



UNIVERZITET U NOVOM SADU  
POLJOPRIVREDNI FAKULTET



Dipl. inž. – master Renata Iličić

**Bakteriozno sušenje trešnje (*Prunus avium* L.)**

doktorska disertacija

**Novi Sad, 2016. godine**

**UNIVERZITET U NOVOM SADU**  
**POLJOPRIVREDNI FAKULTET**  
**KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA**

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Dipl.inž.- master Renata Iličić
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	Prof. dr Vera Stojšin Redovni profesor, Poljoprivredni fakultet Novi Sad
Naslov rada: NR	Bakteriozno sušenje trešnje ( <i>Prunus avium</i> L.)
Jezik publikacije: JP	Srpski (latinica)
Jezik izvoda: JI	srp. / eng.
Zemlja publikovanja: ZP	Srbija
Uže geografsko područje: UGP	AP Vojvodina
Godina: GO	2016.
Izdavač: IZ	Autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Poljoprivredni fakultet, Trg Dositeja Obradovića 8 21000 Novi Sad Departman za fitomedicinu i zaštitu životne sredine
Fizički opis rada: FO	(broj poglavlja / stranica / slika / grafikona / referenci / priloga) 10 poglavlja/ 187 strana/ 39 slika/ 5 grafikona/ 199 referenci/ 23 priloga
Naučna oblast: NO	Fitopatologija
Naučna disciplina: ND	Bakterioze biljaka
Predmetna odrednica, ključne reči:	Trešnja, monitoring, bakteriozno sušenje, <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> , <i>Pseudomonas syringae</i> pv.

PO	<i>morsprunorum</i> rasa 1, identifikacija, epidemiologija.
UDK	
Čuva se: ČU	Biblioteka Poljoprivrednog fakulteta Novi Sad
Važna napomena: VN	Istraživanja u ovoj tezi su obavljena u okviru projekata Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja: TR31038 i III46007.
Izvod: IZ	<p>Bakteriozno sušenje trešnje (<i>Prunus avium</i> L.) poslednjih nekoliko godina u mladim zasadima i plantažama trešnje predstavlja značajan problem u proizvodnji ove voćne vrste. Simptomi bolesti se ispoljavaju u vidu sušenja grana, grančica ili celih stabala, što se uglavnom zapaža na mestima rezidbe i oko pupoljaka, sa uočljivim promenama boje tkiva kore, koje puca i nastaju rak rane. U periodu od 2012 – 2015 godine izvršen je monitoring zdravstvenog stanja trešnje kojim je obuhvaćeno nekoliko plantaža i manjih zasada trešnje iz više lokaliteta na području AP Vojvodine i centralne Srbije (Ritopek). Mlade voćke su očigledno najugroženije, jer smo na osnovu praćenja zdravstvenog stanja u više lokaliteta i zasadima različite starosti, pojavu bakterioznog sušenja u jačem ili slabijem intenzitetu, konstatovali samo u mladim zasadima (do 3 godine starosti – Selenča, Gornji Tavankut, Donji Tavankut, Ljutovo, Mikićevo i Kanjiža). Izolacijama na standardne hranljive podloge, iz prikupljenih obolelih uzoraka trešnje, kao i sa zdravih pupoljaka i listova trešnje (epifitna populacija), dobijeni su brojni izolati bakterija <i>P. syringae</i> pvs. od kojih je za dalja ispitivanja odabrano 155 izolata. Identifikacija dobijenih izolata je izvršena je na osnovu fenotipskih i genotipskih metoda. Na osnovu LOPAT testova izolati pripadaju la grupi fluorescentnih vrsta <i>Pseudomonas syringae</i>. Prema GATTa testovima utvrđene su dve grupe izolata u okviru vrste <i>P. syringae</i>: I grupa (<math>G^+A^+T^-Ta^-</math>) i II grupa (<math>G^-A^+T^+Ta^+</math>). Dodatni testovi su potvrdili GATTa testove, na osnovu kojih je zaključeno da sušenje mladih stabala trešnje prouzrokuju dve grupe bakterije <i>P. s. pv. syringae</i> (I grupa) i <i>P. s. pv. morsprunorum</i> rasa 1 (II grupa). Među ispitivanim izolatima nije bilo odstupanja u pogledu fenotipskih karakteristika u okviru iste grupe, osim sposobnosti stvaranja siringomicina pojedinih izolata I grupe (pv. <i>syringae</i>). Proverom patogenosti na raznim test biljkama i biljci domaćinu utvrđene su razlike, ali i određene sličnosti između izolata I i II grupe. Jasne razlike između grupa izolata utvrđene su pri inokulaciji zelenih plodova trešnje, višnje, ringlova i kruške, paradajza, paprike i mahuna boranije. Pri inokulaciji odvojenih listova jorgovana izolati I grupe (pv. <i>syringae</i>), kao i većina izolata II grupe (pv. <i>morsprunorum</i> rasa 1) su pozitivno reagovali, što ukazuje na heterogenost populacije bakterije <i>P. s. pv. morsprunorum</i> rasa 1. Pri inokulaciji sejanaca voćnih podloga (divlja trešnja, magriva, divlja šljiva, divlja kruška) svi izolati pv. <i>syringae</i> su prouzrokovali karakteristične patološke promene na podlogama svih divnih vrsta, a izolati pv. <i>morsprunorum</i> rase 1 takođe na svim vrstama, osim na sejancima divlje šljive. Ovi rezultati ukazuju da je širenje bakterija moguće i putem podloga koje takođe mogu biti zaražene. Inokulacijama dvogodišnjih grančica trešnje u periodu mirovanja zaključeno je da su svi izolati pv. <i>syringae</i> i <i>morsprunorum</i> rasa 1 podjednako patogeni na svim sortama trešnje (Burlat, Summit, Hedelfigenska i Germerzdorfska). Najveća dužina nekroze najčešće je zabeležena na sortama Burlat i Summit u kombinaciji sa izolatima I grupe (pv. <i>syringae</i>) u pojedinim slučajevima i sa izolatima II grupe (pv. <i>morsprunorum</i> rasa 1), a najmanja uglavnom kod sorti Germerzdorfska i Hedelfigenska sa izolatima II grupe (pv. <i>morsprunorum</i> rasa 1). Identifikacija izolata KBNS71 – 84 (Gornji Tavankut) i KBNS85 – 94 (Selenča) na bazi MLST korišćenjem gena <i>gyrB</i>, <i>rpoD</i>, <i>gapA</i> i <i>gltA</i>, jasno je pokazala prisustvo dva patovara <i>P. s. pv. syringae</i> i <i>P. s. pv. morsprunorum</i> rasa 1. Pri poređenju sa sojevima H – 1, V – 85, V – 88 (višnja) i V – 109 (trešnja) utvrđene su značajne razlike i postojanje genetskog diverziteta populacije ovih patogena. Simultana detekcija gena <i>syrB</i> i <i>syrD</i> utvrđena je kod 70 izolata I grupe (pv. <i>syringae</i>), a samo <i>SyrB</i> kod 9 izolata iste grupe (pv. <i>syringae</i>). Gen za sintezu koronatina detektovan je kod svih 76 izolata II grupe (pv. <i>morsprunorum</i> rasa 1). Rep – PCR metodom ustanovljene su značajne razlike (58%) između I i II grupe izolata (pv. <i>syringae</i> i pv. <i>morsprunorum</i> rasa 1). Ispitivani izolati sa trešnje u okviru pv. <i>syringae</i> nisu ispoljili međusobne razlike, ali se razlikuju od sojeva sa drugih lokaliteta i ranije izolovanih sa istog domaćina (V – 109 i T6), kao i od sojeva sa drugih domaćina – višnje (V – 85) i uljane tikve (Tk21) do 37%. Razlike među izolatima pv. <i>morsprunorum</i> rase 1 iznosile su manje od 5%, a 24% u odnosu na soj CFBP2119 istog patogenog varijeteta. Rep – PCR analiza ukazala je na nizak nivo heterogenosti ispitivanih izolata u okviru istog patogenog varijeteta. RAPD metoda, korišćenjem većeg broja prajmera, bila je uspešnija za poređenje ispitivanih izolata od rep – PCR. Od testiranih 11 prajmera, 4 (SPH1, DJP17, DJ15, DJ16) su selektovana za dalji rad na osnovu razlika među izolatima unutar patogenih varijeteta. Kumulativna RAPD analiza pokazala je da između ispitivanih izolata pv. <i>syringae</i> postoje razlike do 24%, a 41% u poređenju sa sojem KFB0103, dok su kod izolata pv. <i>morsprunorum</i> rase 1 razlike iznosile do 15%, a 36% u odnosu na soj</p>

CFBP2119. Dobijeni rezultati RAPD analize ukazuju da u okviru populacije obe grupe ispitivanih izolata postoji određena heterogenost, ali je genetski diverzitet izraženiji kod pv. *syringae*. Proučavanjem epidemiologije ovih patogena u poljskim uslovima inokulacijom jednogodišnjih grana / mladara sortama Burlat, Germerzdorfska, Hedelfigenska i Droганova žuta, zaključeno je da trešnja u našim agroekološkim uslovima ranije postaje osetljiva (oktobar) prema *P. s. pv. morsprunorum* rasa 1 u odnosu na pv. *syringae*. Prvi pozitivni rezultati pri inokulaciji sojevima pv. *syringae* utvrđeni su pri inokulaciji u novembru. U pogledu dužine nekroze najuspešnije su bile novembarske inokulacije (najduže nekroze; 2,17 – 3,35 cm), uspešne su bile i januarske i martovske inokulacije, ali je dužina nekroze bila sve manja, respektivno. Generalno najduže nekroze su ostvarene kod sorte Burlat, a najkraće kod sorte Germerzdorfska. Sve inokulacije urađene u periodu vegetacije su bile negativne. Inokulacijama dvo – trogodišnjih grana na sorti Summit prve uspešne inokulacije (oba patovara) su ostvarene tek u novembru (oktobarske su bile negativne), kada je utvrđena i veća agresivnost patovara *syringae*. Pri inokulacijama u januaru dužina nekroze je bila manja, a martovska je bila negativna. Sve inokulacije vršene u periodu od bubrenja pupoljaka do opadanja lišća takođe su bile negativne. Ispitivanjem osetljivosti sotrimenta trešnje i pojedinih sorti višnje zaključeno je da su prema oba patovara (*syringae* i *morsprunorum* rasa 1) najosetljivije sorte trešnje Katalin, Linda, Summit, New Star i Burlat, srednje osetljive su sorte višnje Erđi Botermo i sorte trešnje Droганova žuta, Carmen, Germerzdorfska i Rana od Noara, a slabo osetljive sorte višnje Španska i Ujfeheti firtoš i sorta trešnje Rita.

Datum prihvatanja teme od strane Senata: DP	3.12.2015.
Datum odbrane: DO	
Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status)  KO	<p>predsednik: Dr Aleksa Obradović, redovni profesor, Poljoprivredni fakultet Zemun</p> <p>član: Dr Vera Stojšin, redovni profesor, Poljoprivredni fakultet Novi Sad – mentor</p> <p>član: Dr Vladislav Ognjanov, redovni profesor, Poljoprivredni fakultet Novi Sad</p> <p>član: Dr Dragana Jošić, naučni savetnik, Institut za zemljište Beograd</p> <p>član: Dr Tatjana Popović, naučni saradnik, Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Beograd</p>

**UNIVERSITY OF NOVI SAD  
FACULTY OF AGRICULTURE  
KEY WORD DOCUMENTATION**

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	PhD Thesis
Author: AU	Renata Iličić, MSc
Mentor: MN	Vera Stojšin, Full Professor Faculty of Agriculture Novi Sad
Title: TI	Bacterial die back of sweet cherry ( <i>Prunus avium</i> L.)
Language of text: LT	Serbian (Latin letter)
Language of abstract: LA	Serbian / English
Country of publication: CP	Serbia
Locality of publication: LP	AP Vojvodina
Publication year: PY	2016
Publisher: PU	Author's reprint
Publication place: PP	Faculty of Agriculture Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 8 21000 Novi Sad Department for Environmental and Plant Protection

Physical description: PD	10 chapters/ 187 pages/ 39 figures/ 5 graphs/ 199 references/ 23 appendixes
Scientific field SF	Phytopathology
Scientific discipline SD	Plant bacteriology
Subject, Key words SKW	Sweet cherry, monitoring, bacterial die back, <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> , <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>morsprunorum</i> race 1, identification, epidemiology.

UC	
Holding data: HD	Library of the Faculty of Agriculture Novi Sad
Note: N	Investigations in this PhD Thesis were supported by Serbian Ministry of Education, Science and Technological Development, Project No. TR31038 and III46007.
Abstract: AB	<p>Bacterial die back (canker) of sweet cherry (<i>Prunus avium</i> L.) in young orchards and sweet cherry plantations in the past few years has been a significant problem in the production of this fruit species. Symptoms of the disease were manifested in the form of drying branches, twigs or whole trees, which were mainly observed in places of pruning or around the buds, bark changes a color, cracks and cankers has formed. In the period 2012 - 2015 monitoring of the health status of sweet cherries was carried out covering several plantations and smaller orchards of sweet cherries in several localities in Vojvodina and central Serbia (Ritopek). Young fruit trees are obviously the most susceptible, based on monitoring of the health status in many localities and plantations of different ages, the occurrence of bacterial canker in a stronger or weaker intensity was found only in young plantations (up to 3 years old - Selenča, Gornji Tavankut, Donji Tavankut, Ljutovo, Mikićevo and Kanjiža). From collected diseased samples of sweet cherries, as well as healthy buds and leaves of sweet cherry (epiphytic population) isolations on standard nutrient medium, were obtained numerous isolates of <i>P. syringae</i> pvs. and for further investigations was selected 155 isolates. Identification of isolates was performed on the basis of phenotypic and genotypic methods. Based on LOPAT tests isolates belonging to Ia group fluorescent <i>Pseudomonas syringae</i>. According to GATTa tests two groups of <i>P. syringae</i> isolates were identified, I group (G<sup>+</sup>A<sup>+</sup>T<sup>-</sup>Ta<sup>-</sup>) and II group (G<sup>-</sup>A<sup>-</sup>T<sup>+</sup>Ta<sup>+</sup>). Additional tests confirmed the GATT tests, on the basis which it was concluded that the drying of young sweet cherry trees caused <i>P. s. pv. syringae</i> (I group) and <i>P. s. pv. morsprunorum</i> race 1 (II group). Among the tested isolates was not exceptions in phenotypic characteristics within the same group, except for the ability to produced syringomycine for some isolates of I groups (pv. <i>syringae</i>). In pathogenicity tests on various plants and host plant were observed differences, but also and some certain similarity between isolates of I and II groups. Clear differences between the groups of isolates were determined in the inoculations of green fruit of sweet cherry, sour cherry, cherry plum and pears, tomatoes, peppers and green bean pods. In the case of inoculation of separate lilac leaves isolates of I group (pv. <i>syringae</i>) and most isolates of II group (pv. <i>morsprunorum</i> race 1) reactions were positive, what indicating the heterogeneity of the population of <i>P. s. pv. morsprunorum</i> race 1. In the inoculation of fruit rootstock seedlings (wild cherry, Magriva, wild plum, wild pear) all isolates pv. <i>syringae</i> caused the characteristic pathological changes on the all fruit species, isolates of pv. <i>morsprunorum</i> race 1 also except on the seedlings of wild plum. These results suggest that the spreading of bacteria is possibly through the rootstock that can also be infected. Inoculations of two – years old branches of sweet cherry during dormancy, was concluded that all isolates pv. <i>syringae</i> and <i>morsprunorum</i> race 1 were equally pathogenic in all sweet cherry cultivars (Burlat, Summit, Hedelfigen and Germersdorf). The longest length of necrosis usually was observed on the cultivars Burlat and Summit in combination with isolates of I groups (pv. <i>syringae</i>), in some cases with isolates of II group (pv. <i>morsprunorum</i> race 1), and the lowest mainly in cultivars Germersdorf and Hedelfigen with isolates of II group (pv. <i>morsprunorum</i> race 1). Identification of isolates KBNS71 - 84 (GornjiTavankut) and KBNS85 - 94 (Selenča) based on MLST using genes <i>gyrB</i>, <i>rpoD</i>, <i>gapA</i> and <i>gltA</i> genes clearly showed the presence of two pathovars <i>P. s. pv. syringae</i> and <i>P. s. pv. morsprunorum</i> race 1. Comparison with strains H - 1, V - 85 V - 88 (sour cherry) and V - 109 (sweet cherry) showed significant differences and the existence of genetic diversity in the population of these pathogens. Simultaneous detection of <i>syrB</i> and <i>syrD</i> gene was found in 70 isolates of I group (pv. <i>syringae</i>) and only <i>syrB</i> gene in 9 isolates of the same group (pv. <i>syringae</i>). The gene for coronatine synthesis was detected in all 76 isolates of II group (pv. <i>morsprunorum</i> race 1). Rep - PCR method detected significant differences (58%) between isolates of I and II groups (pv. <i>syringae</i> and pv. <i>morsprunorum</i> race 1). The tested isolates from sweet cherry within pv. <i>syringae</i> did not show differences between them, but they were different from the strains from other locations and previously isolated from the same host (V - 109 and T6), as well as strains from other hosts - cherry (V - 85) and pumpkin (Tk21) to 37 %. The differences between isolates pv. <i>morsprunorum</i> race 1 were less than 5% and 24% compared to the same pathovar strain CFBP2119. Rep - PCR analysis indicated a low level of heterogeneity of isolates within the same pathovar. RAPD method using a large number of primers were more successful to compare isolates than rep - PCR. Among 11 tested primers, 4 (SPH1, DJP17, DJ15, DJ16) were selected for further work on the basis of the difference between isolates within same pathovar. Cumulative RAPD analysis showed up to 24% differences among tested isolates of pv. <i>syringae</i> and 41% compared to the strain KFB0103, while among isolates pv. <i>morsprunorum</i> race 1 differences were 15% and 36% compared to the strain CFBP2119. The results of RAPD analysis indicate that a certain heterogeneity</p>

exists in the population of both tested groups of isolates, but genetic diversity is more pronounced among isolates of *pv. syringae*. Studying the epidemiology of this pathogen in field conditions, by inoculating one – year old branches / or shoots sweet cherry cultivars Burlat, Germersdorf, Hedelfigen and Drojanova žuta, it was concluded that the sweet cherry in our agroecological conditions becoming sensitive (October) to *P. s. pv. morsprunorum* race 1 before in relation to the *pv. syringae*. The first positive results of inoculations with strains *pv. syringae* were determined in November. Regarding the length of necrosis most successful were inoculation in the November (necrosis longest; 2.17 to 3.35 cm), inoculations also were successful in the January and the March, but the length of necrosis was smaller, respectively. Generally longest necrosis were observed in the cultivar Burlat, and the shortest in cultivar Germersdorf. All inoculations carried out in the period of vegetation were negative. Inoculations of two – three – years old branches of the cultivar Summit, first successful inoculations (for both pathovar) were observed only in November (October was negative), when a greater aggressiveness of pathovar *syringae* were determined. In inoculations in January length of necrosis was smaller, and in March was negative. All inoculations carried out in the period from buds swelling to leaf falling were also negative. Investigation susceptibility of sweet cherry and some sour cherry cultivars was concluded that against to both pathovars (*syringae* and *morsprunorum* race 1) the most susceptible were cultivars of sweet cherry Katalin, Linda, Summit, New Star and Burlat, medium susceptible were cultivar of sour cherry Erđi Botermo and sweet cherry cultivars Drojanova žuta, Carmen, Germersdorf and Rana od Noara and low susceptible cultivars of sour cherry Španska and Ujfeheti firtoš and cultivar of sweet cherry Rita.

Accepted on Senate on: AS	3.12.2015.
Defended: DE	
Thesis Defend Board: DB	<p>president: Dr Aleksa Obradović, Full Professor Faculty of Agriculture Zemun _____</p> <p>member: Dr Vera Stojšin, Full Professor Faculty of Agriculture Novi Sad – mentor _____</p> <p>member: Dr Vladislav Ognjanov, Full Professor Faculty of Agriculture Novi Sad _____</p> <p>member: Dr Dragana Jošić, Principal Research Fellow, Institute of Soil Science, Belgrade _____</p> <p>member: Dr Tatjana Popović, Research Associate, Institute for Plant Protection and Environment, Belgrade _____</p>

*Duboku zahvalnost dugujem prof. dr Jelici Balaž, svom mentoru za njeno vođstvo i potporu tokom čitavog mog rada. Posebno joj zahvaljujem na svim korisnim savetima, znanju, trudu, strpljenju i objašnjenjima koji su mi pomogli u istraživanjima i pisanju ovog rada.*

*Posebnu zahvalnost dugujem dr Dragani Jošić bez čije pomoći bi deo rada iz oblasti molekularne genetike bio nemoguć. Njen trud i preneseno znanje iz oblasti molekularne biologije su značajno doprineli mom ukupnom razvoju.*

*Veliko hvala dr Tatjani Popović na savetima, podršci i velikoj pomoći u eksperimentalnom radu.*

*Članovima komisije za ocenu i odbranu doktorske disertacije profesorima dr Veri Stojšin, dr Aleksi Obradoviću i dr Vladislavu Ognjanovu zahvaljujem na korektnom i profesionalnom odnosu, kao i na povhalama i kritikama koje su uticale na oblikovanje ovog rada.*

*Zahvaljujem se laborantu Saši Bančeviću za uloženi trud prilikom izvođenja poljskih ogleda.*

*Svojim roditeljima i braći dugujem bezgraničnu zahvalnost za njihovu podršku i ohrabrenje tokom čitavog školovanja.*



## SADRŽAJ

1. UVOD.....	12
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	18
3. RADNA HIPOTEZA.....	19
4. PREGLED LITERATURE.....	20
4. 1. Rasprostranjenost i pojava.....	20
4. 2. Ekonomski značaj.....	23
4. 3. Taksonomska pozicija <i>P. syringae</i> pvs.....	25
4. 4. Simptomi bolesti.....	26
4. 5. Biologija i epidemiologija patogena.....	28
4. 6. Bakteriološke karakteristike, serološka i molekularna identifikacija <i>P. syringae</i> pvs.....	31
4. 7. Suzbijanje.....	34
4. 8. Simptomi slični bakterioznom sušenju.....	37
5. MATERIJAL I METOD RADA.....	40
5. 1. SAKUPLJANJE OBOLELIH UZORAKA TREŠNJE.....	40
5. 2. IDENTIFIKACIJA.....	42
5. 2. 1. IZOLACIJE.....	42
5. 2. 1. 1. Izolacije bakterija na hranljive podloge.....	42
5. 2. 1. 2. Izolacije epifitne bakterijske populacije.....	43
5. 2. 1. 3. Izolacija bakteriofaga.....	50
5. 2. 2. FENOTIPSKU KARAKTERISTIKE.....	51
5. 2. 2. 1. LOPAT TESTOVI.....	51
Stvaranje levana.....	51
Stvaranje oksidaze.....	51
Pektolitička aktivnost na kriškama krompira.....	52
Aktivnost arginin – dehidrolaze.....	52
Hipersenzitivna reakcija (HR) na duvanu.....	52
5. 2. 2. 2. OSNOVNI BIOHEMIJSKO – FIZIOLOŠKI TESTOVI.....	52
Aktivnost katalaze.....	52
Oksidativno/fermentativni, O/F metabolizam glukoze.....	52
Stvaranje H <sub>2</sub> S iz peptona.....	52
Stvaranje indola.....	53
Redukcija nitrata do nitrita.....	53
Hidroliza skroba.....	53
5. 2. 2. 3. DIFERENCIJALNI BIOHEMIJSKO – FIZIOLOŠKI TESTOVI ZA RAZLIKOVANJE <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> i <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>morsprunorum</i> (GATTa testovi).....	53
Razlaganje želatina.....	53
Hidroliza eskulina.....	53
Stvaranje tirozinaze.....	53
Korišćenje (D +) tartarata.....	54
5. 2. 2. 4. DODATNI TESTOVI ZA RAZLIKOVANJE <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> i <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>morsprunorum</i> .....	54
Korišćenje mlečne kiseline (lactic acid).....	54
Karakteristike razvoja bakterija u tečnoj podlozi sa saharozom.....	54
Vitalnost bakterija na podlozi obogaćenoj saharozom.....	54

Hidroliza kazeina.....	55
Korišćenje L – leucina kao izvora C i N.....	55
Stvaranje siringomicina.....	55
Stvaranje čestica leda (INA – Ice Nucleation Activity).....	55
Osetljivost izolata <i>P. s. pv. morsprunorum</i> prema bakteriofagama.....	55
5. 2. 3. PROVERA PATOGENOSTI.....	56
5. 2. 3. 1. PROVERA PATOGENOSTI NA PLODOVIMA I LISTOVIMA.....	56
5. 2. 3. 1. 1. Provera patogenosti na zelenim plodovima trešnje, višnje, ringlova i kruške.....	56
5. 2. 3. 2. 2. Provera patogenosti na plodovima paprike i zelenim plodovima paradajza.....	57
5. 2. 3. 3. 3. Provera patogenosti na mahunama boranije.....	57
5. 2. 3. 4. 4. Provera patogenosti na odvojenim listovima jorgovana.....	57
5. 2. 3. 2. PROVERA PATOGENOSTI NA SEJANCIMA PODLOGA RAZNIH VOĆNIH VRSTA I REZNICAMA TREŠNJE.....	58
5. 2. 3. 2. 1. Provera patogenosti na sejancima voćnih podloga divlje trešnje, magrive, divlje šlive i divlje kruške.....	58
5. 2. 3. 2. 2. Provera patogenosti na reznicama trešnje.....	59
5. 2. 4. MOLEKULARNA IDENTIFIKACIJA I KARAKTERIZACIJA IZOLATA <i>P. syringae</i> pvs.....	60
5. 2. 4. 1. MOLEKULARNA IDENTIFIKACIJA IZOLATA.....	60
5. 2. 4. 1. 1. MLST (Multilocus Sequence Typing).....	60
5. 2. 4. 1. 2. Detekcija gena za sintezu i sekreciju siringomicina metodom m – PCR (multiplex PCR).....	61
5. 2. 4. 1. 3. Detekcija gena za produkciju koronatina ( <i>cfI</i> ).....	62
5. 2. 4. 2. MOLEKULARNA KARAKTERIZACIJA IZOLATA.....	63
5. 2. 4. 2. 1. rep – PCR.....	63
5. 2. 4. 2. 2. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA).....	65
5. 2. 4. 2. 3. Vizuelizacija dobijenih PCR fragmenata.....	67
5. 2. 4. 2. 4. Klaster analize rezultata rep – PCR i RAPD.....	67
5. 3. ISPITIVANJE EPIDEMIOLOŠKIH KARAKTERISTIKA <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> i <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>morsprunorum</i> rase 1 NA TREŠNJI.....	68
5. 4. OSETLJIVOST SORTIMENTA TREŠNJE I VIŠNJE PREMA SOJEVIMA <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> i <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>morsprunorum</i> rasa 1.....	70
6. REZULTATI RADA.....	71
6. 1. SAKUPLJANJE OBOLELIH UZORAKA TREŠNJE.....	71
6. 2. IDENTIFIKACIJA.....	75
6. 2. 1. IZOLACIJE.....	75
6. 2. 1. 1. Izolacije bakterija na hranljive podloge.....	75
6. 2. 1. 2. Izolacije epifitne bakterijske populacije.....	76
6. 2. 1. 3. Izolacija bakteriofaga.....	77
6. 2. 2. FENOTIPISKE KARAKTERISTIKE.....	77
6. 2. 2. 1. LOPAT TESTOVI.....	78
Stvaranje levana.....	78
Aktivnost oksidaze.....	79
Pektolitička aktivnost na kriškama krompira.....	79
Aktivnost arginin – dehidrolaze.....	79
6. 2. 2. 2. OSNOVNI BIOHEMIJSKO – FIZIOLOŠKI TESTOVI.....	85
Aktivnost katalaze.....	85
Oksidativno/fermentativni, O/F metabolizam glukoze.....	85
Stvaranje H <sub>2</sub> S iz peptona.....	85
Stvaranje indola.....	85

Redukcija nitrata do nitrita .....	85
Hidroliza skroba .....	85
6. 2. 2. 3. DIFERENCIJALNI BIOHEMIJSKO – FIZIOLOŠKI TESTOVI ZA RAZLIKOVANJE <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> i <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>morsprunorum</i> (GATTa testovi) .....	86
6. 2. 2. 4. DODATNI TESTOVI ZA RAZLIKOVANJE <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> i <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>morsprunorum</i> .....	93
6. 2. 3. PROVERA PATOGENOSTI .....	100
6. 2. 3. 1. PROVERA PATOGENOSTI NA PLODOVIMA I LISTOVIMA .....	100
6. 2. 3. 1. 1. Provera patogenosti na zelenim plodovima trešnje, višnje, ringlova i kruške .....	100
6. 2. 3. 1. 2. Provera patogenosti na plodovima paprike i zelenim plodovima paradajza .....	102
6. 2. 3. 1. 3. Provera patogenosti na mahunama boranije .....	102
6. 2. 3. 1. 4. Provera patogenosti na odvojenim listovima jorgovana .....	103
6. 2. 3. 2. PROVERA PATOGENOSTI NA SEJANCIMA PODLOGA RAZNIH VOĆNIH VRSTA I REZNICAMA TREŠNJE .....	105
6. 2. 3. 2. 1. Provera patogenosti na sejancima voćnih podloga divlje trešnje, magrive, divlje šlive i divlje kruške .....	105
6. 2. 3. 2. 2. Provera patogenosti na reznicama trešnje .....	107
6. 2. 4. MOLEKULARNA IDENTIFIKACIJA I KARAKTERIZACIJA IZOLATA <i>Pseudomonas syringae</i> pvs. ....	115
6. 2. 4. 1. MOLEKULARNA IDENTIFIKACIJA IZOLATA .....	115
6. 2. 4. 1. 1. MLST (Multilocus Sequence Typing) .....	115
6. 2. 4. 1. 2. Detekcija gena za sintezu i sekreciju siringomicina metodom m – PCR (multiplex PCR) .....	118
6. 2. 4. 1. 3. Detekcija gena za produkciju koronatina ( <i>cfl</i> ) .....	120
6. 2. 4. 2. MOLEKULARNA KARAKTERIZACIJA IZOLATA .....	121
6. 2. 4. 2. 1. rep – PCR .....	121
6. 2. 4. 2. 2. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) .....	127
6. 3. ISPITIVANJE EPIDEMIOLOŠKIH KARAKTERISTIKA <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> i <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>morsprunorum</i> rase 1 NA TREŠNJI .....	135
6. 4. OSETLJIVOST SORTIMENTA TREŠNJE I VIŠNJE PREMA SOJEVIMA <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> i <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>morsprunorum</i> rasa 1 .....	145
7. DISKUSIJA .....	147
8. ZAKLJUČCI .....	168
9. PRILOZI .....	171
10. LITERATURA .....	176
BIOGRAFIJA .....	187

## 1. UVOD

Trešnja (*Prunus avium* L.) je jedna od prvih voćnih vrsta koje se gaje na našim prostorima. Kod nas su dugo gajene samo domaće, autohtone sorte, a od 1950. počinje uvođenje u proizvodnju i novijih, komercijalnih sorti. Novije sorte trešnje krupnog ploda, kod nas su uvezene krajem XIX veka iz zapadne Evrope. U tom periodu uglavnom su bile zastupljene sorte kao što su Lionska rana, Majska rana, Napoleonova, Imperator francis, Hedelfigenska, Germerzdorfska i Drojanova žuta, koje su kod nas i danas zastupljene, posebno u starijim zasadima. Prema zastupljenosti, sorte trešnje su podeljene na vodeće (za proizvodne zasade) Burlat, Van, Stella, Bing, prateće (koje se uglavnom koriste kao oprašivači) Suvenir, Compact Stella, Imperator Francis, Lambert, Germerzdorfska, Drojanova žuta, sorte lokalnog značaja (pretežno autohtonog porekla) Primavera, Lionska rana, Asenova rana, Hedelfigenska, Denisenova rana i perspektivne Sunburst, Lapins, New Star, Sweetheart, Celeste (Ninkovski, 1998). Pored navedenih danas se sve više gaje i sorte Rita, Early Star, Early Lory, Burlat, Benton, Skena, Carmen, Vera, Cristalina, Katalin, Summit, Regina, Black Star, Kordia, Džordžija i Valeri Chkalov. Najčešće korišćene podloge za trešnju su: Magriva (*Prunus mahaleb* L.), Gisela 3, 5, 6, 12 i Kolt.

Po proizvodnji trešnja se u svetu nalazi na šestom mestu, od toga se najveći deo proizvede u Evropi (44%), Aziji (39%) i Severnoj Americi (13%). Vodeća zemlja u svetu je Turska sa udelom u svetskoj proizvodnji od 16,9%, dok su u Evropi najveći proizvođači Italija, Španija, Rumunija, Rusija, Ukrajina, Francuska, Grčka, Poljska i Nemačka. Prema podacima FAO, po proizvodnji Srbija se u Evropi nalazi na 14. mestu, sa prosečnim prinosom od 3,17 tone po hektaru (Keserović i sar., 2014). Prema zvaničnim podacima u periodu od 2005 – 2011. prosečan prinos po stablu trešnje je povećan sa 11 na 15 kg (Statistički godišnjak Republike Srbije, 2012).

Najznačajniji region gajenja trešnje je beogradsko i smederevsko Podunavlje (Grocka, Smederevo), centralna (Čačak), južna Srbija (Niš, Leskovac, Vranje) i Timočka krajina (Zaječar, Negotin). U Vojvodini se trešnja najviše gaji na području Fruške Gore i oko Subotice (Milatović i sar., 2011). Zahvaljujući našim pogodnim agroekološkim uslovima, primenom nove tehnologije proizvodnje i atraktivnim plodovima novog sortimenta, poslednjih godina je kod nas povećan izvoz svežih plodova trešnje. Jedna od bitnih prednosti

trešnje u odnosu na druge voćne vrste je i relativno mali broj hemijskih tretmana koji ova voćna vrsta zahteva, a nakon formiranja krune stabla se vrlo malo orezuju.

Zbog manjeg broja hemijskih tretmana, kao i hranljivih i lekovitih stvojestava plodovi trešnje su veoma cenjeni i kao biološki vredna hrana.

Sve ovo može predstavljati podstrek povećanom izvozu trešnje iz naše zemlje, ali ovu sve intenzivniju proizvodnju, naročito u prvim godinama po sadnji, često prati pojava sušenja mladih stabala. Jače propadanje stabala se naročito zapaža u mladim intenzivnim zasadima sa novijim sortimentom trešnje i to uglavnom stranog porekla (od podizanja zasada do tri godine starosti).

Među najznačajnijim fitopatogenim gljivama trešnje, u svetu i kod nas se smatraju prouzrokovaci sušenja cvetova, rodni grančica i plodova, a to su *Monilinia laxa* (Aderh. & Ruhland) Honey (1945) (Sl.1c), *Monilinia fructicola* (G.Winter) i Honey (1928) i prouzrokovac mrke truleži plodova *Monilinia fructigena* Honey, (1945). Velike ekonomske štete na listovima (ospičavost) višnje i trešnje u našim uslovima prouzrokuje *Blumeriella jaapii* (Rehm) Arx) (Sl.1a). U pojedinim godinama, po značaju se ističu i drugi i prouzrokovaci mikoznih oboljenja, kao što su *Stigmia carpophila* (Lév.) M.B. Ellis, (1959) (Sl.1b) prouzrokovac rešetavosti lista i prouzrokovac citosporoznog izumiranja trešnje *Leucostoma cincta* (Fr:Fr.) Höhn (Ogawa i sar., 2008; Biggs, 2008; Balaž i sar., 2012) (Sl. 2a, 2b).

Pored patogena mikozne prirode, trešnju parazitiraju razni virusi i fitoplazme. Prema Sabanadzovic i sar. (2005) od viroza na trešnji se najčešće javlja: šarenilo lista višnje (CVA), rđasto šarenilo lista (CNRMV), prstenasta pegavost lista (CGRMV), sitničavost plodova trešnje (LChV-1), nekroze kore šljive u asocijaciji sa raznim drugim virusima (PBNSPaV), a kod nas Mandic i sar. (2007) na trešnji navode CGRMV, CNRMV, CVA viruse.

Najznačajnije bolesti trešnje prouzrokovane fitoplazmama u svetu su X – disease (X – disease i Western X disease) (Kirkpatrick i sar., 2008), cherry lethal yellows (Zhu i sar., 1998) i cherry little leaf (Valiunas i sar., 2005). U Evropi je prisutna fitoplazma Evropskog žutila koštičavih voćnih vrsta (European Stone Fruit Yellows, ESFY) na kajsiji, breskvi, Evropskoj šljivi, višnji, trešnji, crnom trnu i bademu (Navrátil i sar., 2001; Fialová i sar., 2004). Prema domaćim litaraturnim izvorima kod nas ne postoji dovoljno utemeljenih eksperimentalnih podataka o prisustvu fitoplazmi na trešnji.

Od bolesti na trešnji kod nas se po značaju svakako izdvajaju oboljenja bakteriozne prirode i to bakteriozno izumiranje trešnje (*Pseudomonas syringae* pvs.) van Hall 1902. (Sl. 2c, 2d, 3a) i bakteriozni rak korena (*Agrobacterium tumefaciens*) (Smith & Townsend, 1907) (Sl.3b) (Arsenijević, 1997; Obradović i sar., 2010; Gavrilović i Milijašević, 2004; Balaž i sar., 2012). Pored navedenih trešnju može parazitirati i *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* (Smith) Vauterin et al. 1995, prouzrokovatelj bakteriozne pegavosti, rešetavosti lista i rak rana koštičavih voćaka. Prisustvo ove bakterije u našoj zemlji do sada nije eksperimentalno potvrđeno (A1 lista).

Na osnovu izvođenja monitoringa trešnje u našim proizvodnim regionima, uočeno je neuobičajeno sušenje mladih voćaka u savremenim plantažnim zasadima. Na osnovu ispoljenih simptoma i preliminarnih ispitivanja posumnjalo se da je u pitanju bolest bakteriozne prirode, odnosno da su prouzrokovatelji ove bolesti *P. syringae* pvs. *P. s.* pv. *syringae* kao polifagna bakterija kod nas je ranije dosta proučavan kao patogen voćaka (Arsenijević, 1968; Arsenijević, 1970; Balaž i sar., 1988; Arsenijević, 1982; Balaž i Arsenijević, 1989). Međutim o bakteriji *P. s.* pv. *morsprunorum* kod nas sve do nedavno (Ivanović i sar., 2009; Gavrilović i sar., 2012; Ivanović i sar., 2012) nije bilo eksperimentalnih podataka.

Uzimajući u obzir ekonomski značaj koji trešnja, kao voćna vrsta sve više dobija u našim uslovima proizvodnje i uz činjenicu da se u savremenim plantažama sve više zapaža pojava sušenja mladih stabala, a da je na proučavanju bakterioza trešnje u našoj zemlji vrlo malo rađeno, pristupili smo detaljnom ispitivanju uzročnika ove pojave, epidemiološkim karakteristikama patogena i osetljivosti sortimenta.

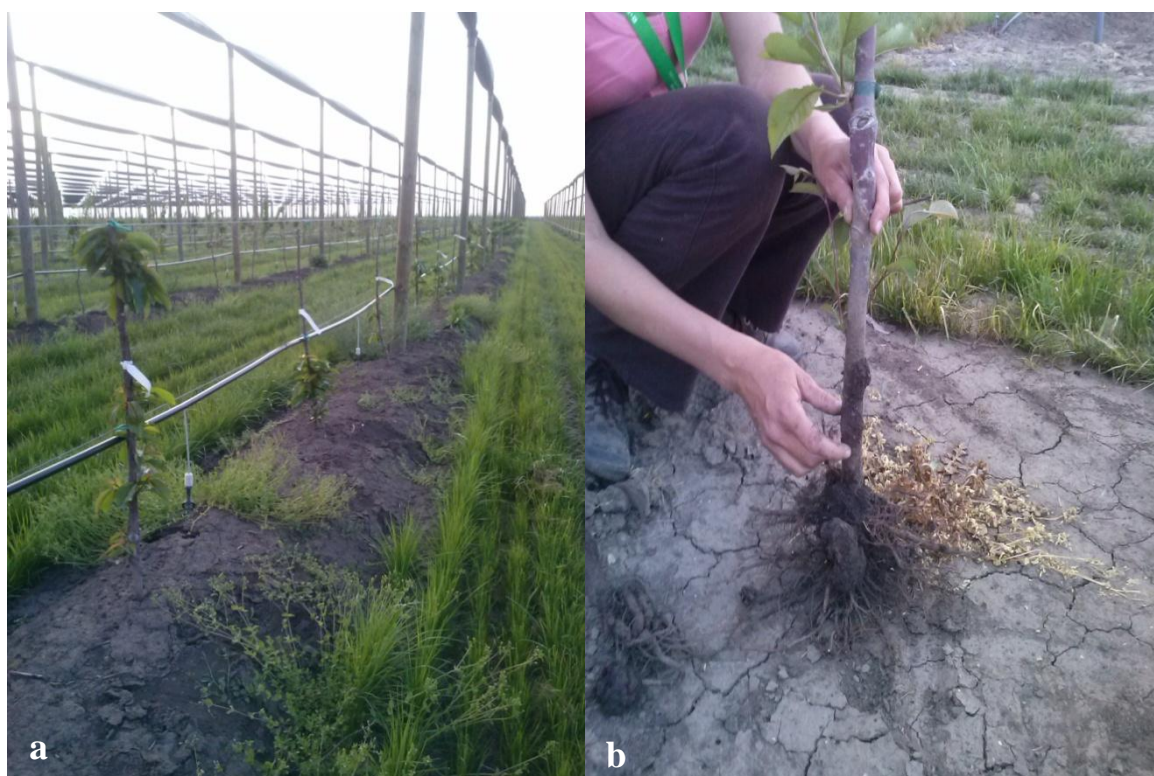


Slika 1. Simptomi na listovima trešnje ospičavost – *B. jaapi* (a), rešetavost – *S. carpophila* (b), sušenje grančica – *M. laxa* (c) (Orig.)



Slika 2. Simptomi *Cytospora* spp. na stablu trešnje (a), pojava piknida na suvim grana trešnje *Cytospora* spp. (b), Bakteriozno sušenje trešnje *P. syringae* pvs. (c), bakteriozna pegavost na listovima *P. syringae* pvs. (d) (Orig.)





Slika 3. Sušenje mladih voćaka trešnje (prva vegetacija) *P. syringae* pvs. (a), rak korena trešnje *A. tumefaciens* (b) (Orig.)

## **2. CILJ ISTRAŽIVANJA**

- Monitoring zdravstvenog stanja trešnje u plantažama i manjima voćnim zasadima na teritoriji AP Vojvodine;
- Prikupljanje uzoraka trešnje sa simptomima bakterioznog sušenja i pegavosti tokom 2012 – 2015;
- Praćenje simptomatologije i detekcija prouzrokovala sušenja trešnje; identifikacija izolata bakterija na osnovu konvencionalnih i savremenih metoda;
- Ispitivanje epidemiologije prouzrokovala bolesti u poljskim uslovima na različitim sortimentu trešnje kroz ciklične inokulacione oglede, tokom godine;
- Ispitivanje osetljivosti sortimenta trešnje u uslovima veštačke inokulacije.

### 3. RADNA HIPOTEZA

Polazeći od ciljeva istraživanja postavljena je radna hipoteza:

- Na osnovu konvencionalnih i savremenih metoda identifikacije će se utvrditi prouzrokovatelj sušenja mladih stabala i pegavosti lista trešnje;
- Predpostavka je da su prouzrokovatelji ovog oboljenja *Pseudomonas syringae* pvs.
- Korišćenjem klasičnih i specifičnih bakterioloških testova, kao i molekularnih metoda izvršiće se identifikacija patogena;
- Primenom većeg broja prajmera utvrdiće se postojanje genetske razlike između izolata pomoću raznih varijanti PCR metoda, na osnovu čega bi se dobio uvid u diverzitet bakterijske populacije prisutne u našim agroekološkim uslovima;
- Inokulacioni ogledi koji će se izvoditi tokom godine u poljskim uslovima, doprineće boljem upoznavanju epidemiologije ovih patogena u našim agroekološkim uslovima i to prvenstveno uslova koji doprinose ostvarenju jakih infekcija i širenju patogena, kao i onim koji onemogućuju razvoj bolesti i koji mogu doprineti uspešnijem suzbijanju ovih patogena;
- Ispitivanjem osetljivosti različitog sortimenta trešnje dobili bi uvid o grupama osetljivih i manje osetljivih sorti prema ovim fitopatogenim bakterijama u našim agroekološkim uslovima.

## 4. PREGLED LITERATURE

### 4. 1. Rasprostranjenost i pojava

Bakterija *Pseudomonas syringae* prvi put je opisana u Holandiji 1902. od strane van Hall na jorgovanu (*Syringa vulgaris* L.), po čemu je i dobila ime. Prema literaturnim podacima prva istraživanja vezana za prouzrokovaoče bakterioza koštičavih voćaka potiču iz 19. veka u Evropi. Smatra se da su prva istraživanja u vezi bakterioznog raka započeta u Poljskoj od strane Brzezinski (1902), koji je ispitivao gumozu kajsije, breskve, šljive i trešnje. U isto vreme van Hall dokazuje prisustvo bakterije *P. syringae* kao prouzrokovaoča bakteriozne plamenjače jorgovana. Tokom 1906. i 1907. Aderhold i Ruhland zaključuju da bakterija *Bacillus spongiosus* prouzrokuje gumozu stabala u nekoliko većih voćnih regiona u Nemačkoj, posebno u zasadima trešnje, a nešto kasnije ovu bakteriju svrstavaju u rod *Pseudomonas* (Aderhold i Ruhland, 1907). Dalji rad na ovoj problematici nastavlja Griffin (1911) koji navodi bakteriju *Pseudomonas cerasi* kao novu vrstu, prouzrokovaoča sušenja i propadanja spavajućih pupoljka trešnje u državi Oregon (USA). Barss (1915) prateći rad Griffin – a dokazuje da ista bakterija prouzrokuje rak rane na granama kod svih koštičavih vrsta voćaka.

U Engleskoj godine 1928. Wormald ističe vrlo jaku pojavu bakterioznog raka u zasadima šljive, a kao prouzrokovaoča navodi vrstu *Pseudomonas morsprunorum*. Radeći na ovoj problematici nekoliko godina, Wormald (1932) utvrđuje da *Pseudomonas prunicola* prouzrokovaoč bakterioznog raka koštičavih voćnih vrsta prouzrokuje i plamenjaču cvetova kruške. Kao prouzrokovaoči sušenja koštičavih vrsta voćaka u ovom ranom periodu se pominju vrste *B. spongiosus*, *P. prunicola* i *P. cerasi*, koje su kasnije preimenovane kao sinonimi vrste *Pseudomonas syringae*. Tokom 1953. Cameron (1955) u državi Oregon ističe jako propadanje spavajućih pupoljka trešnje, a kao prouzrokovaoča navodi vrstu *Pseudomonas syringae*.

Zbog velike sličnosti među patogenima *P. syringae* i *P. morsprunorum*, tokom 1960 – tih vođena je naučna polemika o opravdanosti postojanja ove dve vrste kao prouzrokovaoča bakterioznog sušenja koštičavih vrsta voćaka. Poteškoće su usledile prilikom identifikacije prouzrokovaoča ove bolesti i činjenice da isti tip simptoma (gotovo identične simptome – sušenje grana, cvetova i formiranje rak rana) prouzrokuju obe vrste bakterija. U Severnoj

Americi u državi Oregon, Cameron (1960; 1962) kao prouzrokovača sušenja spavajućih popoljaka trešnje dokazuje bakteriju *P. syringae*.

U tom periodu slično oboljenje, praćeno sušenjem grana i formiranje rak rana na stablima šljive u jugoistočnim delovima Engleske, pripisuje se drugom patogenu *P. morsprunorum* Wormald (1932). U ovom periodu bakteriозni rak koštičavih voćnih vrsta pored Amerike (država Oregon) i Engleske, zapažen je u mnogim regionima poznatim po gajenju voća širom sveta (Australija, Danska, Francuska, Holandija i Novi Zeland) (Cameron, 1960).

Nedoumica u identifikaciji prouzrokovača bakteriозnog raka je otklonjena radovima Crosse i Garrett (1963) i Garrett i sar. (1966), koji su na osnovu proučavanja biohemijsko – fizioloških karakteristika, testova patogenosti i osetljivosti prema bakteriofagama, dokazali da su *P. syringae* i *P. morsprunorum* posebne vrste.

Pored opisanih vrsta veći broj autora navodi i postojanje intermedijarnih formi, koji po određenim karakteristikama (patogene, biohemijsko – fiziološke odlike, osetljivost na bakteriofage) odstupaju i od bakterije *P. syringae* i od *P. morsprunorum* (Cameron, 1962; Crosse i Garrett; 1963; Crosse i Garrett; 1966).

Nekoliko godina kasnije Freigoun i Crosse (1975) u Engleskoj navode postojanje “variant” sojeva vrste *P. morsprunorum*, koji se razlikuju u patogenim i nekim biohemijsko-fiziološkim osobinama u poređenju sa vrstom *P. morsprunorum*. Ovi izolati dobijeni sa obolele trešnje označeni su kao rasa 2, a već opisana vrstu *P. morsprunorum* kao rasa 1.

Taksonomska pozicija *P. syringae* i *P. morsprunorum* prema Young i sar. (1978) je promenjena posle revizije statusa vrste *P. syringae*, kada su dobile taksonomsku poziciju patogenog varijeteta vrste *P. syringae*. Poslednje izmene u pogledu klasifikacije patogenih varijeteta bakterije *P. syringae*, primenom DNK:DNK hibridizacije pokazuju da su *P. s. pv. morsprunorum* rasa 1 i *P. s. pv. morsprunorum* rasa 2, dva potpuno različita organizma jer pripadaju genom – vrsti 2 i 3, dok baterija *P. s. pv. syringae* pripada genom – vrsti 1 (Gardan i sar., 1999).

Bakteriozni rak je i dalje aktuelan problem u proizvodnji koštičavih voćnih vrsta širom sveta u svim voćarskim područjima (Vicente i sar., 2004; Kennelly i sar., 2007; Hattingh i Roos, 2008; Spotts i sar., 2010).

Od koštičavih voćaka bakteriozno sušenje naročito ugrožava trešnju, kajsiju i višnju (Sobiczewski, 1984; Sobiczewski i Jones, 1992; Scortichini, 2005, Natalini i sar., 2006; Kenelly i sar., 2007). Bultreys i Gheysen (2003) ističu velik značaj koji *P. s. pv. syringae* i *P. s. pv. morsprunorum* (rasa 1 i 2) koji imaju na višnji i šljivi u Belgiji. U Americi (Oregon) prema Spotts i sar. (2010) jača pojava bakterioznog raka utvrđena je na trešnji, čiji je prouzrokovatelj *P. s. pv. syringae*. Pored navedene vrste, Renick i sar. (2008) u Americi (Mičigen) ističu i pojavu vrste *P. s. pv. morsprunorum* (rasa 1). Veći broj istraživača u jednom dužem periodu ukazuje na pojavu bakterioznog sušenja trešnje u mladim voćnjacima (Cameron, 1962; Jespersen, 1999; Vicente i sar., 2004; Elmhirst, 2006; Hattingh i Ross, 2008; Spotts i sar., 2010).

Prema brojnim literaturnim podacima i izveštajima iz Francuske, UK, Nemačke, Poljske, Novog Zelanda, Litvanije kao i mnogih drugih, pojava bakterioznog raka već duži niz godina nije problem samo u proizvodnji koštičavih vrsta voćaka, nego i u plantažama divlje trešnje (Vicente i sar., 2004; Vicente i Roberts, 2007; Kaluzna i sar., 2010).

Kod nas je bakterija *P. s. pv. syringae* kao patogen voćaka proučavana od strane većeg broja istraživača Arsenijević, (1968); Arsenijević, (1970); Balaž i sar., (1988); Arsenijević, (1982); Balaž i Arsenijević, (1989); Gavrilović; (2006) i Ivanović i sar. (2009; 2012). U ranijem periodu *P. syringae* je najviše ispitivan kao prouzrokovatelj prevremenog sušenja kajsije (Arsenijević, 1968; Arsenijević, 1976; Arsenijević i Balaž, 1978; Arsenijević, 1982). Nešto kasnije Balaž i sar. (1988) i Balaž i Arsenijević (1989) navode bakteriju *P. syringae* kao štetnog patogena plodova višnje u više lokaliteta u Vojvodini (Šabac, Subotica, Lipar).

Detaljnija proučavanja bakterioza trešnje u našoj zemlji su započeta tek tokom poslednjih 10 – tak godina (Gavrilović i Milijašević, 2004; Gavrilović i sar., 2005). Autori ističu bakteriozno sušenje pupoljaka i grana trešnje u mladim, savremenim plantažnim zasadima, a kao prouzrokovatelje navode bakteriju *P. syringae*. Daljim radom Gavrilović i sar. (2012) zaključuju da su prouzrokovatelji izumiranja pupoljaka i grana trešnje bakterije *P. s. pv. syringae* i *P. s. pv. morsprunorum* (rasa 1) i to na području Beograda, Čačka, Topole, Šapca i Novog Sada. Tokom poslednjih nekoliko godina bakteriozni rak je i dalje aktuelan i ekonomski štetan patogen trešnje i drugih koštičavih voćnih vrsta u našoj zemlji (Ivanović i sar., 2009; Obradović i sar., 2010; Ivanović i sar., 2012; Balaž i sar., 2012; Gašić i sar., 2012).

## 4. 2. Ekonomski značaj

Bakterioze na koštičavim vrstama voćaka prouzrokuju značajne gubitke. Usled proširenja i izmene sortimenta, podloga i nemogućnosti primene uspešne hemijske zaštite, fitopatogene bakterije su sve rasprostranjenije i u povoljnim vremenskim uslovima mogu predstavljati ozbiljan ograničavajući faktor uspešne proizvodnje.

Prve literaturne podatke o ekonomskim štetama u mladim zasadima šljive navodi Wormald (1931), prema kome štete od bakterioznog sušenja mogu biti od 10%, 25%, 32% pa čak i do 43%. Cameron (1962) ističe da je najače sušenje i formiranje rak rana kod koštičavih voćaka u periodu od 1 – 8 godina, dok je kod starijih voćaka pojava bakterioznog raka sporadična i uglavnom se ispoljava samo sušenjem pupoljaka ili tanjih grana. Visok intenzitet propadanja se zapaža u mladim zasadima u kojima pri izrazito povoljnim vremenskim uslovima gubici mogu biti i do 75%, a gubici od 10 do 20% se smatraju uobičajenim. Usled masovnog izumiranja pupoljaka koje može biti i preko 80%, smanjuje se i prinos.

Prve velike štete na trešnji navodi Cameron (1960). Prema ovom autoru na trogodišnjim stablima trešnje tokom 1953. zapaženo je sušenje i propadanje lisnih i cvetnih pupoljaka, a štete su procenjene na oko 70%. U Engleskoj su tokom 1960 – tih takođe zabeleženi značajni gubici, zbog sve učestalije pojave bakterioznog raka na trešnji. Crosse (1966) bakteriozni rak navodi kao jedno od ekonomski najznačajnijih oboljenja posebno u područjima sa intenzivnom voćnom proizvodnjom i vlažnom klimom. Dhanvantari (1969) u istraživanjima sprovedenim tokom 1966 – 1968 u provinciji Ontario (Kanada) utvrđuje prvu pojavu bakterioznog raka na trešnji i šljivi, praćenu iznenadnim sušenjem grana i grančica na kojima se formiraju rak rane iz kojih ističe smola. Sletten (1979) tokom dugogodišnjih ispitivanja (1969 – 1976) u Norveškoj navodi *P. syringae* i *P. morsprunorum* kao dva najznačajnija prouzrokovaca sušenja i propadanja trešnje i šljive, ističući pri tome da sušenje u rasadnicima prouzrokuje štete od oko 25%. Isti autor navodi da se ove bakterije javljaju i u voćnjacima u rodu. Prema Lyskanowska (1979) u Poljskoj je tokom 1978. evidentirano više od 47% zaraženih stabala trešnje bakterijom *P. morsprunorum*. Takve biljke daju slab prinos i postepeno propadaju. Kod nas Gavrilović i Milijašević (2004), Gavrilović i sar. (2005) navode da bakteriozno sušenje pupoljaka i grana trešnje u mladim, savremenim plantažnim zasadima može prouzrokovati značajne štete praćene sušenjem mladih stabala.

Sušenje trešnje kao ozbiljan problem i to posebno tokom prve i druge godine nakon sadnje u Južnoj Africi navode Roos i Hattingh (1986). Slično ističu Latorre i sar. (1985), prema kojima se najveći procenat osušenih stabala trešnje zapaža tokom prvih pet godina posle sadnje. Renick i sar. (2008) navodi da su mlada stabla trešnje posebno osetljiva prema bakterioznom raku. Spotts i sar. (2010) ukazuju da štete na mladim stablima trešnje, ukoliko su uslovi za razvoja patogena povoljni mogu biti i do 75%. Autori posebno ističu da mlada stabla uglavnom stradaju ukoliko su oštećena mrazom, izmrzavanjem, rezidbom ili oštećenjem od insekata, kao i da se najveći procenat propadanja voćaka zapaža tokom prve dve godine posle sadnje. Velike ekonomske štete, praćene sušenjem celih stabala se javljaju prilikom prekraćivanja stabla (heading cut).

Pored trešnje i šljive *P. syringae* značajno ugrožava proizvodnju i drugih koštičavih vrsta. Süle i Seemüller (1987) navode bakteriju *P. s. pv. syringae* kao značajnog prouzrokovača pegavosti listova višnje. Tokom prolećnih meseci na mladim listovima ova bakterioza dovodi do velikih ekonomskih šteta jer prouzrokuje prevremeno opadanje lišća. Sundin i sar. (1988) u državi Michigan takođe ukazuju na problem bakterioznog raka kod trešnje i višnje, dok u susednoj Kanadi ova bolest ima veći značaj na trešnji i šljivi. Prema istim autorima na višnji veći značaj ima *P. s. pv. morsprunorum*, a na trešnji imaju podjednak značaj oba patogena varijeteta. Sobiczewski (1984) u Poljskoj navodi da bakterije *P. syringae* i *P. morsprunorum* prouzrokuju značajne ekonomske gubitke na stablima višnje.

U našoj zemlji tokom 1970 – tih Arsenijević (1968; 1976) ukazuje na značaj ekonomskih šteta koje *P. syringae* prouzrokuje na kajsiji (apopleksija). Balaž i sar. (1988) navode *P. syringae* kao značajnog prouzrokovača bakteriozne pegavosti plodova višnje u Vojvodini na sortama *Heimanns Konservenweichsel* i *Heimanns Rubinweichsel*, ističući da procenat zaraženih plodova pri povoljnim uslovima za razvoj patogena bio i do 80%.

Veći broj autora ističe značaj ovih patogena i u proizvodnji sadnica koštičavih vrsta voćaka (Wimalajeewa i Flett; 1985; Luz, 1997; Kennelly i sar. 2007; Hattingh i Roos, 2008; Bultreys i Kaluzna, 2010; Scortichini, 2010). Visok nivo zaraze koštičavih vrsta voćaka bakterijom *P. s. pv. syringae* utvrđen je u rasadnicima u državi Viktorija (Australija), gde se smatra značajnim faktorom u epidemiologiji bakterioznog raka (Wimalajeewa i Flett, 1985). Luz (1997) smatra da sadni materijal može biti jedan od glavnih izvora inokuluma bakterioznog raka (*P. s. pv. syringae* i *P. s. pv. morsprunorum*) u plantažama divlje trešnje. Prema Vicente i sar. (2004) mlada stabla divlje trešnje su posebno osetljiva prema



prouzrokovateljima bakterioznog raka, ističući značaj latentnih infekcija i zdravstvenog stanja sadnica u rasadnicima. Hattingh i Roos (2008) također ukazuju na značaj bakterioznog raka na sadnom materijalu, a posebno značaj latentnih infekcija pupoljaka ili podloge. Scortichini (2010) navodi da je propadanje sadnica u rasadnicima kao i mladih voćaka naročito izraženo na trešnji i višnji.

#### 4. 3. Taksonomska pozicija *P. syringae* pvs.

*P. syringae* je polifagna, široko rasprostranjena vrsta bakterije u svetu i kod nas. Na osnovu patogenih osobina i spektra domaćina podeljena je na 60 patogenih varijeteta (Young, 2010), a na osnovu DNK homologije na 9 genom vrsta (Gardan i sar., 1999). Spektr domaćina patogenog varijeteta *morsprunorum* ograničen je na koštičave voćne vrste i kao glavni domaćini navode se trešnja, kajsija, višnja, breskva, badem, šljiva i Japanska šljiva (Janse, 2005). U okviru vrste *P. s. pv. morsprunorum* opisane su dve rase (rasa 1 i 2). Pored pomenutih vrsta kao prouzrokovatelj sušenja se navodi i *P. s. pv. persicae* (Prunier, Luisetti et Gardan, 1970) Young, Dye et Wilkie 1978, koji je u Evropi utvrđen samo u Francuskoj, a za našu zemlju je karantinski parazit (Lista A1). Nedavno je na divljoj trešnji u Francuskoj opisan i *P. s. pv. avii* (Menard i sar., 2003).

U našoj zemlji *P. syringae* je kao parazit voćaka eksperimentalno dokazan na jabuci, krušci, kajsiji, višnji, trešnji, šljivi, breskvi i malini (Arsenijević, 1968; Arsenijević, 1970; Balaž i Arsenijević, 1989; Arsenijević, 1993; Gavrilović i sar., 2005; Gavrilović i sar., 2008; Gavrilović, 2006; 2009; Ivanović i sar., 2009; 2012).

Klasifikacija fitopatogenih bakterija se menjala i razvijala u zavisnosti od razvoja prirodnih nauka. Prvi sistemi klasifikacije su bazirani na osnovu morfoloških karakteristika, tipova simptoma i izgleda kolonija. Poseban doprinos u izmeni klasifikacije fitopatogenih bakterija tokom poslednje dve decenije su saznanja do kojih je došlo razvojem molekularne biologije i genetike. Sistemi klasifikacije se i danas permanentno menjaju i usavršavaju. Jedan od napoznatijih i opšte prihvaćen sistem klasifikacije i identifikacije fitopatogenih bakterija koji daju Garrity i sar. (2004) u „Bergey's Manual of Systematic Bacteriology“ (Second Edition). Prema ovom sistemu klasifikacije bakterija *P. syringae* pripada klasi III koja se deli na 3 reda i više porodica i rodova (Šema 1).

