

Trkulja, V., Brkljač Gordana, Zavišić Nada, Misimović, M.,
Vukojević Dragana, Mihić Jelena, Koščica, M.¹

Znanstveni rad

ETIOLOŠKA PROUČAVANJA POJAVE NEKROZE CVJETOVA I MLADICA KRUŠKE U SJEVEROZA- PADNOM DIJELU BOSNE I HERCEGOVINE

Sažetak

Tijekom travnja, svibnja i lipnja 2008. godine u pojedinim zasadima kruške na području sjeverozapadnog dijela Bosne i Hercegovine uočene su pojedinačne biljke s izraženim specifičnim simptomima nekroze i izumiranja cvjetova i mladica. Postotak napadnutih biljaka je bio različit, a kretao se i do 20%, pri čemu je došlo da značajnih ekonomskih šteta. Na osnovu postignutih rezultata dobivenih pri proučavanju patogenih, uzgajivačkih i biokemijsko-fizioloških odlika pet odabranih izolata, možemo zaključiti da svi pripadaju fitopatogenoj bakteriji *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* van Hal – uzročniku bakteriozne pjegavosti i uvenulosti zeljastih biljaka i rak-rana i bakterioznog izumiranja kruške i drugih voćaka.

Ključne riječi: kruška, izolati bakterije, patogene, morfološke, uzgajivačke i biokemijsko-fiziološke odlike, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*.

Uvod

Tijekom travnja, svibnja i lipnja 2008. godine u pojedinim zasadima kruške na području sjeverozapadnog dijela Bosne i Hercegovine uočene su pojedinačne biljke, pa i do 20% njih, s izraženim specifičnim simptomima nekroze i izumiranja cvjetova i mladica. U vrijeme cvjetanja, na oboljelim biljkama kruške je uočena pojava sušenja cvjetova i grančica, pri čemu su simptomi naročito bili izraženi pri vrhu krune. U početnim fazama razvoja oboljenja, inficirani cvjetovi i grančice poprimili su smeđu boju. Razvojem bolesti oboljeli cvjetovi, kao i napadnuto lišće i grančice, dobivali su intenzivno crnu boju, što je rezultiralo sušenjem i izumiranjem zahvaćenih dijelova. Također, kod jače inficiranih biljaka kruške uočena je pojava pucanja i izumiranja kore i sušenje pojedinačnih grana. Činjenica da slične simptome može uzrokovati nekoliko različitih patogena, te izražena bojazan voćara od pojave bakteriozne plamenjače, čiji je uzročnik fitopatogena bakterija *Erwinia amylovora* (Burill) Winslow *et al.*, poslužila nam je kao povod da u ovom radu proučimo etiologiju bolesti i neke značajnije patogene, morfo-

¹ doc.dr. Vojislav Trkulja; Gordana Brkljač, dipl.ing.; Nada Zavišić, dipl.ing.; Milutin Misimović, dipl.ing.; Dragana Vukojević, dipl.ing.; Jelena Mihić, dipl.ing.; Milan Koščica, dipl.ing.; Poljoprivredni institut RS, Banja Luka

loške, uzgajivačke i biokemijsko-fiziološke odlike izoliranog parazita, njenog uzročnika.

Materijal i metode

1. *Materijal.* Iz nekoliko voćnjaka sa šireg područja sjeverozapadnog dijela Bosne i Hercegovine prikupljen je veći broj uzoraka oboljelih mladica kruške s izraženim specifičnim simptomima izumiranja cvjetova i nekroze tkiva. Izraženi simptomi ukazivali su nam da je bolest vjerojatno bakteriozne prirode, zbog čega smo pristupili izolaciji i identifikaciji patogena.

2. *Izoliranje i odabiranje izolata za rad.* Bakterije su izolirane na mesopeptonskoj (MP) podlozi uobičajenim postupkom (Arsenijević, 1992., 1997.). Sitni komadi oboljelog tkiva kruške, uzeti s prijelaza oboljelog i zdravog tkiva, aseptično su, pomoću skalpela, izdvojeni i postavljeni u mužare sa sterilnom destiliranom vodom. Gnječenjem dobijeni macerat posijan je razmazom na mesopeptonsku podlogu u Petrijeve zdjelice. Poslije 48 sati razvoja u termostatu, pri 25°C razvile su se pojedinačne kolonije bakterija. Njihovim prosijavanjem na kosu mesopeptonsku podlogu dobiven je veći broj čistih kultura tog patogena.

