

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Ivan S. Nikolić

**IDENTIFIKACIJA, GENETIČKI  
DIVERZITET I BIOLOŠKA KONTROLA  
*Pseudomonas syringae* pv. *aptata* SA  
PODRUČJA SRBIJE**

Doktorska disertacija

Beograd, 2018

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Ivan S. Nikolić

**IDENTIFICATION, GENETIC DIVERSITY  
AND BIOLOGICAL CONTROL OF  
*Pseudomonas syringae* pv. *aptata*  
FROM SERBIA**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2018

## **MENTORI I ČLANOVI KOMISIJE ZA ODBRANU DOKTORSKE DISERTACIJE**

### **Mentori:**

**Dr Slaviša Stanković**, redovni profesor,  
Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

**Dr Tatjana Popović**, viši naučni saradnik,  
Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu

### **Komisija:**

**Dr Đorđe Fira**, redovni profesor,  
Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

**Dr Tanja Berić**, vanredni profesor,  
Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

**Dr Jelena Lozo**, vanredni profesor,  
Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

Datum odbrane \_\_\_\_\_ 2018. godine

*Eksperimentalni deo ove disertacije urađen je u laboratoriji Katedre za mikrobiologiju, Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, laboratoriji odseka za Fitopatologiju, Instituta za zaštitu bilja i životnu sredinu, laboratoriji za Molekularnu mikrobiologiju, Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerziteta u Beogradu, laboratoriji odseka za Fitopatologiju (Unité de Pathologie Végétale), Nacionalnog instituta za istraživanja u poljoprivredi (L'Institut national de la recherche agronomique-INRA), Avinjon, Republika Francuska.*

*Istraživanja u okviru ove doktorske disertacije sprovedena su u okviru nacionalnog projekata OI 173026 „Molekularna karakterizacija bakterija iz rodova Bacillus i Pseudomonas kao potencijalnih agenasa za biološku kontrolu“ finansiran od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja, Republike Srbije i projekta MISTRAL (MICrobiology of agroeco-Systems : TRAnslational research from pathogen Life histories) koji je finansiran od strane Nacionalnog instituta za istraživanja u poljoprivredi (INRA, Republika Francuska).*

*Želeo bih da izrazim svoju duboku zahvalnost svom mentoru prof. dr Slaviši Stankoviću, na ukazanom poverenju, stručnim savetima, besprekornoj saradnji i utrošenom vremenu u realizaciji i izradi ove disertacije. Zahvaljujem Vam što ste učinili mogućim početak i razvoj moje naučne karijere i što ste svojim stručnim vođstvom pomogli njen napredak i omogućili da dođem tu gde jesam.*

*Veliku zahvalnost dugujem Prof. dr Tanji Berić na neprocenjivoj pomoći i sugestijama tokom eksperimentalne izrade, tumačenju rezultata i pisanju teze. Hvala Vam na vrlo konkretnim i efikasnim savetima koji su gotovo uvek rešavali sve moje nedoumice tokom istraživanja.*

*Zahvalnost dugujem dr Tatjani Popović na pomoći, korisnim i stručnim savetima tokom realizacije istraživanja i kritičkoj oceni teze.*

*Prof. dr Đorđu Firi želim da se zahvalim na sugestijama, konstruktivnim savetima i kritičkoj oceni teze.*

*Prof. dr Jeleni Lozo želim da se zahvalim na sugestijama, konstruktivnim savetima i kritičkoj oceni teze.*

*Posebnu zahvalnost dugujem kolegi dr Žarku Ivanoviću koji me je upoznao sa laboratorijskim radom, fitopatologijom i malim trikovima velikih majstora tokom eksperimentalnog rada i tumačenja rezultata.*

*Ogromnu zahvalnost dugujem dr Cindy Morris na vrlo korisnim savetima, kvalitetnim diskusijama i na ukazanoj prilici da jedan deo ove teze bude urađen u njenoj laboratoriji.*