Domen: *Bacteria*  
Tip: *Proteobacteriaceae*  
Stablo: *Proteobacteria*  
Klasa III: *Gammaproteobacteria*  
Red IX: *Pseudomonadales*  
Familija: *Pseudomonadaceae*  
Rod: *Pseudomonas*  
Vrsta: *Pseudomonas syringae*

Šema 1. Taksonomska pozicija roda *Pseudomonas* u sistemu klasifikacije fitopatogenih bakterija (Garrity i sar., 2004).

#### 4. 4. Simptomi bolesti

*P. syringae* pvs. prouzrokuju sušenje koštičavih voćnih vrsta. Oboljenje je poznato pod nazivom bakteriozni rak. *P. s. pv. syringae* i *P. s. pv. morsprunorum* zaražavaju sve biljne organe (deblo, grane, plodove, cvetove, rodne grane i pupoljke). Bolest se manifestuje u vidu uvelosti i sušenja mladara, grana, cvetova i pegavosti plodova. Daljim razvojem bolesti na zaraženim granama formiraju se manje ili veće rak rane iz kojih ističe smola. Infekcije obično nastupaju tokom jeseni i zimskog perioda, a razvoj rak rana i njihovo širenje se nastavlja i uočava tokom proleća. Širenje rak rana je intenzivno od aprila do polovine maja, kada se njihova dužina i širina brzo povećava, kora ima vlažan izgled, uleže u tkivo i iz pukotina obično intenzivno ističe smola. Odstranjivanjem zaražene kore uočljiva je nekroza floema, ksilema i kambijuma, koja se ispoljava u vidu dužih ili kraćih traka crvenkasto – mrke boje. Početkom leta razvoj rak rana se zaustavlja, što se manifestuje jasnim pucanjem kore u zoni između zdravog i obolelog dela tkiva. Kora gubi vlažan izgled postaje suva i ispucala, a smola se suši (Cameron, 1962; Crosse, 1966; Hattingh i Roos, 2008; Spotts i sar., 2010).

Kod trešnje je naročito izraženo i propadanje pupoljaka koje se obično zapaža krajem februara, početkom marta. Kod obolelih pupoljaka prvo osnova dobija mrku boju, a zatim se suši i ceo pupoljak (Cameron, 1962). Nekroza se postepeno širi zahvatajući i drvenasti deo. Delimično zaraženi pupoljci nakon pucanja formiraju sitne hlorotične listove, koji se za kratko vreme i osuše. Pupoljci mogu biti zaraženi direktno ili putem sistemskog širenja bakterija kroz grančice, iz okolnih rak rana. Cameron (1960) ističe da do sušenja pupoljaka trešnje dolazi i kod starijih i mlađih voćaka.

Prema Cameron (1962) pojava bakterioznog raka se ispoljava sušenjem pojedinih grana ili celih stabala, čemu predhodi uvelost a zatim i sušenje lišća, koje postaje mrko i opada. Rak rane se obično formiraju u bazi zaraženih kratkih rodni grana na stablu i granama, šireći se u vidu eliptičnih pega prema osnovi i vršnom delu, koje je obično intenzivnije.

Lyskanowska (1974) navodi da se rak rane obično formiraju na delovima stabla gde počinje račvanje grana. Prema istom autoru simptomi sušenja se mogu zapaziti tokom celog perioda vegetacije. Na mladim grančicama na kojima je infekcija nastupila preko pupoljka tokom jeseni, pupoljci se ne otvaraju, sparušeni su, a ukoliko se delimično zaraženi pupoljci i otvore oni se ubrzo osuše. Na debljim granama simptomi bakterioznog sušenja se ispoljavaju u vidu sušenja mladara, odnosno listova koji žute i prevremeno opadaju.

Nekrotični proces i obrazovanje rak rana se javlja i na mestima povrede biljke rezidbom ili nekom drugom mehaničkom ozledom. Ova pojava je najopasnija kod mladih voćaka kod kojih se tokom prve godine vrši prekraćivanje stabla (heading cut). U ovom slučaju bakterije se brzo šire kroz elemente kore i zahvataju kako ksilem, tako i elementi kore – kambijum i floem. Kada nekroza prstenasto obuhvati stablo nastupa potpuno sušenje mlade voćke. Koren kod zaraženih voćaka ostaje zdrav na šta ukazuje pojava izbojaka iz korena i osnove debla, usled akumulacije hranljivih materija koje se dalje ne transportuju (Cameron, 1962; Hattingh i Roos, 2008; Balaž i sar., 2012).

Ukoliko do infekcije drvenastih organa dođe tokom vegetacije, one ostaju praktično bez značaja, jer se novo tkivo brzo formira (kalus) sprečavajući dalje širenje patogena. U ovoj fazi su od značaja infekcije koje bakterije vrše na zeljastim organima. Infekcije listova se uglavnom ostvaruju preko stoma i njima je podložno samo mlado lišće. Prvi simptomi na listovima trešnje se ispoljavaju u vidu pega vodenastog izgleda, koje mogu biti okruglaste, veličine od 1 – 2 mm. Pegavost je uglavnom praćena i pojavom hloroze. Sa starošću listova nekroza u okviru pega ispada, tako da listovi dobijaju rešetast izgled (Bultreys i Kaluzna, 2010).

Prema Jones (1971) infekcije cvetova trešnje obično nemaju veći značaj, ali ukoliko je vreme povoljno za razvoj patogena mogu biti veoma izražene i takvi cvetovi tamne i opadaju pre zamatanja plodova. Preko cvetnih drški patogen se sistemično širi u rodne grančice pa i u deblje grane. Cameron (1962), Spotts i sar. (2010) i Peter (2014) ističu da infekcije cvetova

imaju velik značaj, jer se populacija bakterija u periodu cvetanja uvećava za 10, pa čak i do 100 puta, zbog čega nastaju masovne infekcije cvetova koji se suše i opadaju.

Zaraženi plodovi trešnje obično se zapažaju odmah po zametanju, pege su ugnute i u okviru njih tkivo tamni. U slučajevima ranih infekcija nekroza uleže sve do koštice i takvi plodovi propadaju. Ukoliko je vreme povoljno, nastupa sistemično širenje patogena i na peteljke ploda, a zaraženi plodovi zajedno sa peteljkom opadaju pre vremena. U vreme dozrevanja plodova simptomi su manje izraženi jer pege ostaju blokirane sa nastupanjem visokih temperatura (Jones, 1971; Roos i Hattingh, 1986). Tokom letnjih meseci prema Hattingh i Roos (2008) populacija bakterija se u rak ranama smanjuje, a razvoj rak rana se zaustavlja (postaju neaktivne).

#### 4. 5. Biologija i epidemiologija patogena

Zbog složene i kompleksne epidemiologije *P. s. pv. syringae* i *P. s. pv. morsprunorum*, pored brojnih literaturnih izvora, neka pitanja u vezi biologije ovih patogena još uvek su nedovoljno razjašnjena. Uzimajući u obzir ranija istraživanja kao i nedavna proučavanja ovih patogena, izgleda da je na koštičavim voćnim vrstama epidemiologija oba patovara vrlo slična, sa određenim razlikama u pogledu izumiranja bakterija u rak ranama, temperaturama pri kojima nastupaju infekcije i razvoju rak rana (Crosse, 1957, 1959; Cameron, 1962; Crosse, 1966; Lattore i Jones, 1979; Klement i sar., 1984; Ross i Hattingh, 1986).

Crosse (1966) ističe da godišnji ciklus prouzrokovala bakterioznog sušenja (*P. syringae* i *P. morsprunorum*) obuhvata zimsku i letnju fazu bolesti. Zimska faza se odvija u kori debla i grana, a letnja je vezana za listove i druga zelena tkiva. Važnu ulogu u epidemiologiji ovih patogena ima i epifitna faza utvrđena od strane Crosse (1957, 1959) na listovima trešnje. Prema Scortichini (2010) u proleće ovi patogeni vrše kolonizaciju listova, cvetova i plodova, što označava početak epifitne faze. Prema ovom autoru epifitna faza bakterija *P. s. pv. syringae* i *P. s. pv. morsprunorum* se odvija na cvetovima i listovima gotovo tokom celog vegetacionog perioda, ali je brojnost epifitne populacije najveća tokom proleća i jeseni. Latorre i Jones (1979) takođe ističu da epifitna populacija *P. s. pv. morsprunorum* rasa 1 na listovima trešnje ima važnu ulogu u epidemiologiji ove bakterije i da je od velikog značaja za ostvarenje infekcija. Moore (1988) ukazuje da brojnost epifitne populacije dostiže maksimum 2 – 3 nedelje nakon pucanja pupoljaka, pri čemu dolazi do infekcije cvetova, preko kojih

bakterije dospevaju u grančice. Crosse (1966) takođe navodi da se brojnost epifitne populacije u periodu cvetanja uvećava za 10 do 100 puta. Tokom letnjih meseci sa nastupanjem visokih temperatura brojnost epifitne populacije se smanjuje, a bakterije nalaze zaštitu u stominim dupljama. U jesen kišovito vreme uvećava brojnost epifitne populacije, koja tada predstavlja izvor inokuluma za sveže lisne ožiljke, pupoljke i grane čime počinje zimska faza bolesti. Moore (1988) iznosi da je u periodu decembar – februar prisustvo epifitne populacije ovih bakterija nemoguće detektovati.

U jesen nakon ostvarenih infekcija bakterije *P. s. pv. syringae* i *P. s. pv. morsprunorum* prezimljavaju na i u pupoljcima, osušenim pupoljcima a verovatno i u rak ranama – endofitno (Peter, 2014). Prema ranijim literaturnim podacima (Crosse, 1966) u pogledu ostvarenja infekcije ovim bakterijama postoje dve teorije. Prema prvoj, infekcije u vreme opadanja lišća se ostvaruju preko pupoljaka i lisnih ožiljaka, koji su posebno osetljivi od 6 – tog septembra do kraja oktobra (Engleska). Prema istom autoru ukoliko se lisni ožiljci formiraju po suvom vremenu, do infekcije ne dolazi, a posle 8 – 14 dana po opadanju listova oni postaju otporni. Druga teorija o ostvarenju infekcije, se zasniva na ispitivanjima rađenim 1950 – tih (Webb, 1950), prema kojoj se 90% infekcija kod koštičavih vrsta voćaka ostvaruje u jesen, preko kratkih rodni granica kao i kroz povrede nastale rezidbom.

Crosse (1966) ističe da na otpornost biljaka velik uticaj ima faza razvoja, pri čemu su grane i deblo podložne infekcijama od kasne jeseni do ranog proleća, a da su tokom vegetacije visoko otporne. U prilog ovome idu i ranija istraživanja izvedena u Kaliforniji od strane Wilson (1939), koji je utvrdio da inokulacije voćaka bakterijom *P. syringae* izvedene početkom jeseni ostaju blokirane, aktivnošću periderma. Isti autor ističe da inokulacije izvedene kasno u jesen, usled smanjene aktivnosti biljaka domaćina, odnosno periderma daju pozitivne rezultate. Pozitivne rezultate inokulacije voćaka bakterijama *P. s. pv. syringae* i *P. s. pv. morsprunorum* urađenih u periodu mirovanja, a negativnih tokom perioda vegetacije navode i drugi autori (Otta i English, 1970; Chandler i Daniell, 1976; Hinrichs – Berger, 2003). Prema Hinrichs – Berger (2003) rak rane se intenzivno formiraju na južnoj strani voćke čak u 54,4% slučajeva, a na severnoj 21,8%. Autor zaključuje da su navedeni rezultati verovatno u vezi sa činjenicom da voćke od mraza uglavnom stradaju sa južne strane (koja je direktno izložena suncu), što kao rezultat ima topljenje kristala leda i pucanje kore. Pukotine kore na južnoj strani voćke predstavljaju idealna ulazna mesta i pružaju povoljne uslove (voda) za širenje *P. syringae* pvs. Crosse (1966) ističe da je nakon ostvarenja infekcije bakterijom *P. syringae* neophodan period niskih temperatura (ispod nule) u trajanju od

nekoliko dana. Zbog toga infekcije ovom bakterijom najčešće nastaju posle ekstremno niskih temperatura tokom zime ili izraženih kolebanja ovog parametra (smena niskih i visokih temperatura). Uticaj niskih temperatura na razvoj pv. *syringae* na kajsiji navode i Klement i sar. (1984). Prema ovim autorima veštačke inokulacije kajsije su moguće samo ako se biljno tkivo predhodno izloži niskim temperaturama – 5°C u trajanju od 5 – 10 dana.

Crosse (1966) navodi da *P. syringae* ima dva pika u pogledu razvoja rak rana, kasno u jesen i tokom proleća, sa minimalno izraženom aktivnošću tokom zimskog perioda. Prema Shanmuganathan (1962) nakon ostvarenja infekcije *P. morsprunorum* zahteva duži inkubacioni period, a značajniji razvoj rak rana ne nastupa pre ranog proleća, kada se bakterije najintenzivnije šire i migriraju u okolna zdrava tkiva. Razvoj rak rana prouzrokovanih ovom bakterijom zavisi od vremena nastupa infekcije, razvoja biljke domaćina, a naročito od vremenskih uslova (posebno temperature). Optimalna temperatura za ostvarenje infekcije bakterijom *P. morsprunorum* je najčešće od oko 15°C. Infekcije ostvarene pre januara, rezultiraju stvaranjem rak rana u vreme pucanja pupoljaka, a maksimalnu aktivnost imaju pre ili tokom perioda cvetanja. U kasno proleće, razvoj rak rana se zaustavlja aktivnošću felogena i potpuno prestaje početkom leta. Kretanjem vegetacije iz obolelog tkiva prezimele bakterije (primarni izvor inokuluma) dospevaju na površinu kore i kišnim kapima vrše infekcije zeljastih biljnih organa. Infekcije listova obično se dešavaju u vreme pre nego što bakterije u rak ranama postanu neaktivne. Posebno osetljivo je mlado lišće. Crosse (1966) na listovima navodi dva tipa simptoma. Prvi tip su infekcije listova koji se formiraju na kratkim rodnim granama, kod kojih pupoljci postaju zaraženi još u fazi opadanja listova. Drugi tip su obično infekcije listova koje nastupaju u letnjoj fazi bolesti na zeljastim mladarcima. Prema Cameron (1962) jake infekcije listova su u korelaciji sa vlažnim i prohladnim vremenom, praćenim kišom, jakim vetrom i gradom.

Razlike u pogledu epidemiologije *P. syringae* i *P. morsprunorum* je ispitivao veći broj autora (Barss, 1918; Wilson, 1933; Dye, 1954; Crosse, 1966). Navedeni autori smatraju da mali deo bakterija *P. syringae* ostaje u rak ranama tokom letnjih meseci i može postati aktivan tokom jeseni. Crosse (1966) takođe iznosi da je razvoj rak rana vrste *P. syringae* višegodišnji, a da u slučaju *P. morsprunorum* nema dovoljno utemeljenih podataka da su rak rane višegodišnje i da se bakterije tokom letnjih meseci održavaju u njima, iako je Erickson (1945) tokom letnjih meseci iz rak rana izolovao *P. morsprunorum*. Prema Bultreys i Kaluzna, (2010) u slučaju patovara *morsprunorum* rasa 1, češće su infekcije lisnih ožiljaka što nije slučaj kod patovara *syringae* kod kojeg su češće infekcije pupoljaka i cvetova, koje se u

slučaju *morsprunorum* rase 1 retko javljaju. Cao i sar. (2013) ispitujući mogućnost ostvarenja infekcije pv. *syringae* na višnji, šljivi i breskvi preko lisnih ožiljaka i lenticela na stablu, navode da je višnja naročito osetljiva i da se infekcije (jesen) preko lisnih ožiljaka i lenticela u poljskim uslovima ipak ostvaruju. Hinrichs – Berger (2003) je vršeci inokulacione oglede na šljivi utvrdio da je pv. *morsprunorum* prouzrokovao šušenje 50% pupoljaka, a pv. *syringae* 23%.

Prema Crosse (1954; 1955) i Cameron (1962) velik značaj u epidemiologiji ovih patogena, odnosno širenju bolesti ima zdravstveno stanje sadnica u rasadnicima kao i podloga koje se koriste za kalemljenje. Stresogeni uslovi koji prate proizvodnju (transport sadnica, trapljenje sadnica, razne povrede koje se javljaju pri manipulaciji, sadnja na stalno mesto) su posebno značajni. Moore (1988) ukazuje da je *P. syringae* patogen slabosti, a razni stresogeni faktori, kao što su mehaničke povrede, mraz ili faza mirovanja voćaka, dovodi ih u stanje još veće osetljivosti i uslova za brže i lakše širenje patogena. Prema Cao i sar. (1999) i Peter (2014) pojava bakterioznog raka se češće javlja na peskovitim i glinovitim zemljištima niže pH vrednosti, sa neadekvatnom primenom mineralnih đubriva i zalivanja (naročito kasno u jesen). Ovome doprinosi i prisustvo nematoda, zimska rezidba voćaka i pojava ranog prolećnog mraza.

#### **4. 6. Bakteriološke karakteristike, serološka i molekularna identifikacija *P. syringae* pvs.**

Prva detaljnija ispitivanja na identifikaciji prouzrokovala bakterioza u SAD (Oregon) navodi Cameron (1955; 1960). Dalja iscrpna ispitivanja na razlikovanju vrsta *P. syringae* i *P. morsprunorum* u Engleskoj navode Crosse i Garrett (1963) i Garrett i sar. (1966).

Ispitivanje bakterioloških karakteristika u periodu do 1980. su obuhvatala uglavnom sve do tada poznate klasične metode koje se koriste u proučavanju fenotipskih odlika fitopatogenih bakterija, a one podrazumevaju stvaranje fluorescentnog pigmenta (King i sar., 1954), LOPAT testove (Lelliott i sar., 1966), reakcije po Gramu, O/F test i prisustvo katalaze i dr. (Schaad, 1980; Lelliott i Stead, 1987).

Crosse (1966) i Garrett i sar. (1966) navode šemu za identifikaciju i razlikovanje vrsta *P. syringae* od *P. morsprunorum*. Ova šema osim opštih bakterioloških karakteristika obuhvata i razlaganje eskulina, aktivnost tirozinaze, praćenje karakteristika razvoja (boja) u tečnoj podlozi sa saharozom, korišćenje organskih kiselina (L – mlečna kiselina), L – leucina,

hidrolizu arbutina i osetljivost prema bakteriofagama (A – 7). Pored ovih testova koriste se i testovi patogenosti na biljci domaćinu i raznim test biljakama (nezreli plodovi trešnje, višnje, kruške, listovi jorgovana, mahune boranije).

Na aktuelnost ove problematike 60 – tih i 70 – tih godina, ukazuju radovi brojnih autora (Crosse i Garrett, 1963; Garrett i sar. 1966; Jones, 1971; Freigoun i Crosse, 1975; Lyskanowska, 1976; Sletten, 1979). Latorre i Jones (1979) radeći na ovoj problematici za razlikovanje *P. syringae* i *P. morsprunorum* poreklom sa koštičavih voćaka, uvode četiri determinativna testa, poznatih kao GATTa testovi (gelatine hydrolysis, aesculin hydrolysis, tyrosinase activity, utilization of tartaric acid). Vrsta *P. syringae* razlaže želatin, hidrolizuje eskulin, ne stvara tirozinazu i ne koristi tartarate ( $G^+A^+T^-Ta^-$ ), dok vrsta *P. morsprunorum* ne razlaže želatin, ne hidrolizuje eskulin ali stvara tirozinazu i koristi tartarate ( $G^-A^-T^+Ta^+$ ). Crosse i Garrett (1963) Crosse i Garrett (1966) radeći na proučavanju vrsta *P. syringae* i *P. morsprunorum* navode i postojanje intermedijarnih formi, koji po određenim karakteristikama (patogene, biohemijsko – fiziološke odlike, osetljivost na bakteriofage) odstupaju od tipičnih karakteristika za *P. syringae* i *P. morsprunorum*. Freigoun i Crosse (1975) proučavajući izolate bakterije *P. morsprunorum* sa trešnje, utvrđuju da se proučavani izolati po patogenosti i GATTa testovima, razlikuju u odnosu na *P. morsprunorum* rasa 1. Isti autori ove izolate bakterija označavaju kao *P. morsprunorum* rasa 2 („variant strain“).

Osim navedenih, koriste se još neki specifični testovi za razlikovanje *P. s. pv. syringae* i *P. s. pv. morsprunorum* (rase 1 i 2) a to je stvaranje toksina siringomicina (Gross i De Vay, 1977) i formiranje čestica leda (Ice Nucleation Activity) (Lindow, 1990). Mogućnost stvaranja siringomicina karakteristika je vrste *P.s. pv. syringae*. Ispituje se korišćenjem gljive indikatora *Geotrichum candidum* (Latorre i Jones, 1979). Pored navedene, u ovakvim ispitivanjima se mogu primeniti i gljive *Rhodotorula pilimanae* i *Saccharomyces cerevisiae*. Prema Backman i DeVay (1971) sojevi koji stvaraju siringomicin imaju znatno veću virulentnost i izazivaju krupnije pege na biljci domaćinu, u odnosu na sojeve koji ne poseduju ovaj toksin. Siringomicin deluje na ćelijske membrane, izazivajući lizis ćelija. Suprotno ovome Zeller i sar. (1996) smatraju da između patogenosti izolata *pv. syringae* i sposobnosti produkcije siringomicina nema korelacije. Völksch i sar. (1989) navode još jedan biotest za dokazivanje prisustva toksina (koronatin) specifičnog za vrstu *P. s. pv. morsprunorum* (rasa 1). Test se izvodi na kriškama krompira. Ukoliko je koronatin prisutan nastaje hipertrofija tkiva kriški, na koje je naneta suspenzija bakterije.



Sposobnost stvaranja čestica leda (INA) bitna je odlika za razlikovanje *P. syringae* od *P. morsprunorum*, jer prisustvo ove bakterije u zaraženim biljnim tkivima pospešuje njihovo izmrzavanje. Prema Moore (1988) za stvaranje čestica leda kod *P. s. pv. syringae* odgovoran je jedan gen koji kodira protein spoljne membrane. Ovi proteini formiraju velike agregate koji zajednički molekule vode pretvaraju u kristalne strukture, pri temperaturi od  $-2^{\circ}\text{C}$  do  $-10^{\circ}\text{C}$ , čime se katalizuje stvaranje čestica leda.

U periodu od 1980. taksonomska pozicija vrsta *P. syringae* i *P. morsprunorum* je promenjena. Prema Young i sar. (1978) ove vrste su dobile status patogenog varijeteta *P. s. pv. syringae* i *P. s. pv. morsprunorum*. Međutim i pored izmena u taksonomiji i sličnosti patogenih varijeteta i rasa ove bakterije, veći broj istraživača ističe postojanje i intermedijarnih sojeva bakterija poreklom sa trešnje i višnje (Crosse i Garrett, 1963; Garrett i sar., 1966; Sletten, 1979; Sobiczewski, 1984; Roos i Hattingh, 1986; Balaž i Arsenijević, 1989; Luz, 1997; Vicente i sar., 2004).

Karakteristike izolata *P. s. pv. syringae* i *P. s. pv. morsprunorum* se ispituju i serološkim metoda identifikacije. Vicente i sar. (2004) su primenom indirektnog ELISA testa uz korišćenje tri poliklonalna antiseruma utvrdili razlike između većine izolata bakterije *P. s. pv. morsprunorum* rasa 1 i rasa 2, kao i između izolata bakterije *P. s. pv. syringae*. Od seroloških metoda pored primene ELISA testa, u identifikaciji bakterija poreklom sa koštičavih voćnih vrsta i badema, Lopes i sar. (2010) navode i primenu IF testa. Autori ističu da primena ovih metoda daje zadovoljavajuće rezultate pri identifikaciji *pv. syringae*, dok je u slučaju drugih patovara moguća pojava ukrštene reakcije jer pojedini patovari vrste *P. syringae* imaju slične antigene, što onemogućava preciznu identifikaciju.

Novijom klasifikacijom bakterija, zasnovanom na DNK hibridizaciji ustanovljeno je da su *P. s. pv. morsprunorum* rasa 1 i *P. s. pv. morsprunorum* rasa 2, dva potpuno različita organizma, jer pripadaju genom – vrstama 2 i 3, dok *P. s. pv. syringae* pripada genom – vrsti 1 (Gardan i sar., 1999). *P. s. pv. avii*, patogen divlje trešnje pripada genom – vrsti 3 (Menard i sar., 2003). Istej genom – vrsti pripada i *P. s. pv. persicae*, patogen kajsije, nektarine i japanske šljive.

Poslednjih godina sve više je zastupljena identifikacija bakterija na molekularnom nivou korišćenjem lančane reakcije polimeraze (PCR – Polymerase Chain Reaction) i raznih varijanti ove metode (Weingart i Völksch, 1997; Scortichini i sar., 2003; Natalini i sar., 2006; Gilbert i sar., 2009; Kaluzna i sar., 2010; Gašić i sar., 2012; Gavrilović i sar., 2012; Ivanović

i sar., 2009; 2012). Značaj ove metode je u tome što je omogućava karakterizaciju bakterija koje se i pored korišćenja velikog broja klasičnih bakterioloških testova, nisu mogle svrstati ni u patovar *syringae* ni *morsprunorum* (intermedijarni). Molekularne metode su znatno preciznije i omogućuju pouzdanije diferenciranje bakterijske populacije. Za utvrđivanje razlika u populaciji ove bakterije, za preciznu identifikaciju se koriste razne PCR metode, među kojima su najčešće korišćene one koje su bazirane na vezivanju za ponovljive sekvence u genomu, označene kao repetitivne ekstrageneske palindromske sekvence (REP – PCR), enterobakterijske repetitivne intergeneske konsenzus sekvence (ERIC – PCR), BOX elementima, kao i detekciji gena za sintezu siringomicina (*syrB*), sekreciju siringomicina (*syrD*) specifičnog za vrstu *P. s. pv. syringae* i produkciju koronatina (*cfl*) za vrstu *P. s. pv. morsprunorum* rasu 1 i *P. s. pv. morsprunorum* rasu 2 gena za produkciju siderofora yersiniabaktin (*irp1*). Međutim i pored razlike u sintezi različitih gena, prema Gilbert i sar. (2009) u okviru *P.s.pv. morsprunorum* rase 1 postoje opisani izolati bakterije koji ne poseduju gen za sekreciju koronatina. Kao jedna od najpreciznijih navodi se analiza multilokus sekvenci (Multilocus sequence typing – MLST), odnosno visoko konzervativnih gena (“house – keeping genes”) primenom većeg broja prajmera: *gyrB* (DNA giraze B), *gapA* (glicerinaldehid – 3 – fosfat dehidrogenaze), *gltA* poznat i kao *cts* (citrata sintetaza) i *rpoD* (sigma faktor 70). MLST se bazira na priključivanju određenih alela svakom genskom lokusu direktno na osnovu nukleotidne sekvence alela, pa se mogu registrovati promene koje nastaju na nivou nukleotida (Spratt, 1999).

S obzirom na postojanje diverziteta izolata bakterije *P. syringae* kao i permanentnog širenja ove bakterije na nove domaćine, postoji potreba za primenom metoda koje omogućavaju međusobno poređenje izolata istih ili različitih vrsta bakterija. U tu svrhu se koristi RAPD – metoda nasumično umnožene polimorfne DNK (Random Amplified Polymorphic DNA), koja je uspešna za poređenje izolata korišćenjem većeg broja prajmera. Takođe, primena RAPD analize može ukazati i na određene genotipske promene bakterije *P. syringae* (Williams i sar., 1990).

#### 4. 7. Suzbijanje

Mogućnosti za suzbijanje bakterioza su generalno veoma ograničene jer se uglavnom svode na primenu agrotehničkih i fitosanitarnih mera zaštite. Prema tome suzbijanje treba maksimalno usmeriti na primenu što efikasnijih preventivnih mera zaštite. Hemijske mere

uglavnom podrazumevaju samo preventivnu primenu bakarnih preparata, ali kod voćaka tu postoje značajna ograničenja, jer se bakarni preparati mogu koristiti samo u periodu mirovanja vegetacije. Jedna od najbitnijih preventivnih mera je proizvodnja i korišćenje zdravog sadnog materijala, kompatibilnih podloga i plemki i što otpornijeg sortimenta.

Od agrotehničkih mera to je svakako pravilno vreme za izvođenje rezidbe. Rezidbu treba izvoditi u ranom letnjem periodu, uz obaveznu dezinfekciju alata, kako bi se sprečio prodor parazita kroz ozlede i izbeglo stvaranje rak rana. Carroll i sar. (2010) ističu da je rezidbu trešnje najbolje izvoditi krajem jula meseca. Pored pomeranja rezidbe za što kasniji period Spotts (2001) upućuje i na vremenske uslove u kojima se rezidba izvodi, jer svaka novonastala rana u prisustvu kiše predstavlja idealne uslove za razvoj bolesti. U tom smilu rezidbu mladih voćaka nije dobro izvoditi, ukoliko predstoji kišni period u roku od 72 sata.

Za hemijsku zaštitu preporučuje se korišćenje preparata na bazi bakra i antibiotika, međutim u našoj zemlji antibiotici nemaju dozvolu za primenu u zaštiti bilja. Primenu bakarnih preparata treba izvesti tokom jeseni i to prvo kada počne opadanje lišća i drugo kada opadne do 2/3 lišća. Na ovaj način se štite lisni ožiljci koji predstavljaju potencijalna mesta za prodor parazita i snižava nivo epifitne populacije bakterija. Prema istraživanjima Carroll i sar. (2010) primena bakarnih preparata nakon rezidbe voćaka obezbeđuje minimalnu zaštitu od bakterijskih infekcija. U proleće radi sprečavanja razvoja epifitne populacije, koja pri povoljnim uslovima može predstavljati značajan izvor infekcije, preporučuje se jedno tretiranje preparatima na bazi bakra. Da bi se suzbila epifitna populacija primenu bakarnih preparata najbolje bi bilo uraditi kasno u leto, u ranu jesen, kasnu zimu i rano proleće. Na našem tržištu od preparata na bazi bakra nalaze se: Bordovska čorba, Funguran, Kuproksat, Kuprozin, Bakrocid, Nordox, Kuprablau, Neoram i dr. Međutim, pojava rezistentnih sojeva bakterije *P. s. pv. syringae* prema bakru je utvrđena još 1989. godine u Americi (Sundin i sar., 1989). Primena raznih antibiotika uglavnom daje pozitivne rezultate, ali je problem što s jedne strane u mnogim zemljama nemaju dozvolu za primenu, a sa druge utvrđena je pojava rezistentnosti fitopatogenih bakterija prema većini antibiotika (McManus i sar., 2002). Prema Carroll i sar. (2013) pri primeni antibiotika u suzbijanju bakterioznog raka, najbolji efekat je utvrđen kod Kasumina (kasugamicin), a zadovoljavajući kod preparata Flameout (oksitetraciklin).

U suzbijanju bakterioza na voćnim vrstama navodi se i primena regulatora rasta. Preparati Regalis (Evropa, BASF) i Apogee (USA) su na bazi proheksadion – kalcijuma koji

direktno utiče na porast mladara, odnosno smanjuje porast mladara. Prema Bazzi i sar. (2003) pri primeni ovog preparata u suzbijanju bakteriozne pegavosti, porast mladara je bio redukovan ali ne i intenzitet bolesti na listovima, tako da su rezultati primene ovih preparata još uvek nedovoljno jasni. U Italiji Scortichini i Ligouri (2003) ističu zadovoljavajuću efekat acibenzolar – S – metila, aktivatora sistemične otpornosti biljaka (Actigard, USA; Bion, Evropa) u suzbijanju bakterioznog sušenja lešnika, čiji je prouzrokovatelj *P. s. pv. syringae*.

Obevezno je i tretiranje korova u voćnjacima, a posebno travnih korovskih vrsta na kojima se ova bakterija može održati epifitno.

Osim ovih direktnih mera zaštite potrebno je otkloniti i sve faktore koji na određeni način doprinose razvoju oboljenja. To su pre svega izbor terena i područja za gajenje trešnje, zatim umanjiti svaki vid mehaničkih oštećenja i oštećenja nastalih mrazom. Kako bi se smanjilo nepovoljno delovanje mraza i niskih temperatura posebno kod mlađih stabala, potrebno je vršiti premazivanje lateks bojom kojoj se mogu dodati i bakarni preparati. Kod primene mineralnih đubriva voditi računa posebno pri korišćenju azotnih đubriva. Ova đubriva, ne bi trebalo primenjivati krajem leta jer azot produžava vegetaciju, a samim tim biljke ulaze u period mirovanja nedovoljno spremne i osjetljive, kako na nepovoljne temperature tako i patogene. Podizanje novih zasada ne vršiti u blizini starijih, kod kojih već postoji ili se sumnja na prisustvo bakterije *P. syringae* pvs. Pri sadnji voćaka na stalno mesto, navodnjavanje biljaka mora biti izbalansirano zbog smanjenja stresa koji nastaje prilikom sadnje. Za preporuku je da se tokom kasnog leta smanji zalivna norma ili čak prekine, kako bi biljke u fazu mirovanja ušle spremne i manje podložne na uticaj niskih temperatura i mraza. Zaražena stabla i grane sa prisutnim rak rana treba odstraniti i ukloniti iz zasada (Spotts, 2001; Carroll i sar., 2010; Balaž i sar., 2012).

Prema Thornton i Nugent (2002) najosetljivija podloga za trešnju je Gisela (5 i 6). Isti autori u pogledu osjetljivosti sortimenta trešnje navode da otporne sorte ne postoje, ali su manje osjetljive Corum, Sam i Sue dok su Bing, Hardy Giant, Lambert, Royal Anne, Schmidt, Van i Windsor visoko osjetljive. Spotts i sar. (2010) ispitujući različite kombinacije sorti i podloga za trešnju navode da je prema pv. *syringae* posebno osjetljiva sorta Bing i Sweetheart, dok su Regina i Rainier manje osjetljive. U pogledu kombinacije podloga i sorti najosetljivija se pokazala kombinacija sorte Bing na podlozi Gisela 6, kod koje je sušenje bilo 90%, dok u slučaju iste sorte ali na podlozi Kolt, suvih voćaka nije bilo. Spotts (2001) navodi da se podloga Mazzard F12 – 1 za višnju pokazala kao otporna, ali u slučaju trešnje, ni jedna

podloga nije ispoljila otpornost prema bakterioznom raku. Allen i Dirks (1978) navode da su prema pv. *syringae* posebno osjetljive sorte trešnje Viva, Venus, Vega i Victor, a manju osjetljivost ispoljavaju sorte Hedelfigenska i Bing.

#### 4. 8. Simptomi slični bakterioznom sušenju

Mnoge bolesti biotske ili abiotske prirode su simptomatološki slične bakterioznom sušenju. Prouzrokovaci bolesti biotske prirode su bakterije, gljive, virusi ili fitoplazme, ali i razni insekti.

Od prouzrokovaca bakterioznih oboljenja na trešnji *A. tumefaciens* može prouzrokovati simptome slične bakterioznom sušenju. Razvojem tumora na korenu nastupa prekid hranljivih materija i vode u biljci, zbog čega dolazi do sušenja mladara i grana voćaka koje može podsećati na bakteriozno sušenje (*P. syringae* pvs). Jedina bitna razlika u poređenju sa bakterioznim rakom korena, jeste prisustvo tumora. Pojavu bakterioznog raka korena tokom ovih ispitivanja, utvrdili smo u jednoj od većih plantaža (Selenča), ali je prisustvo bilo sporadično.

Bolesti slične bakterioznom sušenju mogu izazvati i gljive iz roda *Cytospora* (*Leucostoma*) i *Phomopsis*. Veći broj autora ističe značaj navedenih vrsta kao prouzrokovaca sušenja trešnje (Spotts i sar., 1990; Regner i sar., 1990; Barakat i Johnson, 1997; Peter, 2014). Citosporozno izumiranje je značajno oboljenje breskve, kajsije, trešnje, višnje, šljive, jabuke, kruške i raznih drugih biljaka. U svetu i kod nas ova gljiva je najviše proučavana kao patogen prevremenog izumiranja kajsije i breskve (Luepschen i sar., 1979; Wilson i sar., 1984; Biggs, 1989; Biggs, 2008; Arsenijević i sar., 1973; Arsenijević i sar., 1982; Balaž i sar., 1994; Popović, 2004; Popović i Balaž, 2005). Prema Balaž i sar. (2012) citosporozno izumiranje je sve značajniji problem kod nas i u zasadima trešnje. Spotts i sar. (1990) ispitujući uzročnika sušenja trešnje u državi Oregon, ističu da je pri pregledu 1000 stabala trešnje (u 20 različitih voćnjaka) zastupljenost gljive *C. cincta* i bakterije *P. s. pv. syringae* bila podjednaka. Pokharel (2009) navodi da štete na koštičavim vrstama voćaka u Koloradu iznose 15 – 20%. Prema istom autoru zavisno od područja gajenja, sorte i mnogih drugih faktora (starost voćaka, a naročito period u kome su ostvarene infekcije), ističe da do najvećeg propadanja dolazi kod voćaka kod kojih je infekcija nastupila u ranijem stadijumu razvića. Isti autor navodi da se na trešnji pored *C. cincta* javlja i *L. personii*.

Pojava vrsta iz roda *Cytospora* i *Phomopsis* na trešnji tokom ovih ispitivanja zabeležena je u nekoliko lokaliteta na području Vojvodine i centralne Srbije (Ritopek). Simptom sušenja je konstatovan kako u starijim tako i mladim zasadima i plantažama trešnje i to posebno vrsta *Cytospora* spp. Na obolelim vočkama uglavnom se zapaža propadanje kore sa jasno izraženim promenama boje tkiva u mrko ljubičastu, što na osnovu simptoma podseća na bakteriозno sušenje. Zaražena kora puca, formiraju se rak rane iz kojih ističe smola (Sl.4a, 4b). Ovakvi simptomi u voćnjacima su prisutni tokom cele godine, ali se najkarakterističniji simptom javlja tokom kretanja vegetacije, kada se pojedini pupoljci ne otvaraju i u njihovoj osnovi su prisutne eliptične mrke pege, koje se šire u dužinu i širinu. U okviru pega kora se nabira, puca i nastaju rak rane. Pojava nekroze se često zapaža i na mestima rezidbe i prekraćivanja stabla trešnje. Ukoliko dođe do kretanja pupoljaka posle dve nedelje oni se suše. Ubrzo dolazi i do delimičnog ili potpunog sušenja grana, a ponekad i celih mlađih i starijih voćaka. Bitna simptomatološka razlika u poređenju sa bakteriозnim sušenjem je pojava crnih piknida *Cytospora* spp. u kori osušenih biljnih organa. Detaljnija ispitivanja i ulogu ovih patogena kao prouzrokovaca sušenja grana i stabala trešnje u našim uslovima bi svakako trebalo ispitati, jer poslednjih godina dobijaju sve veći značaj.

Insekti iz familija *Buprestidae* i *Scolytidae* – drvotočci, ishranom u kori grana i stabla prouzrokuju sušenje mladara i savijanje vrhova mladara, pa najzad i sušenje celih grana i stabala (Sl.4c, 4d). Simptome nalik bakteriозnom sušenju mogu izazvati i abiotski činioci a to su pre svega suša, ozlede od žege, mraza, vetra i herbicida (Sl.4e).



Slika 4. Citosporozno izumiranje trešnje sušenje grana, pucanje kore – rak rane (a, b), oštećenja od insekata familija *Buprestidae* (c) imago vrste *Perotis lugubris* Fab. (d), oštećenja na listovima usled neadekvatne primene herbicida (e) (Orig.)

## 5. MATERIJAL I METOD RADA

Eksperimentalan rad je izvođen u Laboratoriji za fitobakteriologiju, Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu; Insututu za zemljište i Institutu za zaštitu bilja i životnu sredinu u Beogradu. Inokulacioni ogledi su izvođeni u Botaničkoj bašti Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu i na Oglednom polju Departmana za voćarstvo, vinogradarstvo, hortikulturu i pejzažnu arhitekturu – Rimski Šančevi.

Sva ispitivanja su obavljena u okviru projekata Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj: TR31038 „Stvaranje slabobujnih podloga za trešnju i višnju i razvijanje intenzivne tehnologije gajenja na principima održive poljoprivrede“ i III46007 „Novi autohtoni izolati bakterija *Lysobacter* i *Pseudomonas* kao važan izvor metabolita korisnih za biotehnologiju, stimulaciju rasta biljaka i kontrolu bolesti bilja: od izolata do preparata“

### 5. 1. SAKUPLJANJE OBOLELIH UZORAKA TREŠNJE

U periodu od 2012 – 2015. izvršen je monitoring zdravstvenog stanja trešnje u određenim regionima na teritoriji Vojvodine i regionu poznatom po proizvodnji trešnje (okolina Ritopeka) u centralnoj Srbiji. Uzorci sa karakterističnim simptomima su donošeni u Laboratoriju na analizu i identifikaciju prouzrokovala bolesti. Monitoringom je obuhvaćeno nekoliko plantaža i manjih zasada trešnje iz više lokaliteta na području Vojvodine (Južno bački okrug – Kać, Rimski Šančevi, Čerević, Čelarevo, Sirig, Temerin, Selenča, Bođani, Bačka Palanka; Sremski okrug – Krčedin; Severno banatski okrug – Kanjiža; Severno bački okrug – Ljutovo, Gornji Tavankut, Donji Tavankut, Mikićevo) (Tab.1).

Osnovni simptomi koji su tokom proleća i leta zapaženi u ovim voćnjacima i iz kojih su vršene izolacije jeste sušenje jednogodišnjih grančica, žućenje i venjenje listova. Sušenje grančica obično polazi od suvih pupoljaka, oko kojih se obrazuju eliptične pege, koje kasnije pucaju prelazeći u sitne rak rane. U pojedinim slučajevima dolazilo je i do potpunog sušenja mladih voćaka, kod kojih se simptomi (rak rane) javljaju oko raznih mehaničkih ozleda i velikih rezova (heading cut). Odstranjivanjem zaražene kore jasno se uočava promena boje unutrašnjih tkiva u crvenkasto – mrku. Pegavost na listovima je uočena tokom maja i juna.



Tabela. 1. Lokaliteti sa kojih su prikupljeni oboleli uzorci trešnje

Lokalitet	Površina zasada/plantaže	Starost zasada/plantaže	Sorte/ podloga
Kać	7 ha	13 god.	Standardne sorte (Burlat, Hedelfigenska, Germerzdorfska, Valeri Chkalov) / <i>P. mahaleb</i>
Rimski Šančevi	1 ha	17 god.	Standardne sorte (Burlat, Germerzdorfska, Hedelfigenska, Drojanova žuta) / <i>P. mahaleb</i>
Čerević	0,5 ha	3 – 4 god.	Summit / <i>P. mahaleb</i>
Čelarevo	1,6 ha	4 god.	Regina, Kordia / Gisela 5
Sirig	1 ha	6 god.	New Star / <i>P. mahaleb</i>
Temerin	1,3 ha	1.god.	Regina, Kordia, Ferrovia, Early Bigi / Gisela 6
Krčedin	14 ha	4 god.	Germerzdorfska, Burlat, Van, Hedelfigenska/ <i>P. mahaleb</i>
Selenča	16 ha	2 – 3 god.	Vanda, Summit, Burlat, Merchant, Regina, Kordia / Gisela 5
Bođani	0,5 ha	5 god.	Hedelfigenska, Burlat, Džordžija / <i>P. mahaleb</i>
Kanjiža	0,5 ha sadnice za 17 ha	Rasadnik	Valeri Chkalov, Germerzdorfska, Vera, Summit, New Star / <i>P. mahaleb</i>
Ljutovo	17 ha	1.god.	Valeri Chkalov, Summit, Germerzdorfska, New Star, Vera / <i>P. mahaleb</i>
Gornji Tavankut	2 ha	3 god.	Summit / <i>P. mahaleb</i>
Donji Tavankut	1,5 ha	3 – 4 god.	Carmen, Celeste / <i>P. mahaleb</i>
Mikićevo	0,7 ha	2 god.	Regina, Kordia / Gisela 5
Ritopek	veći broj manjih zasada	> 10 god.	Standardne sorte (Burlat, Germerzdorfska, Lionska rana) / <i>P. mahaleb</i>
Bačka Palanka	4 ha	4 god.	Carmen, Summit, Celeste / <i>P. mahaleb</i>

## 5. 2. IDENTIFIKACIJA

### 5. 2. 1. IZOLACIJE

#### 5. 2. 1. 1. Izolacije bakterija na hranljive podloge

Iz obolelih uzoraka izolacije su rađene uglavnom tokom cele godine, a najmasovnije u fazi intenzivnog razvoja vegetacije u proleće. U tom periodu, posebno tokom faze cvetanja i razvoj rak rana je najintenzivniji.

U lokalitetima u kojima je konstatovano prisustvo bakterioznog sušenja, obilazak zasada / plantaža je vršen svakog meseca uz uzimanje uzoraka za analizu. Uzorci grančica, višegodišnjih grana i celih stabala trešnje koji su ispoljavali simptome sušenja i rak rana donošeni su u Laboratoriju za fitobakteriologiju na analizu (2012 – 2015). Nakon odstranjivanja kore za izolacije su uzimani delovi floema sa prelaza zdravog i obolelog dela, koji je crvenkasto – mrke boje i uglavnom lepljiv. Izolacije su rađene i iz obolelog ksilema, što se manifestovalo u vidu izduženih mrkih traka u unutrašnjosti obolelih drvenastih delova tkiva. Ovi simptomi i najintenzivniji rad na izolacijama sa grana (rak rane) uglavnom je bio tokom aprila. Izolacije sa listova rađene su tokom maja i juna meseca. Izolacije su rađene po uobičajenom laboratorijskom postupku (Šutić i Panić, 1969). Za izolacije je korišćena podloga obogaćena saharozom 5% (Nutrient Sucrose Agar – NSA) i hranljivi agar (Nutrient Agar – NA) (Lelliott i sar., 1966).

Izolacija gljiva kao eventualnih prouzrokovaca sušenja i propadanja trešnje uporedo je rađena na podlogu PDA (Potato Dekstrose Agar) (Delibašić i Babović, 2006).

Kolonije sa morfološkim karakteristikama tipičnim za vrstu *P. syringae* presejane su na kosu mesopeptonsku (MPA) podlogu sa 2% glicerola u cilju formiranja Kolekcije čistih izolata za dalja ispitivanja. Dobijeni izolati su čuvani u Kolekciji fitopatogenih bakterija – KBNS (Laboratorija za fitobakteriologiju, Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu) u epruvetama sa uljem pri temperaturi od 4°C i u podlozi Luria Bertani (LB) pri temperaturi – 20°C (Bertani, 1952).

Ovim postupkom dobijen je velik broj izolata fitopatogenih bakterija, od kojih su za dalji rad odabrani izolati pod šiframa prikazani u Tabeli 2. U rad su uključeni i izolati pod šiframa KBNS71 – 94, dobijeni od J. Balaž (Balaž i sar., 2016).

### 5. 2. 1. 2. Izolacije epifitne bakterijske populacije

S obzirom da je za ovu bakteriju poznato da se u jednom delu svog životnog ciklusa održava i ponaša kao epifit, vršene su izolacije i epifitne populacije.

Ispitivanje prisustva epifitne populacije vršeno je sa nekoliko odabranih lokaliteta (Gornji Tavankut, Ljutovo, Mikićevo i Selenča) i to sa pupoljaka u fazi početka kretanja vegetacije (20.2. i 10.3.2014.) i tokom leta (15.8.2014.) sa zdravih listova trešnje.

Izolacije sa pupoljaka su vršene prema metodu koji navode Roos i Hattingh (1983). Sa 5 slučajno odabranih stabala, uzeto je po 10 grančica (1 – 2 godišnjih), od svake sorte trešnje iz pomenutih zasada, uzeta su po 2 uzorka. Prikupljene grane trešnje su dezinfikovane 70% alkoholom, nakon čega su pupoljci sterilno skinuti sa grane. Svaki od pupoljaka je isečen na manje fragmente i potopljen u 2 ml 0,01M fosfatnog pufera (pH 7). Tako pripremljene posude su postavljene na mešalicu tokom dva sata. Iz dobijene suspenzije vršeno je zasejavanje bakterija na NSA i NA. Za utvrđivanje prisustva epifitne populacije na listovima takođe su korišćeni zdravi listovi trešnje prikupljeni slučajnim izborom, prema metodu Crosse (1959). Jedan uzorak činilo je oko 100 listova, sa po 5 slučajno odabranih stabala. Od svake sorte uzeta su po 3 uzorka. Istog dana uzorci su potapani u veće laboratorijske posude u koje je dodato 4 lit. 0,01M fosfatnog pufera (pH 7). Tako pripremljeni listovi su držani na sobnoj temperaturi 6 h, nakon čega je pufer dekantiran. Iz dobijenog rastvora vršeno je zasejavanje na NSA i NA podlogu.

Zasejane podloge su potom inkubirane pri temperaturi od 25 – 26°C, a pregled kolonija je vršen nakon 48h.

Ovim postupkom dobijen je veći broj izolata bakterija *P. syringae*, od kojih je za dalji rad odabrano 10 – tak izolata. Izolati epifitne bakterijske populacije takođe su prikazani u Tabeli 2.

Tabela 2. Izolacija iz obolelih uzoraka trešnje, zdravih pupoljaka i listova trešnje  
(epifitna populacija)

Redni broj	Šifra izolata	Radne oznake	Lokalitet	Sorta	Biljni organ	Datum i godina izolacije
1	KBNS71	-	Selenča	Burlat	Grana	20.4. 2012
2	KBNS72	-	Selenča	Burlat	Grana	20.4. 2012
3	KBNS73	-	Selenča	Burlat	Grana	20.4. 2012
4	KBNS74	-	Selenča	Burlat	Grana	20.4. 2012
5	KBNS75	-	Selenča	Burlat	Grana	20.4. 2012
6	KBNS76	-	Selenča	Burlat	Grana	20.4. 2012
7	KBNS77	-	Selenča	Burlat	Grana	20.4. 2012
8	KBNS78	-	Selenča	Burlat	Grana	20.4. 2012
9	KBNS79	-	Selenča	Burlat	Grana	20.4. 2012
10	KBNS80	-	Selenča	Burlat	Grana	20.4. 2012
11	KBNS81	-	Selenča	Burlat	Grana	20.4. 2012
12	KBNS82	-	Selenča	Burlat	Grana	20.4. 2012
13	KBNS83	-	Selenča	Burlat	Grana	20.4. 2012
14	KBNS84	-	Selenča	Burlat	Grana	20.4. 2012
15	KBNS85	-	Gornji Tavankut	Summit	Grana	3.5. 2012
16	KBNS86	-	Gornji Tavankut	Summit	Grana	3.5. 2012
17	KBNS87	-	Gornji Tavankut	Summit	Grana	3.5. 2012
18	KBNS88	-	Gornji Tavankut	Summit	Grana	3.5. 2012
19	KBNS89	-	Gornji Tavankut	Summit	Grana	3.5. 2012
20	KBNS90	-	Gornji Tavankut	Summit	List	3.5. 2012
21	KBNS91	-	Gornji Tavankut	Summit	List	3.5. 2012
22	KBNS92	-	Gornji Tavankut	Summit	List	3.5. 2012
23	KBNS93	-	Gornji Tavankut	Summit	List	3.5. 2012
24	KBNS94	-	Gornji Tavankut	Summit	List	3.5. 2012
25	KBNS300	S1	Selenča	Burlat	Grana	5.4.2013.
26	KBNS301	S2	Selenča	Burlat	Grana	5.4.2013.
27	KBNS302	S3	Selenča	Burlat	Grana	5.4.2013.
28	KBNS303	S4	Selenča	Burlat	Grana	5.4.2013.
29	KBNS304	S5	Selenča	Burlat	Grana	5.4.2013.
30	KBNS305	S6	Selenča	Burlat	Grana	5.4.2013.
31	KBNS306	S7	Selenča	Burlat	Grana	5.4.2013.
32	KBNS307	S8	Selenča	Burlat	Grana	5.4.2013.

33	KBNS308	S9	Selenča	Burlat	Grana	15.6.2013.
34	KBNS309	S10	Selenča	Burlat	Grana	15.6.2013.
35	KBNS310	S11	Selenča	Burlat	Grana	15.6.2013.
36	KBNS311	S12	Selenča	Burlat	Grana	15.6.2013.
37	KBNS312	S13	Selenča	Burlat	Grana	15.6.2013.
38	KBNS313	S14	Selenča	Burlat	Grana	15.6.2013.
39	KBNS314	S15	Selenča	Merchant	Grana	23.11.2013.
40	KBNS315	S16	Selenča	Merchant	Grana	23.11.2013.
41	KBNS316	S17	Selenča	Merchant	Grana	23.11.2013.
42	KBNS317	S18	Selenča	Merchant	Grana	23.11.2013.
43	KBNS318	S19	Selenča	Merchant	Grana	23.11.2013.
44	KBNS319	S20	Selenča	Merchant	Grana	23.11.2013.
45	KBNS320	S21	Selenča	Summit	Grana	23.11.2013
46	KBNS321	S22	Selenča	Summit	Grana	23.11.2013
47	KBNS322	S23	Selenča	Summit	Grana	23.11.2013
48	KBNS323	S24	Selenča	Vanda	Grana	23.11.2013
49	KBNS324	S25	Selenča	Vanda	Grana	23.11.2013
50	KBNS325	S26	Selenča	Vanda	Grana	23.11.2013
51	KBNS326	S27	Selenča	Vanda	Grana	23.11.2013
52	KBNS327	S28	Selenča	Vanda	Grana	23.11.2013
53	KBNS328	S29	Selenča	Vanda	Grana	23.11.2013
54	KBNS329	S30	Selenča	Merchant	Grana	17.1.2014.
55	KBNS330	S31	Selenča	Merchant	Grana	17.1.2014.
56	KBNS331	S32	Selenča	Merchant	Grana	17.1.2014.
57	KBNS332	S33	Selenča	Merchant	Grana	17.1.2014.
58	KBNS333	S34	Selenča	Vanda	Grana	20.3.2014.
59	KBNS334	S35	Selenča	Vanda	Grana	20.3.2014.
60	KBNS335	S36	Selenča	Vanda	Grana	20.3.2014.
61	KBNS336	S37	Selenča	Vanda	Grana	20.3.2014.
62	KBNS337	S38	Selenča	Vanda	Grana	20.3.2014.
63	KBNS338	S39	Selenča	Vanda	Grana	20.3.2014.
64	KBNS339	S41	Selenča	Vanda	List	20.5.2014.
65	KBNS340	S42	Selenča	Vanda	List	20.5.2014.
66	KBNS341	S43	Selenča	Vanda	List	20.5.2014.
67	KBNS342	S44	Selenča	Vanda	List	20.5.2014.
68	KBNS343	S45	Selenča	Merchant	List	20.5.2014.

69	KBNS344	S46	Selenča	Merchant	List	20.5.2014.
70	KBNS345	S47	Selenča	Merchant	List	20.5.2014.
71	KBNS346	S48	Selenča	Burlat	List	20.5.2014.
72	KBNS347	S49	Selenča	Burlat	List	20.5.2014.
73	KBNS348	S50	Selenča	Burlat	List	20.5.2014.
74	KBNS349	S51	Selenča	Burlat	List	20.5.2014.
75	KBNS350	S52	Selenča	Burlat	List	20.5.2014.
76	KBNS351	S53	Selenča	Burlat	List	20.5.2014.
77	KBNS352	T1	Gornji Tavankut	Summit	Grana	24.6.2013.
78	KBNS353	T2	Gornji Tavankut	Summit	Grana	24.6.2013.
79	KBNS354	T3	Gornji Tavankut	Summit	Grana	24.6.2013.
80	KBNS355	T4	Gornji Tavankut	Summit	Grana	24.6.2013.
81	KBNS356	T5	Gornji Tavankut	Summit	Grana	24.6.2013.
82	KBNS357	T6	Gornji Tavankut	Summit	Grana	24.6.2013.
83	KBNS358	T7	Gornji Tavankut	Summit	Grana	24.6.2013.
84	KBNS359	T8	Gornji Tavankut	Summit	Grana	24.6.2013.
85	KBNS360	T9	Gornji Tavankut	Summit	Grana	24.6.2013.
86	KBNS361	T10	Gornji Tavankut	Summit	Grana	24.6.2013.
87	KBNS362	T11	Gornji Tavankut	Summit	Grana	24.6.2013.
88	KBNS363	T12	Gornji Tavankut	Summit	Grana	24.6.2013.
89	KBNS364	T13	Gornji Tavankut	Summit	Grana	24.6.2013.
90	KBNS365	T14	Gornji Tavankut	Summit	Grana	24.6.2013.
91	KBNS366	T15	Gornji Tavankut	Summit	Grana	26.7.2013.
92	KBNS367	T16	Gornji Tavankut	Summit	Grana	26.7.2013.
93	KBNS368	T17	Gornji Tavankut	Summit	Grana	26.7.2013.
94	KBNS369	T18	Gornji Tavankut	Summit	Grana	26.7.2013.
95	KBNS370	T19	Gornji Tavankut	Summit	Grana	26.7.2013.
96	KBNS371	T20	Gornji Tavankut	Summit	Grana	26.7.2013.
97	KBNS372	T21	Gornji Tavankut	Summit	Grana	26.7.2013.
98	KBNS373	T22	Gornji Tavankut	Summit	Grana	26.7.2013.
99	KBNS374	T23	Donji Tavankut	Carmen	Grana	30.9.2013.
100	KBNS375	T24	Donji Tavankut	Carmen	Grana	30.9.2013.
101	KBNS376	T25	Donji Tavankut	Carmen	Grana	30.9.2013.
102	KBNS377	T26	Donji Tavankut	Carmen	Grana	30.9.2013.
103	KBNS378	T27	Donji Tavankut	Carmen	Grana	30.9.2013.
104	KBNS379	T28	Donji Tavankut	Carmen	Grana	30.9.2013.

105	KBNS380	T29	Donji Tavankut	Carmen	Grana	30.9.2013.
106	KBNS381	K1	Kanjiža	Valeri Chkalov	Stablo	14.11.2013.
107	KBNS382	K2	Kanjiža	Valeri Chkalov	Stablo	14.11.2013.
108	KBNS383	K3	Kanjiža	Valeri Chkalov	Stablo	14.11.2013.
109	KBNS384	K4	Kanjiža	Valeri Chkalov	Stablo	14.11.2013.
110	KBNS385	K5	Kanjiža	Valeri Chkalov	Stablo	14.11.2013.
111	KBNS386	K6	Kanjiža	Valeri Chkalov	Stablo	14.11.2013.
112	KBNS387	K7	Kanjiža	Valeri Chkalov	Stablo	14.11.2013.
113	KBNS388	K8	Kanjiža	Valeri Chkalov	Stablo	14.11.2013.
114	KBNS389	LJ1	Ljutovo	Germerzdorfska	Stablo	26.2.2014.
115	KBNS390	LJ2	Ljutovo	Germerzdorfska	Stablo	26.2.2014.
116	KBNS391	LJ3	Ljutovo	Germerzdorfska	Stablo	26.2.2014.
117	KBNS392	LJ9	Ljutovo	Summit	Stablo	14.4.2014.
118	KBNS393	LJ10	Ljutovo	Summit	Stablo	14.4.2014.
119	KBNS394	LJ11	Ljutovo	Summit	Stablo	14.4.2014.
120	KBNS395	LJ12	Ljutovo	Summit	Stablo	14.4.2014.
121	KBNS396	LJ13	Ljutovo	Summit	Stablo	14.4.2014.
122	KBNS397	M1	Mikićevo	Regina	Grana	27.2.2014.
123	KBNS398	M2	Mikićevo	Regina	Grana	27.2.2014.
124	KBNS399	M3	Mikićevo	Regina	Grana	27.2.2014.
125	KBNS400	M4	Mikićevo	Kordia	Grana	27.2.2014.
126	KBNS401	M5	Mikićevo	Kordia	Grana	27.2.2014.
127	KBNS402	M6	Mikićevo	Kordia	Grana	27.2.2014.
128	KBNS403	M7	Mikićevo	Kordia	Grana	27.2.2014.
129	KBNS404	M8	Mikićevo	Kordia	Grana	27.2.2014.
130	KBNS405	M9	Mikićevo	Kordia	Grana	27.2.2014.
131	KBNS406	M10	Mikićevo	Kordia	Grana	27.2.2014.
132	KBNS407	M12	Mikićevo	Kordia	Grana	30.3.2014.
133	KBNS408	M13	Mikićevo	Kordia	Grana	30.3.2014.
134	KBNS409	M14	Mikićevo	Regina	Grana	30.3.2014.
135	KBNS410	M15	Mikićevo	Regina	Grana	30.3.2014.
136	KBNS411	M16	Mikićevo	Regina	Grana	30.3.2014.
137	KBNS412	M17	Mikićevo	Regina	Grana	30.3.2014.
138	KBNS413	M18	Mikićevo	Regina	Grana	30.3.2014.
139	KBNS414	M25	Mikićevo	Regina	List	16.5.2014.
140	KBNS415	M26	Mikićevo	Regina	List	16.5.2014.

141	KBNS416	M27	Mikićevo	Regina	List	16.5.2014.
142	KBNS417	M28	Mikićevo	Regina	List	16.5.2014.
143	KBNS418	M29	Mikićevo	Regina	List	16.5.2014.
Izolati epifitne populacije bakterija						
144	KBNS419	M11	Mikićevo	Regina	Epifitno lisni pupoljak	20.2.2014.
145	KBNS420	M19	Mikićevo	Kordia	Epifitno lisni pupoljak	20.2.2014.
146	KBNS421	LJ6	Ljutovo	Valeri Chalov	Epifitno lisni pupoljak	10.3.2014.
147	KBNS422	LJ7	Ljutovo	Germerzdorfska	Epifitno lisni pupoljak	10.3.2014.
148	KBNS423	LJ8	Ljutovo	Summit	Epifitno lisni pupoljak	10.3.2014.
149	KBNS424	T30	Gornji Tavankut	Summit	Epifitno lisni pupoljak	10.3.2014.
150	KBNS425	S40	Selenča	Merchant	Epifitno lisni pupoljak	10.3.2014.
151	KBNS426	EPLS1	Selenča	Burlat	Epifitno list	15.8.2014.
152	KBNS427	EPLM1	Mikićevo	Kordia	Epifitno list	15.8.2014.
153	KBNS428	EPLGT1	Gornji Tavankut	Summit	Epifitno list	15.8.2014.
154	KBNS429	EPLLJ1	Ljutovo	Germerzdorfska	Epifitno list	15.8.2014.
155	KBNS430	EPLLJ2	Ljutovo	Summit	Epifitno list	15.8.2014.

Za sva ispitivanja korišćeni su izolati bakterija starosti 48h gajeni pri temperaturi od 25 – 26°C.

Za uporedna ispitivanja korišćeni su kontrolni sojevi bakterija CFBP1582 *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, CFBP2119 i T6 *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* rasa 1, KFB0103 *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, KFB0101 *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* rasa 2, KFB0120 *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* rasa 1 (*cfl* +), KFB0121 *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* rasa 1 (*cfl* –), dobijeni ljubaznošću A. Obradović, Poljoprivredni fakultet Zemun i V. Gavrilović, Institut za zaštitu bilja Beograd (Tab. 3).