Za dalje proučavanje odabrano je pet izolata (Kš-84, Kš-89, Kš-91, Kš-92 i Kš-101) izrazite agresivnosti izražene u testovima patogenosti (tab. 1). Vitalnost proučavanih izolata održavana je češćim prosijavanjem kultura ili zalijevanjem parafinskim uljem.

3. *Patogenost.* Za preliminarnu provjeru patogenosti dobivenih izolata bakterije korištene su kriške krumpira i list muškatele. U prethodno pripremljene otvore na kriškama krumpira, postavljenim na vlažan filter papir u Petrijevu zdjelicu, nalivena je suspenzija bakterija koncentracije 10⁸ cfu/ml, dok je radi utvrđivanja uzrokovanja hipersenzibilne reakcije lišće muškatele infiltrirano, pomoću medicinskog šprica, bakterijskom suspenzijom proučavanih izolata bakterije gustine 10⁷ cfu/ml. Samo izolati uzročnici truleži inokuliranih kriški krumpira odabrani su za druge testove patogenosti i dalji eksperimentalni rad.

Ocjena rezultata pojave truleži kriški krumpira vršena je poslije tri dana, dok je hipersenzibilna reakcija (HR) duhana evidentirana nakon 24 sata.

Patogene odlike odabranih izolata bakterija proučene su i inokulacijom zdravih, ujednačenih mladica i plodića tri sorte kruške i to: viljamovke, pasakrasane i lipanjske ljepotice, kao i plodića trešnje sorte lionska rana. Inokulacija je vršena ubodom u tkivo mladice i plodića kruške i trešnje, nanošenjem kapi bakterijske suspenzije proučavanih izolata na mjesto uboda, pomoću sterilne bakteriološke igle. Pri tome je korištena suspenzija bakterija gustoće 10⁸ cfu/ml. Mjesto uboda u tkivo mladice kruške omotano je navlaženom vatom i staniol folijom, radi održavanja vlage potrebne za ostvarenje infekcije. Za

svaku sortu postavljena je i kontrola, odnosno kontrolne mladice i plodići koji su umjesto suspenzijom proučavanih sojeva bakterije inokulirani običnom vodom. Tako inokulirane mladice i plodići su zatim postavljeni u vlažnu komoru, pri sobnoj temperaturi.

Nastale promjene na inokuliranim mladicama i plodićima ocijenjene su poslije 10 dana. Pojava nekroze na mjestu inokulacije smatrana je pozitivnom reakcijom, dok je odsustvo bilo kakvih promjena ocijenjeno negativno.

4. *Bakteriološke karakteristike izolata.* Morfološke karakteristike odabranih izolata bakterija proučene su korištenjem svjetlosnog mikroskopa, dok je bojenje po Gramu utvrđeno pomoću 3% KOH (Arsenijević, 1988., 1992.; Arsenijević i Olivera Jovanović, 1995.).

Od uzgajivačkih odlika proučen je razvoj bakterija na mesopeptonskoj podlozi, kao i pojava fluorescentnog pigmenta na Kingovoj podlozi B (Fahy i Persley, 1983.; *loc. cit.* Arsenijević, 1992., 1997.).

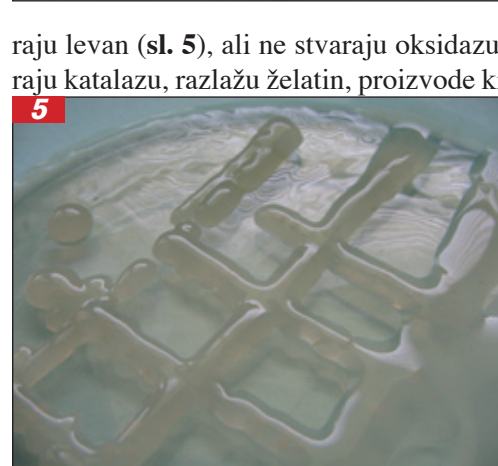
Od biokemijsko-fizioloških karakteristika proučeno je stvaranje katalaze i čestica leda, O/F test metabolizma glukoze, LOPAT testovi, kao i razlaganje želatina i stvaranje kiseline iz saharoze (Fahy i Persley, 1983.; Lelliott i Stead, 1987.; Schaad, 1988.; Arsenijević, 1992., 1997.).

Rezultati

Simptomi bolesti

U vrijeme cvjetanja, na oboljelim biljkama kruške je uočena pojava sušenja cvjetova i grančica, pri čemu su simptomi naročito bili izraženi pri vrhu krune. U početnim fazama razvoja oboljenja, inficirani cvjetovi i grančice poprimili su smeđu boju (sl. 1).