*Veliku zahvalnost dugujem svim kolegama sa Instituta za zaštitu bilja i životnu sredinu na pomoći i savetima tokom eksperimentalne izrade teze.*

*Neposrednim saradnicima Ivici Dimkiću, Tamari Janakiev i Olji Stanojević dugujem veliku zahvalnost za nesebičnu pomoć u eksperimentalnom radu, korisnim diskusijama, kao i na druženju van posla.*

*Profesorima i saradnicima Katedre za mikrobiologiju dr Jeleni Knežević-Vukčević, dr Brankici Vuković-Gačić, dr Biljani Nikolić i dr Dragani Mitić-Ćulafić dugujem veliku zahvalnost pre svega na pruženom teorijskom i praktičnom znanju, kao i na kolegijalnom i prijateljskom odnosu tokom svakodnevnog rada.*

*Mojim dragim kolegama dr Stoimiru Kolareviću, dr Karolini Sunjog, Bojani Vasilijević, dr Jovani Kostić-Vuković i Stefani Cvetković zahvaljujem što svaki dan na poslu odiše prijateljskom atmosferom.*

*Zahvaljujem se kolegama sa departmana za Fitomedicinu i zaštitu životne sredine, Poljoprivrednog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu na pomoći tokom prikupljanja uzoraka na terenu.*

*Zahvaljujem se mojim prijateljima na podršci i razumevanju*

*Zahvaljujem se mojoj porodici na ljubavi, podršci i razumevanju tokom izrade i pisanja teze. Uvek ste bili tu za mene.*

*Zahvaljujem se mojoj Nadi na ogromnoj ljubavi koju mi pruža i koja mi daje snagu da idem napred.*

*Ovaj rad posvećujem mojoj majci Jasni*

## **Identifikacija, genetički diverzitet i biološka kontrola *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* sa područja Srbije**

### **Sažetak**

Ovaj rad predstavlja opsežnu studiju koja obuhvata identifikaciju, utvrđivanje genetičkog diverziteta, filogenetskog statusa, patogenih karakteristika i biološke kontrole uzročnika bolesti lisne pegavosti šećerne repe koji je izolovan sa komercijalnih zasada na teritoriji AP Vojvodina. Kombinovanjem konvencionalnih mikrobioloških tehnika, LOPAT testova i amplifikacije specifičnih DNK fragmenata, 104 bakterijska izolata su determinisana kao *Pseudomonas syringae* pv. *aptata*. Procena genetičkog diverziteta kolekcije izolata, metodama genetičkog profilisanja i analizom sekvenci više genskih lokusa, pokazala je značajan diverzitet unutar patovara i postojanje tri različite linije infekcije. Rep-PCR je pokazao 25 različitih grupa genetičkih profila, dok je korišćenjem PFGE metode pokazano 17 različitih profila. Analiza parcijalnih sekvenci dva visoko konzervirana gena utvrdila je da postoje četiri različite alelske varijante za *gyrB* gen, dok su za *gapA* gen izdvojene tri alelske varijante. Dodatno, određivan je filogenetski status reprezentativnih izolata u okviru *P. syringae* kompleksa, i utvrđeno je da svi izolati pripadaju 02d filogenetskoj grupi. Ocenjivanje patogenog potencijala na osnovu utvrđivanja virulentnosti i agresivnosti reprezentativnih izolata je sprovedeno na 4 sorte šećerne repe. Veliki diverzitet u patogenim karakteristikama je pronađen među testiranim izolatima, dok su najagresivniji izolati P97 i P100 koji uzrokuju intenzitet bolesti u opsegu od 51-75%. Sorte šećerne repe, Lara i Jasmina su se pokazale rezistentnije na bolest nego sorte Marinela i Serenada. Testiranje opsega domaćina pokazalo je veliki diverzitet među izolatima, gde su izolati P21 i P23 imali najširi opseg domaćina. Utvrđivanje biološke kontrole *P. syringae* pv. *aptata* sprovedeno je na četiri sorte šećerne repe korišćenjem bakterijske kulture *Bacillus amyloliquefaciens* SS-12.6, pri čemu je detektovana inhibicija nekroze tkiva i do 92%. Sveukupno, dobijeni rezultati ukazuju na postojanje patogena šećerne repe, sa visokim intra-patovar diverzitetom, koji može voditi poreklo sa drugih biljaka ili može biti rezervoar infekcije za druge biljke. Biološka kontrola izolata *P. syringae* pv. *aptata* je moguća i efikasna.

