

UDK: 632.3

*Jelena Zindović¹***PSEUDOMONAS SYRINGAE SSP. SAVASTANOI (Smith, 1908),
PROUZROKOVAČ RAKA OLEANDERA*****PSEUDOMONAS SYRINGAE SSP. SAVASTANOI (Smith, 1908)*
*THE CAUSAL AGENT OF OLEANDER KNOT*****Izvod**

U radu su prikzani rezultati i metode proučavanja morfoloških i biohemijskih karakteristika bakterije *Pseudomonas syringae ssp. savastanoi*, prouzrokovača raka oleandera.

Ključne riječi: oleander, *Pseudomonas syringae ssp. savastanoi*, morfološke osobine, odgajivačke osobine, biohemijske osobine.

Abstract

Results of the study referred to the morphological and biochemical characteristics of bacteria *Pseudomonas syringae ssp. savastanoi*, the causal agent of oleander knot.

Key words: oleander, *Pseudomonas syringae ssp. savastanoi*, morphological characteristics, breeding characteristics, biochemical characteristics.

UVOD

Nerium oleander L. (oleander) je kod nas jako rasprostranjen u priobalnom pojasu, ali se može naći i na teritoriji Podgorice. Ova vrsta je značajna kao ukrasna biljka, sreće se u mnogim parkovima, ali se može slobodno razvijati u prirodi, van parkovskih površina, formirajući čiste sastojine (Popović i Sterniša, 1971).

Oleander je biljka podložna napadu mnogih patogena. Kao najznačajnija i ekonomski najštetnija bolest izdvaja se rak oleandera. Prouzrokovač ove bolesti je bakterija *Pseudomonas syringae ssp. savastanoi* (Smith).

¹ Jelena Zindović, dipl. inž., Biotehnički institut Podgorica

Bolest je veoma rasprostranjena i može se sresti skoro svuda gdje se gaji oleander. Prisutna je u Evropi, Mediteranu i Sjevernoj Africi (Bradbury, 1986), a konstatovana je i na Crnogorskom primorju (Arsenijević, 1988).

Prema podacima Tehabsim et al. (1991), Caponero et al. (1995), Pyrowolakis & Weltzien (1974), Lavermicocca & Surico (1987) ovaj patogen izaziva slične promjene na maslini i jasenu. Prema istraživanjima koja su vršena u Holandiji (Arsenijević, 1988) proizilazi da se bakterije prouzrokovajući patoloških promjena na jasenu, oleanderu i maslini razlikuju samo u pogledu patogenosti, dok se u pogledu morfoloških, biohemijskih, fizioloških i seroloških osobina gotovo potpuno podudaraju. Na osnovu razlika u pogledu patogenosti, *P. s. ssp. savastanoi* ima tri patovara: *P. s. ssp. savastanoi pv. oleae* – parazita *Olea europea* L. (maslina) i raznih vrsta porodice *Oleacea*, *P. s. ssp. savastanoi pv. nerii* – parazita *Nerium oleander* L. (oleander); *P. s. ssp. savastanoi pv. fraxini* – parazita *Fraxinus excelsior* L. (jasen) i *Olea europea* L.



Sl. 1. *Pseudomonas syringae ssp. savastanoi*. Simptomi na grančicama i listovima oleandera.

Fig. 1. *Pseudomonas syringae ssp. savastanoi*. The symptoms on branches and leaves of oleander.

S obzirom na prisustvo bolesti na velikom broju biljaka i sadnica oleandera u Crnoj Gori, pristupili smo prvo testiranju patogenosti, a zatim ispitivanju morfoloških, odgajivačkih i biohemijsko-fizioloških osobina bakterije, izolovane iz tumoralnih izraštaja grančica i listova oleandera. Uzorci su sakupljeni oktobra 2002. godine na teritoriji Podgorice i Crnogorskog primorja.

MATERIJAL I METODE

Istraživački rad obavljen je na Poljoprivrednom fakultetu u Zemunu, u laboratoriji Katedre za fitopatologiju. Kao početni materijal za izolaciju bakterije korišćeno je lišće i grančice oleandera na kojima su uočeni tumori.

