

Analiza masnih kiselina sojeva *Erwinia amylovora* iz Srbije i Crne Gore

Milan Ivanović, Katarina Gašić, Anđelka Čalić, Nemanja Kuzmanović,
Mirko Ivanović i Aleksa Obradović

Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Institut za fitomedicinu, Nemanjina 6,
11080 Beograd, Srbija
(milanivanovic007@yahoo.com)

Primljen: 4. aprila 2011.
Prihvaćen: 13 aprila 2011.

REZIME

Automatizovana metoda analize masnih kiselina primenjena je za identifikaciju i proučavanje heterogenosti *Erwinia amylovora*. Kao materijal za analizu prikupljen je 41 soj *E. amylovora* izolovan iz 8 različitih vrsta domaćina gajenih u 13 lokaliteta u Srbiji i jednom lokalitetu u Crnoj Gori. Rezultati ukazuju da svi proučavani sojevi poseduju 14:0 3OH masnu kiselinu, koja je karakteristična za „*amylovora*“ grupu. Na osnovu sastava masnih kiselina 39 sojeva je identifikovano kao *E. amylovora*, kao prvi izbor iz baze podataka. Dva soja su identifikovana kao *E. amylovora*, ali tek kao drugi izbor iz baze podataka, što je najverovatnije posledica specifičnosti u sastavu njihovih masnih kiselina. Rezultati analize masnih kiselina takođe pokazuju da populacija *E. amylovora* poreklom iz Srbije nije homogena i da među sojevima postoje tri grupe ili profila, koji su u ovom radu obeleženi sa α , β i γ . Svi sojevi koji su izolovani na prostoru centralne ili južne Srbije pripadaju grupi α , kao i četiri soja izolovana na području Vojvodine. Grupama β i γ pripadaju samo sojevi izolovani na području Vojvodine. Dobijeni rezultati predstavljaju dokaz heterogenosti populacije *E. amylovora* na ovim prostorima i ukazuju na mogućnost prodora patogena u naše područje iz različitih pravaca. Analiza masnih kiselina omogućila je ne samo identifikaciju do nivoa vrste, već i nova saznanja o heterogenosti populacije *E. amylovora* na ovim prostorima.

Ključne reči: Analiza masnih kiselina; *Erwinia amylovora*; heterogenost; populacija; bakteriorna plamenjača voćaka

UVOD

Bakteriozna plamenjača voćaka i ukrasnih biljaka, koju prouzrokuje *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al. spada među najštetnije bakterioze gajenih biljaka (Bonn i van der Zwet, 2000). Prisustvo bakteriorne plamenjače do sada je utvrđeno u većini evropskih zemalja, uključujući i zemlje iz našeg okruženja

(van der Zwet, 2002). U Srbiji prisustvo bakteriorne plamenjače prvi put je primećeno krajem osamdesetih godina prošlog veka, a zvanično potvrđeno 1990. godine na kruški i dunji (Arsenijević i sar., 1991). Od tada je registrovano više novih domaćina ovog patogena, tako da se *E. amylovora*, pored navedenih, danas pojavljuje i na jabuci (*Malus domestica*), mušmulu (*Mespilus germanica*), glogu (*Crataegus* sp.), japanskoj kruški

(*Pyrus pyrifolia*), oskoruši (*Sorbus* sp.), vatrenom trnu (*Pyracantha* sp.), japanskoj dunji (*Chaenomeles japonica*) i polegloj dunjarici (*Cotoneaster horizontalis*) (Jovanović, 1999; Balaz i sar., 2004; Gavrilović i sar., 2007). Smatra se da je u našu zemlju patogen dospao iz dva pravca: sa juga – iz Makedonije u područje južne Srbije, i sa zapada na teritoriju zapadne Srbije (Panić i Arsenijević, 1996). Za sada, međutim, ne postoje naučni argumenti koji bi potvrdili pretpostavke o načinu unošenja ovog patogena u našu zemlju, kao i pravcu širenja bolesti na ovim prostorima.

Identifikacija fitopatogenih bakterija, usled njihove specifične građe, predstavlja ponekad složen i dug postupak. U cilju identifikacije bakterija potrebno je odrediti njihove morfološke, odgajivačke, biohemijske i serološke odlike. Usled izražene srodnosti pojedinih bakterija, ove klasične metode identifikacije sve više se dopunjuju novim, molekularnim, ali i automatizovanim metodama (Schaad i sar., 1990). Jedna od automatizovanih tehnika identifikacije bakterija je i analiza masnih kiselina. Uloga masnih kiselina u klasifikaciji bakterija poznata je skoro pola veka. Masne kiseline u bakterijskoj ćeliji najčešće se nalaze u citoplazmatičnoj i spoljašnjoj membrani, a njihov tip i količina predstavljaju važan taksonomski karakter (Dickstein i sar., 2001). Rod *Erwinia* odlikuje se prisustvom 14:0 masne kiseline sa tri hidroksilne grupe, koja nije prisutna kod drugih rodova fitopatogenih bakterija (Sasser, 1990). Primenom gasne hromatografije nakon esterifikacije masnih kiselina u metil-estre masnih kiselina moguće je izvršiti identifikaciju bakterija do nivoa vrste, podvrste i patogenog varijeteta. Utvrđivanje sastava masnih kiselina u građi bakterijskih ćelija predstavlja pouzdano sredstvo u identifikaciji i utvrđivanju sličnosti ili razlika, kako među samim proučavanim sojevima tako i u odnosu na karakteristike sojeva deponovanih u bazi podataka (Obrodović i sar., 2004, 2007, 2008; Ivanović i sar., 2007).