**Ključne reči:** *P. syringae* pv. *aptata*, šćerna repa, bolest lisne pagavosti, genetički diverzitet, patogenost, biološka kontrola

**Naučna oblast:** Biologija

**Uža naučna oblast:** Mikrobiologija, Fitopatologija, Biokontrola, Ekologija patogena

**Identification, genetic diversity and biological control of *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* from Serbia**

**Abstract**

This work represents a comprehensive study concerning identification, determination of genetic diversity, phylogenetic status, pathogenic characterization and biological control of causative agent of leaf spot disease on sugar beet isolated from commercial fields at the Serbian province AP Vojvodina. Combining conventional microbiological techniques, LOPAT tests and amplification of specific DNA fragments 104 isolates were determined as *Pseudomonas syringae* pv. *aptata*. Assessment of genetic polymorphism of collected isolates with genetic fingerprinting methods and Multi-locus sequence analysis showed significant intra-pathovar diversity and existing of three different lines of infection. In particular, Rep-PCR showed 25 different groups of genetic profiles, while PFGE method showed 17 different profiles. Analysis of partial sequences of two highly conserved housekeeping genes (*gyrB* and *gapA* genes) showed four and three different allelic variants, respectively. Additionally, the phylogenetic status of representative isolates within a *P. syringae* complex was determined and all isolates belonged to 02d phylogenetic group. The estimation of pathogenic potential by determining virulence and aggressiveness of representative isolates was conducted on four sugar beet cultivars. Large diversity of the pathogenic characteristics was found among tested isolates and the most aggressive isolates were P97 and P100 which caused disease severity in range from 51% to 75%. Cultivars Lara and Jasmina were showed much more resistant to disease then cultivars Marinela and Serenada. Host range testing showed large diversity between isolates, while isolates P21 and P23 has the broadest host range and caused disease symptoms on each tested plant species. Assessment of biological control of *P. syringae* pv. *aptata* was conducted on all four sugar beet cultivars using cell culture of *Bacillus amyloliquefaciens* strain SS-12.6. Inhibition of tissue necrosis was up to 92%. Overall, the obtained results point out to emerging sugar beet pathogen, with high intra-pathovar diversity, which can originate from other plants or be a reservoir of infection for other plants. Biological control of isolates *P. syringae* pv. *aptata* is possible and efficient.



**Key words:** *P. syringae* pv. *aptata*, sugar beet, leaf spot disease, genetic diversity, pathogenicity, host range, biological control.

