

Pseudomonas syringae pv. *glycinea* - EKONOMSKI ŠTETAN PATOGEN SOJE U VOJVODINI

Maja Ignjatov¹, Jelica Balaž², Mirjana Milošević³, Miloš Vidić⁴

¹Nacionalna laboratorija za ispitivanje semena, Novi Sad

²Poljoprivredni fakultet, Novi Sad

³Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede Republike Srbije, Beograd

⁴Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad

Email: maja@ifvcns.ns.ac.yu

Izvod

Bakteriozna pegavost soje, čiji je prouzrokovac *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* (Coerper) Young, u Srbiji se javlja redovno, često u jakom intenzitetu. Uzorci su prikupljeni tokom 2005. godine, iz više lokaliteta u Vojvodini.

Patogenost dobijenih izolata je dokazana pozitivnom hipersenzitivnom reakcijom (HR) na duvanu, kao i inokulacijom biljaka soje u fazi kotiledona (sorta Balkan). Odgajivačke i biohemisko-fizioloske odlike ispitane su standardnim metodama. Na osnovu dobijenih rezultata, ispitivani izolati poseduju karakteristike Ia fluorescentne grupe fitopatogenih bakterija roda *Pseudomonas*. Za razlikovanje *P. s.* pv. *glycinea* od *P. s.* pv. *glycinea* korišćeni su specijalni diferencijalni testovi. Rezultati ukazuju da prvi patogen koristi eritritol, betain, sorbitol i L-laktat, izazivajući nekrozu zelenih plodova višnje i trešnje, dok *P. s.* pv. *glycinea* pokazuje negativnu reakciju u pomenutim testovima. Identifikacija bakterija potvrđena je i serološkim testovima (metod aglutinacije, IF, ELISA), korišćenjem odgovarajućih antitela bakterije *P. s.* pv. *glycinea*, (NEOGEN Europe Ltd., Scotland, UK). Molekularnom metodom identifikacije (PCR), korišćenjem odgovarajućih prajmera, potvrđeno je da proučeni izolati sa soje pripadaju vrsti *P. s.* pv. *glycinea*. Pripadnost dobijenih izolata fiziološkim rasama odredena je korišćenjem diferencijalnog sortimenta soje: Acme, Chippewa, Flambeau, Harosoy, Lindarin, Merit i Norchief. Zaključeno je da izolati bakterije *P. s.* pv. *glycinea*, sa soje u Vojvodini, pripadaju rasi 4.

Reakcija 12 sorti i dve linije soje (L-220 230, P-9241), različitih grupa zrenja, prema *P. s.* pv. *glycinea*, ispitana je u uslovima spontane infekcije u polju i staklari. Genotipovi soje, obuhvaćeni ovim proučavanjima, ispoljili su različit nivo osetljivosti prema *P. s.* pv. *glycinea*. Postoje statistički značajne razlike osetljivosti između pojedinih genotipova i linija. Genotipovi sa najkraćom vegetacijom (000 i 00 grupa zrenja) pokazali su se kao najosetljiviji.

Ključne reči: *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*, soja, bakteriozna pegavost, rase, test, aglutinacija, IF, ELISA, PCR.

UVOD

Soja (*Glycine max* L. Merrill) je jedna od važnijih gajenih biljaka u svetu i kod nas. U uslovima intenzivne proizvodnje prouzrokovaci oboljenja mogu naneti značajne štete. U svetu je opisano više od 100 uzročnika bolesti, od kojih se u ekonomski značajnije svrstavaju mikoze, bakterioze i viroze. Bakteriozna pegavost soje je jedna od najrasprostranjениjih kod nas. Osnovni izvor inokuluma je seme, a vetar i kiša imaju znatnog udela u širenju bakterije tokom vegetacije (Arsenijević, 1988). U agroekološkim uslovima Vojvodine *P. s.* pv. *glycinea* redovno se javlja, a u povoljnijim uslovima za razvoj bolesti može naneti velike štete, posebno u ranostasnih sorti (Vidić, Balaž, J., 1997).

Klasični metodi determinacije fitopatogenih bakterija, uzimajući u obzir pretežno njihova morfološka i biohemisika svojstva, iziskuju dug laborato-

rijski rad. Postoji veliki broj opisanih savremenih i brzih metoda dokazivanja, koje se zasnivaju na serološkim i molekularnim osobinama patogena, u cilju dobijanja brže i potpunije informacije o prisustvu patogena u biljnim tkivima.