Tabela 1. Sastav masnih kiselina u 143 proučavana soja *E. amylovora* (van der Zwet i Wells, 1993)

Nezasićene nerazgranate masne kiseline	43%
Zasićene nerazgranate masne kiseline	41%
Hidroksi kiseline	7%
Nezasićene razgranate kiseline	4%
Ciklične kiseline	3%
Zasićene razgranate kiseline	1%

Postoji više od 400 različitih masnih kiselina koje se pojavljuju kod bakterija. One predstavljaju jedinjenja sa najčešće 8-20 ugljenikovih atoma (Sasser, 2001). Najznačajnija podela masnih kiselina je na zasićene (bez dvostrukih veza u molekulu) i nezasićene (sa jednom ili

više dvostrukih veza), ali postoji i niz drugih klasa i grupa masnih kiselina u zavisnosti od broja ugljenikovih atoma, prisustva aktivnih grupa, prostorne konformacije itd. (Rikovski, 1970). Gasnom hromatografijom moguće je odrediti tačan odnos i sastav masnih kiselina u bakterijskoj ćeliji. Tip i količina masnih kiselina, tj. profil masnih kiselina (PMK) mogu varirati u zavisnosti od starosti bakterijske kulture, uslova gajenja i sastava podloge (Casano i sar., 1988; Wells i sar., 1994). Ipak, u standardizovanim uslovima gajenja moguće je dobiti tipičan profil karakterističan za vrstu (Tabela 1), pa čak i za niže taksonomske kategorije, koje se zatim unose u bazu podataka (Paulin, 2000). Iako taksonomski bliske vrsti *E. amylovora*, saprofitne vrste roda *Erwinia* i ostale vrste bakterija imaju drugačije profile masnih kiselina (Wells i sar., 1994). Profil masnih kiselina često je korišćen u identifikaciji *E. amylovora* nakon unošenja patogena u određenu zemlju, kao što je slučaj sa Egiptom ili Bugarskom (van der Zwet i Wells, 1993). Ovo je, međutim, prvi put da se analizom masnih kiselina proučavaju sojevi *E. amylovora* izolovani na teritoriji Srbije i Crne Gore.

MATERIJAL I METODE

Proučen je sastav masnih kiselina 41 soja *E. amylovora*, izolovanih iz osam različitih vrsta domaćina u periodu od 1998. do 2005. godine, gajenih u 13 lokaliteta u Srbiji i jednom lokalitetu u Crnoj Gori (Tabela 2). Proučavani sojevi su prethodno opisani i identifikovani korišćenjem standardnih bakterioloških testova (Ivanović i sar., 2007), proučavanjem metabolizma šireg spektra ugljenikovih jedinjenja i seroloških odlika (Ivanović i sar., 2008b), i reakcijom lančanog umnožavanja DNK fragmenta pomoću A/B para prajmera metodom Bereswill-a i saradnika (1992), kao i reakcijom sa dva para prajmera u jednoj reakcionoj smeši (Nested PCR) po metodi Llop-a i saradnika (2000) (Ivanović i sar., 2009b). Priprema uzoraka za gasnu hromatografiju vršena je u 5 koraka (Slika 1), koristeći MIDI tehničko uputstvo (Sasser, 2001):

1. Prikupljanje bakterija – čiste bakterijske kulture *E. amylovora* gajene su 24 h pri 28°C na preporučenoj TSB (Trypticase Soy Broth Agar) podlozi. Bakteriološkom petljom prikupljeno je oko 40 mg bakterijske kulture proučavanog soja i preneto u epruvete;