**Research field:** Biology

**Specific research fields:** Microbiology, Phytopathology, Biocontrol, Ecology of pathogens

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	13
1.1. Evolucionarna istorija vrste <i>P. syringae</i> i uloga u ciklusu kruženja vode.....	14
1.2. Genetički diverzitet <i>P. syringae</i> .....	18
1.3. Epidemiologija i patogeni diverzitet <i>P. syringae</i> .....	23
1.4. <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>aptata</i> – uzročnik bolesti lisne pegavosti šećerne repe.....	27
1.5. Prevencija i upravljanje bolestima bilja - Biološka kontrola.....	29
2. CILJEVI RADA.....	20
3. MATERIJAL I METODE.....	21
3.1. Bakterijski sojevi.....	21
3.2. Medijumi za gajenje bakterija, boje, reagensi i rastvori.....	21
3.3. Sakupljanje uzoraka i izolacija bakterija.....	25
3.4. Morfološke i biohemijske odlike bakterijskih izolata.....	31
3.4.1. Morfološke karakteristike kolonija.....	31
3.4.2. Razlikovanje bakterija po Gramu.....	31
3.4.3. Hidroliza želatina.....	32
3.4.4. Hidroliza esculina.....	32
3.4.5. Hidroliza skroba.....	33
3.4.6. Produkcija vodonik sulfida (H <sub>2</sub> S).....	34
3.4.7. Metabolizam glukoze (O/F test).....	34
3.4.8. Produkcija indola.....	35
3.4.9. Prisustvo katalaze.....	35
3.4.10. Stvaranje zelenog pigmenta - fluorescencija.....	36
3.5. Metode za identifikaciju <i>P. syringae</i> pv. <i>aptata</i> .....	37
3.5.1. LOPAT testovi.....	37
3.5.1.1 Stvaranje levana.....	37
3.5.1.2. Oksidaza test.....	37
3.5.1.3. Pektolitička aktivnost.....	38
3.5.1.4. Aktivnost arginin dehidrolaze.....	39
3.5.1.5 Hipersenzitivna reakcija (HR) na listovima duvana.....	39
3.5.2. Molekularna metoda za identifikaciju <i>P. syringae</i> pv. <i>aptata</i> .....	40
3.5.2.1. Izolacija ukupne DNK iz <i>P. syringae</i> pv. <i>aptata</i> .....	40

3.5.2.2. Umnožavanje <i>P. syringae</i> pv. <i>aptata</i> -specifičnih DNK fragmenata metodom PCR (Polymerase Chain Reaction) .....	40
3.5.2.3. Horizontalna elektroforeza DNK na agaroznom gelu .....	41
3.6. Genetički diverzitet fitopatogena <i>P. syringae</i> pv. <i>aptata</i> .....	43
3.6.1. Genetičko profilisanje .....	43
3.6.1.1. Rep-PCR.....	43
3.6.1.2. Elektroforeza u pulsirajućem polju (PFGE) .....	44
3.6.2. Analiza sekvenci sa više genskih lokusa (Multi-Lokus Sequence Analysis) .....	46
3.7. Filogenetski status izolata <i>P. syringae</i> pv. <i>aptata</i> u okviru <i>P. syringae</i> kompleksa .....	47
3.7.1. Multiplex-PCR .....	47
3.7.2. Sekvenciranje <i>cts</i> gena i filogenetska analiza .....	49
3.8. Patogene karakteristike izolata <i>P. syringae</i> pv. <i>aptata</i> .....	50
3.8.1. Test patogenosti.....	50
3.8.2. Utvrđivanje opsega potencijalnih domaćina izolata <i>P. syringae</i> pv. <i>aptata</i> .....	51
3.9. Biološka kontrola fitopatogena <i>P. syringae</i> pv. <i>aptata</i> .....	53
3.10. Statističke analize.....	54
4. REZULTATI .....	56
4.1. Morfološke, biohemijske i fitopatološke karakteristike izolata .....	56
4.2. Patovar specifična molekularna identifikacija .....	57
4.3. Genetički diverzitet <i>P. syringae</i> pv. <i>aptata</i> .....	58
4.4. Filogenetski status <i>P. syringae</i> pv. <i>aptata</i> izolata u okviru <i>P. syringae</i> kompleksa .....	67
4.5. Patogene karakteristike izolata <i>P. syringae</i> pv. <i>aptata</i> i korelacija sa genetičkim diverzitetom .....	69
4.6. Opseg domaćina <i>P. syringae</i> pv. <i>aptata</i> izolata i korelacija sa filogenetskim statusom u okviru <i>P. syringae</i> kompleksa .....	74
4.7. Biološka kontrola.....	77
5. DISKUSIJA .....	78
6. ZAKLJUČCI .....	93
7. LITERATURA .....	95
8. PRILOZI.....	111