Metod rada

Izolacija patogena. Vršena je iz obolelih listova soje, tokom 2005. godine, sa različitih sorti soje (Balkan, Sava, Ravnica, Rita, Proteinka), poreklom iz nekoliko lokaliteta u Vojvodini (Srbobran, Tovariševo, Laćarak, Njegoševo, Bačka Topola, Čalma, Subotica, Begeč) i Republici Srpskoj (Bijeljina).

Provera patogenosti ispitivanih izolata. Inokulacija mlađih biljaka soje obavljena je prskanjem ozleđenih kotiledona, bakterijskom suspenzijom koncentracije 10^8 cfu/ml. Inokulisane biljke prskanjem, inkubirane su u vlažnoj komori tri dana, nakon čega su prenete u laboratorijske uslove, pri temperaturi od 25°C. Nastale promene praćene su svakodnevno 15 dana od inokulacije.

Hipersenzitivna reakcija (HR) na duvanu. Suspenzija bakterija koncentracije 10^6 cfu/ml ubrizgavana je u međunervalni deo lisnog tkiva, u tkivo mezofila lista, a pojava hypersenzitivne reakcije ocenjivana je nakon 24 časa.

Morfološke, odgajivačke i biohemisko-fiziološke odlike. Ispitivanja ovih odlika, kao što su: stvaranje levana, aktivnost oksidaze, stvaranje katalaze, O/F test, metabolizam arginina, trulež krtola krompira, hidroliza želatina i eskulina, razlaganje skroba, redukcija nitrata i stvaranje kiseline iz ugljenih hidrata, ispitani su klasičnim postupcima (Lelliot, Stead, 1987; Arsenijević, 1988; Schaad et al., 2001). Ispitivanje bakterijskih izolata LOPAT testovima je izvedeno prema uobičajenom postupku za identifikaciju bakterija iz roda *Pseudomonas* (Lelliot et al., 1966; Balaž, J., Arsenijević, 1988).

Diferencijalni testovi za patogene varijetete *P. s. pv. syringae* i *P. s. pv. glycinea*. Na soji se, osim *P. s. pv. glycinea*, kao patogena bakterija može pojaviti i *P. s. pv. syringae*. Na osnovu provere patogenosti i ponašanja u nekim testovima, može se izvršiti njihova diferencijacija (Fahy, Persley, 1983). Patogeni varijeteti *syringae* i *glycinea* mogu se razlikovati na osnovu sledećih reakcija i testova: (1) korišćenja eritritola, betaina, sorbitola i L-laktata i (2) pojavom nekrotičnih pega na mladim (zelenim) plodovima trešnje i višnje.

Serološke metode identifikacije. Od seroloških metoda za identifikaciju *P. s. pv. glycinea* korišćeni su: metod aglutinacije (ekspres aglutinacioni test), metod imunofluorescencije (IF) i ELISA test. Identifikacija je vršena odgovarajućim antitelima bakterije *P. s. pv. glycinea* (ADGEN NEOGENEUROPE Ltd., Scotland, UK).

Molekularna metoda identifikacije PCR-om. Determinacija izolata bakterija obavljena je i pomoću molekularne metode lančanom reakcijom polimeraze (PCR-Polymerase Chain Reaction), kojom se potvrđuje pripadnost odabranih izolata vrsti *P. s. pv. glycinea*, sojevima koji produkuju fitotoksin koronatin, po metodi Bereswill et al. (1994) i Schaad et al. (2001).