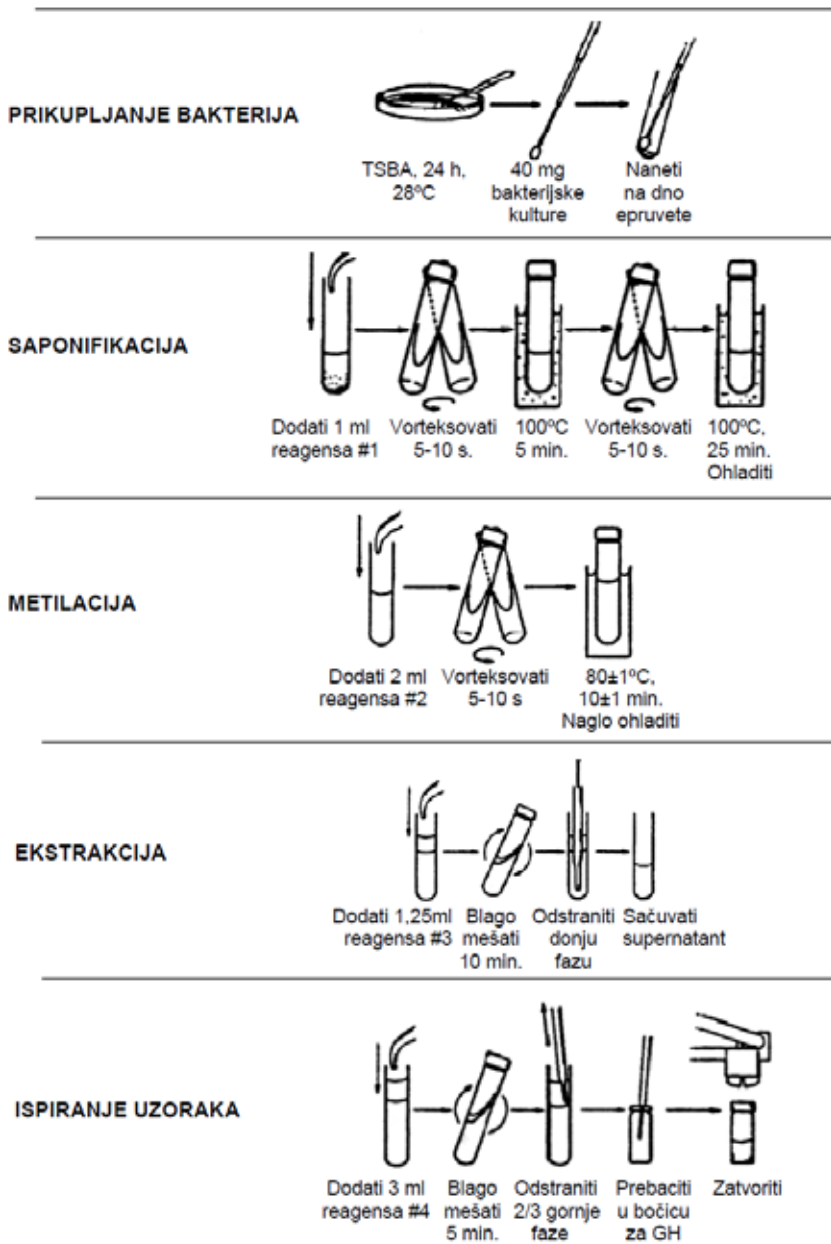
2. Saponifikacija – vršena je dodavanjem 1 ml reagensa #1 (45 g NaOH, 150 ml metanola i 150 ml destilovane vode) u epruvete sa uzorcima. Epruvete su čvrsto zatvorene teflonskim zatvaračima a sadržaj je nakratko promešan i postavljen u vodeno kupatilo pri temperaturi 100°C u trajanju 5 min. Nakon toga, sadržaj je snažno promešan 5-10 s, i ponovo vraćen u vodeno kupatilo za još 25 min;

3. Metilacija – u ohlađen sadržaj dodavano je po 2 ml reagensa #2 (325 ml 6.0 N hidrohlorne kiseline i 275 ml metil-alkohola), zatim je sadržaj kratko promešan i potom zagrevan do $80 \pm 1^\circ\text{C}$ u trajanju 10 ± 1 min. Ova faza je kritična u pogledu vremena i temperature. U ovom koraku dolazi do opadanja pH vrednosti suspenzije ispod 1,5 što uzrokuje metilaciju masnih kiselina;

4. Ekstrakcija – u prohladen sadržaj dodato je po 1,25 ml reagensa #3 (200 ml heksana i 200 ml metil-tetra-butil etra) što dovodi do izdvajanja estara masnih kiselina

u organsku fazu koja je neophodna za analizu gasnom hromatografijom. Sadržaj u epruvetama je zatim blago promešan pomoću rotacione mešalice u trajanju od 10 min nakon čega je iz epruvete odstranjena donja faza;

5. Ispiranje uzoraka – 3 ml reagensa #4 (10,8 g NaOH i 900 ml destilovane vode) dodato je organskoj fazi koja je preostala u epruveti i zatim blago mešano na rotacionoj mešalici 5 min, nakon čega je oko 2/3 gornje (organske) faze pipetirano u bočicu za dalju analizu u gasnom hromatografu.



Slika 1. Priprema uzoraka za gasnu hromatografiju (Sasser, 2001). GH – gasna hromatografija