Razvojem bolesti oboljeli cvjetovi, kao i napadnuto lišće i grančice, dobivali su intenzivno crnu boju (sl. 2), što je rezultiralo sušenjem i izumiranjem zahvaćenih dijelova.



Također, kod jače inficiranih stabala kruške uočena je i pojava pucanja i izumiranja kore i sušenje pojedinačnih jače zahvaćenih grana (sl. 3).

Patogenost

Svi proučavani izolati bakterije uzrokuju nekrozu inokuliranih mladica i plodića sve tri testirane sorte kruške, kao i plodića testirane sorte trešnje, i među njima nije utvrđena značajna razlika u izražavanju osjetljivosti prema tom patogenu (sl. 4).

Morfološke, uzgajivačke i biokemijsko-fiziološke odlike

Promatrane pod svjetlosnim mikroskopom bakterije svih pet proučavanih izolata uočavaju se u vidu kraćih štapića, zaobljenih krajeva, bez spora, koji se prema Gramu boje negativno.

Na mesopeptonskoj podlozi svi proučavani izolati stvaraju blago ispupčene, sjajne i okruglaste kolonije, bjeličastokrem boje, dok na Kingovoj podlozi B stvaraju zeleni fluorescentni pigment. Svi izolati proučavane bakterije uzrokuju hipersenzibilnu reakciju na listu muškatele i ne izazivaju trulež kriški krumpira, stvaraju levan (sl. 5), ali ne stvaraju oksidazu i arginin dehidrolazu (LOPAT +---+), te stvaraju katalazu, razlažu želatin, proizvode kiselinu iz saharoze, stvaraju čestice leda (sl. 6),



dok glukozu razlažu oksidativno, ali ne i fermentativno (tab. 1).

Tab. 1. Bakteriološke odlike proučavanih izolata

Testovi	Izolati					Literatura
	Kš-84	Kš-89	Kš-91	Kš-92	Kš-101	<i>P. s. pv. syringae</i>
Razvoj na levanovoj podlozi	+	+	+	+	+	+
Stvaranje oksidaze	-	-	-	-	-	-
Trulež kriški krumpira	-	-	-	-	-	-
Metabolizam arganina	-	-	-	-	-	-
Hipersenzibilna reakcija	+	+	+	+	+	+
O/F test metabolizma	-	-	-	-	-	-
Razlaganje želatina	+	+	+	+	+	+
Stvaranje kiseline iz saharoze	+	+	+	+	+	+

Rasprava

U mnogim zemljama na krušci se pojavljuju simptomi nekroze i izumiranja cvjetova i mladica. Oboljeli cvjetovi su u početku smeđi, a kasnije postaju crni kao i napadnuto lišće, plodovi i grančice. Na starijim granama javlja se pucanje i izumiranje kore, kao i nekroza ksilema. U uvjetima jače zaraze dolazi do sušenja pojedinih grana (sl. 1-3).

U pojedinim zasadima kruške na području sjeverozapadnog dijela Bosne i Hercegovine uočene su pojedinačne biljke, pa i do 20% njih, s izraženim specifičnim simptomima nekroze i izumiranja cvjetova i mladica. U Fitopatološkoj laboratoriji Poljoprivrednog instituta RS u Banja Luci, gdje su dostavljeni uzorci i vršena dalja analiza, iz većeg broja prikupljenih uzoraka oboljelih cvjetova i mladica kruške s većeg broja lokaliteta dobio je veći broj izolata bakterije od kojih je za daljnja proučavanja odabrano pet izolata (Kš-84, Kš-89, Kš-91, Kš-92 i Kš-101) izrazite agresivnosti izražene u preliminarnim testovima patogenosti.

Sudeći na osnovi postignutih rezultata dobivenih pri proučavanju patogenih, morfoloških, uzgajivačkih i biokemijsko-fizioloških odlika pet odabranih izolata, možemo zaključiti da svi pripadaju fitopatogenoj bakteriji *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* van Hal – uzročniku bakteriozne pjegavosti i uvenulosti zeljastih biljaka i rak-rana i bakterioznog izumiranja voćaka.

Pojavu sličnih simptoma može uzrokovati i fitopatogena bakterija *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum*, ali se njihova pouzdana determinacija vrši u laboratorijama na osnovi razlika u patogenim, uzgajivačkim, biokemijsko-fiziološkim i molekularnim karakteristikama.