Izolovanje bakterije izvršeno je standardnom metodom razmaza kapi macerata pomoću bakteriološke petlje, na standardnu mesopeptonsku podlogu (MPP). Nakon inkubacije na temperaturi od 27 °C odabrana je pojedinačna kolonija bakterija i presijana na kosu MPP podlogu. Na ovaj način dobijena je čista kultura bakterijskog izolata.

Patogenost proučavane bakterije

Provjera patogenosti izolovane bakterije vršena je na osnovu hipersenzibilnosti, infiltracijom lišća duvana, korišćenjem suspenzije bakterija koncentracije 10^7 ćel/ml. Infiltracija tkiva vršena je medicinskim špricom.

Osim duvana provjera patogenosti vršena je još inokulacijom listova i grančica oleandera. Inokulacije su izvršene prethodnim povređivanjem grančica i listova, pa prskanjem suspenzijom bakterija koncentracije 10^8 ćel/ml.

Proučavanje morfoloških, odgajivačkih i biohemijsko-fizioloških osobina bakterije vršena su standardnim metodama (Arsenijević, 1992, Šutić i Panić, 1969, Lelliot & Stead, 1987).

Bakteriološke karakteristike

Razvoj bakterija na vještačkoj podlozi praćen je posmatranjem izgleda, boje, veličine i oblika kolonija na mesopeptonskoj, King-ovoj podlozi B i podlozi obogaćenoj saharozom (NAS). Od tečnih podloga korišćene su hranljivi bujon, Fermi i Cohn. U tečnim podlogama praćene su sljedeće odlike: stepen zamućenosti, formiranje taloga, pramenova, oblačića i promjena boje. Sve podloge su zasijavane jednodnevnom bakterijskom kulturom.

Razlikovanje bakterija po Gramu obavljeno je korišćenjem 3% KOH (Arsenijević, 1988).

Prilikom proučavanja biohemijsko-fizioloških osobina korišćen je tzv. LOPAT test (Arsenijević, 1988, Klement et. al, 1990), karakterističan za predstavnike roda *Pseudomonas*. LOPAT test obuhvatio je ispitivanje sljedećih reakcija: stvaranje levana (prati se pojava na MPP podlozi sa 5% saharoze), aktivnost oksidaze, trulež krtola krompira, metabolizam arginina i hipersenzibilna reakcija na duvanu.

Od ostalih biohemijskih odlika proučene su sljedeće: fermentacija ugljenikovih jedinjenja (kao ugljenikova jedinjenja korišćeni su šećeri: laktoza, dekstroza, saharoza, maltoza i manoza, a od glukozida eskulin); hidroliza

skroba; hidroliza želatina; stvaranje amonijaka; stvaranje vodonik-sulfida; stvaranje indola; redukcija nitrata; aktivnost katalaze; tolerantnost prema 2% i 5% NaCl i reakcije u mlijeku (obrano mlijeko, mlijeko sa metilenskim plavim i mlijeko sa purpurnim brom-krezolom).

REZULTATI I DISKUSIJA

Patogenost proučavane bakterije

Sojevi bakterije prouzrokuju hipersenzibilnu reakciju na lišću duvana. Prve promjene na inokulisanom lišću duvana uočavaju se dosta brzo, već poslije 8-10 časova od ubrizgavanja suspenzije u lisno tkivo. Početne promjene manifestuju se blagim gubljenjem turgora inokulisanog tkiva. Jasne promjene nastale su nakon 24-48 časova, kada su se na inokulisanom lišću javile tipične nekrotične promjene. Inokulisano tkivo u početku je bilo manje-više sivo, a kasnije svijetlo-mrko do mrko.

Na inokulisanim biljkama oleandera, 15 dana nakon vještačke inokulacije, pojavili su se tumori veličine 2-3 mm, prvo na grančicama, pa onda na lišću. Njihov izgled i boja ukazuje na razvoj tipičnih simptoma bolesti koja nastaje u prirodi u uslovima spontane zaraze.

Bakteriološke karakteristike

Proučavana bakterija ima štapićast oblik, gramnegativna je i asporogena.