Tabela 2. Proučavani sojevi *E. amylovora* poreklom iz Srbije i Crne Gore

R.br.	Soj	Domaćin	Lokalitet	Izolovan	AMK	
					IS	PMK
1.	KFB 146	Jabuka	Sombor	1998.	0,78	β
2.	KFB 147	Jabuka	Bačka Palanka	2000.	0,77	β
3.	KFB 148	Jabuka	Čačak	2005.	0,92	α
4.	KFB 149	Jabuka	Topola	2005.	0,84	α
5.	KFB 150	Jabuka	Topola	2005.	0,83	α
6.	KFB 151	Jabuka	Topola	2005.	0,77	α
7.	KFB 152	Jabuka	Topola	2005.	0,80	α
8.	KFB 153	Kruška	Šid	1998.	0,64	β
9.	KFB 154	Kruška	Šid	1998.	0,84	β
10.	KFB 155	Kruška	Kraljevo	2005.	0,76	α
11.	KFB 156	Kruška	Kraljevo	2005.	0,83	α
12.	KFB 158	Kruška	Mladenovac	2005.	0,75	α
13.	KFB 159	Kruška	Mladenovac	2005.	0,74	α
14.	KFB 160	Kruška	Begaljica	2005.	0,73	α
15.	KFB 161	Kruška	Begaljica	2005.	0,82	α
16.	KFB 162	Kruška	Topola	2005.	0,73	α
17.	KFB 163	Kruška	Topola	2005.	0,70*	α
18.	KFB 164	Kruška	Topola	2005.	0,80	α
19.	KFB 165	Kruška	Topola	2005.	0,75	α
20.	KFB 166	Dunja	Bečej	1998.	0,68	β
21.	KFB 167	Dunja	Topola	2005.	0,79	α
22.	KFB 168	Dunja	Arilje	2005.	0,89	α
23.	KFB 169	Dunja	Niš	2005.	0,89	α
24.	KFB 170	Dunja	Niš	2005.	0,88	α
25.	KFB 172	Oskoruša	Niš	2005.	0,74	α
26.	KFB 173	Oskoruša	Niš	2005.	0,82	α
27.	KFB 174	Oskoruša	Niš	2005.	0,84	α
28.	KFB 175	Oskoruša	Niš	2005.	0,83	α
29.	KFB 176	Japanska kruška	Čačak	2005.	0,83	α
30.	KFB 177	Japanska kruška	Čačak	2005.	0,81	α
31.	KFB 178	Japanska kruška	Čačak	2005.	0,75	α
32.	KFB 179	Japanska dunja	Bačka Palanka	2000.	0,64	γ
33.	KFB 180	Japanska dunja	Bačka Palanka	2005.	0,61	γ
34.	KFB 181	Dunjarica	Futog	2000.	0,69	α
35.	KFB 182	Dunjarica	Futog	2000.	0,64	α
36.	KFB 183	Mušmula	Šid	2001.	0,73*	γ
37.	KFB 184	Mušmula	Niš	2005.	0,81	α
38.	KFB 185	Mušmula	Niš	2005.	0,85	α
39.	KFB 186	Jabuka	Bela Crkva	2003.	0,80	α
40.	KFB 187	Jabuka	Bela Crkva	2003.	0,78	α
41.	KFB 188	Jabuka	Župa Nikšićka	2003.	0,72	α

KFB – kolekcija fitopatogenih bakterija, kurator prof. dr Aleksa Obradović, Institut za fitomedicinu, Poljoprivredni fakultet, Beograd; AMK – analiza masnih kiselina; IS – indeks sličnosti sa najbližim sojem iz TSBA50 baze podataka; PMK – profil masnih kiselina;

* – drugi izbor iz TSBA50 baze podataka

Razdvajanje komponenti iz smeše gasnom hromatografijom zasniva se na razlici u koeficijentima raspodele između stacionarne (tečne) i mobilne gasovite faze (gas nosač). Tehnika se primenjuje samo za ona jedinjenja koja se nalaze u gasovitom stanju, ili se pogodnim metodama mogu prevesti u gasovito stanje. Masti i ulja imaju relativno veliku molekulsku masu i nizak napon pare, pa se teško mogu direktno ispitivati gasnom hromatografijom. Prevođenjem masnih kiselina u metil-estre, koji imaju znatno nižu tačku isparavanja i stabilniji su, prevazilaze se navedeni problemi (Sasser, 2001). Identifikacija se vrši upoređivanjem tipa i količine, odnosno profila masnih kiselina proučavanog soja sa najbližim profilom koji se nalazi u bazi podataka (van der Zwet i Wells, 1993; Dickstein i sar., 2001). U ovom radu je, za upoređivanje i identifikaciju proučavanog soja, korišćena komercijalna TSBA50 baza podataka. Utvrđivanje međusobne sličnosti proučavanog soja, kao i sličnosti sa sojevima u bazi podataka ove automatizovane metode izvršeno je pomoću kompjuterskog programa Sherlock. Indeksom sličnosti, koji se kreće između 0 i 1 izražena je sličnost proučavanog soja sa najbližim sojem u bazi podataka. Na kraju procesa analize masnih kiselina, pomoću MIDI Library Generation softvera, formiran je dendrogram proučavanog soja. Ovaj program upoređuje uzorke koristeći metodu glavnih komponenta. Prilikom izrade

dendrograma korišćena je klaster analiza u formiranju neponderisanih odgovarajućih parova na osnovu sastava masnih kiselina (Dickstein i sar., 2001). Analiza masnih kiselina izvršena je u Laboratoriji za identifikaciju bakterija i analizu masnih kiselina Univerziteta Florida u Gejnsvilu, SAD.

REZULTATI

Nakon prevođenja masnih kiselina u metil-estre gasnom hromatografijom izvršena je analiza i dobijeni su profili masnih kiselina svih proučavanih sojeva. Na kraju analize, obradom profila svakog pojedinačnog soja, formiran je dendrogram (Slika 2). Svi proučavani sojevi *E. amylovora* posedovali su 14:0 3OH masnu kiselinu, koja je karakteristična za rod *Erwinia*. Sojevi *E. amylovora*, proučavani u ovom radu imali su u proseku 45,4% zasićenih, nerazgranatih masnih kiselina sa parnim brojem ugljenikovih atoma (klasa A), zatim 1,9% zasićenih, nerazgranatih masnih kiselina sa neparnim brojem C-atoma (klasa B), 33,9% nezasićenih masnih kiselina (klasa C), 9,3% hidroksi kiselina (klasa D), 0,2% razgranatih, zasićenih masnih kiselina (klasa E), zatim 8,8% cikličnih masnih kiselina (klasa F) i 0,5% nepoznatih komponenti klase G (Tabela 3).