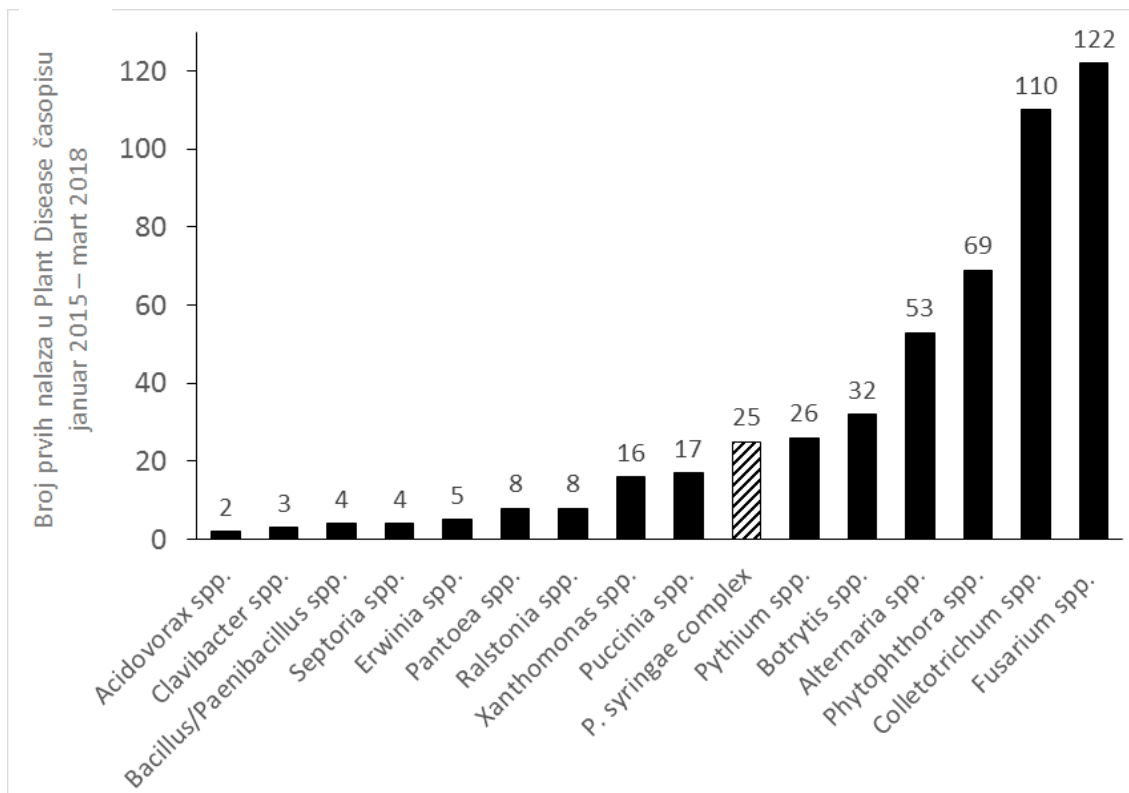
# UVOD

# 1. UVOD

Fitopatogeni mikroorganizmi predstavljaju jednu od glavnih pretnji za proizvodnju poljoprivrednih useva, najvećim delom zbog nedostatka odgovarajućih prirodnih ili hemijskih preparata za njihovu kontrolu, nepažljivog prenošenja i latentnih infekcija semena. U studiji koju su sprovedi Strange & Scott (2005) procenjeno je da se najmanje 10% svetske produkcije hrane godišnje izgubi usled bolesti biljaka koje izazivaju biljni patogeni. U red do sada poznatih biljnih patogena svrstavaju se parazitske biljke, nematode, gljive, oomicete, bakterije i virusi (Buttimer et al., 2017). Među njima, opisano je preko 200 vrsta bakterijskih patogena koji interaguju sa biljkama i izazivaju različite tipove bolesti (Considine, 2012). Jedan od bakterijskih fitopatogena koji možda ima i najveći značaj sa naučnog i ekonomskog aspekta je vrsta *Pseudomonas syringae*. Iz naučne perspektive, značaj se pre svega ogleda u tome što je *P. syringae*, kao model organizam, imao izuzetno veliki uticaj na razumevanje patogenosti uopšte, dok je sa druge strane ekonomski značajan patogen jer uzrokuje bolesti na brojnim veoma važnim i zastupljenim poljoprivrednim kulturama (Mansfield et al., 2012).