Izolati bakterija korišćeni u raznim biohemijsko – fiziološkim testovima prikazanu su u Tabeli 4.



Tabela 3. Kontrolni sojevi bakterija

Šifra sojeva/izolata	Bakterija	Kolekcija	Dobijen posredstvom
CFBP1582	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	Collection Française des Bactéries Phytopathogènes	
CFBP2119	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>morsprunorum</i> rasa 1		V. Gavrilović
T6	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	Kolekcija fitopatogenih bakterija, Institut za zaštitu bilja Beograd	
KFB0103	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>		A. Obradović
KFB0101	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>morsprunorum</i> rasa 2	Kolekcija fitopatogenih bakterija, Poljoprivredni fakultet Zemun	
KFB0120	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>morsprunorum</i> rasa 1 ( <i>cfl</i> +)		
KFB0121	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>morsprunorum</i> rasa 1 ( <i>cfl</i> -)		
V-85			J. Balaž
V-88			
V-109	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	Kolekcija fitopatogenih bakterija Poljoprivredni fakultet Novi Sad	
Tk21			
Tk20			
Tk23			
H-1			S. Süle
765R	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lachrymans</i>		

Tabela 4. Test izolati bakterija korišćeni za biohemijsko – fiziološka ispitivanja

Šifra izolata	Bakterija	Kolekcija	Dobijen posredstvom
KBNS201	<i>Pseudomonas fluorescens</i>		
KBNS202	<i>Erwinia amylovora</i>		
KBNS203	<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i>	Kolekcija fitopatogenih bakterija Poljoprivredni fakultet Novi Sad	J.Balaž
KBNS204	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>phaseoli</i>		
KBNS205	<i>Escherichia coli</i>		

### 5. 2. 1. 3. Izolacija bakteriofaga

Tokom jeseni 2014. prikupljeni su uzorci zemljišta za izolaciju bakteriofaga iz dva voćnjaka (trešnja – Selenča i jabuka – Irig). Izolacija bakteriofaga je vršena prema metodu koji navode Crosse i Garrett (1963). Ovo je metod obogaćivanja supstrata, koji omogućava selektivno umnožavanje bakteriofaga specifičnih prema bakteriji domaćinu, koja se dodaje supstratu u rastvorenu podlogu. Za obogaćivanje supstrata korišćen je izolat bakterije *P. s. pv. morsprunorum* rasa 1 (KBNS74). Za izolaciju bakteriofaga uzeto je 10 g zemljišta, 50 ml podloge NYGB (Nitrogen Yeast Glycerol Broth) i dodato 5 ml indikator bakterije.

Tako pripremljene suspenzije su postavljene na rotacionu mešalicu u termostat na 26°C, tokom 24h. Ekstrakcija faga izvršena je centrifugiranjem 1 ml obogaćene suspenzije 5 min na 16000g (Hermile Z 300 K). Supernatant je potom prenet u tube i tretiran hloroformom (10:1 v/v). Nakon taloženja hloroforma gornja faza suspenzije je dekantirana u nove tube, koje su stavljene na čuvanje u frižider na 4°C (Crosse i Garrett, 1963).

## 5. 2. 2. FENOTIPSKU KARAKTERISTIKE

Fenotipske karakteristike obuhvatile su ispitivanje morfoloških, biohemijsko – fizioloških i patogenih odlika proučavanih izolata bakterija.

- Oblik bakterija je ispitan bojenjem fuksinom i posmatranjem ćelija mikroskopskim pregledom pomoću uljne imerzije, korišćenjem uvećanja 100 x 10 (Jarak i Đurić, 2006)
- Reakcija po Gramu je izvedena pomoću KOH testa (Suslow i sar., 1982)
- Pokretljivost bakterija ispitana je u podlozi od triptonu, natrijum hlorida i agara (Schaad i sar., 2001)
- Stvaranje fluorescentnog pigmenta ispitano je na podlozi King B (King i sar., 1954)

### 5. 2. 2. 1. LOPAT TESTOVI

Za identifikaciju vrsta *P. syringae* izvedeni su LOPAT testovi (Lelliott et. al., 1966) levana (L) – stvaranje levana; oksidaza (O) – stvaranje oksidaze; potato (P) – pektolitička aktivnost na kriškama krompira; arginin – dehidrolaza (A) – aktivnost arginin – dehidrolaze; tobacco (T) – hipersenzitivna reakcija (HR) na duvanu.

Svi ogledi su izvedeni u tri ponavljanja.

**Stvaranje levana** praćeno je na podlozi sa 5% saharoze (NSA) (Lelliott i Stead, 1987). Izgled kolonija posmatran je posle 2 – 3 dana razvoja.

**Stvaranje oksidaze** je ispitano prema metodu koji navodi Kovacs (1956) korišćenjem filter traka, preliivenih reagensom tetramethyl – p – phenylenediamine dihydrochloride. Reakcija se određuje posle 5 – 10 sekundi.

**Pektolitička aktivnost na kriškama krompira** je ispitana u Petri kutijma prema metodu (Sands, 1990). Reakcija je očitana posle 24 i 48h.

**Aktivnost arginin – dehidrolaze** je ispitana u epruvetama sa 5 ml anorganske podloge kojoj je dodat L – arginin (Thornley, 1960). Formiranje bazne sredine iz arginina, uz dodatak pH indikatora Phenol red u aerobnoj i anaerobnoj sredini, je praćeno u periodu od 4 – 14 dana.

**Hipersenzitivna reakcija (HR) na duvanu** je ispitana po metodi koju navodi Klement (1963). Suspenzija bakterije je infiltrirana u međunervalni deo lisnog tkiva, konc. >  $10^7$  cfu/ml. Ocena je vršena nakon 24 – 48h. Negativnu kontrolu su činili listovi infiltrirani destilovanom vodom.

#### 5. 2. 2. 2. OSNOVNI BIOHEMIJSKO – FIZIOLOŠKI TESTOVI

U cilju identifikacije izolata ispitane su neke osnovne biohemijsko – fiziološke odlike: aktivnost katalaze, stvaranje  $H_2S$ , indola, redukcija nitrata, hidroliza skroba i O/F test.

Svi ogledi su postavljeni u tri ponavljanja pri temperaturi od 25 – 26°C (termostat).

**Aktivnost katalaze.** Za dokazivanje sposobnosti stvaranja enzima katalaze korišćen je vodonikperoksid ( $H_2O_2$ ) prema metodu koji navode Fahy i Hayward (1983). Pozitivna ili negativna reakcija se ocenjuje posle nekoliko sekundi.

**Oksidativno/fermentativni, O/F metabolizam glukoze.** Ovaj test je izveden prema metodu (Hugh i Leifson, 1953) korišćenjem podloge sa 1% glukoze i indikatora Bromothymol blue u aerobnim i anaerobnim uslovima. Rezultati su očitavani nakon sedam dana od zasejavanja.

**Stvaranje  $H_2S$  iz peptona** je ispitivano u tečnoj podlozi sa cisteinom prema metodu koji navodi Dye (1968). Rezultati su očitavani nakon 14 dana od zasejavanja.

**Stvaranje indola** praćeno je u tečnoj podlozi sa triptonom (Sands, 1990). Rezultati su očitani 7 dana nakon zasejavanja uz dodavanje Kovacs – indol reagensa.

**Redukcija nitrata do nitrita** je ispitana na podlozi od hranljiviog bujona sa određenim procentom nitrata ( $\text{KNO}_3$ ) (Shaffer, 1975). Rezultati su očitani posle deset dana od zasejavanja, uz dodavanje određenog reagensa.

**Hidroliza skroba.** Na podlogu koja sadrži 1% skroba, izvršeno je zasejavanje kultura bakterija starih 24 – 48h (Lelliott i Stead, 1987). Nakon sedam dana dodaje se nekoliko kapi Lugolovog reagensa i prati reakcija posle nekoliko sekundi.

### 5. 2. 2. 3. DIFERENCIJALNI BIOHEMIJSKO – FIZIOLOŠKI TESTOVI ZA RAZLIKOVANJE *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* i *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum*

#### (GATTa testovi)

Pri identifikaciji patogenih varijeteta bakterije *P. syringae* poreklom sa koštičavih vrsta voćaka, redovno se koriste diferencijalni testovi GATTa (Gelatine hydrolysis, Aesculin hydrolysis, Tyrosinase activity, utilization of Tartarate) za razlikovanje varijeteta *syringae* i *morsprunorum* (Crosse i Garrett, 1963; Jones; 1971; Latorre i Jones, 1979).

Svi ogledi su postavljeni u tri ponavljanja pri temperaturi od 25 – 26°C (termostat).

**Razlaganje želatina.** Za proučavanje proteolitičke aktivnosti korišćena je podloga sa određenim procentom želatina (Lelliott i Stead, 1987). Rezultati su očitani posle sedam dana uz dodavanje Frejzerovog reagensa.

**Hidroliza eskulina** je ispitana zasejavanjem proučavanih bakterija u tečnu podlogu sa eskulinom (Jones, 1971). Rezultati su očitani posle 7 – 14 dana.

**Stvaranje tirozinaze** je ispitano na podlozi sa određenim procentom L – tirozina (Crosse i Garrett, 1963). Testiranje sposobnost stvaranja tirozinaze vršeno je zasejavanjem ispitivanih izolata na podlogu sa tirozinom razlivenu u Petri kutije. Rezultati su očitani posle 4 – 5 dana.

**Korišćenje (D +) tartarata** ispitano je na hranljivoj podlozi sa 0,15% tartarata uz dodatak indikatora Bromothymol blue (Arsenijević, 1997). Rezultati su praćeni do 21 – og dana.

#### **5. 2. 2. 4. DODATNI TESTOVI ZA RAZLIKOVANJE *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* i *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum***

Pri identifikaciji patogenih varijeteta *syringae* i *morsprunorum*, osim GATTa testova više autora navodi i druge testove kao što su: korišćenje mlečne kiseline, karakteristike razvoja bakterija u tečnoj podlozi sa saharozom, vitalnost bakterija na podlozi obogaćenoj saharozom, hidroliza kazeina, korišćenje L – leucina, stvaranje čestica leda (INA), stvaranje siringomicina i osetljivost prema bakteriofagama (Crosse i Garrett, 1963; Garrett i sar., 1966; Jones, 1971, Paulin i Luisetti, 1978; Latorre i Jones; 1979; Lindow, 1990).

Svi ogledi su postavljeni u tri ponavljanja pri temperaturi od 25 – 26°C (termostat).

**Korišćenje mlečne kiseline (lactic acid).** Stvaranje baza iz organskih kiselina proučavanih izolata ispitano je u anorganskoj hranljivoj podlozi (Ayers i sar., 1919), u koju je dodata mlečna kiselina čija je finalna koncentracija 1%, uz dodatak indikatora Bromothymol blue. Promena boje podloge praćena je tokom 21 dan.

**Karakteristike razvoja bakterija u tečnoj podlozi sa saharozom.** Izolati ispitivanih bakterija zasejani su u tečnu hranljivu podlogu obogaćenu saharozom (Crosse i Garrett, 1963; Latorre i Jones, 1979). Kulture su inkubirane u termostatu pri 26°C tokom 3 do 5 dana, nakon čega je vršeno očitavanje.

**Vitalnost bakterija na podlozi obogaćenoj saharozom** je ispitana na hranljivoj podlozi obogaćenoj saharozom (NSA) (Garrett i sar., 1966). Presejavanje ispitivanih izolata odnosno ispitivanje dužine života vršeno je u 48 – časovnim intervalima, do 18 – tog dana.

**Hidroliza kazeina** je ispitana na podlozi sa obranim mlekom u Petri kutijama (Mishra i sar., 1980). Ispitivani izolati su zasejani spiralnim razmazom po površini podloge i inkubirani na temperaturu 25°C u trajanju od 7 dana.

**Korišćenje L – leucina kao izvora C i N.** Filtracijom sterilisana aminokiselina L – leucin dodata je osnovnoj tečnoj anorganskoj podlozi do konačne koncentracije 0,5% (w/v) u kojoj je kao pH indikator korišćen Phenol red (Garrett i sar., 1966). Očivanje rezultata vršeno je posle 28 dana.

**Stvaranje siringomicina** je ispitano korišćenjem gljive indikatora *Geotrichum candidum* (Latorre i Jones, 1979), kao i gljiva *Rhodotorula pilimanae* i *Saccharomyces cerevisiae*. Ispitivani izolati zasejani su na podlogu od krompira (PDA) u vidu kruga i inkubirani. Nakon 24h površina Petri kutije je isprskana sporama navedenih gljiva. Rezultati su očitani nakon 1 – 2 dana.

**Stvaranje čestica leda (INA – Ice Nucleation Activity).** Ispitivani izolati gajeni su na tečnoj CPG podlozi (pepton, glukoza i kazein hidrolizat) (Paulin i Luisetti, 1978). Nakon 48h u epruvetama je pripremljena suspenzija bakterija koncentracije  $10^9$  cfu/ml. Tako pripremljene suspenzije proučavanih izolata prenete su u vodeno kupatilo na temperaturu – 4°C. Rezultati se očitavaju nakon 5 minuta.

**Osetljivost izolata *P. s. pv. morsprunorum* prema bakteriofagama.** Prisustvo faga specifičnih za vrstu *P. s. pv. morsprunorum* rasa 1 ispitano je formiranjem plaka u podlozi.

Osetljivost izolata prema bakteriofagama ispitana je prema metodu koji navodi Adams (1959) – Spot test (dvoslojni agar). U prvom koraku pripremljen je ravan agar i u svaku Petri kutiju razliveno je po 30 ml podloge. Nakon sušenja ravan agar se preliva vršnim agarom (Top Layer Agar), temperature 45°C u količini od 10 ml u koji su predhodno zasejane ispitivane bakterije (0,1 ml odgajana u LTP podlozi).

Na pripremljene podloge pomoću bakteriološke petlje naneta je suspenzija izolovanih bakteriofaga na površinu podloge i nakon 24 – 48h posmatrana je pojava plaka na mestima na koje je naneta suspenzija.

## 5. 2. 3. PROVERA PATOGENOSTI

### 5. 2. 3. 1. PROVERA PATOGENOSTI NA PLODOVIMA I LISTOVIMA

Provera patogenosti svih izolata (Tab. 2) ispitana je na zelenim plodovima voća, paprike, paradajza, mahunama boranije i listovima jorgovana. Sva ispitivanja su vršena u laboratorijskim uslovima. Ova ispitivanja su sukcesivno izvođena, paralelno sa dobijanjem novih izolata u periodu od 2012 – 2015 i sezonskog pristizanja određenih biljnih organa za inokulaciju. U zavisnosti od biljke na kojoj je vršena provera patogenosti, korišćeni su različiti metodi inokulacije koji se primenjuju pri identifikaciji patogenih varijeteta bakterije *P. syringae* (*syringae* i *morsprunorum*).

Svi ogledi su postavljeni u pet ponavljanja. Kontrolu su činili plodovi i listovi inokulisani destilovanom vodom.

#### 5. 2. 3. 1. 1. Provera patogenosti na zelenim plodovima trešnje, višnje, ringlova i kruške

Patogenost dobijenih izolata je proverena na nezrelim plodovima trešnje (*P. avium* L.), kao i drugim test biljkama višnji (*P. cerasus* L.), ringlovu (*P. cerasifera* Ehrh.) i krušci (*Pyrus communis* L.). Zeleni plodovi su površinski sterilisani 95% alkoholom. Inokulacije su izvršene ubodom igle (na trešnji, višnji – jedan ubod, ringlovu – dva uboda i krušci – tri uboda) nakon čega je na mesto povrede nanošena kap suspenzija bakterija koncentracije  $10^8$  –  $10^9$  cfu/ml. Inokulisani plodovi su održavani pri ambijentalnoj temperaturi u uslovima Laboratorije (Jones, 1971; Latorre i Jones, 1979).

Pregled je vršen nakon 24 i 48h, zatim trećeg, petog, sedmog i desetog dana. Ocena inteziteta zaraze je vršena na osnovu izgleda i veličine pega. Pri inokulaciji nezrelih plodova trešnje, višnje i ringlova eksperiment je završen petog dana, a u slučaju kruške nakon desetog dana. Kao pozitivna kontrola korišćeni su sojevi bakterija *E. amylovora* (KBNS202) i *P. s. pv. syringae* (KFB0103).



### 5. 2. 3. 2. 2. Provera patogenosti na plodovima paprike i zelenim plodovima paradajza

Inokulacija plodova paprike (*Capsicum annuum* L.) i zelenog paradajza (*Solanum lycopersicum* L.) urađena je infiltracijom suspenzije bakterija (konc.  $10^6 - 10^7$  cfu/ml), ubrizgavanjem u mezokarp navedenih plodova. Rezultati su očitani nakon 3 – 5 dana (Gavrilović, 2006).

### 5. 2. 3. 3. 3. Provera patogenosti na mahunama boranije

Inokulacije mahuna boranije (*Phaseolus vulgaris* L.) su rađene u fazi tehnološke zrelosti mahuna. Mahune su predhodno dezinfikovane 70% etil – alkoholom. Bakterijska suspenzija koncentracije  $10^6 - 10^7$  cfu/ml je infiltrirana u perikarp mahune pomoću medicinske igle prema metodu koji navode Ercolani i sar. (1974). Tako inokulisane mahune su postavljene u plastične kutije sa navlaženim filter papirom, a visoka relativna vlažnost je obezbeđena postavljanjem plastičnih kutija u vlažne komore. Ovaj metod za dokazivanje patogenosti izolata *P. syringae* pvs. poreklom sa jabučastog i koštičavog voća navodi Gavrilović (2006).

### 5. 2. 3. 4. 4. Provera patogenosti na odvojenim listovima jorgovana

Tokom maja meseca (2013 – 2015) provera patogenosti je vršena i na listovima jorgovana odvojenim sa grančica (*S. vulgaris* L.). Sveže prikupljeni mladi listovi su oprani i prosušeni, a zatim dezinfikovani 95% alkoholom. Pri inokulaciji listova korišćena su tri metoda:

1. Medicinskim špricom bez igle, pod pritiskom sa naličja lista ubrizgana je suspenzija bakterije  $10^6 - 10^7$  cfu/ml, a ovaj metod za proveru patogenosti bakterije *X. arboricola* pv. *pruni* na listovima breskve navode Randhawa i Civerolo (1985);
2. Ozleđivanje i potapanje lista u suspenziju bakterija u trajanju od 2 sata rađeno je prema metodu koju navode Yessad i sar. (1992) za proveru patogenost izolata *P. s.* pv. *syringae* na listovima kruške. Ovaj metod je modifikovan u delu što je povređivanje lista vršeno sečenjem do glavnog nerva, a u originalnoj metodi sečenjem glavnog nerva.

3. Potapanje lisnih drški jorgovana u suspenziju bakterija (2 sata) vršeno je prema metodu koji navodi Young (1991) i Gavrilović (2006) za proveru patogenosti izolata *P. syringae* pvs. na listovima kruške i jorgovana.

Za drugi i treći metod inokulacije korišćena je suspenzija bakterija koncentracije  $10^9$  cfu/ml. Lisne drške su nakon izvršene inokulacije obmotane vlažnom vatom i listovi su održavani u Petri kutijama, koje su postavljene u vlažne komore. U zavisnosti od načina inokulacije listova jorgovana, očitavanje rezultata je vršeno nakon prve pojave simptoma tj. posle 48h, 6, 8 i 10 dana. Svi ogledi su završeni nakon 14 dana.

### **5. 2. 3. 2. PROVERA PATOGENOSTI NA SEJANCIMA PODLOGA RAZNIH VOĆNIH VRSTA I REZNICAMA TREŠNJE**

Provera patogenosti na sejancima voćnih podloga i reznicama (odsečene dvogodišnje grančice trešnje), vršena je u uslovima Laboratorije i u Botaničkoj bašti Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu.

Svi ogledi su izvođeni u pet ponavljanja, a kontrolu su činile biljke inokulisane destilovanom vodom.

#### **5. 2. 3. 2. 1. Provera patogenosti na sejancima voćnih podloga divlje trešnje, magrive, divlje šlive i divlje kruške**

Sejanci divlje trešnje (*P. avium* L.), magrive (*P. mahaleb* L.), divlje šljive (*P. cerasifera* Ehrh.) i kruške (*P. communis* L.) nabavljeni su iz rasadnika voćnih sadnica (Čantavir). Za potrebe ispitivanja sejanci su presađeni u manje saksije i održavani u uslovima Botaničke bašte, Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu. Nakon nedelju dana uz redovno zalivanje i ostalu negu, izvršena je inokulacija biljaka, koje su bile visine 10 – 15 cm sa 7 – 8 razvijenih listova. Inokulacije su izvršene metodom zareza (dužina zareza 5 mm) i premazivanjem suspenzijom bakterija (konc.  $10^8$  –  $10^9$  cfu/ml). Ovaj metod inokulacije navode Klement i sar. (1974) sa razlikom što su pomenuti autori radili inokulacije na reznicama kajsije. U radu su korišćeni odabrani izolati pod šiframa KBNS93, T1, T29, K1, Lj1, M15, KBNS73, S1, S44 i M25.

Nakon inokulacije biljke su postavljene u plastične kutije u kojima je obezbeđena visoka relativna vlažnost u klima komorama na temperaturi od 25 – 27°C. Ocena ogleda je vršena merenjem dužine nekroze. Pojava simptoma praćena je tokom 2 nedelje.

#### 5. 2. 3. 2. 2. Provera patogenosti na reznicama trešnje

Ogledi su izvođeni tokom novembra, decembra, januara 2013/2014 i 2014/2015. Inokulacije su vršene na reznicama (dvogodišnje grančice) u periodu mirovanja na nekim od reprezentativnih sorti trešnje (Burlat, Summit, Germerzdorfska i Hedelfigenska).

Grančice trešnje (navedenih sorti) dužine oko 40 – 50 cm dezinfikovane su alkoholom i potom inokulisane metodom zarezaja. Na svakoj grančici su načinjena po tri zarezaja (dužina zarezaja 0,5 cm) nakon čega su zarezaji premazani suspenzijom bakterija koncentracije  $10^9$  cfu/ml, prema metodu koji su Klement i sar. (1974) koristili za ispitivanje patogenosti *P. syringae* na kajsiji. Isti metod navode i Sobiczewski i Jones (1992) na grančicama trešnje. Za rad su korišćeni odabrani izolati pod šiframa KBNS74, KBNS79, KBNS87 i KBNS93.

Inokulisane grančice su postavljene u posude sa vlažnim kvarcnim peskom i održavane u Laboratoriji pri ambijentalnoj temperaturi tokom prvih sedam dana, a nakon toga su prenete u Botaničku baštu u uslove spoljne sredine. Ocena intenziteta zaraze na grančicama je vršena nakon pojave simptoma, merenjem dužine nekroze oko mesta zarezaja nekoliko puta. U cilju praćenja širenja nekroze vršene su tri ocene. Rezultati dobijeni u ogledu su statistički obrađeni upotrebom dvofaktorijalne analize varijanse (ANOVA), a značajnost razlika ocenjena je Duncan testom.

**Reizolacija.** Po završetku ogleda, sa inokulisanih grančica je izvršena reizolacije bakterija.

## 5. 2. 4. MOLEKULARNA IDENTIFIKACIJA I KARAKTERIZACIJA IZOLATA *P. syringae* pvs.

U cilju što detaljnije karakterizacije i identifikacije izolata kao i potvrde rezultata dobijenih klasičnim postupkom identifikacije *P. s. pv. syringae* i *P. s. pv. morsprunorum*, korišćene su molekularne metode bazirane na lančanoj reakciji polimeraze (Polymerase Chain Reaction – PCR):

MLST,

m – PCR (multiplex PCR),

*cfl* – PCR,

rep – PCR (REP; BOX; ERIC),

RAPD.

Totalna DNK je ekstrahovana iz bakterijskih kultura odgajanih na King B podlozi na 26°C tokom 24h, nakon lize ćelija kuvanjem na 95°C tokom 10 minuta i hlađenja na ledu. Posle centrifugiranja (13000 rpm, 5 minuta) 250µl supernatanta je preneto u mikrotube i čuvano na – 20°C prema Ross i sar. (2000).

### 5. 2. 4. 1. MOLEKULARNA IDENTIFIKACIJA IZOLATA

#### 5. 2. 4. 1. 1. MLST (Multilocus Sequence Typing)

U analizu je ukupno uključeno 24 izolata sa trešnje dobijenih tokom 2012. godine pod šiframa od KBNS71 – KBNS94 (Balaž i sar., 2016). Osim toga u ispitivanja su uključeni i sojevi sa višnje (V – 85 izolovan sa plodova i V – 88 sa peteljke ploda, Šabac) i grane trešnje (V – 109 rak rana, Subotica) Balaž i sar. (1988); Balaž i Arsenijević (1989) i H – 1 (Süle i Seemüller, 1987) sa višnje.

MLST je izveden korišćenjem 4 gena: *gyrB* (DNA giraze B), *gapA* (gliceraldehid – 3 – fosfat dehidrogenaze), *gltA* poznat i kao *cts* (citrata sintetaza) i *rpoD* (sigma faktor 70).

Uslovi amplifikacije i sekvenciranja je urađeno prema protokolu Sarkar i Guttman (2004). Totalna DNK je ekstrahovana prema proceduri Ausubel i sar. (1992). Filogenetske analize urađene su na bazi maximum likelihood (ML) korišćenjem CLUSTALW (MEGA6 software) (Tamura i sar., 2013).

PCR produkti su prečišćeni sa QIAquick PCR purification kit (QIAGEN) prema uputstvu proizvođača. Sekvenciranje PCR produkata je urađeno u Macrogen Inc, Soeul, Korea.

#### **5. 2. 4. 1. 2. Detekcija gena za sintezu i sekreciju siringomicina metodom m – PCR (multiplex PCR)**

Za detekciju gena odgovornog za sintezu siringomicina (*syrB*) i sekreciju siringomicina (*syrD*) specifičnih za vrstu *P. s. pv. syringae* korišćena je metoda multiplex – PCR primenom oba seta prajmera. m – PCR je dizajniran za potrebe ovih ispitivanja, a baziran je na ranijim istraživanjima (Soresten i sar., 1998; Bultreys i Gheysen, 1999). Urađen je u zapremini od 30 $\mu$ l korišćenjem GreenTaqDream Master Mix (Thermo Scientific, Lithuania) 1,2 $\mu$ l bakterijske DNK kao matrice (template) i seta prajmera B1/B2 primer 0,2 $\mu$ l svaki i seta prajmera SyD1/SyD2 po 0,3 $\mu$ l.

Amplifikacija je sprovedena u Eppendorf MasterCycler Personal (Germany) termosajkler – u prema programu prikazanom u tabeli 5.

Tabela 5. Prajmeri i uslovi amplifikacije za m – PCR

Prajmer	Sekvenca (5'-3')	Uslovi umožavanja	Veličina amplifikovanog produkta	Referenca
B1/ B2	CTTCCGTGGTCTTGATGAGG TCGATTTTGCCGTGATGAGTC	1. Inicijalna denaturacija 94°C 5 min	752bp	Soresten i sar. (1998)
SyD1/ SyD2	CAGCGGCGTTGCGTCCATTGC TGCCGCCGACGATGTAGACCAGC	2. 35 ciklusa 94°C 1,25 min 61°C 1,25 min 72°C 2 min 3. finalna ekstenzija 72°C 10 min	1040bp	Bultreys i Gheysen (1999)

#### 5. 2. 4. 1. 3. Detekcija gena za produkciju koronatina (*cfl*)

Za detekciju gena odgovornog za produkciju koronatina (*cfl*) specifičnog za vrstu *P. s. pv. morsprunorum* rasu 1 urađen je *cfl* – PCR u zapremini od 25µl korišćenjem GreenTaqDream Master Mix (Thermo Scientific, Lithuania) 1,5µl bakterijske DNK kao matrice (template) i seta prajmera Primer1/Primer2 / po 0,15µl prema uslovima amplifikacije i programu prikazanom u tabeli 6.

Tabela 6. Prajmeri i uslovi amplifikacije *cfl* gena

Prajmer	Sekvenca (5'-3')	Uslovi umožavanja	Veličina amplifikovanog produkta	Referenca
Primer1/ Primer2	GGCGCTCCCTCGCACTT GGTATTGGCGGGGGTGC	1. Inicijalna denaturacija 93°C 2 min 2. 37 ciklusa 93°C 2 min 67°C 1 min 72°C 2 min 3. finalna ekstenzija 72°C 10 min	650bp	Bereswill i sar. (1994)

#### 5. 2. 4. 2. MOLEKULARNA KARAKTERIZACIJA IZOLATA

##### 5. 2. 4. 2. 1. rep – PCR

rep – PCR analiza je sprovedena primenom BOX prajmera: (GTG)<sub>5</sub> i BOXA 1R, para prajmera ERIC 1R/ ERIC 2 i para prajmera REP 1R – I/REP 2 – I. U 30µl zapremine PCR reakcije su sadržale po 1U DreamTaqGreen Master Mix (Thermo Scientific, Lithuania), 1µl bakterijske DNK kao matrice (template) i 100pM odgovarajućeg prajmera. Amplifikacija je sprovedena u Eppendorf MasterCycler Personal (Germany) termosajkler – u prema uslovima prikazanim u tabeli 7. Od kontrolnih sojeva u ovim ispitivanjima korišćeni su sojevi Tk21 (pv. *syringae*; uljana tikva), V – 85 (pv. *syringae*; višnja), V – 109 (pv. *syringae*; trešnja), H – 1 (pv. *syringae*; višnja), T6 (pv. *syringae*; trešnja), CFBP2119 (*P. s. pv. morsprunorum* rasa 1) i 765R (*P. s. pv. lachrymans*).

Tabela 7. Prajmeri i uslovi amplifikacije za rep – PCR

Prajmer	Sekvenca (5'-3')	Uslovi umnožavanja	Referenca
(GTG) <sub>5</sub>	GTGGTGGTGGTGGTG	1. Inicijalna denaturacija 94°C 3 min 2. 35 ciklusa 94°C 1 min 53°C 1 min 65°C 8 min 3. finalna ekstenzija 65°C 16 min	Versalovic i sar. (1991)
BOXA 1R	CTACGGCAAGGCGACGCTGACG	1. Inicijalna denaturacija 95°C 2 min 2. 35 ciklusa 94°C 3 sek 92°C 30 sek 40°C 1 min 3. finalna ekstenzija 65°C 15 min	Schaad i sar. (2001)
Par prajmera ERIC1R/ ERIC 2	ATGTAAGCTCCTGGGGATTCAC AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG	1. Inicijalna denaturacija 95°C 2 min 2. 35 ciklusa	Schaad i sar. (2001)
Par prajmera REP1R-I I/REP 2-I	IIIICGICGICATCIGGC ICGICTTATCIGGCCTAC	94°C 3 sek 92°C 30 sek 50°C 1 min 3. finalna ekstenzija 65°C 8 min	



#### **5. 2. 4. 2. 2. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)**

Pored primene rep – PCR metode za ispitivanje diverziteta izolata bakterija poreklom sa trešnje korišćena je i metoda nasumično umnožene polimorfne DNK (RAPD analiza) korišćenjem većeg broja prajmera, kojom je omogućeno međusobno poređenje izolata. RAPD analiza sprovedena je u zapremini od 25 $\mu$ l korišćenjem GreenTaqDream Master Mix (Termo Scientific, Lithuania) 1 $\mu$ l bakterijske DNK kao matrice (template) i 100pM odgovarajućeg prajmera. RAPD prajmeri i uslovi amplifikacije dati su u tabeli 8.

Tabela 8. Prajmeri i uslovi amplifikacije za RAPD

Prajmer	Sekvenca (5'-3')	Uslovi umožavanja	Referenca
AP10	CAGGCCCTTC	1.Inicijalna denaturacija 95°C 5 min 2. 45 ciklusa 94°C 1 min 36°C 1 min 72°C 2 min 3.finalna ekstenzija 72°C 5 min	Salenska-Pobel i sar. (1996)
AF14	GGTGCGCACT	1.Inicijalna denaturacija 95°C 5 min 2. 40 ciklusa 94°C 1 min 32°C 1 min 72°C 2 min 3.finalna ekstenzija 72°C 5 min	Mliki i sar. (2001)
BC318	CGGAGAGCGA		
AX16	GTCTGTGCGG		
AG15	CCCACACGCA		
AK16	CTGCGTGCTC		
OPA10	GTGACGTAGG		
SPH1	GACGACGACGACGAC		Dooley i sar. (1993)
DJ15	AGCCGTATGGAGCTG	1.Inicijalna denaturacija 95°C 5 min 2. 35 ciklusa 94°C 1 min 57°C 1 min 72°C 2 min 3.finalna ekstenzija 72°C 5 min	Novodizajnirani prajmeri (Savić i sar., 2015; Iličić i sar., 2016)
DJ16	GTGCGCATCAGGCCGT		
DJP17	GTGCGCATCAGGCCGTA		

### 5. 2. 4. 2. 3. Vizuelizacija dobijenih PCR fragmenata

PCR fragmenti (po 8 $\mu$ l) su razdvojeni horizontalnom elektroforezom (aparat za horizontalnu elektroforezu MAXIGEL Eco 2, APELEX) u agaroznom gelu gustine 1,5% (w/v) i 0,5xTBE puferu za elektroforezu pri konstantnom naponu od 5V/cm gela. Gelovi su vizuelizovani bojenjem etidijum bromidom. Procena veličine dobijenih fragmenata vršena je upoređivanjem sa markerima poznatih molekulskih masa "DNA Ladder" (Thermo Scientific, Vilnius, Lithuania) SM0331, SM1551 i SM0243.

### 5. 2. 4. 2. 4. Klaster analize rezultata rep – PCR i RAPD

Sličnost izolata *P. syringae* pvs. procenjena je na osnovu simple matching coefficient (SSM). SSM je statistički pokazatelj koji ističe sličnost između podataka nove informacije podjednake vrednosti koje se obeležavaju sa 0 i 1 pri čemu 0 znači odsustvo informacija. Formiranje klastera vršeno je na bazi UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) analize primenom STATISTICA 12 software.

### 5. 3. ISPITIVANJE EPIDEMIOLOŠKIH KARAKTERISTIKA *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* i *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* rase 1 NA TREŠNJI

Cilj ovih istraživanja je bio da se kroz inokulacione ogledе u poljskim uslovima ispitaju neke epidemiološke karakteristike (*P. s. pv. syringae*, *P. s. pv. morsprunorum* rasa 1), a prvenstveno da se utvrdi u kojoj je fenofazi trešnja najpodložnija ostvarenju infekcija i širenju patogena u toku jednogodišnjeg ciklusa razvoja trešnje u našim agroekološkim uslovima.

Ispitivanja su vršena na standardnim sortama trešnje (Germerzdorfska, Burlat, Hedelfigenska, Droганova žuta i Summit) na Oglednim poljima Departmana za voćarstvo, vinogradarstvo, hortikulturu i pejzažnu arhitekturu – Rimski Šančevi, tokom 2013/2014 godine. U ispitivanja su uključeni sojevi bakterija KBNS87 i KBNS93 koji pripadaju vrsti *P. s. pv. syringae* i KBNS74 i KBNS79 vrsti *P. s. pv. morsprunorum* rasa 1.

Radi dobijanja što pouzdanijih rezultata ogledi izvođeni su ciklični ogledi (tokom godine) na nekoliko sorti trešnje u dva poljska ogleda.

1. ogled: Ispitivanja su vršena na starijim voćkama (dvadeset godina) sorti trešnje: Burlat, Droганova žuta, Germerzdorfska i Hedelfigenska, inokulacijom mladara (6.6.2013. i 17.9.2013.) i jednogodišnjih grančica (24.10.2013., 20.11.2013., 18.1.2014., 14.3.2014. i 16.4.2014.);

2. ogled: Izvođen je na voćkama starosti sedam godina (sorta Summit), inokulacijom dvo – trogodišnjih grana (6.6.2013., 17.9.2013., 24.10.2013., 20.11.2013., 18.1.2014., 14.3.2014. i 16.4.2014.).

Inokulacije u oba ogleda su izvođene metodom "zarez pod koru" (Crosse i sar., 1966).

Sva ispitivanja su izvođena u tri ponavljanja. Kontrolu su činile grane inokulisane destilovanom vodom.

Tokom izvođenja poljskih ogleda praćeni su meteorološki uslovi (količina padavina i temperatura) (RHMZ, 2013/2014).

Ocene ogleda su vršene nekoliko puta (30.11.2013., 3.3.2014., 30.4.2014., 30.5.2014. i 15.6.2014.).

Merenjem nekroze od mesta zareza dobijeni su podaci koji su statistički obrađeni upotrebom dvofaktorijalne analize varijanse (ANOVA), a značajnost razlika ocenjena je Duncan testom.

**Reizolacija.** 17.6.2014. izvršena je i reizolacije bakterija.

#### **5. 4. OSETLJIVOST SORTIMENTA TREŠNJE I VIŠNJE PREMA SOJEVIMA *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* i *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* rasa 1**

U uslovima staklare ispitana je osetljivost različitog sortimenta na jednogodišnjim sadnicama trešnje (Burlat, Drozanova žuta, Germerzdorfska, Summit, Rana od Noara, Carmen, New Star, Linda, Rita, Katalin) i višnje (Španska, Erdi Botermo, Ujfehetyi firtoš) u Botaničkoj bašti Poljoprivrednog fakulteta, Novi Sad. Sadnice su gajene u saksijama prečnika 28 x 28 cm. Veštačke inokulacije ukorenjenih sadnica su urađene u fazi mirovanja (25.11.2013.). Inokulacije su izvedene takođe metodom „zarez pod koru“ (veličina zareza 0,5 cm), koji navode Arsenijević (1968) i Klement i sar. (1974). Ogled je izvođen u tri ponavljanja. Kontrolu su činile sadnice inokulisane destilovanom vodom. U ova ispitivanja su uključena 2 soja bakterija KBNS93 (*P. s. pv. syringae*) i KBNS74 (*P. s. pv. morsprunorum* rasa 1).

Ocena je izvršena nakon jasne pojave simptoma.

Rezultati dobijeni u ogledu su statistički obrađeni upotrebom dvofaktorijalne analize varijanse (ANOVA), a za poređenje značajnost razlika korišćen je Duncan testom.

## 6. REZULTATI RADA

### 6. 1. SAKUPLJANJE OBOLELIH UZORAKA TREŠNJE

Obilaskom voćnjaka i plantaža trešnje na području Vojvodine i Centralne Srbije (Ritopek), zapažena je jača pojava sušenja pojedinih grana, a u najgorem slučaju i celih mladih voćaka. Najuočljiviji simptom je bio na jednogodišnjim granama koje u proleće ne kreću ili kretanje počne, a ubrzo zatim listovi žute, venu i suše se.

Prvi simptomi se obično mogu uočiti sredinom februara. Razvojem bolesti na osnovu detaljnog pregleda moglo se zapaziti nekoliko tipova simptoma u odnosu na mesto i vreme ostvarenja infekcije:

- Sušenje jednogodišnjih grančica, kod kojih infekcija najčešće polazi od pupoljka ili su to razne mehaničke ozlede; od mesta infekcije nekroza se postepeno širi zahvatajući susedne ili sve pupoljke na grani, odnosno celu granu; takve grane su u vreme kretanja vegetacije obično potpuno suve ili je često suv vršni deo na kome kora izbeljuje (Sl.5a);
- Ukoliko u vreme kretanja vegetacije zaražena grančica nije u potpunosti suva, ona delimično lista, ali su listovi hlorotični, sitni, postepeno venu i suše se tokom proleća i leta (Sl.5b);
- Na stablima mladih voćaka (1 – 2 godine starosti) infekcije nastaju preko lenticela, pupoljaka, raznih mehaničkih ozlede, mesta rezidbe ili osušenih grana; u svim slučajevima od mesta infekcije nekroza se brzo širi kroz stablo (Sl.6a), obrazujući izdužene, krupnije eliptične pege ili su one u vidu širih nekrotičnih pruga; kod takvih voćaka cela lisna kruna počinje da žuti, lišće se deformiše, uvija i vene, a kada nekroza prstenasto zahvati stablo, suše se cele grane, odnosno cela kruna i stablo;
- Najače infekcije, koje vode brzom sušenju stabla (uglavnom mladih voćaka, do 3 godine starosti) su one koje potiču od velikih rezova, odnosno prekraćivanja stabla (heading cut) ili odsecanja većih suvih grana (Sl.6b, 6c). U ovakvim slučajevima nekroza se u vidu širokih traka spušta niz stablo, prouzrokujući pri tome sukcesivno sušenje svih grana; tako zaražena stabla se tokom vegetacije suše u celosti (Sl. 6d), s tim da je proces sušenja znatno brži ukoliko su u pitanju mlade voćke.

Na jednogodišnjim, višegodišnjim granama i stablu, koji ispoljavaju simptome sušenja gotovo su uvek prisutne i rak rane. Izgled rak rana tokom godine je različit u zavisnosti da li patogen nakon ostvarenja infekcije nastavlja da se širi ili ubrzo postaje blokiran zdravim tkivom. Najčešće širenje rak rana zapaža se tokom proleća, krajem marta i tokom aprila meseca. Rak rane u ovom periodu izgledaju vlažno, kora je ljubičasto – mrka, a prelazi zdravog i bolesnog tkiva nisu razdvojeni pukotinama, nego naprotiv vidi se vlažna zona uljastog izgleda koja se difuzno širi u zdravo tkivo. Daljim razvojem bolesti obolela kora se uleže, širenje nekroze je eliptično i pri odstranjivanju kore unutrašnja tkiva su mrko – crvenkaste boje. Obolela tkiva izgledaju vlažno, lepljivo a ponekad se vide i uljaste ćilibarne sluzaste kapi. Kod ovih rak rana smola se formira obilno i razliva duž rane i okolnih tkiva.

Prestanak širenja rak rana uočava se sredinom maja i početkom juna. Pojedine rak rane u tom periodu već ne deluju aktivno, mada brojne još uvek imaju vlažan izgled, na njima je prisutna sveža smola, ali se dalje ne šire. Početkom leta, rak rane uglavnom još izgledaju vlažno, u okviru njih je i dalje prisutna relativno sveža smola, ali oko rak rana nema vidljivog širenja nekroze (prožimanja u zdrava tkiva). Usled visokih letnjih temperatura i odbrambenih reakcija biljke domaćina, širenje rak rana se zaustavlja, smola suši, a pukotine i kalusno tkivo počinju jasno da odvajaju suve od zdravih delova kore. U takvim rak ranama, značajno se smanjuje brojnost bakterijske populacije.

Rak rane tokom zimskih meseci na zaražanim stablima nisu aktivne, kora je suva i ispucala, a smola postaje gotovo crna, delimično prisutna oko rak rane, a često se vide i slepljeni suvi listovi. U okviru rak rana tkivo je obično ulegnuto. Pri odstranjivanju kore floem i elementi sprovodnih sudova takođe deluju suvo, sive su do mrke boje. Kod ovakvih rana razvoj patogena je uglavnom zaustavljen, jer pukotine kore obično dele oboleli od zdravog dela tkiva. Tokom februara pri kretanju vegetacije, pojedine rak rane postaju aktivne, na šta ukazuje uska vlažna zona oko ivica rak rana. Kora oko rak rana počinje blago da menja boju i postaje sjajnija. Kod pojedinih sorti u okviru rak rana ponovo počinje da se obrazuje smola.

Shodno sezonalnim promenama u izgledu rak rana tokom vegetacije bili su i rezultati uspeha naših izolacija. Najuspešnije izolacije su bile tokom aprila i maja, ređe tokom juna i jula, mada su bakterije u pojedinim slučajevima u malom broju dobijane i tokom ostalog dela godine (septembar, novembar, januar, februar i mart).



Pojava pegavosti na listovima trešnje uočava se kasnije, tokom maja i juna. Generalno u svim lokalitetima pegavost na listovima počinje na mladima na potpuno formiranim listovima. Ukoliko su vremenski uslovi povoljni (kišovito vreme) bolest se brzo širi zahvatajući masovno listove cele krune. U slučaju jakih infekcija starijeg lišća, pegavost zahvata i mlade vršne listove. U početku pege su svetlo zelene, blago prosvetljene a kasnije postaju mrko – ljubičaste, različite veličine od nekoliko mm pa i do 1 cm. Pojedine pege se i spajaju. Kod starijih pega može doći i do ispadanja, mrkog centralnog dela, tako da list dobija rešetast izgled. U zavisnosti od sorte, pegavošću može biti zahvaćeno 15 – 40% lisne mase.



Slika 5. Sušenje jednogodišnjih grančica (infekcija od pupoljka), širenje nekroze preko suve grančice u stablo (a); delimično listanje, hloroza i sušenje listova (b) (Orig.)



Slika 6. Sušenje mladih stabala trešnje infekcije nastale preko: pupoljaka i lenticela na stablu (a); mesta prekraćivanja stabla (heading cut) (b, c, d) (Orig.)

## 6. 2. IDENTIFIKACIJA

### 6. 2. 1. IZOLACIJE

#### 6. 2. 1. 1. Izolacije bakterija na hranljive podloge

Tokom 2012 – 2015. godine pregledom zasada i plantaža trešnje u više lokaliteta na području Vojvodine (Kač, Rimski Šančevi, Čerević, Čelarevo, Sirig, Temerin, Selenča, Bođani, Bačka Palanka, Krčedin, Kanjiža, Ljutovo, Gornji Tavankut, Donji Tavankut, Mikićevo) i centralne Srbije (Ritopek), uspešne izolacije fitopatogenih bakterija su bile iz uzoraka prikupljenih u lokalitetima Selenča, Kanjiža, Ljutovo, Gornji Tavankut, Donji Tavankut i Mikićevo.

U navedenim lokalitetima bakterije su najčešće uspešno izolovane iz uzoraka kod kojih je nekroza kretala od mesta gde su mlada stabla (1 – 3 godine) prekraćivana. U većem broju slučajeva uspešne izolacije bakterija su bile i iz uzoraka jednogodišnjih grančica, kod kojih su infekcije polazile od osušenih pupoljka ili eventualno i nekih mehaničkih ozleda oko kojih se širila nekroza. Pozitivne rezultate izolacija smo imali sa uzoraka mladih stabala (1 – 2 godine starosti), kod kojih je nekroza polazila od raznih mehaničkih ozleda, rezidbe, pupoljaka ili lenticela.

Generalno simptomi bakterioznog sušenja u jačem intenzitetu su uglavnom konstatovani i izolacije su bile najuspešnije iz uzoraka uzetih iz mlađih zasada (1 – 3 godine starosti), a posebno ukoliko je sadni materijal pre ili neposredno po sadnji bio izložen stresu (suša, izmrzavanje, grad). Stresogeni faktori nastaju i prilikom dugog neadekvatnog transporta sadnog materijala ili neadekvatnih uslova tokom čuvanja u skladištu.

Tokom maja i početkom juna uočena je i pojava pegavosti na listovima, a bakterije karakteristične za vrstu *P. syringae* su uspešno izolovane iz lokaliteta Gornji Tavankut, Mikićevo i Selenča. U svim slučajevima najuspešnije izolacije su bile tokom maja meseca, mada su bakterije u pojedinim slučajevima izolovane tokom juna.

Dva dana nakon izvedenih izolacija na podlozi obogaćenoj saharozom NSA, razvile su se kolonije bakterija izrazito ispupčene, biserno bele do krem – beličaste, ravnih ivica, sjajne i levan pozitivne veličine 3 – 4 mm (Sl.7), na NA kolonije su sitne, okruglaste, sjajne, ravnih ivica sivkasto – beličaste boje, veličine oko 2 mm.

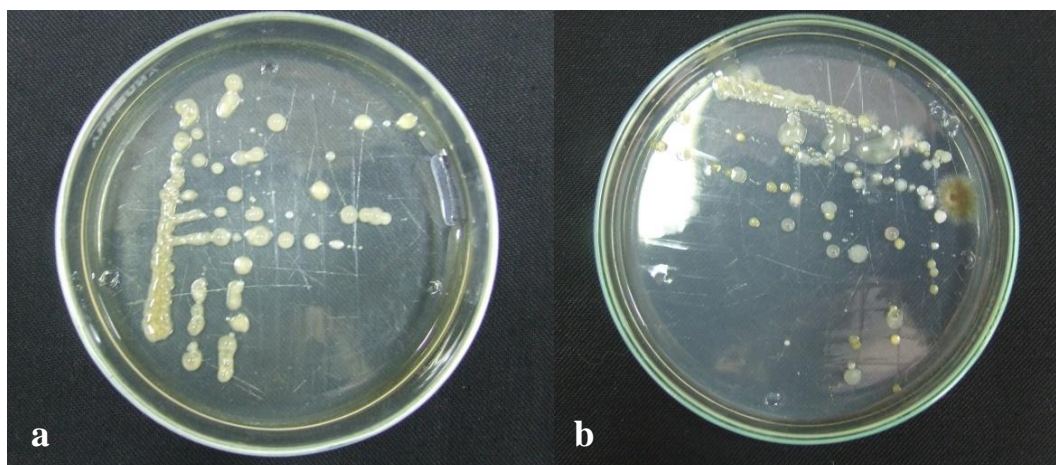


Slika 7. Izolacija – izgled kolonija *P. syringae* na podlozi NSA (Orig.)

Negativni rezultati izolacija bakterija su bili iz uzoraka koji su poticali iz zasada / plantaža starosti preko tri i više godina. U ovim slučajevima iz grana i grančica koje su se sušile iz skoro svih lokaliteta na podlozi PDA izolovana je *Cytospora* spp. U nekoliko slučajeva iz uzoraka sa sličnim simptomima izolovane su i gljive iz roda *Phomopsis*.

### 6. 2. 1. 2. Izolacije epifitne bakterijske populacije

Sa pupoljaka trešnje, tokom ranog proleća (20.2. i 10.3.2014.) i u leto (15.8.2014.) sa potpuno zdravih listova trešnje uspešno su izolovane bakterije, koje su na podlogama NSA i NA imale oblik kolonija tipičan za *P. syringae*. Izolacije epifitne populacije bakterija sa zdravih pupoljaka u proleće su bile znatno uspešnije (80 – 100%) (Sl.8a), u odnosu na izolacije rađene sa listova u avgustu (5 – 10%) (Sl.8b).



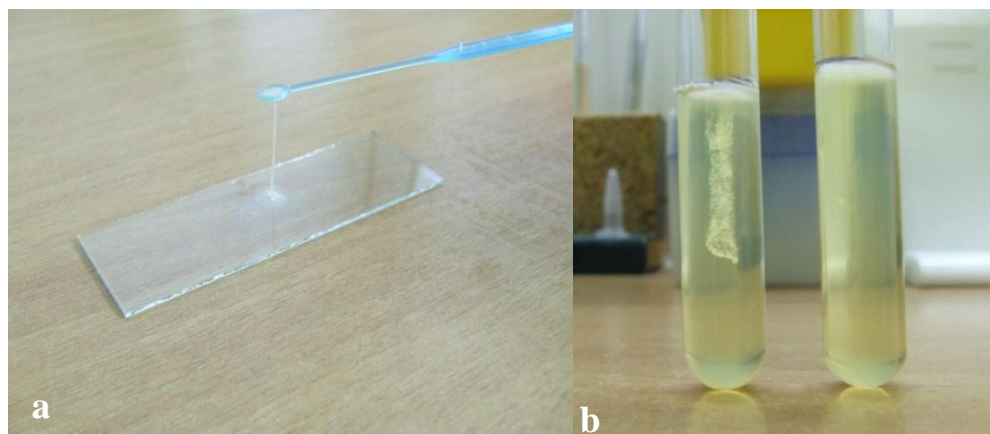
Slika 8. Izolacije epifitne populacije bakterija sa pupoljaka (a), sa listova (b) (Orig.)

### 6. 2. 1. 3. Izolacija bakteriofaga

Iz uzoraka zemljišta poreklom iz voćnjaka trešnje (Selenča) i jabuke (Irig) prikupljenih tokom jeseni (2014), sa oba lokaliteta uspešno su izolovani bakteriofagi metodom obogaćivanja supstrata. Iz ukupno 12 testiranih uzoraka prisustvo bakteriofaga utvrđeno je u 5 uzoraka. Izolovani bakteriofagi su označeni šiframa ST1/3, ST1/6 (Selenča) i I1/2, I3/5, I3/4 (Irig).

### 6. 2. 2. FENOTIPSKU KARAKTERISTIKE

- Bakterijske ćelije su štapićastog oblika sa zaobljenim krajevima;
- Svi ispitivani izolati bakterija formiraju sluzast končić u kontaktu sa 3% KOH, što znači da pripadaju grupi gramnegativnih bakterija (Sl.9a);
- Proučavani izolati su pokretljivi jer je nakon 48h inkubacije, došlo do zamućenja podloge (Sl.9b);
- Na King B podlozi svi proučavani izolati stvaraju zeleni fluorescentni pigment i obrazuju sjajne, bele, blago ispupčene kolonije.



Slika 9. KOH test – formiranje sluzastog končića (a), pokretljivost bakterija – nakon 24 h razvoj bakterija oko mesta uboda (epruveta levo) zamućenje podloge nakon 48 h (epruveta desno) (b) (Orig.)

### 6. 2. 2. 1. LOPAT TESTOVI

**Stvaranje levana.** Svi proučavani izolati stvaraju karakteristične sluzaste, krupne, sjajne, ispupčene, levan pozitivne kolonije tri dana posle razvoja na podlozi obogaćenoj saharozom (NSA), što znači da stvaraju levan (Sl.10). Stvaranje polisaharida levana zabeleženo je i kod kontrolnih sojeva CFBP1582 (*P. s. pv. syringae*) i CFBP2119 (*P. s. pv. morsprunorum* rasa 1).



Slika 10. Stvaranje levana na NSA podlozi (Orig.)

**Aktivnost oksidaze.** Ispitivani izolati ne stvaraju oksidazu. Pozitivnu reakciju je dao samo izolat bakterije *P. fluorescens* (KBNS201), što se manifestovalo pojavom plavo – ljubičaste boje na filter papiru (posle nekoliko sekundi).

**Pektolitička aktivnost na kriškama krompira.** Ispitivani izolati ne poseduju pektolitičke enzime, odnosno ne prouzrokuju trulež kriški krompira. Pozitivnu reakciju je dao samo test izolat bakterije *E. c. subsp. carotovora* (KBNS203) prouzrokujući vlažnu trulež krompira.

**Aktivnost arginin – dehidrolaze.** Ispitivani izolati ne stvaraju arginin – dehidrolazu. Promenu boje u ljubičasto – crvenu, kao znak pozitivne reakcije prouzrokovao je samo test izolat, *P. fluorescens* (KBNS201) i u aerobnim i anaerobnim uslovima.

**Hipersenzitivna reakcija (HR) na duvanu.** Svi izolati infiltrirani u list duvana i muškatle, nakon 24h su prouzrokovali tipičnu hipersenzitivnu reakciju.

Na osnovu LOPAT testova zaključeno je da svi ispitivani izolati sa trešnje pripadaju Ia grupi fluorescentnih fitopatogenih bakterija, odnosno vrsti *Pseudomonas syringae*. Rezultati LOPAT testova svih ispitivanih i kontrolnih sojeva dati su u tabeli 9.

Tabela 9. Rezultati LOPAT testova

Redni broj	Šifra izolata/ radne oznake	L	O	P	A	T
1	KBNS71	+	-	-	-	+
2	KBNS72	+	-	-	-	+
3	KBNS73	+	-	-	-	+
4	KBNS74	+	-	-	-	+
5	KBNS75	+	-	-	-	+
6	KBNS76	+	-	-	-	+
7	KBNS77	+	-	-	-	+
8	KBNS78	+	-	-	-	+
9	KBNS79	+	-	-	-	+
10	KBNS80	+	-	-	-	+
11	KBNS81	+	-	-	-	+
12	KBNS82	+	-	-	-	+
13	KBNS83	+	-	-	-	+
14	KBNS84	+	-	-	-	+
15	KBNS85	+	-	-	-	+
16	KBNS86	+	-	-	-	+
17	KBNS87	+	-	-	-	+
18	KBNS88	+	-	-	-	+
19	KBNS89	+	-	-	-	+
20	KBNS90	+	-	-	-	+
21	KBNS91	+	-	-	-	+
22	KBNS92	+	-	-	-	+
23	KBNS93	+	-	-	-	+
24	KBNS94	+	-	-	-	+
25	S1	+	-	-	-	+
26	S2	+	-	-	-	+
27	S3	+	-	-	-	+
28	S4	+	-	-	-	+
29	S5	+	-	-	-	+
30	S6	+	-	-	-	+



31	S7	+	-	-	-	+
32	S8	+	-	-	-	+
33	S9	+	-	-	-	+
34	S10	+	-	-	-	+
35	S11	+	-	-	-	+
36	S12	+	-	-	-	+
37	S13	+	-	-	-	+
38	S14	+	-	-	-	+
39	S15	+	-	-	-	+
40	S16	+	-	-	-	+
41	S17	+	-	-	-	+
42	S18	+	-	-	-	+
43	S19	+	-	-	-	+
44	S20	+	-	-	-	+
45	S21	+	-	-	-	+
46	S22	+	-	-	-	+
47	S23	+	-	-	-	+
48	S24	+	-	-	-	+
49	S25	+	-	-	-	+
50	S26	+	-	-	-	+
51	S27	+	-	-	-	+
52	S28	+	-	-	-	+
53	S29	+	-	-	-	+
54	S30	+	-	-	-	+
55	S31	+	-	-	-	+
56	S32	+	-	-	-	+
57	S33	+	-	-	-	+
58	S34	+	-	-	-	+
59	S35	+	-	-	-	+
60	S36	+	-	-	-	+
61	S37	+	-	-	-	+
62	S38	+	-	-	-	+
63	S39	+	-	-	-	+
64	S41	+	-	-	-	+
65	S42	+	-	-	-	+
66	S43	+	-	-	-	+

67	S44	+	-	-	-	+
68	S45	+	-	-	-	+
69	S46	+	-	-	-	+
70	S47	+	-	-	-	+
71	S48	+	-	-	-	+
72	S49	+	-	-	-	+
73	S50	+	-	-	-	+
74	S51	+	-	-	-	+
75	S52	+	-	-	-	+
76	S53	+	-	-	-	+
77	T1	+	-	-	-	+
78	T2	+	-	-	-	+
79	T3	+	-	-	-	+
80	T4	+	-	-	-	+
81	T5	+	-	-	-	+
82	T6	+	-	-	-	+
83	T7	+	-	-	-	+
84	T8	+	-	-	-	+
85	T9	+	-	-	-	+
86	T10	+	-	-	-	+
87	T11	+	-	-	-	+
88	T12	+	-	-	-	+
89	T13	+	-	-	-	+
90	T14	+	-	-	-	+
91	T15	+	-	-	-	+
92	T16	+	-	-	-	+
93	T17	+	-	-	-	+
94	T18	+	-	-	-	+
95	T19	+	-	-	-	+
96	T20	+	-	-	-	+
97	T21	+	-	-	-	+
98	T22	+	-	-	-	+
99	T23	+	-	-	-	+
100	T24	+	-	-	-	+
101	T25	+	-	-	-	+
102	T26	+	-	-	-	+

103	T27	+	-	-	-	+
104	T28	+	-	-	-	+
105	T29	+	-	-	-	+
106	K1	+	-	-	-	+
107	K2	+	-	-	-	+
108	K3	+	-	-	-	+
109	K4	+	-	-	-	+
110	K5	+	-	-	-	+
111	K6	+	-	-	-	+
112	K7	+	-	-	-	+
113	K8	+	-	-	-	+
114	LJ1	+	-	-	-	+
115	LJ2	+	-	-	-	+
116	LJ3	+	-	-	-	+
117	LJ9	+	-	-	-	+
118	LJ10	+	-	-	-	+
119	LJ11	+	-	-	-	+
120	LJ12	+	-	-	-	+
121	LJ13	+	-	-	-	+
122	M1	+	-	-	-	+
123	M2	+	-	-	-	+
124	M3	+	-	-	-	+
125	M4	+	-	-	-	+
126	M5	+	-	-	-	+
127	M6	+	-	-	-	+
128	M7	+	-	-	-	+
129	M8	+	-	-	-	+
130	M9	+	-	-	-	+
131	M10	+	-	-	-	+
132	M12	+	-	-	-	+
133	M13	+	-	-	-	+
134	M14	+	-	-	-	+
135	M15	+	-	-	-	+
136	M16	+	-	-	-	+
137	M17	+	-	-	-	+
138	M18	+	-	-	-	+

139	M25	+	-	-	-	+
140	M26	+	-	-	-	+
141	M27	+	-	-	-	+
142	M28	+	-	-	-	+
143	M29	+	-	-	-	+
144	M11	+	-	-	-	+
145	M19	+	-	-	-	+
146	LJ6	+	-	-	-	+
147	LJ7	+	-	-	-	+
148	LJ8	+	-	-	-	+
149	T30	+	-	-	-	+
150	S40	+	-	-	-	+
151	EPLS1	+	-	-	-	+
152	EPLM1	+	-	-	-	+
153	EPLGT1	+	-	-	-	+
154	EPLLJ1	+	-	-	-	+
155	EPLLJ2	+	-	-	-	+
kontrolni sojevi	CFBP1582	+	-	-	-	+
	CFBP2119	+	-	-	-	+
	KFB0103	+	-	-	-	+
	KFB0120	+	-	-	-	+
	KFB0101	+	-	-	-	+

## 6. 2. 2. 2. OSNOVNI BIOHEMIJSKO – FIZIOLOŠKI TESTOVI

**Aktivnost katalaze.** Svi ispitivani izolati stvaraju ferment katalazu, što je utvrđeno pojavom mehurića gasa kao rezultat izdvajanja slobodnog kiseonika, odnosno prisustva fermenta katalaze.

**Oksidativno/fermentativni O/F metabolizam glukoze.** Svi ispitivani izolati su razložili glukozu oksidativnim putem (promena boje podloge u žutu u aerobnim uslovima), na osnovu čega je zaključeno da proučavani izolati pripadaju grupi aerobnih bakterija.

**Stvaranje H<sub>2</sub>S iz peptona.** Ni jedan od ispitivanih izolata ne stvara sumpor – vodonik (nije došlo do pojave čađave boje na filter papiru).

**Stvaranje indola.** Ispitivani izolati ne stvaraju indol, odnosno nije došlo do pojave crveno – ljubičaste boje nakon dodavanja odgovarajućeg reagensa.

**Redukcija nitrata do nitrita.** Ispitivani izolati ne vrše redukciju nitrata do nitrita, odnosno nije došlo do pojave tamno – mrke boje nakon dodavanja odgovarajućeg reagensa.

**Hidroliza skroba.** Ispitivani izolati ne hidrolizuju skrob što je utvrđeno pojavom plave boje u celoj podlozi nakon dodavanja Lugolovog rastvora.