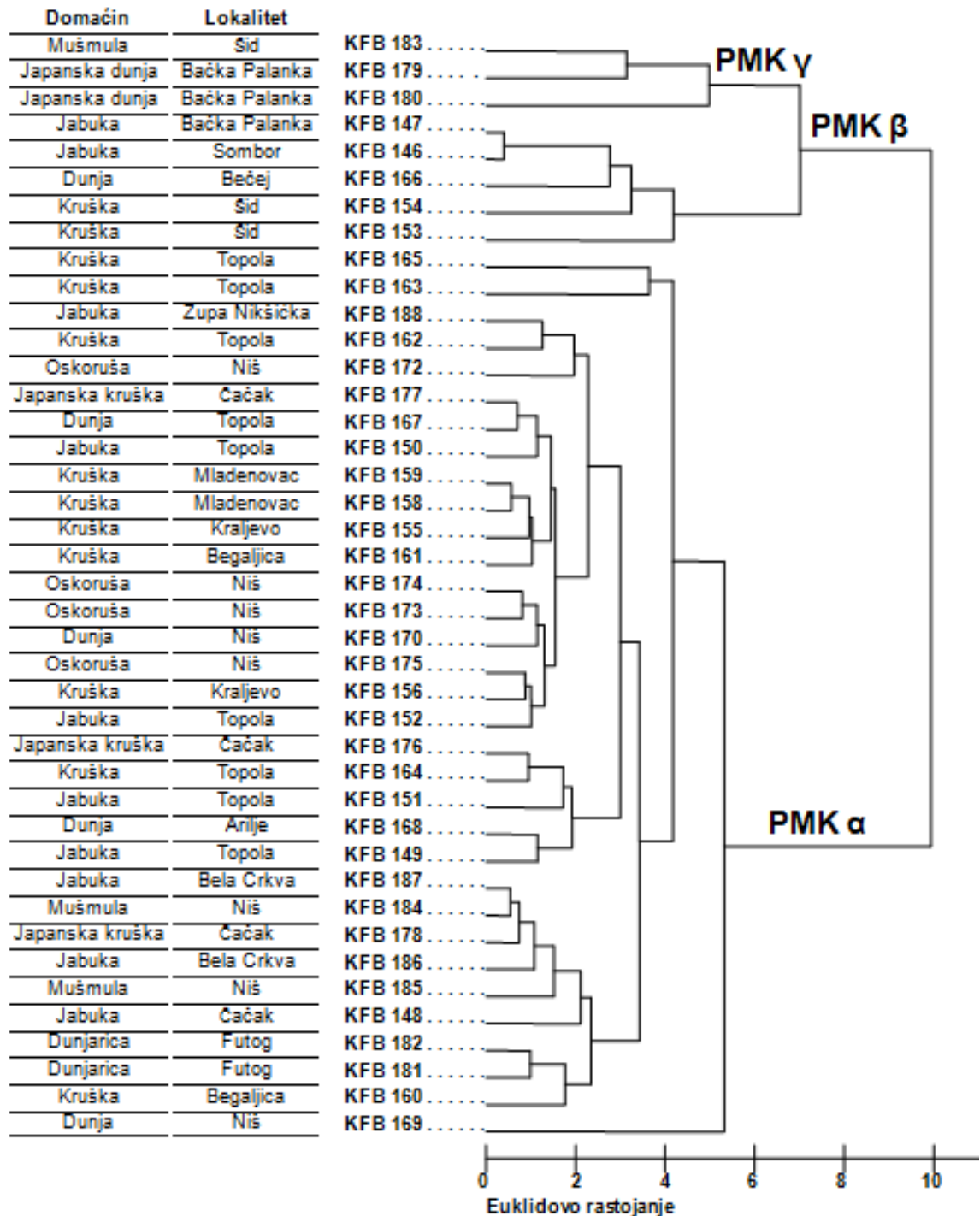
Tabela 3. Sastav masnih kiselina proučavanih sojeva *Erwinia amylovora* u ovom radu

	Sastav masnih kiselina (%)														Klasa G
	Klasa A				Klasa B		Klasa C				Klasa D		Klasa E	Klasa F	
	12:0	14:0	16:0	18:0	13:0	17:0	16:1 w5c	16:1 w7c	17:1 w8c	18:1 w7c	14:0 2OH	14:0 3OH	19:0 izo	17:0 ciklo	
PMK* α	4,8	4,9	34,7	0,3	0,2	1,7	0,1	22,8	0,0	7,8	0,7	9,2	0,2	13,0	
PMK β	4,9	5,6	35,4	0,2	0,3	1,6	0,2	27,0	0,2	5,7	0,0	9,0	0,0	8,9	
PMK γ	4,8	5,4	34,4	0,3	0,3	1,6	0,1	31,3	0,2	6,8	0,0	9,2	0,0	4,5	
Prosek	4,8	5,3	34,9	0,4	0,3	1,6	0,1	27,0	0,1	6,7	0,2	9,1	0,1	8,8	
Ukupno	45,4				1,9		33,9				9,3		0,2	8,8	0,5

* - profil masnih kiselina

Svi proučavani sojevi *E. amylovora* svrstani su u tri grupe (Slika 2): α – kojoj pripada najveći broj sojeva, ukupno 33; β – 5 sojeva, i to KFB 146, KFB 147, KFB 153, KFB 154 i KFB 166; γ – tri soja, KFB 179, KFB 180 i KFB 183. Detaljnijim proučavanjem sastava masnih kiselina uočene su razlike u profilima između sojeva. Najveće razlike između ove tri grupe sojeva utvrđene su u količini ukupnih nezasićenih masnih kiselina klase C: 30,7% za grupu α , 33,1% za grupu β i 38,4% za grupu γ . Značajne razlike su, takođe, izmerene

i u količini ciklične masne kiseline: 13,0% za grupu α , 8,9% za grupu β i 4,5% za grupu γ . Pored kvantitativnih razlika u sastavu masnih kiselina, grupa α se izdvajala i kvalitativno jer je u svom sastavu posedovala i hidroksi kiseline klase D sa 2 hidroksilne grupe, kao i razgranate masne kiseline klase E, što nije registrovano kod druge dve grupe sojeva. Takođe, grupe β i γ su u sastavu svojih masnih kiselina posedovale 17:1 w8c nezasićenu masnu kiselinu koja nije detektovana kod sojeva grupe α (Tabela 3).



