.com, Žarko Ivanović, dipl.mol.biol, dr Goran Aleksić, dr Slobodan Kuzmanović, dr Saša Stojanović, mr Svetlana Živković, dr Veljko Gavrilović. Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Teodora Drajzera 9, 11000 Beograd

kao i 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.

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). Imajući u vidu da je u našim uslovima prisutna *C. pyri*, može se zaključiti da je ona vektor PD i u Srbiji.

Simptomi Pear decline fitoplazme su primećeni u komercijalnim zasadima kruške u Srbiji već izvestan broj godina. 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). U centralnoj Srbiji Duduk i saradnici su 2005. godine, primenom PCR metode dokazali prisustvo ove fitoplazme na krušci. 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.

Dokazivanje prisustva fitoplazmi u biljnom tkivu može se obaviti 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), ali daleko više primenom molekularnih tehnika lančnom reakcijom polimeraze, koje su vrlo osetljive za dokazivanje fitoplazmi (Lee et al., 1998; Carcia-Chapa et al., 2002; Duduk et al., 2005).

## Materijal i metode

**Biljni materijal.** Tokom avgusta 2004. godine u lokalitetu Deč obavljen je pregled zasada kruške starosti dve godine sorti Vilijamovka i Abata fetel i stabala istih sorti kruške, starosti 10-15 godina, u lokalitetu Crvenka, početkom septembra meseca 2007. godine. Vizuelnim pregledom utvrđeno je prisustvo simptomima tipa crvenila na većem broju stabala. Ova stabla su obeležena i sa njih je uzorkovan biljni materijal za analize. Uzorkovano je lišće sa više grana da bi se izbegla greška zbog neravnomernog prisustva fitoplazmi. Istovremeno je uzorkovano lišće sa zdravih stabala istih sorti, koje je poslužilo kao kontrola. Uzorci su čuvani na temperaturi od 4°C do ispitivanja.

**Elektronska mikroskopija u dokazivanju PD.** Lisne peteljke su poslužile kao polazni materijal za dalja ispitivanja. Delovi lisne peteljke sa listova koji su ispoljavali simptome crvenila su sečeni u fiksativu (2,5% glutaraldehyd u kakodilatnom puferu pH 7,2) i čuvani na temperaturi od 4°C 24 h. Fragmenti tkiva za histopatološka ispitivanja isečani su iz zone sporvodnih sudova i dalje obrađeni po metodi koju su opisali Hopkins i saradnici (1973). Fiksirani isečci su potapani u 1% osmijum tetroksidu 3h u mraku, na 4°C, zatim dehidrirani 2 puta po 15' u 25% etanolu i 2 puta po 15' u 50% etanolu, dalje bojeni u 1% uranilacetatu u 75% etanolu, preko noći na 4°C, pa ponovo dehidrirani u 100% eta-

nolu 4 puta na sobnoj temperaturi, iseći su zatim potapani u propilenoksid 15-20', pa u mešavinu 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 bojeni olovoacetatom. Ovako spremljeni uzorci 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 materijala, po proceduri koje je opisana u EPPO 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 i diskusija

**Simptomi.** Utvrđeno je prisustvo oba tipa simptoma crvenila kruške u pregledanim voćnjacima. Prvi tip simptoma ispoljava se u vidu **brzog sušenja**, takva stabla su bila prisutna u oba ispitivana lokaliteta na obe sorte, Ova stabla su bila zahvaćena intenzivnim crvenilom, već u mesecu julu, vrlo brzo, naročito mlade sadnice mogu poleći u zoni kalemjenja 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).



Sl. 1. Crvenilo kruške: sasušeno stablo kruške  
*Pear decline: quick decline*

Sporiji tip sušenja, bio je takodje prisutan u oba lokaliteta na obe sorte. Kod ovih stabala prvi simptomi su bili vidljivi na lišću, u vidu intenzivnog crvenjenja i uvijenosti ka licu liske, što je karakterističan simptom za crvenilo kruške (sl. 2), već početkom avgusta meseca. Ove biljke su donosile plodove, sitnije, kamene i komercijlno neupotrebljive (sl. 3).