*P. syringae* predstavlja jednog od najrasprostranjenijih biljnih patogena na svetu, koji je genetički heterogen, ima veoma veliki opseg domaćina i može se prilagoditi različitim vrstama staništa, kao i iznenađujućim ekološkim nišama (Sarkar & Guttman, 2004; Morris et al., 2008). Značaj ovog fitopatogena ogleda se i u broju “first report” publikacija, koje predstavljaju prvi izveštaj koji se tiče bolesti izazvane ovim patogenom na teritoriji određene države ili na novom domaćinu. Na osnovu 1678 ovakvih izveštaja koji su publikovani u periodu od januara 2015. do marta 2018, u časopisu “Plant Disease“ *P. syringae* zauzima prvo mesto po broju navoda među bakterijskim patogenima (Slika 1.1). Iako je prethodnih godina fokus istraživanja u fitopatologiji prebačen na fungalne patogene, *P. syringae* i dalje zaokuplja naučnu pažnju. Ekologija, raznovrsnost i evolucija *P. syringae* jasno ukazuju na to da ova vrsta predstavlja filogenetski kompleks koji nastanjuje kopnena i vodena staništa (Morris et al., 2013; Berge et al., 2014). Upravo ova složenost same vrste dovela je do toga da se *P. syringae* posmatra kao kompleks filogenetskih grupa i patogenih varijeteta

(patovara). Međutim, da bismo uspjeli da objasnimo ekologiju i životni ciklus tih taksonomskih jedinica ispod nivoa vrste, moramo da se pre svega osvrnemo na evoluciju i epidemiološko-genetičke karakteristike vrste *P. syringae*.



**Slika 1.1.** Grafički prikaz publikovanih izveštaja o bolestima koje izazivaju bakterije i gljive u časopisu *Plant Disease* za period januar 2015. – mart 2018

### 1.1. Evolucionarna istorija vrste *P. syringae* i uloga u ciklusu kruženja vode

*Pseudomonas syringae* predstavlja jednog od najrasprostranjenijih biljnih patogena, bakterijski soj koji je važan faktor životne sredine u ciklusu kruženja vode, kao i veoma pogodan model sistem za istraživanje mikrobiološke evolucije i interakcije između biljaka i bakterija (Baltrus et al., 2017). Upravo zbog svoje sveprisutnosti i veoma aktivne uloge u ciklusu kruženja vode, *P. syringae* je često u interakciji sa

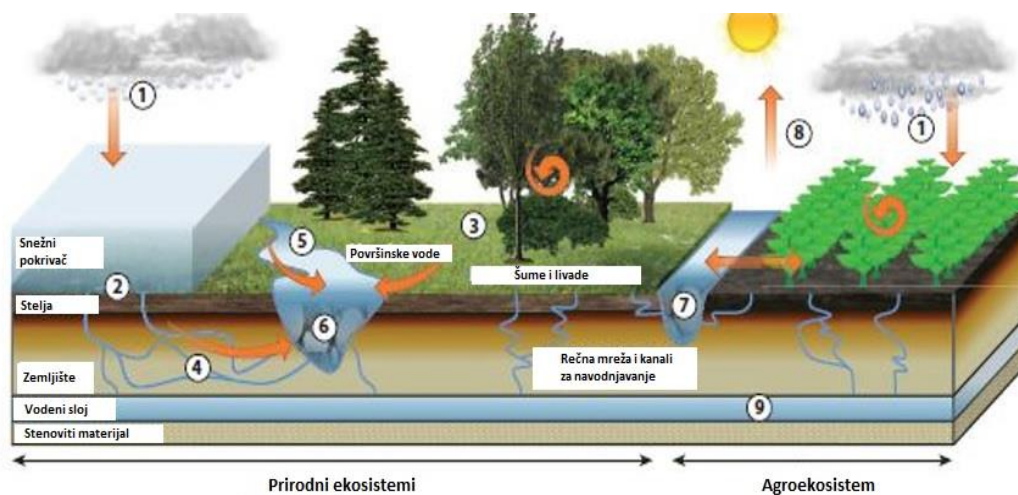
biljkama i može se naći kao bezopasan komensal na površini listova, ali i kao značajan patogen biljnih i poljoprivrednih kultura (Sarkar & Guttman, 2004).

