
GLASILO BILJNE ZAŠTITE

GODINA XVI

TRAVANJ - SVIBANJ

BROJ 3

Ivana KRIŽANAC¹, Jelena PLAVEC¹, Bogdan CVJETKOVIĆ²
 Hrvatski centar za poljoprivredu, hranu i selo, Zavod za zaštitu bilja¹
 Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet²
 ivana.krizanac@hcphs.hr

BAKTERIJSKI RAK TREŠNJE I VIŠNJE

SAŽETAK

Bakterijski rak trešnje i višnje uzrokuju dva patovara bakterije *Pseudomonas syringae*: pv. *syringae* van Hall i pv. *morsprunorum* (Wormald) Young *et al.* Oba patogena varijeteta uzrokuju vrlo slične simptome koji mogu varirati ovisno o virulentnosti soja, starosti stabla i osjetljivosti kultivara. Trešnja je najosjetljivija na tu bakteriozu iako sve koštičave voćke mogu biti zaražene. Zaraze su obično povezane s duljim hladnim i vlažnim razdobljima, kasnim proljetnim mrazovima ili olujnom kišom koja oštećuje cvat i listove. U 2014. i 2015. godini analizirali smo više uzoraka trešnje. Identificirana su oba patovara *Pseudomonas syringae* u uzorcima trešnje i višnje iz Međimurske, Zadarske i Slavonsko-baranjske županije.

Ključne riječi: *Pseudomonas syringae*, patovar, detekcija, identifikacija, PCR

UVOD

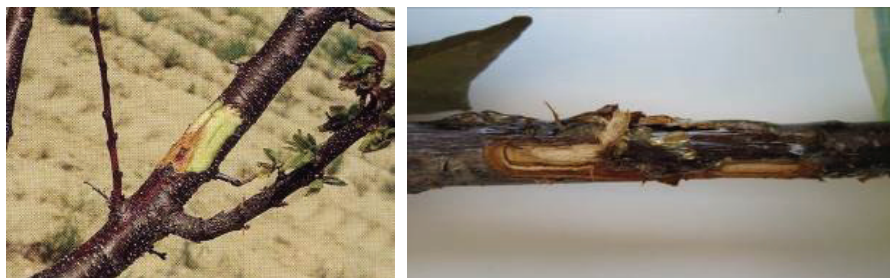
Višnje i trešnje se u Hrvatskoj uzgajaju na nešto više od 3500 ha, a urod je oscilirao od 10825 do 16980 tona u razdoblju od 2010. do 2014. godine (Anonim 2015). Neujednačenost uroda uzrokovale su nepovoljne klimatske prilike i napadi štetnih organizama (Vončina i sur. 2014), pa su u pojedinim godinama urodi bili smanjeni (Šubić 2016.). Bakterijski rak trešnje uzrokuju dva patovara bakterije *Pseudomonas syringae*: pv. *syringae* van Hall i pv. *morsprunorum* (Wormald) Young *et al.* Oba patogena varijeteta uzrokuju vrlo slične simptome koji mogu varirati ovisno o virulentnosti soja, vremenu infekcije, starosti stabla i osjetljivosti kultivara. Jače zaraze su često povezane s duljim hladnim i vlažnim razdobljima, kasnim proljetnim mrazovima ili olujnom kišom koja oštećuje cvat i listove. Bolest se češće javlja na teškim zbitim tlima, koja nisu idealna za uzgoj koštičavih voćaka, a i na tlima s nedostatkom kalija. Da bi se sa sigurnošću identificirala vrsta, a napose patogeni varijetet bakterije, potrebno je koristiti više metoda i kombinirati njihove rezultate da bi se postavila konačna dijagnoza. Najčešće se koriste klasične mikrobiološke tehnike (uzgoj bakterijske kulture na hranjivoj ili selektivnoj

podlozi, biokemijski i nutritivni testovi) u kombinaciji s brzim serološkim ili molekularnim metodama i testom patogenosti. *Pseudomonas syringae* jest Gram-negativna bakterija koja pripada rodu *Pseudomonas sensu stricto* u γ podrazredu proteobakterija. Jedna je od najvažnijih fitopatogenih bakterija, velike raznolikosti, širokoga kruga biljaka domaćina koji uključuje brojne vrste voćaka, povrća i ukrasnoga bilja te više od 50 opisanih patogenih varijeteta (patovara). Bakterija je aerobna, štapičasta i pokreće se pomoću jednog ili nekoliko polarnih bičeva.