**Sl. 2.** Crvenilo kruške: prevremeno crvenilo i uvijenost liske  
*Pear decline: premmature reddening and leaf*



**Sl. 3.** Crvenilo kruške: neupotrebljivi plodovi  
*Pear decline: useless fruits*

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

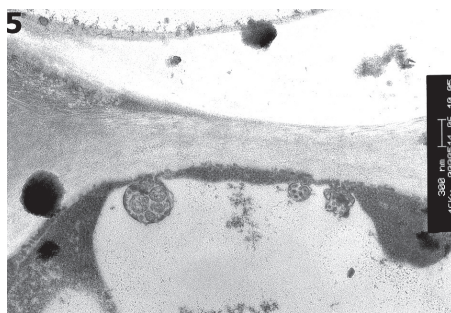


Sl. 4. Poprečni presek obolelog stabla kruške od crvenila  
*Cross section of the trunk*

Ovi rezultati potvrđuju, davno postavljenu pretpostavku da su uočeni simptomi tipa crvenila na krušci u vezi sa mikoplazmama sličnim organizmima (Vojvodić i Grbić, 1969), ali i skorije utvrđeno prisustvo ove fitoplazme na krušci Srbiji (Duduk i saradnici, 2005) i u Bosni i Hercegovini (Duduk et al., 2005), 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 prisustvu.

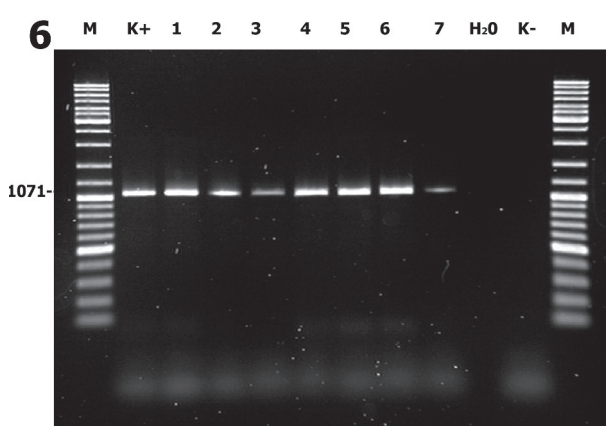
Opisani simptomi na krušci, odgovaraju u potpunosti, promenama koje su opisali mnogi istraživači vezano za crvenilo kruške (Avineent et al., 1997; Davies et al., 1992; Del Serrone, et al., 1988; Duduk et al., 2005; Garcia-Chapa et al., 2003; Jarausch et Dobsa, 1995; Schneider, 1970).

**Elektronska mikroskopija.** Na ultratankim preseccima 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 preseccima 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. 5. Fitoplazme u sprovodnim sudovima kruške  
*Phytosmas present in sieve tube of pear*





**Sl. 6.** 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

*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, cordially obtain from prof. Bertaccini*

Prikazani rezultati elektronske mikroskopije po dimenzijama, obliku i strukturi su u skladu sa opisanim rezultatima Hibino and Schneider (1970). Fitoplazme utvrđene u floemu sprovodnih sudova u lisnim nervima kruške obolele od crvenila imale su okruglast do blago izdužen oblik, dimenzija 350-480 x 600-700 nm. Navedene karakteristike, dimenzije i oblika čestica su u potpunom skladu sa podacima koje su utvrdili Hibino and Schneider (1970), koji su opisali čestice veličine od 50 do 800 nm, pri čemu su one imale izdužen i sferičan oblik.

**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. Daljom primenom specifičnog prajmera fO1/rO1 omogućili su identifikaciju do grupe fitoplazme 16SrX kojoj pripada i fitoplazma PD (slika 5).

### Zaključak

Crvenilo na krušci zaokuplja pažnju stručnjaka u ovoj oblasti, jer je ova pojava sve više zastupljena u Srbiji. Simptomi crvenila su primećeni u više lokaliteta širom Srbije u manjim zasadima, ili na pojedinačnim stablima, obzirom da je broj većih komercijalnih zasada kruške poslednjih godina znatno smanjen.

Imajući u vidu činjenicu da je u prirodi šire *Cacopsylla pyricola* (Davies et al., 1992; Jensen et al., 1964) i *C. pyri* (Avinent et al., 1997; Carraro et al., 1998), kao prva i osnov-

na mera borbe protiv crvenila kruške je 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 uvođenje 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, prouzrokovачa proliferacije jabuke. U svakom slučaju, jedan od ciljeva budućih istraživanja trebalo bi da bude analiza medjuodnosa plemki kruške i podloga na koje su kalemljene.