Na mesopeptonskoj podlozi bakterija je formirala žučkasto-bijele, sjajne, glatke, blago ispupčene, tačkaste kolonije, prečnika 1-3 mm, što su prema podacima Arsenijevića (1992) i Lelliot-a & Stead-a (1987) karakteristike bakterija roda *Pseudomonas*.

Konstatovano je da bakterija na King B podlozi intenzivno formira kolonije žučkastobijele boje, koje posmatrane pod ultravioletnim svjetlom imaju plavičastozeleni sjaj, što je dokaz da bakterija luči pigment fluorescin i da spada u grupu fluorescentnih bakterija roda *Pseudomonas* (Arsenijević, 1992, Klement et al., 1990, Kiraly et al., 1974). Takođe je konstatovan umjeren razvoj bakterije na kosoj MPP, a kod uspravne MPP podloge bakterija se razvijala i na površini i duž uboda, što dokazuje da je bakterija fakultativni anaerob (Šutić i Panić, 1969). Od tečnih podloga pozitivne reakcije su se javile u hranljivom bujonom i Fermi-ju, dok u podlozi Kohn nije došlo ni do kakvih promjena.

Tab. 1. Biohemijsko-fiziološke odlike ispitivane bakterije *Pseudomonas syringae* ssp. *savastanoi*, prouzrokovatelj raka oleandera i poređenje sa literaturnim podacimaTab. 1. Biochemical and physiological properties of *Pseudomonas syringae* ssp. *savastanoi*, the causal agent of oleander knot and comparison with literature data

| Test | Ispitivani soj <i>Investigated strain</i> | Tehabsim (1991) | Arsenijević (1988, 1992) |
|--|--|--------------------|-----------------------------|
| Hidroliza skroba <i>Starch hydrolysis</i> | + | nt | - |
| Hidroliza eskulina <i>Aesculin hydrolysis</i> | - | + | - |
| Redukcija nitrata <i>Nitrate reduction</i> | - | - | - |
| Stvaranje NH ₃ <i>NH₃ production</i> | + | nt | + |
| Stvaranje H ₂ S <i>H₂S production</i> | - | - | - |
| Stvaranje indola <i>Indole production</i> | + | + | nt |
| Oksidaza <i>Oxidase</i> | - | - | - |
| Katalaza <i>Catalase</i> | + | + | nt |
| Arginin-dehidrolaza <i>Arginine-dehydrolase</i> | - | - | - |
| Laktoza <i>Lactose</i> | +- | nt | - |
| Dekstroza <i>Dextrose</i> | - | nt | - |
| Saharoza <i>Sucrose</i> | + | + | + |
| Maltoza <i>Maltosa</i> | - | - | +- |
| Manoza <i>Manosa</i> | + | nt | nt |
| 1 % NaCl | nt | + | + |
| 2 % NaCl | ++ | - | nt |
| 5 % NaCl | + | - | nt |

+ - pozitivna reakcija (positive reaction)

- - negativna reakcija (negative reaction)

nt - nije testirano (not tested)

Na osnovu reakcija LOPAT testa potvrđeno je (Lelliot-a & Stead-a, 1987) da bakterija pripada Ib grupi roda *Pseudomonas*. Naime, korišćenjem pet osnovnih reakcija ovog testa, dobili smo sljedeće rezultate: ----+, što znači da proučavana bakterija ne stvara levane na MPP podlozi sa dodatkom 5% saharoze; ne posjeduje ferment oksidazu; na inokulisanim kriškama krompira ne izaziva nikakve promjene; ne posjeduje ferment arginin-dehidrolazu koji razlaže arginin i izaziva hipersenzibilnu reakciju na duvanu.

U tabeli 1. prikazani su rezultati ispitivanja biohemijskih karakteristika bakterije *Pseudomonas syringae ssp. savastanoi* i poređenje sa literaturnim podacima.

U biohemijskom pogledu, bakterija *P. s. ssp. savastanoi* izvršila je fermentaciju nekih ugljenikovih jedinjenja. Promjenom boje indikatora u podlozi koja je sadržala saharozu i manozu, ustanovljeno je da bakterija razlaže ove šećere do kiseline, a na osnovu pojave mjehurića konstatovano je da je izvršila i dalje razlaganje kiseline do ugljen-dioksida i vode. Bakterija je izvršila i fermentaciju laktoze, ali samo do kiseline, dok kod dekstroze i manoze nisu uočene nikakve promjene.

