

Karakterizacija i fiziološka specijalizacija *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* patogena paradajza u Srbiji

Svetlana Milijašević¹ i Aleksa Obradović²

¹Institut "Srbija", Centar za pesticide i zaštitu životne sredine, Beograd-Zemun

²Poljoprivredni fakultet, Beograd-Zemun

REZIME

Iz uzoraka obolelih biljaka paradajza sa simptomima bakteriozne pegavosti lišća i krastavosti plodova, prikupljenih sa nekoliko lokaliteta u Srbiji, tokom poslednjih godina, izolovani su sojevi bakterija. U cilju identifikacije, proučene su njihove patogene, morfološke, odgajivačke i biohemijско-fiziološke karakteristike.

Na osnovu rezultata istraživanja utvrđeno je da svi proučavani sojevi pripadaju bakteriji *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Okabe) Yang, Dye et Wilkie 1978. Primenom lančane reakcije polimeraze (PCR) u genomu proučavanih sojeva potvrđeno je prisustvo gena koji determinišu stvaranje fitotoksina koronatina, što se smatra diferencijalnom karakteristikom *P. s. pv. tomato*.

Razlike ispoljene u reakciji inokulisanih biljaka diferencijalne sorte paradajza Ontario 7710, ukazuju da naši sojevi pripadaju rasama **0** i **1** bakterije *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*.

Ključne reči: Bakteriozna pegavost lišća; krastavost plodova; paradajz; *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*; PCR; koronatin; rase

UVOD

Sve intenzivnija proizvodnja paradajza u našoj zemlji stvara povoljne uslove za čestu pojavu raznih prouzrokovaca bolesti ove povrtarske vrste. Među njima, osim gljiva, značajno mesto zauzimaju i fitopatogene bakterije (Arsenijević i Jovanović, 1993; Obradović i sar., 2000, 2001, 2003. i 2004).

Osetljivost sortimenta, pojava novih fizioloških rasa patogena i pogodni klimatski uslovi za razvoj bolesti, osnovni su uzroci sve češće pojave

Pseudomonas syringae pv. *tomato* (Okabe) Yang, Dye et Wilkie 1978, poslednjih godina kao patogena paradajza (Arsenijević i Radusin, 1981; Pešić, 1984; Arsenijević i Jovanović, 1993). Značajne štete nanosi naročito tokom vlažnog proleća, pa se danas pored *Xanthomonas vesicatoria* svrstava u ekonomski značajnije bakterioze paradajza (Arsenijević, 1986. i 1997). *P. s. pv. tomato* ne samo što prouzrokuje krastavost plodova paradajza čineći ih neprivlačnim za tržište, čime je ekonomski efekat proizvodnje znatno smanjen, već može umanjiti prinos za

5-75 %, a gubici su utoliko veći ukoliko je infekcija biljaka nastupila ranije tokom sezone (Bonn i Gitaitis, 1985).

Pouzdana dijagnoza bolesti zahteva izolaciju patogena, dobijanje čistih kultura i proučavanje njegovih biohemijskih, fizioloških i patogenih odlika. Međutim, ove metode zahtevaju dosta materijala, vremena i rada. Korišćenje seroloških metoda i bakteriofaga u identifikaciji *P. s. pv. tomato*, takođe je moguće, ali su ove metode ponekad nedovoljno specifične da bi poslužile kao dijagnostički test za ovu bakteriju (Fackrel i Sinha, 1983; Jones i sar., 1983; Cuppels, 1984). U novije vreme identifikacija *P. s. pv. tomato* uglavnom se zasniva na: (1) izolaciji bakterija na poluselektivne podloge (VBTar); (2) umnožavanju fragmenta DNK, pri čemu se kao proba koristi gen za sintezu koronatina (Cuppels i Elmhirst, 1999); i (3) korišćenju savremenih seroloških metoda, kao što su IFAS ili ELISA (Zaccardelli i sar., 2003).

P. s. pv. tomato odlikuje se sposobnošću stvaranja fitotoksina koronatina karakterističnog za patogene varijetete: *tomato*, *atropurpurea*, *glycinea*, *maculicola* i *morsprunorum*, ali ne i za *pv. syringae* (Mitchell, 1982; Cuppels i saradnici, 1990; Wiebe i Campbell, 1993). Ova karakteristika je od važnosti za razlikovanje, inače biohemijski i fiziološki veoma sličnih, patogenih varijeteta *tomato* i *syringae*, jer je i *pv. syringae* zabeležen kao patogen paradajza, ali bez većeg ekonomskog značaja.

Razvojem metoda molekularne biologije Bender i saradnici (1989) otkrili su da je gen koji determiniše sintezu koronatina lociran na specifičnom plazmidu *P. s. pv. tomato*. Na osnovu sekvence ovog gena, Bereswill i saradnici (1994) razvili su metod detekcije ove bakterije zasnovan na lančanom umnožavanju specifičnog fragmenta DNK (PCR metod).

I pored otkrića više gena otpornosti prema ovoj bakteriji, svega je nekoliko otpornih sorti paradajza komercijalno dostupno. Osim toga, pojačan selekcion pritisak, nastao gajenjem hibrida paradajza otpornih prema u svetu predominantnoj rasi **0**, uslovio je pojavu nove fiziološke rase (**1**) i na hibridima paradajza nosiocima gena otpornosti (*Pto*) u heterozigotnom stanju (Buonaurio i sar., 1996).