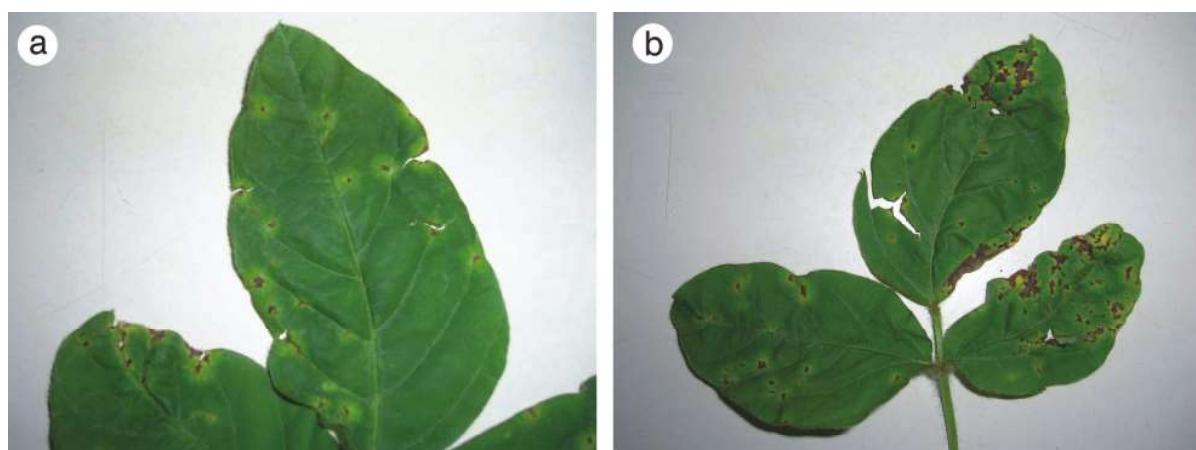
Identifikacija fizioloških rasa patogena. Pripadnost dobijenih sojeva rasama određena je korišćenjem diferencijalnog sortimenta soje (Acme, Chippewa, Flambeau, Harosoy, Lindarin, Merit i Norchief), prema Cross et al. (1966). Inokulacija mlađih biljaka soje je obavljena 10 dana nakon nicanja, suspenzijom bakterija svih ispitivanih izolata. Biljke su inokulisane na dva načina: prskanjem biljaka pod pritiskom, uz upotrebu ručnog atomizera (Cross et al. 1966; Balaž, J. i sar., 1990) i povredom listova sunderom, natopljenim suspenzijom bakterija (Alvarez et al. 1995). Osetljivu reakciju karakteriše pojava vodenastih pega posle 3-5 dana od inokulacije, a otpornu reakciju pojava sitnih, mrkih pega, bez pojave hlorotičnog oreola.

Ispitivanje osetljivosti genotipva soje prema *P. s. pv. glycinea*. Proučena je reakcija sorti soje u uslovima spontane infekcije u polju i pri inokulaciji u uslovima veštačke zaraze. Istraživanjima je obuhvaćeno 12 sorti i dve linije soje (L-220 230, P-9241). Odabrani genotipovi razlikuju se po dužini vegetacije, odnosno zastupljene su sorte iz svih grupa zrenja, koje se uspešno gaje u našim agroekološkim uslovima.

REZULTATI I DISKUSIJA

Simptomi bolesti. Patogen *P. s. pv. glycinea* napada sve nadzemne delove soje, ali tipični simptomi se javljaju na lišću i mahunama. Simptomi bakteriozne pegavosti soje uočavaju se na biljkama u polju s proleća, tokom juna, naročito posle kišnog perioda. Oboljenje se lako zapaža na lišću zaraženih biljaka, u vidu sitnih, vlažno-zelenih pega, a na naličju lista moguće je uočiti i bakterijski eksudat. U uslovima niže temperature, oko pega se javlja hlorotični oreol, koji nastaje kao posledica stvaranja fitotoksina koronatina (Sl. 1).

Sa zaraženih mahuna patogen dospeva do semena. U zoni infekcije seme-njača je bledožuta, smežurana i bez sjaja. Seme se deformiše i na njemu se javljaju ugnute, nekrotične pege, u kojima se može zapaziti bakterijski eksudat.



Sl. 1. Simptomi bakteriozne pegavosti na listu soje:
početni simptomi (a), spajanje pega u veće nekrotične površine (b)

Izolacija patogena. Na hranljivoj podlozi sa saharozom (NSA), tri do četiri dana nakon izvedene izolacije, obrazovale su se krupne, sjajne, bele i ispušćene kolonije bakterija. Za dalja proučavanja odabrana su 22 reprezentativna izolata.