U svim navedenim biohemijsko – fiziološkim testovima reakcije kontrolnih sojeva CFBP1582, CFBP2119, KFB0103, KFB0101 i KFB0120 su bile identične ispitivanim izolatima poreklom sa trešnje.

### 6. 2. 2. 3. DIFERENCIJALNI BIOHEMIJSKO – FIZIOLOŠKI TESTOVI ZA RAZLIKOVANJE *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* i *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum*

#### (GATTa testovi)

Rezultati proučavanja diferencijalnih GATTa testova su pokazali da ispitivani izolati bakterija nisu uniformni (Sl. 11, 12, 13).

Na osnovu ovih testova utvrđeno je postojanje dve grupe izolata u okviru vrste *P. syringae*, koje odgovaraju patogenim varijetetima *syringae* ( $G^+A^+T^-Ta^-$ ) i *morsprunorum* (rasa 1) ( $G^-A^-T^+Ta^+$ ). Rezultati GATTa testova prikazani su u tabeli 10. Izolate čije su reakcije  $G^+A^+T^-Ta^-$ , u daljem tekstu smo označili kao I grupa (pv. *syringae*), a izolate čije su reakcije  $G^-A^-T^+Ta^+$  svrstani su u II grupu (pv. *morsprunorum*).

Među ispitivanim izolatima nije bilo odstupanja u okviru iste grupe. Kontrolni sojevi su reagovali kao tipični predstavnici navedenih patogenih varijeteta vrste *P. syringae*.

Tabela 10. Rezultati GATTa testova

Redni broj	Šifra izolata/ radne oznake	Hidroliza želatina (G)	Hidroliza eskulina (A)	Aktivnost tirozinaze (T)	Stvaranje (D+) tartarata (Ta)	Profil
1	KBNS71	-	-	+	+	<i>Psm</i> rasa 1
2	KBNS72	-	-	+	+	<i>Psm</i> rasa 1
3	KBNS73	-	-	+	+	<i>Psm</i> rasa 1
4	KBNS74	-	-	+	+	<i>Psm</i> rasa 1
5	KBNS75	-	-	+	+	<i>Psm</i> rasa 1
6	KBNS76	-	-	+	+	<i>Psm</i> rasa 1
7	KBNS77	-	-	+	+	<i>Psm</i> rasa 1
8	KBNS78	-	-	+	+	<i>Psm</i> rasa 1
9	KBNS79	-	-	+	+	<i>Psm</i> rasa 1
10	KBNS80	-	-	+	+	<i>Psm</i> rasa 1
11	KBNS81	-	-	+	+	<i>Psm</i> rasa 1
12	KBNS82	-	-	+	+	<i>Psm</i> rasa 1
13	KBNS83	-	-	+	+	<i>Psm</i> rasa 1
14	KBNS84	-	-	+	+	<i>Psm</i> rasa 1
15	KBNS85	+	+	-	-	<i>Pss</i>
16	KBNS86	+	+	-	-	<i>Pss</i>
17	KBNS87	+	+	-	-	<i>Pss</i>
18	KBNS88	+	+	-	-	<i>Pss</i>
19	KBNS89	+	+	-	-	<i>Pss</i>
20	KBNS90	+	+	-	-	<i>Pss</i>
21	KBNS91	+	+	-	-	<i>Pss</i>
22	KBNS92	+	+	-	-	<i>Pss</i>
23	KBNS93	+	+	-	-	<i>Pss</i>
24	KBNS94	+	+	-	-	<i>Pss</i>
25	S1	-	-	+	+	<i>Psm</i> rasa 1
26	S2	-	-	+	+	<i>Psm</i> rasa 1
27	S3	-	-	+	+	<i>Psm</i> rasa 1
28	S4	-	-	+	+	<i>Psm</i> rasa 1
29	S5	-	-	+	+	<i>Psm</i> rasa 1
30	S6	-	-	+	+	<i>Psm</i> rasa 1

31	S7	-	-	+	+	<i>Psm</i> rasa 1
32	S8	-	-	+	+	<i>Psm</i> rasa 1
33	S9	-	-	+	+	<i>Psm</i> rasa 1
34	S10	-	-	+	+	<i>Psm</i> rasa 1
35	S11	-	-	+	+	<i>Psm</i> rasa 1
36	S12	-	-	+	+	<i>Psm</i> rasa 1
37	S13	-	-	+	+	<i>Psm</i> rasa 1
38	S14	-	-	+	+	<i>Psm</i> rasa 1
39	S15	-	-	+	+	<i>Psm</i> rasa 1
40	S16	-	-	+	+	<i>Psm</i> rasa 1
41	S17	-	-	+	+	<i>Psm</i> rasa 1
42	S18	-	-	+	+	<i>Psm</i> rasa 1
43	S19	-	-	+	+	<i>Psm</i> rasa 1
44	S20	-	-	+	+	<i>Psm</i> rasa 1
45	S21	-	-	+	+	<i>Psm</i> rasa 1
46	S22	-	-	+	+	<i>Psm</i> rasa 1
47	S23	-	-	+	+	<i>Psm</i> rasa 1
48	S24	-	-	+	+	<i>Psm</i> rasa 1
49	S25	-	-	+	+	<i>Psm</i> rasa 1
50	S26	-	-	+	+	<i>Psm</i> rasa 1
51	S27	-	-	+	+	<i>Psm</i> rasa 1
52	S28	-	-	+	+	<i>Psm</i> rasa 1
53	S29	-	-	+	+	<i>Psm</i> rasa 1
54	S30	+	+	-	-	<i>Pss</i>
55	S31	+	+	-	-	<i>Pss</i>
56	S32	+	+	-	-	<i>Pss</i>
57	S33	+	+	-	-	<i>Pss</i>
58	S34	-	-	+	+	<i>Psm</i> rasa 1
59	S35	-	-	+	+	<i>Psm</i> rasa 1
60	S36	-	-	+	+	<i>Psm</i> rasa 1
61	S37	-	-	+	+	<i>Psm</i> rasa 1
62	S38	-	-	+	+	<i>Psm</i> rasa 1
63	S39	-	-	+	+	<i>Psm</i> rasa 1
64	S41	-	-	+	+	<i>Psm</i> rasa 1
65	S42	-	-	+	+	<i>Psm</i> rasa 1
66	S43	-	-	+	+	<i>Psm</i> rasa 1



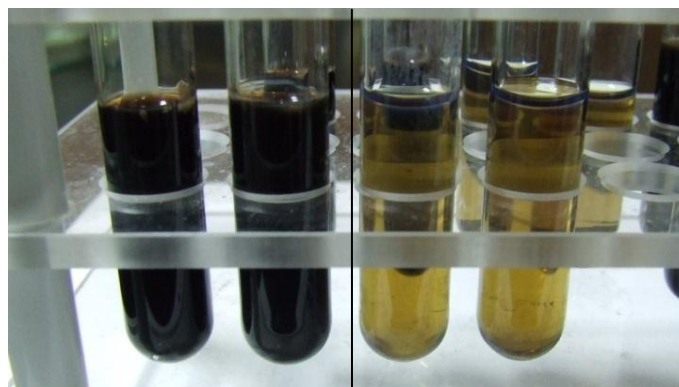
67	S44	-	-	+	+	<i>Psm</i> rasa 1
68	S45	-	-	+	+	<i>Psm</i> rasa 1
69	S46	-	-	+	+	<i>Psm</i> rasa 1
70	S47	-	-	+	+	<i>Psm</i> rasa 1
71	S48	-	-	+	+	<i>Psm</i> rasa 1
72	S49	-	-	+	+	<i>Psm</i> rasa 1
73	S50	-	-	+	+	<i>Psm</i> rasa 1
74	S51	-	-	+	+	<i>Psm</i> rasa 1
75	S52	-	-	+	+	<i>Psm</i> rasa 1
76	S53	-	-	+	+	<i>Psm</i> rasa 1
77	T1	+	+	-	-	<i>Pss</i>
78	T2	+	+	-	-	<i>Pss</i>
79	T3	+	+	-	-	<i>Pss</i>
80	T4	+	+	-	-	<i>Pss</i>
81	T5	+	+	-	-	<i>Pss</i>
82	T6	+	+	-	-	<i>Pss</i>
83	T7	+	+	-	-	<i>Pss</i>
84	T8	+	+	-	-	<i>Pss</i>
85	T9	+	+	-	-	<i>Pss</i>
86	T10	+	+	-	-	<i>Pss</i>
87	T11	+	+	-	-	<i>Pss</i>
88	T12	+	+	-	-	<i>Pss</i>
89	T13	+	+	-	-	<i>Pss</i>
90	T14	+	+	-	-	<i>Pss</i>
91	T15	+	+	-	-	<i>Pss</i>
92	T16	+	+	-	-	<i>Pss</i>
93	T17	+	+	-	-	<i>Pss</i>
94	T18	+	+	-	-	<i>Pss</i>
95	T19	+	+	-	-	<i>Pss</i>
96	T20	+	+	-	-	<i>Pss</i>
97	T21	+	+	-	-	<i>Pss</i>
98	T22	+	+	-	-	<i>Pss</i>
99	T23	+	+	-	-	<i>Pss</i>
100	T24	+	+	-	-	<i>Pss</i>
101	T25	+	+	-	-	<i>Pss</i>
102	T26	+	+	-	-	<i>Pss</i>

103	T27	+	+	-	-	<i>Pss</i>
104	T28	+	+	-	-	<i>Pss</i>
105	T29	+	+	-	-	<i>Pss</i>
106	K1	+	+	-	-	<i>Pss</i>
107	K2	+	+	-	-	<i>Pss</i>
108	K3	+	+	-	-	<i>Pss</i>
109	K4	+	+	-	-	<i>Pss</i>
110	K5	+	+	-	-	<i>Pss</i>
111	K6	+	+	-	-	<i>Pss</i>
112	K7	+	+	-	-	<i>Pss</i>
113	K8	+	+	-	-	<i>Pss</i>
114	LJ1	+	+	-	-	<i>Pss</i>
115	LJ2	+	+	-	-	<i>Pss</i>
116	LJ3	+	+	-	-	<i>Pss</i>
117	LJ9	+	+	-	-	<i>Pss</i>
118	LJ10	+	+	-	-	<i>Pss</i>
119	LJ11	+	+	-	-	<i>Pss</i>
120	LJ12	+	+	-	-	<i>Pss</i>
121	LJ13	+	+	-	-	<i>Pss</i>
122	M1	+	+	-	-	<i>Pss</i>
123	M2	+	+	-	-	<i>Pss</i>
124	M3	+	+	-	-	<i>Pss</i>
125	M4	-	-	+	+	<i>Psm rasa 1</i>
126	M5	-	-	+	+	<i>Psm rasa 1</i>
127	M6	-	-	+	+	<i>Psm rasa 1</i>
128	M7	-	-	+	+	<i>Psm rasa 1</i>
129	M8	-	-	+	+	<i>Psm rasa 1</i>
130	M9	-	-	+	+	<i>Psm rasa 1</i>
131	M10	-	-	+	+	<i>Psm rasa 1</i>
132	M12	+	+	-	-	<i>Pss</i>
133	M13	+	+	-	-	<i>Pss</i>
134	M14	+	+	-	-	<i>Pss</i>
135	M15	+	+	-	-	<i>Pss</i>
136	M16	+	+	-	-	<i>Pss</i>
137	M17	+	+	-	-	<i>Pss</i>
138	M18	+	+	-	-	<i>Pss</i>

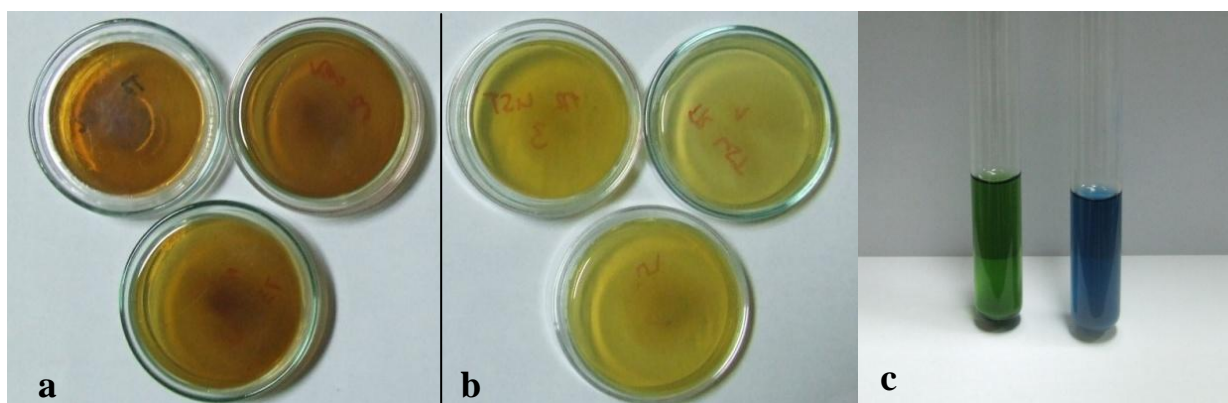
139	M25	-	-	+	+	<i>Psm</i> rasa 1
140	M26	-	-	+	+	<i>Psm</i> rasa 1
141	M27	-	-	+	+	<i>Psm</i> rasa 1
142	M28	-	-	+	+	<i>Psm</i> rasa 1
143	M29	-	-	+	+	<i>Psm</i> rasa 1
144	M11	+	+	-	-	<i>Pss</i>
145	M19	+	+	-	-	<i>Pss</i>
146	LJ6	+	+	-	-	<i>Pss</i>
147	LJ7	+	+	-	-	<i>Pss</i>
148	LJ8	+	+	-	-	<i>Pss</i>
149	T30	+	+	-	-	<i>Pss</i>
150	S40	-	-	+	+	<i>Psm</i> rasa 1
151	EPLS1	+	+	-	-	<i>Pss</i>
152	EPLM1	-	-	+	+	<i>Psm</i> rasa 1
153	EPLGT1	+	+	-	-	<i>Pss</i>
154	EPLLJ1	+	+	-	-	<i>Pss</i>
155	EPLLJ2	+	+	-	-	<i>Pss</i>
kontrolni sojevi	CFBP1582	+	+	-	-	<i>Pss</i>
	CFBP2119	-	-	+	-	<i>Psm</i> rasa 1
	KFB0103	+	+	-	-	<i>Pss</i>
	KFB0120	-	-	+	+	<i>Psm</i> rasa 1
	KFB0101	+	+	+	-	<i>Psm</i> rasa 2



Slika 11. Razlaganje želatina: pozitivna reakcija izolata I grupe (levo), negativna reakcija izolata II grupe (desno) (Orig.)



Slika 12. Hidroliza eskulina: pozitivna reakcija izolata I grupe (levo), negativna reakcija izolata II grupe (desno) (Orig.)



Slika 13. Aktivnost tirozinaze: pozitivna reakcija izolata II grupe (a), negativna reakcija izolata I grupe (b); Stvaranje D (+) tartarata (c) – negativna reakcija izolata I grupe (levo), pozitivna reakcija izolati II grupe (desno) (Orig.)

#### 6. 2. 2. 4. DODATNI TESTOVI ZA RAZLIKOVANJE *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* i *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum*

Dodatni testovi su takođe potvrdili da postoje razlike između izolata I grupe i II grupe (Sl. 14, 15, 16). Izolati I grupe – koriste mlečnu kiselinu, podlogu obogaćenu saharozom boje žuto, hidrolizuju kazein i L – leucin, zadržavaju vitalnost na NSA podlozi 15 – 18 dana, stvaraju čestice leda i toksin siringomicin (izuzimajući mali broj izolata kod kojih je ova reakcija bila negativna – KBNS85, KBNS86, KBNS88, KBNS89, KBNS90, KBNS91, KBNS92, KBNS94, T23, T24, T25, T26, T27, T28, T29) i nisu ispoljili osetljivost prema testiranim bakteriofagama (Tab. 11). Izolati II grupe – ne koriste mlečnu kiselinu, podlogu obogaćenu saharozom boje belo, ne hidrolizuju kazein i L – leucin, zadržavaju vitalnost 9 dana, ne stvaraju čestice leda ni siringomicin, ali su ispoljili osetljivost prema svim testiranim bakteriofagama. Prisustvo bakteriofaga u ispitivanim uzorcima dokazano je pojavom plaka, odnosno prosvetljenih zona kružnih oblika koje nastaju usled lize bakterijskih ćelija u podlozi nakon 24 – 48h inkubacije u termostatu na temperaturi 26°C (Tab. 11). Veličina plaka kod svih ispitivanih izolata je bila ujednačena i kretala se od 9 – 11 mm (Sl.17). U svim navedenim testovima kontrolni sojevi su reagovali kao tipični predstavnici navedenih patogenih varijeteta vrste *P. syringae*.

Prema tome, rezultati dodatnih testova potvrđuju da ispitivani izolati bakterija poreklom sa trešnje pripadaju vrstama *P. s. pv. syringae* i *P. s. pv. morsprunorum* rasi 1. Izolati iz lokaliteta Selenča poreklom sa grana – rak rana (49 izolata) i listova (13) pripadaju II grupi, odnosno pv. *morsprunorum* rasi 1. Iz ovog lokaliteta samo mali broj izolata (4 izolata sa grana – rak rana) pripada I grupi (pv. *syringae*). Izolati iz lokaliteta Gornji Tavankut i to sa grane – rak rana (27 izolata) i listova (5 izolata) na osnovu ovih testova svrstani su u I grupu (pv. *syringae*). U I grupu (pv. *syringae*) uključeni su izolati iz lokaliteta Kanjiža, stablo – rak rana (8 izolata), Donjeg Tavankuta (7 izolata, grana rak – rana) i Ljutova (8 izolata; stablo – rak rana). Izolati iz lokaliteta Mikićevo sa grana – raka rana (7 izolata) i sa listova (5 izolata) pripadaju pv. *morsprunorum* rasa 1 (II grupa). U istom lokalitetu sa grana – rak rane je dobijeno 10 izolata koji pripadaju pv. *syringae* (I grupa) (Tab. 11).

Iz epifitne populacije (Selenča, Mikićevo, Gornji Tavankut i Ljutovo) sa pupoljaka i listova dobijen je velik broj izolata, ali je za dalji rad (identifikaciju) odabrano desetak izolata. U epifitnoj populaciji iz lokaliteta Selenča i Mikićevo utvrđeno je prisustvo oba patovara (*syringae* i *morsprunorum* rasa 1), a u lokalitetima G.Tavankut i Ljutovo samo pv. *syringae* (Tab. 11).

Tabela 11. Rezultati dodatnih testova za razlikovanje *pvs. syringae* i *morsprunorum*

Redni broj	Šifra izolata/ radne oznake	Korišćenje mlečne kiseline	Razvoj u tečnoj podlozi obogaćenoj saharozom	Vitalnost na NSA podlozi/dani	Hidroliza kazeina	Korišćenje L- leucina	INA	Siringomicin	Osetljivost prema bakteriofagama
1	KBNS71	-	beo	9	-	-	-	-	+
2	KBNS72	-	beo	9	-	-	-	-	+
3	KBNS73	-	beo	9	-	-	-	-	+
4	KBNS74	-	beo	9	-	-	-	-	+
5	KBNS75	-	beo	9	-	-	-	-	+
6	KBNS76	-	beo	9	-	-	-	-	+
7	KBNS77	-	beo	9	-	-	-	-	+
8	KBNS78	-	beo	9	-	-	-	-	+
9	KBNS79	-	beo	9	-	-	-	-	+
10	KBNS80	-	beo	9	-	-	-	-	+
11	KBNS81	-	beo	9	-	-	-	-	+
12	KBNS82	-	beo	9	-	-	-	-	+
13	KBNS83	-	beo	9	-	-	-	-	+
14	KBNS84	-	beo	9	-	-	-	-	+
15	KBNS85	+	žut	18	+	+	+	-	+
16	KBNS86	+	žut	18	+	+	+	-	+
17	KBNS87	+	žut	18	+	+	+	+	-
18	KBNS88	+	žut	18	+	+	+	-	-
19	KBNS89	+	žut	18	+	+	+	-	-
20	KBNS90	+	žut	18	+	+	+	-	-
21	KBNS91	+	žut	18	+	+	+	-	-
22	KBNS92	+	žut	18	+	+	+	-	-
23	KBNS93	+	žut	18	+	+	+	+	-
24	KBNS94	+	žut	18	+	+	+	-	-
25	S1	-	beo	9	-	-	-	-	+
26	S2	-	beo	9	-	-	-	-	+
27	S3	-	beo	9	-	-	-	-	+
28	S4	-	beo	9	-	-	-	-	+
29	S5	-	beo	9	-	-	-	-	+

30	S6	-	beo	9	-	-	-	-	+
31	S7	-	beo	9	-	-	-	-	+
32	S8	-	beo	9	-	-	-	-	+
33	S9	-	beo	9	-	-	-	-	+
34	S10	-	beo	9	-	-	-	-	+
35	S11	-	beo	9	-	-	-	-	+
36	S12	-	beo	9	-	-	-	-	+
37	S13	-	beo	9	-	-	-	-	+
38	S14	-	beo	9	-	-	-	-	+
39	S15	-	beo	9	-	-	-	-	+
40	S16	-	beo	9	-	-	-	-	+
41	S17	-	beo	9	-	-	-	-	+
42	S18	-	beo	9	-	-	-	-	+
43	S19	-	beo	9	-	-	-	-	+
44	S20	-	beo	9	-	-	-	-	+
45	S21	-	beo	9	-	-	-	-	+
46	S22	-	beo	9	-	-	-	-	+
47	S23	-	beo	9	-	-	-	-	+
48	S24	-	beo	9	-	-	-	-	+
49	S25	-	beo	9	-	-	-	-	+
50	S26	-	beo	9	-	-	-	-	+
51	S27	-	beo	9	-	-	-	-	+
52	S28	-	beo	9	-	-	-	-	+
53	S29	-	beo	9	-	-	-	-	+
54	S30	+	žut	15	+	+	+	+	-
55	S31	+	žut	15	+	+	+	+	-
56	S32	+	žut	15	+	+	+	+	-
57	S33	+	žut	15	+	+	+	+	-
58	S34	-	beo	9	-	-	-	-	+
59	S35	-	beo	9	-	-	-	-	+
60	S36	-	beo	9	-	-	-	-	+
61	S37	-	beo	9	-	-	-	-	+
62	S38	-	beo	9	-	-	-	-	+
63	S39	-	beo	9	-	-	-	-	+
64	S41	-	beo	9	-	-	-	-	+
65	S42	-	beo	9	-	-	-	-	+

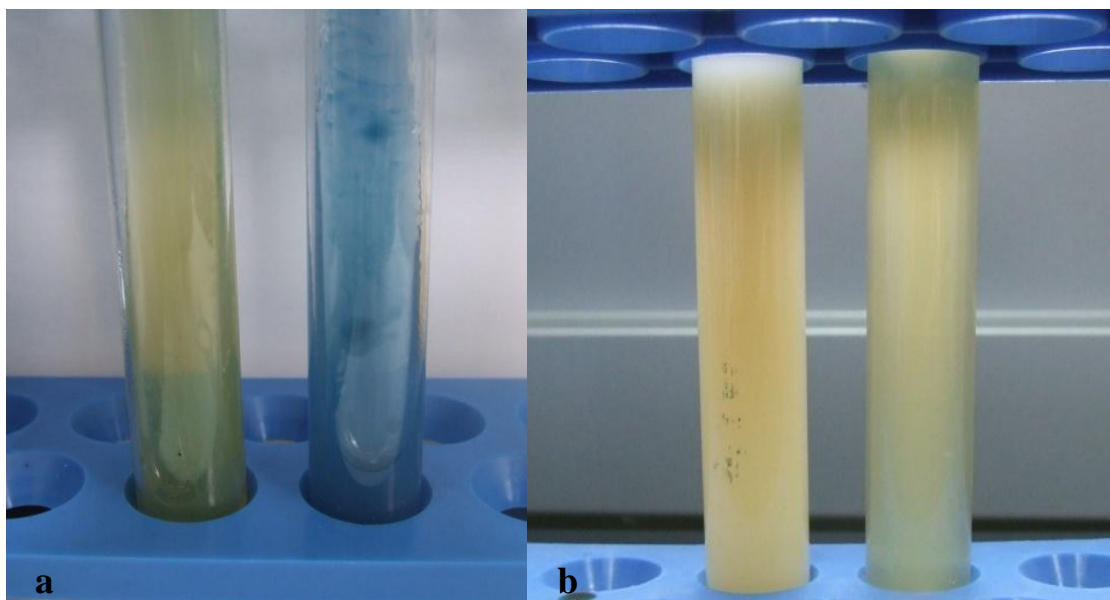
66	S43	-	beo	9	-	-	-	-	+
67	S44	-	beo	9	-	-	-	-	+
68	S45	-	beo	9	-	-	-	-	+
69	S46	-	beo	9	-	-	-	-	+
70	S47	-	beo	9	-	-	-	-	+
71	S48	-	beo	9	-	-	-	-	+
72	S49	-	beo	9	-	-	-	-	+
73	S50	-	beo	9	-	-	-	-	+
74	S51	-	beo	9	-	-	-	-	+
75	S52	-	beo	9	-	-	-	-	+
76	S53	-	beo	9	-	-	-	-	+
77	T1	+	žut	18	-	-	-	-	+
78	T2	+	žut	18	+	+	+	+	-
79	T3	+	žut	18	+	+	+	+	-
80	T4	+	žut	18	+	+	+	+	-
81	T5	+	žut	18	+	+	+	+	-
82	T6	+	žut	18	+	+	+	+	-
83	T7	+	žut	18	+	+	+	+	-
84	T8	+	žut	18	+	+	+	+	-
85	T9	+	žut	18	+	+	+	+	-
86	T10	+	žut	18	+	+	+	+	-
87	T11	+	žut	18	+	+	+	+	-
88	T12	+	žut	18	+	+	+	+	-
89	T13	+	žut	18	+	+	+	+	-
90	T14	+	žut	18	+	+	+	+	-
91	T15	+	žut	18	+	+	+	+	-
92	T16	+	žut	18	+	+	+	+	-
93	T17	+	žut	18	+	+	+	+	-
94	T18	+	žut	18	+	+	+	+	-
95	T19	+	žut	18	+	+	+	+	-
96	T20	+	žut	18	+	+	+	+	-
97	T21	+	žut	18	+	+	+	+	-
98	T22	+	žut	18	+	+	+	+	-
99	T23	+	žut	15	+	+	+	-	-
100	T24	+	žut	15	+	+	+	-	-
101	T25	+	žut	15	+	+	+	-	-



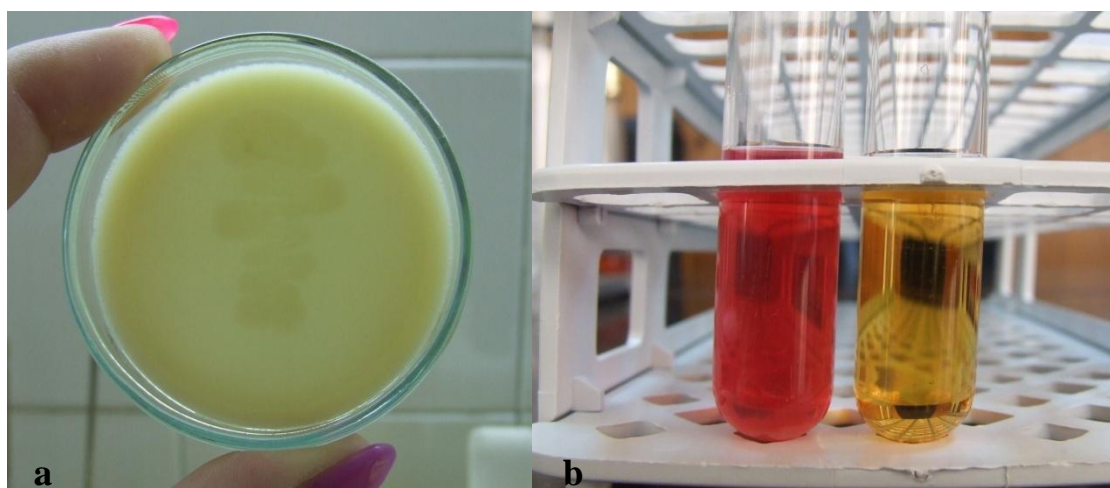
102	T26	+	žut	15	+	+	+	-	-
103	T27	+	žut	15	+	+	+	-	-
104	T28	+	žut	15	+	+	+	-	-
105	T29	+	žut	15	+	+	+	-	-
106	K1	+	žut	18	+	+	+	+	-
107	K2	+	žut	18	+	+	+	+	-
108	K3	+	žut	18	+	+	+	+	-
109	K4	+	žut	18	+	+	+	+	-
110	K5	+	žut	18	+	+	+	+	-
111	K6	+	žut	18	+	+	+	+	-
112	K7	+	žut	18	+	+	+	+	-
113	K8	+	žut	18	+	+	+	+	-
114	LJ1	+	žut	18	+	+	+	+	-
115	LJ2	+	žut	18	+	+	+	+	-
116	LJ3	+	žut	18	+	+	+	+	-
117	LJ9	+	žut	18	+	+	+	+	-
118	LJ10	+	žut	18	+	+	+	+	-
119	LJ11	+	žut	18	+	+	+	+	-
120	LJ12	+	žut	18	+	+	+	+	-
121	LJ13	+	žut	18	+	+	+	+	-
122	M1	+	žut	18	+	+	+	+	-
123	M2	+	žut	18	+	+	+	+	-
124	M3	+	žut	18	+	+	+	+	-
125	M4	-	beo	9	-	-	-	-	+
126	M5	-	beo	9	-	-	-	-	+
127	M6	-	beo	9	-	-	-	-	+
128	M7	-	beo	9	-	-	-	-	+
129	M8	-	beo	9	-	-	-	-	+
130	M9	-	beo	9	-	-	-	-	+
131	M10	-	beo	9	-	-	-	-	+
132	M12	+	žut	15	+	+	+	+	-
133	M13	+	žut	15	+	+	+	+	-
134	M14	+	žut	15	+	+	+	+	-
135	M15	+	žut	15	+	+	+	+	-
136	M16	+	žut	15	+	+	+	+	-
137	M17	+	žut	15	+	+	+	+	-

138	M18	+	žut	15	+	+	+	+	-
139	M25	-	beo	9	-	-	-	-	+
140	M26	-	beo	9	-	-	-	-	+
141	M27	-	beo	9	-	-	-	-	+
142	M28	-	beo	9	-	-	-	-	+
143	M29	-	beo	9	-	-	-	-	+
144	M11	+	žut	15	+	+	+	+	-
145	M19	+	žut	15	+	+	+	+	-
146	LJ6	+	žut	15	+	+	+	+	-
147	LJ7	+	žut	15	+	+	+	+	-
148	LJ8	+	žut	15	+	+	+	+	-
149	T30	+	žut	15	+	+	+	+	-
150	S40	-	beo	9	-	-	-	-	+
151	EPLS1	+	žut	15	+	+	+	+	-
152	EPLM1	-	beo	9	-	-	-	-	+
153	EPLGT1	+	žut	15	+	+	+	+	-
154	EPLLJ1	+	žut	15	+	+	+	+	-
155	EPLLJ2	+	žut	15	+	+	+	+	-
kontrolni izolati	CFBP1582	+	žut	nt	+	+	+	+	nt
	CFBP2119	-	beo	nt	-	-	-	-	nt
	KFB0103	+	žut	7	+	+	+	+	-
	KFB0120	-	beo	nt	-	-	-	-	+
	KFB0101	-	beo	4	-	-	-	-	-

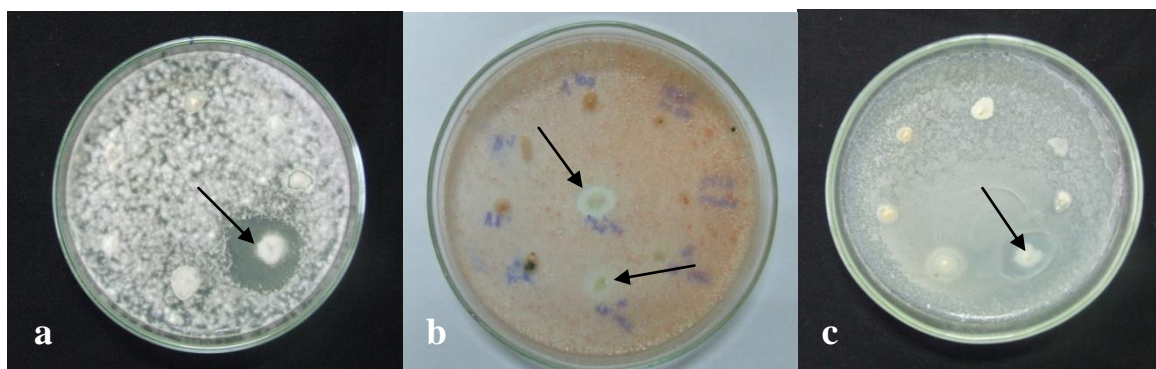
nt–nije testirano



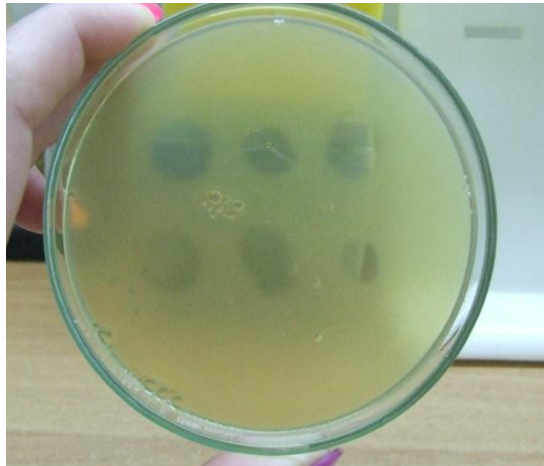
Slika 14. Korišćenje mlečne kiseline (a) – negativna reakcija izolata II grupe (levo), pozitivna reakcija izolata I grupe (desno); Karakteristike razvoja u tečnoj podlozi obogaćenoj saharozom (b) – žut razvoj izolati I grupe (levo), beo izolati II grupe (desno) (Orig.)



Slika 15. Pozitivna reakcija hidrolize kazeina za izolate I grupe (a); Korišćenje L – Leucina kao izvora C i N (b) pozitivna reakcija izolata I grupe (epruveta levo), negativna reakcija izolata II grupe (epruveta desno) (Orig.)



Slika 16. Stvaranje siringomicina: *Geotrichum candidum* (a), *Rhodotorula pilimanae* (b) *Saccharomyces cerevisiae* (c) pozitivna reakcija – formiranje prosvetljene zone oko kolonije bakterija (izolati I grupe); negativna reakcija – odsustvo prosvetljenih zona (izolati II grupe) (Orig.)



Slika 17. Osetljivost prema bakteriofagama (izolati II grupe) – stvaranje prosvetljenih zona (plaka) na mestima gde je naneta suspenzija bakteriofaga (Orig.)

### 6. 2. 3. PROVERA PATOGENOSTI

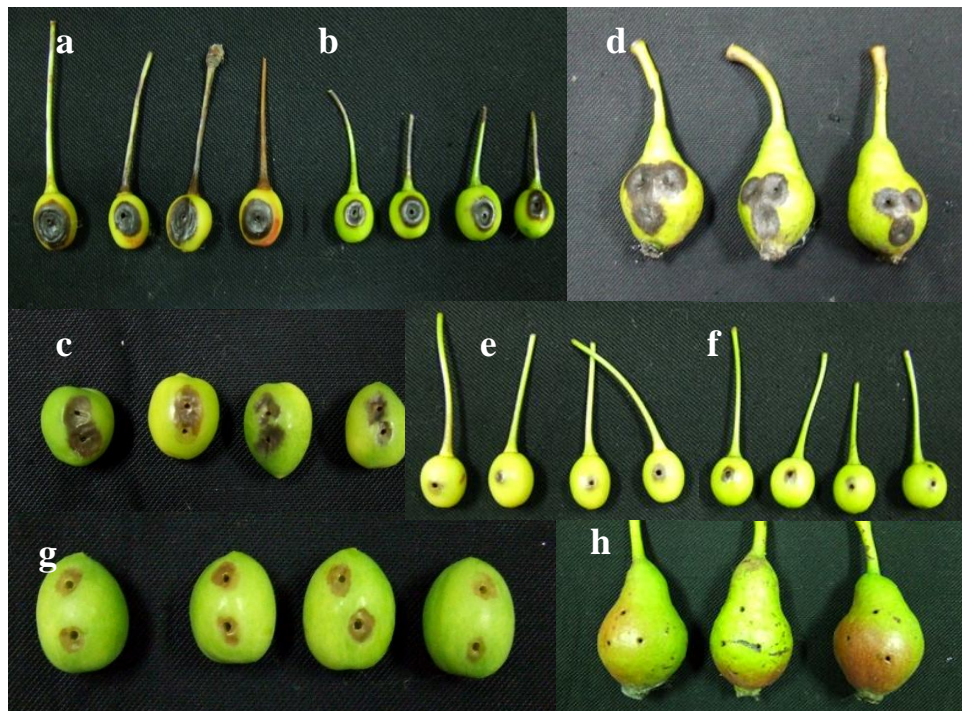
#### 6. 2. 3. 1. PROVERA PATOGENOSTI NA PLODOVIMA I LISTOVIMA

##### 6. 2. 3. 1. 1. Provera patogenosti na zelenim plodovima trešnje, višnje, ringlova i kruške

Na zelenim plodovima inokulisanim ubodom igle i postavljenim na vlažnu filter hartiju prvi simptomi su uočeni posle 24h na plodovima trešnje i višnje u vidu vodenastih, masnih pega oko uboda kod svih izolata I grupe (KBNS85, KBNS86, KBNS87, KBNS88, KBNS89, KBNS90, KBNS91, KBNS92, KBNS93, KBNS94, S30, S31, S32, S33, T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7, T8, T9, T10, T11, T12, T13, T14, T15, T16, T17, T18, T19, T20, T21, T22, T23, T24, T25, T26, T27, T28, T29, K1, K2, K3, K4, K5, K6, K7, K8, LJ1, LJ2, LJ3, LJ9, LJ10, LJ11, LJ12, LJ13, M1, M2, M3, M12, M13, M14, M15, M16, M17, M18, M11, M19, LJ6, LJ7, LJ8, T30, EPLS1, EPLGT1, EPLLJ1 i EPLLJ2). Nakon 48h isti simptomi su uočeni i na ringlovu. Tri dana posle inokulacije tkivo oko mesta uboda počinje da tamni. Petog dana simptomi se javljaju i na nezrelim plodovima kruške. Između trećeg i petog dana, pege na plodovima trešnje i višnje intenzivno crne i tkivo se uleže sve do koštice (Sl. 18a, 18b). Između četvrtog i petog dana veličina nekroze kod trešnje i višnje se kretala oko 5,50 mm, a kod ringlova 6,70 mm (Sl. 18c). Na plodovima kruške pege su tamne gotovo crne i uležu u tkivo (Sl. 18d). Desetog dana nakon inokulacije prosečna veličina pega na plodovima kruške je 6,41 mm. Ovaj tip simptoma odgovara simptomima koje prouzrokuje patovar *syringae*. Isti

simptomi na inokulisanim plodovima zabeleženi su i kod kontrolnog soja KBF0103 (*P. s. pv. syringae*).

Kod izolata II grupe (KBNS71, KBNS72, KBNS73, KBNS74, KBNS75, KBNS76, KBNS77, KBNS78, KBNS79, KBNS80, KBNS81, KBNS82, KBNS83, KBNS84, S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7, S8, S9, S10, S11, S12, S13, S14, S15, S16, S17, S18, S19, S20, S21, S22, S23, S24, S25, S26, S27, S28, S29, S34, S35, S36, S37, S38, S39, S41, S42, S43, S44, S45, S46, S47, S48, S49, S50, S51, S52, S53, M4, M5, M6, M7, M8, M9, M10, M25, M26, M27, M28, M29, S40 i EPLM1) prvi simptomi na inokulisanim plodovima se javljaju nakon 48h u vidu vodenastih pega oko mesta uboda na plodovima trešnje i višnje. Između trećeg i petog dana pege su sive i tkivo oko pega nije ugnuto (Sl. 18e, 18f). Petog dana veličina pege na plodovima trešnje i višnje je oko 3,50 mm i 4,12 mm na ringlovu (Sl. 18g). Na inokulisanim plodovima kruške ova grupa izolata nije prouzrokovala simptome (Sl. 18h). Iste simptome na zelenim plodovima voća je prouzrokovao i kontrolni soj KFB0120 (*P. s. pv. morsprunorum* rasa 1). Na plodovima inokulisanim destilovanom vodom do kraja ogleda nisu nastupile nikakve promene.

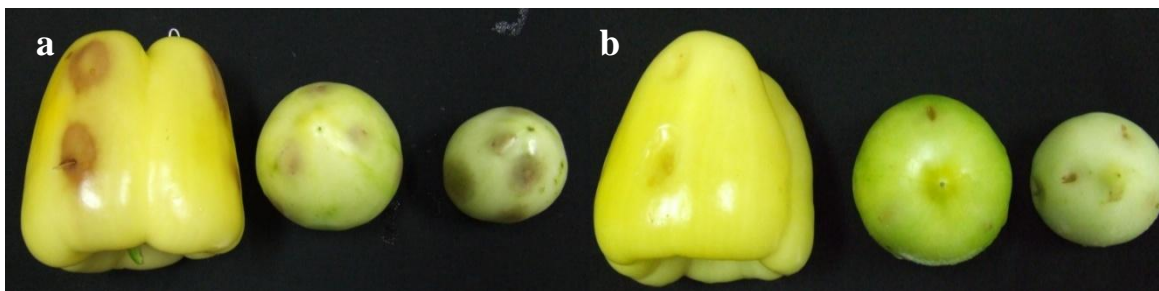


Slika 18. Inokulacija zelenih plodova: Izolati I grupe – crne, ugnute pege na inokulisanim plodovima trešnje (a), višnje (b), ringlova (c) i kruške (d); Izolati II grupe – sive, površinske pege na inokulisanim plodovima trešnje (e) i višnje (f), ringlova (g) i negativna reakcija pri inokulaciji plodova kruške (h) (Orig.)

### 6. 2. 3. 1. 2. Provera patogenosti na plodovima paprike i zelenim plodovima paradajza

Na plodovima paprike i paradajza inokulisanih infiltracijom bakterijske suspenzije medicinskom iglom, simptomi su se pojavili nakon 48h. Izolati I grupe (pv. *syringae*) na inokulisanim plodovima u zoni infiltracije suspenzije, obrazuju masne pege sa vodenastom zonom. Trećeg dana pege počinju da tamne i blago uležu u tkivo (Sl. 19a). Petog dana kod skoro svih izolata pege počinju da se spajaju i u manjoj ili većoj meri su mrke boje. Isti simptomi na inokulisanim plodovima zabeleženi su i kod kontrolnog soja KBF0103 (*P. s. pv. syringae*).

Izolati bakterija II grupe (pv. *morsprunorum* rasa 1) na inokulisanim plodovima paprike i zelenim plodovima paradajza nisu prouzrokovali simptome (Sl. 19b), kao ni kontrolni soj KFB0120 (*P. s. pv. morsprunorum*). Kontrolni plodovi inokulisani destilovanom vodom do kraja ogleada su ostali negativni.



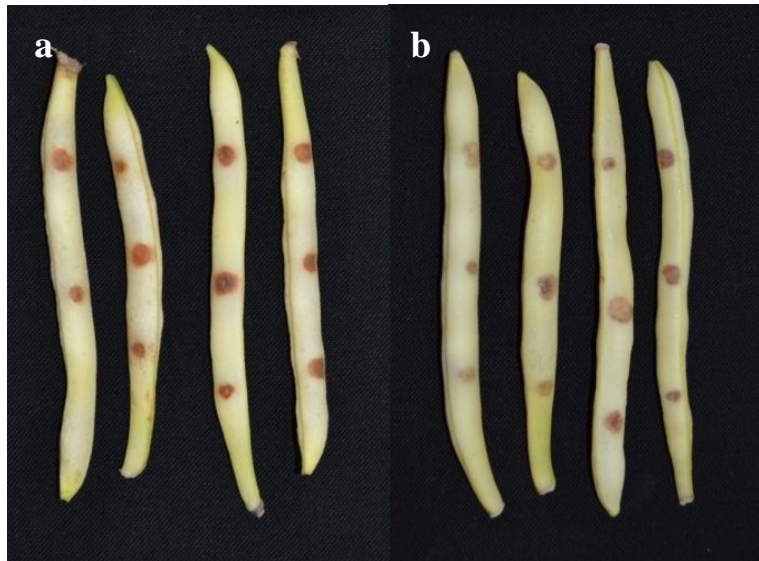
Slika 19. Inokulacija plodova paprika i zelenih plodova paradajza: mrke, blago ulegnute pege na mestima inokulacije plodova izolatima I grupe (a), negativna reakcija izolata II grupe (b) (Orig.)

### 6. 2. 3. 1. 3. Provera patogenosti na mahunama boranije

Na inokulisanim mahunama boranije prvi simptomi se uočavaju nakon 48h od inokulacije. Kod izolata I grupe (pv. *syringae*) pege su mrko – crvenkaste boje i blago ulegle u tkivo (Sl. 20a). Iste reakcije zabeležene su i kod kontrolnog soja KBF0103 (*P. s. pv. syringae*).

Kod izolata II grupe (pv. *morsprunorum* rasa 1) simptomi se takođe zapažaju nakon 48h ali su kod ove grupe izolata pege sivkasto – mrke boje (Sl. 20b). Isti izgled pega na inokulisanim mahunama boranije je bio i kod kontrolnog soja KFB0120 (*P. s.* pv. *morsprunorum* rasa 1).

Na kontrolnim mahunama, inokulisanim destilovanom vodom do kraja ogleda nije došlo do promena.



Slika 20. Inokulacija mahuna boranije: mrko – crvenkaste pege na mestima inokulacije plodova izolatima I grupe (a), sivkasto – mrke pege pri inokulaciji sa izolatima II grupe (b) (Orig.)

#### 6. 2. 3. 1. 4. Provera patogenosti na odvojenim listovima jorgovana

Pri inokulaciji listova jorgovana korišćenjem tri metoda inokulacije, kod svih izolata koji pripadaju I grupi (pv. *syringae*) reakcije su bile pozitivne. Korišćenjem istih metoda inokulacije većina izolata II grupe (pv. *morsprunorum* rasa 1) je takođe dala pozitivnu reakciju, ali su za izolate iz lokaliteta Mikićevo ove reakcije bile negativne.

Pri prvom metodu inokulacije – ubrizgavanje suspenzije bakterija pod pritiskom u lisno tkivo, kod svih izolata I grupe i većine izolata II grupe, nakon 48h je došlo do pojave simptoma. Na mestima inokulacije pege su sivkasto mrke i kod pojedinih pega se javlja hloroza. Daljim razvojem, pege postaju mrke i vidljive sa lica i naličja lista (Sl. 21a). Jedina razlika između isptivanih izolata jeste u pogledu boje pega. Kod izolata I grupe pege su

tamnije, gotovo crne, dok je kod izolata II grupe boja pega sivkasto – mrka. Do kraja ogleda izgled pega je ostao nepromenjen.

Isti slučaj je bio i kod drugog metoda inokulacije – sečenje lista do glavnog nerva i potapanje u suspenziju bakterija. Prvi simptomi se javljaju šestog dana, nekroza se počinje širiti oko mesta preseka i to kod izolata I grupe. Sledećeg dana simptomi se uočavaju i kod izolata II grupe. Oko mesta preseka lista, nekroza zahvata i glavni nerv. Daljim razvojem simptoma nekroza se širi i na bočne nerve, a 10 – tog dana zahvata veći deo liske (Sl. 21b). U pogledu veličine i boje nekroze koja je zahvatila lisku, nije bilo razlika između ispitivanih grupa izolata.

Identična situacija je bila i pri korišćenju trećeg metoda inokulacije – potapanje lisnih drški u suspenziju bakterija. Simptomi se zapažaju šestog dana kod obe grupe izolata, pri čemu osnova drške počinje da tamni. Vremenom (8 – 10 dana) bakterije počinju da se šire i kroz glavni i bočne nerve (Sl. 21c). Na kraju ogleda pri ovom metodu inokulacije kod obe grupe ispitivanih izolata nekroza 14 – tog dana zahvata oko 70% lisne mase.

Izolati kod kojih su reakcije bile negativne pri korišćenju sva tri metoda inokulacije pripadaju II grupi i označeni su šiframa M4, M5, M6, M7, M8, M9, M10, M25, M26, M27, M28, M29 i EPLM1 (Mikićevo). Upoređujući dobijene rezultate sa kontrolnim sojevima, može se zaključiti da izolati I grupe i većina izolata II grupe reaguju isto kao kontrolni sojevi KBF0103 (*P. s. pv. syringae*) i KFB0101 (*P. s. pv. morsprunorum* rasa 2), a samo izolati II grupe koji potiču iz lokaliteta Mikićevo reaguju identično kao kontrolni soj KFB0120 (*P. s. pv. morsprunorum* rasa 1).

Na kontrolnim listovima, inokulisanim destilovanom vodom do kraja ogleda nije došlo do promena.





Slika 21. Inokulacija odvojenih listova jorgovana: pozitivna reakcija izolata I grupe i većine izolata II grupe – metod infiltracije (a), povređivanje liske i potapanje u suspenziju bakterija (b) i potapanje lisnih drški (c) (Orig.)

### 6. 2. 3. 2. PROVERA PATOGENOSTI NA SEJANCIMA PODLOGA RAZNIH VOĆNIH VRSTA I REZNICAMA TREŠNJE

#### 6. 2. 3. 2. 1. Provera patogenosti na sejancima voćnih podloga divlje trešnje, magrive, divlje šljive i divlje kruške

Na sejancima navedenih voćnih podloga, visine 10 – 15 cm inokulisanih metodom zareza, četvrtog dana nakon izvršenih inokulacija reprezentativnim izolatima iz I grupe (KBNS93, T1, T29, K1, Lj1 i M15), uočava se promena boje oko mesta inokulacije na svim inokulisanim sejancima. Narednog dana simptomi se počinju javljati i kod II grupe izolata (S1, S44 i M25) i to na inokulisanim sejancima magrive, divlje trešnje i kruške. Na sejancima divlje šljive kod ove grupe izolata nisu zabeležene nikakve promene.

Sedmog dana kod izolata iz I grupe nekroza oko svakog zareza se širi eliptično (1 do 2 cm), tamno mrke do crne boje. Ivice nekroze se jasno uočavaju, odvajajući okolno zdravo

tkivo (Sl. 22a, 22b, 23a, 23b). Najintenzivnije širenje nekroze uočeno je kod izolata T1 i K1. Kod II grupe izolata nekroza oko mesta zareza se širila nešto sporije iznoseći 1 do 1,5 cm.

Desetog dana kod svih ispitivanih izolata na svim inokulisanim sejancima nekroza zahvata veći deo biljaka, koje crne a vršni delovi se povijaju. U pojedinim slučajevima dolazi i do opadanja listova. Jače širenje nekroze kod svih inokulisanih sejanaca zapaženo je u I grupi izolata. Najče patološke promene zabeležene su na divljoj krušci (Sl. 22a).

Četrnaestog dana nekroza je uglavnom zahvatila veći deo sejanaca i biljke propadaju u celosti. Kod izolata II grupe nisu uočene promene na divljoj šljivi (Sl. 23c).

Na biljkama inokulisanim destilovanom vodom reakcija je negativna.

Kod kontrolnih sojeva KFB0103 (*P. s. pv. syringae*) takođe je došlo do nekroze kod svih vrsta sejanaca, praćene istim razvojem simptoma i propadanjem biljaka, kao i u slučaju ispitivanih izolata. Na sejancima inokulisanim sojem KFB0120 (*P. s. pv. morsprunorum* rasa 1) simptomi su se javili kod svih ispitivanih vrsta, osim sejanaca divlje šljive, što je bio slučaj i kod ispitivanih izolata S1, S44 i M25.



Slika 22. Inokulacije sejanaca voćnih podloga: širenje nekroze oko zareza, povijanje biljaka, žućenje i opadanje listova divlja kruška (a), divlja trešnja (b) (Orig.)



Slika 23. Inokulacije sejanaca voćnih podloga: širenje nekroze oko zareza (a – divlja šljiva, b – magriva), negativna reakcija izolata II grupe pri inokulaciji sejanaca divlje šljive (c) (Orig.)

### 6. 2. 3. 2. 2. Provera patogenosti na reznicama trešnje

Rezultati inokulacija na reznicama (dvogodišnje grančice) trešnje tokom perioda mirovanja voćaka (novembar, decembar, januar 2013/2014 i 2014/2015 godine), postavljenih u kvarcni pesak (Botanička bašta Poljoprivredni fakultet, Novi Sad) pokazuju da su svi izolati I grupe (KBNS87, KBNS93 – pv. *syringae*) i II grupe (KBNS74, KBNS79 – pv. *morsprunorum* rasa 1), podjednako patogeni na raznim sortama trešnje (Burlat, Summit, Hedelfigenska i Germerzdorfska).

U ogledu izvedenom 2013/2014 na reznicama trešnje tokom novembra (2013) prvi vidljivi simptomi uočeni su sredinom januara (20.1.2014.). Najjače promene u okviru zareza konstatovane su kod sorte Burlat inokulisane izolatima KBNS87 i KBNS93 – pv. *syringae* (Tab. 12). Prvi simptomi se ispoljavaju u vidu promene boje na zarezima. Kora tamni, deluje vlažno i nekroza se širi prema osnovi i vršnom delu grančice nekoliko mm od zareza (Sl. 24 a). Kod drugih sorti i izolata takođe su uočene promene. Pri prvoj oceni oko mesta zareza nekroza se u proseku kretala od 0,29 – 0,38 cm. Sredinom marta (20.3.2014.) kod svih inokulisanih reznica evidentirano je širenje nekroze (0,97 – 1,25 cm), zavisno od sorte i izolata. Nekroza se širila eliptično i pratilo je uleganje kore. Kod svih sorti jasno je uočljiva promena boje tkiva u mrko – ljubičastu uz prisustvo smole u okviru zareza, što je praćeno sušenjem grančica (Sl. 24b, 24c). Pri konačnom pregledu (15.4.2014.) prosečna dužina nekroze je bila od 1,35 – 2,35 cm. Najduža nekroza (2,28 – 2,35 cm) je ponovo utvrđena kod sorte Burlat (KBNS87 i KBNS93), zatim kod Summit kod svih izolata (1,98 – 2,18 cm), a

najmanja kod sorte Germerzdorfska inokulisane izolatima pv. *morsprunorum* rasa 1 KBNS74 i KBNS79 (1,35 – 1,46 cm). Između sorte Burlat inokulisane izolatima pv. *syringae* postoji značajna razlika u odnosu na sve druge kombinacije sorti i izolata (Tab.12).

Tabela 12. Prosečna dužina nekroze (cm) veštački inokulisanih reznica (dvogodišnje grančice) trešnje tokom novembra 2013. godine Botanička bašta, Poljoprivredni fakultet Novi Sad

Novembar 2013 god.								
Sorta	Izolot	Ocena I 20.01.	Sorta	Izolot	Ocena II 20.3.	Sorta	Izolot	Ocena III 15.4.
Germerzdorfska	K-	0 <sup>a</sup>	Germerzdorfska	K-	0 <sup>a</sup>	Germerzdorfska	K-	0 <sup>a</sup>
Summit	K-	0 <sup>a</sup>	Summit	K-	0 <sup>a</sup>	Summit	K-	0 <sup>a</sup>
Hedelfigenska	K-	0 <sup>a</sup>	Hedelfigenska	K-	0 <sup>a</sup>	Hedelfigenska	K-	0 <sup>a</sup>
Burlat	K-	0 <sup>a</sup>	Burlat	K-	0 <sup>a</sup>	Burlat	K-	0 <sup>a</sup>
Germerzdorfska	KBNS74	0,29 <sup>b</sup>	Germerzdorfska	KBNS74	0,97 <sup>b</sup>	Germerzdorfska	KBNS74	1,35 <sup>b</sup>
Summit	KBNS74	0,30 <sup>bc</sup>	Burlat	KBNS74	1,03 <sup>bc</sup>	Germerzdorfska	KBNS79	1,46 <sup>b</sup>
Germerzdorfska	KBNS79	0,30 <sup>bc</sup>	Germerzdorfska	KBNS79	1,04 <sup>bcd</sup>	Hedelfigenska	KBNS74	1,76 <sup>cd</sup>
Summit	KBNS79	0,31 <sup>bcd</sup>	Hedelfigenska	KBNS74	1,07 <sup>bcd</sup>	Hedelfigenska	KBNS79	1,83 <sup>cd</sup>
Summit	KBNS93	0,31 <sup>bcd</sup>	Summit	KBNS79	1,08 <sup>cdef</sup>	Hedelfigenska	KBNS93	1,83 <sup>cd</sup>
Germerzdorfska	KBNS93	0,31 <sup>bcd</sup>	Germerzdorfska	KBNS93	1,08 <sup>cdef</sup>	Summit	KBNS79	1,98 <sup>cde</sup>
Hedelfigenska	KBNS79	0,32 <sup>bcd</sup>	Hedelfigenska	KBNS79	1,09 <sup>cdef</sup>	Hedelfigenska	KBNS87	2,02 <sup>def</sup>
Hedelfigenska	KBNS93	0,33 <sup>bcd</sup>	Summit	KBNS74	1,10 <sup>cdef</sup>	Burlat	KBNS74	2,14 <sup>efg</sup>
Hedelfigenska	KBNS87	0,33 <sup>bcd</sup>	Summit	KBNS87	1,11 <sup>cdef</sup>	Summit	KBNS74	2,15 <sup>efg</sup>
Burlat	KBNS74	0,34 <sup>bcd</sup>	Burlat	KBNS87	1,12 <sup>cdefg</sup>	Summit	KBNS93	2,17 <sup>efg</sup>
Burlat	KBNS79	0,34 <sup>bcd</sup>	Hedelfigenska	KBNS93	1,13 <sup>cdefg</sup>	Summit	KBNS87	2,18 <sup>efg</sup>
Germerzdorfska	KBNS87	0,36 <sup>cde</sup>	Burlat	KBNS87	1,14 <sup>defgh</sup>	Burlat	KBNS79	2,21 <sup>fg</sup>
Summit	KBNS87	0,37 <sup>de</sup>	Germerzdorfska	KBNS87	1,16 <sup>efgh</sup>	Germerzdorfska	KBNS93	2,26 <sup>fg</sup>
Hedelfigenska	KBNS74	0,37 <sup>de</sup>	Hedelfigenska	KBNS87	1,20 <sup>fgh</sup>	Burlat	KBNS87	2,28 <sup>g</sup>
Burlat	KBNS93	0,38 <sup>e</sup>	Summit	KBNS93	1,23 <sup>gh</sup>	Germerzdorfska	KBNS87	2,33 <sup>g</sup>
Burlat	KBNS87	0,38 <sup>e</sup>	Burlat	KBNS93	1,25 <sup>h</sup>	Burlat	KBNS93	2,35 <sup>g</sup>

$p < 0,05$

Pri inokulacijama urađenim tokom decembra 2013. prvi simptomi su uočeni sredinom februara (20.2.2014.). Simptomi su zapaženi na svim sortama i kod svih izolata (Tab. 13). Prosečna dužina nekroze je bila 0,29 – 0,38 cm u zavisnosti od sorte i izolata. U drugoj oceni (25.3.2014.) zabeleženo je širenje nekroze kod svih sorti i izolata (1,18 – 1,52 cm). Kod poslednjeg očitavanja (20.4.2014.) utvrđeno je povećanje dužine nekroze (2,18 – 2,80 cm). Razlike u dužini nekroze zavisno od kombinacije izolata i sorte su bile vrlo male. Međutim, u

većini slučajeva najmanja dužina nekroze je bila kod izolata KBNS74 i KBNS79 – pv. *morsprunorum* rasa 1 (Tab. 13).

Tabela 13. Prosečna dužina nekroze (cm) veštački inokuliranih reznica (dvogodišnje grančice) trešnje tokom decembra 2013. godine Botanička bašta, Poljoprivredni fakultet Novi Sad

Decembar 2013 god.								
Sorta	Izolat	Ocena I 20.2.	Sorta	Izolat	Ocena II 25.3.	Sorta	Izolat	Ocena III 20.4.
Germerzdorfska	K-	0 <sup>a</sup>	Germerzdorfska	K-	0 <sup>a</sup>	Germerzdorfska	K-	0 <sup>a</sup>
Summit	K-	0 <sup>a</sup>	Summit	K-	0 <sup>a</sup>	Summit	K-	0 <sup>a</sup>
Hedelfigenska	K-	0 <sup>a</sup>	Hedelfigenska	K-	0 <sup>a</sup>	Hedelfigenska	K-	0 <sup>a</sup>
Burlat	K-	0 <sup>a</sup>	Burlat	K-	0 <sup>a</sup>	Burlat	K-	0 <sup>a</sup>
Summit	KBNS74	0,36 <sup>b</sup>	Germerzdorfska	KBNS93	1,18 <sup>b</sup>	Summit	KBNS79	2,18 <sup>b</sup>
Summit	KBNS79	0,36 <sup>b</sup>	Hedelfigenska	KBNS74	1,20 <sup>b</sup>	Hedelfigenska	KBNS74	2,20 <sup>b</sup>
Summit	KBNS93	0,37 <sup>bc</sup>	Germerzdorfska	KBNS74	1,25 <sup>bc</sup>	Summit	KBNS74	2,31 <sup>bc</sup>
Hedelfigenska	KBNS79	0,38 <sup>bc</sup>	Summit	KBNS87	1,26 <sup>bcd</sup>	Germerzdorfska	KBNS74	2,36 <sup>bc</sup>
Germerzdorfska	KBNS74	0,39 <sup>bc</sup>	Summit	KBNS79	1,27 <sup>bcd</sup>	Hedelfigenska	KBNS79	2,45 <sup>cd</sup>
Hedelfigenska	KBNS87	0,39 <sup>bc</sup>	Summit	KBNS74	1,28 <sup>bcd</sup>	Germerzdorfska	KBNS79	2,45 <sup>cd</sup>
Burlat	KBNS93	0,39 <sup>bc</sup>	Summit	KBNS93	1,33 <sup>cde</sup>	Hedelfigenska	KBNS87	2,50 <sup>cd</sup>
Germerzdorfska	KBNS93	0,39 <sup>bc</sup>	Hedelfigenska	KBNS93	1,35 <sup>cde</sup>	Burlat	KBNS93	2,63 <sup>de</sup>
Hedelfigenska	KBNS93	0,40 <sup>bc</sup>	Hedelfigenska	KBNS87	1,36 <sup>cde</sup>	Hedelfigenska	KBNS93	2,64 <sup>de</sup>
Germerzdorfska	KBNS79	0,41 <sup>bc</sup>	Hedelfigenska	KBNS79	1,37 <sup>cde</sup>	Burlat	KBNS87	2,66 <sup>de</sup>
Hedelfigenska	KBNS74	0,41 <sup>bc</sup>	Germerzdorfska	KBNS87	1,38 <sup>cdef</sup>	Summit	KBNS87	2,66 <sup>de</sup>
Burlat	KBNS74	0,41 <sup>bc</sup>	Burlat	KBNS93	1,39 <sup>def</sup>	Burlat	KBNS74	2,66 <sup>de</sup>
Summit	KBNS87	0,41 <sup>bc</sup>	Germerzdorfska	KBNS79	1,42 <sup>efg</sup>	Germerzdorfska	KBNS93	2,70 <sup>e</sup>
Burlat	KBNS79	0,41 <sup>bc</sup>	Burlat	KBNS74	1,43 <sup>efg</sup>	Summit	KBNS93	2,72 <sup>e</sup>
Germerzdorfska	KBNS87	0,43 <sup>c</sup>	Burlat	KBNS87	1,49 <sup>fg</sup>	Germerzdorfska	KBNS87	2,73 <sup>e</sup>
Burlat	KBNS87	0,43 <sup>c</sup>	Burlat	KBNS79	1,52 <sup>g</sup>	Burlat	KBNS79	2,80 <sup>e</sup>

$p < 0,05$

Na reznicama inokuliranim tokom januara 2014. prvi simptomi oko mesta zarezavanja zapaženi su početkom marta (10.3.2015.) kod svih sorti i izolata (Tab. 14). Prosečna dužina nekroze se kretala od 0,35 cm do 0,47 cm. Konačnim pregledom reznica (20.4.2014.) utvrđeno je jače širenje nekroze u odnosu na predhodnu ocenu, ali su rezultati bili slični decembarskim. Prosečna dužina nekroze je bila od 2,13 cm do 2,81 cm. U ovom slučaju dužina nekroze u kombinacijama sorte i izolata su bile minimalne. Analizirajući dobijene podatke proizilazi da je na sortama Hedelfigenska i Germerzdorfska (nezavisno od izolata) dužina nekroze generalno bila manja (2,13 – 2,39 cm) u odnosu na sorte Burlat i Summit

(2,51 – 2,81 cm). Odnosno između sorti Hedelfigenska i Germerzdorfska inokulisane svim izolatima postoji statistički značajna razlika u odnosu na sorte Burlat inokulisane svim izolatima i sorte Summit inokulisane izolatima pv. *syringae* (Tab.14).