Cilj ovog rada bio je prikupljanje većeg broja uzoraka obolelih biljaka, poreklom sa raznih lokaliteta u Srbiji, izolacija prouzrokovala oboljenja, proučavanje njegovih bakterioloških i patogenih karakteristika i identifikacija fizioloških

rasa patogena. Na taj način se stvaraju preduslovi za testiranje osetljivosti selekcionog materijala i rad na stvaranju otpornih sorti paradajza prema patogenu.

MATERIJAL I METODE

Izolovanje patogena

Usled učestale pojave bakteriozne pegavosti lišća i krastavosti plodova paradajza, tokom poslednjih nekoliko godina prikupljeni su uzorci obolelih biljnih delova (lišća i plodova) paradajza poreklom sa različitih lokaliteta. Bakterije su izolovane iz macerata fragmenata biljnog tkiva, uzetih na prelazu zdravog i obolelog tkiva listova i plodova paradajza, standardnom metodom razmaza po površini mesopeptonske podloge (MPA) i King-ove podloge B, u Petri kutijama prečnika 90 mm (Arsenijević, 1997; Schaad i sar., 2001). Posle 2-3 dana razvoja na temperaturi od 26°C, prenošenjem pojedinačnih kolonija na zakošenu mesopeptonsku podlogu sa 2% glicerola (NAG) izdvojene su čiste kulture bakterije (Klement i sar., 1990).

Ovim postupkom izolovan je veći broj sojeva bakterija, od kojih je za proučavanje odabrano 37. Osim izolovanih sojeva, proučavanja su obuhvatila i sojeve iz kolekcije fitopatogenih bakterija Poljoprivrednog fakulteta u Beogradu-Zemunu (KFB-62, KFB-63, KFB-64, KFB-65, KFB-66 i KFB-67).

U svim testovima korišćene su kulture bakterija gajene 24 časa na temperaturi od 26°C. Sojevi bakterija su održavani periodičnim presejavanjem, a čuvani su na podlozi s kvasčevim ekstraktom i CaCO₃ (YDC) u epruvetama na temperaturi od 4°C, i u sterilnoj vodi u mikroeprevetama na sobnoj temperaturi.

Kao kontrola korišćeni su determinisani sojevi bakterije *P. s. pv. tomato*: Pst CNBP 1323/97 iz Francuske (Collection National de Bacteries Phytopathogenes, Angers, France), DAPP-PG 214 (rasa **0**) i DAPP-PG 213 (rasa **1**) iz Italije (dr R. Buonaurio, Dipartimento di Arboricoltura e Protezione delle Piante, Perugia) i BMG-13 (rasa **1**) i DC-84-1 (rasa **0**) iz Kanade (dr D. Cuppels, Agriculture & Agri-Food Canada, Southern Crop Protection & Food Research, London, Ontario).

Provera patogenosti

Patogenost sojeva izolovanih iz obolelih listova i plodova paradajza, proveravana je prskanjem

biljaka paradajza sorte Saint Pierre. Za proveru patogenosti, biljke paradajza gajene su u gotovom, sterilisanom supstratu "B Medium Course" proizvođača Floragard, u saksijama (prečnika 10 cm) u stakleniku. Inokulisane su biljke u fazi 4-5 stalnih listova. Korišćena je suspenzija bakterija gustine 10^8 ćel/ml, koja je podešena pomoću Mc Farland-ove skale, a potvrđena tehnikom zasejavanja razređenja inokuluma i brojanja bakterija koje su se razvile na mesopeptonskoj podlozi posle 48 sati (Klement i sar., 1990).

Kontrolne biljke su tretirane na isti način, destilovanom vodom. Inokulisane biljke održavane su u vlažnoj sredini, pod plastičnim kesama 48 sati od inokulacije, a potom u fitotronsnoj komori, na temperaturi 25-27°C, relativnoj vlažnosti vazduha 75-80% i dvanaestočasovnoj smeni dana i noći.

Bakteriološke odlike

U cilju identifikacije izolovanih sojeva patogena paradajza, proučene su njihove sledeće bakteriološke karakteristike: razlikovanje po Gramu, stvaranje fluorescentnog pigmenta na King-ovoj podlozi B, oksidativno-fermentativni metabolizam glukoze; stvaranje levana (L), aktivnost oksidaze (O), trulež kriški krompira (P), aktivnost arginin dehidrolaze (A), hipersenzitivna reakcija duvana (T) (LOPAT testovi); hidroliza skroba, želatina i eskulina; hidroliza estra oleinske kiseline, stvaranje fermenta katalaze; korišćenje sorbitola, manitola, inozitola, eritritola i l-laktata; i sposobnost stvaranja čestica leda (Lellott i Stead, 1987; Schaad i sar., 2001).

Primena lančane reakcije polimeraze (PCR) u detekciji patogena

Za specifičnu detekciju sojeva *P. s. pv. tomato* koji proizvode fitotoksin koronatin, korišćena je reakcija lančanog umnožavanja fragmenta nukleinske kiseline (PCR) po metodi Bereswill i saradnici, (1994); modifikovana korišćenjem Ready Mix Red Taq PCR Reaction Mix sa $MgCl_2$ ("Sigma").