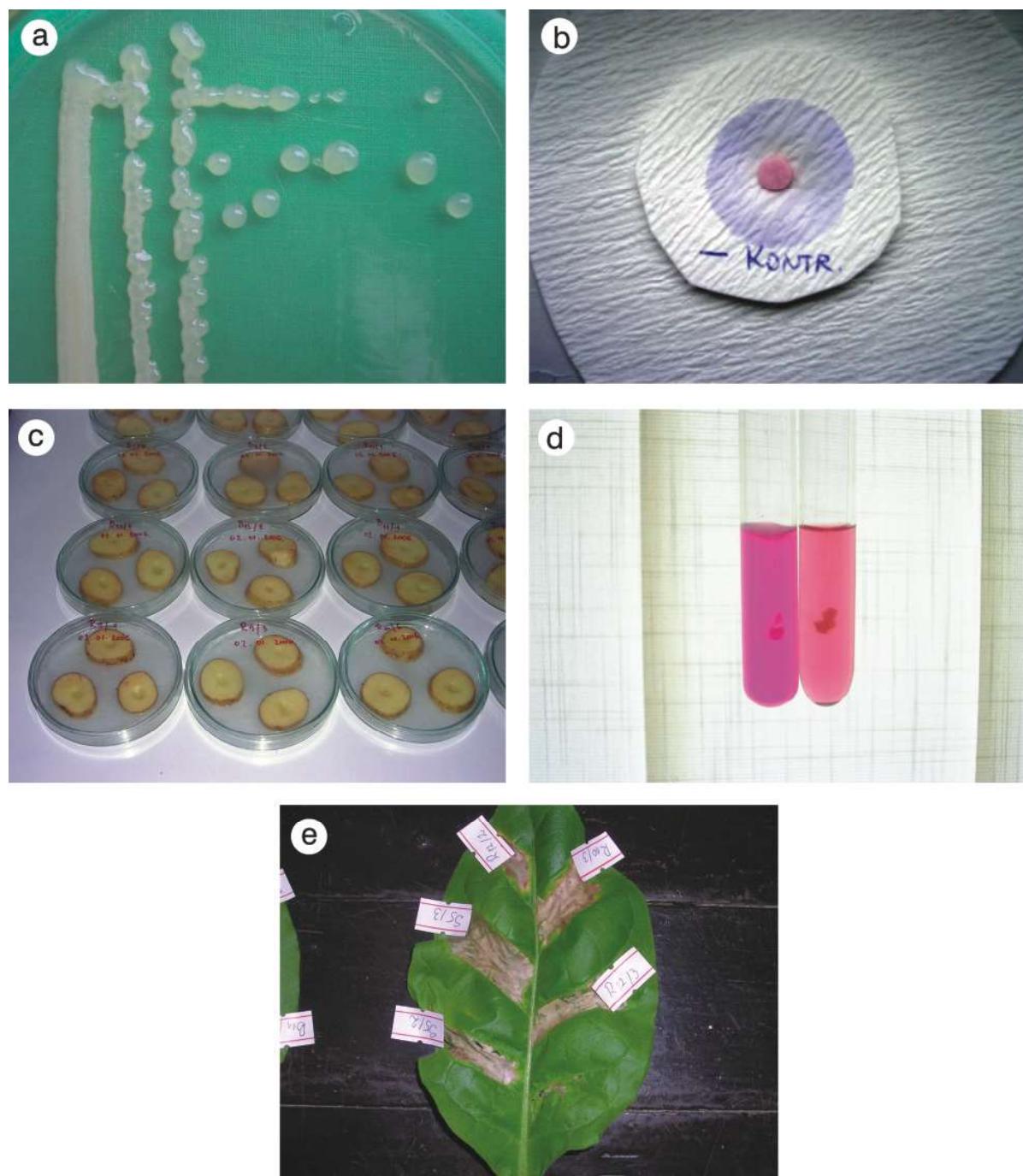
Patogenost ispitivanih izolata. Svi proučavani izolati uglavnom su ispoljili visok stepen patogenosti. Pege na listu soje su vlažne, tamnozelene, sa masnim odsjajem, veličine 2-3 mm. Vremenom se spajaju i pretvaraju u tamnomrke, skoro crne, ugnute lezije. Kotiledoni nakon izvesnog vremena nekrotiraju i kao potpuno suvi otpadaju sa biljke. Većina izolata prouzrokuje simptome nakon osam dana, dok izolati B11/1, B13/1 i B13/2 iste promene prouzrokuju na kotiledonima tek nakon 10 i 11 dana od inokulacije.

Izolat P15/2 prouzrokuje pojavu infekcija nakon pet dana, što ukazuje na patogenija svojstva u odnosu na ostale ispitivane izolate.

Kontrolni - referentni izolat bakterije *P. s. pv. glycinea* (NCPPB 3318) prouzrokuje identične simptome kao ispitivani izolati. Reizolacijom patogena i reinokulacijom mladih biljaka soje u fazi kotiledona, dobijeni su identični simptomi, čime su potvrđeni Kohovi postulati.