Znaci bolesti mogu se pojaviti na gotovo svim vidljivim dijelovima stabla: izbojcima, granama, deblu, listovima i plodovima. Simptomi ovise o sorti, starosti stabla, soju bakterije i drugim čimbenicima. Rak-rane mogu nastati na stablu i granama. Najčešće nastaju na mladicama, i to na mjestu na kojem je cvjetna stapka pričvršćena za izbojak, ali mogu nastati i na mjestima povreda ili rana. Na mjestu infekcije kora zaraženih mladica i grana puca i nastaju rak-rane. Na mjestu rak-rana pojavljuje se smola kao reakcija tkiva na prisutnost patogena (slika 1) dok provodno tkivo ispod kore mijenja boju i nastaje nekroza floema (slika 2. i 3.).



Slika 1. Smola iznad rak-rane (snimila J. Plavec)



Slika 2. i 3. Nekroza floema (snimila J. Plavec)

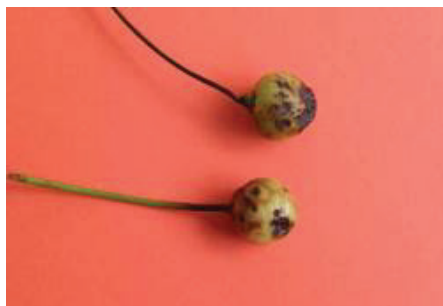
Oboljele mladice zaostaju u porastu, požute i suše se. Deblje zaražene grane također usporeno rastu, a kad rak rana obuhvati cijelu granu, ona se osuši. Za jakih zaraza djelomično se ili potpuno suše čitava stabla.

Kad je zaraza već prisutna, pupovi se ne otvore i ostaju sasušeni na mladici. Ako infekcija nastane tijekom otvaranja pupova, zaraženi lisni i cvjetni pupovi uopće se ne otvore, a drugi ostanu uspavani, kasnije kreću i kolabiraju početkom

ljeta. Uz zaraženi pup na mladici se može primijetiti mala nekroza. Simptom paleža cvijeta javlja se kad je u prethodnoj godini zaraza lista bila jaka. Inficirani cvjetovi gube turgor, venu i na kraju se osuše, a osušeni cvjetovi često ostaju prilijepljeni uz mladicu. Kada su u proljeće razdoblja vlažnog i hladnog vremena dulja, zaraza zahvati list i plod neposredno nakon cvatnje. Na plojci lista nastaju tamno smeđe okrugle do uglate pjege katkada sa svijetlo žutim rubom. Središnji se dio pjege osuši i može ispasti pa plojka ostaje šupljikava i podsjeća na šupljikavost lista koju uzrokuje *Stigmini carpophila* (slika 4.). Pjege se mogu spojiti, osobito na rubovima plojke, zahvaćajući veću površinu lista. Suše se listovi na kojima je zahvaćena veća površina plojke. Stariji listovi rjeđe su napadnuti (adultna otpornost).



Slika 4. Listovi zaraženi *P. s. pv. Morsprunorum* (snimio M. Scortichini)



Slika 5. Zaraženi plodovi (snimio B. Cvjetković)

Zaraze ploda nisu česte, ali mogu prouzročiti znatne gubitke jer zaraženi plodovi nemaju tržišnu vrijednost. Simptomi bolesti na nezrelim, još zelenim plodovima, jesu ovalne pjege smeđe boje, a rub pjege tamnije je zelen i izgleda kao da je natopljen vodom. S vremenom tkivo odumire, a na mjestu pjege ostaje crno udubljenje sa žuto obojenim rubom (slika 5.).

Na kasnije inficiranim plodovima nastaju vlažne, tamnosmeđe pjege. Pjega na peteljci ploda tamno je smeđa i ima vodenasti rub.