Slika 2. Grupisanje proučavanih sojeva *E. amylovora* iz Srbije i Crne Gore na osnovu sastava masnih kiselina. PMK – profil masnih kiselina

Od ukupno 41 soja, 39 je identifikovano kao *E. amylovora*. Međutim, za soj KFB 163 prvi izbor iz baze podataka bila je vrsta *Rabnella aquatilis* (Gram-negativna, štapičasta bakterija iz fam. *Enterobacteriaceae*) (Harrell i sar., 1989), sa indeksom sličnosti od 0,75, a drugi izbor *E. amylovora*, sa indeksom sličnosti 0,7. Kod soja KFB 183 prvi izbor iz baze podataka bila je vrsta *Yersinia aldovae* (Gram-negativna, štapičasta bakterija iz fam. *Enterobacteriaceae*) (Bercovier i sar., 1984) sa indeksom sličnosti 0,76, a drugi izbor *E. amylovora* sa indeksom sličnosti 0,73. Indeks sličnosti proučavanih sojeva sa sojevima iz TSBA50 baze podataka kretao se između 0,61 i 0,92 (Tabela 2).

DISKUSIJA

Tradicionalne metode identifikacije fitopatogenih bakterija standardnim diferencijalnim testovima, biološkim testom, ili serološkim metodama su i dalje u primeni. Međutim, uvek je postojala težnja za razvojem pouzdanijih, bržih i automatizovanih metoda kojima bi se mogao obraditi veliki broj uzoraka za kratko vreme. Jedna od takvih metoda je analiza masnih kiselina koje ulaze u sastav ćelijskih membrana bakterija. U ovom radu, osim za identifikaciju, analiza masnih kiselina korišćena je i za proučavanje homogenosti populacije *E. amylovora* poreklom iz različitih domaćina i lokaliteta u Srbiji i Crnoj Gori. Od ukupno analiziranog 41 soja, 39 je identifikovano kao *E. amylovora*, kao prvi izbor iz baze podataka. Dva soja, KFB 163 i KFB 183, identifikovani su Sherlock softverom kao *E. amylovora*, ali tek kao drugi izbor iz baze podataka. Mogući razlog za ovakvu identifikaciju su najverovatnije specifični profili njihovih masnih kiselina. Soj KFB 163 imao je 44% više heptadekanske (17:0) masne kiseline (zasićena masna kiselina sa 17 ugljenikovih atoma) i 38% više 18:1 masne kiseline (nezasićena masna kiselina sa 18 ugljenikovih atoma). Soj KFB 183 u svom profilu takođe je imao neobičajeno visok sadržaj 17:0 masne kiseline (42% više od proseka za sve sojeve), i 38% više stearinske (18:0) masne kiseline od proseka za sve sojeve. Neobično visok procenat ovih masnih kiselina kod sojeva KFB 163 i KFB 183 je izuzetak u odnosu na druge proučavane sojeve. Međutim, proučavanjem biohemijsko-fizioloških, patogenih i seroloških osobina ova dva soja, nedvosmisleno je dokazana njihova pripadnost bakteriji *E. amylovora* (Ivanović i sar., 2007, 2008b). Takođe, kod oba soja, primenom PCR metode, umnožen je DNK fragment specifičan za *E. amylovora* (Ivanović i sar., 2009b).

Analizom masnih kiselina i međusobnim upoređivanjem njihovih profila, proučavani sojevi *E. amylovora*

svrstani su u tri grupe sa Euklidovim rastojanjem većim od 6 (Slika 2). Detaljnijim posmatranjem dendrograma uočava se da svi sojevi koji su izolovani na prostoru centralne ili južne Srbije pripadaju grupi α , dok grupama β i γ pripadaju sojevi rasprostranjeni u severnom delu naše zemlje, tj. u Vojvodini. Samo četiri soja (KFB 181, KFB 182, KFB 186 i KFB 187), od ukupno 12 izolovanih na teritoriji Vojvodine, pripadaju najbrojnijoj grupi α . Analizom masnih kiselina utvrđena je razlika između sojeva *E. amylovora* izolovanih na području centralne i južne Srbije, i sojeva izolovanih u Vojvodini. Rezultati ovog rada potvrđuju ranije pretpostavke da je *E. amylovora* uneta u Srbiju iz najmanje dva pravca: sa juga u područje južne Srbije, i sa severa ili severozapada u područje Vojvodine. Razlike između ove dve populacije potvrđene su i proučavanjem genoma *E. amylovora* restrikcijom analizom i elektroforezom u pulsirajućem električnom polju (Ivanović i sar., 2008a, 2009a). Rezultati ukazuju da su ove dve populacije unete u našu zemlju iz različitih pravaca i da su se u početku nezavisno razvijale. Vremenom je došlo do preklapanja teritorija ovih populacija tako da danas ne postoji jasna i precizna granica njihovog rasprostranjenja. O tome svedoči i grupisanje četiri soja iz Vojvodine, koja su po svojim profilima masnih kiselina vrlo bliski sojevima iz centralne i južne Srbije.