Kod biljaka inokulisanih vodom pojava karakterističnih, masnih pega na kotiledonima je potpuno izostala.

Hipersenzitivna reakcija (HR) na duvanu. Svi izolati, infiltrirani u list duvana, nakon 24 sata su prouzrokovali hipersenzitivnu reakciju na duvanu, kao posledicu inkompatibilnog odnosa patogen-domaćin.



Sl. 2. Rezultati LOPAT testa: (a) levan pozitivne kolonije, (b) stvaranje oksidaze -, (c) trulež krompira -, (d) arginin dehidrolaza -, (e) HR na duvanu +

Morfološke, odgajivačke i biohemijsko-fiziološke odlike. Svi proučavani izolati sa soje, kao i referentni izolat bakterije *P. s. pv. glycinea*, stvaraju levan, ne stvaraju oksidazu, ni arginin dehidrolazu, ne poseduju pektolitičke fermente, a hipersenzitivnu reakciju duvana prouzrokuju u roku od 24 časa. Na osnovu rezultata LOPAT testova, ispitivani izolati poseduju karakteristike

Ia fluorescentne grupe fitopatogenih bakterija roda *Pseudomonas*, koji su u saglasnosti sa rezultatima koje navode Lelliot et al. (1966); Balaž, J. i Arsenijević (1988) i dr. (Sl. 2). Enzimska aktivnost izolata je niska, jer proučavani izolati stvaraju katalazu, a ne razlažu skrob, niti hidrolizuju želatin i eskulin i ne vrše redukciju nitrata. Proučavanjem sposobnosti razlaganja ugljenikovih jedinjenja, utvrđeno je da svi ispitivani izolati, kao i referentni izolat (NCPPB 3318), ispoljavaju iste osobine u pogledu metabolizma ugljenih hidrata. Ispitivani izolati metabolišu glukozu, galaktozu, fruktozu, ksilozu, arabinuzu, manozu, saharozu, rafinozu, manitol i inozitol.

Na osnovu bakterioloških osobina, svi proučavani izolati poseduju karakteristike koje u potpunosti odgovaraju literurnim podacima o bakteriji *P. s. pv. glycinea*.

Diferencijalni testovi za patogene varijetete *P. s. pv. syringae* i *P. s. pv. glycinea*. Ispitivani izolati iz soje ne koriste L-laktat, sorbitol, betain i eritritol, nasuprot kontrolnom - referentnom soju bakterije *P. s. pv. syringae*. Pojava žute boje, kao znak pozitivne reakcije, karakteristična je za patogeni varijetet *syringae*. Ispitivani izolati sa soje, kao i referentni izolat (NCPPB 3318), na zelenim plodovima višnje (sorta Oblačinska) i trešnje (sorta Germerdolska), poreklom iz Bačke Palanke, prouzrokuju sitne, mrke, tačkaste pege na mestima uboda, bez izražene nekroze. Na inokulisanim zelenim plodovima izolatom bakterije *P. s. pv. syringae*, nakon 48 sati, zapaža se pojava krupnih, tamnomrkih i ugnutih pega.

Seroške metode identifikacije. Na osnovu dobijenih rezultata u serološkim testovima (test aglutinacije, IF, ELISA) potvrđeno je da ispitivani izolati bakterija pripadaju vrsti *P. s. pv. glycinea*.

Molekularna metoda identifikacije PCR-om. Kao rezultat lančane reakcije polimeraze, posmatranjem produkata elektroforeze na agaroznom gelu, detektovani su fragmenti nukleinske kiseline, veličine 650 baznih parova, specifični za sojeve *P. s. pv. glycinea*, koji stvaraju fitotoksin koronatin.

Identifikacija fizioloških rasa patogena. Dobijeni rezultati, odnosno osetljiva reakcija svih ispitivanih diferencijalnih sorti prema svim izolatima bakterije *P. s. pv. glycinea*, pokazuju da je u nas prisutna rasa 4 ove bakterije, što je u saglasnosti sa ispitivanjima Balaž, J. i sar. (1990), koji su još pre gotove dve decenije, takođe, utvrdili prisustvo rase 4 ove bakterije, na soji gajenoj u agroekološkim uslovima Vojvodine.