P. s. pv. syringae je vrlo rasprostranjen parazit u cijelom svijetu te predstavlja jednog od najštetnijih patogena kruške uopće. Taj parazit se vrlo teško suzbija, a u praksi se najčešće koriste preventivne mjere zaštite. U jesen i tijekom zime, kroz razne povrede

na kruni i deblu, a naročito preko orezanih dijelova na granama, kao i preko pupoljaka, ta bakterija prodire u biljno tkivo vršeći infekciju raznih dijelova kruške. Obično se na oboljelim voćkama zapaža prisustvo rak-rana na osnovnim granama ili deblu, što dovodi do izumiranja pojedinih grana ili čitavog stabla. Rezidba voćaka bez provođenja dezinfekcijskih mjera omogućava širenje zaraze. Smatra se da se na ovaj način, preko orezanih grana, parazit prenosi u 50-70% slučajeva. Na mjestu ostvarene infekcije formira se tipična rak-rana, ponekad s prisustvom smole. Pokazalo se da poslije infekcije debela nastaje izumiranje cijele voćke, a da se kod zaraze grana suše samo pojedini dijelovi voćaka. S obzirom da povrede u kruni voćaka nastale rezidbom ili na deblu, zbog mehaničkog udara pri obradi, predstavljaju veliku opasnost u pogledu nastanka infekcije, jer služe kao otvori za prodiranje bakterija i naseljavanje tkiva, moraju se svesti na najmanju mjeru. Idealno bi bilo poslije rezidbe voćaka na mjestu presjeka izvršiti dezinfekciju povrijeđenog tkiva, kao i obaveznu dezinfekciju pribora pri rezidbi. Isto tako, oboljele grane treba sasjeci i uništiti. Pri tome treba zahvatiti desetak i više cm zdravog dijela kako bi se sa sigurnošću eliminiralo oboljelo tkivo (Smith *et al.*, 1988.; Arsenijević, 1997.).

Ipak, prema Peljto i sur. (2007.) uspješno suzbijanje *P. s. pv. syringae* može se ostvariti samo uz korištenje integralnih mjera borbe. One podrazumijevaju provođenje niza preventivnih mjera koje prije svega osiguravaju dobru kondiciju i optimalno zdravstveno stanje voćaka te minimaliziraju mogućnost nastajanja stresa kod njih. Neki od faktora stresa koji povećavaju osjetljivost kruške prema tom patogenu su povrede zbog smrzavanja, razne rane i povrede, oštećenja od nematoda, infekcije fitopatogenim gljivama iz roda *Leucostoma* i *Nectria* i sl.. U voćnjacima treba redovito poduzimati i sve fitosanitarne mjere, koje podrazumijevaju redovito uklanjanje rak-rana i jače oboljelih biljaka, kako bi se smanjio infekcijski potencijal parazita. Rezidbu voćaka treba obavljati kada se ne očekuju padaline i kada su voćke manje osjetljive prema tim patogenima (od ljeta do jeseni). I izboru mjesta za podizanje mladih voćnjaka, kao i pravilnom odabiru podloge i sorte, koje su prilagođene specifičnim uvjetima određene regije, trebalo bi posvetiti posebnu pažnju.

Za kemijsko suzbijanje *P. s. pv. syringae* mogu se koristiti preparati na bazi bakra, pri čemu se preporučuju dva tretiranja, i to: prvo, u proljeće prije cvjetanja voćaka i drugo u jesen, poslije opadanja lišća. Bolji rezultati se ipak postižu kada se s tretiranjem otpočne početkom opadanja lišća, budući da ta tretiranja reduciraju epifitnu populaciju bakterija, te tako smanjuju izvor zaraze posredstvom kojeg nastaje infekcija grana i grančica kroz ožiljke nastale opadanjem lišća. Zbog toga, pojedini autori u jesen preporučuju tri tretmana bakrenim preparatima, i to: sredinom kolovoza, početkom rujna i početkom listopada, pri čemu se kod prva dva prskanja bakrenim preparatima dodaje pamučno ulje radi smanjenja fitotoksičnosti.

Pojedine sorte kruške, pokazuju nejednaku osjetljivost prema tom parazitu, što se povezuje s otpornošću podloge koja se koristi pri cijepljenju, kao i s visinom na kojoj

se cijepljenje izvodi, zbog čega se preporučuje izbor otporne podloge i cijepljenje „na visoko”. Na kraju, potrebno je voditi računa i o tome da se sve oboljele voćke iz nasada na vrijeme uklone, a njihova mjesta dezinficiraju. Preporučuju su i redovite i poboljšane agrotehničke mjere u periodu aktivnog razvoja stabala kruške jer se na taj način povećava njihova otpornost. Preprati na bazi bakra i neki antibiotici omogućavaju djelimičnu zaštitu.