Korišćen je set prajmera koji amplifikuje dijagnostičke PCR produkte veličine 650 baznih parova (bp) sledeće sekvence:

Prajmer 1: 5' GGCGCTCCCTCGCACTT 3'

Prajmer 2: 5' GGTATTGGCGGGGGTGC 3'

PCR smeša pripremljena je dodavanjem sledećih komponenta:

1. Red Taq (1.5 U taq DNK polimeraza, 10mM tris-HCl, 50mM KCl, 1.5mM $MgCl_2$, 0.001% želatin, 0.2mM dNTP, stabilizatori).....12.5 μ l
 2. Prajmer 1 (20 μ M).....1.0 μ l
 3. Prajmer 2 (20 μ M).....1.0 μ l
 4. Sterilna destilovana ili "ultra čista" voda9.5 μ l
- Ukupna zapremina: 24.0 μ l +1 μ l uzorka DNK = 25 μ l

Kao pozitivna kontrola korišćen je determinisani soj *P. s. pv. tomato* - Pst CNBP 1323/97, a kao negativna - "ultra čista" voda. Prethodno su mikroeprove s pripremljenim uzorkom DNK, kao i pozitivnom kontrolom, centrifugirane. Kao uzorak DNK korišćene su cele bakterijske ćelije bez prethodne izolacije DNK, iz suspenzije bakterije koncentracije 10^6 ćel/ml. Koncentracija suspenzije podešena je korišćenjem Mc Farland-ove skale, a potvrđena tehnikom zasejavanja razređenja inokuluma i brojanja bakterija koje su se razvile na mesopeptonskoj podlozi posle 48 sati (Klement i sar., 1990).

Uslovi PCR reakcije:

1 ciklus

- denaturacija uzorka (93°C - 2 minuta)

37 ciklusa

- denaturacija DNK (93°C - 2 minuta)
- vezivanje prajmera (67°C - 1 minut)
- sinteza fragmenta DNK (72°C - 2 minuta)

1 ciklus

- hlađenje do 4°C

PCR produkti su analizirani odmah po završenoj reakciji.

Analiza PCR produkata

Fragmenti nukleinske kiseline, dobijeni reakcijom lančanog umnožavanja, detektovani su elektroforezom u 1.5 % agaroznom gelu u koji je prethodno dodat etidijum bromid (do finalne koncentracije 0.005%). Kao DNK marker korišćen je "Low Mass Ladder" a elektroforetsko razdvajanje dobijenih komponenta trajalo je 40 minuta, pri naponu od 100 V i jačini struje od 100 mA, u kadici za elektroforezu dimenzija 11.5 x 14 cm. Gel je posmatran u UV transiluminatoru i fotografisan.

Pozitivno je ocenjivan PCR test u kome je detektovan specifični produkt amplifikacije veličine 650 bp, uz uslov da isti nije zabeležen u uzorcima koji predstavljaju negativnu kontrolu.

Identifikacija fizioloških rasa patogena

Zastupljenost pojedinih fizioloških rasa *P. s. pv. tomato* među proučavanim sojevima određena je prskanjem biljaka paradajza sorte Ontario 7710, nosioca gena otpornosti (*Pto*) prema rasi 0 ovog patogena. Pojava tipičnih simptoma znak je kompatibilnog odnosa patogena i domaćina i ukazuje na prisustvo rase 1 *P. s. pv. tomato* (Buonaurio i sar., 1996).

Prisustvo gena otpornosti (*Pto*) u biljkama Ontario 7710 provereno je prskanjem organofosfornim insekticidom fention (0.75 ml/L), koji ispoljava fitotoksičan efekat prema *Pto+* genotipovima paradajza (Laterrot, 1985, *loc. cit.* Buonaurio i sar., 1996). Kao kontrola korišćene su biljke paradajza sorte Saint Pierre.

Biljke diferencijalne sorte paradajza inokulisane su u fazi četiri stalna lista prskanjem suspenzijom bakterija (10^8 ćel/ml). Koncentracija inokuluma podešena je pomoću Mc Farland-ove skale, a proverena tehnikom brojanja bakterija koje su se razvile na ravnoj mesopeptonskoj podlozi nakon 48 sati (Klement i sar., 1990).

Kao kontrola korišćeni su sojevi *P. s. pv. tomato*: DAPP -PG 214 (rasa 0) i DAPP- PG 213 (rasa 1) iz Italije i BMG-13 (rasa 1) i DC-84-1 (rasa 0) iz Kanade, a kao negativna kontrola biljke paradajza tretirane su destilovanom vodom.

Biljke su posle inokulacije održavane u vlažnoj sredini tokom 48 sati, a potom u stakleniku na temperaturi od 25°C i relativnoj vlažnosti vazduha 75%.

Promene na veštački inokulisanim biljkama paradajza praćene su svakodnevno, a rezultati su očitavani sedam dana posle inokulacije.

REZULTATI

Simptomi bolesti

Prvi simptomi bakteriozne pegavosti lišća paradajza gajenog u polju, zapažaju se tokom juna, naročito posle kišnog perioda. Simptomi bolesti uočavaju se na svim nadzemnim delovima biljke. Prvi znaci bolesti ispoljavaju se u vidu vlažno-zelenih pega na listu, koje usled nekroze tkiva dobijaju tamnomrku do skoro crnu ili čađavu boju, sa uočljivim hlorotičnim oreolom. Pege se vremenom šire i spajaju, te nastaje nekroza veće površine lisnog tkiva usled čega se ono deformiše, zaostaje u porastu

i na kraju izumire (Slika 1). Pegavost zahvata i stablo na kome se formiraju najpre vlažne pege s tamnim centrom, koje kasnije postaju čađavog izgleda, dok su na cvasti crne i sitne. Pege na plodu su u početku sitne, crne, ovičene vlažnom zonom. Vremenom se uvećavaju i postaju čađavocrne sa žućkastim ili belim oreolom.