Ispitivanje osetljivosti genotipva soje prema *P. s. pv. glycinea*. Svi genotipovi soje, obuhvaćeni ovim proučavanjima ispoljili su različit nivo osetljivosti prema *P. s. pv. glycinea* u polju, što je prikazano preko indeksa oboljenja. Postoje statistički značajne razlike u osetljivosti između pojedinih genotipova i linija, kako u polju tako i u staklari. Genotipovi sa najkraćom vegetacijom (000 i 00 grupa zrenja) pokazali su se kao najosetljiviji. Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima Vidića i Balaž, J. (1997), koji su, takođe, utvrdili da su ranostasne sorte soje osetljivije prema *P. s. pv. glycinea*, u odnosu na kasnóstasne. Ove sorte su najzastupljenije u proizvodnji soje kod nas, što ukazuje da je osetljiv sortiment glavni uzročnik čestih i jakih pojava bakteriozne plamenjače soje kod nas. Svi genotipovi soje ispoljili su veći stepen osetljivosti u uslovima veštačke inokulacije, u odnosu na spontanu infekciju u polju. Ranostasni genotipovi su i u ovom slučaju pokazali veću osetljivost od kasnóstasnih.

ZAKLJUČAK

Na osnovu dobijenih rezultata proučavanja patogenih, morfološko-odgajivačkih, biohemijskih, fizioloških, seroloških i molekularnih karakteristika, zaključeno je da ispitivani izolati sa soje pripadaju rasi 4, bakterije *P. s. pv. glycinea*. Uzimajući u obzir postojanje fizioloških rasa ovog patogena, povoljne uslove za razvoj bolesti u Vojvodini, kao i gajenje osetljivog sortimenta, utvrđivanje i identifikacija prouzrokovaca bakterioznih oboljenja soje je veoma važno sa aspekta zaštite, oplemenjivanja i stvaranja otpornih linija i sorti.

LITERATURA

- Alvarez, E., Braun, E. J., McGee, D. C. (1995): New Assays for Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* in Soybean Seed. Plant Diseases, vol. 79, No.1. APS, USA.
- Arsenijević, M. (1988): Bakterioze biljaka. Naučna knjiga. Beograd.
- Balaž, Jelica, Arsenijević, M. (1988): Primena nekih specifičnih metoda u identifikaciji fluorescentnih fitopatogenih bakterija iz roda *Pseudomonas*. Glasnik zaštite bilja, 2, 44-47.
- Balaž, Jelica, Arsenijević, M., Vidić, M. (1990): Bakteriološke karakteristike i fiziološke rase *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* (Coerper) Young, Dye et Wilkie parazita soje. Zaštita bilja, vol. 41 (4), 194: 423-429, Beograd.
- Bereswill, S., Bugert, P., Volksch, B., Ullrich, M., Bender, C., Geider, K. (1994): Identification and Relatedness of Coronatine-Producing *Pseudomonas syringae* Pathovars by PCR Analysis and Sequence Determination of the Amlification Products. Microbiology, p. 2924-2930, vol. 60, No. 8. American Society for Microbiology, USA.
- Cross, J. E., Kennedy, B. W., Lambert, J. W., Cooper, R. L. (1966): Pathogenic races of the bacterial blight pathogen of soybeans, *Pseudomonas glycinea*. Plant Dis. Rep. 50: 557-560.
- Fahy, P. C., Persley, G. J. (1983). Plant Bacterial Diseases, A Diagnostic Guide. Academic Press, Australia.
- Lelliott, R. A., Billing, E., Hayward, A. C. (1966): A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic *Pseudomonads*. Journal of Applied Bacteriology, 29, 470-489.
- Lelliott, R. A., Stead, D. E. (1987): Methods for the Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants (vol. 2). British Society for Plant Pathology Blackwell Scientific Publications. London, UK.
- Schaad, N., Jones, J. B., Chun, W. (2001): Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA.
- Vidić, M., Balaž, Jelica (1997): Reakcija genotipova soje prema *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. Zaštita bilja, vol. 48 (2), 220: 119-125, Beograd.