Utvrđivanju biohemijskih osobina doprinijeli su rezultati biohemijskih testova. Tako je utvrđeno da dobijeni izolati vrše hidrolizu skroba, tj. da stvaraju prostija ugljenikova jedinjenja pod uticajem fermenta. Konstatovano je da bakterija luči ferment katalazu, kada se dio bakterijske kolonije homogenizuje u 1 ml 20% H₂O₂. Pozitivnu reakciju u ovom slučaju označava pojava mjehurića gasa nastala zbog oslobađanja kiseonika, odnosno ukazuje na prisustvo fermenta katalaze u ispitivanoj kulturi. Bakterija sadrži i ferment koji u peptonskoj podlozi triptofan razlaže do indola, na šta je ukazala pojava roze prstena na površini podloge. Utvrđeno je da bakterija ne posjeduje ferment želatinazu.

Reakcije: redukcija nitrata, hidroliza eskulina i stvaranje vodonik-sulfida dale su negativne rezultate, što je prema Arsenijeviću (1988) i Lelliot-u & Stead-u (1987) karakteristika bakterije *P. s. ssp. savastanoi*.

Kao važan podatak za potpuniju identifikaciju bakterije poslužili su rezultati reakcija u mlijeku. Uočeno je da ova bakterija izaziva i koagulaciju (grušanje) mlijeka i peptonizaciju (prosvjetljavanje) mlijeka. Koagulacija je konstatovana kod obranog, mlijeka sa metilenskim plavim i mlijeka sa purpurnim brom krezolom. Kod mlijeka sa metilenskim plavim došlo je do promjene boje u bijelu, dok je kod mlijeka sa purpurnim brom krezolom konstatovana promjena u maslinastozelenu boju.

Bakterija je pokazala tolerantnost prema 2% i 5% NaCl. I u jednom i u drugom rastvoru došlo je do umjerenog razvoja bakterije.

ZAKLJUČAK

Poređenjem rezultata istraživanja koji se odnose na testiranje patogenosti, ispitivanje morfoloških i biohemijskih osobina izolovane bakterije sa podacima drugih autora, zaključeno je da patogen izolovan iz tumora grančica i listova oleandera pripada vrsti *Pseudomonas syringae ssp. savastanoi* (Smith).

Bakterija proizvodi fluorescentni pigment na King B podlozi, što ukazuje na to da patogen pripada grupi fluorescentnih bakterija roda *Pseudomonas*.

U cilju proučavanja porasta kolonija na različitim podlogama dobili smo sljedeće rezultate: bakterija formira kolonije na MPP i Fermi podlozi, a ne formira na MPP podlozi sa dodatkom 5% saharoze i Cohn podlozi.

Rezultati LOPAT testa su sljedeći: ----+, što znači da bakterija ne stvara levane, ne posjeduje ferment oksidazu, ne izaziva trulež krtola krompira, ne hidrolizuje arginin i izaziva pojavu hipersenzibilne reakcije na duvanu.

Biohemijski testovi pokazuju da svi sojevi bakterije daju negativnu reakciju na hidrolizu eskulina i želatina, stvaranje H₂S, redukciju nitrata, stvaranje kiseline iz dekstroze i maltoze. Pozitivni rezultati dobijeni su u sljedećim reakcijama: aktivnost katalaze, hidroliza skroba, stvaranje indola i amonijaka, stvaranje kiseline iz saharoze, laktoze i manoze, razvoj u 2% i 5% NaCl.

LITERATURA

- Arsenijević, M. (1988): Bakterioze biljaka, Beograd: Naučna knjiga.
- Arsenijević, M. (1992): Fitopatogene bakterije, Beograd: Naučna knjiga.
- Bradbury, J.F. (1986): Guide to plant pathogenic bacteria, CAB International Mycological Institute, 173 pp.
- Caponero, A., Contesini, A. M., Iacobellis, N. S. (1995): Population diversity of *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* on olive and oleander, Review of Plant Pathology, vol. 75, N° 5, 427 pp.
- Ferari, M., Marcon, E., Menta, A., Montermini, A. (1999): Malattie e parassiti delle piante da fiore, ornamentali e forestali. Edagricole – Edizione agricole.
- Ferraris, T. (1926): Trattato di patologia e terapia vegetale, 3 ed., Milano, 104 - 106.