Sl. 1. Simptomi bakteriozne pegavosti na listu paradajza - prirodna zaraza

Fig. 1. Bacterial speck symptoms on tomato leaves - natural infection

Patogene odlike proučavanih sojeva

Prilikom provere patogenosti proučavanih sojeva, zapažene su razlike u vremenu pojave i intenzitetu ispoljavanja simptoma biljaka paradajza sorte Saint Pierre inokulisanih prskanjem. Na osnovu tih razlika sojevi su svrstani u dve grupe. Prva grupa sojeva prouzrokovala je početne promene na lišću 4-5 dana posle inokulacije. Veličina pega i njihova brojnost znatno su manji u odnosu na one prouzrokovane drugom grupom sojeva. S lica i naličja lista uočavaju se vlažno-zelene pege. Na mlađem lišću, četiri dana od inokulacije, pege su sitne (prečnika 1-2 mm), mrke boje i ovičene jasno uočljivim žućkastim

oreolom širine 2-3 mm (Slika 2). Vremenom, pege postaju brojnije, uvećavaju se uz istovremeno širenje hlorotičnog oreola, a lišće se deformiše. Na starijem



Sl. 2. *P. s. pv. tomato* (soj P-100) - tamnomrke pege, sa hlorotičnim oreolom na inokulisanom listu paradajza sorte Saint Pierre

Fig. 2. *P. s. pv. tomato* (strain P-100) - dark lesions with chlorotic halo on inoculated leaves of tomato cv. Saint Pierre

lišću, šest dana nakon inokulacije, pege dobijaju svetlomrku boju usled nekroze tkiva. Nakon 6-7 dana od inokulacije, nekroza se širi i pege se spajaju, dobijajući tamnomrku boju, naročito duž nerava (na starijem lišću). Istovremeno okolno tkivo žuti. Izostaje nekroza dela liske između nerava.

Druga grupa sojeva prouzrokovala je prve promene na lišću već tri dana posle inokulacije prskanjem. Nakon početnih simptoma u vidu vlažno-zelenih pega, na mladem lišću uočavaju se sitne pege (prečnika 1-2 mm), mrke boje, sa izraženim hlorotičnim oreolom širine 2-3 mm, ali znatno brojnije od onih koje prouzrokuju sojevi prve grupe, zahvatajući znatan deo površine lista (Slika 3). Kasnije se veličina i broj pega uvećavaju, a njihovim širenjem i spajanjem dolazi do nekroze veće površine tkiva liske, što je karakterističan

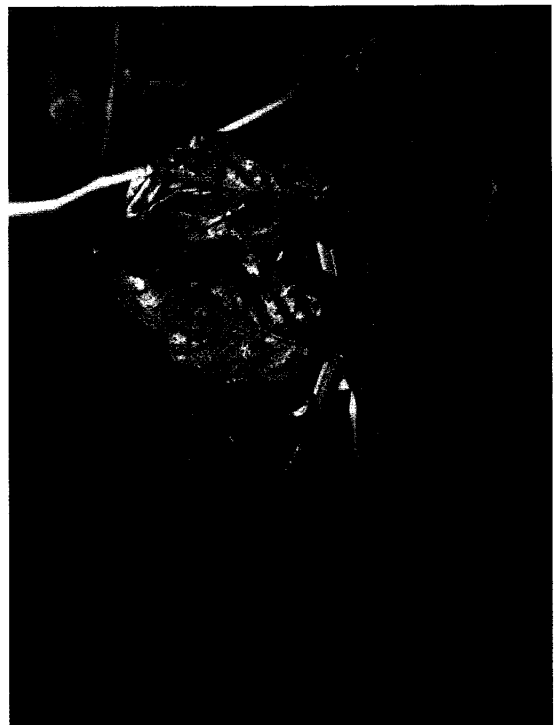
simptom za ovu grupu sojeva. Spajanjem pega i izumiranjem većeg dela tkiva između nerava, zaraženo lišće se deformiše, dobijajući mrkocrnu, a delimično i žutu boju, i na kraju izumire.

Kontrolni soj *P. s. pv. tomato* DC-84-1 prouzrokuje simptome slične sojevima prve grupe posle veštačke inokulacije prskanjem paradajza sorte Saint Pierre.

Biohemijsko-fiziološke odlike

Na mesopeptonskoj podlozi, tri dana od zasejavanja, uočavaju se bele, sjajne, okruglaste, blago ispupčene kolonije, prečnika 2-3 mm.

Bakterije proučavanih sojeva su Gram-negativne, stvaraju zeleni fluorescentni pigment na King-ovoj podlozi B, a glukozu razlažu oksidativnim putem.