Evoluciona istorija *P. syringae* zasniva se pre svega na odvajanju klase  $\gamma$ -proteobakterija kojoj ova vrsta pripada. Nastanak klase  $\gamma$ -proteobakterija prema nekim procenama se desio pre 1,75 milijardi godina, nakon što je koncentracija kiseonika u atmosferi dostigla 20% (Madigan et al., 2008). Rod *Pseudomonas* predstavlja jednog od prvih rodova u okviru ove klase koji je divergirao, što se svakako desilo znatno pre kolonizacije kopna od strane biljaka (pre 475 miliona godina) ili nastanka angiospermi (pre 140-180 miliona godina). Na osnovu podataka, u okviru evolucione istorije roda *Pseudomonas* može se zaključiti da je primarni habitat ovih bakterija bilo vodeno stanište (Morris et al., 2013). Važnost vodenih staništa za *Pseudomonas* spp. može se uočiti i danas, usled njihovog prisustva u okeanima i estuarima (Biers et al., 2009; Pesciaroli et al., 2012). Takođe, na osnovu metagenomskih studija  $\gamma$ -proteobakterije predstavljaju stalno prisutne komponente u rečnim ekosistemima (Newton et al., 2011), dok su u jezerskim ekosistemima nešto manje prisutne nego u okeanskim (Portillo et al., 2012). Danas, u okviru roda *Pseudomonas* poznato je 128 različitih vrsta (Prilog 1), od kojih su mnoge vrste veoma važni humani i biljni patogeni, biokontrolni agensi kao i organizmi uključeni u procese bioremedijacije. Takođe, naseljavaju različite klimatske zone, od Antarktika do tropskih oblasti (Peix et al., 2009). Što se tiče *P. syringae*, detekcija ove vrste je izuzetno česta u alpskim jezerima i potocima, iako je ukupan udeo u bakterijskoj populaciji, na ovom staništu, veoma mali i iznosi oko 0,1% kulturabilnih bakterija (Morris et al., 2008, 2010). Akvatična životna sredina je nesumljivo imala ulogu u ranoj evoluciji predaka većine biljnih patogena (Morris et al., 2013). Stoga, kad god da je vrsta *P. syringae* divergirala od zajedničkog pretka, a pretpostavki je mnogo (Cunnac et al., 2009; Green et al., 2010; Baltrus et al., 2011; O'Brien et al., 2011; Scortichini et al., 2012), konzervirani deo genoma („core“ genom) ove vrste vodi poreklo od predaka koji su evoluirali i adaptirali se u akvatičnim staništima koja nisu sadržala biljke.

U studiji koju su predstavili Morris et al. (2013) prikazano je nekoliko scenarija koje se tiču načina na koji je *P. syringae* iz vodenih ekosistema došla u kontakt sa biljkama na kopnu. Jedan od načina se svakako vezuje za činjenicu da su se prve kopnene biljke (nešto nalik briofitama) nalazile u močvarama, te su vrlo lako mogle da

dođu u kontakt sa akvatičnim mikroorganizmima. Takođe, jedan od mogućih scenarija vezivao se za fenomen stvaranja aerosola, usled pucanja balončića vode koji su se stvarali iznad vodenih površina (Fuentes et al., 2010). Rasprskavanje balončića može predstavljati prvi način kojim je *P. syringae* iz vode dospelo u atmosferu (Morris et al., 2013). Ostali scenariji uključuju potencijalno rasprskanje vode sa bakterijama na kopno, pomeranje bakterija usled kapilarnosti na površinu gde se nalazi mesto kontakta vode i delova biljaka, kao i potapanje biljaka usled poplava.