Pseudomonas syringae pv. *morsprunorum* i *P. s. pv. syringae* prezimljavaju na oboljelim stablima u inficiranim pupovima i na rubovima rak-rana na kori. *P. s. pv. syringae* može se umnažati mnogo brže nego *P. s. pv. morsprunorum* pa postaje dominantan u infekcijama. Kada nema uvjeta za infekcije, oba patovara mogu preživjeti na listovima kao epifiti od cvatnje do opadanja listova, a da ne uzrokuju simptome. *P. s. pv. syringae* može uzrokovati sistemsku zarazu. Nakon prezimljenja u pupovima i rak-ranama, bakterije se počinju razmnožavati u inficiranom tkivu te se na stablu i u voćnjaku šire kišom na druge mlade biljne organe. Bakterije ulaze kroz prirodne otvore - puči i hidatode, ili kroz mehaničke ozljede tkiva biljke. Manji broj bakterija sačuva vitalnost tako što su zaštićene od vanjskih utjecaja u substomalnoj šupljini. Taj mali broj preživjelih bakterija ponovo se aktivira i postaje izvor zaraze. Bakterije u jesen, kišom, dospjevaju na izboje, pupove, grane i deblo. Infekcije se ostvaruju kroz ožiljke



Slika 6. Shematski prikaz životnoga ciklusa bakterije *Pseudomonas syringae*

koji nastaju na mjestu otpadanja lista ili kroz rane (slika 6).

Bakterija *P.s.* pv. *syringae* ali ne i *P. s.* pv. *morsprunorum*, ima široki krug domaćina te korovi i biljni ostaci mogu biti važan izvor zaraze. Razvoju bolesti pogoduju stresni uvjeti. Dolaskom proljeća, u kišovitim i vlažnim razdobljima uz obilje mladog i osjetljivog lišća, nastaju povoljni uvjeti za infekcije. Prisutnost vode na površini listova i visoka relativna vlaga najmanje 24 sata prije oluja preduvjet su jakim zarazama. U takvim okolnostima simptomi se mogu pojaviti pet dana nakon infekcije pri temperaturama od 20 do 26 °C. Povrede kore nastale od rujna do svibnja, napose od tuče, preduvjet su za infekcije grana i pojavu rak-rana. Na osnovi simptoma teško je odrediti koji je patovar uzročnik, a za sigurnu dijagnozu potrebna je laboratorijska analiza.

MATERIJALI I METODE

Na dostavljenim uzorcima bili su vidljivi simptomi koji su upućivali na moguću zarazu bakterijom *Pseudomonas syringae* (slike 1., 3. i 5.). Iz oboljelog biljnog tkiva pripremljen je ekstrakt koji je nanesen na hranjivu podlogu King's B (King i sur. 1954, prema Braun-Kiewnick i Sands, 2001.) u decimalnim razrjeđenjima. Dio biljnoga tkiva iskorišten je i za izolaciju nukleinskih kiselina DNeasy Plant Mini kitom (Quiagen). Nakon trodnevne inkubacije na 25 °C kolonije koje svojom morfologijom odgovaraju očekivanoj morfologiji za tu vrstu dalje su presađene na nove podloge da bi se uzgojila čista kultura za daljnje testove. Za izdvojene izolate smo odredili Gram-reakciju s 3% KOH (Suslow i sur. 1982) te su za test likvifikacije (razgradnje) želatine korišteni izolati za koje je potvrđeno da su Gram-negativni. Za test likvifikacije pripremljeno je po 5 ml medija (pepton 5 g/L i želatina 120 g/L vode) u epruvetama od 15 ml koje su inokulirane 24-satnom bakterijskom kulturom.

S podloga je također uzet i „presjek“ kolonija bez obzira na morfologiju te je korišten za izolaciju DNA prije navedenim kitom (bio-PCR). Da bi se potvrdila identifikacija vrste, koristili smo metodu lančane reakcije polimerazom (PCR od en. *polymerase chain reaction*) s početnicama kojima se umnaža ITS1 regija većine *P. syringae* patovara (Manceau i Horvais, 1997.).

REZULTATI I RASPRAVA

Identifikacija uzročnika bolesti počinje dobrim poznavanjem biljke domaćina i proučavanjem simptoma, što je važno i na terenu i u laboratoriju. Osim toga, pravilno i pravovremeno uzorkovanje može katkad imati odlučujući utjecaj na rezultat laboratorijske analize.

Da bi se sa sigurnošću mogli razlikovati patogeni varijeteti bakterije *Pseudomonas syringae* potrebno je provesti nekoliko testova te zajedno tumačiti dobivene rezultate. Populacije *P. s. pv. syringae* vrlo su raznolike, što je i očekivano s obzirom na to da imaju vrlo širok krug domaćina. Zbog toga biokemijski i nutritivni testovi katkad nisu jednoznačni čak i za isti patogeni varijetet.