Tabela 14. Prosečna dužina nekroze (cm) veštački inokulisanih reznica (dvogodišnje grančice) trešnje tokom januara 2014. godine Botanička bašta, Poljoprivredni fakultet Novi Sad

Januar 2014 god.								
Sorta	Izolat	Ocena I 10.3.	Sorta	Izolat	Ocena II 31.3.	Sorta	Izolat	Ocena III 20.4.
Germerzdorfska	K-	0 <sup>a</sup>	Germerzdorfska	K-	0 <sup>a</sup>	Germerzdorfska	K-	0 <sup>a</sup>
Summit	K-	0 <sup>a</sup>	Summit	K-	0 <sup>a</sup>	Summit	K-	0 <sup>a</sup>
Hedelfigenska	K-	0 <sup>a</sup>	Hedelfigenska	K-	0 <sup>a</sup>	Hedelfigenska	K-	0 <sup>a</sup>
Burlat	K-	0 <sup>a</sup>	Burlat	K-	0 <sup>a</sup>	Burlat	K-	0 <sup>a</sup>
Germerzdorfska	KBNS93	0,35 <sup>b</sup>	Hedelfigenska	KBNS93	1,22 <sup>b</sup>	Hedelfigenska	KBNS74	2,13 <sup>b</sup>
Hedelfigenska	KBNS93	0,35 <sup>b</sup>	Germerzdorfska	KBNS74	1,25 <sup>bc</sup>	Hedelfigenska	KBNS79	2,30 <sup>bc</sup>
Germerzdorfska	KBNS74	0,38 <sup>bcd</sup>	Hedelfigenska	KBNS74	1,25 <sup>bc</sup>	Germerzdorfska	KBNS79	2,32 <sup>bc</sup>
Hedelfigenska	KBNS74	0,38 <sup>bcd</sup>	Summit	KBNS79	1,28 <sup>bcd</sup>	Germerzdorfska	KBNS74	2,34 <sup>c</sup>
Germerzdorfska	KBNS79	0,39 <sup>bcd</sup>	Hedelfigenska	KBNS87	1,29 <sup>bcd</sup>	Hedelfigenska	KBNS87	2,35 <sup>cd</sup>
Hedelfigenska	KBNS79	0,34 <sup>bcd</sup>	Germerzdorfska	KBNS93	1,30 <sup>bcd</sup>	Hedelfigenska	KBNS93	2,35 <sup>cd</sup>
Hedelfigenska	KBNS87	0,40 <sup>bcd</sup>	Germerzdorfska	KBNS87	1,32 <sup>bcd</sup>	Germerzdorfska	KBNS93	2,38 <sup>cd</sup>
Summit	KBNS79	0,41 <sup>cdef</sup>	Summit	KBNS74	1,33 <sup>bcd</sup>	Germerzdorfska	KBNS87	2,39 <sup>cd</sup>
Summit	KBNS74	0,41 <sup>cdef</sup>	Burlat	KBNS79	1,34 <sup>bcd</sup>	Summit	KBNS74	2,51 <sup>cde</sup>
Germerzdorfska	KBNS87	0,41 <sup>cdef</sup>	Hedelfigenska	KBNS79	1,35 <sup>bcd</sup>	Summit	KBNS79	2,58 <sup>def</sup>
Summit	KBNS93	0,42 <sup>cdef</sup>	Germerzdorfska	KBNS79	1,37 <sup>cde</sup>	Summit	KBNS93	2,66 <sup>efg</sup>
Summit	KBNS87	0,42 <sup>cdef</sup>	Summit	KBNS93	1,38 <sup>cde</sup>	Burlat	KBNS79	2,66 <sup>efg</sup>
Burlat	KBNS93	0,45 <sup>efg</sup>	Burlat	KBNS74	1,39 <sup>de</sup>	Burlat	KBNS87	2,68 <sup>efg</sup>
Burlat	KBNS87	0,45 <sup>efg</sup>	Summit	KBNS87	1,40 <sup>de</sup>	Summit	KBNS87	2,68 <sup>efg</sup>
Burlat	KBNS79	0,45 <sup>efg</sup>	Burlat	KBNS87	1,42 <sup>de</sup>	Burlat	KBNS74	2,77 <sup>fg</sup>
Burlat	KBNS74	0,47 <sup>g</sup>	Burlat	KBNS93	1,47 <sup>e</sup>	Burlat	KBNS93	2,81 <sup>g</sup>

$p < 0,05$

Kod oglada izvedenog tokom 2014/2015 tokom novembra 2014. dobijeni su slični rezultati kao u predhodnoj godini (Tab. 15). Najjače širenje nekroze od 2,19 cm do 2,30 cm je bilo kod sorte Burlat (svi izolati), a nešto niže vrednosti su bile kod sorte Summit, takođe kod svih izolata (2,02 – 2,18 cm). Najmanji prečnik nekroze je bio kod sorte Germerzdorfska inokulisane izolatima KBNS74 i KBNS79 – pv. *morsprunorum* rasa 1 (1,3 – 1,47 cm). Između ove sorte inokulisane sa oba izolata pv. *morsprunorum* rasa 1, postoji statistički

značajna razlika u odnosu na sve ostale kombinacije, kao i između sorte Burlat inokulisane sa po jednim izolatom oba patovara (KBNS79, KBNS93) (Tab. 15).

Tabela 15. Prosečna dužina nekroze (cm) veštački inokulisanih reznica (dvogodišnje grančice) trešnje tokom novembra 2014.godine Botanička bašta, Poljoprivredni fakultet Novi Sad

Novembar 2014 god.								
Sorta	Izolot	Ocena I 20.1.	Sorta	Izolot	Ocena II 20.3.	Sorta	Izolot	Ocena III 15.4.
Germerzdorfska	K-	0 <sup>a</sup>	Germerzdorfska	K-	0 <sup>a</sup>	Germerzdorfska	K-	0 <sup>a</sup>
Summit	K-	0 <sup>a</sup>	Summit	K-	0 <sup>a</sup>	Summit	K-	0 <sup>a</sup>
Hedelfigenska	K-	0 <sup>a</sup>	Hedelfigenska	K-	0 <sup>a</sup>	Hedelfigenska	K-	0 <sup>a</sup>
Burlat	K-	0 <sup>a</sup>	Burlat	K-	0 <sup>a</sup>	Burlat	K-	0 <sup>a</sup>
Germerzdorfska	KBNS74	0,29 <sup>b</sup>	Germerzdorfska	KBNS74	0,96 <sup>b</sup>	Germerzdorfska	KBNS74	1,35 <sup>b</sup>
Germerzdorfska	KBNS79	0,32 <sup>bc</sup>	Germerzdorfska	KBNS79	1,03 <sup>bc</sup>	Germerzdorfska	KBNS79	1,47 <sup>b</sup>
Germerzdorfska	KBNS93	0,33 <sup>bcd</sup>	Hedelfigenska	KBNS74	1,06 <sup>bcd</sup>	Germerzdorfska	KBNS87	1,71 <sup>c</sup>
Summit	KBNS79	0,34 <sup>bcd</sup>	Burlat	KBNS74	1,08 <sup>cd</sup>	Hedelfigenska	KBNS74	1,75 <sup>cd</sup>
Germerzdorfska	KBNS87	0,35 <sup>cdef</sup>	Hedelfigenska	KBNS79	1,08 <sup>cd</sup>	Hedelfigenska	KBNS93	1,85 <sup>cde</sup>
Hedelfigenska	KBNS93	0,35 <sup>cdef</sup>	Summit	KBNS79	1,10 <sup>cd</sup>	Hedelfigenska	KBNS79	1,88 <sup>cdef</sup>
Hedelfigenska	KBNS79	0,36 <sup>cdef</sup>	Germerzdorfska	KBNS93	1,12 <sup>cde</sup>	Hedelfigenska	KBNS87	1,91 <sup>defg</sup>
Hedelfigenska	KBNS74	0,36 <sup>cdef</sup>	Summit	KBNS87	1,13 <sup>cdef</sup>	Germerzdorfska	KBNS93	2,01 <sup>efgh</sup>
Hedelfigenska	KBNS87	0,37 <sup>cdefg</sup>	Hedelfigenska	KBNS93	1,14 <sup>cdef</sup>	Summit	KBNS79	2,02 <sup>efgh</sup>
Summit	KBNS93	0,38 <sup>efg</sup>	Burlat	KBNS79	1,14 <sup>cdef</sup>	Summit	KBNS93	2,05 <sup>fghi</sup>
Burlat	KBNS74	0,39 <sup>efgh</sup>	Burlat	KBNS87	1,16 <sup>cdef</sup>	Summit	KBNS87	2,08 <sup>ghi</sup>
Summit	KBNS74	0,40 <sup>efgh</sup>	Germerzdorfska	KBNS87	1,16 <sup>cdef</sup>	Summit	KBNS74	2,18 <sup>hi</sup>
Burlat	KBNS79	0,40 <sup>efgh</sup>	Summit	KBNS93	1,17 <sup>def</sup>	Burlat	KBNS87	2,19 <sup>hi</sup>
Summit	KBNS87	0,41 <sup>fgh</sup>	Hedelfigenska	KBNS87	1,24 <sup>ef</sup>	Burlat	KBNS74	2,24 <sup>i</sup>
Burlat	KBNS87	0,42 <sup>gh</sup>	Burlat	KBNS93	1,24 <sup>ef</sup>	Burlat	KBNS79	2,30 <sup>j</sup>
Burlat	KBNS93	0,44 <sup>h</sup>	Summit	KBNS74	1,26 <sup>f</sup>	Burlat	KBNS93	2,30 <sup>j</sup>

$p < 0,05$

U decembarskim inokulacijama (2014) prilikom prve ocene (20.2.2015.) prosečna dužina nekroze oko zarezaja je bila od 0,39 – 0,47 cm. Širenje nekroze tokom drugog pregleda (20.3.2015.) je bilo jasno uočljivo kod svih inokulisanih reznica i sorti (Tab. 16). Nekroza oko zarezaja se eliptično širila i u zavisnosti od sorte i izolata, bila je od 1,33 cm do 1,54 cm. Pri trećoj oceni (20.4.2015.) dužina nekroze u svim kombinacijama je bila ujednačena iznoseći od 2,15 cm do 2,74 cm. Na sortima Burlat i Summit konstatovana je najveća dužina nekroze od 2,56 – 2,74 cm, pri čemu se u oba slučaja radi o kombinacijama ovih sorti i izolata pv.

*syringae*. Kod ostalih izolata i sorti zabeležene su približno iste vrednosti nekroze od 2,29 do 2,53 cm. U ovom ogledu najmanja dužina nekroze evidentirana je kod sorte Hedelfigenska i većine izolata (2,15 – 2,24 cm) (Tab.16).

Tabela 16. Prosečna dužina nekroze (cm) veštački inokulisanih reznica (dvogodišnje grančice) trešnje tokom decembra 2014. godine Botanička bašta, Poljoprivredni fakultet Novi Sad

Decembar 2014 god.								
Sorta	Izolat	Ocena I 20.2.	Sorta	Izolat	Ocena II 25.3.	Sorta	Izolat	Ocena III 20.4.
Germerzdorfska	K-	0 <sup>a</sup>	Germerzdorfska	K-	0 <sup>a</sup>	Germerzdorfska	K-	0 <sup>a</sup>
Summit	K-	0 <sup>a</sup>	Summit	K-	0 <sup>a</sup>	Summit	K-	0 <sup>a</sup>
Hedelfigenska	K-	0 <sup>a</sup>	Hedelfigenska	K-	0 <sup>a</sup>	Hedelfigenska	K-	0 <sup>a</sup>
Burlat	K-	0 <sup>a</sup>	Burlat	K-	0 <sup>a</sup>	Burlat	K-	0 <sup>a</sup>
Summit	KBNS79	0,39 <sup>b</sup>	Hedelfigenska	KBNS74	1,33 <sup>b</sup>	Hedelfigenska	KBNS74	2,15 <sup>b</sup>
Summit	KBNS74	0,39 <sup>b</sup>	Summit	KBNS74	1,33 <sup>b</sup>	Hedelfigenska	KBNS93	2,19 <sup>bc</sup>
Hedelfigenska	KBNS79	0,40 <sup>bc</sup>	Germerzdorfska	KBNS74	1,33 <sup>b</sup>	Hedelfigenska	KBNS79	2,24 <sup>bcd</sup>
Hedelfigenska	KBNS74	0,41 <sup>bcd</sup>	Summit	KBNS79	1,37 <sup>b</sup>	Summit	KBNS74	2,29 <sup>bcd</sup>
Hedelfigenska	KBNS87	0,42 <sup>bcd</sup>	Hedelfigenska	KBNS87	1,38 <sup>bc</sup>	Germerzdorfska	KBNS74	2,38 <sup>bcd</sup>
Germerzdorfska	KBNS74	0,43 <sup>bcd</sup>	Hedelfigenska	KBNS93	1,40 <sup>bcd</sup>	Summit	KBNS79	2,40 <sup>cdef</sup>
Germerzdorfska	KBNS93	0,43 <sup>bcd</sup>	Germerzdorfska	KBNS93	1,40 <sup>bcd</sup>	Hedelfigenska	KBNS87	2,41 <sup>cdef</sup>
Hedelfigenska	KBNS93	0,43 <sup>bcd</sup>	Germerzdorfska	KBNS87	1,42 <sup>bcd</sup>	Burlat	KBNS74	2,43 <sup>cdef</sup>
Summit	KBNS87	0,43 <sup>bcd</sup>	Hedelfigenska	KBNS79	1,42 <sup>bcd</sup>	Germerzdorfska	KBNS79	2,47 <sup>def</sup>
Germerzdorfska	KBNS87	0,44 <sup>bcd</sup>	Summit	KBNS87	1,49 <sup>cde</sup>	Burlat	KBNS79	2,52 <sup>efg</sup>
Burlat	KBNS74	0,44 <sup>bcd</sup>	Germerzdorfska	KBNS79	1,50 <sup>cde</sup>	Germerzdorfska	KBNS93	2,53 <sup>efg</sup>
Germerzdorfska	KBNS79	0,45 <sup>cde</sup>	Burlat	KBNS93	1,50 <sup>cde</sup>	Burlat	KBNS93	2,56 <sup>fg</sup>
Burlat	KBNS87	0,45 <sup>cde</sup>	Summit	KBNS93	1,50 <sup>cde</sup>	Burlat	KBNS87	2,57 <sup>fg</sup>
Burlat	KBNS93	0,46 <sup>de</sup>	Burlat	KBNS87	1,52 <sup>de</sup>	Germerzdorfska	KBNS87	2,58 <sup>fg</sup>
Summit	KBNS93	0,47 <sup>e</sup>	Burlat	KBNS74	1,53 <sup>e</sup>	Summit	KBNS87	2,72 <sup>g</sup>
Burlat	KBNS79	0,47 <sup>e</sup>	Burlat	KBNS79	1,54 <sup>e</sup>	Summit	KBNS93	2,74 <sup>g</sup>

$p < 0,05$

U januaru 2015. godine prilikom prve ocene (10.3.2015.) dužina nekroze oko zarezata bila je 0,35 – 0,51 cm (Tab. 17). Tokom druge ocene zabeleženo je ujednačeno širenje nekroze oko mesta zarezata. Pri trećoj oceni (20.4.2015.) takođe nije postojala bitnija razlika u dužini nekroze uzimajući u obzir razne sorte i izolate. Mada je u ovom ogledu i u ogledu iz januara 2014., na sortama Hedelfigenska i Germerzdorfska dužina nekroze bila manja (2,01 – 2,30 cm), u odnosu na prosečne dužine nekroze kod sorti Burlat i Summit (2,34 – 2,70 cm) u kombinaciji sa svim izolatima. Prema tome, statistički značajna razlika postoji između sorti



Hedelfigenska i Germerzdorfska (svi izolati), u odnosu na sortu Burlat (ova patovara) i Summit (pv. *syringae*) (Tab. 17).

Tabela 17. Prosečna dužina nekroze (cm) veštački inokuliranih reznica (dvogodišnje grančice) trešnje tokom januara 2015. godine Botanička bašta, Poljoprivredni fakultet Novi

Sad

Januar 2015 god.								
Sorta	Izolati	Ocena I 10.3.	Sorta	Izolati	Ocena II 31.3.	Sorta	Izolati	Ocena III 30.4.
Germerzdorfska	K-	0 <sup>a</sup>	Germerzdorfska	K-	0 <sup>a</sup>	Germerzdorfska	K-	0 <sup>a</sup>
Summit	K-	0 <sup>a</sup>	Summit	K-	0 <sup>a</sup>	Summit	K-	0 <sup>a</sup>
Hedelfigenska	K-	0 <sup>a</sup>	Hedelfigenska	K-	0 <sup>a</sup>	Hedelfigenska	K-	0 <sup>a</sup>
Burlat	K-	0 <sup>a</sup>	Burlat	K-	0 <sup>a</sup>	Burlat	K-	0 <sup>a</sup>
Hedelfigenska	KBNS93	0,35 <sup>b</sup>	Hedelfigenska	KBNS93	1,27 <sup>b</sup>	Hedelfigenska	KBNS93	2,01 <sup>b</sup>
Germerzdorfska	KBNS93	0,36 <sup>b</sup>	Germerzdorfska	KBNS74	1,27 <sup>b</sup>	Germerzdorfska	KBNS79	2,11 <sup>bc</sup>
Germerzdorfska	KBNS74	0,37 <sup>bc</sup>	Hedelfigenska	KBNS87	1,30 <sup>bc</sup>	Germerzdorfska	KBNS93	2,11 <sup>bc</sup>
Germerzdorfska	KBNS87	0,39 <sup>bcd</sup>	Hedelfigenska	KBNS79	1,30 <sup>bc</sup>	Germerzdorfska	KBNS74	2,15 <sup>bcd</sup>
Germerzdorfska	KBNS79	0,40 <sup>bcd</sup>	Hedelfigenska	KBNS74	1,31 <sup>bc</sup>	Germerzdorfska	KBNS87	2,20 <sup>bcd</sup>
Hedelfigenska	KBNS79	0,42 <sup>cdef</sup>	Germerzdorfska	KBNS79	1,33 <sup>bcd</sup>	Hedelfigenska	KBNS79	2,20 <sup>bcd</sup>
Hedelfigenska	KBNS74	0,42 <sup>cdef</sup>	Germerzdorfska	KBNS87	1,34 <sup>bcd</sup>	Hedelfigenska	KBNS87	2,25 <sup>cde</sup>
Hedelfigenska	KBNS87	0,43 <sup>defgh</sup>	Germerzdorfska	KBNS93	1,37 <sup>bcd</sup>	Hedelfigenska	KBNS74	2,30 <sup>cde</sup>
Burlat	KBNS87	0,44 <sup>efghi</sup>	Burlat	KBNS87	1,42 <sup>cdef</sup>	Summit	KBNS74	2,34 <sup>de</sup>
Burlat	KBNS79	0,46 <sup>ghij</sup>	Summit	KBNS74	1,42 <sup>cdef</sup>	Summit	KBNS79	2,40 <sup>ef</sup>
Summit	KBNS87	0,47 <sup>ghij</sup>	Burlat	KBNS74	1,46 <sup>defg</sup>	Burlat	KBNS79	2,60 <sup>g</sup>
Summit	KBNS74	0,47 <sup>ghij</sup>	Burlat	KBNS79	1,48 <sup>efg</sup>	Burlat	KBNS93	2,61 <sup>g</sup>
Summit	KBNS79	0,48 <sup>hij</sup>	Summit	KBNS93	1,50 <sup>fg</sup>	Burlat	KBNS74	2,65 <sup>g</sup>
Burlat	KBNS74	0,49 <sup>ij</sup>	Burlat	KBNS79	1,53 <sup>fg</sup>	Summit	KBNS87	2,67 <sup>g</sup>
Summit	KBNS93	0,49 <sup>ij</sup>	Summit	KBNS87	1,55 <sup>g</sup>	Burlat	KBNS87	2,68 <sup>g</sup>
Burlat	KBNS93	0,51 <sup>j</sup>	Summit	KBNS93	1,56 <sup>g</sup>	Summit	KBNS93	2,70 <sup>g</sup>

$p < 0,05$

Na grančicama inokuliranim destilovanom vodom do kraja ogleđa rezultat je bio negativan.

**Reizolacija.** Po završetku ogleđa kod svih inokulacija uspešno su urađene reizolacije bakterija. Nakon 2 – 3 dana na podlozi NSA reizolovane su bakterije tipične za *P. syringae* pvs., odnosno bele, krupne, ispupčene, sluzaste prečnika oko 3 mm, levan pozitivne. Reizolati (Tab.18) na King B podlozi stvaraju fluorescentni pigment. Patogenost reizolata je dokazana na zelenim plodovima trešnje, višnje i ringlova.

Tabela 18. Reizolati bakterija (veštački inokulisane reznice trešnje 2013/2014 i 2014/2015)

Reizolat/Sorta sa koje je dobijen	Šifra reizolata	Šifra izolata
R TR SEL 3/3 Summit	I RG 1	KBNS74
RTR LIST 4 Summit	I RG 2	KBNS93
R TR SEL 4/2 Summit	I RG 3	KBNS79
R TR GR II Summit	I RG 4	KBNS87
R TR SEL 4/2 Germerzdorfska	II RG 1	KBNS79
R TR SEL 3/3 Germerzdorfska	II RG 2	KBNS74
R TR GR II Germerzdorfska	II RG 6	KBNS87
R TR GR II Summit	II RG 7	KBNS87
R TR LIST 4 Hedelfigenska	II RG 8	KBNS93
R TR LIST 4 Burlat	II RG 10	KBNS93
R TR GR II Burlat	III RG 1	KBNS87
R TR GR II Summit	III RG 2	KBNS87
R TR SEL 4/2 Summit	III RG 3	KBNS79
R TR SEL 3/3 Summit	III RG 4	KBNS74
R TR SEL 3/3 Burlat	III RG 5	KBNS74
R TR SEL 3/3 Germerzdorfska	III RG 6	KBNS74
R TR LIST 4 Germerzdorfska	III RG 7	KBNS93
R TR LIST 4 Summit	III RG 8	KBNS93
R TR LIST 4 Burlat	III RG 9	KBNS93



Slika 24. Inokulacija reznica trešnje (period mirovanja 2013/2014): početak širenja nekroze oko zarezaja koju prati promena boje kore (a), eliptično širenje nekroze oko zarezaja, praćeno uleganjem kore i pojavom smole (b), širenje nekroze u unutrašnjim tkivima, sušenje pupojaka i grančice (c) (Orig.)

## 6. 2. 4. MOLEKULARNA IDENTIFIKACIJA I KARAKTERIZACIJA IZOLATA *Pseudomonas syringae* pvs.

### 6. 2. 4. 1. MOLEKULARNA IDENTIFIKACIJA IZOLATA

Molekularna identifikacija izolata, odnosno proučavanje filogenetskih osobina podrazumeva upotrebu analiza kao što su 16S ribozomalna RNA i MLST (Multilocus Sequence Typing – house keeping genes). Navedene metode su vrlo precizne i mogu registrovati promene koje nastaju na nivou nukleotida.

Kako bi se analizirala genetska varijabilnost i ispitala filogenija izolata urađena je MLST metoda za ukupno 24 izolata dobijena 2012. analizom 4 gena *gyrB*, *rpoD*, *gapA* and *gltA*. Za uporedna ispitivanja korišćen je soj H – 1 (*P. s. pv. syringae*) (Süle i Seemüller, 1987) i izolati poreklom sa višnje (V – 85, V – 88) i trešnje V – 109. Izolati V – 85, V – 88 i V – 109 su tokom ranijih ispitivanja bili identifikovani kao intermedijarne forme (na osnovu fenotipskih karakteristika i patogenosti) (Balaž i Arsenijević, 1989).

#### 6. 2. 4. 1. 1. MLST (Multilocus Sequence Typing)

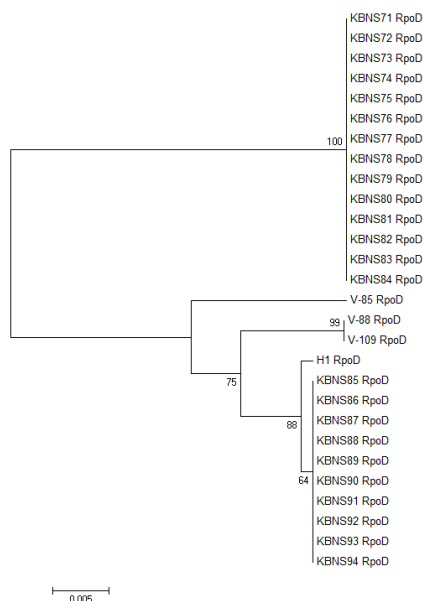
Dendrogram dobijen na bazi *gyrB* sekvence house keeping gena pokazao je dva odvojena klastera (Grafik 1). U prvom klasteru izdvojili su se izolati KBNS71 – 84 (Selenča) identifikovani kao *P. s. pv. morsprunorum*. U drugi klaster svrstani su izolati *P. s. pv. syringae* KBNS85 – 94 (Gornji Tavankut), zajedno sa izolatom *P. s. pv. syringae* V– 85 poreklom sa višnje, prisutan u različitom subklasteru. Izolati V – 88 i V – 109 poreklom sa višnje i trešnje izdvojili su se u poseban klaster. Referentni izolat H – 1 nije se grupisao ni u jedan od klastera.

Grafik 1. Dendrogram dobijen na bazi *gyrB* sekvence house keeping gena kod izolata *P.syringae* korišćen u MLST analizi



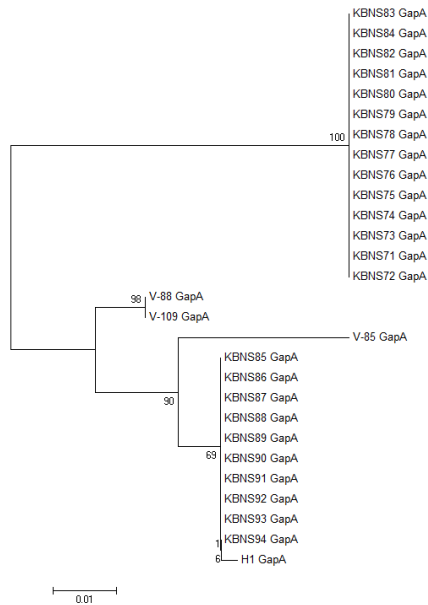
Primenom *rpoD* sekvence house keeping gena, dobijena su dva klastera, jedan klaster čini 14 izolata KBNS71 – 84 (Selenča) identifikovani kao *P. s. pv. morsprunorum*. Drugi klaster čine izolati poreklom iz Gornjeg Tavankuta (KBNS85 – 94) identifikovani kao *P. s. pv. syringae* zajedno sa referentnim izolatom H – 1 poreklom sa višnje. U istom klasteru ali u različitom subklasteru bili su izolati korišćeni za poređenja V – 88 i V – 109 (*P. syringae* pv. *syringae*) poreklom sa višnje i trešnje, a *P. s. pv. syringae* V – 85 poreklom sa višnje iz istog klastera je bio izdvojen (Grafik 2).

Grafik 2. Dendrogram dobijen na bazi *rpoD* sekvence house keeping gena kod izolata *P.syringae* korišćen u MLST analizi



Dendrogram dobijen na bazi *gapA* sekvence kod izolata *P.syringae* je bio sličan kao i u slučaju house keeping gena *rpoD* (Grafik 3).

Grafik 3. Dendrogram dobijen na bazi *gapA* sekvence house keeping gena kod izolata *P.syringae* korišćen u MLST analizi



Dendrogramom konstruisanim na bazi *gltA* sekvence gena, dobijena su dva različita klastera (Grafik 4.). Prvi klaster čine izolati *P. s. pv. morsprunorum* (KBNS71 – 84) i referentni izolat *P. s. pv. syringae* H – 1. Drugi klaster podeljen je na dva subklastera u okviru jednog su izolati *P. s. pv. syringae* (KBNS85 – 94), dok su u drugom subklasteru izolati *P. s. pv. syringae* V – 85 i V – 88 poreklom sa višnje i izolat V – 109 poreklom sa trešnje.

Grafik 4. Dendrogram konstruisan na bazi *gltA* sekvence gena kod izolata *P.syringae*



Za ispitivane gene napravljen je zajednički združeni dendrogram pri čemu ispitivani izolati sa trešnje formiraju dva klastera (Grafik 5.). Izolati (KBNS71 – 84) identifikovani kao vrsta *P. s. pv. morsprunorum* čine jedan klaster, a izolati *P. s. pv. syringae* (KBNS85 – 94) drugi klaster. Izolati korišćeni za upoređivanje *P. s. pv. syringae* V – 85 i V – 88 poreklom sa višnje i izolat V – 109 poreklom sa trešnje izdvojeni su posebno iz dva navedena klastera. Referentni izolat H – 1 nije bio ni u jednom od klastera.

Grafik 5. Združeni dendrogram dobijen za house keeping gene *gyrB*, *rpoD*, *gapA* i *gltA* za izolate *P. syringae* korišćene u MLST analizi



#### 6. 2. 4. 1. 2. Detekcija gena za sintezu i sekreciju siringomicina metodom m – PCR (multiplex PCR)

Važna odlika izolata *P. s. pv. syringae* je stvaranje toksina siringomicina. Za detekciju gena za sintezu siringomicina (*syrB*) kao i gena odgovornog za sekreciju siringomicina (*syrD*), kod vrste *P. s. pv. syringae* koriste se specifični setovi prajmera koji amplifikuju fragmente veličine 752bp za *syrB* i 1040bp za *syrD*.

U prvom koraku izvršena je detekcija *syrB* gena parom prajmera B1 i B2, pri čemu je fragment od 752 bp detektovan kod izolata KBNS85, KBNS86, KBNS87, KBNS88, KBNS89, KBNS90, KBNS91, KBNS92, KBNS93 i KBNS 94 (Gornji Tavankut). *syrB* gen detektovan je i u slučaju referentnog izolata *P. s. pv. syringae* CFBP1582, kao i V – 85, V – 88 i V – 109, čime je potvrđena njihova pripadnost *P. s. pv. syringae*. Kod izolata KBNS71,

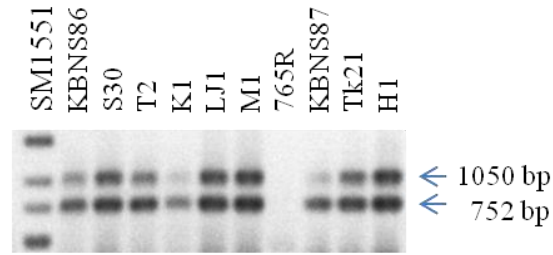
KBNS72, KBNS73, KBNS74, KBNS75, KBNS76, KBNS77, KBNS78, KBNS79, KBNS80, KBNS81, KBNS82, KBNS83 i KBNS84 (Selenča) kao i referentnog izolata *P. s. pv. morsprunorum* CFBP2119 *syrB* gen nije detektovan.

Radi uštede hemikalija i skraćivanja postupka detekcije, za ova istraživanja je dizajniran m – PCR na osnovu gore navedenih metoda, kako bi se simultano detektovalo prisustvo oba ili svakog od navedenih gena.

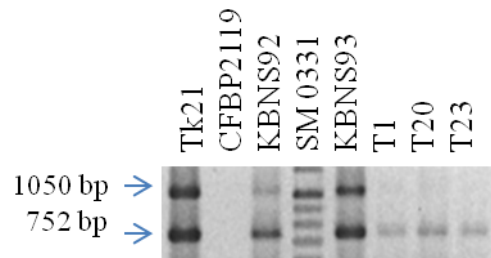
Detekcija gena *syrB* i *syrD* utvrđena je kod ukupno 79 izolata (I grupa) od 155 ispitivanih izolata (Tab.19.). Fragmenti veličine 752bp za *syrB* i 1070bp za *syrD* detektovani su kod 70 izolata, a samo *SyrB* je detektovan kod 9 izolata. Deo rezultata prikazan je na slici 25. i 26.

Tabela 19. Rezultati m – PCR i *cfl* – PCR

Izolati	m-PCR ( <i>SyrB/SyrD</i> )	<i>cfl</i> - PCR	Procenat zastupljenosti izolata
KBNS71, KBNS72, KBNS73, KBNS74, KBNS75, KBNS76, KBNS77, KBNS78, KBNS79, KBNS80, KBNS81, KBNS82, KBNS83, KBNS84, S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7, S8, S9, S10, S11, S12, S13, S14, S15, S16, S17, S18, S19, S20, S21, S22, S23, S24, S25, S26, S27, S28, S29, S34, S35, S36, S37, S38, S39, S41, S42, S43, S44, S45, S46, S47, S48, S49, S50, S51, S52, S53, M4, M5, M6, M7, M8, M9, M10, M25, M26, M27, M28, M29, S40, EPLM1	-/-	+	49,03%
KBNS85, KBNS86, KBNS87, KBNS88, KBNS89, KBNS90, KBNS91, KBNS92, KBNS93, KBNS94, S30, S31, S32, S33, T2, T3, T4, T5, T6, T7, T8, T9, T10, T11, T12, T13, T14, T15, T16, T17, T18, T19, T21, T22, K1, K2, K3, K4, K5, K6, K7, K8, LJ1, LJ2, LJ3, LJ9, LJ10, LJ11, LJ12, LJ13, M1, M2, M3, M12, M13, M14, M15, M16, M17, M18, M11, M19, LJ6, LJ7, LJ8, T30, EPLS1, EPLGT1, EPLLJ1, EPLLJ2	+/+	-	45,6%
T20, T1, T23, T24, T25, T26, T27, T28, T29	+/-	-	5,8%



Slika 25. Detekcija gena *syrB* i *syrD* kod izolata *P. syringae* sa trešnje.  
Kontrolni sojevi: 765R – *P. s. pv. lachrymans*; Tk21– *P. s. pv. syringae*; H – 1 *P. s. pv. syringae*; Marker SM1551 – GeneRuler ExpressDNA Ladder Thermo Scientific, Lithuania.



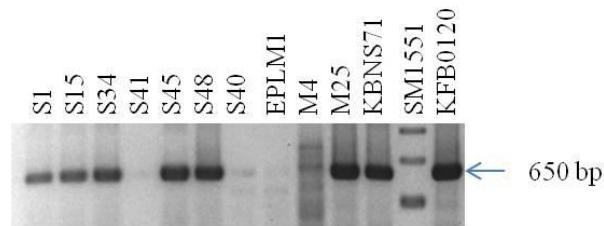
Slika 26. Detekcija gena *syrB* i *syrD* kod izolata *P. syringae* sa trešnje  
Kontrolni sojevi: Tk21– *P. s. pv. syringae*; , CFBP2119 – *P. s. pv. morsprunorum*; Marker SM0331– GeneRuler DNA Ladder Mix, Thermo Scientific, Lithuania.

#### 6. 2. 4. 1. 3. Detekcija gena za produkciju koronatina (*cfl*)

Izolati bakterije *P. s. pv. morsprunorum* rasa 1 ne stvaraju siringomicin, nego produkuju toksin koronatin. Za detekciju gena odgovornog za sintezu koronatina (*cfl*) kod vrste *P. s. pv. morsprunorum* rasa 1, koristi se set prajmera Primer1/Primer2 koji amplifikuju fragmente veličine 650bp.

U ovim istraživanjima korišćena je metoda po Bereswill i sar. (1994) za detekciju gena produkcije koronatina. Fragment veličine 650bp (Slika 27.) koji odgovara *cfl* genu amplifikovan je kod 76 ispitivanih izolata (II grupa) (Tab.19.).





Slika 27. Detekcija *cfl* gena kod izolata *P. syringae* sa trešnje. Kontrolni soj: KFB0120 – *P. s. pv. morsprunorum* rasa 1 (*cfl* +). Marker SM1551 – GeneRuler ExpressDNA Ladder Thermo Scientific, Lithuania.

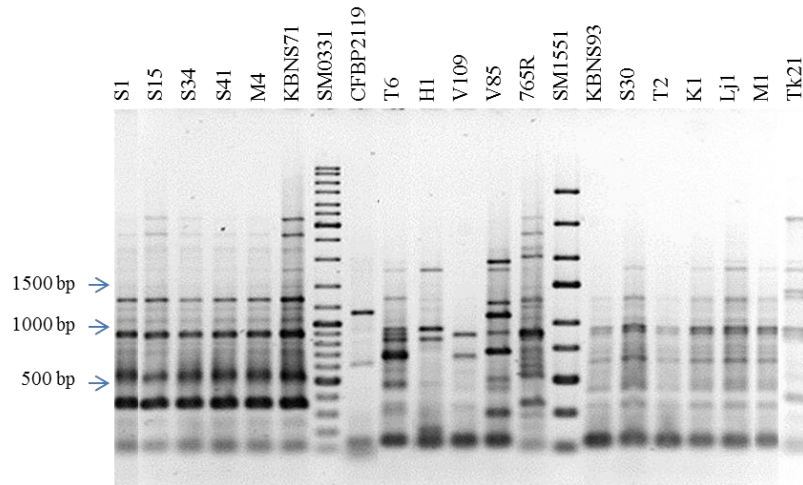
#### 6. 2. 4. 2. MOLEKULARNA KARAKTERIZACIJA IZOLATA

Za molekularnu karakterizaciju izolata *syringae* i *morsprunorum* odabrane su rep – PCR i RAPD metode koje daju dobru rezoluciju u razdvajanju izolata između različitih vrsta i u okviru iste vrste.

##### 6. 2. 4. 2. 1. rep – PCR

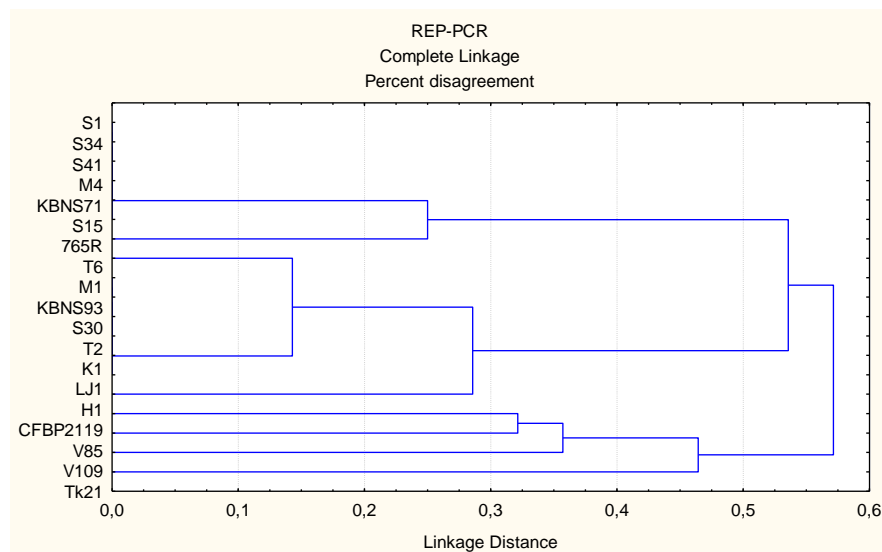
Za analizu sličnosti među izolatima *syringae* i *morsprunorum* rasa 1 upotrebljena je rep – PCR metoda korišćenjem REP, ERIC i BOX prajmera [BOXA 1R i (GTG)<sub>5</sub>]. Ovi prajmeri su primenjeni na reprezentativnim izolatima selektovanim na osnovu rezultata m – PCR (*syrB* i *syrD*) i prisustva *cfl* gena u genomu.

REP – PCR čine dva klastera koji se razlikuju 57% (Sl. 28, Grafik 6.). Prvi klaster čine dva subklastera. U prvom je samo soj Tk21 (pv. *syringae*) poreklom sa uljane tikve, a drugi čine dve grane: u prvoj je soj V – 109 (pv. *syringae*), a u drugoj sojevi V – 85 (pv. *syringae*) i CFBP2119 (pv. *morsprunorum* rasa 1). Drugi klaster ima dva subklastera koji se međusobno razlikuju 53%. Prvi subklaster čine dve grane: u prvoj je samo soj H – 1 (pv. *syringae*), a u drugoj izolati Lj1, K1, T2, S30, KBNS93, M1 (pv. *syringae*) i soj T6 (pv. *syringae*) i grane se međusobno razlikuju 28%. Soj T6 se razlikuje od ostalih izolata iste grane oko 15%. Drugi subklaster čine dve grane: u prvoj je soj 765R (pv. *lachrymans*), a u drugoj međusobno isti izolati S15, KBNS71, M4, S41, S34, S1 (pv. *morsprunorum* rasa 1).



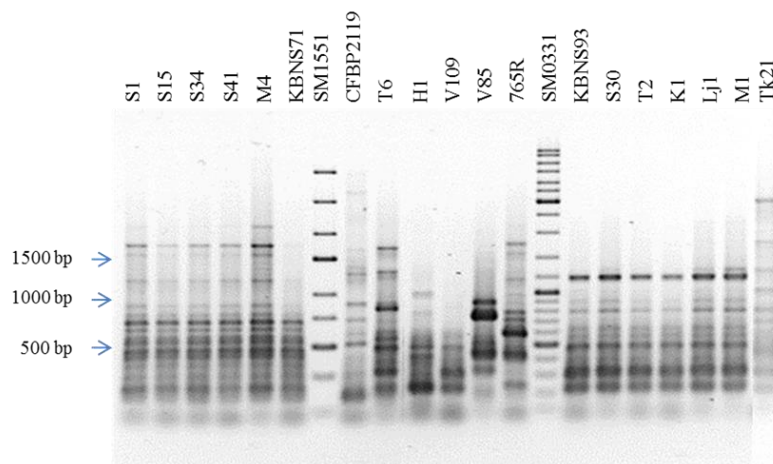
Slika 28. REP – PCR za izolate *P. syringae* sa trešnje. Kontrolni sojevi: CFBP2119 – *P. s. pv. morsprunorum* rasa 1; T6, H – 1, V – 109 i V – 85 (*P. s. pv. syringae*); 765R – *P. s. pv. lachrymans*; Tk21 – *P. s. pv. syringae*; Markeri SM0331– GeneRuler DNA Ladder Mix i SM1551- GeneRuler ExpressDNA Ladder, Thermo Scientific, Lithuania

Grafik 6. Dendrogram konstruisan na bazi REP – PCR za izolate *P. syringae*



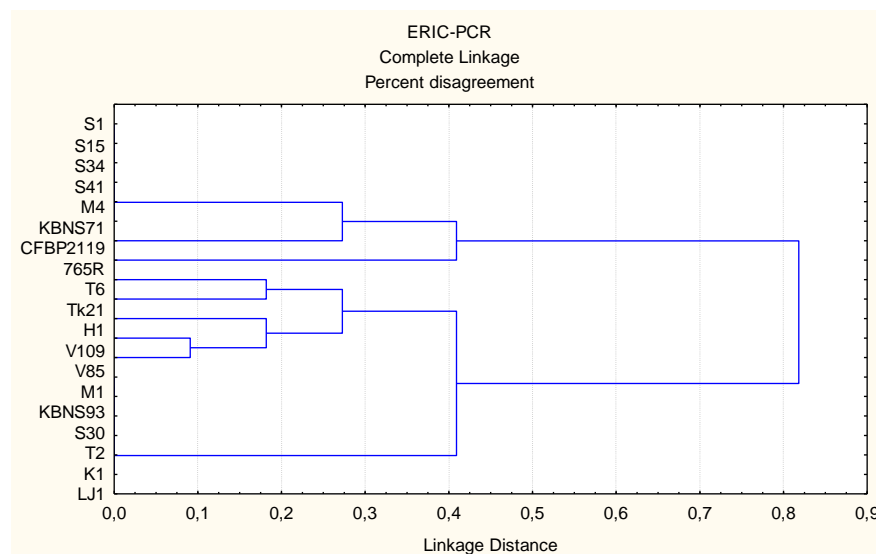
Dendrogram dobijen na bazi ERIC – PCR, čine dva klastera koji se razlikuju 82,5% (Sl. 29, Grafik 7.). Prvi klaster čine dva subklastera. U prvom subklasteru su izolati Lj1, K1, T2, S30, KBNS93, M1 (*pv. syringae*) koji su međusobno identični. Drugi subklaster čine dve grane – u prvoj su sojevi V – 85, V – 109 i H – 1 (*pv. syringae*), a u drugoj sojevi Tk21 i T6 (*pv. syringae*). Razlike između ova dva subklastera su 41%. Drugi klaster takođe čine dva subklastera koji se razlikuju 41%. U prvom je soj 765R (*pv. lachrymans*), a drugi subklaster

čine dve grane: u prvoj je soj CFBP2119, a u drugoj izolati pv. *morsprunorum* rasa 1 KBNS71, M4, S41, S34, S15, S1, koji se razlikuju 27,5% u odnosu na soj CFBP2119.



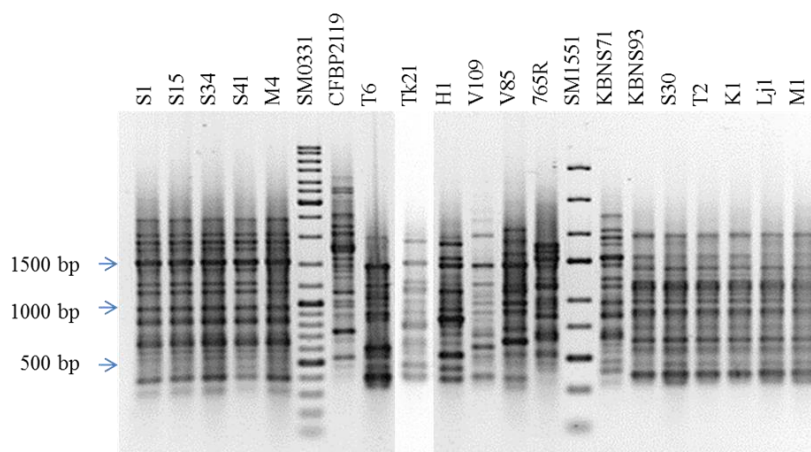
Slika 29. ERIC – PCR za izolate *P. syringae* sa trešnje. Kontrolni sojevi: CFBP2119 – *P. s. pv. morsprunorum* rasa 1; T6, H – 1, V – 109 i V – 85 (*P. s. pv. syringae*); 765R – *P. s. pv. lachrymans*; Tk21 – *P. s. pv. syringae*; Markeri SM1551 – GeneRuler ExpressDNA Ladder i SM0331 – GeneRuler DNA Ladder Mix, Thermo Scientific, Lithuania

Grafik 7. Dendrogram konstruisan na bazi ERIC – PCR za izolate *P. syringae*



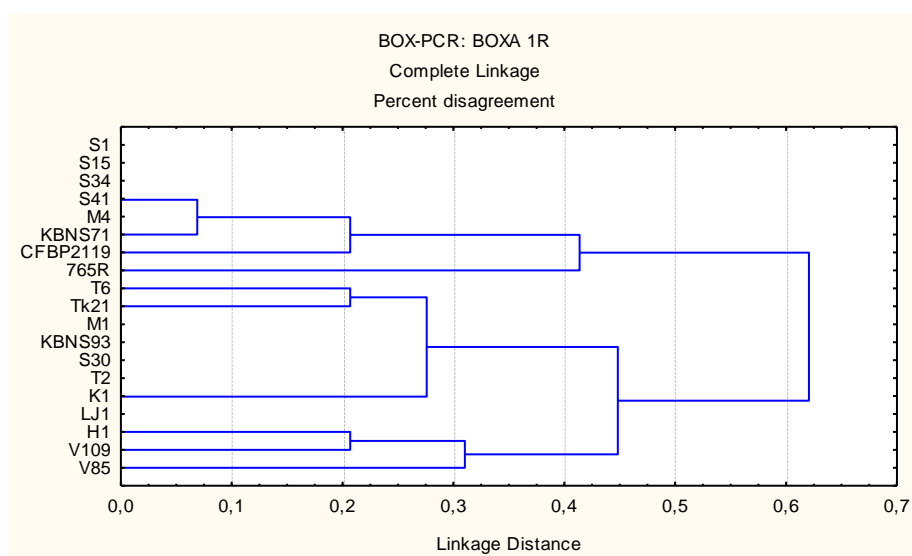
Na bazi rezultata BOX – PCR: BOXA 1R prajmera (Sl. 30) dobijen je dendrogram koga čine 2 klastera međusobno različita 62% (Grafik 8.). Prvi klaster čine 2 subklastera (razlika 45%). U prvom subklasteru su dve grane: u prvoj grani je samo soj V – 85, a u drugoj su sojevi V – 109 i H – 1 (pv. *syringae*). Drugi subklaster čine dve grane koje su međusobno različite 27%: u prvoj su izolati Lj1, K1, T2, S30, KBNS93, M1, a u drugoj sojevi T6 i Tk21 (pv. *syringae*). U okviru drugog klastera takođe postoje 2 subklastera, koji se međusobno

razlikuju 41%. U prvom je samo soj 765R (pv. *lachrymans*), a drugi čine dve grane: u prvoj grani je soj CFBP2119, a u drugoj izolati KBNS71, M4, S41, S34, S15, S1. Razlika između soja CFBP2119 (pv. *morsprunorum* rasa 1) i izolata KBNS71, M4, S41, S34, S15, S1 je 21%.

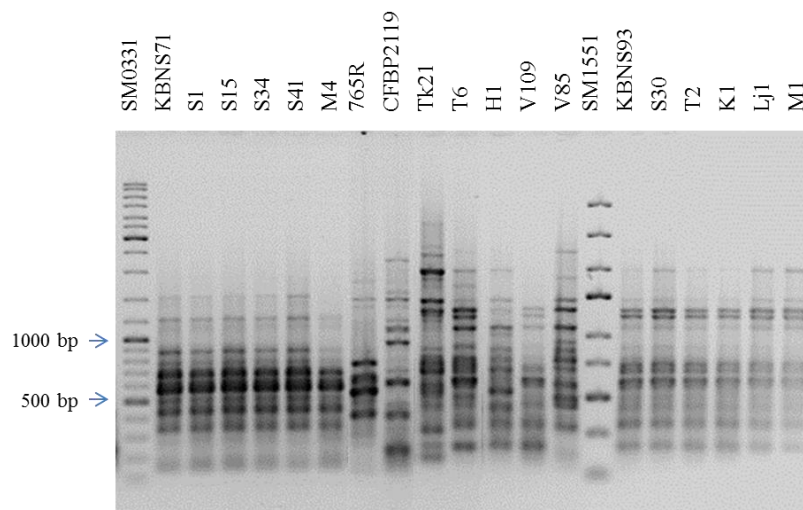


Slika 30. BOX – PCR: BOXA 1R za izolate *P. syringae* sa trešnje. Kontrolni sojevi: CFBP 2119 *P. s. pv. morsprunorum* rasa 1; T6, Tk21, H – 1, V – 109 i V – 85 (*P. s. pv. syringae*); 765R – *P. s. pv. lachrymans*; Markeri SM0331– GeneRuler DNA Ladder Mix i SM1551- GeneRuler ExpressDNA Ladder, Thermo Scientific, Lithuania

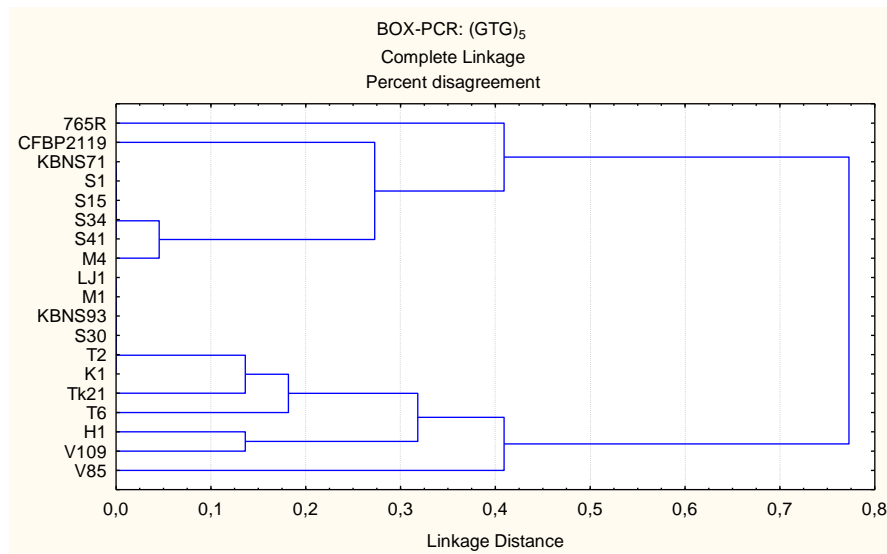
Grafik 8. Dendrogram konstruisan na bazi BOX – PCR: BOXA 1R za izolate *P. syringae*



Dendrogram dobijen na bazi BOX – PCR (GTG)<sub>5</sub> čine 2 klastera, između kojih je razlika od 77,5% (Sl. 31, Grafik 9.). Prvi klaster ima 2 subklastera (razlika 41%), a u prvom subklasteru je samo soj V – 85. Drugi subklaster čine 2 grane – u prvoj su sojevi H – 1 i V – 109, a u drugoj sojevi T6, Tk21 i izolati K1, S30, KBNS93, M1, Lj1 (pv. *syringae*). Sojevi T6 i Tk21 se od ispitivanih izolata istog patovara razlikuju 18%, odnosno 14%. Drugi klaster takođe ima dva subklastera. Prvi subklaster čine dve grane, u prvoj su izolati M4, S41, S34, S15, S1, KBNS71, posebnu granu ovog subklastera čini soj CFBP2119, a drugi subklaster čini soj 765R (pv. *lachrymans*), sa 41% različitosti. Razlika između CFBP2119 i izolata M4, S41, S34, S15, S1, KBNS71 je 27%.

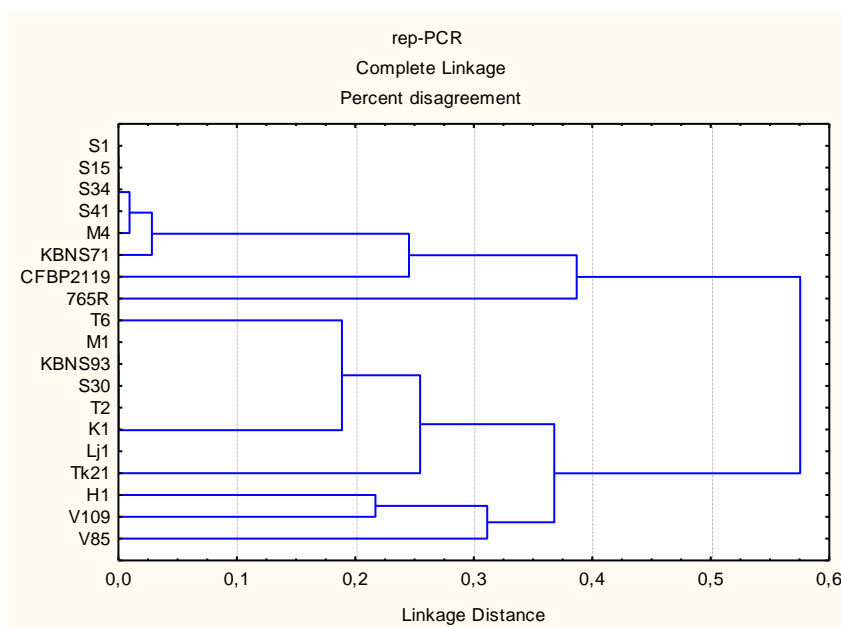


Slika 31. BOX – PCR: (GTG)<sub>5</sub> za izolate *P. syringae* sa trešnje. Kontrolni sojevi: 765R – *P. s. pv. lachrymans*; CFBP 2119 *P. s. pv. morsprunorum* rasa 1; Tk21, T6, H – 1, V – 109 i V – 85 (*P. s. pv. syringae*); Markeri SM0331– GeneRuler DNA Ladder Mix i SM1551 – GeneRuler ExpressDNA Ladder Thermo Scientific, Lithuania.

Grafik 9. Dendrogram konstruisan na bazi BOX – PCR: (GTG)<sub>5</sub> za izolate *P. syringae*

Na osnovu rezultata amplifikacije REP, ERIC, BOXA 1R i (GTG)<sub>5</sub> prajmera, zbirni rep – PCR dijagram čine 2 klastera koji se međusobno razlikuju 58% (Grafik 10.). Prvi klaster čine 2 subklastera između kojih je dobijena razlika od 37%. U okviru prvog subklastera prisutne su dve grane: u prvoj je samo soj V – 85, a u drugoj V – 109 i H – 1. Soj V – 85 se razlikuje 31% od ostalih sojeva i izolata u okviru ovog klastera. U drugom subklasteru kao posebna grana izdvaja se soj Tk21, a u drugoj su Lj1, K1, T2, S30, KBNS93, M1 i soj T6. Između soja T6 i ostalih izolata ove grane, koji su međusobno isti, utvrđena je razlika od 19%, a 25% od Tk21. Svi navedeni sojevi i izolati u okviru ovog subklastera pripadaju pv. *syringae*. Drugi klaster čine 2 subklastera. U okviru prvog izdvojio se samo soj 765R (pv. *lachrymans*) sa 39% različitosti od drugog subklastera koji ima dve grane: u prvoj je soj CFBP2119 sa razlikom od 24% od druge grane koju čine izolati KBNS71, M4, S41, S34, S15 i S1 (pv. *morsprunorum* rasa 1) (različiti 0 do 3%).

Grafik 10. Zbirni dendrogram rep – PCR konstruisan na bazi REP, BOXA 1R, ERIC i (GTG)<sub>5</sub> za izolate *P. syringae*

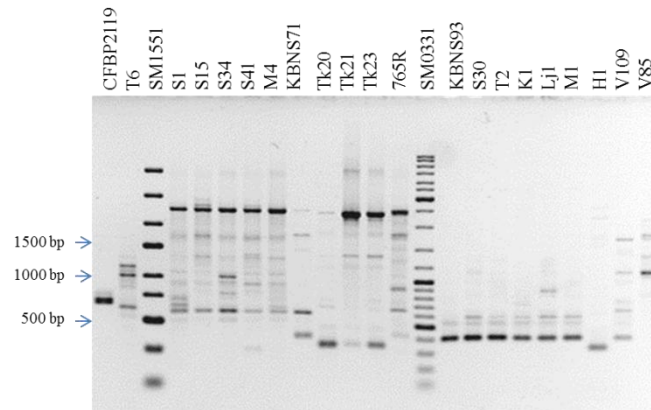


#### 6. 2. 4. 2. 2. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

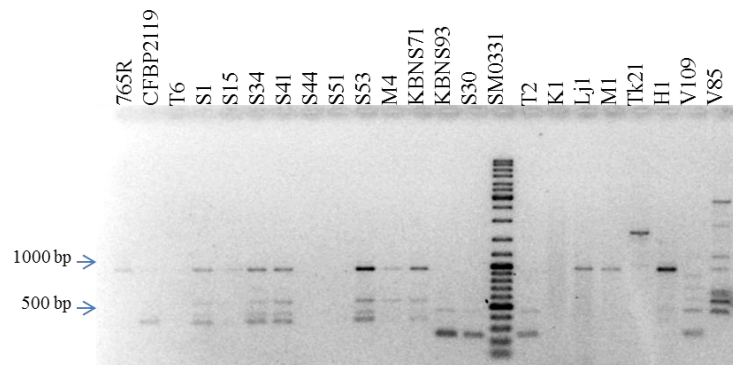
RAPD analiza je primenjena korišćenjem 11 prajmera: AF14, AX16, AG15, AK16, AP10, BC318, OPA10, SPH1, DJP17, DJ15 i DJ16.

Testiranje svih prajmera izvršeno je na probnom uzorku od 20 izolata (10 izolata *P. s. pv. syringae* i 10 izolata *P. s. pv. morsprunorum* rasa 1) identifikovanih na osnovu biohemijskih analiza i detekciji gena za sintezu i sekreciju siringomicina ili prisustva *cfl* gena.

Prajmeri sa veoma lošom rezolucijom (AF14, AX16, AG15, AK16 i OPA10) nisu dalje korišćeni u istraživanjima. Prajmeri AP10 i BC318 testirani su na uzorku od 40 izolata jer su amplifikovali različite profile za *P. s. pv. syringae* i *P. s. pv. morsprunorum* rasa 1 (Sl. 32, 33). Prajmer SPH1, a posebno novodizajnirani prajmeri za ispitivanje diverziteta autohtonih populacija različitih vrsta bakterija u Srbiji, pa i *P. syringae*, DJP17, DJ15 i DJ16, amplifikovali su profile visoke rezolucije i primenjeni su na većem broju izolata.