Uprkos spontanim mutacijama u genomu bakterija, stabilnost sastava masnih kiselina u ćeliji čini ih pogodnim za identifikaciju bakterija (Paulin, 2000). Analiza masnih kiselina je brza i jednostavna metoda za identifikaciju fitopatogenih bakterija. Za rezultat je potrebno svega nekoliko sati, a hemikalije koje se koriste za prevođenje masnih kiselina u metil-estre mogu se naći u većini fitopatoloških laboratorija. Mogućnost ispitivanja velikog broja uzoraka i niski troškovi rada instrumenata predstavljaju još neke od prednosti ove automatizovane metode. Međutim, mora se naglasiti da precizna identifikacija nepoznatih sojeva u najvećoj meri zavisi od kvaliteta baze podataka. Ukoliko se vrsta koju želimo da identifikujemo ne nalazi u bazi podataka ona ne može biti identifikovana (Sasser, 2001). Takođe, cena opreme, a pre svega gasnog hromatografa i softvera za identifikaciju, i dalje predstavlja prepreku širem uvođenju ove metode u fitobakteriološke laboratorije kod nas.

ZAHVALNICA

Ovaj rad je rezultat aktivnosti u okviru projekta III46008 – Razvoj integrisanih sistema upravljanja štetnim organizmima u biljnoj proizvodnji sa ciljem prevazilaženja rezistentnosti i unapređenja kvaliteta

i bezbednosti hrane, koji finansira Ministarstvo prosvete i nauke Republike Srbije. Autori se zahvaljuju prof. dr Jelici Balaž i dr Veljku Gavriloviću koji su ustupili sojeve iz svojih kolekcija za ovo istraživanje, kao i prof. dr Jeffrey Jones-u i dr Ellen Dickstein u čijoj laboratoriji na Univerzitetu Florida je urađena analiza masnih kiselina proučavanih sojeva.

LITERATURA

- Arsenijević, M., Panić, M. and Antonijević, D.:** Fire blight of pomaceous trees in Yugoslavia. *Plant Protection*, 42: 87-97, 1991.
- Balaž, J., Knežević, T., Smiljanić, A. and Stojšin, V.:** *Chaenomeles japonica* and *Cotoneaster horizontalis*, new hosts of *Erwinia amylovora* in Serbia. Proceedings of 10th International Workshop on Fire Blight, Bologna, Italy, 2004, pp. 22.
- Bercovier, H., Steigerwalt, A.G., Guiyoule, A., Huntley-Carter, G. and Brenner, D.J.:** *Yersinia aldovae* (Formerly *Yersinia enterocolitica*-Like Group X2): a new species of *Enterobacteriaceae* isolated from aquatic ecosystems. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 34: 166-172, 1984.
- Bereswill, S., Pabl, A., Bellemann, P., Zeller, W. and Geider, K.:** Sensitive and species-specific detection of *Erwinia amylovora* by polymerase chain reaction analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 58: 3522-3526, 1992.
- Bonn, W.G. and van der Zwet, T.:** Distribution and economic importance of fire blight. In: *Fire Blight: The Disease and its Causative Agent, Erwinia amylovora* (Vanneste J., ed.), CABI Publishing, Wallingford, UK, 2000, pp. 37-53.
- Casano, F., Wells, J. and van der Zwet, T.:** Fatty acid profiles of *Erwinia amylovora* as influenced by growth medium, physiological age and experimental conditions. *Journal of Phytopathology*, 121: 267-274, 1988.
- Dickstein, E.R., Jones, J.B. and Stead, D.E.:** Automated techniques, physiological and biochemical methods. In: *Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria* (Schaad N.W., Jones J.B., Chun W., eds.), APS Press, St. Paul, USA, 2001, pp. 343-347.
- Gavrilović, V., Obradović, A., Milijašević, S., Arsenijević, M. and Vojinović, M.:** *Sorbus* spp. – a new host of *Erwinia amylovora* in Serbia. Proceedings of 11th International Workshop on Fire Blight, Portland, Oregon, USA, 2007, pp. 69.
- Harrell, L.J., Cameron, M.L. and O'Hara, C.M.:** *Rabnella aquatilis*, an unusual Gram-negative rod isolated from the bronchial washing of a patient with acquired immunodeficiency syndrome. *Journal of Clinical Microbiology*, 27: 1671-1672, 1989.
- Ivanović, M., Gašić, K. i Obradović A.:** Proučavanje populacije *Erwinia amylovora* poreklom iz različitih domaćina gajenih u Srbiji. Zbornik rezimea XIII simpozijuma sa savetovanjem o zaštiti bilja, Zlatibor, 2007, str. 46-47.
- Ivanović, M., Gašić, K. i Obradović, A.:** Razlike u genomu *Erwinia amylovora* poreklom iz različitih domaćina gajenih u Srbiji. Zbornik rezimea XIII kongresa voćara i vinogradara Srbije, Novi Sad, 2008a, str. 155.
- Ivanović, M., Gašić, K. i Obradović, A.:** Neke odlike *Erwinia amylovora* poreklom iz različitih domaćina. Zbornik rezimea IX savetovanja o zaštiti bilja, Zlatibor, 2008b, str. 121-122.
- Ivanović, M., Gašić, K., Čalić, A. i Obradović, A.:** Analiza genoma sojeva *Erwinia amylovora* elektroforezom u pulsirajućem električnom polju. Zbornik rezimea VI kongresa o zaštiti bilja sa simpozijumom o biološkoj kontroli invazivnih organizama, Zlatibor, 2009a, str. 57-58.
- Ivanović, M., Gašić, K., Čalić, A. i Obradović, A.:** Uspoređivanje osetljivosti i specifičnosti različitih metoda lančanog umnožavanja DNK za detekciju *Erwinia amylovora*. Zbornik rezimea VI kongresa o zaštiti bilja sa simpozijumom o biološkoj kontroli invazivnih organizama, Zlatibor, 2009b, str. 59-60.
- Jovanović, G.:** Rasprostranjenost, značaj i domaćini bakterije *Erwinia amylovora* na teritoriji južne Srbije. *Zaštita bilja*, 50: 115-149, 1999.
- Llop, P., Bonaterra, A., Peñalver, J. and López, M.M.:** Development of a highly sensitive nested-PCR procedure using a single closed tube for detection of *Erwinia amylovora* in asymptomatic plant material. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 2071-2078, 2000.
- Obradović, A., Gavrilović, V., Ivanović, M. and Gašić, K.:** *Pseudomonas* blight of raspberry in Serbia. In: *Pseudomonas syringae* Pathovars and Related Pathogens – Identification, Epidemiology and Genomics (Fatmi M., Collmer A., Iacobellis N.S., Mansfield J.W., Murillo J., Schaad N.W., Ullrich M., eds.), Springer Science + Business Media B.V., 2008, pp. 413-417.
- Obadović, A., Jones, J.B., Minsavage, G.V., Dickstein, E.R. and Momol, T.M.:** A leaf spot and blight of greenhouse tomato seedlings incited by a *Herbaspirillum* species. *Plant Disease*, 91: 886-890, 2007.
- Obradović, A., Mavridis, A., Rudolph, K., Janse, J.D., Arsenijević, M., Jones, J.B., Minsavage, G.V. and Wang, J.F.:** Characterization and PCR-based typing of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* from peppers and tomatoes in Serbia. *European Journal of Plant Pathology*, 110: 285-292, 2004.
- Panić, M. i Arsenijević, M.:** Bakteriozna plamenjača voćaka i ukrasnih biljaka, monografska studija. Zajednica za voće i povrće D.D., Beograd, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad, 1996.