Pokazalo se da su rezultati za molekularne metode bolji kada se koristi DNA izolirana iz uzgojenih bakterijskih kultura (bio-PCR).

U dostavljenim uzorcima trešnje i višnje potvrđena je sumnja na bakterijski rak. Ovisno o godini i porijeklu uzorka, u Hrvatskoj su identificirana oba patovara: *P. syringae* pv. *syringae* u uzorcima trešnje i *P. syringae* pv. *morsprunorum* u jednom uzorku višnje.

ZAŠTITA

O zaštiti treba razmišljati već pri podizanju voćnjaka te pri odabiru položaja za sadnju. Treba izabrati dobre položaje s povoljnim edafskim i klimatskim uvjetima za rast i razvoj voćke. Potrebno je izbjegavati mjesta na kojima se dugo zadržava vlaga u zraku i krošnji stabla, a osobito je važno izbjegavati mjesta na kojima se pojavljuju kasni proljetni mrazovi. Relativno su rezistentne neke sorte trešanja napr. Merla, Merman, Merspet, Regina i Rainier, a od višanja sorte Stevnsbär, Schattenmorelle i Kelleris 16. Otpornima se smatraju podloge Kolt, F12-1 Mazzard i Changer, a osjetljiva je Gisela 6. (Scortichini, M 1995). Rezidbom treba odstraniti sve zaražene izboje i grane te odrezane dijelove iznijeti iz voćnjaka i spaliti. Mjesta reza moraju se premazati nekom od pasta za premazivanje rana ili 2-postotnom otopinom nekog od fungicida na osnovi bakra. U programu zaštite protiv gljivičnih bolesti zaštita se provodi u dva termina fungicidima na osnovi bakra, i to jednim ili dva prskanja u jesen u vrijeme otpadanja listova te prskanjem u proljeće u doba kretanja vegetacije. Takav program daje određenu zaštitu i protiv bakterija. Lisna gnojiva koja u svom sastavu imaju bakar u kelatnom obliku s glukonskom kiselinom (Scudo, FitoLabicuper i drugi), kao i stimulatori obrambenih mehanizama u biljaka, pokazuju posredni učinak u smanjenju zaraze.

SUMMARY

BACTERIAL CANKER OF SWEET AND SOUR CHERRY

Bacterial canker of sweet and sour cherry is caused by two pathovars of

Pseudomonas syringae: pv. *syringae* van Hall and pv. *morsprunorum* (Wormald) Young *et al.* Regardless of the causal agent, symptoms can be very alike. Severity of symptoms can vary depending on the strain virulence, condition and age of the tree and between different cultivars. Infections can often be linked to prolonged periods of cold weather with high humidity, late spring frost and hail storms. In 2014 and 2015 several samples of both sweet and sour cherry from Medimurska, Zadarska and Slavonsko-baranjska counties were analysed. Both pathovars were identified in Croatia.

Keywords: *Pseudomonas syringae*, pathovar, detection, identification, PCR

Znanstveni rad

LITERATURA

Anonim (2015). Statistički ljetopis Republike Hrvatske 2015. Državni zavod za statistiku, p. 282-283.

Manceau, C. & Horvais, A. (1997). Assessment of Genetic Diversity among Strains of *Pseudomonas syringae* by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of rRNA Operons with Special Emphasis on *P. syringae* pv. *tomato*. Applied and environmental microbiology 63: 498–505.

Braun-Kiewnick, A. & Sands, D. C. (2001). *Pseudomonas*. U: Schaad, N. W., Jones J. B. & Chun, W (ur.) Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. Third Edition, APS Press, 84-120.

Scortichini, M. (1995). Malattie batteriche delle colture agrarie. Edagricole, 297 300

Šubić, M. (2016). Mogućnosti i ograničenja suzbijanja štetnih organizama u suvremenim nasadima trešnje pri globalnim klimatskim promjenama. GBZ -Zbornik sažetaka 60 seminara biljne zaštite, Opatija, 09-12. 02. 2016., 20-21

Vončina D., Ražov J, Sever Z, Ivić D. Barić B. (2014). *Apiognomonina erytostroma*, *Scolytus rugosus* i ekstremni klimatski uvjeti-uzročnici propadanja stabla trešnje i višnje u Dalmaciji. Glasilo biljne zaštite 5, 405-412