Zaključak

Na osnovi rezultata postignutih tijekom navedenih proučavanja mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- svi proučavani izolati bakterije uzrokuju nekrozu inokuliranih mladica i plodića sve tri testirane sorte kruške, kao i plodića trešnje, među kojima nije utvrđena značajna razlika u izražavanju osjetljivosti prema tom patogenu
- promatrane pod svjetlosnim mikroskopom bakterije proučavanih izolata uočavaju se u vidu kraćih štapića, zaobljenih krajeva, bez spora, koji se prema Gramu boje negativno
- na mesopeptonskoj podlozi svi proučavani izolati stvaraju blago ispupčene, sjajne i okruglaste kolonije, bjeličastokrem boje, dok na Kingovoj podlozi B stvaraju zeleni fluorescentni pigment
- svi izolati proučavane bakterije stvaraju levan, ne stvaraju oksidazu, ne izazivaju trulež kriški krumpira, ne stvaraju arginin dehidrolazu, ali uzrokuju hipersenzibilnu reakciju na listu muškatele (LOPAT +---+).
- svi proučavni izolati stvaraju katalazu, razlažu želatin, proizvode kiselinu iz saharoze, dok glukozu razlažu oksidativno, ali ne i fermentativno.

Na osnovi postignutih rezultata dobivenih pri proučavanju patogenih, morfoloških, uzgajivačkih i biokemijsko-fizioloških odlika pet odabranih izolata porijeklom s kruške, možemo zaključiti da svi pripadaju fitopatogenoj bakteriji *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* van Hal – uzročniku bakteriozne pjegavosti i uvenulosti zeljastih biljaka i rakrana i bakterioznog izumiranja kruške i drugih voćaka.

Daljnja proučavanja te bolesti, odnosno njenog uzročnika, s ciljem pronalazačenja adekvatnih mjera borbe, što je posebno važno s obzirom na ekonomski značaj bolesti, su u tijeku.

Literatura

- Arsenijević, M. (1992.): Fitopatogene bakterije. Naučna knjiga, Beograd.
- Arsenijević, M. (1997.): Bakterioze biljaka (Treće izmijenjeno i dopunjeno izdanje). "S Print", Novi Sad.
- Arsenijević, M., Jovanović, Olivera (1995.): Nov postupak razlikovanja bakterija po Gramu. Zaštita bilja 211: 57-62, Beograd.
- Fahy, P.C., Hayward, A.C. (1983.): Media and Methods for Isolation and Diagnostic Tests. In: "Plant Bacterial Diseases - A Diagnostic Guide" (Edited by P. C. Fahy and G. J. Presley). Academic Press, Sydney, Australia.
- Lelliott, R.A., Stead, D.E. (1987.): Methods for the Diagnostic of Bacterial of Plants. British Society of Plant Pathology, Blackwell Scientific Publications, Oxford London Edinburgh.
- Peljto, Amela, Trkulja, V., Ostojčić, I., Rotim, N., Đikić, Mirha (2007.): Suzbijanje bolesti, štetnika i korova koštičavih voćaka. Društvo za zaštitu bilja u Bosni i Hercegovini.
- Schaad, N.W. (1980.): Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota.
- Smith, I.M., Dunez, J., Phillips, D.H., Lelliott, R.A., Archer, S.A. (1988.): European Handbook of Plant Diseases. Blackwell Scientific Publications, Oxford-London-Edinburgh.

Scientific study

ETIOLOGICAL STUDIES OF APPEARANCE OF NECROSIS OF FLOWERS AND PEAR SHOOTS IN NORTHWEST BOSNIA AND HERZEGOVINA

Summary

*Individual plants with evident symptoms of necrosis and extinction of flowers and browses were noted in individual pear orchards on territory of northwest Bosnia and Herzegovina, during April, May and June in 2008. The percentage of affected plants varied and it was up to 20%, which caused significant economic damages. Based on the results obtained by studying pathogen, morphological, cultivating and biochemical-physiological characteristics of five chosen isolates, we can conclude that they all belong to phytopathogenic bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* van Hal – which is the cause of bacterial spotting and wilting of herbaceous plants, canker and bacterial dying out of pear and other fruit-trees.*

Key words: pear, isolates of bacteria, pathogen, morphological, cultivating and biochemical-physiological characteristics, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*.