Paulin, J.P.: *Erwinia amylovora*: general characteristics, biochemistry and serology. In: Fire Blight: The Disease and its Causative Agent, *Erwinia amylovora*. (Vanneste J., ed.), CABI Publishing, Wallingford, UK, 2000, pp. 87-116.

Rikovski, I.: Organska hemija za studente poljoprivrednog fakulteta. Građevinska knjiga, Beograd, 1970.

Sasser, M.: Identification of bacteria through fatty acid analysis. In: Methods in Phytobacteriology (Klement Z., Rudolph K., Sands D.C., eds.), Akademiai Kiado, Budapest, Hungary, 1990, pp. 199-204.

Sasser, M.: Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids. Tech. Note 101. Microbial ID, Inc., Newark, De, USA, 2001.

Schaad, N.W., Süle, S., van Vuurde, J.W.L., Vrugink, H., Alvarez, A.M., Benedict, A.A., de Wael, L. and van Laere, O.: Serology. In: Methods in Phytobacteriology (Klement Z., Rudolph K., Sands D.C., eds.), Akademiai Kiado, Budapest, Hungary, 1990, pp. 153-190.

Van der Zwet, T.: Present worldwide distribution of fire blight. Acta Horticulturae, 590: 33-34, 2002.

Van der Zwet, T. and Wells, J.M.: Application of fatty acid class analyses for the detection and identification of *Erwinia amylovora*. Acta Horticulturae, 338: 233-234, 1993.

Wells, J.M., van der Zwet, T. and Hale, C.N.: Differentiation of *Erwinia* species in the „Amylovora” group by class analysis of cellular fatty acids. Journal of Phytopathology, 140: 31-38, 1994.

Fatty acid analysis of *Erwinia amylovora* from Serbia and Montenegro

SUMMARY

Automated method of fatty acid analysis was used to identify and study heterogeneity of 41 *Erwinia amylovora* strains, originating from 8 plant species grown in 13 locations in Serbia and one in Montenegro. All strains contained 14:0 3OH fatty acid, characteristic for the „amylovora” group. According to fatty acid composition 39 strains were identified as *E. amylovora* as the first choice from the database. Due to their specific fatty acid composition, two strains were identified as *E. amylovora*, but as a second choice. Fatty acid analysis also showed that *E. amylovora* population from Serbia could be differentiated in three groups, designated in this study as α , β and γ . All strains originating from central or south Serbia, as well as four strains from north Serbia clustered into group α . Group β and γ contained only strains isolated in northern Serbia (Vojvodina). The results show that *E. amylovora* population in this area is heterogeneous and indicate pathogen introduction from different directions. Fatty acid analysis enabled identification at species level, as well as new insights of heterogeneity of *E. amylovora* population.

Keywords: Fatty acid analysis; *Erwinia amylovora*; Heterogeneity; Population; Fire blight