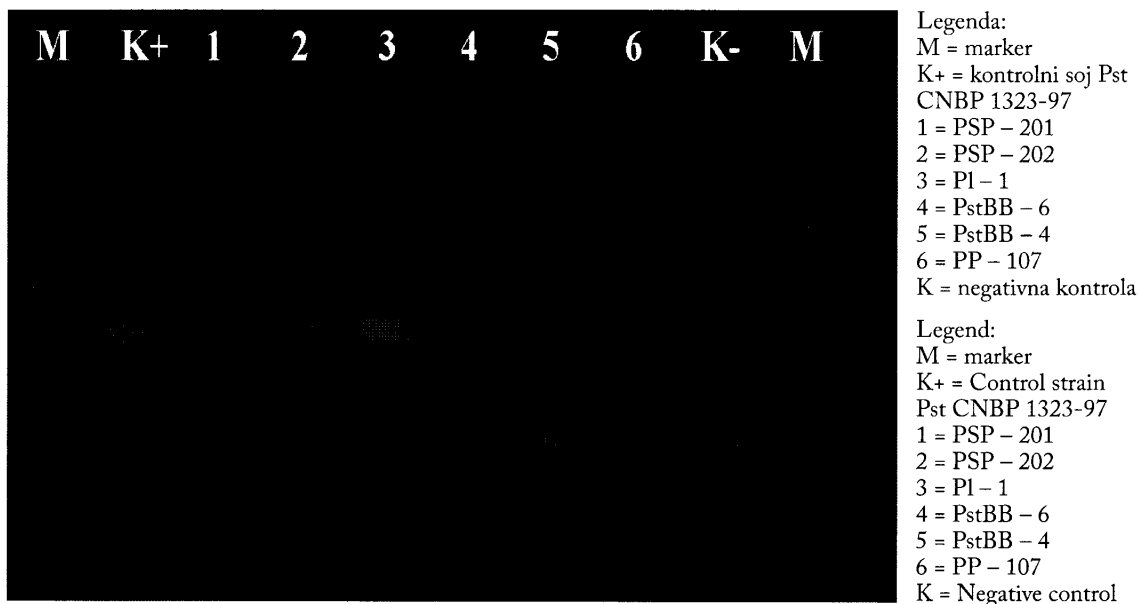


Sl. 3. *P. s. pv. tomato* (soj PstBB-11) - nekroza inokulisanog lista paradajza sorte Saint Pierre

Fig. 3. *P. s. pv. tomato* (soj PstBB-11) - necrosis on inoculated leaves of tomato cv. Saint Pierre

Na osnovu ispoljenih karakteristika u navedenim testovima, naši sojevi pripadaju grupi fluorescentnih bakterija roda *Pseudomonas*.

Naši sojevi, kao i kontrolni iz Kanade (DC-84-1), stvaraju karakteristične kolonije "levan tip" posle tri



Sl. 4. Amplifikacija specifičnog DNK fragmenata *cft*-gena veličine 650 bp

Fig. 4. Amplification of specific 650 bp DNA fragment of *cft*-gene

dana razvoja na podlozi obogaćenju sa 5% saharoze (NAS). Proučavani sojevi ne stvaraju ferment oksidazu, ni arginin dehidrolazu, niti prouzrokuju trulež kriški krompira, a hipersenzitivnu reakciju lista duvana prouzrokuju tokom 24 časa. Rezultati LOPAT testova ukazuju da proučavani sojevi poseduju karakteristike grupe Ia bakterija roda *Pseudomonas*.

Proučavani sojevi kao i kontrolni iz Kanade (DC-84-1), razlažu želatin i eskulin, stvaraju ferment katalazu, a ne stvaraju amilazu i lipazu; metabolišu polihidroksilne alkohole: sorbitol, manitol i inozitol. Takođe, sojevi iz paradajza ne koriste eritritol i l-laktate kao izvor ugljenika, niti stvaraju čestice leda (Tabela 1). Nasuprot tome, kontrolni soj *P. s. pv. syringae* (Me-3) poreklom iz maline metaboliše eritritol i l-laktate i odlikuje se sposobnošću stvaranja čestica leda. Na osnovu dobijenih rezultata, svi proučavani sojevi poseduju karakteristike bakterije *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*.

Detekcija gena koji determiniše stvaranje fitotoksina koronatina primenom PCR

Kao rezultat lančane reakcije polimeraze, korišćenjem prajmera 1 i 2, i vizuelizacijom produkata nakon elektroforeze u agaroznom gelu, detektovani su fragmenti nukleinske kiseline veličine 650

baznih parova, specifični za sojeve *P. s. pv. tomato* koji stvaraju fitotoksin koronatin (Slika 4).

Fiziološke rase patogena

Biljke paradajza sorte Ontario 7710, tretirane fentionom, ispoljile su nekrotične pege na lišću pet dana posle tretmana, čime je potvrđeno da su one nosioci gena otpornosti (*Pto*). Na kontrolnim biljkama paradajza sorte Saint Pierre, nisu zapaženi navedeni simptomi.

Reakcija diferencijalne sorte paradajza ukazuje da proučavani sojevi *P. s. pv. tomato* pripadaju dvema rasama ovog patogena (Tabela 2). Rasi 0 *P. s. pv. tomato* pripadaju sojevi koji, kao i kontrolni sojevi DAPP-PG 214 (rasa 0) iz Italije i DC-84-1 (rasa 0) iz Kanade, ne prouzrokuju simptome na biljkama Ontario 7710 sedam dana posle inokulacije. Preostali sojevi, koji prouzrokuju simptome kompatibilne reakcije na biljkama sorte Ontario 7710 identične onima koje prouzrokuju kontrolni sojevi rase 1 DAPP-PG 213 iz Italije i BMG-13 iz Kanade, pripadaju rasi 1 (Slike 5 i 6).

DISKUSIJA

U svetu je do sada pronađeno i proučeno više vrsta bakterija, prouzrokovaca raznih promena na

Tabela 1. Biohemijsko-fiziološke odlike proučavanih sojeva *P. s. pv. tomato***Table 1.** Biochemical and physiological characteristics of the investigated *P. s. pv. tomato* strains

Sojevi Strains	Proučavani sojevi Investigated strains (37)	Kontrola Check (DC-84-1)
Poreklo – Origin	Srbija – Serbia	Kanada – Canada
Test:		
Bojenje po Gramu Gram stain	-	-
Stvaranje fluorescentnog pigmenta na KB ¹ podlozi Fluorescence on KB medium	+	+
O/F ² metabolizam glukoze Glucose (O/F) metabolism	O	O
Stvaranje levana Levan production	+	+
Aktivnost oksidaze Oxidase activity	-	-
Trulež kriški krompira Potato rot (pectolitic activity)	-	-
Aktivnost arginin dehidrolaze Arginine dehidrolase activity	-	-
Hipersenzitivna reakcija duvana Tobacco hypersensitivity	+	+
Razlaganje skroba Amylase production	-	-
Razgradnja želatina Gelatine hydrolysis	+	+
Hidroliza eskulina Aesculin hydrolysis	+	+
Hidroliza Tween 80 Tween 80 hydrolysis	-	-
Stvaranje katalaze Catalase production	+	+
Korišćenje ugljenika iz: Carbohydrate utilisation:		
• sorbitola/sorbitol	+	+
• manitola/manitol	+	+
• inozitola/inositol	+	+
• eritritola/erythritol	-	-
• l-laktata/l-lactate	-	-
Stvaranje čestica leda Ice nucleation	-	-