- Израельский, В.П. (1960): Бактериальные болезни растений, Москва: Государственное издательство сельскохозяйственной литературы, 147 - 148.
- Klement, Z., Rudolph, K., Sands, D. C., (1990): *Methods in Phytobacteriology*, Budapest: Akademia Kiado, 134 - 142.
- Kiraly, Z., Klement, Z., Solymosy, F., Voros, J. (1974): *Methods in Plant pathology*, Akademia Kiado, Budapest.
- Колесников, А. И. (1974): Декоративная дендрология, Москва: Издательство «Лесная промышленность», 524-525.
- Lavermicossa, P., & Surico, G. (1987): Presenza epifitica di *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* e di altri batteri sull'olivo e sull'oleandro, *Phytopathologia Mediteranea*, vol. 26, 136 - 141.
- Lelliot, R. A., & Stead, D. E. (1987): *Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants*, vol. 2, British society for Plant Pathology, 43 - 44
- Pascal, P. Pirone. (1978): *Diseases & Pests of Ornamental plants*, New York: A Wiley - Interscience publication, 370 - 372.
- Popović, D., Sterniša, A. (1971): Flora i vegetacija Hercegovinskog područja s posebnim osvrtom na parkovsko bilje, Beograd: Beogradski izdavačko grafički zavod, 137-138.
- Pyrowolakis, E., & Weltzien, C. H. (1974): Studies on the distribution of olive knot, induced by *Pseudomonas savastanoi* (Sm.) Stev. in the Greek island of Crete, *Phytopathologia Mediteranea*, N° 13, 118 - 120.
- Tebabsim, A., Khadair, M. A., Janse, J. D. (1991): Occurrence and distribution of *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* in Jordan, *Phytopathologia Mediteranea*, vol. 30, 64 - 66.
- Šutić, D. (1995): *Anatomija i fiziologija bolesnih biljaka*, Beograd - Zemun, 21 pp.
- Šutić, D., Dowson, W. J. (1962): The reactions of olive, oleander and ash, cross inoculated with some strains and forms of *Pseudomonas savastanoi* (Smith) Stevens, *Phytopathologische Zeitschrift*, Bd. 46, Heft 4, 305 - 314.
- Šutić, D., Panić, M. (1969): *Metode proučavanja fitopatogenih bakterija*, Beograd: Zavod za zaštitu bilja poljoprivrednog fakulteta i Sekretarijat za poljoprivredu, šumarstvo i vodoprivredu SR Srbije.

***PSEUDOMONAS SYRINGAE SSP. SAVASTANOI* (Smith, 1908)
*THE CAUSAL AGENT OF OLEANDER KNOT***

by
Jelena Zindović
Biotechnical institute - Podgorica

Summary

Comparing the results of this survey, which consider patogenicity, morphological and biochemical characteristics of the isolated bacteria, with date of other scientists, we concluded that pathogen isolated from the bacterial galls from leaves and branches of oleander is *Pseudomonas syringae ssp. savastanoi*.

Bacteria produces pigments on King's medium B and that indicates that pathogen belongs a group of green-fluorescent pseudomonads.

In order to investigate growth of colonies of bacteria in some media we obtained this results: colonies are present on MPP and Fermi media and colonies are absent from the 5% sucrose nutrient agar and Cohn media.

The results of the LOPAT tests are: ---+, which means that all isolates are non-levan, oxidase reaction is negative, potato rot is negative, arginin hydrolysis is negative and hypersensitivity reaction on tabacco is positive.

The biochemical tests shows that all the strains gave a negative reaction for aesculin and gelatin hydrolysis, H₂S production, nitrate reduction and acid production from decstrose and maltose. Positive test results were obtained for catalase reaction, scrob hydrolysis, indol and NH₃ production, acid production from sucrose, lactose, manose and growth in 2% and 5% NaCl.