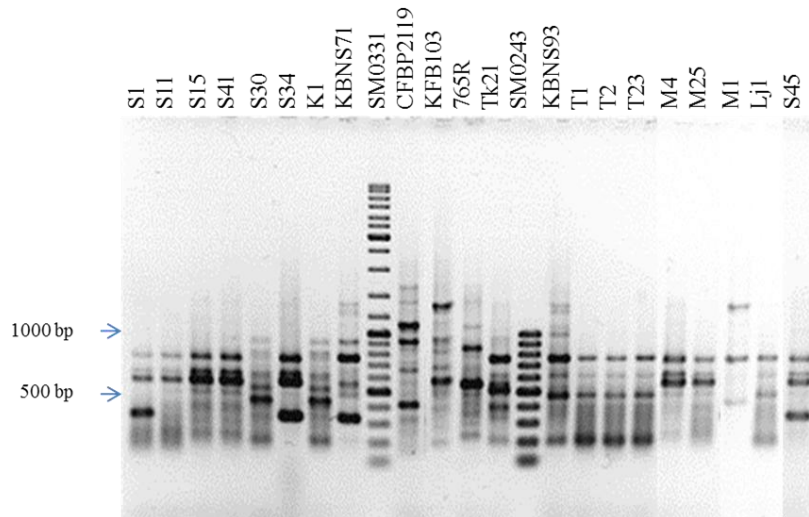
Slika 32. RAPD – Prajmer AP10. Kontrolni sojevi: CFBP 2119 – *P. s. pv. morsprunorum* rasa 1; T6, Tk20, Tk21, Tk23, H – 1, V – 109 i V – 85 – *P. s. pv. syringae*; 765R – *P. s. pv. lachrymans*; Markeri SM1551– GeneRuler ExpressDNA Ladder i SM0331– GeneRuler DNA Ladder Mix Thermo Scientific, Lithuania



Slika 33. RAPD – Prajmer BC318. Kontrolni sojevi: 765R – *P. s. pv. lachrymans*; CFBP 2119 – *P. s. pv. morsprunorum* rasa 1; T6, Tk21, H – 1, V – 109 i V – 85 – *P. s. pv. syringae*; Marker SM0331– GeneRuler DNA Ladder Mix, Thermo Scientific, Lithuania

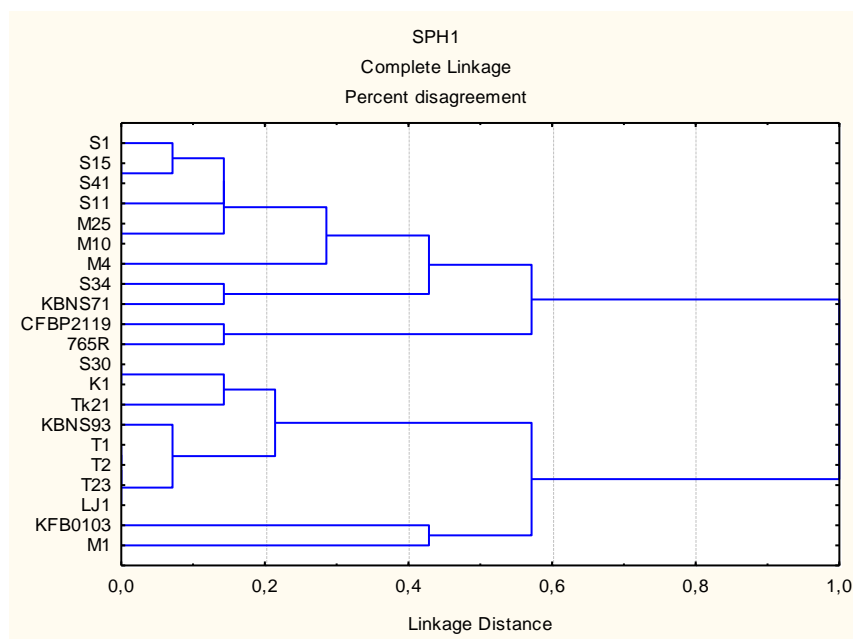
Dendrogram dobijen na bazi rezultata amplifikacije SPH1 prajmerom čine dva klastera koji se međusobno razlikuju 100% (Sl. 34, Grafik 11.). Prvi klaster čine dva subklastera koji se razlikuju 58%. U prvom subklasteru su dve grane: u prvoj je samo izolat M1 (pv. *syringae*), a u drugoj soj KFB0103 (koji se razlikuju 43%). Drugi subklaster čine dve grane: u prvoj grani su izolati Lj1, T23, T2, T1, KBNS93 (pv. *syringae*), a u drugoj soj Tk21 sa uljane tikve i izolati K1 i S30 (pv. *syringae*); izolati ovih grana se razlikuju 21%. Drugi klaster čine dva subklastera. Prvi čine dve grane: u prvoj je soj 765R, a u drugoj soj CFBP2119. Drugi subklaster čine dve grane između kojih je utvrđena razlika od 43% (pv. *morsprunorum* rasa 1): u prvoj su izolati KBNS71 i S34, a u drugoj M4, M10, M25, S11, S41, S15 i S1.





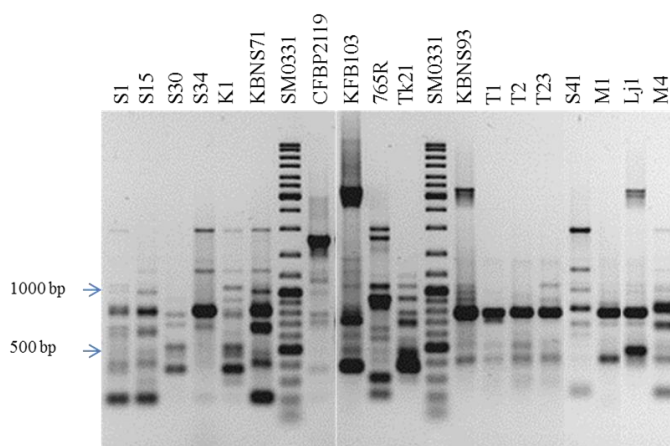
Slika 34. RAPD – Prajmer SPH1. Kontrolni sojevi: CFBP 2119 – *P. s. pv. morsprunorum* rasa 1; KFB0103 – *P. s. pv. syringae*; 765R – *P. s. pv. lachrymans*; Tk21 – *P. s. pv. syringae*; Markeri SM0331– GeneRuler DNA Ladder Mix i SM0243 – GeneRuler 100bp DNA Ladder, Thermo Scientific, Lithuania.

Grafik 11. Dendrogram konstruisan na bazi RAPD – PCR: SPH1 za izolate *P. syringae*

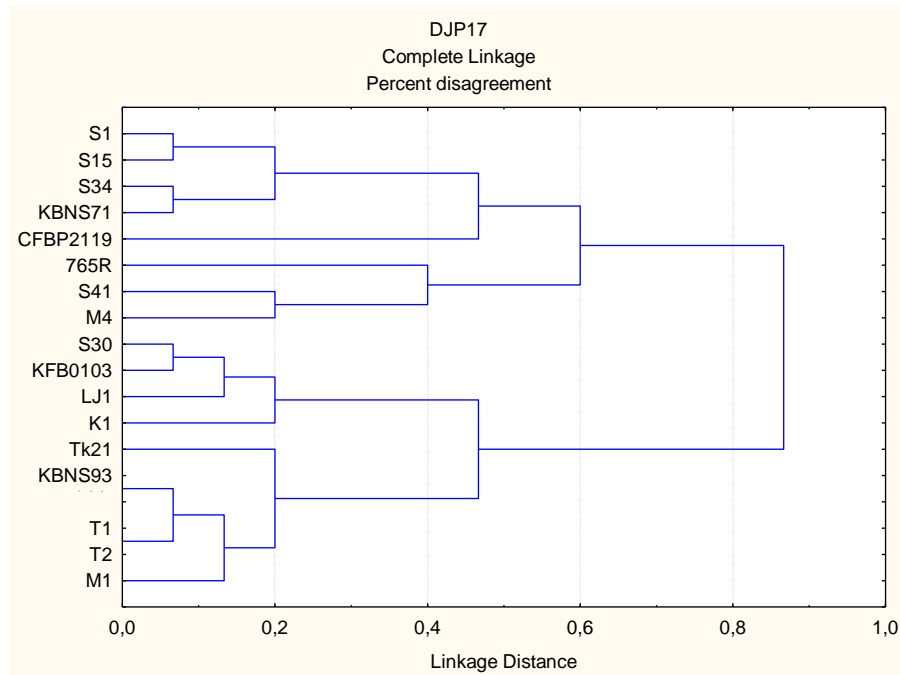


Dendrogram dobijen na bazi rezultata amplifikacije primenom DJP17 prajmera čine dva klastera, međusobno različita 87% (Sl. 35, Grafik 12.). Prvi klaster čine dva subklastera različita 47%, a svi sojevi i izolati pripadaju *pv. syringae*. Prvi subklaster čine dve grane: u

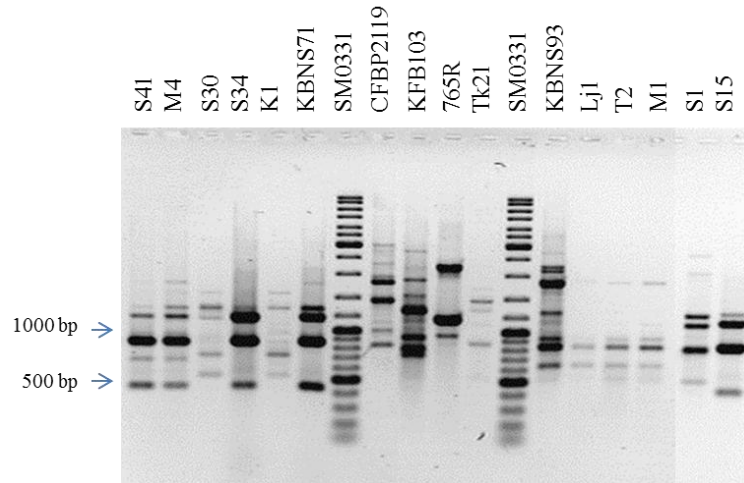
prvoj su izolati M1, T2, T1, T23, KBNS93, a u drugoj soj Tk21. Drugi subklaster takođe čine dve grane (pv. *syringae*): u prvoj je izolat K1, a u drugoj Lj1, KFB0103 i S30. Kod oba subklastera razlike među granama iznose 20%. Drugi klaster čine dva subklastera (različiti 60%). Prvi subklaster čine dve grane: u prvoj su izolati M4 i S41 (pv. *morsprunorum* rasa 1), a u drugoj soj 765R (pv. *lachrymans*), 40% različit. Drugi subklaster takođe čine dve grane koje se razlikuju 47%: u prvoj je soj CFBP2119, a u drugoj izolati KBNS71, S34, S15, S1 (pv. *morsprunorum* rasa 1) između kojih postoje određene razlike (5 – 20%).



Slika 35. RAPD – Prajmer DJP17. Kontrolni sojevi: CFBP 2119 – *P. s. pv. morsprunorum* rasa 1; KFB0103 – *P. s. pv. syringae*; 765R – *P. s. pv. lachrymans*; Tk21 – *P. s. pv. syringae*; Marker SM0331– GeneRuler DNA Ladder Mix, Thermo Scientific, Lithuania.

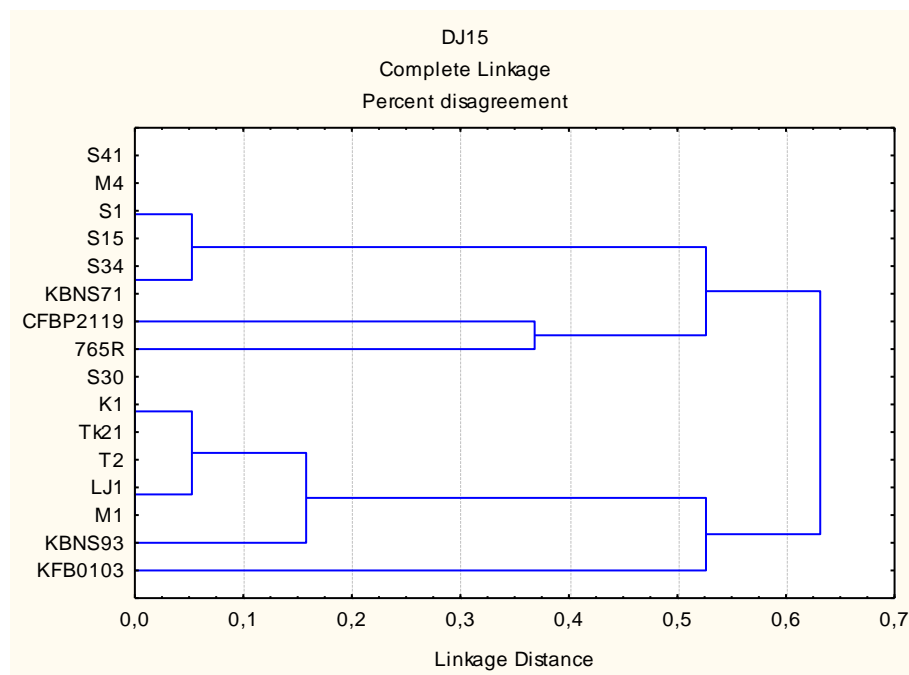
Grafik 12. Dendrogram konstruisan na bazi RAPD – PCR: DJP17 za izolate *P. syringae*

Dendrogram konstruisan na bazi amplifikacije prajmerom DJ15 čine dva klastera koji se međusobno razlikuju 63% (Sl. 36, Grafik 13.). Prvi čine dva subklastera koji obuhvataju sojeve i izolate *pv. syringae* (različita 52%). U prvom subklasteru je samo soj KFB0103, a drugi čine dve grane: u prvoj je izolat KBNS93, a u drugoj izolati M1, LJ1, T2, Tk21, K1 i S30, koji se međusobno razlikuju do 5%. Drugi klaster čine dva subklastera (različiti 53%). Prvi subklaster čine dve grane: u prvoj je soj 765R (*pv. lachrymans*), a u drugoj CFBP2119. Drugi subklaster takođe čine dve grane (*pv. morsprunorum* rasa 1): u prvoj su izolati KBNS71 i S34, a u drugoj S15, S1, M4, S41 (različiti do 5%).



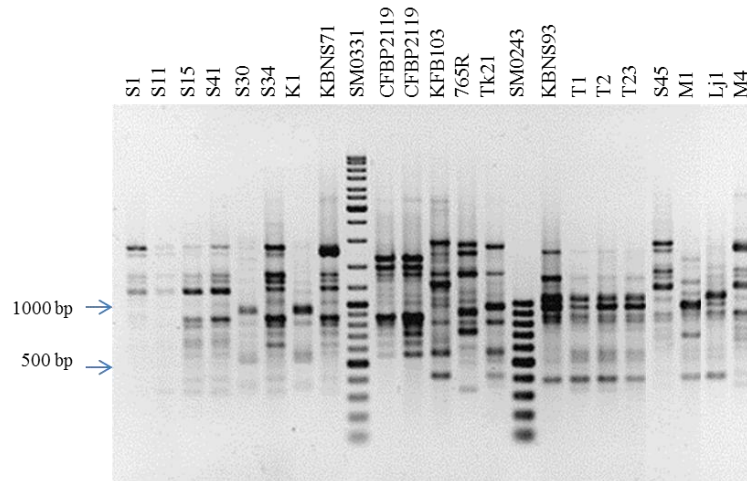
Slika 36. RAPD – Prajmer DJ15. Kontrolni sojevi: CFBP 2119 – *P. s. pv. morsprunorum* rasa 1; KFB0103 – *P. s. pv. syringae*; 765R – *P. s. pv. lachrymans*; Tk21 – *P. s. pv. syringae*; Marker SM0331 – GeneRuler DNA Ladder Mix Thermo Scientific, Lithuania.

Grafik 13. Dendrogram konstruisan na bazi RAPD – PCR: DJ15 za izolate *P. syringae*



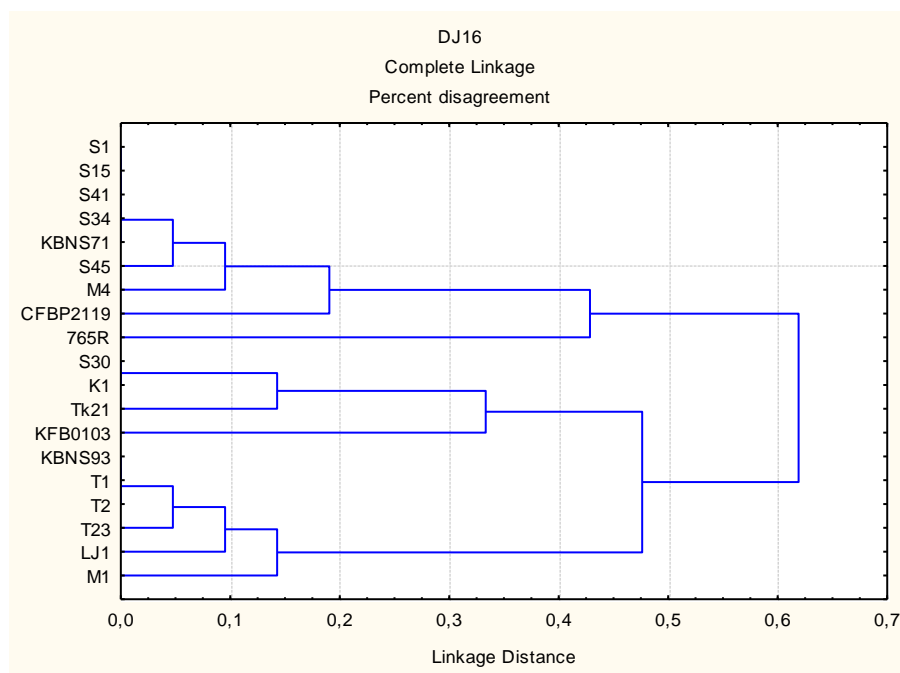
Dendrogram dobijen na bazi rezultata amplifikacije primenom prajmera DJ16 čine dva klastera (razlika 62%) (Sl. 37, Grafik 14.). Prvi klaster čine dva subklastera (47,5%). U prvom subklasteru postoje dve grane (pv. *syringae*): u prvoj je izolat M1, a u drugoj Lj1, T23, T2, T1 i KBNS93. U prvoj grani drugog subklastera je soj KFB0103 (razlika 33%), a u drugoj soj Tk21 i izolati K1, S30, koji se od Tk21 razlikuju oko 14%. Drugi klaster čine dva subklastera

(različiti 42,5%) – u prvom je soj 765R (pv. *lachrymans*), a drugi čine dve grane: sa 19% razlike izdvaja se soj CFBP2119 od izolata u drugoj grani M4, S45, KBNS71, S34, S41, S15, S1 (pv. *morsprunorum* rasa 1). Izolati druge grane se međusobno razlikuju do 10%.



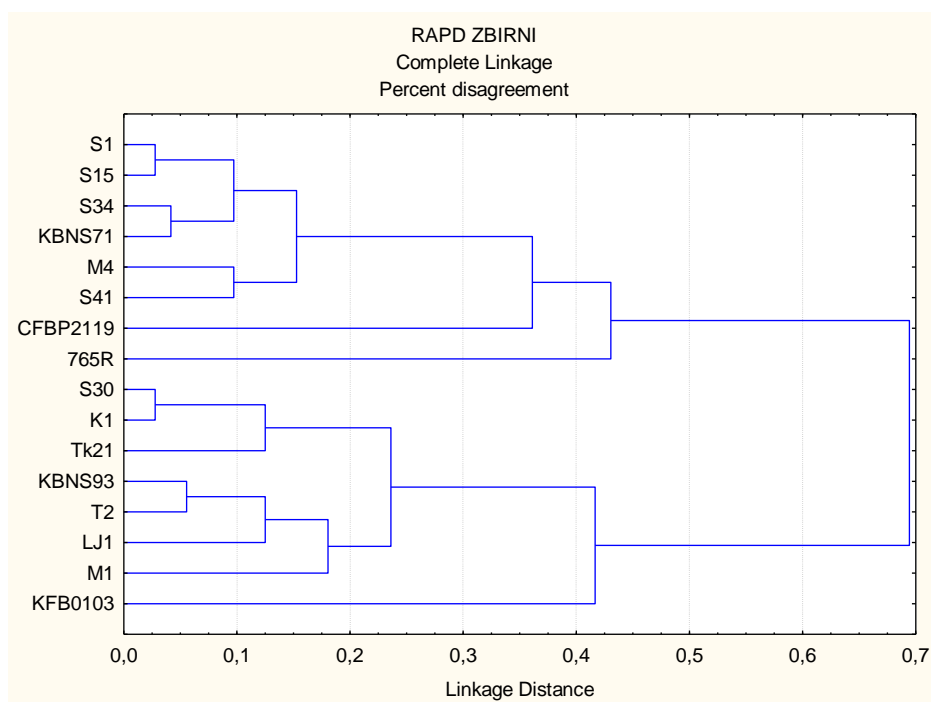
Slika 37. RAPD – Prajmer DJ16. Kontrolni sojevi: CFBP 2119 – *P. s.* pv. *morsprunorum* rasa 1; KFB0103 – *P. s.* pv. *syringae*; 765R – *P. s.* pv. *lachrymans*; Tk21 – *P. s.* pv. *syringae*; Markeri SM0331 – GeneRuler DNA Ladder Mix i SM0243 – GeneRuler 100bp DNA Ladder, Thermo Scientific, Lithuania.

Grafik 14. Dendrogram konstruisan na bazi RAPD – PCR: DJ16 za izolate *P. syringae*



Na bazi zbirnog dendrograma RAPD analize (SPH1, DJP17, DJ15, DJ16) dobijena su dva klastera između kojih je razlika 69% (Grafik 15). Prvi klaster čine dva subklastera različita 41% koji obuhvataju pripadnike pv. *syringae*. U prvom subklastru je soj KFB0103, a drugi čine dve grane sa 24% razlike (pv. *syringae*): u prvoj su izolati M1, LJ1, T2 i KBNS93, a u drugoj K1 i S30 kao i soj Tk21. Drugi klaster čine dva subklastera, različita 42,5% od kojih jedan sadrži samo soj 765R (pv. *lachrymans*). Drugi subklaster čine 2 grane sa međusobnom razlikom 36% (pv. *morsprunorum* rasa 1): u prvoj je soj CFBP2119, a u drugoj izolati S41, M4, KBNS71, S34, S15, S1. Između ovih izolata postoji razlika do 15%.

Grafik 15. Zbirni dendrogram konstruisan na bazi RAPD: SPH1, DJP17, DJ15 i DJ16 za izolate *P. syringae*



### 6. 3. ISPITIVANJE EPIDEMIOLOŠKIH KARAKTERISTIKA *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* i *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* rase 1 NA TREŠNJI

Ispitivanja epidemioloških karakteristika bakterija *P. s. pv. syringae* (KBNS87, KBNS93) i *P. s. pv. morsprunorum* rase 1 (KBNS74, KBNS79) u našim agroekološkim uslovima izvođena su u poljskim uslovima na Oglednim poljima Departmana za voćarstvo, vinogradarstvo, hortikulturu i pejzažnu arhitekturu – Rimski Šančevi, tokom 2013/2014. Ispitivanja su izvedena u dva ciklična ogleda.

U **prvom ogledu** koji je izveden na voćkama dvadeset godina starosti (sorte Burlat, Germerzdorfska, Drojanova žuta i Hedelfigenska) pozitivan rezultat je dobijen pri inokulacijama jednogodišnjih grančica izvedenim u fazi mirovanja voćaka (24.10.2013., 20.11.2013., 18.1.2014. i 14.3.2014.), a negativni rezultati su dobijeni pri inokulacijama mladara (6.6.2013., 17.9.2013. i 16.4.2014.) izvedenim tokom vegetacije.

Na inokulisanim jednogodišnjim grančicama urađenim u vreme opadanja lišća (24.10.2013.) pri prvoj oceni (30.11.2013.) na mestima zareza nisu uočene nikakve promene ni kod jednog soja (Tab. 20). Narednim pregledom (3.3.2014.) zapažena je pojava širenje nekroze oko zareza samo kod sojeva pv. *morsprunorum* rasa 1 (KBNS74 i KBNS79). Najveća dužina nekroze je bila na sorti Burlat za oba soja (1,71 – 1,87 cm). Najmanja dužina nekroze je bila kod sorte Germerzdorfska (1,13 – 1,17 cm) i Hedelfigenska (1,26 cm). Kod treće ocene (30.5.2014.) nekroza kod sojeva pv. *morsprunorum* rasa 1 (KBNS74 i KBNS79) se i dalje širila. Najveća dužina nekroze je ponovo bila na sorti Burlat (2,70 cm) inokulisane sojem KBNS79. Najmanja dužina nekroze, kao i u predhodnoj oceni utvrđena je kod sorte Germerzdorfska (1,36 – 1,39 cm). Prema tome pozitivne reakcije su dobijene samo sa sojevima pv. *morsprunorum* rasa 1, a statistički značajna razlika postoji između sorte Germerzdorfska u odnosu na sve ostale sorte, kao i Drojanove žute u odnosu na Hedelfigensku i Burlat (Tab. 20).

Reakcije sojeva grupe *P. s. pv. syringae* (KBNS87 i KBNS93) u oktobarskim inokulacijama su bile negativne (Tab. 20).

Tabela 20. Rezultati veštačkih inokulacija (*P. syringae* pvs.) jednogodišnjih grančice trešnje (24.10.2013.) R.Šančevi

Datum inokulacije		24.10.2013.						
Sorta	Soj	Ocena I 30.11.	Sorta	Soj	Ocena II 3.3.	Sorta	Soj	Ocena III 30.5.
Germerzdorfska	K-	0 <sup>a</sup>	Germerzdorfska	K-	0 <sup>a</sup>	Germerzdorfska	K-	0 <sup>a</sup>
Droganova žuta	K-	0 <sup>a</sup>	Droganova žuta	K-	0 <sup>a</sup>	Droganova žuta	K-	0 <sup>a</sup>
Hedelfigenska	K-	0 <sup>a</sup>	Hedelfigenska	K-	0 <sup>a</sup>	Hedelfigenska	K-	0 <sup>a</sup>
Burlat	K-	0 <sup>a</sup>	Burlat	K-	0 <sup>a</sup>	Burlat	K-	0 <sup>a</sup>
Germerzdorfska	KBNS93	0 <sup>a</sup>	Germerzdorfska	KBNS93	0 <sup>a</sup>	Germerzdorfska	KBNS93	0 <sup>a</sup>
Hedelfigenska	KBNS87	0 <sup>a</sup>	Hedelfigenska	KBNS87	0 <sup>a</sup>	Hedelfigenska	KBNS93	0 <sup>a</sup>
Burlat	KBNS87	0 <sup>a</sup>	Burlat	KBNS87	0 <sup>a</sup>	Burlat	KBNS87	0 <sup>a</sup>
Burlat	KBNS93	0 <sup>a</sup>	Burlat	KBNS93	0 <sup>a</sup>	Burlat	KBNS93	0 <sup>a</sup>
Droganova žuta	KBNS93	0 <sup>a</sup>	Droganova žuta	KBNS93	0 <sup>a</sup>	Hedelfigenska	KBNS87	0 <sup>a</sup>
Droganova žuta	KBNS87	0 <sup>a</sup>	Droganova žuta	KBNS87	0 <sup>a</sup>	Droganova žuta	KBNS93	0 <sup>a</sup>
Hedelfigenska	KBNS93	0 <sup>a</sup>	Hedelfigenska	KBNS93	0 <sup>a</sup>	Droganova žuta	KBNS87	0 <sup>a</sup>
Germerzdorfska	KBNS79	0 <sup>a</sup>	Germerzdorfska	KBNS87	0 <sup>a</sup>	Germerzdorfska	KBNS87	0 <sup>a</sup>
Germerzdorfska	KBNS74	0 <sup>a</sup>	Germerzdorfska	KBNS79	1,13 <sup>b</sup>	Germerzdorfska	KBNS79	1,36 <sup>b</sup>
Germerzdorfska	KBNS87	0 <sup>a</sup>	Germerzdorfska	KBNS74	1,17 <sup>b</sup>	Germerzdorfska	KBNS74	1,39 <sup>b</sup>
Hedelfigenska	KBNS74	0 <sup>a</sup>	Hedelfigenska	KBNS74	1,26 <sup>b</sup>	Droganova žuta	KBNS74	1,75 <sup>c</sup>
Hedelfigenska	KBNS79	0 <sup>a</sup>	Hedelfigenska	KBNS79	1,26 <sup>b</sup>	Droganova žuta	KBNS79	2,12 <sup>c</sup>
Droganova žuta	KBNS74	0 <sup>a</sup>	Droganova žuta	KBNS74	1,26 <sup>b</sup>	Burlat	KBNS74	2,13 <sup>d</sup>
Droganova žuta	KBNS79	0 <sup>a</sup>	Droganova žuta	KBNS79	1,48 <sup>c</sup>	Hedelfigenska	KBNS74	2,16 <sup>d</sup>
Burlat	KBNS74	0 <sup>a</sup>	Burlat	KBNS74	1,71 <sup>d</sup>	Hedelfigenska	KBNS79	2,22 <sup>d</sup>
Burlat	KBNS79	0 <sup>a</sup>	Burlat	KBNS79	1,87 <sup>e</sup>	Burlat	KBNS79	2,70 <sup>e</sup>

$p < 0,05$

Pri inokulaciji grančica trešnje urađenim u novembru (20.11.2013.), pozitivni rezultati zapaženi su već pri prvoj oceni (30.3.2014.), kod svih sorti i svih ispitivanih sojeva (Tab. 21). Širenje nekroze oko zareza kod svih sojeva i sorti trešnje bilo je od 1,16 cm do 1,98 cm. Tokom druge ocene izvdene 30.4.2014. jasno je uočeno povećanje dužine nekroze kod svih sojeva. Najslabije širenje je bilo kod sorte Germerzdorfska, a najjače kod sorte Burlat. Pri zadnjoj oceni (30.5.2014.) širenje se nastavilo, kod svih sorti i sojeva. Najmanja dužina nekroze je bila kod sorte Germerzdorfska (2,17 – 2,52 cm) (Sl. 38a), a najveća kod sorte Burlat (3,03 – 3,35 cm) (Sl. 38b). U oba slučaja u pitanju su pojedini sojevi oba patovara (KBNS79 i KBNS93). Kod sorti Hedelfigenska (Sl. 38c) i Droganova žuta (Sl. 38d), dužina



nekroze je bila između navedenih vrednosti (2,65 – 2,98 cm), uključujući oba patovara (*syringae* i *morsprunorum* rasa 1) (Tab. 21).

Tabela 21. Rezultati veštačkih inokulacija (*P. syringae* pvs.) jednogodišnjih grančice trešnje (20.11.2013.) R.Šančevi

Datum inokulacije		20.11.2013.						
Sorta	Soj	Ocena I 30.3.	Sorta	Soj	Ocena II 30.4.	Sorta	Soj	Ocena III 30.5.
Germerzdorfska	K-	0 <sup>a</sup>	Germerzdorfska	K-	0 <sup>a</sup>	Germerzdorfska	K-	0 <sup>a</sup>
Droganova žuta	K-	0 <sup>a</sup>	Droganova žuta	K-	0 <sup>a</sup>	Droganova žuta	K-	0 <sup>a</sup>
Hedelfigenska	K-	0 <sup>a</sup>	Hedelfigenska	K-	0 <sup>a</sup>	Hedelfigenska	K-	0 <sup>a</sup>
Burlat	K-	0 <sup>a</sup>	Burlat	K-	0 <sup>a</sup>	Burlat	K-	0 <sup>a</sup>
Hedelfigenska	KBNS87	1,16 <sup>b</sup>	Germerzdorfska	KBNS74	1,83 <sup>b</sup>	Germerzdorfska	KBNS79	2,17 <sup>b</sup>
Hedelfigenska	KBNS79	1,17 <sup>b</sup>	Germerzdorfska	KBNS79	1,90 <sup>b</sup>	Germerzdorfska	KBNS93	2,28 <sup>bc</sup>
Droganova žuta	KBNS93	1,17 <sup>b</sup>	Germerzdorfska	KBNS93	1,92 <sup>bc</sup>	Germerzdorfska	KBNS87	2,40 <sup>bcd</sup>
Droganova žuta	KBNS87	1,20 <sup>b</sup>	Germerzdorfska	KBNS87	2,02 <sup>bcd</sup>	Germerzdorfska	KBNS74	2,52 <sup>cde</sup>
Hedelfigenska	KBNS74	1,24 <sup>b</sup>	Hedelfigenska	KBNS74	2,12 <sup>bcd</sup>	Hedelfigenska	KBNS79	2,65 <sup>ef</sup>
Droganova žuta	KBNS74	1,27 <sup>b</sup>	Droganova žuta	KBNS87	2,13 <sup>bcd</sup>	Hedelfigenska	KBNS74	2,72 <sup>efgh</sup>
Germerzdorfska	KBNS74	1,28 <sup>b</sup>	Droganova žuta	KBNS79	2,24 <sup>cde</sup>	Droganova žuta	KBNS93	2,72 <sup>efgh</sup>
Germerzdorfska	KBNS87	1,33 <sup>b</sup>	Droganova žuta	KBNS93	2,26 <sup>cde</sup>	Droganova žuta	KBNS79	2,77 <sup>efghi</sup>
Germerzdorfska	KBNS93	1,36 <sup>bc</sup>	Burlat	KBNS87	2,26 <sup>cde</sup>	Droganova žuta	KBNS87	2,87 <sup>fghij</sup>
Droganova žuta	KBNS79	1,38 <sup>bc</sup>	Hedelfigenska	KBNS87	2,30 <sup>de</sup>	Droganova žuta	KBNS74	2,95 <sup>fghij</sup>
Germerzdorfska	KBNS79	1,40 <sup>bc</sup>	Hedelfigenska	KBNS79	2,31 <sup>de</sup>	Hedelfigenska	KBNS87	2,98 <sup>ghij</sup>
Burlat	KBNS87	1,62 <sup>cd</sup>	Burlat	KBNS93	2,58 <sup>ef</sup>	Burlat	KBNS74	3,03 <sup>hij</sup>
Burlat	KBNS74	1,63 <sup>cd</sup>	Hedelfigenska	KBNS93	2,72 <sup>fg</sup>	Burlat	KBNS87	3,06 <sup>ijk</sup>
Burlat	KBNS79	1,77 <sup>de</sup>	Droganova žuta	KBNS74	2,81 <sup>fg</sup>	Hedelfigenska	KBNS93	3,08 <sup>ijk</sup>
Hedelfigenska	KBNS93	1,81 <sup>de</sup>	Burlat	KBNS79	2,88 <sup>fg</sup>	Burlat	KBNS79	3,20 <sup>k</sup>
Burlat	KBNS93	1,98 <sup>e</sup>	Burlat	KBNS74	2,98 <sup>g</sup>	Burlat	KBNS93	3,35 <sup>k</sup>

$p < 0,05$

Prema rezultatima inokulacionog ogleada izvedenog u januaru (18.1.2014.) prva pojava simptoma zabeležena je krajem marta (30.3.2014.), na svim sortama i kod svih sojeva, ali su dužine nekroze bile nešto manje (1,03 – 1,44 cm), u odnosu na predhodne inokulacione oglede (Tab. 22). Najveća dužina nekroze bila je kod sorte Burlat u kombinaciji sa sojem KBNS87 (1,44 cm) i nešto manja kod sorte Germerzdorfska u kombinaciji sa sojevima KBNS74 i KBNS79 (1,33 – 1,41 cm). Nekroza se dalje širila tako da je u drugoj oceni (30.4.2014.) kod svih sorti i sojeva trešnje bila od 1,28 do 2,00 cm. Pri trećoj oceni

(30.5.2014.) širenje nekroze je nastavljeno, ali su dužine nekroze pri drugoj i trećoj oceni (1,28 – 2,0 cm; 1,44 – 2,31 cm, respektivno) i dalje bile manje u odnosu na novembarske inokulacije. Generalno u ovom ogledu pri trećoj oceni najmanja dužina nekroze je bila kod sorte Droanova žuta inokulisane svim sojevima, a najduže nekroze su bile uglavnom kod sorti Germerzdorfska i Hedelfigenska, uključujući obe grupe sojeva (Tab. 22).

U ostalim kombinacijama sorta – soj, takođe se nije mogao jasno diferencirati uticaj sorte, odnosno ispitivanih sojeva na stepen osetljivosti.

Tabela 22. Rezultati veštačkih inokulacija (*P. syringae* pvs.) jednogodišnjih grančice trešnje (18.1.2014.) (R.Šančevi)

Datum inokulacije			18.1.2014.					
Sorta	Soj	Ocena I 30.3.	Sorta	Soj	Ocena II 30.4.	Sorta	Soj	Ocena III 30.5.
Germerzdorfska	K-	0 <sup>a</sup>	Germerzdorfska	K-	0 <sup>a</sup>	Germerzdorfska	K-	0 <sup>a</sup>
Droganova žuta	K-	0 <sup>a</sup>	Droganova žuta	K-	0 <sup>a</sup>	Droganova žuta	K-	0 <sup>a</sup>
Hedelfigenska	K-	0 <sup>a</sup>	Hedelfigenska	K-	0 <sup>a</sup>	Hedelfigenska	K-	0 <sup>a</sup>
Burlat	K-	0 <sup>a</sup>	Burlat	K-	0 <sup>a</sup>	Burlat	K-	0 <sup>a</sup>
Droganova žuta	KBNS79	1,03 <sup>b</sup>	Droganova žuta	KBNS79	1,28 <sup>b</sup>	Droganova žuta	KBNS74	1,44 <sup>b</sup>
Droganova žuta	KBNS87	1,05 <sup>b</sup>	Droganova žuta	KBNS74	1,34 <sup>bc</sup>	Droganova žuta	KBNS87	1,47 <sup>b</sup>
Droganova žuta	KBNS93	1,06 <sup>bc</sup>	Hedelfigenska	KBNS79	1,36 <sup>bc</sup>	Hedelfigenska	KBNS79	1,51 <sup>bc</sup>
Hedelfigenska	KBNS87	1,06 <sup>bc</sup>	Droganova žuta	KBNS87	1,37 <sup>bc</sup>	Droganova žuta	KBNS79	1,56 <sup>bcd</sup>
Hedelfigenska	KBNS79	1,10 <sup>bc</sup>	Burlat	KBNS79	1,44 <sup>bcd</sup>	Droganova žuta	KBNS93	1,65 <sup>bcd</sup>
Droganova žuta	KBNS74	1,10 <sup>bc</sup>	Burlat	KBNS93	1,48 <sup>bcd</sup>	Burlat	KBNS87	1,79 <sup>cdef</sup>
Germerzdorfska	KBNS87	1,11 <sup>bc</sup>	Germerzdorfska	KBNS93	1,50 <sup>bcd</sup>	Burlat	KBNS93	1,80 <sup>cdef</sup>
Burlat	KBNS79	1,16 <sup>bcd</sup>	Droganova žuta	KBNS93	1,56 <sup>cde</sup>	Burlat	KBNS74	1,85 <sup>def</sup>
Hedelfigenska	KBNS93	1,17 <sup>bcd</sup>	Burlat	KBNS74	1,56 <sup>cde</sup>	Germerzdorfska	KBNS93	1,87 <sup>ef</sup>
Hedelfigenska	KBNS74	1,17 <sup>bcd</sup>	Germerzdorfska	KBNS87	1,61 <sup>cde</sup>	Hedelfigenska	KBNS74	1,87 <sup>ef</sup>
Burlat	KBNS74	1,23 <sup>bcd</sup>	Burlat	KBNS87	1,70 <sup>def</sup>	Burlat	KBNS79	1,94 <sup>efg</sup>
Germerzdorfska	KBNS93	1,25 <sup>bcd</sup>	Hedelfigenska	KBNS74	1,80 <sup>efg</sup>	Hedelfigenska	KBNS87	2,01 <sup>fg</sup>
Burlat	KBNS93	1,26 <sup>bcd</sup>	Germerzdorfska	KBNS79	1,91 <sup>fg</sup>	Germerzdorfska	KBNS87	2,06 <sup>fgh</sup>
Germerzdorfska	KBNS74	1,33 <sup>cde</sup>	Germerzdorfska	KBNS74	1,94 <sup>fg</sup>	Germerzdorfska	KBNS79	2,08 <sup>fgh</sup>
Germerzdorfska	KBNS79	1,41 <sup>de</sup>	Hedelfigenska	KBNS87	1,95 <sup>fg</sup>	Hedelfigenska	KBNS93	2,23 <sup>h</sup>
Burlat	KBNS87	1,44 <sup>e</sup>	Hedelfigenska	KBNS93	2,00 <sup>g</sup>	Germerzdorfska	KBNS74	2,31 <sup>h</sup>

$p < 0,05$

Prema rezultatima inokulacionih ogleda izvedenih u periodu bubrenja pupoljaka tokom marta (14.3.2014.) dobijeni rezultati pokazuju sličan trend kao i u januarskim inokulacijama. Simptomi su konstatovani na svim sortama u kombinaciji sa svim sojevima, ali je dužina nekroze bila manja u odnosu na januarske inokulacije (Tab. 23). Prvi simptomi širenja nekroze oko mesta zareza zabeleženi su krajem aprila (30.4.2014.). U ovom periodu nekroza je bila od 0,92 – 1,22 cm. Širenje bakterija se i dalje nastavilo tako da je pri drugoj oceni kod svih kombinacija sorti i sojeva evidentirano širenje nekroze (1,22 cm do 1,73 cm), ali je nekroza takođe bila manja, u odnosu na drugu ocenu januarske inokulacije. Sličan trend je bio i kod treće ocene (15.6.2014.), prosečna dužina nekroze je bila 1,22 – 2,13 cm. Ni u ovom

ogledu nije se mogla uočiti razlika u agresivnosti sojeva pv. *syringae* i *morsprunorum* rasa 1 u odnosu na sorte (Tab. 23).

Tabela 23. Rezultati veštačkih inokulacija (*P. syringae* pvs.) jednogodišnjih grančice trešnje (14.3.2014.) (R.Šančevi)

Datum inokulacije		14.3.2014.						
Sorta	Soj	Ocena I 30.4.	Sorta	Soj	Ocena II 30.5.	Sorta	Soj	Ocena III 15.6.
Germerzdorfska	K-	0 <sup>a</sup>	Germerzdorfska	K-	0 <sup>a</sup>	Germerzdorfska	K-	0 <sup>a</sup>
Droganova žuta	K-	0 <sup>a</sup>	Droganova žuta	K-	0 <sup>a</sup>	Droganova žuta	K-	0 <sup>a</sup>
Hedelfigenska	K-	0 <sup>a</sup>	Hedelfigenska	K-	0 <sup>a</sup>	Hedelfigenska	K-	0 <sup>a</sup>
Burlat	K-	0 <sup>a</sup>	Burlat	K-	0 <sup>a</sup>	Burlat	K-	0 <sup>a</sup>
Germerzdorfska	KBNS79	0,92 <sup>b</sup>	Hedelfigenska	KBNS74	1,22 <sup>b</sup>	Hedelfigenska	KBNS74	1,22 <sup>b</sup>
Germerzdorfska	KBNS87	0,94 <sup>bc</sup>	Droganova žuta	KBNS74	1,23 <sup>b</sup>	Droganova žuta	KBNS74	1,32 <sup>bc</sup>
Germerzdorfska	KBNS93	0,96 <sup>bc</sup>	Burlat	KBNS74	1,27 <sup>b</sup>	Hedelfigenska	KBNS79	1,33 <sup>bc</sup>
Germerzdorfska	KBNS74	0,97 <sup>bc</sup>	Droganova žuta	KBNS79	1,27 <sup>b</sup>	Germerzdorfska	KBNS79	1,35 <sup>bc</sup>
Hedelfigenska	KBNS87	1,01 <sup>bcd</sup>	Germerzdorfska	KBNS79	1,27 <sup>b</sup>	Burlat	KBNS74	1,37 <sup>bc</sup>
Droganova žuta	KBNS87	1,06 <sup>bcdde</sup>	Hedelfigenska	KBNS79	1,28 <sup>b</sup>	Germerzdorfska	KBNS74	1,40 <sup>bc</sup>
Droganova žuta	KBNS93	1,07 <sup>bcdde</sup>	Germerzdorfska	KBNS74	1,30 <sup>b</sup>	Droganova žuta	KBNS79	1,40 <sup>bc</sup>
Hedelfigenska	KBNS74	1,10 <sup>bcdde</sup>	Burlat	KBNS87	1,35 <sup>bc</sup>	Droganova žuta	KBNS87	1,44 <sup>bc</sup>
Hedelfigenska	KBNS79	1,10 <sup>bcdde</sup>	Germerzdorfska	KBNS87	1,38 <sup>bc</sup>	Germerzdorfska	KBNS87	1,45 <sup>bc</sup>
Droganova žuta	KBNS79	1,10 <sup>bcdde</sup>	Droganova žuta	KBNS87	1,38 <sup>bc</sup>	Hedelfigenska	KBNS87	1,46 <sup>bc</sup>
Droganova žuta	KBNS74	1,12 <sup>cde</sup>	Germerzdorfska	KBNS93	1,40 <sup>bc</sup>	Germerzdorfska	KBNS93	1,47 <sup>c</sup>
Burlat	KBNS74	1,13 <sup>cde</sup>	Hedelfigenska	KBNS87	1,41 <sup>bc</sup>	Droganova žuta	KBNS93	1,49 <sup>c</sup>
Hedelfigenska	KBNS93	1,13 <sup>cde</sup>	Droganova žuta	KBNS93	1,42 <sup>bc</sup>	Burlat	KBNS87	1,57 <sup>d</sup>
Burlat	KBNS87	1,14 <sup>cde</sup>	Burlat	KBNS93	1,55 <sup>cd</sup>	Hedelfigenska	KBNS93	1,74 <sup>d</sup>
Burlat	KBNS93	1,20 <sup>de</sup>	Hedelfigenska	KBNS93	1,72 <sup>d</sup>	Burlat	KBNS79	1,76 <sup>d</sup>
Burlat	KBNS79	1,22 <sup>e</sup>	Burlat	KBNS79	1,73 <sup>d</sup>	Burlat	KBNS93	2,13 <sup>e</sup>

$p < 0,05$

Do kraja ogleda (17.6.2014.) veličina nekroze se nije menjala. Nastupanjem visokih temperatura tokom juna meseca razvoj patogena je zaustavljen, odnosno formirani su kalusi.

Veštačke inokulacije izvođene tokom vegetacije (6.6.2013., 17.9.2013., 16.4.2014.) na sortama Burlat, Germerzdorfska, Droganova žuta i Hedelfigenska sa svim sojevima pv. *syringae* i *morsprunorum* rasa 1, bile su negativne.

**Reizolacija:** Po završetku ogleda uspešno su urađene reizolacije bakterija sa jednogodišnjih grančica inokulisanih 20.11.2013., 18.1.2014. i 14.3.2014.

Nakon 2 – 3 dana na NSA podlozi reizolovane su kolonije bakterija tipične za *P. syringae* pvs., odnosno krupne, bele, ispupčene, sluzaste i levan pozitivne kolonije. Svi dobijeni reizolati na King B podlozi stvaraju fluorescentni pigment (Tab. 24). Patogenost reizolata je potvrđena na listovima duvana i mahunama boranije.

Tabela 24. Reizolati bakterija (veštački inokulisane jednogodišnje grančice trešnje – 4 sorte R. Šančevi)

Reizolat/Sorta sa koje je dobijen	Šifra soja	Šifra reizolata	Datum inokulacije/reizolacije	
R TR SEL 4/2 Droганova žuta	KBNS79	I 1	20.11.2013.	17.6.2014.
R TR LIST 4 Germerzdorfska	KBNS93	I 2	20.11.2013	17.6.2014.
R TR LIST 4 Germerzdorfska	KBNS93	I 3	20.11.2013	17.6.2014.
R TR LIST 4 Hedelfigenska	KBNS93	I 4	20.11.2013	17.6.2014.
R TR SEL 3/3 Hedelfigenska	KBNS74	I 5	20.11.2013	17.6.2014.
R TR SEL 4/2 Burlat	KBNS79	I 6	20.11.2013	17.6.2014.
R TR LIST 4 Hedelfigenska	KBNS93	I 7	20.11.2013	17.6.2014.
R TR GR II Hedelfigenska	KBNS87	II 1	18.01.2014.	17.6.2014.
R TR GR II Hedelfigenska	KBNS87	II 2	18.01.2014.	17.6.2014.
R TR GR II Germerzdorfska	KBNS87	II 4	18.01.2014.	17.6.2014.
R TR SEL 4/2 Germerzdorfska	KBNS79	II 5	18.01.2014.	17.6.2014.
R TR LIST 4 Germerzdorfska	KBNS93	II 6	18.01.2014.	17.6.2014.
R TR LIST 4 Germerzdorfska	KBNS93	II 7	18.01.2014.	17.6.2014.
R TR GR II Burlat	KBNS87	II 8	18.01.2014.	17.6.2014.
R TR GR II Burlat	KBNS87	II 9	18.01.2014.	17.6.2014.
R TR GR II Droганova žuta	KBNS87	II 13	18.01.2014.	17.6.2014.
R TR GR II Droганova žuta	KBNS87	II 14	18.01.2014.	17.6.2014.
R TR LIST 4 Droганova žuta	KBNS93	II 16	18.01.2014.	17.6.2014.
R TR GR II Burlat	KBNS87	III 1	14.3.2014.	17.6.2014.
R TR SEL 4/2 Burlat	KBNS79	III 2	14.3.2014.	17.6.2014.
R TR GR II Germerzdorfska	KBNS87	III 3	14.3.2014.	17.6.2014.
R TR GR II Germerzdorfska	KBNS87	III 4	14.3.2014.	17.6.2014.
R TR GR II Droганova žuta	KBNS87	III 5	14.3.2014.	17.6.2014.
R TR LIST 4 Hedelfigenska	KBNS93	III 6	14.3.2014.	17.6.2014.
R TR SEL 4/2 Hedelfigenska	KBNS79	III 7	14.3.2014.	17.6.2014.
R TR SEL 3/3 Hedelfigenska	KBNS74	III 8	14.3.2014.	17.6.2014.
R TR LIST 4 Burlat	KBNS93	III 10	14.3.2014.	17.6.2014.



Slika 38. Inokulacija jednogodišnjih grančica trešnje (*P. syringae* pvs. 20.11.2013. ocena – 30.5.2014.) promena boje kore oko zarez u mrko – ljubičastu, eliptično širenje nekroze koju prati uleganje kore (4 sorte): Germerzdorfska (a), Burlat (b), Hedelfigenska (c), Drojanova žuta (d) (Orig.)

**U drugom ogledu** inokulacijom dvo – trogodišnjih grana trešnje na sorti Summit pozitivan rezultat je takođe dobijen samo pri inokulacijama izvedenim tokom perioda mirovanja (20.11.2013. i 18.1.2014.) a negativni rezultati pri inokulacijama urađenim tokom vegetacije (6.6.2013., 17.9.2013., 14.3.2014. i 16.4.2014.) pa i u periodu opadanja lišća (24.10.2013.). Pri inokulaciji urađenoj u novembru (20.11.2013.) kod svih sojeva (KBNS74, KBNS79, KBNS87 i KBNS93) i u svim ponavljanjima tokom prve ocene (30.3.2014.)

rezultat je bio pozitivan (pojava nekroze oko zareza) (Tab. 25). Među sojevima nisu utvrđene razlike u pogledu dužine nekroze koja se kretala od 1,44 cm do 1,60 cm. Pri drugoj oceni (30.4.2014.) evidentirano je širenje nekroze i konstatovane su određene razlike između ispitivanih sojeva. Kod treće ocene (30.5.2014.) dužina nekroze se i dalje povećavala (Sl. 39). Između dužine nekroze prouzrokovane sojevima pv. *syringae* (2,48 – 2,58 cm) postoji statistički značajna razlika u odnosu na dužinu nekroze prouzrokovanu sojevima pv. *morsprunorum* rasa 1 (2,30 – 2,33 cm) (Tab. 25).

Do kraja ogleđa (17.6.2014.) dužina nekoroze se nije menjala. Nastupanjem visokih temperatura tokom juna meseca razvoj patogena je zaustavljen formiranjem kalusa.

Tabela 25. Rezultati veštačkih inokulacija (*P. syringae* pvs.) dvo – trogodišnjih grana trešnje sorte Summit 20.11.2013. (R.Šančevi)

Datum inokulacije		20.11.2013.				
Sorta	Soj	Ocena I 30.3.	Soj	Ocena II 30.4.	Soj	Ocena III 30.5.
Summit	K-	0 <sup>a</sup>	K-	0 <sup>a</sup>	K-	0 <sup>a</sup>
Summit	KBNS79	1,44 <sup>b</sup>	KBNS79	1,90 <sup>b</sup>	KBNS79	2,30 <sup>b</sup>
Summit	KBNS93	1,44 <sup>b</sup>	KBNS74	2,01 <sup>bc</sup>	KBNS74	2,33 <sup>b</sup>
Summit	KBNS87	1,58 <sup>b</sup>	KBNS93	2,03 <sup>bc</sup>	KBNS93	2,48 <sup>c</sup>
Summit	KBNS74	1,60 <sup>b</sup>	KBNS87	2,09 <sup>c</sup>	KBNS87	2,58 <sup>c</sup>

$p < 0,05$

Pri inokulaciji urađenoj u januaru (18.1.2014.) kod prve ocene (30.3.2014.) utvrđeno je širenje nekroze, ali u poređenju sa predhodnim inokulacionim ogledom dužina nekroze je bila manja, iznoseći od 0,98 cm do 1,04 cm (Tab. 26). Između ispitivanih sojeva nije bilo razlika u pogledu prosečnih dužina nekroze. Pri drugoj oceni (30.4.2014.) zabeleženo je slabo širenje nekroze. Prosečna vrednost u ovom periodu se kretala od 1,25 cm do 1,34 cm. Između ispitivanih sojeva i dalje nije bilo razlike u agresivnosti. Pri poslednjoj oceni (30.5.2014.) takođe nije utvrđena statistički razlika u pogledu prosečne dužine nekroze između ispitivanih sojeva (od 1,60 cm do 1,82 cm) (Tab. 26).



Slika 39. Inokulacija dvo – trogodišnjih grana trešnje sorte Summit (*P. syringae* pvs.), eliptično širenje nekroze oko zareza uleganje i promena boje kore (Orig.)

Pri veštačkim inokulacijama debljih grana sorte Summit izvedenim u periodu opadanja lišća (24.10.2013.), tokom faze bubrenja pupoljaka (14.3.2014.) i pune vegetacije (6.6.2013., 17.9.2012. i 16.4.2014.) sojevima pv. *syringae* i *morsprunorum* rasa 1, rezultat je u svim slučajevima bio negativan.

Bitna razlika između ovog i predhodnog cikličnog oglada je u tome što smo pri inokulacijama jednogodišnjih grančica pozitivan rezultat dobili i u oktobarskim inokulacijama, mada samo sa sojevima pv. *morsprunorum* rasa 1, a u martovskim inokulacijama pozitivan rezultat je dobijen sa svim sojevima, oba patogena varijeteta.

Tabela 26. Rezultati veštačkih inokulacija (*P. syringae* pvs.) dvo – trogodišnjih grana trešnje sorte Summit 18.1.2014. (R.Šančevi)

Datum inokulacije		18.1.2014.				
Sorta	Soj	Ocena I 30.3.	Soj	Ocena II 30.4.	Soj	Ocena III 30.5.
Summit	K-	0 <sup>a</sup>	K-	0 <sup>a</sup>	K-	0 <sup>a</sup>
Summit	KBNS74	0,98 <sup>b</sup>	KBNS79	1,25 <sup>b</sup>	KBNS74	1,60 <sup>b</sup>
Summit	KBNS93	0,99 <sup>b</sup>	KBNS93	1,28 <sup>b</sup>	KBNS79	1,65 <sup>b</sup>
Summit	KBNS79	1,02 <sup>b</sup>	KBNS74	1,30 <sup>b</sup>	KBNS87	1,76 <sup>b</sup>
Summit	KBNS87	1,04 <sup>b</sup>	KBNS87	1,34 <sup>b</sup>	KBNS93	1,82 <sup>b</sup>

$p < 0,05$



#### 6. 4. OSETLJIVOST SORTIMENTA TREŠNJE I VIŠNJE PREMA SOJEVIMA *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* i *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* rasa 1

Uzimajući u obzir značaj sortimenta trešnje i činjenicu da prema prouzročivačima bakterijskog sušenja ne postoje visoko otporne sorte, kroz ovaj ogled smo želeli da ispitamo da li ima određenih razlika u osetljivosti sorti koje se gaje u Srbiji, prema ovim patogenima u našim agroekološkim uslovima.

Na ukorenjenim sadnicama trešnje i višnje u Botaničkoj bašti, Poljoprivrednog fakulteta – Novi Sad, inokulisanim u novembru (2013), prvi simptomi su se javili krajem marta (2014) i to pri inokulaciji sa oba soja (KBNS93 i KBNS74) i svih sorti. Tkivo oko zarezaja je počelo da menja boju, dobija vlažan izgled, a kod pojedinih sadnica u okviru zarezaja javlja se i smola. Najintenzivnije širenje nekroze zabeleženo je sredinom aprila. Nekroza se eliptično širila, boja kora se menjala boju u mrko – ljubičastu i tkivo se ulegalo. Skidanjem kore se videlo da se boja unutrašnjih tkiva menja u crvenkasto – mrku. Daljim razvojem, nekroza se širi oko zarezaja zahvatajući koru, floem, a u pojedinim slučajevima i ksilem i sržni deo stabla. Prestanak širenja nekroze uočen je početkom juna meseca. Na kontrolnim biljkama do kraja ogleda nije bilo promena. Početkom leta oko mesta inokulacije, novo tkivo obrasta rane i zarezaji postepeno kalusiraju.

Na osnovu dobijenih rezultata (merjenjem dužine nekroze) utvrđen je stepen osetljivosti sorti trešnje i višnje prema bakterijama *P. s.* pv. *syringae* i *P. s.* pv. *morsprunorum* rasa 1 (Tab. 27).

U prvoj grupi kao najosetljivije prema oba soja izdvojile su se sorte trešnje Katalin, Linda, Summit, New Star i Burlat. Prosečna dužina nekroze je bila od 1,99 – 2,37 cm, a najveća dužina nekroze je utvrđena za soj KBNS93 pv. *syringae* (2,37 cm) (Tab. 27).

U drugoj grupi prema oba soja (*syringae* i *morsprunorum* rasa 1) kao srednje osetljive sa prosečnom dužinom nekroze od 0,98 cm do 1,82 cm, bile su sorte višnje Erdi Botermo i trešnje Drojanova žuta, Carmen, Germerzdorfska i Rana od Noara.

U treću grupu kao slabo osetljive sorte, kod kojih je evidentiran najmanji prečnik nekroze (oba soja) od 0,82 cm do 0,87 cm, bile su sorte višnje Španska i Ujfehetyi firtoš i trešnje Rita.

Tabela. 27. Osetljivost sortimenta trešnje i višnje u uslovima veštačke inokulacije ukorenjenih sadnica (*P. syringae* pvs.); Botanička bašta, Poljoprivredni fakultet Novi Sad

Godina inokulacije 2013.			
Sorta	Trešnja (T) Višnja (V)	Soj	Prosečna dužina nekroze
Germerzdorfska	T	K-	0,00 <sup>a</sup>
Rana od Noara	T	K-	0,00 <sup>a</sup>
Carmen	T	K-	0,00 <sup>a</sup>
Droganova žuta	T	K-	0,00 <sup>a</sup>
New Star	T	K-	0,00 <sup>a</sup>
Rita	T	K-	0,00 <sup>a</sup>
Burlat	T	K-	0,00 <sup>a</sup>
Katalin	T	K-	0,00 <sup>a</sup>
Summit	T	K-	0,00 <sup>a</sup>
Linda	T	K-	0,00 <sup>a</sup>
Erdi Botermo	V	K-	0,00 <sup>a</sup>
Ujfehetyi firtoš	V	K-	0,00 <sup>a</sup>
Španska	V	K-	0,00 <sup>a</sup>
Španska	V	KBNS74	0,82 <sup>ab</sup>
Rita	T	KBNS74	0,82 <sup>ab</sup>
Ujfehetyi firtoš	V	KBNS93	0,84 <sup>ab</sup>
Rita	T	KBNS93	0,84 <sup>ab</sup>
Španska	V	KBNS93	0,87 <sup>abc</sup>
Ujfehetyi firtoš	V	KBNS74	0,87 <sup>abc</sup>
Erdi Botermo	V	KBNS74	0,98 <sup>bcde</sup>
Droganova žuta	T	KBNS74	1,09 <sup>bcde</sup>
Erdi Botermo	T	KBNS93	1,29 <sup>bcde</sup>
Carmen	T	KBNS74	1,41 <sup>bcde</sup>
Droganova žuta	T	KBNS93	1,43 <sup>bcde</sup>
Carmen	T	KBNS93	1,46 <sup>bcde</sup>
Germerzdorfska	T	KBNS74	1,49 <sup>bcde</sup>
Rana od Noara	T	KBNS93	1,64 <sup>cde</sup>
Rana od Noara	T	KBNS74	1,76 <sup>cde</sup>
Germerzdorfska	T	KBNS93	1,82 <sup>de</sup>
Katalin	T	KBNS74	1,99 <sup>de</sup>
Linda	T	KBNS93	1,99 <sup>de</sup>
Summit	T	KBNS74	1,99 <sup>de</sup>
Linda	T	KBNS74	2,02 <sup>de</sup>
New Star	T	KBNS93	2,15 <sup>e</sup>
New Star	T	KBNS74	2,16 <sup>e</sup>
Katalin	T	KBNS93	2,18 <sup>e</sup>
Summit	T	KBNS93	2,19 <sup>e</sup>
Burlat	T	KBNS74	2,24 <sup>e</sup>
Burlat	T	KBNS93	2,37 <sup>e</sup>

$p < 0,05$

## 7. DISKUSIJA

Poslednjih nekoliko godina u regionima gde se gaji trešnja na teritoriji AP Vojvodine i Centralne Srbije (Ritopek) zapažena je jača pojava sušenja voćaka. Uzimajući u obzir da ovaj problem u uslovima ekstenzivnog gajenja trešnje kod nas ranije uglavnom nije ni postojao, bolesti trešnje se u Srbiji tek odnedavno ispituju. S druge strane, u svetu se bolestima trešnje posvećuje velika pažnja još od polovine prošlog veka. Kao dva glavna prouzrokovala sušenja trešnje Cameron (1960), Cameron (1962), Crosse (1966), Crosse i Garrett (1966) navode bakterije *P. syringae* i *P. morsprunorum*, istučući bakteriozni rak kao jedno od najznačajnijih oboljenja ne samo trešnje nego i drugih koštičavih voćnih vrsta. U ovom periodu Cameron (1960) navodi da štete u povoljnim uslovima za razvoj patogena na trogodišnjim stablima trešnje, mogu biti čak i preko 70%. Bakteriozno sušenje trešnje (*P. s. pv. syringae* i *P. s. pv. morsprunorum*) i danas predstavlja velik problem u svetu, jer prouzrokuje značajne ekonomske štete u svim voćarskim područjima. Jače propadanje voćaka se uglavnom javlja u mladim zasadima i plantažama trešnje (Vicente i sar., 2004; Elmhirst, 2006; Kennelly i sar., 2007; Hattingh i Roos, 2008; Renick i sar., 2008; Spotts i sar., 2010; Scortichini, 2010). Ovi autori bakteriozno sušenje ističu kao ozbiljan problem i to posebno tokom prve i druge godine nakon sadnje. Prema novijim literaturnim podacima u mladim zasadima i plantažama trešnje u povoljnim vremenskim uslovima gubici mogu biti i do 75%, a štete od 10 – 20% se smatraju očekivanim (Spotts i sar., 2010). Međutim prema nekim autorima bakteriozno sušenje se podjednako javlja i u mlađim i starijim voćnjacima trešnje (Garrett i Crosse, 1974; Sletten, 1979).