Legenda: + = pozitivna reakcija; - = negativna reakcija; O = oksidativni metabolizam glukoze,

1 = Kingova podloga B; 2 = oksidativno-fermentativni metabolizam glukoze

Legend: + = Positive reaction; - = Negative reaction; O = Oxidative metabolism of glucose;

1 = King 's medium B; 2 = Oxidative-fermentative metabolism of glucose

Tabela 2. Diferencijacija rasa proučavanih sojeva *P. s. pv. tomato***Table 2.** Race differentiation of investigated *P. s. pv. tomato* strains

Proučavani sojevi Strains investigated	Broj sojeva No. of strains	Sorta Saint Pierre Cv. Saint Pierre	Sorta Ontario 7710 Cv. Ontario 7710	Rase Races
Domaći sojevi Serbian strains	21 16	+ +	- +	0 1
DAPP PG 214*	1	+	-	0
DAPP PG 213*	1	+	+	1
DC- 84 -1**	1	+	-	0
BMG-13**	1	+	+	1

Legenda: * kontrolni sojevi poreklom iz Italije; ** kontrolni sojevi poreklom iz Kanade; + = kompatibilna reakcija; - = inkompatibilna reakcija

Legend: * Control strains originating from Italy; ** Control strains originating from Canada; + = Compatible reaction; - = incompatible reaction

parazitiranim biljkama paradajza (pegavost, uvelost, vlažna trulež, rak i dr.) (Jones, 1991). Pri povoljnim uslovima temperature i vlažnosti, bakterije paraziti paradajza ugrožavaju proizvodnju tokom čitave sezone, počev od najranijih faza razvoja, kako u zaštićenom prostoru, tako i u polju (Arsenijević i Radusin, 1981; Pešić, 1984; Arsenijević i Jovanović, 1993; Arsenijević, 1994, Obradović i sar., 2000, 2001. i 2003).

Već duži niz godina, svojom učestalom pojavom *P. s. pv. tomato* izaziva ekonomski značajne i simptomatološki karakteristične promene, kako na lišću, tako i na plodovima obolelih biljaka paradajza (Arsenijević i Radusin, 1981; Pešić, 1984; Arsenijević i Jovanović, 1993).

Usled jakog intenziteta pojave crne pegavosti lišća i krastavosti plodova tokom poslednjih nekoliko godina, prikupljeni su brojni uzorci biljaka paradajza sa navedenim simptomima. Izolacijom na mesopeptonskoj i King-ovoj podlozi B, dobijen je veći broj sojeva bakterija. U cilju identifikacije izolovanih sojeva, primenom klasičnih i savremenih fitobakterioloških metoda proučene su njihove patogene i biohemijsko-fiziološke karakteristike, kao i delimična struktura genoma.

Kohovi postulati potvrđeni su veštačkom inokulacijom lišća paradajza, kao i reizolacijom bakterija iz inokulisanih biljaka. Proučavani sojevi ispoljili su visok stepen patogenosti, slično onima nastalim u uslovima prirodne zaraze. Međutim, zapažene su razlike u vremenu pojave i intenzitetu ispoljavanja simptoma oboljenja na inokulisanim biljkama sorte Saint Pierre, na osnovu čega su sojevi svrstani u dve grupe. Veličina pega i njihova

brojnost znatno su manji na biljkama inokulisanim prvom grupom sojeva (Slika 2) u odnosu na one prouzrokovane drugom grupom sojeva (Slika 3). Takođe, izostaje i nekroza dela liske između nerava, nastala spajanjem pega, koja je karakteristična za drugu grupu sojeva.

Rezultati proučavanja bakterioloških odlika sojeva izolovanih iz paradajza, kao i zajedničke odlike sa kontrolnim sojem DC-84-1, potvrdili su da se radi o bakteriji *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Tabela 1).

Razvojem tehnika molekularne biologije, informacije o strukturi genoma fitopatogenih mikroorganizama postale su dostupne i obezbedile su novi pristup detekciji patogena. Uvođenje molekularnih metoda, najpre hibridizacije nukleinskih kiselina, a potom i lančane reakcije polimeraze (PCR), omogućilo je pouzdanu i brzu dijagnozu, odnosno utvrđivanje prisustva patogena u ispitivanom uzorku, kao i za diferencijaciju najnižih taksonomskih kategorija bakterija. Nakon otkrića Bender i saradnika (1989) da je gen koji determiniše sintezu koronatina lociran na specifičnom plazmidu *P. s. pv. tomato*, Bereswill i saradnici (1994) razvili su metod za identifikaciju ove bakterije zasnovan na lančanom umnožavanju specifičnog fragmenta DNK (PCR metod). Metode Cuppels i saradnika (1990) i Bereswill i saradnika (1994) pokazale su se naročito pogodnim u detekciji *P. s. pv. tomato* na asimptomatičnom lišću paradajza, kao i lišću i plodovima paradajza sa simptomima.