Abstract

***Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* ECONOMICALLY HARMFUL PATHOGEN OF SOYBEAN IN VOJVODNIA**

Maja Ignjatov¹, Jelica Balaž², Mirjana Milošević³ and Miloš Vidić⁴

¹Natinal laboratory for seed testing, Novi Sad

²Agricultural faculty, Novi Sad, Serbia

³Ministry of Ariculture, Forestry and Water menagment, Belgrade, Serbia

⁴Institute of field and vegetable crops, Novi Sad, Serbia

Email: maja@ifvcns.ns.ac.yu

Pseudomonas syringae pv. *glycinea* (Coerper) Young causal agent of bacterial blight is important and frequent disease of soybean in Vojvodina province. Isolation of the pathogen was carried out during 2005. from infected soybean leaves of several cultivar.

Pathogenicity of the obtained isolates including referent strain (National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, United Kingdom-NCPPB 3318) was proved by inoculation soybean plants at cotyledon stage (Balkan variety) and by hypersensitive reaction (HR) on tobacco leaves. Cultural and biochemical-physiological characteristics were tested according to known methods. Bacterium identification was also confirmed by

serological method (agglutination tests, IF, ELISA,) with appropriate antibodies of *P. s.* pv. *glycinea* NEOGEN Europe Ltd., Scotland, UK. All investigated isolates showed positive reaction with mentioned antibodies. Molecular technique (PCR) based on chlorosis inducing phytotoxin coronatine confirm that studied isolates belong to *P. s.* pv. *glycinea*. Differential soybean cultivars: Acme, Chippewa, Flambeau, Harosoy, Lindarin, Merit and Norchief were used to determine physiological race of the bacterium. Young plants were inoculated in two ways: by leaves rubbing with sterile cotton swab dipped into the bacterial suspension and by spraying leaves under the pressure. Based on the obtained results it was shown that strains which cause bacterial blight of soybeans in Vojvodina, belonged to *P. s.* pv. *glycinea* race 4.

Reaction of 12 soybean varieties and two lines (L-220 230, P-9241) from different maturity groups were investigated under natural field infection and under glass house conditions.

Statistically significant differences of sensitivity between individual genotypes and lines were determined. Genotypes 000 and 00 maturity group were the most sensitive.

Key words: soybean, bacterial blight, *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*, race 4, identification.

PATOGENI MRKVE (*Alternaria radicina*, *A. dauci*)

Aleksandra Bulajić, Branka Krstić

Poljoprivredni fakultet, Zemun - Beograd

Email: aleksandrabulajic@yahoo.com

Izvod

Mrkva je veoma traženo i korišćeno povrće. Površine na kojima se gaji, kao i ekonomski značaj, u stalnom su porastu u svetu. Organski proizvedena mrkva spada u najtraženije povrće u svetu, koje najčešće donosi i veliki profit.

Gljive koje pripadaju rodu *Alternaria*, naročito *A. dauci*, koja izaziva lisnu pegavost i sušenje lista i *A. radicina*, koja izaziva crnu trulež, mogu da ugroze celokupnu proizvodnju. Prisustvo ova dva značajna patogena, kao i jačinu bolesti koje izazivaju, treba stalno pratiti i kontrolisati u svim fazama proizvodnje.

Prisustvo *A. dauci* i *A. radicina* redovno je svake godine u našoj zemlji. Kontrola jačine bolesti, koje ove dve gljive izazivaju, veoma je teška i komplikovana. Suzbijanje mora da uključi istovremenu primenu različitih mera, među kojima je najvažnija setva nezaraženog semena. Oba patogena mogu da se suzbijaju hemijskim i agrotehničkim merama, ali je njihova efikasnost u slovima visokog infekcionog pritiska ograničena.

Ključne reči: mrkva, *Alternaria dauci*, *A. radicina*, nezaraženo seme.

UVOD

Gljive iz roda *Alternaria* su veoma rasprostranjene, poznate kao saprobi u različitim substratima, ali i patogeni biljaka koji, u poslednje vreme, privlače sve više pažnje proizvođača i istraživača širom sveta. U prirodnoj populaciji većine vrsta *Alternaria* postoji puno prelaznih oblika, čije se pojedine osobine ponekad preklapaju sa osobinama druge vrste istog roda. Njihova taksonomija je komplikovana, tako da je opisan veći broj vrsta infektivnih za različite biljke domaćine (Rotem, 1994).

Mrkva /*Daucus carota* L. subsp. *sativus* (Hoffm.) Arcang./ spada u veoma traženo i često korišćeno povrće. Njena komercijalna proizvodnja je ekonomski značajna svuda u svetu. Najveći proizvođači su Kina, SAD i Rusija, a