Detaljnija proučavanja bakterioznog sušenja (*P. syringae*) trešnje u Srbiji su započeta tek tokom poslednjih 10 – tak godina (Gavrilović i Milijašević, 2004). Autori ističu da u savremenim plantažama bakteriozno sušenje pupoljaka i grana predstavlja ozbiljan problem, jer dovodi do propadanja mladih stabala trešnje. U daljem radu Gavrilović i sar. (2012) zaključuju da izumiranje pupoljaka i grana trešnje prouzrokuju bakterije *P. s. pv. syringae* i *P. s. pv. morsprunorum* rasa 1. Uzimajući u obzir značaj koji trešnja sve više dobija u našim uslovima proizvodnje, a da ovu sve intenzivniju proizvodnju prati pojava sušenja mladih voćaka, poslednjih nekoliko godina problematika bakterioznog sušenja trešnje kod nas je postala vrlo aktuelna (Gavrilović i sar., 2012; Balaž i sar., 2012; Ivanović i sar., 2009; 2012; Balaž i sar., 2016).

U periodu od 2012 – 2015. izvršen je monitoring zdravstvenog stanja trešnje kojim je obuhvaćeno nekoliko plantaža i manjih zasada trešnje iz više lokaliteta na području Vojvodine (Južno bački okrug – Kać, Rimski Šančevi, Čerević, Čelarevo, Sirig, Temerin, Selenča, Bođani, Bačka Palanka; Sremski okrug – Krčedin; Severno banatski okrug – Kanjiža; Severno bački okrug – Ljutovo, Gornji Tavankut, Donji Tavankut, Mikićevo) i centralne Srbije (Ritopek). U svim zasadima i plantažama trešnje tokom proleća, uočeno je sušenje pojedinih grana, grančica a u pojedinim slučajevima i celih mladih voćaka. Najuočljiviji simptom je bilo sušenje jednogodišnjih grana kod kojih infekcija nastupa preko pupoljaka, tokom jeseni. Takve grane u proleće ne kreću ili ukoliko kretanje i počne, listovi se ubrzo suše. Na debljim granama ili na mladim stablima nekroza kreće od mesta rezidbe, osušenih grana, mehaničkih ozleda ili prekraćivanja stabla. Zaražena kora je mrko – ljubičaste boje, tkivo se uleže, vlažnog je izgleda, a kasnije se suši. Kora puca i formiraju se rak rane iz kojih ističe smola. Kod zaraženih mladih sadnica, nekroza se brzo širi i u pojedinim slučajevima za samo nekoliko nedelja se suše cele voćke. Jedino koren ostaje zdrav, zbog čega se često kod mladih osušenih voćaka, može uočiti pojava izbojaka u osnovi stabla. Pojavu izbojaka iz osnove stabla kod koštičavih vrsta voćaka, koje se naglo suše navodi veći broj autora (Cameron, 1962; Arsenijević, 1980; Arsenijević, 1982; Hattingh i Roos, 2008; Balaž i sar., 2012). Na listovima pojava bakteriozne pegavosti je uočena kasnije tokom maja i juna, a intenzitet razvoja bolesti na listovima je varirao od 15 – 40%. Ova pojava je najizraženija u mladim, intenzivnim zasadima trešnje sa novijim sortama i podlogama. Simptomi koji se zapažaju na terenu odgovaraju simptomima bakterioznog sušenja trešnje koje navode Cameron (1962), Crosse (1966), Lyskanowska (1974), Gavrilović i Milijašević (2004), Kennelly i sar. (2007), Bultreys i Kaluzna (2010), Balaž i sar. (2012). Zbog značaja i aktuelnosti ove problematike pristupili smo detaljnom ispitivanju uzročnika ove pojave i epidemiološkim karakteristikama patogena.

Prema rezultatima naših ispitivanja u uslovima intenzivne proizvodnje trešnje, posebnu pažnju treba posvetiti zdravstvenom stanju mladih zasada i sadnom materijalu. Mlade voćke su očigledno najugroženije i to one do 3 godine starosti, gde je i konstatovano bakteriozno sušenje. Najizraženije propadanje zabeleženo je u plantaži trešnje u Selenči i to u delu u kome su voćke bile najmlađe (u prvoj vegetaciji). U ovom delu plantaže, tokom prve vegetacije je iskrčeno oko 500 mladih stabala. Uzimajući u obzir da je u ovoj plantaži na najmlađim voćkama već u prvoj vegetaciji nakon sadnje utvrđeno prisutvo bakterioznog raka u jakom intenzitetu i uz činjenicu da u bližoj okolini nema voćnih zasada, pretpostavka je da je

inokulum u ovu plantažu mogao dospeti samo zaraženim sadnim materijalom (Italija). Sorta Merchant je nakon sadnje bila izložena stresu od suše, a sorta Burlat je pre sadnje izložena jakom mrazu (Balaž i sar., 2016). U istoj plantaži stresu od suše su bile izložene i sorte Vanda i Summit, a sve sorte su bile na podlozi Gisela 6. U zasadu trešnje u lokalitetu Mikićevo takođe postoji mogućnost da je inokulum dospeo sadnim materijalom jer u bližoj okolini nema voćnih zasada, a utvrđeno je prisustvo bakterioznog raka. U voćnjaku su zastupljene sorte Regina i Kordia (na podlozi Gisela 6). Sadni materijal je takođe dopremljen iz Italije, a mlade voćke su i u ovom slučaju nakon sadnje takođe bile izložene suši. U ovom zasadu je takođe iskrcen, određen manji broj stabala trešnje. Ovi primeri su u skladu sa istraživanjima većeg broja autora Lyskanowska (1979), Wimalajeewa i Flett (1985) Bultreys i Kaluzna (2010), koji navode pojavu bakterioznog raka u rasadničkoj proizvodnji i na sadnom materijalu koji ima značajnu ulogu u pojavi bakterioznog raka u mladim zasadima i to naročito u prvim godinama nakon sadnje na stalno mesto. Hattingh i Roos (2008) ističu značaj latentnih infekcija pupoljaka ili podloge, na sadnom materijalu jer latentno zaražene voćke kada nakon presađivanja dospu u stresne uslove, postaju još osetljivije i upravo se iz ovih razloga bakteriozni rak u brojnim slučajevima javlja kod mlađih voćaka, a ne kod starijih, koje su stekle određenu otpornost. Prema istim autorima starije voćke su generalno otpornije, jer tokom razvoja stiču otpornost.

Negativan uticaj stresa se jasno ispoljio i pri rasadničkoj proizvodnji sadnica trešnje u Kanjiži. U ovom rasadniku trešnje (sorta Valeri Chkalov / *P. mahaleb*) su bile izložene oštećenjima od grada, a nakon dve nedelje *P. s. pv. syringae* je uspešno izolovan (tokom novembra). Na stablima ozleđenih sadnica uočeno je širenje nekroze oko mesta povrede, zbog čega je veći broj biljaka takođe uklonjen iz rasadnika. Rezultati su u skladu sa navodima Spotts i sar. (2010), da su vrlo značajni razni stresogeni faktori koji prate proizvodnju sadnica, a naročito mlada stabla koja stradaju ukoliko su oštećena gradom.

U lokalitetu Ljutovo takođe postoji opravdana sumnja da bakteriozni rak, koji je na mladim voćkama uočen već u prvoj godini nakon sadnje, potiče od sadnog materijala. U prilog ovome je činjenica da je sadni materijal nabavljen iz rasadnika u Kanjiži (gde je predhodno već dokazano prisustvo fitopatogenih bakterija), a nakon sadnje pojavi bolesti su svakako doprineli i razni stresogeni faktori koji prate operacije presađivanja (vađenje sadnica, trpljenje, transport i sadnja na stalno mesto). Negativan uticaj složenih radnji koje se odvijaju od vađenja do sadnje na stalno mesto navodi Cameron (1962). U lokalitetu Ljutovo bakteriozno sušenje je utvrđeno na sortama Germerzdorfska i Summit / *P. mahaleb*.

Prekraćivanje stabla (heading cut) se redovno izvodi u cilju formiranja voćne krune i takođe predstavlja velik problem u svim zasadima (Selenča, Gornji Tavankut, Donji Tavankut, Mikićevo i Ljutovo). Ovako nastale rane predstavljaju idealno ulazno mesto za patogene, jer se nekroza spušta sve do spojnog mesta sa podlogom i ovakve voćke se suše u celosti za vrlo kratko vreme. Spotts i sar. (2010) takođe navode velike ekonomske štete u Oregonu na mladim voćkama, koje nastaju zbog prekraćivanja stabala.

Monitoring je u svim zasadima i plantažama nastavljen i nakon prvog uočavanja bakterioznog sušenja. Uz primenu dobre poljoprivredne prakse (agrotehničke mere i primena bakarnih preparata), posle 2 – 3 godine utvrđeno je da su se voćke značajno oporavile, uglavnom nema novog sušenja voćaka, mada je i dalje prisutna sporadična pojava bakterioznih simptoma.

Odsustvo bakterija u manjim zasadima trešnje (starosti preko 3 – 4, 10 i više godina), u uslovima ekstenzivne proizvodnje, najverovatnije se može objasniti korišćenjem zdravijeg sadnog materijala, čemu je verovatno doprineo i manji obim proizvodnje i manja osetljivost sortimenta. Smatramo da se odsustvo bakterioznog raka u starijim zasadima može objasniti privikavanjem voćki na date proizvodne uslove. U prilog ovome je i činjenica da su u Srbiji bakterioze trešnje eksperimentalno utvrđene samo u savremenim plantažama mlađim od 10 – tak godina (Gavrilović i Milijašević, 2004). Hattingh i Roos (2008) i Vicente i sar. (2004) takođe navode da su mlade voćke, posebno u prvoj – drugoj godini po presađivanju vrlo osetljive, sve dok se ne priviknu na nove, proizvodne uslove.

U lokalitetima u kojima nije dokazano prisustvo fitopatogenih bakterija, a konstatovano je sušenje grana ili celih stabala trešnje, uglavnom su uspešno izolovane fitopatogene gljive iz roda *Cytospora*, a ređe i *Phomopsis*. Značaj navedenih vrsta kao prouzrokovala sušenja trešnje navodi veći broj autora (Spotts i sar., 1990; Regner i sar., 1990; Barakat i Johnson, 1997; Peter, 2014). Od uobičajenih bolesti u svim zasadima trešnje konstatovano je prisustvo monilioznog sušenja cvetova (*Monilia* spp.), desetak dana posle precvetavanja (naročito u starijim i zapuštenim zasadima), a tokom juna i pojava ospičavosti lista (*Blumeriella jaapii*).

Izolacije iz obolelih uzoraka trešnje obuhvaćenih monitoringom, uglavnom su rađene tokom cele godine, a najintenzivnije u fazi razvoja vegetacije u proleće, posebno tokom faze cvetanja. U ovoj fazi (Cameron, 1962; Crosse, 1966; Spotts i sar., 2010) i razvoj rak rana je najintenzivniji. Najuspešnije izolacije su bile iz uzoraka kod kojih nekroza polazi od mesta gde je izvršeno prekraćivanje stabla i sa jednogodišnjih grančica, kod kojih infekcija polazi od

pupoljka i mesta rezidbe. Dosta pozitivnih izolacija je bilo i iz uzoraka mladih stabala (1 – 2 godine starosti) kod kojih su infekcije ostvarene preko raznih mehaničkih ozleda, pupoljaka ili lenticela na stablu.

Simptomi bakterioznog sušenja su bili najizraženiji, a izolacije najuspešnije iz uzoraka koji potiču iz mladih zasada i plantaža trešnje (1 – 3 godine starosti) i to iz lokaliteta Selenča, Kanjiža, Ljutovo, Gornji Tavankut, Donji Tavankut i Mikićevo. Iz uzoraka sa navedenim simptomima dva dana nakon izvedenih izolacija na podlozi obogaćenoj saharozom NSA, razvile su se kolonije bakterija izrazito ispupčene, biserno bele do krem – beličaste, ravnih ivica, sa prozirnom zonom oko kolonija, zrnaste (pojedine i radijalne) strukture, sjajne i levan pozitivne, veličine 3 – 4 mm (Sl.7A). Na NA kolonije su sitne, okruglaste, sjajne, ravnih ivica sivksto – beličaste boje, veličine oko 2 mm. Ovi rezultati su u skladu sa navodima većeg broja autora (Lyskanowska, 1976, Sletten, 1979; Sobiczewski, 1984), koji ističu da bakterije *P. syringae* pvs. na hranljivoj podlozi formiraju bele ili krem – beličaste kolonije, okrugle, ravnih ivica sa prozirnom zonom i zrnastom stukturuom u centru. Pri pregledu kolonija naših izolata, nisu zapažene kolonije koje imaju izgled „pečenog jajeta“, koje navode Freigoun i Crosse (1975) za „variant strain“, odnosno *P. morsprunorum* rasu 2.

Iz obolelih uzoraka trešnje i sa potpuno zdravih pupoljaka i listova trešnje (epifitna populacija), dobijen je veći broj izolata. Za dalji rad je odabrano 155 izolata (Tab. 2). Podloge NSA sa 5% saharoze i NA, pokazale su se kao vrlo pogodne za izolaciju vrsta *Pseudomonas syringae*.

Izolacije sa rak rana na jednogodišnjim i debljim granama su bile najuspešnije tokom aprila i maja, ređe tokom juna i jula, mada su bakterije u pojedinim slučajevima izolovane i tokom ostalog dela godine (septembar, novembar, januar, februar i mart). Sa listova izolacije su bile uspešne tokom maja i juna (Gornji Tavankut, Mikićevo, Selenča). Kako su bakterije *P. syringae* pvs. dobijane gotovo tokom cele godine, ovi rezultati ukazuju da kod oba patovara (*syringae* i *morsprunorum* rasa 1), u rak ranama ostaje izvesni, mali deo populacije bakterija tokom letnjih meseci i ponovo postaje aktivan tokom jeseni. Barss (1918), Wilson (1933) i Dye (1954) takođe navode da samo mali deo populacije bakterije *P. syringae* ostaje u rak ranama tokom letnjih meseci i da može postati aktivan u jesen, a za *P. morsprunorum* nema dovoljno podataka da se bakterija tokom leta održava u njima. Erickson (1945) navodi da je tokom kišovityh letnjih meseci izolovao bakterije *P. morsprunorum* iz rak rana. Međutim prema Crosse (1966) navedeni podaci nisu dovoljno utemeljeni, da bi se tvrdilo da je razvoj

raka rana ovog patovara višegodišnji i da se bakterije tokom letnih meseci održavaju u rak ranama. Uzimajući u obzir da su izolacije *P. s. pv. morsprunorum* rasa 1 u naši ispitivanjima iz rak rana u nekim slučajevima bile pozitivne i tokom leta i jeseni, smatramo da na mogućnost prezimljavanja ove bakterije mogu imati uticaj i razni agroekološki uslovi kao i određene karakteristike sorti trešnje.

Za identifikaciju izolata bakterija poreklom sa trešnje, ispitane su fenotipske i genetske karakteristike bakterija. Svi proučavani izolati (Tab. 2) ispoljavaju iste fenotipske karakteristike. Čelije bakterija su u vidu kratkih štapića sa zaobljenim krajevima, pokretljive, a prema reakciji po Gramu pripadaju grupi gramnegativnih bakterija. Na podlozi King B (King i sar., 1954) svi ispitivani izolati stvaraju fluorescentni pigment, što je karakteristika *Pseudomonas syringae*. Stvaranje fluorescentnog pigmenta značajna je bakteriološka karakteristika pri identifikaciji patogenih varijeteta *P. s. pv. syringae* i *P. s. pv. morsprunorum* rasa 1, jer je ova reakcija generalno pozitivna za *P. s. pv. syringae*, a varijabilna za *P. s. pv. morsprunorum* rasa 1, kao i kod patovara *persicae* i *avii* (Bultreys i Kaluzna, 2010). Sletten (1979) navodi da izolati *P. morsprunorum* poreklom sa trešnje stvaraju fluorescentni pigment, dok je za izolate sa šljive ova reakcija negativna. Lyskanowska (1976) takođe ističe da svi izolati *P. morsprunorum* sa trešnje stvaraju fluorescentni pigment. Prema Roos i Hattingh (1986) izolati *P. s. pv. morsprunorum* sa trešnje takođe stvaraju fluorescentni pigment, dok intermedijarne forme stvaraju vrlo slabu fluorescenciju. Varijabilnost u pogledu stvaranja fluorescentnog pigmenta je specifična i za *P. s. pv. morsprunorum* rasu 2. Prema navodima Freigoun i Crosse (1975), samo mali broj izolata *P. s. pv. morsprunorum* rase 2 stvara fluorescentni pigment.

Dobijeni izolati sa trešnje stvaraju polisaharid levan, oksidaza je negativna, ne prouzrokuju trulež kriški krompira i ne stvaraju arginin – dehidrolazu i prouzrokuju HR na duvanu. Prema tome na osnovu LOPAT testova (Tab.9) ispitivani izolati pripadaju vrsti *Pseudomonas syringae*, grupi Ia (Lelliott i sar., 1966). Ostale biohemijsko – fiziološke odlike izolata su sledeće: katalaza pozitivna, glukozu razlažu oksidativnim putem, ne stvaraju sumpor – vodonik i indol, ne redukuju nitrate do nitrita i ne vrše hidrolizu skroba što je u skladu sa karakteristikama *P. syringae* i navodima drugih autora (Lelliott i sar. 1966; Misaghi i Grogan, 1969; Burkowicz i Rudolph, 1994). Na osnovu rezultata GATTa testova (Tab.10) utvrđeno je prisustvo dve grupe izolata vrste *P. syringae* koje odgovaraju patogenim varijetetima *syringae* ( $G^+A^+T^-Ta^-$ ) I grupa i *morsprunorum* (rasa 1) ( $G^-A^-T^+Ta^+$ ) II grupa. Primenom GATTa testova, u ovim ispitivanjima nije utvrđeno prisustvo *pv. morsprunorum*



rase 2 ( $G^+A^+T^+Ta^-$ ), kao ni intermedijarnih formi izolata, koje navodi veći broj autora (Crosse i Garrett 1963; Sletten 1979; Roos i Hattingh, 1986; Balaž i Arsenijević, 1989; Luz 1997; Vicente i sar. 2004). Dobijeni rezultati ( $G^+A^+T^+Ta^-$ ) i ( $G^-A^-T^+Ta^+$ ) u saglasnosti su sa rezultatima Garrett i sar. (1966), Jones (1971), Sobiczewski (1984), Roos i Hattingh, (1986). Naši rezultati potvrđuju ranija istraživanja, odnosno prisustvo oba patovara *syringae* i *morsprunorum* rase 1, kao patogena trešnje u našoj zemlji (Gavrilović i sar., 2012; Ivanović i sar., 2009; 2012).

Za razdvajanje *P. s. pv. syringae* i *P. s. pv. morsprunorum* rasa 1 korišćeni su i određeni dodatni testovi (korišćenje L – mlečne kiseline, karakteristike razvoja u tečnoj podlozi obogaćenoj saharozom, hidroliza L – leucina, kazeina, dužina života, stvaranja čestica leda – INA, stvaranje siringomicina i osetljivost prema bakteriofagama). Rezultati ovih testova takođe potvrđuju da ispitivani izolati bakterija poreklom sa trešnje pripadaju patogenim varijetetima *P. s. pv. syringae* i *P. s. pv. morsprunorum* rasi 1 (Tab.11). Prema literaturnim podacima korišćenje mlečne kiseline odlika je izolata *P. syringae* (Crosse, 1966), dok je za izolate *P. morsprunorum* ova reakcija negativna. Naši izolati I grupe (*pv. syringae*) koriste mlečnu kiselinu, dok izolati II grupe (*pv. morsprunorum* rasa 1) ne koriste. Razlike između izolata I i II grupe potvrđene su i ispitivanjem karakteristika razvoja u tečnoj podlozi obogaćenoj saharozom (5%), pri čemu je za sve izolate označene kao *pv. syringae* (I grupa) utvrđen žut razvoj, dok je kod *pv. morsprunorum* rasa 1 (II grupa) razvoj beo. Prema Garrett i sar. (1966), Lyskanowska (1976) patogeni varijetet *syringae* ovu podlogu boji u žuto dok je kod *pv. morsprunorum* boja podloge bela. Vicente i sar. (2004) navode ovaj test kao adekvatnu dopunu GATTa testovima. U našim ispitivanjima ovi testovi su se takođe pokazali kao vrlo pogodni za razlikovanje patogenih varijeteta *syringae* i *morsprunorum* rasa 1. Izolati I grupe (*pv. syringae*) hidrolizuju kazein i koriste L – leucin kao jedini izvor C i N, dok su kod izolata II grupe (*pv. morsprunorum* rasa 1) ove reakcije negativne. Navedene reakcije su u saglasnosti sa navodima drugih autora koji su radili na identifikaciji patogenih varijeteta *syringae* i *morsprunorum* (Garrett i sar., 1966; Jones, 1971; Sletten, 1979). Prema Garrett i sar. (1966) sposobnost hidrolize kazeina za izolate *pv. syringae* u korelaciji je sa sposobnošću hidrolize želatina, što potvrđuju i ova ispitivanja. Proučavani izolati *pv. syringae* (I grupa) zadržavaju vitalnost na NSA podlozi od 15 do 18 dana dok izolati *pv. morsprunorum* rasa 1 (II grupa) samo 9 dana. Prema dobijenim rezultatima ovaj test nije po svemu sudeći dovoljno pouzdan jer u literaturi nailazimo na različite podatke. Sletten (1979) navodi da je dužina života za *pv. syringae* od 14 – 18 dana, a za *pv. morsprunorum* od 3 – 6 dana. Prema Garrett i

sar. (1966) dužina života pv. *syringae* je 8 – 14 dana, a pv. *morsprunorum* 2 – 6 dana. Gavrilović (2006) ispitujući dužinu života izolata *P. syringae* pvs. poreklom sa jabučastih i koštičavih vrsta voćaka, navodi da proučavani izolati na hranljivoj podlozi sa 5% saharoze zadržavaju vitalnost duže od 10 dana. Ispitivanje sposobnosti stvaranja čestica leda (INA) bitna je odlika za razlikovanje *P. syringae* pvs. Stvaranje čestica leda utvrđeno je kod svih ispitivanih izolata I grupe, a kod izolata II grupe ova reakcija je negativna. Navedene pozitivne reakcije I grupe u skladu su sa navodima većeg broja autora (Roos i Hattingh, 1983; Grosse i sar., 1984; Moore, 1988; Kaluzna, 2011; Peter, 2014), koji ističu da samo izolati pv. *syringae* imaju sposobnost stvaranja čestica leda. Prema Roos i Hattingh (1983) INA test je dosta pouzdan u identifikaciji, jer patovar *morsprunorum* nema mogućnost stvaranja čestica leda. Međutim i pored pouzdane identifikacije autori ističu da pojedini izolati patovara *syringae* kao i intermedijarni izolati ne stvaraju čestice leda. Kaluzna (2011) takođe navodi da pojedini izolati pv. *syringae* ne stvaraju čestice leda. Sposobnost stvaranja čestica leda bitna je odlika pv. *syringae*, jer prisustvo ove bakterije u zaraženim biljnim tkivima pospešuje njihovo izmrzavanje. Prema Klement i sar. (1984), grane kajsije je nakon inokulacije izolatima *P.s.* pv. *syringae*, neophodno izložiti niskim temperaturama (od – 5°C, tokom nekoliko dana), nakon čega nastupa razvoj simptoma. Arsenijević (1982) takođe ukazuje na značaj niskih, zimskih temperatura – mraza u prevremenom izumiranju kajsije (*P. s.* pv. *syringae*), jer mraz već oslabljenu biljku koja je u stanju mirovanja, dovodi u stanje još veće osetljivosti i stvaranja uslova za brže i lakše širenje patogena. Hinrichs – Berger (2004) takođe ističe da velike štete na šljivi nastaju posle ekstremno niskih temperatura, koje prati period mirovanja voćaka. Prema literaturnim izvorima vrsta *P. s.* pv. *syringae* stvara toksin siringomicin, a pv. *morsprunorum* rasa 1 koronatin (Crosse, 1966; Roos i Hattingh, 1983; Sobiczewski, 1984; Roos i Hattingh, 1987; Bultreys i Gheysen, 1999; Kaluzna 2011; Gašić i sar., 2012). U ovim ispitivanjima korišćenjem gljiva indikatora *Geotrichum candidum*, *Rhodotorula pilimanae* i *Saccharomyces cerevisiae* utvrđeno je da većina izolata pv. *syringae* (I grupa) stvara siringomicin. Međutim, pojedini izolati I grupe (pv. *syringae*) su negativno reagovali, odnosno nisu stvorili siringomicin (KBNS85, KBNS86, KBNS88, KBNS89, KBNS90, KBNS91, KBNS92, KBNS93, T23, T24, T25, T26, T27, T28 i T29). Varijabilnost između izolata poreklom sa koštičavih vrsta voćaka prema ovom testu navode i drugi autori. Roos i Hattingh (1983) navode da je stvaranje siringomicina karakteristika izolata pv. *syringae*, ali je i za 30,2% ispitivanih izolata (intermedijarne forme) stvaranje ovog toksina pozitivno. Kaluzna (2011) ističe da izolati pv. *morsprunorum* (rasa 1 i 2) negativno reaguju i da većina

izolata pv. *syringae* stvara siringomicin, međutim za pojedine izolate pv. *syringae* ova reakcija je negativna, što potvrđuju i naši rezultati.

Poznato je da je rasa 1 patogenog varijeteta *morsprunorum* osetljiva prema bakteriofagu A – 7, dok patogeni varijetet *syringae* ne ispoljava osetljivost (Crosse i Hingorani, 1958; Crosse i Garrett, 1963). Osetljivost prema bakteriofagama opisana je 60 – tih godina od strane Crosse i Hingorani (1958), Crosse i Garrett (1963), koji ovaj test navode kao vrlo pogodan u identifikaciji patogenih varijeteta. Prema Freigoun i Crosse (1975) utvrđeno je da i izolati rase 2 pv. *morsprunorum* ispoljavaju osetljivost prema bakteriofagama. U ovim ispitivanjima, svi izolati pv. *morsprunorum* rasa 1 (II grupa) ispoljili su osetljivost prema svim testiranim bakteriofagama (ST1/3, ST1/6, I1/2, I3/5 i I3/4), koje smo izolovali iz zemljišta prikupljenom u voćnjacima trešnje i jabuke uz obogaćenje izolatom *P. s.* pv. *morsprunorum* rasa 1 (KBNS74). Izolati I grupe (pv. *syringae*) nisu ispoljili osetljivost ni prema jednom od ispitivanih bakteriofaga. Navedene pozitivne i negativne reakcije u saglasnosti su sa navodima drugih autora, koji su primenjivali ovaj test za razlikovanje i identifikaciji patovara i rasa bakterije *P. syringae* (Crosse i Garrett, 1963; Garret, 1978; Sobiczewski, 1984; Balaž i Arsenijević, 1989).

Na osnovu dobijenih rezultata korišćenjem GATTa i raznih dodatnih testova može se zaključiti da izolati sa trešnje uniformno reaguju i da su brojni testovi korišćeni u ovim ispitivanjima vrlo pogodni kao diferencijalni za razlikovanje i identifikaciju patogenih varijeteta i rasa vrste *P. syringae*.

Proverom patogenosti na raznim test biljkama i biljci domaćinu, utvrđene su određene sličnosti ali i razlike između izolata grupe I i II.

Provera patogenosti na zelenim plodovima trešnje, višnje, ringlova i kruške se pokazala kao vrlo pouzdan i brz test za razdvajanje *P. syringae* pvs. Izolati I grupe (pv. *syringae*) na inokulisanim zelenim plodovima ovih vrsta prouzrokuju intenzivno crne pege, u okviru kojih tkivo uleže sve do koštice. Izolati II grupe (pv. *morsprunorum* rasa 1) na inokulisanim zelenim plodovima trešnje, višnje i ringlova između trećeg i petog dana prouzrokuju sitnije sive pege, koje ne uležu u tkivo. Na inokulisanim plodovima kruške ova grupa izolata nije prouzrokovala simptome. Simptomi na inokulisanim zelenim plodovima voća u potpunosti odgovaraju reakcijama koje na istim test biljkama za pv. *syringae* i *morsprunorum* navode Garrett i sar. (1966), Jones (1971), Latorre i Jones (1979), Gavrilović (2006), Kaluzna i Sobiczewski (2009), Bultreys i Kaluzna (2010), Ivanović i sar. (2009; 2012), Gavrilović i sar.

(2012), Gašić i sar. (2012), Iličić i sar. (2014). Ovi rezultati potvrđuju da zeleni plodovi voćaka predstavljaju vrlo pogodan test za razlikovanje patogenih varijeteta *syringae* i *morsprunorum*.

Kao pogodan test za proveru patogenosti izolata bakterije *P. syringae* pvs. pokazali su se i zeleni plodovi paradajza i paprike. Na pomenutim plodovima nakon 48h inokulisanim izolatima I grupe (pv. *syringae*) u zoni infiltracije suspenzije obrazuju se masne pege sa vodenastom zonom, koje trećeg dana tamne i blago uležu u tkivo, a petog dana postaju mrke. Kod izolata II grupe (pv. *morsprunorum* rasa 1) rezultat je bio negativan. Ove testove za proveru patogenosti izolata patogenih varijeteta *syringae* i *morsprunorum* navodi Gavrilović (2006) iznoseći takođe da izolati pv. *syringae* daju pozitivan, a pv. *morsprunorum* negativan rezultat. Prema tome i zeleni plodovi paradajza i paprika na osnovu ovih rezultata se mogu koristiti kao pouzdan test patogenosti za razlikovanje pv. *syringae* i *morsprunorum*.

Test provere patogenosti na mahunama boranije, sa simptomima koji se uočavaju već nakon 48h od inokulacije takođe je vrlo pogodan. Kod svih izolata I grupe (pv. *syringae*) na mestu inokulacije se obrazuju pege mrko – crvenkaste, koje blago uležu u tkivo. Kod II grupe (pv. *morsprunorum* rasa 1) simptomi se zapažaju isto nakon 48h, ali su kod ove grupe izolata pege sivkasto – mrke i bez uleganja. Ove razlike u tipu pega na mahunama, takođe su jednostavan i jasan test za razlikovanje patogenih varijeteta *syringae* i *morsprunorum*, što navode i drugi autori (Gavrilović, 2006; Gavrilović i sar., 2008; Gašić i sar. 2012).

Za proveru patogenosti svih izolata uključeni su i listovi jorgovana, odvojeni sa grančica i inokulisani korišćenjem tri metoda inokulacije (ubrizgavanje suspenzije bakterija pod pritiskom pomoću medicinskog šprica bez igle, zasecanje liske i potapanje u suspenziju bakterija i potapanje lisnih drški u suspenziju bakterija). Izolati I grupe (pv. *syringae*), kao i većina izolata II grupe (pv. *morsprunorum* rasa 1) u ovom testu, korišćenjem sva tri metoda inokulacije su pozitivno reagovali. Negativna reakcija utvrđena je samo za pojedine izolate II grupe (pv. *morsprunorum* rasa 1) iz lokaliteta Mikićevo (M4, M5, M6, M7, M8, M9, M10, M25, M26, M27, M28, M29 i EPLM1). Pri metodi ubrizgavanja suspenzije bakterija pod pritiskom, na mestima inokulacije pege kod I grupe izolata su tamnije, gotovo crne, dok je kod II grupe izolata boja pega sivkasto – mrka. Sečenjem lista do glavnog nerva i potapanjem u suspenziju bakterija, simptomi se uočavaju kod obe grupe izolata, nekroza od mesta preseka se širi na glavni i bočne nerve, a 10 – tog dana zahvata veći deo liske. Pri inokulaciji potapanjem lisnih drški simptomi su takođe uočeni kod obe grupe izolata. Osnova lisne drške

tamni (6 – tog dana), a vremenom (8 – 10 dana) bakterije počinju da se šire kroz glavni i bočne nerve, da bi do kraja ogleda (14 – ti dan) kod obe grupe ispitivanih izolata nekroza zahvatila oko 70% lisne mase. Ovakvo širenje bakterija kroz lisne nerve pokazuje da se bakterije sistemično šire u biljci što navode i drugi autori (Roos i Hattingh, 1987; Gavrilović, 2006). Rezultati dobijeni inokulacijom listova jorgovana (sva tri metoda inokulacije) u većem delu odstupaju od reakcija koje navode drugi autori. Pozitivne reakcije izolata I grupe (pv. *syringae*) odgovaraju literaturnim podacima (Scortichini i sar., 2003; Vicente i sar., 2004; Gavrilović, 2006; Gavrilović i sar., 2008; Bultreys i Kaluzna, 2010; Gavrilović i sar., 2012). Međutim, u našim ispitivanjima je i većina izolata II grupe (pv. *morsprunorum* rasa 1) dala pozitivan rezultat, a prema dostupnim literaturnim izvorima (Scortichini i sar., 2003; Vicente i sar., 2004; Gavrilović, 2006; Gavrilović i sar., 2008; Bultreys i Kaluzna, 2010; Gavrilović i sar., 2012) za pv. *morsprunorum* rasa 1, ova reakcija je negativna. Od naših izolata iz grupe pv. *morsprunorum* rasa 1, ova reakcija je negativna samo za izolate poreklom iz Mikićeva. Odnosno, samo je njihova reakcija u odnosu na test patogenosti na listovima jorgovana u skladu sa navedenim literaturnim izvorima. Pozitivna reakcija većine naših izolata II grupe (pv. *morsprunorum* rasa 1) ukazuje na veliku heterogenost izolata pv. *morsprunorum* rase 1 i da u pogledu patogenosti i specijalizacije između izolata postoji značajna varijabilnost.

U cilju dokazivanja patogenosti izolata korišćeni su i sejanci podloga raznih voćnih vrsta: divlje trešnje, magrive, divlje šljive i divlje kruške. Izolati I grupe pv. *syringae* (KBNS93, T1, T29, K1, Lj1 i M15), četvrtog dana na svim inokulisanim voćnim podlogama su prouzrokovali simptome. Oko mesta zarezane nekroze se širi i zahvata veći deo biljke, koje crne, vršni delovi se povijaju, a kod pojedinih biljaka dolazi i do opadanja listova. Kod II grupe izolata pv. *morsprunorum* rasa 1 (S1, S44 i M25) razvoj simptoma je isti na svim biljnim vrstama, s tim da je širenje nekroze sporije (u odnosu na izolate I grupe) i da ne prouzrokuju simptome na inokulisanim biljkama divlje šljive. U literaturnim izvorima nismo našli podatke o veštačkoj inokulaciji sejanaca voćnih podloga. Slična ispitivanja, ali na klijancima navode Vicente i sar. (2004) i Gavrilović (2006). Vicente i sar. (2004) su proučavali patogenost izolata pv. *syringae* i *morsprunorum* rasa 1 i 2 na klijancima divlje trešnje, navodeći pri tome pozitivne reakcije za oba patogena varijeteta i rase, što se slaže sa našim rezultatima. Ovi autori takođe navode veću agresivnost izolata patovara *syringae*, u odnosu na pv. *morsprunorum* rase 1. U odnosu na rase pv. *morsprunorum*, izolati rase 1 su ispoljili veću agresivnost u odnosu na rasu 2. Gavrilović (2006) je vršio proveru patogenosti na klijancima kruške sorte Krasanka. Prema dobijenim rezultatima, samo izolati pv. *syringae*

prouzrokuju simptome na klijancima kruške i biljčice brzo propadaju (za 2 – 3 dana), uz intenzivni pojavu mrkocrne boje stabaoca i kotiledonih listova.

Ovi rezultati naših ispitivanja potvrđuju da je širenje bakterija moguće i putem podloga, koje mogu biti zaražene. Slične rezultate navodi i Luz (1997), ističući da sadni materijal može biti jedan od glavnih izvora inokuluma bakterioznog raka u plantažama divlje trešnje. Prema Crosse (1954; 1955) i Cameron (1962) u epidemiologiji ovih patogena naročito veliki značaj ima zdravstveno stanje sadnica u rasadnicima i podloga koje se koriste za kalemljenje. Hattingh i Roos (2008) takođe ukazuju da sadni materijal u rasadnicima može biti inficiran preko pupoljaka ili podloge. Pri čemu se simptomi bakterioznog raka uglavnom ispolje tek nakon presađivanja sadnica na stalno mesto, jer u rasadnicima gde su uslovi optimalni, infekcije se mogu održati u latentnom stanju.

Rezultati inokulacija izvedenih u periodu mirovanja (novembar, decembar, januar, 2013 – 2015.) na reznicama (dvogodišnje grančice) trešnje, pokazuju da su svi izolati (KBNS74, KBNS79 – pv. *morsprunorum* rasa 1, KBNS87, KBNS93 – pv. *syringae*) podjednako patogeni na raznim sortama trešnje (Burlat, Summit, Hedelfigenska i Germerzdorfska) i da su reznice pogodan test za proveru patogenosti izolata *P. syringae* pvs. U većini slučajeva najveća dužina nekroze je zabeležena na sortama Burlat i Summit u kombinaciji sa izolatima I grupe (pv. *syringae*), a u pojedinim slučajevima i sa izolatima II grupe (pv. *morsprunorum* rasa 1) (Tab. 12, 14, 15, 17). Najmanje dužine nekroze uglavnom su konstatovane kod sorti Germerzdorfska i Hedelfigenska inokulisanih izolatima pv. *morsprunorum* rasa 1 (Tab. 14; 17). Dobijene rezultate potvrđuju ispitivanja Sobiczewski i Jones (1992), koji su takođe radili inokulacije na reznicama jednogodišnjih grančica trešnje (decembar – mart). Prema rezultatima ovih autora obe grupe izolata prouzrokuju simptome na inokulisanim grančicama i ističu da nešto veći prečnik nekroze prouzrokuje pv. *syringae*, što se slaže sa rezultatima naših ispitivanja. Veću agresivnost izolata pv. *syringae* ističu i drugi autori (Crosse i Garrett, 1966; Kennely i sar., 2007).

Pored klasičnih fenotipskih karakteristika, uključujući i razne testove patogenosti, identifikacija i karakterizacija izolata sa trešnje vršena je i primenom raznih molekularnih metoda.

MLST analiza za izolate dobijene 2012. godine sa lokaliteta Gornji Tavankut (KBNS71 – 84) i Selenča (KBNS85 – 94) korišćenjem gena *gyrB*, *rpoD*, *gapA* i *gltA* pokazala je prisustvo dva patovara *P. syringae* koji su i na osnovu klasičnih metoda identifikacije

okarakterisani kao *P. s. pv. syringae* i *P. s. pv. morsprunorum* rasa 1. MLST analiza ispitivanih izolata u poređenju sa sojevima H1 – *P. s. pv. syringae* (Süle i Seemüller, 1987) i *P. syringae* intermedijarni izolati (V – 85, V – 88, V – 109) (Balaž i Arsenijević, 1989), koji su na osnovu ispitivanja *syrB* gena potvrđeni kao *P.s. pv. syringae*, ukazuju na postojanje genetskog diverziteta populacije ovih patogena, jer se pri korišćenju navedenih gena ovi izolati razlikuju od ispitivanih izolata sa trešnje (KBNS71 – 94).

Ova ispitivanja su takođe pokazala da je populacija izolata *pv. morsprunorum* rasa 1 (KBNS71 – 84) i *pv. syringae* (KBNS 85 – 94) poreklom sa trešnje homogena. Svakako ova ispitivanja bi trebalo nastaviti uz korišćenje većeg broja izolata, različitog geografskog porekla i sa različitih domaćina kako bi se moglo govoriti o genetskom diverzitetu između izolata, koja tokom ovog rada nisu bila u mogućnosti da se izvedu. Navedenu metodu u identifikaciji i karakterizaciji izolata *P. syringae* pvs. sa koštičavih voćnih vrsta i lešnika navode Kaluzna i sar. (2010). Autori ističu da se primenom MLST metode uz korišćenje gena *gyrB*, *gapA*, *gltA*, *rpoD* jasno mogu utvrditi razlike između izolata *pv. syringae* kao i *pv. morsprunorum* rase 1 i 2. Rezultati dobijeni tokom ovih ispitivanja su u saglasnosti sa navodima pomenutih autora.

Analiza rezultata m – PCR primenjenog u ovim istraživanjima pokazala je mogućnost simultane detekcije gena za sintezu i sekreciju siringomicina. Detekcija gena *syrB* i *syrD* utvrđena je kod ukupno 79 izolata (I grupa), koji su i prema GATTA i dodatnim testovima identifikovani kao *pv. syringae*, od ukupno 155 ispitivanih izolata. Fragmenti veličine 752bp za *syrB* i 1040bp za *syrD* detektovani su kod 70 izolata što čini 45,6% od ispitivanih, a samo *SyrB* je detektovan kod 9 izolata što čini 5,8% (Tab. 19). Navedenu metodu simultane detekcije oba gena navodi Rico i sar. (2006) pri identifikaciji izolata *P. s. pv. syringae* poreklom sa pasulja. Autori ističu da je primena simultane detekcije uz korišćenje većeg broja gena, precizna i brza metoda, što potvrđuju i naši rezultati.

Odvojenu primenu prajmera gena sinteze i sekrecije siringomicina navodi veći broj autora (Soresten i sar., 1998; Bultreys i Gheysen, 1999; Scortichini i sar., 2003; Gašić i sar., 2012). Bultreys i Kaluzna (2010) ukazuju da pojedini izolati *pv. syringae* ne moraju posedovati oba gena *syrD* ili *syrB* što je takođe potvrđeno i u našim ispitivanjima za pojedine izolate *pv. syringae*, kod kojih nije detektovan gen za sekreciju siringomicina (T20, T1, T23, T24, T25, T26, T27, T28, T29). Kod izolata T23, T24, T25, T26, T27, T28, T29 ni u biotestu nije dokazano stvaranje siringomicina, što se može protumačiti odsustvom ili supresijom gena

za sekreciju siringomicina. Međutim, kod izolata T20 i T1 prisustvo siringomicina utvrđeno je u slučaju svih ispitivanih indikatora, iako nije amplifikovan gen za sekreciju siringomicina. Nedostatak amplikona je verovatno uzrokovan nedovoljnom komplementarnošću ovog gena sa primenjenim prajmerom. Kod izolata kod kojih je rezultat biotesta takođe bio negativan (KBNS85, KBNS86, KBNS88, KBNS89, KBNS90, KBNS91, KBNS92, KBNS94), primenom m – PCR uspešno su detektovana oba gena (*syrB/syrD*), što je ukazalo na veću osetljivost PCR metode od biotesta.

Gen za sintezu koronatina i fragment veličine 650bp koji odgovara *cfl* genu, detektovan je kod svih 76 ispitivanih izolata (II grupa), koji su i po biohemijsko – fiziološkim metodama identifikovani kao *P. s. pv. morsprunorum* rasa 1. Od ukupnog broja ispitivanih izolata *pv. morsprunorum* rasa 1 je čini 49,03%. Metodu detekcije *cfl* gena pri identifikaciji *pv. morsprunourm* rase 1 navode Bereswill i sar. (1994); Gilbert i sar. (2009); Kaluzna i sar. (2010); Bultreys i Kaluzna (2010), mada ističu da pojedini izolati *pv. morsprunorum* rase 1 ne moraju posedovati *cfl* gen.

Genetske metode rep – PCR (BOX, REP i ERIC) jasno ukazuju na razlike između patogenih varijeteta *syringae* (I grupa) i *morsprunorum* rasa 1 (II grupa) (Grafik 6, 7, 8, 9, 10). Korišćenjem prajmera BOX, ERIC, REP i (GTG)<sub>5</sub> izolati *pv. syringae* i *morsprunorum* rase 1 se jasno izdvajaju u dve različite grupe. Metode rep – PCR kao pogodne u identifikaciji ovih patogena u svetu i kod nas navodi veći broj autora (Weingart i Völksch, 1997; Scortichini i sar., 2003; Vicente i sar., 2004; Vicente i Roberts, 2007; Puławska i sar., 2008; Gilbert i sar., 2009; Ivanović i sar., 2009; 2012, Gavrilović i sar., 2012; Gavrilović i sar., 2013).

Analizom zbirnog dendrograma rep – PCR razlike između I i II grupe izolata su bile 58%. Ispitivani izolati sa trešnje u okviru I grupe *pv. syringae* nisu ispoljili međusobne razlike, dok je između njih i soja T6 sa trešnje utvrđena razlika od 19%, a soja Tk21 sa uljane tikve od 25%. Sojevi H – 1 i V – 85 sa višnje i V – 109 sa trešnje formirali su poseban subklaster sa 37% razlike. Na osnovu rep – PCR kod *pv. syringae* utvrđene su razlike između ispitivanih izolata i sojeva sa drugih lokaliteta i vremena izolacije sa istog domaćina – trešnje, kao i razlike u odnosu na druge domaćine – višnje i uljane tikve. Razlike manje od 5% zabeležene kod izolata *pv. morsprunorum* rasa 1, a razlike između ovih izolata i referentnog soja CFBP2119 istog patogenog varijeteta iznosile su 24%, što ukazuje na nizak diverzitet populacije ovih patogena. Ispitivani izolati su ispoljili neznatnu heterogenost populacije na



osnovu rep – PCR u slučaju oba patogena varijeteta. Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima drugih autora. Prema Vicente i sar. (2004), Vicente i Roberts (2007) koji ističu da je primenom rep – PCR između izolata pv. *morsprunorum* rase 1 i 2, utvrđena gotovo homogena populacija, dok je u slučaju izolata pv. *syringae* zabeleženo postojanje veće genetske varijabilnosti između izolata poreklom sa trešnje i divlje trešnje. Isto navode i Gilbert i sar. (2009) u identifikaciji izolata pv. *syringae*, *morsprunorum* rase 1 i 2 i pv. *avii*. Scortichini i sar. (2003) ispitujući izolate bakterije *P. s. pv. syringae* poreklom sa različitih drvenastih i zeljastih biljaka, ističu da među njima postoji genetski diverzitet. Međutim, pojedini autori ističu da primena PCR korišćenjem samo jednog ili dva seta prajmera nije dovoljna kako bi bilo moguće razlikovati izolate i rase patogena. Weingart i Völksch (1997) ukazuju da se izolati patovara *morsprunorum* poreklom sa šljive primenom REP i ERIC – PCR u pojedinim fragmentima nisu razlikovali od izolata *P. savastanoi*, dok Menard i sar. (2003) ističe da *P. s. pv. persicae* može razlikovati od izolata poreklom sa divlje trešnje jedino upotrebom ERIC i BOX – PCR, a nikako REP – PCR. Soj 765R *P. s. pv. lachrymans*, koji je korišćen u ovim istraživanjima kao jedan od referentnih, pokazao je veću sličnost sa sojem CFBP2119 i izolatima *morsprunorum* rase 1, grupišući sa njima u poseban klaster, iako se uvek odvajao u poseban subklaster (ERIC, BOX) ili granu (REP), što je u saglasnosti sa rezultatima Menard i sar. (2003).

Ivanović i sar. (2009) na osnovu primene BOX – PCR metode ukazuju da izolati *P. syringae* pvs. poreklom iz Srbije pokazuju veliku varijabilnost u zavisnosti od domaćina sa kojeg su izolovani. Gavrilović i sar. (2012) u identifikaciji bakterija *P. syringae* pvs. poreklom sa trešnje, navodi da korišćenje REP – PCR metode omogućuje sigurnu detekciju izolata pv. *morsprunorum* rase 1, ali se u slučaju izolata pv. *syringae* javlja veća genetska varijabilnost, zbog čega je pored ove metode potrebno u ispitivanja uključiti i neke druge. Slično ističu i drugi autori (Vicente i Roberts, 2007; Kaluzna i sar., 2010). Ova varijabilnost zapažena od strane navedenih autora je pre svega uslovljena geografskim poreklom ispitivanih izolata.

Poznato je da između izolata bakterije *P. s. pv. syringae* postoji veća genetska varijabilnost u odnosu na izolate pv. *morsprunorum* (različito geografsko poreklo, domaćini) (Khayamie i sar., 2009; Afrose i sar., 2014).

RAPD metoda korišćenjem većeg broja prajmera je bila uspešnija za poređenje ispitivanih izolata od rep – PCR. Tokom ovih ispitivanja RAPD analiza je primenjena

korišćenjem 11 prajmera. Kao prajmeri sa veoma lošom rezolucijom bili su AF14, AX16, AG15, AK16 i OPA10. Prajmeri AP10 i BC318 su amplifikovali različite profile za *P. s. pv. syringae* i *P.s. pv. morsprunorum* rasa 1, ali nisu ispoljili razlike među izolatima unutar patogenog varijeteta. Prajmer SPH1, a posebno novodizajnirani prajmeri DJP17, DJ15 i DJ16 su amplifikovali profile visoke rezolucije koji su istakli razlike između izolata. Tokom ovih ispitivanja na osnovu analize profila svakog prajmera ponaosob utvrđene su razlike između ispitivanih izolata poreklom sa trešnje (Grafik 11, 12, 13, 14). Na bazi zbirnog dendograma RAPD analize na osnovu 4 prajmera (SPH1, DJP17, DJ15, DJ16) (Grafik 15) utvrđeno je da između ispitivanih izolata *pv. syringae* postoje razlike od 0 do 24%, a u poređenju sa sojem KFB0103 (*pv. syringae*) 41%. Razlike do 15% su zabeležene kod izolata *pv. morsprunorum* rasa 1, a 36% u odnosu na referentni soj CFBP2119. Dobijeni rezultati RAPD analize ukazuju da u okviru obe grupe ispitivanih izolata u populaciji postoji određena heterogenost, ali je genetski diverzitet izraženiji kod *pv. syringae*. Soj 765R *P. s. pv. lachrymans* je pokazao veću sličnost sa *pv. morsprunorum* izolatima i sojem CFBP2119, formirajući zajednički klaster, ali poseban subklaster, sa razlikom od oko 42,5%. Ova metoda je korišćena u ranijim istraživanjima *P. syringae* sa različitim domaćina u Srbiji (Iličić i sar., 2014). Identifikaciju izolata i postojanje većeg genetskog diverziteta u okviru grupe *pv. syringae* poreklom sa koštičavih voćnih vrsta, lešnika i maslina korišćenjem RAPD analize navode Khayamie i sar. (2009). Mogućnost primene RAPD analize za procenu genetskog diverziteta izolata *P. s. pv. syringae* navode i Afrose i sar. (2014), koji ističu da naročito velik značaj za diverzitet među izolatima ima geografsko poreklo, region i domaćin sa kojeg su izolovani. Prema Williams i sar. (1990) ova analiza može ukazati i na određene genotipske promene bakterije *P. syringae*.

Epidemiologija *P. syringae* pvs. patogena koštičavih vrsta voćaka je vrlo kompleksa. Brojni istraživači širom sveta su radili na proučavanju biologije i epidemiologije ovih patogena (Crosse, 1957; 1959; Cameron, 1962; Crosse, 1966; Crosse i Garrett, 1966; Crosse i sar., 1966; Crosse i Garrett, 1970; Lattore i Jones, 1979; Hattingh i sar. 1989). Ovu problematiku dodatno komplikuje činjenica da sušenje koštičavih vrsta voćaka prouzrokuju četiri patovara *P. s. pv. syringae*, *P. s. pv. morsprunorum* (rasa 1 i 2), *P. s. pv. persicae* i *P. s. pv. avii*, iako najveći značaj imaju *P. s. pv. syringae* i *P. s. pv. morsprunorum*. Osim toga, epidemiologija patovara *syringae* i *morsprunorum* na koštičavim voćnim vrstama je vrlo slična (Hattingh i sar. 1989). Zbog svega navedenog, želeli smo da ispitamo neke od najvažnijih epidemioloških karakteristika ovih patogena u našim agroekološkim uslovima. U tom cilju ispitivanja smo izvodili kroz poljske inokulacione oglede, da bi utvrdili kada je

trešnja najpodložnija ostvarenju infekcija i širenju patogena. Upoznavanje određenih epidemioloških karakteristika u našim uslovima je bitno, jer doprinosi pravilnijoj primeni adekvatnih mera zaštite. Cameron (1962), Crosse (1966), Crosse i Garrett (1966), Crosse i sar. (1966), Crosse i Garrett, (1970), Hattingh i sar. (1989), Kennelly i sar. (2007), Scortichini (2010) daju iscrpne podatke o epidemiologiji ovih patogena u svetu. Većina autora navodi da *P. syringae* pvs. imaju zimsku fazu bolesti, koja se odvija u kori debla i grana i letnju koja je vezana za listove i druga zelena tkiva. Crosse (1966) ističe da masovne infekcije bakterijama *P. syringae* i *P. morsprunorum* nastaju u fazi pred opadanje i tokom opadanja lišća i to preko lisnih ožiljaka, pupoljaka, kratkih rodnih grana i kroz razne mehaničke povrede. U proleće kretanjem vegetacije prezimele bakterije se iz drvenastih delova tkiva šire i vrše infekcije zeljastih biljnih organa. Crosse (1957, 1959) ističe i značaj epifitne faze patogena, koja se odvija na pupoljcima i listovima tokom celog vegetacionog perioda, sa najvećom brojnošću populacije tokom proleća i jeseni, predstavljajući tako izvor inokuluma za infekcije koje se ostvaruju tokom perioda mirovanja. Kroz ovaj rad takođe smo ispitivali da li se i u našim agroekološkim uslovima ovi patogeni održavaju kao epifiti. U tom cilju vršili smo izolaciju epifitne mikoflore iz lokaliteta u kojima je utvrđeno prisustvo bakterioznog sušenja (Mikićevo, Ljutovo, Gornji Tavankut i Selenča). Veća brojnost epifitne bakterijske populacije utvrđena je februaru i martu (zdravi pupoljci) u odnosu na izolacije rađene tokom leta (zdravi listovi). Navedeni rezultati ispitivanja potkrepljuju rezultati većeg broja autora (Crosse, 1966; Latorre i Jones, 1979; Moore, 1988; Scortichini, 2010; Peter, 2014) koji ističu da je brojnost epifitne populacije bakterija najveća tokom proleće i jeseni, a da se sa nastupanjem visokih temperatura (leto) brojnost epifitne populacije smanjuje. U lokalitetima (Gornji Tavankut i Ljutovo) u epifitnoj populaciji je utvrđeno samo prisustvo pv. *syringae*. U ovim lokalitetima i sa rak rana i listova (G.Tavankut), takođe je izolovan samo pv. *syringae*. U lokalitetima Mikićevo i Selenča u epifitnoj bakterijskoj populaciji utvrđeno je prisustvo oba patovara (*syringae* i *morsprunorum* rasa 1). U istim lokalitetima, oba patovara su izolovana i sa rak rana, a iz pega na listovima samo *P. s. pv. morsprunorum* rasa 1.

U cilju utvrđivanja fenofaza trešnje kada je trešnja najpodložnija ostvarenju infekcije inokulacione oglede smo izvodili gotovo tokom cele godine (2013 – 2014). Prvi ogled je izvođen inokulacijom jednogodišnjih grana i mladara na četiri sorte (Burlat, Germerzdorfska, Hedelfigenska i Droганova žuta), a drugi na debljim granama (dvo – trogodišnje) na sorti Summit.

U prvom ogledu (jednogodišnje grane / mladari, 4 sorte) prvi pozitivan rezultat je dobijen pri inokulacijama izvedenim u oktobru (24.10.2013.). Pozitivan rezultat je dobijen samo sa sojevima pv. *morsprunorum* rasa 1 (KBNS74, KBNS79), kod kojih je prosečna dužina nekroze bila od 1,36 do 2,70 cm (ocena – 30.5.2014.) (Tab. 20). Ovaj rezultat, odnosno sposobnost pv. *morsprunorum* rase 1 da prouzrokuje patološke promene pri oktobarskoj inokulaciji, može se povezati sa navodima Crosse (1966) koji ističe da u ovom periodu *P. morsprunorum* vrši infekciju letorasta i mlađih grančica pretežno preko lisnih ožiljaka, posle opadanja lišća ili raznih mehaničkih oštećenja (Engleska). U našim ispitivanjima tokom oktobra srednja mesečna temperatura je bila 13,6°C a suma padavina 66,2 mm, što je u saglasnosti sa Shanmuganathan (1962), da bakterija *P. morsprunorum* infekcije najčešće ostvaruje pri temperaturi od oko 15°C. Crosse i sar. (1966) navode da inokulacije urađene tokom oktobra meseca daju pozitivne rezultate i u slučaju *P. syringae* i *P. morsprunorum*, ali u pogledu dužine nekroze mnogo jači stepen infekcije je utvrđen za grupu izolata *P. morsprunorum*, što je u skladu sa našim rezultatima.

Sa sojevima pv. *syringae* (KBNS87, KBNS93) prve pozitivne rezultate dobili smo tek u novembarskim inokulacijama (20.11.2013.). Inokulacije sa sojevima pv. *morsprunorum* rase 1 (KBNS74, KBNS79), takođe su bile pozitivne. Prosečna dužina nekroze novembarskih inokulacija je bila od 2,17 do 3,35 cm (ocena – 30.5.2014.). Najduže nekroze su bile na sorti Burlat (3,03 – 3,35 cm), a najmanje na sorti Germerzdorfska (2,17 – 2,52 cm), kod svih ispitivanih sojeva (Tab. 21). Pozitivni rezultati su dobijeni i pri inokulacijama izvedenim u januaru (18.1.2014.), kod oba patovara i na svim ispitivanim sortama (Tab. 22), mada je prosečna dužina nekroze (1,44 – 2,31 cm, ocena – 30.5.2014.) bila manja u odnosu na novembarsku inokulaciju. Kod inokulacija u martu u fazi bubrenja pupoljaka (14.3.2014.), rezultati inokulacija su i dalje bili pozitivni na svim sortama u kombinacijama sa svim sojevima (Tab. 23), ali je prosečna dužina nekroze bila još manja (1,22 – 2,13 cm, ocena – 15.6.2014.) u odnosu na januarske inokulacije. U januarskoj pa i u martovskoj inokulaciji nije bilo značajnih razlika u dužini nekroze između sojeva pv. *syringae* i *morsprunorum* rase 1 i ispitivanih sorti. Prema dobijenim rezultatima, najveće dužine nekroze su zabeležene pri novembarskim inokulacijama (2,17 – 3,35 cm). U prilog ovome idu navodi brojnih autora (Cameron, 1962; Crosse, 1966; Crosse i Garrett, 1970; Klement i sar., 1972; Arsenijević, 1980; Cao i sar., 2013) da koštičave vrste voćaka postaju osetljive prema *P. syringae* pvs. sa nastupanjem perioda mirovanja, kada su voćke oslabljene, jer su u ovom periodu fiziološki procesi (odbrambeni mehanizmi) svedeni na minimum. Navedeni autori se uglavnom slažu da

se nakon ostvarenih infekcija u jesen, širenje patogena zaustavlja sa nastupanjem zimskih temperatura, da bi se u periodu između završetka niskih, zimskih temperatura i početka intenzivnog razvoja vegetacije u proleće, širenje bakterija nastavilo i bilo vrlo intenzivno (maksimum tokom faze cvetanja), što se i manifestuje pojavom aktivnih rak rana.

Prema Crosse i Garrett (1970) grane trešnje i šljive su u periodu mirovanja posebno osetljive. Arsenijević (1980) vršeći inokulacije na stablima kajsije, takođe ukazuje da je najveća uspešnost veštačkih inokulacija urađenih tokom novembra i decembra, naročito ukoliko ovaj period prati relativno toplo vreme 15 – 18°C posle čega nastupaju niske temperature, od – 10°C do – 15°C. Klemet i sar. (1972) takođe navode da se najveće patološke promene na inokulisanim stablima kajsije dešavaju pri inokulacijama izvršenim u periodu mirovanja, kada dolazi do potpune nekroze floema, kambijuma i ksilema. Na osnovu daljih ispitivanja Klement i sar. (1984) zaključuju da su veštačke inokulacije ovom bakterijom moguće samo ukoliko se kajsija (delovi stabla) izloži temperaturama od – 5°C u trajanju od 5 – 10 dana. Uz objašnjenje da se bakterije pre izlaganja niskim temperaturama intenzivno umnožavaju pri čemu troše šećere u tkivu floema, što rezultira redukcijom šećera od 19 – 48%. Smanjenem količine šećera u zaraženom floemu i kambijumu, ova tkiva postaju osetljiva prema oštećenjima od mraza i tako stresirana postaju još osetljivija prema patogenu. Pozitivni rezultati koje smo dobili u novembarskim inokulacijama (pv. *syringae*) mogu se objasniti relativno povoljnim vremenskim uslovima, jer je nakon inokulacije usledio jedan period viših temperatura (8 – 10°C), a nakon toga temperature su se spustile na – 2 °C do – 5°C.

Smanjenje dužine nekroze u martovskim (pa i januarskim) inokulacijama u odnosu na novembarske, moglo bi se objasniti fiziološkim stanjem voćaka u fazi prelaska iz stanja mirovanja u fazu kretanja vegetacije. Kod voćaka se u ovoj fazi povećava količina vode u ćelijama, rezervne materije iz starijih ograna kreću u mlađe delove voćke i u ćelijskom soku počinje polimerizacija šećera u skrob, što utiče na povećanje otpornosti biljke domaćina prema patogenima (Stanković, 1973).

Ispitivanje mogućnosti ostvarenja infekcije na trešnji bakterijama *P. syringae* pvs. vršeno je i u periodu vegetacije. Sve inokulacije urađene u ovom periodu (6.6.2013., 17.9.2013. i 16.4.2014.) su bile negativne. Negativne rezultate inokulacija koštičavih voćnih vrsta tokom vegetacije (sa oba patovara) navode i drugi istraživači (Shanmuganathan, 1962; Crosse i sar., 1966, Crosse, 1966; Crosse i Garret, 1970; Hinrichs – Berger, 2003) ističući pri

tome da su grane trešnje i drugih koštičavih voćnih vrsta u periodu vegetacije visoko otporne prema *P. syringae* pvs. Ove literaturne podatke potvrđuju i rezultati naših ispitivanja.