U našim istraživanjima, kao rezultat lančane reakcije polimeraze po metodi Bereswill i saradnici (1994) detektovani su fragmenti nukleinske kiseline



Sl. 5. Odsustvo simptoma na paradajzu sorte Ontario 7710 inokulisanim sojem P-107 (rasa 0)

Fig. 5. Symptomless tomato plants of cv. Ontario 7710 inoculated with P-107 strain (race 0)

veličine 650 baznih parova, specifični za sojeve *P. s. pv. tomato* koji stvaraju fitotoksin koronatin (Slika 4). Iako najnovija istraživanja ukazuju na postojanje tzv. Cor - sojeva *P. s. pv. tomato* koji ne poseduju gen za stvaranje koronatina, zbog čega je moguće dobiti lažno negativne rezultate korišćenjem ove metode (Zaccardelli i sar., 2003), u našim istraživanjima ovakvi sojevi nisu detektovani.

Na osnovu razlika ispoljenih u reakciji inokulisanih biljaka diferencijalne sorte paradajza Ontario 7710, utvrđeno je da naši sojevi pripadaju rasama 0 i 1 proučavane bakterije. Od 37 sojeva *P. s. pv. tomato*, rasi 0 pripada 21, a rasi 1 - 16 sojeva (Tabela 2). Pojavu obe rase bakterije u Kanadi prethodno su saopštili Lawton i MacNeil (1986), a potom i Bogačevska (1989) u Bugarskoj. Ovo je prvo saopštenje o pojavi rase 1 *P. s. pv. tomato* u Srbiji. Takođe, u Italiji su Buonauro i saradnici (1996) otkrili pojavu rase 1 na sortama paradajza koje su nosioci gena otpornosti (*Pto*) u heterozigotnom stanju.

Pojava novih rasa patogena, nakon uvođenja u proizvodnju otpornih genotipova, poznat je

fenomen u složenim odnosima domaćin-patogen (Mew i sar., 1992). U našoj zemlji ova pojava se može objasniti sa nekoliko stanovišta. Jedna od mogućnosti je postojanje rase 1 u prirodnoj populaciji bakterije. Druga, ne manje verovatna, je pojačan selekcionni pritisak nastao gajenjem novih sorti i hibrida paradajza iz uvoza u individualnom sektoru. Ne treba isključiti ni verovatnoću unošenja nove rase putem razmene semena i plodova u svežem stanju sa susednim zemljama u kojima je rasa 1 bakterije prisutna.

Naša istraživanja pokazala su da je rasa 1 bila dominantna na paradajzu u okolini Šapca tokom 2002. godine. Međutim, sveukupni rezultati ukazuju na predominantno prisustvo rase 0. Ova činjenica upozorava na važnost poznavanja rasnog sastava bakterije u našoj zemlji u pojedinim



Sl. 6. Sitne tamnomrke pege na lišću paradajza sorte Ontario 7710 inokulisanim sojem PstBB-6 (rasa 1)

Fig. 6. Small dark brown lesions on the leaves of tomato cv. Ontario 7710 inoculated with strain PstBB-6 (race 1)

područjima gajenja paradajza, zbog mogućnosti izbora genotipova otpornih prema dominantnoj rasi. Sve ovo ukazuje i na neophodnost testiranja osetljivosti najčešće gajenih hibrida paradajza u našoj zemlji prema rasama bakterije, kao i otkrivanje

novih izvora otpornosti. Posledice uvođenja u proizvodnju genotipova paradajza otpornih prema rasi **0**, kao i pojava rase **1** na sortama paradajza koje su nosioci gena otpornosti (*Pto*) u heterozigotnom stanju (Buonaurio i sar., 1996), nameću potrebu za pronalaženjem novih izvora otpornosti sposobnih da prevaziđu pojavu novih rasa patogena. Stockinger i Walling (1994), su otkrili nove gene otpornosti (*Pto3* i *Pto4*) u *Lycopersicon hirsutum* var. *glabratum*, sposobne da zaustave rasu **0**, odnosno, rasu **1** bakterije. Unošenje ovih dominantnih gena u komercijalne genotipove paradajza značajno bi doprinelo sprečavanju pojave ovog oboljenja.