## Literatura

1. *Avinent, L., Llacer, G., Almacellas, J., Tora, R. (1997): Pear decline in Spain. Plant Pathol. 46:694-698.*
2. *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.*
3. *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.*
4. *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). Progrès agricole et viticole 98: 835-838.*
5. *Cvetković, B. (1976): Decay of pears in Dalmatia. Propadanje krušaka u Dalmaciji. Biljna zaštita, 3: 104-105.*
6. *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.*
7. *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.*
8. *Duduk, B, Botti, S., Trkulja, V., Ivanović, M., Stojčić, J., Bertaccini, A. (2005): Occurrence of pear decline phytoplasmas in Bosnia and Hercegovina. Journal of Plant Pathology, 87: 75.*
9. *Duduk, B., Ivanović, M., Obradović, A. (2005): First Report of Pear Decline Phytoplasmas on Pear in Serbia. Plant Disease, 89, 774.*
10. *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.*
11. *Hibino, H., Schneider, H. (1970): Mycoplasma-like Bodies in Sieve Tubers of Pear Trees Affected with Pear Decline. Phytopathology, 60: 499-501.*

12. *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.
13. *Jensen, D.D., Griggs, W.H, Gonzales, C.Q, Schneider, H. (1964):* Pear decline virus transmission by pear psylla. *Phytopathology* 54: 1346-1351.
14. *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.
15. *Lee I. M., Gundersen-Rindal D. E., Davis R. E., and Bartoszyk I. M. (1998) Revised classification sheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. International Journal of Szstematic Bacteriology, 48: 1153-1169.*
16. *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 cpecifically localize phytoplasma in plant cells. *Molecular and cellular probes*, 13: 41-47.
17. *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.*
18. *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.
19. *OEPP/EPPPO Bulletin 36 :121-125*
20. *Quaroni, S., Saracchi, M., Fortusini, A., Belli, G. (1991):* Investigations by scanning wlvctron microscopy on grapevines affected by «Flavescende dorée». *Proceedings of the 10th Meeting of ICVG, Volos, Greece, 446-449.*
21. *Schneider, H. (1970):* Graft transmission and host range of pear decline causal agent. *Phytopathology*, 60: 204-207.
22. *Trkulja, V., Duduk, B., Botti, S., Ivanović, M., Stojčić, J., Bertaccini, A.(2004):* Pear decline phytoplasma – novi patogen kruške u Bosni i Hercegovini. *Zbornik rezimea V Kongresa o zaštiti bilja, Zlaibor, 140-142.*
23. *Vojvodić i Grbić, (1969):* Pear decline in Vojvodina plantations. *Propadanje kruške u plantažnim zasadima Vojvodine. I Kongres mikrobiologa Jugoslavije, Beograd, 1: 722-726.*



## PEAR DECLINE PHYTOPLASMAS IN SERBIA

*M. Starović, Ž. Ivanović, G. Aleksić, S. Kuzmanović, S. Stojanović, S. Živković,  
V. Gavrilović\**

### Summary

Symptoms of Pear decline (PD) have been observed in commercial orchards in Serbia a few years ago. First appearance of PD in Vojvodina have dated from 1969 year (Vojvodić and Grbić, 1969). Duduk et al., 2005. by using PCR method proved the presence of PD in the Central Serbia. On territory of ex Yugoslavia, this phytoplasma had found in part of Dalmatia (Cvjetković, 1976), and in Republic of Srpska (Trkulja et al., 2004).

Typical symptoms of PD were observed in commercial orchards on two years old pears during the August of 2004, in the locality Deč, and in the beginning of september 2007, in the locality Crvenka. The original material for these investigations was collected for the electron micrography and PCR identification.

On the ultrathin cross-sections of conductive vessels of the main leaf vein, organisms corresponding to phytoplasmas in shape, size and structure were observed at the electron microscope. The dimensions of phytoplasmas cells were from 350-480 x 600-700nm. The PCR identification by using specific primers fO1/rO1 proved the presence of PD.

**Key words:** pear, phytoplasma disease, electron microscopy, molecular detection

---

\* Mira Starović, Ph. D., gavrnm@yahoo.com, Žarko Ivanović, B. Sc., Goran Aleksić, Ph. D., Slobodan Kuzmanović, Ph. D., Saša Stojanović, Ph. D., Svetlana Živković, M. Sc., Veljko Gavrilović, Ph.D. Institute for Plant Protection and Environment, Belgrade, Teodora Drajzera 9, 11000 Beograd