Drugi ogled je izveden na sorti Summit (inokulacija dvo – trogodišnjih grana). Oktobarske inokulacije (24.10.2013.) u ovom ogledu su bile negativne, sa oba patogena varijeteta. Prvi pozitivan rezultat je evidentiran u novembarskim inokulacijama (20.11.2013.), pri čemu je utvrđena veća agresivnost patovara *syringae*. Sojevi pv. *syringae* (KBNS87 i KBNS93) su prouzrokovali dužinu nekroze od 2,48 do 2,58 cm, a sojevi pv. *morsprunorum* rasa 1 (KBNS74, KBNS79) od 2,30 do 2,33 cm (ocena – 30.5.2014.) (Tab. 25). Ovi rezultati bi se mogli dovesti u vezu sa navodima Bultreys i Kaluzna, (2010) koji ističu da pv. *syringae* uglavnom vrši infekcije debljih grana, u odnosu na pv. *morsprunorum* čija se epidemiologija uglavnom vezuje za tanje grane i lisne ožiljke. U januarskim inokulacijama (18.1.2014.), rezultat je takođe bio pozitivan, ali je u odnosu na novembarsku inokulaciju dužina nekroze bila manja (1,60 – 1,82 cm, ocena – 30.5.2014.) i nije postojala značajnija razlika u patogenosti između sojeva *syringae* i *morsprunorum* rasa 1 (Tab. 26). Dalje inokulacije u ovom ogledu, vršene su tokom marta (period bubrenja pupoljka – 14.3.2014.), u periodu vegetacije (6.6.2013., 17.9.2013. i 16.4.2014.) i u periodu opadanja lišća (24.10.2013.). Tokom ovog celokupnog perioda rezultat inokulacije je bio negativan. Ovi rezultati su u skladu sa navodima većeg broja autora (Shanmuganathan, 1962; Crosse i sar., 1966, Crosse, 1966; Crosse i Garret, 1970; Hinrichs – Berger, 2003).

U oba ogleda pozitivan rezultat inokulacija se manifestovao pojavom rak rana, koje su se najintenzivnije širile u periodu mart – april do prve dekade maja. Prestanak širenja rak rana utvrđen je krajem maja početkom juna, pri čemu ivice rak rana jasno odvajaju zdrave od bolesnih delova tkiva (kore). Dobijeni rezultati (vreme ostvarenja infekcije, simptomi, širenje i prekid razvoja rak rana) odgovaraju navodima brojnih autora koji su u zasadima trešnje pratili bakteriozno sušenje (*P. s. pv. syringae* i *P. s. pv. morsprunorum* rasa 1) (Cameron 1962; Crosse 1966; Hattingh i Roos 2008; Spotts i sar., 2010).

Uzimajući u obzir ranija istraživanja Crosse i Garrett (1966) kojima je dokazano da bakterije vrše infekcije u periodu opadanja listova preko lisnih ožiljaka (Engleska) i mi smo u poljskim uslovima vršili inokulacije preko lisnih ožiljaka (premazivanjem suspenzijom bakterija  $10^9$  cfu/ml). Za oba patovara rezultati ovih inokulacija su bili negativni. Suprotno našim rezultatima Crosse i Garrett (1966) u Engleskoj su pri inokulaciji lisnih ožiljaka dobili pozitivan rezultat i to u slučaju *P. morsprunorum* uspešnost je bila čak 93 – 98%, a kod *P.*

*syringae* svega 10%. Ispitivanja smo nastavili i u periodu vegetacije, inokulacijom zeljastih biljnih organa, u skladu sa navodima Crosse (1966). Inokulacije smo vršili u fazi bubrenja pupoljaka (skidanjem pupoljaka i premazivanjem suspenzijom bakterija  $10^9$  cfu/ml), kao i tokom faze cvetanja i razvoja plodova (prskanjem suspenzijom bakterija  $10^9$  cfu/ml). U svim slučajevima rezultati inokulacija su bili negativni. Negativni rezultati inokulacionih oglada koje smo izvodili preko lisnih ožiljaka, pupoljaka, cvetova i plodova, verovatno su delom uslovljeni otpornošću voćaka sa kretanjem vegetacije, a delom i specifičnošću naših agroekoloških uslova (količina padavina, temperatura).

Gajenje manje osetljivih sorti trešnje predstavlja jednu od najznačajnijih mera vezanu za zaštitu od prouzrokovala bakterioznog sušenja. Veći broj autora u svetu se bavi proučavanjem i iznalaženjem manje osetljivih sorti, kao i kombinacijama sorti i raznih podloga za trešnju prema *P. syringae* pvs. (Garrett, 1986; Allen i Dirks, 1978; Young, 1987; Thornton i Nugent, 2002; Carroll i sar., 2010; Spotts, 2001; Spotts i sar., 2010). Navedeni autori ističu da prema bakterioznom raku ne postoje otporne sorte trešnje, a kao manje osetljive uglavnom se navode Corum, Sam, Sue, Regina i Rainier. Od podloga za trešnju prema Spotts (2001), Thornton i Nugent (2002) posebno je osetljiva Gisela 5 i 6. To su slabo bujne podloge, koje se poslednjih godina kod nas i u svetu sve više koriste u intenzivnim zasadima i plantažama trešnje.

Poslednjih godina i kod nas se u proizvodnji sve više uvode nove sorte i podloge za trešnju, za koje ne postoje podaci u pogledu osetljivosti prema prouzrokovalima bakterioznog sušenja. Kroz ovaj rad u uslovima veštace inokulacije jednogodišnjih ukorenjenih sadnica dobijen je uvid o osetljivim i manje osetljivim sortama trešnje i pojedinim sortama višnje prema sojevima *P. s. pv. syringae* (KBNS93) i *P. s. pv. morsprunorum* rasa 1 (KBNS74) (Tab. 27). U prvu grupu kao najosetljive prema oba patovara (*syringae* i *morsprunorum* rasa 1) uključene su sorte trešnje Katalin, Linda, Summit, New Star i Burlat sa prosečnom dužinom nekroze od 1,99 do 2,37 cm. U drugu grupu kao srednje osetljive prema oba patovara izdvojile su sorte višnje Erdi Botermo i sorte trešnje Drojanova žuta, Carmen, Germerzdorfska i Rana Noara (prosečna dužina nekroze 0,98 – 1,82 cm). U treću grupu su svrstane slabo osetljive sorte višnje Španska i Ujfehetyi firtoš i sorta trešnje Rita, kod kojih je prosečna dužina nekroze bila 0,82 do 0,87 cm.

Na osnovu navedenih rezultata, ovakva ispitivanja i dalja proučavanja na utvrđivanju manje osetljivih sorti trešnje, kao i kombinacija podloga i sorti za trešnju u našoj zemlji bi svakako trebalo nastaviti.

## 8. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata dobijenih tokom ovih ispitivanja može se zaključiti sledeće:

- Bakteriozno sušenje trešnje poslednjih nekoliko godina u mladim zasadima i plantažama trešnje predstavlja značajan problem u proizvodnji ove perspektivne voćne vrste;
- Monitoringom sprovedenim u periodu od 2012 – 2015. zaključeno je da su mlade voćke najugroženije, jer je pojava bakterioznog sušenja u jačem ili slabijem intenzitetu, konstatovana samo u mladim zasadima (do 3 godine starosti) u kojima su voćke pretrpele određene stresogene uslove (Selenča, Gornji Tavankut, Donji Tavankut, Mikićevo, Ljutovo), kao i u rasadničkoj proizvodnji sadnica trešnje u Kanjiži;
- Izolacijama na standardne hranljive podloge, iz prikupljenih obolelih uzoraka trešnje, kao i sa zdravih pupoljaka i listova trešnje (epifitna populacija), dobijeni su brojni izolati bakterija *P. syringae* pvs. od kojih je za dalja ispitivanja odabrano 155 izolata;
- Identifikacija dobijenih izolata izvršena je na osnovu fenotipskih i genotipskih metoda. Na osnovu LOPAT testova izolati pripadaju Ia grupi fluorescentnih vrsta *Pseudomonas syringae*. Prema GATTa testovima utvrđene su dve grupe izolata u okviru vrste *P. syringae*: I grupa ( $G^+A^+T^-Ta^-$ ) i II grupa ( $G^-A^-T^+Ta^+$ ). Dodatni testovi su potvrdili GATTa testove, na osnovu kojih je zaključeno da sušenje mladih stabala trešnje prouzrokuju dve grupe bakterije *P. s. pv. syringae* (I grupa) i *P. s. pv. morsprunorum* rasa 1 (II grupa). Među ispitivanim izolatima nije bilo odstupanja u pogledu fenotipskih karakteristika u okviru iste grupe, osim sposobnosti stvaranja siringomicina pojedinih izolata I grupe (*pv. syringae*);
- Proverom patogenosti na raznim test biljkama i biljci domaćinu utvrđene su razlike, ali i određene sličnosti između izolata I i II grupe. Jasne razlike između grupa izolata utvrđene su pri inokulaciji zelenih plodova trešnje, višnje, ringlova i kruške, paradajza, paprike i mahuna boranije. Pri inokulaciji odvojenih listova jorgovana izolati I grupe (*pv. syringae*), kao i većina izolata II grupe (*pv. morsprunorum* rasa 1) su pozitivno reagovali, što ukazuje na heterogenost populacije bakterije *P. s. pv. morsprunorum* rasa 1;
- Pri inokulaciji sejanaca voćnih podloga (divlja trešnja, magriva, divlja šljiva, divlja kruška) svi izolati *pv. syringae* su prouzrokovali karakteristične patološke promene na podlogama svih voćnih vrsta, a izolati *pv. morsprunorum* rase 1 takođe na svim



vrstama, osim na sejancima divlje šljive. Ovi rezultati ukazuju da je širenje bakterija moguće i putem podloga koje takođe mogu biti zaražene;

- Inokulacijama dvogodišnjih grančica trešnje u periodu mirovanja zaključeno je da su svi izolati pv. *syringae* i *morsprunorum* rasa 1 podjednako patogeni na svim sortama trešnje (Burlat, Summit, Hedelfigenska i Germerzdorfska). Najveća dužina nekroze najčešće je zabeležena na sortama Burlat i Summit u kombinaciji sa izolatima I grupe (pv. *syringae*) u pojedinim slučajevima i sa izolatima II grupe (pv. *morsprunorum* rasa 1), a najmanja uglavnom kod sorti Germerzdorfska i Hedelfigenska sa izolatima II grupe (pv. *morsprunorum* rasa 1);
- Identifikacija izolata KBNS71 – 84 (Gornji Tavankut) i KBNS85 – 94 (Selenča) na bazi MLST korišćenjem gena *gyrB*, *rpoD*, *gapA* i *gltA*, jasno je pokazala prisustvo dva patovara *P. s.* pv. *syringae* i *P. s.* pv. *morsprunorum* rasa 1. Pri poređenju sa sojevima H – 1, V – 85, V – 88 (višnja) i V – 109 (trešnja) utvrđene su značajne razlike i postojanje genetskog diverziteta populacije ovih patogena;
- Simultana detekcija gena *syrB* i *syrD* utvrđena je kod 70 izolata I grupe (pv. *syringae*), a samo *SyrB* kod 9 izolata iste grupe (pv. *syringae*). Gen za sintezu koronatina detektovan je kod svih 76 izolata II grupe (pv. *morsprunorum* rasa 1);
- Rep – PCR metodom ustanovljene su značajne razlike (58%) između I i II grupe izolata (pv. *syringae* i pv. *morsprunorum* rasa 1). Ispitivani izolati sa trešnje u okviru pv. *syringae* nisu ispoljili međusobne razlike, ali se razlikuju od sojeva sa drugih lokaliteta i ranije izolovanih sa istog domaćina (V – 109 i T6), kao i od sojeva sa drugih domaćina – višnje (V – 85) i uljane tikve (Tk21) do 37%. Razlike među izolatima pv. *morsprunorum* rase 1 iznosile su manje od 5%, a 24% u odnosu na soj CFBP2119 istog patogenog varijeteta. Rep – PCR analiza ukazala je na nizak nivo heterogenosti ispitivanih izolata u okviru istog patogenog varijeteta;
- RAPD metoda, korišćenjem većeg broja prajmera, bila je uspešnija za poređenje ispitivanih izolata od rep – PCR. Od testiranih 11 prajmera, 4 (SPH1, DJP17, DJ15, DJ16) su selektovana za dalji rad na osnovu razlika među izolatima unutar patogenih varijeteta. Kumulativna RAPD analiza pokazala je da između ispitivanih izolata pv. *syringae* postoje razlike do 24%, a 41% u poređenju sa sojem KFB0103, dok su kod izolata pv. *morsprunorum* rase 1 razlike iznosile do 15%, a 36% u odnosu na soj CFBP2119. Dobijeni rezultati RAPD analize ukazuju da u okviru populacije obe

grupe ispitivanih izolata postoji određena heterogenost, ali je genetski diverzitet izraženiji kod *pv. syringae*;

- Proučavanjem epidemilogije ovih patogena u poljskim uslovima inokulacijom jednogodišnjih grana / mladara sortama Burlat, Germerzdorfska, Hedelfigenska i Drojanova žuta, zaključeno je da trešnja u našim agroekološkim uslovima ranije postaje osetljiva (oktobar) prema *P. s. pv. morsprunorum* rasa 1 u odnosu na *pv. syringae*. Prvi pozitivni rezultati pri inokulaciji sojevima *pv. syringae* utvrđeni su pri inokulaciji u novembru. U pogledu dužine nekroze najuspešnije su bile novembarske inokulacije (najduže nekroze; 2,17 – 3,35 cm), uspešne su bile i januarske i martovske inokulacije, ali je dužina nekroze bila sve manja, respektivno. Generalno najduže nekroze su ostvarene kod sorte Burlat, a najkraće kod sorte Germerzdorfska. Sve inokulacije urađene u periodu vegetacije su bile negativne;
- Inokulacijama dvo – trogodišnjih grana na sorti Summit prve uspešne inokulacije (oba patovara) su ostvarene tek u novembru (oktobarske su bile negativne), kada je utvrđena i veća agresivnost patovara *syringae*. Pri inokulacijama u januaru dužina nekroze je bila manja, a martovska je bila negativna. Sve inokulacije vršene u periodu od bubrenja pupoljaka do opadanja lišća takođe su bile negativne;
- Ispitivanjem osetljivosti sotrimenta trešnje i pojedinih sorti višnje zaključeno je da su prema oba soja (*syringae* i *morsprunorum* rasa 1) najosetljivije sorte trešnje Katalin, Linda, Summit, New Star i Burlat, srednje osetljive su sorte višnje Erdi Botermo i sorte trešnje Drojanova žuta, Carmen, Germerzdorfska i Rana od Noara, a slabo osetljive sorte višnje Španska i Ujfehetyi firtoš i sorta trešnje Rita.

## 9. PRILOZI

- **Hranljivi agar obogaćen saharozom (NSA)**

Pepton.....	5 g
Mesni ekstrakt.....	1 g
Saharoza.....	50 g
NaCl.....	5 g
Agar.....	20 g
Destilovana voda.....	1000 ml

- **Hranljivi agar (NA)**

Mesni ekstrakt.....	3 g
Pepton.....	10 g
NaCl.....	5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	2 g
Agar.....	20 g
Destilovana voda.....	1000 ml

- **Podloga za stvaranje fluorescentnog pigmenta-King B**

Ptotease pepton.....	20 g
Glicerol.....	10 ml
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	1,5 g
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O.....	1,5 g
Agar.....	15 g
Destilovana voda.....	1000 ml

- **Podloga od krompira (PDA)**

Krompir.....	200 g
Agar.....	17 g
Glukoza.....	20 g
Destilovana voda.....	1000 ml

- **Podloga za stvaranje arginin-dehidrolaze**

Pepton.....	1 g
NaCl.....	5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0,3 g
L-arginin HCl.....	10 g
Phenol red.....	0,01 g
Agar.....	3 g
Destilovana voda.....	1000 ml

- **Polučvrsta podloga**

Tripton.....	10 g
NaCl.....	5 g
Agar.....	5 g
Destilovana voda.....	1000 ml

- **Podloga za stvaranje H<sub>2</sub>S**

NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0,5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0,5 g
MgSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O.....	0,2 g
NaCl.....	5 g
Kvašćev ekstrakt.....	5 g
Pepton.....	0,5 g
Destilovana voda.....	1000 ml

- **Podloga za stvaranje indola**

Tripton.....	10 g
Destilovana voda.....	1000 ml

**Kovacs-indol reagens**

P-dimetilaminobenzaldehid.....	5 g
Amil alkohol.....	75 ml
Koncentrovana HCl.....	25 ml

- **Podloga za redukciju nitrata**

Pepton.....	5 g
NaCl.....	10 g
KNO <sub>3</sub> .....	1 g
Destilovana voda .....	1000 ml

**Reagens**

0,5% rastvor skroba.....	1 ml
0,4% kalijum jodid.....	1 ml
50% sumporna kiselina .....	5 ml

- **Podloga za hidrolizu skroba**

Mesni ekstrakt.....	3 g
Pepton.....	5g
Rastvorljivi skrob.....	2 g
Agar.....	15 g
Destilovana voda.....	1000 ml

- **Hugh-Leifson-ova podloga za O/F test**

Pepton.....	2 g
NaCl.....	5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0,3 g
Glukoza.....	10 g
Agar.....	3 g
BTB.....	0.03 g
Destilovana voda.....	1000 ml

10% rastvor glukoze se posebno sterilize filtracijom, a zatim se dodaje osnovnoj podlozi do konačne koncentracije 1%.

- **Podloga za hidrolizu želatina**

Želatin.....	5 g
Hranljivi bujon.....	24 g
Agar.....	20 g
Destilovana voda.....	1000 ml

- **Podloga za hidrolizu eskulina**

Pepton.....	10 g
NaCl.....	5 g
Eskulin.....	1 g
Feriamonijum citrat.....	0.5 g
Destilovana voda.....	1000 ml

- **Podloga za ispitivanje aktivnosti tirozinaze**

Kazein.....	10 g
Tirozin.....	1 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0,5 g
MgSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O.....	0,125 g
Agar.....	20 g
Glicerin.....	5 ml

- **Podloga za stvaranje D+ tartarata**

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	1 g
MgSO <sub>4</sub> .....	0,2 g
NaNH <sub>4</sub> HPO <sub>4</sub> .....	1,5 g
D (+) tartarati.....	1,5 g
BTB.....	0,05 g
Destilovana voda .....	1000 ml

- **Podloga za korišćenje mlečne kiseline**

NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0,5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0,5 g

MgSO <sub>4</sub> .....	0,2 g
NaCl.....	5g
Kvašćev ekstrakt.....	0,8 g
Mlečna kiselina.....	2 g
Agar.....	20 g
BTB.....	0,02 g

- **Tečna podloga sa dodatkom saharoze**

Hranljivi bujon.....	23,3 g
Saharoza.....	50 g

- **Podloga za hidrolizu kazeina**

- **Kazein A**

Obrano mleko.....	100 g
Destilovana voda.....	1000 ml

- **Kazein B**

Agar.....	20 g
Destilovana voda.....	1000 ml

Kazein B skuvati i prohladiti na 45-50 °C a zatim u prohladeno dodati Kazein A. Podloge sjediniti mešanjem.

- **Podloga za hidrolizu L-leucina**

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	1 g
KCl.....	0,2 g
MgSO <sub>4</sub> .....	0,2 g
Phenol Red.....	0,01 g
Destilovana voda.....	1000 ml

Filtracijom aminokiselina L-leucin je dodata osnovnoj podlozi do konačne koncentracije 1%.

- **LTP podloga**

Bacto tripton.....	10 g
Kvašćev ekstrakt.....	5 g
NaCl.....	5 g
Glukoza.....	1 g
Destilovana voda.....	1000 ml

- **NYGB podloga**

Pepton.....	5 g
Kvašćev ekstrakt.....	3 g
Glicerol.....	20 ml
Destilovana voda.....	1000 ml

- **Ravan Agar**

Bacto tripton.....	10 g
Kvaščev ekstrakt.....	5 g
NaCl.....	5 g
Glukoza.....	1 g
Agar.....	20 g
Destilovana voda.....	1000 ml

- **Top Layer Agar**

NaCl.....	5 g
Polipepton.....	10 g
Agar.....	5 g
Destilovana voda.....	1000 ml

## 10. LITERATURA

1. Adams, M. H. (1959): Bacteriophages. Interscience, New York.
2. Aderhold R., Ruhland W. (1907): Der Bakterienbrand der Kirschbäume. Abhandlung der. Kaiserlichen Biologische Anstalt. Für Land und Forstwirtschaft 5:293-340.
3. Afrose, S., Hossain, I., Islam, M. R., Hossain, M.D., Khan, M. A. H. (2014): RAPD analyses reveals the genetic diversity of the litchi leaf blight pathogen, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* in Bangladesh. Current Research in Microbiology and Biotechnology 2(1): 301-309.
4. Allen, W., Dirks, R. (1978): Bacterial canker of sweet cherry in the Niagara Peninsula of Ontario: *Pseudomonas* species involved and cultivar susceptibilities. Canadian Journal of Plant Science 58(2):363-369.
5. Arsenijević, M. (1968): *Pseudomonas syringae* van Hall (*P.mors* – *prunorum* Wormald) kao parazit kajsije u Jugoslaviji. IV Međunarodni simpozijum za kajsiju Subotica, 8-13 jul.
6. Arsenijević, M. (1970): Prilog proučavanja *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Van Hall parazita kruške u Jugoslaviji. Zaštita bilja 110-111.
7. Arsenijević, M. (1976): Uloga bakterija u genezi 'apopleksije' kajsije. Zaštita bilja 137-138: 237-244.
8. Arsenijević, M. (1980): Further investigations on *Pseudomonas syringae* van Hall as pathogen of apricot in Yugoslavia. Plant Protection 152:121-127.
9. Arsenijević, M. (1982): Parazit kajsije *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* van Hall i mogućnost suzbijanja. Jugoslovensko voćarstvo 16, 61-62 (1982/3-4) 43-50.
10. Arsenijević, M. (1993): *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, parazit jabuke. Zaštita bilja 44(4)206:283-293.
11. Arsenijević, M. (1997): Bakterioze biljaka. S – Print. Novi Sad.
12. Arsenijević, M., Jasnić, S., Balaž, J., Petrov, M. (1973): Prilog proučavanja *Cytospora cincta* Sacc. kao parazita breskve. Zaštita bilja XXIV 126:337-349.
13. Arsenijević, M., Balaž, J. (1978): Istraživanje prouzrokovala 'apopleksije' kajsije u Jugoslaviji. Jugoslovensko voćarstvo 44-45:17-24.
14. Arsenijević, M., Jasnić, S., Balaž, J., Petrov, M. (1982): Razvoj *Cytospora cincta* Sacc. kao parazita breskve tokom godine. Zaštita bilja 33(1)159:73-83.
15. Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (1992): Current protocols in molecular biology, Vol.I. New York: Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience.
16. Ayers, S.H., Rupp, P., Johnson, W.T. (1919): A study of the alkaliforming bacteria in milk. United State Department of Agriculture Bulletin 782.
17. Backman, P.A., DeVay, J.E. (1971): Studies of the mode of action and biogenesis of the phytotoxin syringomycin. Physiological Plant Pathology 1:215-234.
18. Balaž, J., Arsenijević, M., Vojvodić, Đ. (1988): Etiološka proučavanja bakteriozne nekroze plodova i lišća višnje i mogućnost suzbijanja. Zaštita bilja 39(3)185: 311-321.
19. Balaž, J., Arsenijević, M. (1989): Further investigations on *Pseudomonas syringae* pathovar as pathogen of sour cherry fruits in Yugoslavia. (Paper presented at the 7th Conference on Plant Pathogenic Bacteria, Budapest, pp. 515-520).
20. Balaž, J., Grbić, R., Pizurica, B. (1994): Gljive kao prouzrokovali sušenja grana breskve i mogućnost njihovog suzbijanja. Savremena poljoprivreda 42 vanredni broj 43-48.
21. Balaž, J., Ognjanov, V., Iličić, R., Grahovac, M. (2012): Važnije mikoze i bakterioze trešnje. Biljni lekar 4:316-334.



22. Balaž, J., Iličić, R., Ognjanov, V., Ivanović, Ž., Popović, T. (2016): Etiology and epidemiology of bacterial canker on young sweet cherry trees in Serbia. *Journal of Plant Pathology*.
23. Barakat, R. M., Johnson, D. A. (1997): Expansion of cankers caused by *Leucostoma cincta* on sweet cherry trees. *Plant Disease* 81:1391-1394.
24. Barss, H.P. (1915): Bacterial gummosis or bacterial canker of cherries. *Oregon Biennial Crop, Pest and Horticultural Report for 1913-1914*: 224-240.
25. Barss, H.P. (1918): Bacterial gummosis of stone fruits. *Monthly Bulletin State Commission of Horticulture, California* 7:121-36.
26. Bazzi, C., Messina, C., Tortoreto, L., Bini, F., Cecca, G., Stefani, E. (2003): Investigations on the possible use of abiotic and biotic elicitors of defence-related responses in plants. *European Journal of Horticultural Science* 68:115-122.
27. 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 amplification products. *Applied and Environmental Microbiology* 8:2924-2930.
28. Bertani, G. (1952): "Studies on Lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*." *Journal of Bacteriology* 62:293-300.
29. Biggs, A.R. (1989): Temporal Changes in the Infection Court After Wounding of Peach Bark and Their Association with Cultivar Variation in Infection by *Leucostoma persoonii*. *Phytopathology* Vol. 79, No.5:627-630.
30. Biggs, A.R. (2008): *Leucostoma* canker. (in *Compendium of Stone Fruit Diseases*. eds. Ogawa., J.M., Zehr, E.I., Bird, G.W., Ritchie, D.F., Uriu, K., Ujemoto, J.K. APS Press pp. 28-30)
31. Brzezinski J. (1902): Etiologie du chancre et de la gomme des arbres fruitiers. *Comptes rendus de l'Académie des Sciences, Paris* 134: 1170-1173.
32. Bultreys, A., Gheysen, I. (1999): Biological and molecular detection of toxic lipodepsipeptide-producing *Pseudomonas syringae* strains and PCR identification in plants. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 1904-1909.
33. Bultreys, A., Gheysen, I. (2003): Diversity among *Pseudomonas syringae* strains from Belgian orchards. (In: *Pseudomonas syringae* and Related Pathogens. eds. Iacobellis N.S., Collmer A., Hutcheson S.W., Mansfield J.W., Morris C.E., Murillo J., Schaad N.W., Stead D.E., Surico G., Ullrich M.S. *Biology and Genetics*, pp. 69-70). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
34. Bultreys, A., Kaluzna, M. (2010): Bacterial cankers caused by *Pseudomonas syringae* on stone fruit species with special emphasis on the pathovars *syringae* and *morsprunorum* race 1 and 2. *Journal of Plant Pathology* 92 (1, Supplement), S1.21-S.1.33.
35. Burkowicz, A., & Rudolph, K. (1994). Evaluation of pathogenicity and of cultural and biochemical tests for identification of *Pseudomonas syringae* pathovars *syringae*, *morsprunorum* and *persicae* from fruit trees. *Journal of Phytopathology* 141: 59-76.
36. Cameron, R. (1955): Bacterial canker and dead bud in sweet cherries in Oregon. 47<sup>th</sup> Annual Report of Oregon State Horticultural Society, pp. 103-104.
37. Cameron, H.R. (1960): Death of dormant buds in sweet cherry. *Plant Disease Reporter* 44 (2), 139-143.
38. Cameron, H.R. (1962): Disease of deciduous fruit trees incited by *Pseudomonas syringae* van Hall. *Technical Bulletin* 66, December 1-64.
39. Cao, T., Saylor, R.J., DeJong, T.M., Kirkpatrick, B.C., Bostock, R.M., Shackel, K.A. (1999): Influence of stem diameter, water content, and freezing-thawing on bacterial

- canker development in excised stems of dormant stone fruit. *Phytopathology* 88:962-966.
40. Cao, T., Kirkpatrick, B.C., Shackel, K.A., DeJong, T.M. (2013): Effect of leaf scar age, chilling and freezing-thawing on infection of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* through leaf scars and lenticels in stone fruits. *Fruits* Vol.68, 2:159-169.
  41. Carroll, J.E., Burr, T.J., Robinson, T.L., Hoying, S.A. (2010): Effect of spring-pruning method, copper sprays and training systems on bacterial canker of sweet cherry. NYS IPM Program Project Report.
  42. Carroll, J., Robinson, T., Burr, T., Hoying, S., Cox, K. (2013): Evaluation of Pruning Techniques and Bactericides to Manage Bacterial Canker of Sweet Cherry. NYS IPM Program Project. NEW YORK FRUIT QUARTERLY Vol. 18 No 1. SPRING 2010.
  43. Chandler, W.A., Daniell, J.W. (1976): Relation of pruning time and inoculation with *Pseudomonas syringae* van Hall to schort life of peach trees growing in old peach land. *Horticultural Science* 11:103-104.
  44. Crosse, J.E. (1954): Bacterial canker, leaf spot, and shoot wilt of cherry and plum. The East Malling Research Station 1953, 202-7.
  45. Crosse, J.E. (1955): Bacterial canker of stone fruits. I. Field observations on the avenues of autumnal infection of cherry. *Journal of Horticultural Science* 30:31-42.
  46. Crosse, J.E. (1957): Bacterial canker of stone fruits. III. Inoculum concentration and the time of inoculation in relation to leaf – scar infection of cherry. *Annals of Applied Biology* 45:19-35.
  47. Crosse, J.E. (1959): Bacterial canker of stone fruits. IV. Investigation of a method for measuring the inoculum potential of cherry trees. *Annals of Applied Biology* 47:306-17.
  48. Crosse, J.E. (1966): Epidemiological relations of the Pseudomonad pathogens of deciduous fruit trees. *Annual Review of Phytopathology* 4:291-310.
  49. Crosse, J.E., Garrett, C.M.E. (1963): Studies on the bacteriophage of *Pseudomonas mors-prunorum*, *Ps. syringae* and related organisms. *Journal of Applied Bacteriology* 26:159-177.
  50. Crosse, J.E., Garrett, C.M.E. (1966): Bacterial canker of stone-fruits. Infection experiments with *Pseudomonas mors – prunorum* and *P. syringae*. *Annals of Applied Biology* 58:31-41.
  51. Crosse, J.E., Garrett, C.M.E. (1970): Pathogenicity of *Pseudomonas morsprunorum* in Relation to Host Specificity. *Journal of General Microbiology* 62:315-327.
  52. Crosse, J.E., Hingorani, M.K. (1958): A Method for isolating *Pseudomonas – mors prunorum* Phages from the Soil. *Nature* 181:60-61.
  53. Delibašić, G., Babović, M. (2006): Opšta fitopatologija - Praktikum. Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet. Akademska misao, Beograd.
  54. Dhanvantari, B.N. (1969): Occurrence of bacterial canker of sweet cherry and plum in Ontario. *Canadian Plant Disease Survey* 49:5-7.
  55. Dooley, J.J., Harrison, S.P, Mytton, L.R, Dye, M, Cresswell, A, Skot, L, Beeching, J.R. (1993): Phylogenetic grouping and identification of *Rhizobium* isolates on the basis of random amplified polymorphic DNA profiles. *Canadian Journal of Microbiology* 39: 665-673.
  56. Duy, D.W. (1954): Blast of stone fruit in New Zeland. *New Zeland Journal of Science and Technology* 35:451-61.
  57. Dye, D.W. (1968): A taxonomic study of the genus *Erwinia*. 1. The „Amylovora“ group. *New Zealand Journal of Science* 11:590-607.
  58. Elmhirst, J. (2006): Crop Profile for Sweet Cherries in Canada. Pesticide Risk Reduction Program, Pest Management Centre. Agriculture and Agri – Food Canada.

59. Ercolani, G.L., Hagedorn, D.J., Kelman, A., & Rand, R.E. (1974). Epiphytic survival of *Pseudomonas syringae* on hairy vetch in relation to epidemiology of bacterial brown spot of bean in Wisconsin. *Phytopathology* 64:1330-1339.
60. Erickson, D. (1945): Certain aspects of resistance of plum trees to bacterial canker. I. Some biochemical characteristics of *Pseudomonas mors-prunorum* Wormald and related phytopathogenic bacteria. *Annals of Applied Biology* 32:44-52.
61. Fahy, P.C., Hayward, A. C. (1983): Media and Methods for isolation and Diagnostic Tests in Plant Bacterial Diseases – A Diagnostic Guide, ACADEMIC PRESS.
62. Fialová R., Navrátil M., Válová P., Lauterer P., Kocourek F., Poncarová-Voráčková Z., (2004): Epidemiology of European stone fruit yellows phytoplasma in the Czech Republic. *Acta Horticulturae* 657: 483-487.
63. Freigoun, S.O., Crosse, J.E. (1975): Host relation and distribution of a physiological and pathological variant of *Pseudomonas morsprunorum*. *Annals of Applied Biology* 81:317-330.
64. Gardan, L., Shafik, H., Belouin, S., Broch, R., Grimont, F., Grimont, P.A.D. (1999): DNA relatedness among the pathovars of *Pseudomonas syringae* and description of *Pseudomonas tremae* sp. nov. and *Pseudomonas cannabina* sp. nov. (ex Sutic and Dowson 1959). *International Journal of Systematic Bacteriology* 49:469-478.
65. Garrett, C.M.E. (1978): Pathogenic races of *Pseudomonas mors – prunorum*. Proc. 4<sup>th</sup> International Conference on Plant Pathogenic Bacteria, Angers.
66. Garrett, C.M.E. (1986): Influence of rootstock on the susceptibility of sweet cherry scions to bacterial canker, caused by *Pseudomonas syringae* pvs. *morsprunorum* and *syringae*. *Plant Pathology* 35:114–119.
67. Garrett, C.M.E., Crosse, J.E. (1974): Bacterial canker of cherry and plum. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. Advisory Leaflet 592, 1-6.
68. Garrett, C.M.E., Panagopoulos, C.G., Crosse, J.E. (1966): Comparison of plant pathogenic Pseudomonads from fruit tree. *Journal of Applied Bacteriology* 29:342-356.
69. Garrity, G.M., Bell, J.A., Liburn, T.G. (2004): Taxonomic Outline of the Prokaryotes. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2<sup>nd</sup> Edition. Springer – Verlag, New York, 1-399.
70. Gašić, K., Prokić, A., Ivanović, M., Kuzmanović, N., Obradović, A. (2012): Differentiation of *Pseudomonas syringae* pathovars originating from stone fruits. *Pesticides and Phytomedicine* 27(3):219-229.
71. Gavrilović, V. (2006): Patogene i biohemijsko – fiziološke karakteristike bakterija roda *Pseudomonas* parazita voćaka. *Zaštita bilja* 255-258:5-55.
72. Gavrilović, V. (2009): *Pseudomonas syringae* – a Pathogen of Fruit Trees in Serbia. *Pesticides and Phytomedicine* 24 (3): 153-163.
73. Gavrilović, V., Milijašević, S. (2004). Etiological study of cherry and plum bud necrosis. (Book of Abstracts V Kongres on Plant Protection, Zlatibor, Serbia, pp. 144).
74. Gavrilović, V., Milijašević, S. Arsenijević, M. (2005): Bakteriozno sušenje pupoljaka trešnje. *Biljni lekar* 4:418-421.
75. Gavrilović, V., Živković, S., Trkulja, N., Ivanović, M. (2008): Characteristics of bacterial strains from *Pseudomonas* Genera isolated from diseased plum trees. *Pesticides and Phytomedicine* 23:25-31.
76. Gavrilović, V., Živković, S., Dolovac, N., Trkulja, N., Dolovac – Pfaf, E., Popović, T., Ivanović, Ž. (2012). *Pseudomonas syringae* - pathogen of sweet cherry in Serbia. *Pesticides and Phytomedicine* 27 (2):141-149.
77. Gavrilović, V., Ivanović, Ž., Popović, T., Živković, S., Stanković, S., Berić, T., Fira, Đ. (2013): Genetic characterization of pathogenic fluorescent Pseudomonads isolated from necrotic cherry and plum buds in Serbia. *Genetika* 45 (3):953-961.

78. Gilbert, V., Legros, F., Maraite, H., Bultreys, A. (2009): Genetic analyses of *Pseudomonas syringae* isolates from Belgian fruit orchards reveal genetic variability and isolate-host relationships within the pathovar *syringae*, and help identify both races of the pathovar *morsprunorum*. *European Journal of Plant Pathology* 124:199-218.
79. Griffin F.L. (1911): A bacterial gummosis of cherries. *Science* 34:615-616.
80. Grosse, D.C., DeVay, J.E. (1977): Population dynamics and pathogenicity of *Pseudomonas syringae* in maize and cowpea in relation to the in vitro production of syringomycin. *Phytopathology* 67:474-483.
81. Gross, D.C., Cody, Y.S., Proebsting, E.L.Jr., Rademaker, G.K., Spotts, R.A. (1984): Ecotypes and pathogenicity of ice – nucleation – active *Pseudomonas syringae* isolated from deciduous fruit tree orchards. *Phytopathology* 74:241-248.
82. Hattingh, M., J., Roos, I.M.M. (2008): Bacterial canker. (in *Compendium of Stone Fruit Diseases* eds. Ogawa, M.J., Zehr, I.E., Bird, W.G., Ritchie, F.D., Uriu, K., & Uyemoto, K.J pp. 48-50). APS PRESS, American Phytopathological Society.
83. Hattingh, M.J., Roos, I.M., Mansvelt, E.L. (1989): Infection and systemic invasion of deciduous fruit trees by *Pseudomonas syringae* in South Africa. *Plant Disease* 73 (10):784-789.
84. Hinrichs – Berger, J. (2003): Epidemiology of *Pseudomonas syringae* pathovars associated with decline of plum trees in the Southwest of Germany. *Journal of Phytopathology* 152: 153-160.
85. Hugh, R., Leifson, E. (1953): The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram – negative rods. *Journal of Bacteriology* 66:24–26.
86. Iličić, R., Balaž, J., Jošić, D. (2014): Characterization of two *Pseudomonas syringae* pathovars (*syringae* and *morsprunorum*) from sweet cherry by RAPD. V Congress of the genetic society. Kladovo, Serbia, 28 September – 02 October pp. 218.
87. Iličić, R., Balaž, J., Vlajić, S. (2014): Virulence of *Pseudomonas syringae* pathovars originating from sweet cherry. VII Congress on plant protection: "Integrated Plant Protection -Knowledge-Based Step Towards Sustainable Agriculture, Forestry And Landscape Architecture" Zlatibor, 24-28 November pp. 160-161.
88. Iličić, R., Balaž, J., Stojšin, V., Jošić, D. (2016): Characterization of *Pseudomonas syringae* pathovars from different sweet cherry cultivars by RAPD analysis. *Genetika* Vol. 48, No 1.
89. Ivanović, Ž., Živković, S., Starović, M., Jošić, D., Stanković, S., Gavrilović, V. (2009). Diversity among *Pseudomonas syringae* strains originating from fruit trees in Serbia. *Archives of Biological Sciences* 61(4):863-870.
90. Ivanović, Ž., Stanković, S., Živković, S., Gavrilović, V., Kojić, M., Fira, Đ. (2012). Molecular characterization of *Pseudomonas syringae* isolates from fruit trees and raspberry in Serbia. *European Journal of Plant Pathology* 134:191-203.
91. Jarak, M., Đurić, S. (2006): Praktikum iz mikrobiologije. Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet Novi Sad.
92. Jaspersen, G. (1999): Bacterial canker of cherry. *Tree Fruit & Grape News*. Ministry of Agriculture, Food & Fisheries.
93. Jones, A.L. (1971): Bacterial canker of sweet cherry in Michigan. *Plant Disease Reporter* 55 (11):961-965.
94. Kaluzna M., Ferrante P., Sobiczewski P., Scortichini M. (2010): Characterization and genetic diversity of *Pseudomonas syringae* isolates from stone fruits and hazelnut using repetitive-PCR and MLST. *Journal of Plant Pathology* 92 (3):781-787.
95. Kaluzna M., Sobiczewski P. (2009): Virulence of *Pseudomonas syringae* pathovars and races originating from stone fruit trees. *Phytopathologia* 54: 71-78.

96. Kaluzna, M. (2011): *Pseudomonas syringae* – phenotypic and genetic characterization of the causal agents of bacterial canker on stone fruits. Research Institute of Horticulture, Pomology Division Pomologiczna 18 pp. 96-100 Skierniewice.
97. Kennelly, M. M., Cazorla F. M., Vicente A., Ramos C., Sundin, G. W. (2007): *Pseudomonas syringae* disease of fruit trees, progress toward understanding and control. *Plant Disease* 91:4-17.
98. Keserović, Z., Magazin, N., Kurjakov, A., Dorić, M., Gošić, J. (2014): Voćarstvo. Popis poljoprivrede 2012, Poljoprivreda u Republici Srbiji. Republički zavod za statistiku.
99. Khayamie, S., Niknejad, K.N., Rabie, B., Sassanie, S., Ebadie, A.A. (2009): Genetic characterization of *P. syringae* pv. *syringae* strains from stone fruits based on RAPD analysis in Iran. *AgriculturaTropicaetSubtropica* 42(4):162-166.
100. King, E.O., M.K. Ward, and D.E. Raney (1954): Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 44:301-307.
101. Kirkpatrick, B.C.; Uyemoto, J.K.; Purcell, A.H. (2008): X – disease. (in: Compendium of stone fruit diseases. eds. Ogawa., J.M., Zehr, E.I., Bird, G.W., Ritchie, D.F., Uriu, K., Ujemoto, J.K. pp. 57-58). APS Press
102. Klement, Z. (1963): Rapid detection of the pathogenicity of phytopathogenic pseudomonads. *Nature* 199:199-300.
103. Klement, Z., Rozsnyay, D.S., Arsenijević, M. (1974): Apoplexy of apricots. III Relationship of winter frost and the bacterial canker die-back of apricots. *Acta Phytopathologica Academiae Scientiarum Hungaricae* 9:35-45.
104. Klement, Z., Rozsnyay, D.S., Balo, E., Panczel, M., Prileszky, Gy. (1984): The effect of cold on development of bacterial canker in apricot trees infected with *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Physiological Plant Pathology* 24 (2):237-246.
105. Klement, Z., Rudolph, K., Sands, D.C. (1990): *Methods in Phytobacteriology* Academiai Kiado, Budapest.
106. Kovacs, N. (1956): Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. *Nature* 178 (4535):703.
107. Latorre, B. A., Gonzales, J. A., Cox, J. E., Vial, F. (1985): Isolation of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* from cankers and the effect of free moisture on its epiphytic populations on sweet cherry. *Plant Disease* 69:409-412.
108. Latorre, B.A., Jones, A.L. (1979): *Pseudomonas morsprunorum*, the cause of bacterial canker of sour cherry in Michigan and its epiphytic association with *P. syringae*. *Phytopathology* 69:335-339.
109. Lelliott, R.A., Billing, E., & Hayward, A.C. (1966): A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic Pseudomonads. *Journal of Applied Bacteriology* 29(3): 470-489.
110. Lelliott, R.A., Stead, D. E. (1987): *Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants*. Oxford, London, Edinburgh: British Society for Plant Pathology, Blackwell Scientific Publications.
111. Lindow, S.E. (1990): Bacterial ice nucleation activity. (in: *Methods in Phytopathology* eds. S.Klement, K. Rudolph, D.C. Sands pp.185-198). Academiai Kiado, Budapest.
112. Lopes, M.M., Rosello, M., Palacio-Bielsa, A. (2010): Diagnosis and detection of the main bacterial pathogens of stone fruit and almond. *Journal of Plant Pathology* 92 (1, Supplement) S1.57-S1.66
113. Luepschen, S.N., Hetherington, E.J., Stahl, J.F., Mowrer, E.K. (1979): Cytospora canker of peach trees in Colorado: Survey of incidence, canker location and apparent infection courts. *Plant Disease Report* 63 (8):685-687.

114. Luz, J.P.M. (1997): Detection and epidemiology of bacterial canker (*Pseudomonas syringae*) on wild cherry (*Prunus avium*). PhD Thesis.
115. Lyskanowska, K. (1976): Bacterial canker on sweet cherry (*Prunus avium*) in Poland. II. Taxonomy of causal organism (*Pseudomonas morsprunorum*). Plant Disease Reporter 60:822-826.
116. Lyskanowska, K. (1979): Bacterial canker of sweet cherry (*Prunus avium*) in Poland. IV Etiology of the necrosis of cherry buds in nursery stock production and attempts of chemical control. Phytopathologische Zeitschrift 96:222-230.
117. Mandić B., Matic S., Rwanhah M.A., Jelkmann W., Myrta A. (2007): Viruses of sweet and sour cherry in Serbia. Journal of Plant Pathology 89:103–108.
118. McManus, P.S., Stockwell, V.O., Sundin, G.W., Jones, A.L. (2002): Antibiotic use in plant agriculture. Annual Review of Phytopathology 40:443-465.
119. Menard, M., Sutra, L., Luisetti, J., Prunier, J.P., Gardan, L. (2003): *Pseudomonas syringae* pv. *avii* (pv.nov), the casual agent of bacterial canker of wild cherries (*Prunus avium*) in France. European Journal of Plant Pathology 109 (6):565-576.
120. Milatović, D., Nikolić, M., Miletić, N. (2011): Trešnja i višnja. Naučno voćarsko društvo Srbije, Čačak.
121. Misaghi, I., Grogan, R.C. (1969): Nutritional and biochemical comparisons of plant-pathogenic and saprophytic fluorescent pseudomonads. Phytopathology 59: 1436–1450.
122. Mishra, S.K., Gordon, R.E., Barnett, D.A. (1980): Identification of nocardiae and streptomycetes of medical importance. Journal of Clinical Microbiology 11:728-736.
123. Mliki, A., Staub, E.J., Zhang Yong, S., Abdelwahed, G. (2001): Genetic diversity in melon (*Cucumis melo* L.): An evaluation of African germplasm. Genetic Resources and Crop Evolution 48:587-597.
124. Moore, L.W. (1988): *Pseudomonas syringae*: disease and ice nucleation activity. Ornamentals Northwest Newsletter 12:4-16.
125. Natalini, E., Rossi, M.P., Barionovi, D., Scortichini, M. (2006): Genetic and pathogenic diversity of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* isolates associated with bud necrosis and leaf spot of pear in a single orchard. Journal of Plant Pathology 88(2): 219-223.
126. Navrátil, M., Válová, P., Fialová, R., Petrová, K., Poncarová, Vorácková Z., Fránová, J., Nebesárová, J., Karesová, R. (2001): Survey for stone fruit phytoplasmas in the Czech Republic. Acta Horticulturae 550:377-382.
127. Ninkovski, I. (1998): Trešnja. Savremeni načini podizanja i iskorišćavanja. IP POTEZ – UNO, Beograd.
128. Obradović, A., Kuzmanović, N., Čalić, A., Gašić, K., Ivanović, M. (2010): Bakterioze i fitoplazmoze koštičavih voćaka. Bilni lekar 38(4-5):323-338.
129. Ogawa, J.M., Zehr, E.I., Bird, G.W., Ritchie, D.F., Uriu, K., Ujemoto, J.K. (2008): Compendium of Stone Fruit Diseases. APS Press.
130. Otta, J.D., English, W.H. (1970): Epidemiology of the bacterial canker disease of French prune. Plant Disease 54:332-336.
131. Paulin, I.P., Luisetti, J. (1978): Ice nucleation among phytopathogenic bacteria. (Proceedings of the 4<sup>th</sup> International Conference on Plant Pathogenic Bacteria. Agnes, pp. 725-731).
132. Peter, K. (2014): Bacterial diseases on stone fruit: Learning lessons from 2013. Penn State University Fruit Research and Extension Center Biglerville, PA.
133. Pokharel, R.R. (2009): Cytospora Canker in Tree Fruit Crops. Colorado State University. Extension. Fact Sheet No. 2.953 Crop Series – Diseases.

134. Popović, T. (2004): Etiološka proučavanja sušenja breskve na području Fruške Gore. Magistrarska teza. Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.
135. Popović, T., Balaž, J. (2005). Uticaj nekih preparata na razvoj izolata *Cytospora cincta in vitro*. Zaštita bilja 56 (1-4):251-254:67-76.
136. Puławska, J., Sobiczewski, P., Sulikowska, M. (2008): Research on *Pseudomonas syringae* – pathogen of stone fruit trees in Poland – the past and the future. Research Institute of Pomology and Floriculture, Skierniewice, Poland. [http://www.cost873.ch/uploads/files/m\\_Pulawska\\_2008\\_04.pdf](http://www.cost873.ch/uploads/files/m_Pulawska_2008_04.pdf)
137. Randhawa, P.S. Civerolo, E.L. (1985): A Detached – Leaf Bioassay for *Xanthomonas campestris* pv. *pruni*. Phytopathology 75:1060-1063.
138. Regner, K. M., Johnson, D. A., Gross, D. C. (1990): Etiology of canker and dieback of sweet cherry in Washington State. Plant Disease 74:430-433.
139. Renick L.J., Cogal A.G., Sundin G.W. (2008): Phenotypic and genetic analysis of epiphytic *Pseudomonas syringae* populations from sweet cherry in Michigan. Plant Disease 92: 372-378.
140. Republički hidrometeorološki zavod. Republika Srbija. Godišnja meteorološka analiza (2013/2014).
141. Rico, A., Erdozain, M., Ortiz-Barredo, A., Ruiz de Galarreta, Murillo, J. (2006) Detection by multiplex PCR and characterization of nontoxigenic strains of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* from different places in Spain. Spanish Journal of Agricultural Research 4(3):261-267.
142. Roos, I.M.M., Hattingh, M.J. (1983): Fluorescent pseudomonads associated with bacterial canker of stone fruits in South Africa. Plant Disease 67:1267-1269.
143. Roos, I.M.M., Hattingh, M.J. (1986): Bacterial canker of sweet cherry in South Africa. Phytophylactica 18:1-4.
144. Roos, I.M.M., Hattingh, M.J. (1987): Systematic invasion of plum leaves and shoots by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* introduced in to petioles. Phytopathology 77:1253-1257.
145. Ross, L.I., Alami, Y., Harvey, R.P., Achouak, W., Ryder, M.H. (2000): Genetic Diversity and Biological Control Activity of Novel Species of Closely Related Pseudomonads Isolated from Wheat Field Soil in South Australia. Applied and Environmental Microbiology 66:1609-1616.
146. Sabanadzovic S., Abou Ghanem-Sabanadzovic N., Rowhani A., Grant J.A., Uyemoto J.K. (2005): Detection of Cherry virus A, Cherry necrotic rusty mottle virus and Little cherry virus 1 in California orchards. Journal of Plant Pathology 87:173–177.
147. Sands, D.C. (1990): Physiological Criteria – Determinative Tests. (in. Methods in Phytobacteriology, eds. Klement, Z., Rudolph, K., Sands, D.C., pp. 134 – 143). Academiai Kiado, Budapest.
148. Sarker, S.F., Guttman, D.S. (2004): Evolution of the core genome of *Pseudomonas syringae*, a highly clonal, endemic plant pathogen. Applied and Environmental Microbiology 70:1999-1012.
149. Schaad, N. W., (1980): Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria, APS Press.
150. Schaad, N. W., Jones, J.B., Chun, W. (2001): Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria, Third Edition, APS Press.
151. Scortichini, M. (2005): The population structure of some plant pathogenic bacteria: an ecological and adaptive perspective. Journal of Plant Pathology 87:5-12.
152. Scortichini, M. (2010): Epidemiology and predisposing factors of some major bacterial diseases of stone and nut fruit trees species. Journal of Plant Pathology 92 (1, Supplement) S1.73-S1.78

- 153.Scortichini, M., Ligouri, R. (2003): Integrated management of bacterial decline of hazelnut, by using Bion as an activator of systemi acquired resistance (SAR). (in. *Pseudomonas syringae* and Related Pathogens. eds. Iacobellis, N.S., Collmer, A., Hutcheson, S.W., Mansfield, J.W. pp. 483-487) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- 154.Scortichini, M., Marchesi, U., Dettori, M.T., Rossi, M.P. (2003): Genetic diversity, presence of the syrB gene, host preference and virulence of *Pseudomonas syringae* pv.*syringae* strains from woody and herbaceous host plants. *Plant Pathology* 52: 277-286.
- 155.Selenska – Pobell, S., Evguenieva – Hackerberg, E., Radeva, G., Squartini, A. (1996): Characterization of *Rhizobium hedusari* by RFLP analysis of PCR amplified rDNA and by genomic fingerprinting. *Journal of Applied Bacteriology* 50:517-28.
- 156.Shaffer, W.H. Jr. (1975): Procedures for the identifications of bacterial plant pathogens. (in. *Phytobacteriology* eds. Goodman R.N., Proceedings of the first workshop on Phytobacteriology, pp. 68-73). University of Missouri, Columbia.
- 157.Shanmuganathan, N. (1962): Studies in bacterial canker of plum and cherry (*Pseudomonas mors – prunorum* Wormald). Doctoral thesis, University London.
- 158.Sletten, A. (1979): Bacterial canker of stone – fruits in Norway. *Scientific Reports of The Agricultural University of Norway* 58 (31): 1-9.
- 159.Sobiczewski, P. (1984): Etiology of sour cherry bacterial cancer in Poland. *Fruit Science Report* 11 (4):169-179.
- 160.Sobiczewski, P., Jones, A. L. (1992): Effect of exposure to freezing temperature on necrosis in sweet cherry shoots inoculated with *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* or *P.s.* pv. *morsprunorum*. *Plant Disease* 76:447-451.
- 161.Soresten, K.N., Kim, K.H., Takemoto, J.Y. (1998): PCR detection of cyclic lipodepsinonapeptide - producing *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and similarity strains. *Applied and Environmental Microbiology* 64:226-320.
- 162.Spotts, R.A. (2001): 11 Steps to Manage Bacterial Canker of Sweet Cherry. OSU Mid Columbia Agricultural Research and Extension Center. Hood River, OR. 1 pp.
- 163.Spotts, R.A., Facteau, J., Cervantes, L. A., Chestnut N. E. (1990): Incidence and Control of Cytospora Canker and Bacterial Canker in a Young Sweet Cherry Orchard in Oregon. *Plant Disease* 74:577-580.
- 164.Spotts, R.A., Wallis, K.M., Serdani, M., Azarenko, A.N. (2010): Bacterial canker of sweet cherry in Oregon – infection of hotricultural and natural wounds, and resistance of cultivar and rootstock combination. *Plant Disease* 93:345-350.
- 165.Spratt, B.G. (1999): Multilocus sequence typing: molecular typing of bacterial pathogens in an era of rapid DNA sequencing and the Internet. *Current Opinion in Microbiology* 2:312-316.
- 166.Stanković, D. (1973): Opšte voćarstvo III Deo – Voće od berbe do upotrebe (realizacija voća). Štamparsko preduzeće MINERVA Subotica – Beograd.
- 167.Statistički godišnjak Republike Srbije (2011): Republički zavod za statistiku, Beograd, 2012.
- 168.Süle, S., Seemüller, E. (1987): The role of ice formation in the infection of sour cherry leaves by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Phytopathology* 77:173-177.
- 169.Sundin G.W., Olson B.D., Jones A.L. (1988): Overwintering and population dynamics of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and *P. syringae* pv. *morsprunorum* on sweet and sour cherry. *Canadian Journal of Plant Pathology* 10:281-288.
- 170.Sundin, G.W., Jones, A.L., Fulbright, D.W. (1989): Copper resistance in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* from cherry orchards and its associated transfer in vitro and in planta with a plasmid. *Phytopathology* 79:861-865.



171. Suslow, T. V., Schroth, M.N., Isaka, M. (1982): Application of a rapid method for Gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. *Phytopathology* 72:917-917.
172. Šutić, D., Panić, M. (1969): Metode proučavanja fitopatogenih bakterija. Beograd, Zavod za zaštitu bilja Poljoprivrednog fakulteta i Sekretarijata za poljoprivredu, šumarstvo i vodoprivredu SR Srbije.
173. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S. (2013): MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30:2725-2729.
174. Thornley, M.J. (1960): The differentiation of *Pseudomonas* from other gram negative bacteria on the basis of arginine metabolism. *Journal of Applied Bacteriology* 1:37-52.
175. Thornton, G. Nugent, J. (2002): Bacterial Canker Suppression. [http://agbioresearch.msu.edu/uploads/files/Research Center/NW Mich Hort/Pests IP M\\_Mgmt/BacterialCankerControlSweetCherries.pdf](http://agbioresearch.msu.edu/uploads/files/Research%20Center/NW%20Mich%20Hort/Pests_IP_M_Mgmt/BacterialCankerControlSweetCherries.pdf)
176. Valiunas, D., Jomantiene, R., Davis, R.E. (2005): A 'Candidatus Phytoplasma asteris'-related phytoplasma associated with cherry little leaf disease represents a new subgroup, 16SrI-Q. *Phytopathology* 95: S106.
177. Van Hall, C.J.J. (1902): Bijdragen tot de kennis der bacteriële plantenziekten Ph.D. Thesis, University of Amsterdam, The Netherlands.
178. Vauterin, L., Hoste, B., Kersters, K., Swings, J. (1995): Reclassification of *Xanthomonas*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 45:472-489.
179. Versalovic, J., Koeuth, T., Lupski, J.R. (1991): Distribution of repetitive DNA sequence in eubacteria and application fingerprinting of bacterial genome. *Nucleic Acids Research* 19:6823-6831.
180. Vicente, J., Roberts, S. (2007). Discrimination of *Pseudomonas syringae* isolates from sweet and wild cherry using rep – PCR. *European Journal of Plant Pathology* 117:383-392.
181. Vicente, J.G., Roberts, S.J., Russell, K., Alves, J.P. (2004): Identification and discrimination of *Pseudomonas syringae* isolates from wild cherry in England. *European Journal of Plant Pathology* 110:337-351.
182. Völksch B., Bublitz, F., Frieche, W. (1989): Coronatine production by *Pseudomonas syringae* pathovars : screening method and capacity of production formation. *Journal of Basic Microbiology* 29:463-468
183. Webb, P.C.R. (1950): Bacterial infection of fruiting spurs of sweet cherry (*Pseudomonas mors – prunorum* Wormald and *Ps. prunicola*). *Annals Report of East Malling Res. Sta. for 1949. Sect. III*, pp. 120-121.
184. Weingart, H., Völksch, B. (1997): Genetic Fingerprinting of *Pseudomonas syringae* pathovars Using ERIC-, REP- and IS50-PCR. *Journal of Phytopathology* 145:339-345.
185. Williams, J.G., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V. (1990): DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18:6531–6535.
186. Wilson, C. L., Miller, S. S., Otto, B. E., Eldridge, B. J. (1984). Pruning technique affects dieback and *Cytospora* infection in peach trees. *HortScience* 19:251-253.
187. Wilson, E.E. (1933): Bacterial canker of stone fruit trees in California. *Hilgardia* 8:83-123.
188. Wilson, E.E. (1939): Factors affecting development of the bacterial canker of stone fruits. *Hilgardia* 12:259-298.
189. Wimalajeewa D. L. S., Flett, J.D. (1985): A study of populations of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* on stone fruits in Victoria. *Plant Pathology* 34 (2): 248–254.

190. Wormald, H. (1931): Bacterial disease of stone fruit in Britain. III. The symptoms of bacterial canker in plum trees. *Journal of pomology* 9:239-256.
191. Wormald, H. (1932): Bacterial diseases of stone fruit trees in Britain. IV. The organism causing bacterial canker of plum trees. *Transactions of the British Mycological Society* 17:157-169.
192. Yessad, S, Manceau, C., Luisetti, J. (1992): A Detached Leaf Assay to Evaluate Virulence and Pathogenicity of Strains of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* on pear. *Plant Disease* 76:370-373.
193. Young J.M., Dye D.W., Bradbury J.F., Panagopoulos C.G., Robbs, C.F. (1978): A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 21:153-177.
194. Young, J.M. (1987): Orchard management and bacterial diseases of stone fruit. *New Zealand Journal of Experimental Agriculture* 15:257– 266.
195. Young, J.M. (1991): Pathogenicity and identification of lilac pathogens *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* van Hall 1902. *Annals of Applied Bacteriology* 118:283-298.
196. Young, J.M. (2010): Taxonomy of *Pseudomonas syringae*. *Journal of Plant Pathology* 92 (1, Supplement) S1.5-S1.14
197. Zeller, W., Yunlu, X., Bereswill, S., Rudolph, K. (1996): Taxonomy and virulence of bacterial blight (*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*) from pome fruit and stone fruit trees. (in: *Developments in Plant Pathology Pseudomonas syringae* Pathovars and Related Pathogens, eds. Rudolph K., T.J. Burr, J.W. Mansfield, D. Stead, A. Vivian, J. von Kietzell, pp. 465-469). Dordrecht-Boston-London:Kluwer Academic Publishers.
198. Zhu, S.F., A. Hadidi, I.M. Lee, D.E. Gundersen, C.L. Zhang (1998): Characterization of the phytoplasmas associated with cherry lethal yellows and jujube witches' broom disease in China. *Acta Horticulturae* 472:701–707
199. Janse, J.D. (2005): *Phytobacteriology - Principles and practice*. CABI Publishing, USA.

## BIOGRAFIJA



Dipl. inž. – master Renata Iličić je rođena 16.03.1987. godine u Odžacima. Osnovnu školu završila je mestu Vajska. Srednju medicinsku školu „7. april“ završila je u Novom Sadu. Poljoprivredni fakultet, Novi Sad smer Fitomedicina je upisala 2006/2007 godine.

Diplomski rad pod nazivom „Bakteriozno sušenje listova tikve“ je odbranila 2010. godine sa ocenom 10 i prosečnom ocenom tokom studiranja 8,66. Nakon završetka studija 2010/2011. godine je radila kao rukovodilac zaštite bilja (ratarstvo, povrtarstvo i semenarstvo) u DOO Petefi – Temerin i DOO Kinđa Agar – Kikinda. Iste godine upisala je i master studije smera Fitomedicina/Fitopatologija. Master rad pod nazivom „Etiološka proučavanja lisne pegavosti i truleži ploda uljane tikve (*Cucurbita pepo* L.)“ je odbranila 2011. godine sa ocenom 10 i prosečnom ocenom tokom studija 9,86. Doktorske studije smera Agronomija na Poljoprivrednom fakultetu u Novom sadu upisala je 2011/2012 godine. Od septembra 2013. godine zaposlena je kao istraživač saradnik na projektima Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja TR31038 i III46007 na Poljoprivrednom fakultetu u Novom Sadu.

Objavila je kao autor i koautor veći broj naučnih publikacija.

Član je društva za zaštitu bilja Srbije, društva genetičara Srbije i Američkog fitopatološkog društva (American Phytopathological Society).

Govori i služi se engleskim jezikom.