LITERATURA

- Arsenijević, M.:** Prouzrokovac crne pegavosti lišća i krastavosti plodova paradajza- *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Okabe 1933) Young, Dye et Wilkie 1978. Glasnik zaštite bilja, 1, 1986.
- Arsenijević, M.:** Karakteristike bakterije *Pseudomonas* sp., patogena paradajza. Zaštita bilja, 210: 257-271, 1994.
- Arsenijević, M.:** Bakterioze biljaka. "S-Print", Novi Sad, 1997.
- Arsenijević, M. i Radusin, N.:** Etiološka proučavanja bakteriozne pegavosti i truleži paradajza. Zaštita bilja, 157: 293-305, 1981.
- Arsenijević, M. i Jovanović, O.:** *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* parazit rasada paradajza. Zaštita bilja, 203: 73-83, 1993.
- Bender, C. L., Malvick, D. K. and Mitchel, R. E.:** Plasmid mediated production of the phytotoxin coronatine in *Pseudomonas syringae*. J. Bacteriol., 171: 807-812, 1989.
- Bereswill, S., Bugert, P., Völksch, B., Ullrich, M., Bender, C. L. and Geider, K.:** Identification and relatedness of coronatine-producing *Pseudomonas syringae* pathovars by PCR analyses and sequence determination of the amplification products. Appl. and Environm. Microbiol., 60: 2924-2930, 1994.
- Bogatevska, N. S., Sotirova, V. and Stamova, L. D.:** Race of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Okabe) Young et al. Доклады Болгарской академии наук, Томе 42, No 2: 129-130, 1989.
- Bonn, W. G. and Gitaitis, R. D.:** Epiphytic survival of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* on tomato transplants shipped from Georgia. Plant Disease, 69: 58-60, 1985.
- Buonaurio, R., Stravato, V. M. and Cappelli, C.:** Occurrence of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* race **1** in Italy on *Pto* gene-bearing tomato plants. J. Phytopathol., 144: 437-440, 1996.
- Cuppels, D. A.:** The use of pathovar-indicative bacteriophages for rapidly detecting *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* in tomato leaf and fruit lesions. Phytopathology, 74: 891-894, 1984.
- Cuppels, D.A., Moore, R.A. and Morris, V.L.:** Construction and use of a nonradioactive DNA probe for detection of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* on tomato plants. Appl. Environm. Microbiol., 56: 1743-1749, 1990.
- Cuppels, D. A. and Elmhirst, J.:** Disease development and changes in the natural *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* populations on field tomato plants. Plant Disease, 83: 759-764, 1999.
- Fackrell, H. B. and Sinha, R. C.:** Serological analyses of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Phytopathology, 73: 178-181, 1983.
- Jones, J. B., Dawe, D. L. and McCarter, S. M.:** Separation of strains of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* into serovars by three serological methods. Phytopathology, 73: 573-576, 1983.
- Jones, J. B.:** *Diseases Caused by Bacteria*. In: Compendium of Tomato Diseases (Jones, Jones, Stall, and Zitter, eds.). APS Press, St. Paul, Minnesota, USA, 1991.
- Klement, Z., Rudolf, K. and Sands, D.:** Methods in phytobacteriology. Akademiai Kiado, Budapest, Hungary, 1990.
- Lavton, M. B. and MacNeill, B. H.:** Occurrence of race **1** of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* on field tomato in southwestern Ontario. Can. J. Plant Pathol., 8: 85-88, 1986.
- Lelliott, R. A. and Stead, D. E.:** Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK, 1987.
- Mew, T. W., Vera Cruz, C. M. and Medalla, E. S.:** Changes in race frequency of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in response to rice cultivars planted in Philippines. Plant Disease, 76: 1029-1032, 1992.
- Mitchell, R. E.:** Coronatine production by some phytopathogenic *Pseudomonads*. Physiol. Plant Pathol., 20: 83-89, 1982.
- Obradović, A., Mavridis, A., Rudolph, K. and Arsenijević, M.:** Bacterial spot of capsicum and tomato in Yugoslavia. EPPO Bulletin, 30: 333-336, 2000.
- Obradović, A., Mavridis, A., Rudolph, K. and Zdravković, J.:** Sudden appearance of the tomato race of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in Yugoslavia. In: Plant Pathogenic Bacteria (Solke H. De Boer, ed.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 2001, pp. 350-352.
- Obradović, A., Jones, J. B., Minsavage, G. V., Dickstein, E. R. and Momol, M. T.:** *Pseudomonas buttiensis* Associated With Leaf Necrosis and Blighting of Tomato Seedlings in the Greenhouse. In: "Pseudomonas syringae and Related Pathogens - Biology and Genetic" (N. S. Iacobellis, A. Collmer, S. W. Hutcheson, J. W. Mansfield, C. E. Morris, J. Murillo, N. W. Schaad, D. E. Stead, G. Surico, and M. Ullrich, eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 2003, pp. 627-630.
- Obradović, A., Mavridis, A., Rudolph, K., Janse, J. D., Arsenijević, M., Jones, J. B., Minsavage, G. V. and Wang, J. F.:** Characterization and PCR-based typing of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* from peppers and tomatoes in Serbia. Eur. J. Plant Pathol. 110 (3): 285-292, 2004.
- Pešić, D.:** Prouzrokovaci bakteriozne pegavosti paradajza

s posebnim osvrtom na *Pseudomonas tomato* (Okabe) Alstat. Magistarska teza, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad, 1984.

Schaad, N., Jones, J. B. and Chun, W.: Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA, 2001.

Stockinger, E. J. and Walling, L. L.: *Pto3* and *Pto4*: novel genes from *Lycopersicon hirsutum* var. *glabratum* that confer resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Theor. Appl. Genet., 7-8: 879-884, 1994.

Wiebe, W. L. and Campbell, R. N.: Characterisation of *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* and comparison with *P. s.* pv. *tomato*. Plant Disease, 77: 414-419, 1993.

Zaccardelli, M., Spasiano, A., Merighi, M. and Bazzi, C.: Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* by PCR. In: *Pseudomonas syringae* and Related Pathogens. Biology and Genetic. (Iacobellis, N., Colmer, A., Hutcheson, S. W., Mansfield, J. W., Morris, C. E., Murillo, J., Schaad, N. W., Stead, D., Surico, G. and Ullrich, M., eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 2003, pp. 553-558.

Characterisation and Physiological Specialisation of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* - Tomato Pathogen in Serbia

SUMMARY

During the past few years, a frequent appearance of bacterial speck of tomatoes was observed in all tomato growing areas in Serbia. Phytobacteriological analyses of the diseased plant samples, collected from different localities, showed that symptoms were caused by phytopathogenic bacteria.

In order to identify isolated bacteria, their pathogenic, morfological, cultural, biochemical and physiological characteristics were studied. Based on the results of these studies, it was determined that investigated strains belonged to *P. s.* pv. *tomato*.

Coronatine producing strains of *P. s.* pv. *tomato* were detected by polymerase chain reaction.

Reaction of tomato differential cultivar Ontario 7710 indicated that out of 37 strains 21 belonged to races **0** and 16 to race **1** of *P. s.* pv. *tomato*.

Keywords: Bacterial speck, tomato, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, PCR, coronatine, race