*Pseudomonas syringae* je detektovan u većem broju supstrata koji su usko povezani sa ciklusom kruženja vode u prirodi (Morris et al., 2013). To se pre svega odnosi na njeno prisustvo u oblacima, snežnim pahuljama, kišnim kapima, snežnom pokrivaču, u rekama, jezerima, epilitičkom biofilmu, vodi koja otiče preko zemljišta, kao i na divljim i kultivisanim biljkama. Akumulacija *P. syringae* u prirodnim ekosistemima i to na zemljištu i biljkama vrši se preko kiše i snega, dok se oticanjem kišnice i otapanjem snega akumulirao na stelji, travi i površini zemlje (Slika 1.2).



**Slika 1.2.** Kretanje *P. syringae* u biosferi. 1) Precipitacija (kiša, sneg) 2) Stelja 3) travnata površina 4) podzemne vode 5) površinske vode 6) rečna mreža 7) rečna voda koja se koristi za irigaciju poljoprivrednih površina 8) troposfera 9) vodeni sloj između zemljišta i stenovitog materijala (preuzeto iz studije Morris et al. 2013).

Ovim procesima *P. syringae* se akumulira i u podzemnim i površinskim vodama čime ulazi u kompletnu rečnu mrežu. U agroekosistemima se dešavaju slični procesi.



Precipitacijom i rečnom vodom koja se koristi za navodnjavanje, *P. syringae* dospeva do poljoprivrednih kultura. Sa druge strane populacije *P. syringae* se putem aerosola transportuju u troposferu. Voda sa poljoprivrednih useva u kojoj se nalazi *P. syringae* otiče duboko ispod zemljišta i dolazi do podzemnih voda (Slika 1.2).

Jedna od osnovnih karakteristika ove bakterijske vrste, koja omogućava veoma aktivnu ulogu u ciklusu kruženja vode u prirodi, jeste aktivnost u stvaranju čestica leda („ice nucleation activity“, „IN“). Proces kristalizacije leda nastaje kada dođe do izvanrednog hlađenja („supercooling“), što kod čiste vode iznosi  $-40^{\circ}\text{C}$  (Cochet et al., 2000). Kristalizacija nastaje kada se stvore određeni uslovi za agregaciju molekula vode u čestice određene konformacije ili kada neka čvrsta čestica posluži kao jezgro za kristalizaciju. Raznovrsne neorganske i organske komponente mogu poslužiti kao jezgra za kristalizaciju, kao npr. srebro-jodid, kaolinit (mineral gline), holesterol, aminokiseline. Kada govorimo o biološkim organizmima koji imaju sposobnost stvaranja jezgra za kristalizaciju, među njima bakterije imaju vodeću ulogu (Cochet et al., 2000), a pre svih *P. syringae*.

*P. syringae* ima sposobnost da sintetiše membranski protein, INaZ lipoglikoprotein, koji daje ćeliji sposobnost da katalizuje kristalizaciju na visokim temperaturama, znatno iznad nivoa zamrzavanja, od  $-2^{\circ}\text{C}$  do  $-8^{\circ}\text{C}$  (Maki et al., 1974). *P. syringae* je jedan od nekoliko prirodnih i opšteprisutnih organizama pronađenih u oblacima koji pospešuju kristalizaciju i zamrzavanje kapljica u oblacima na temperaturama na kojima su neke neorganske materije, npr. minerali, manje efikasni (Mohler et al. 2007). Nekoliko kvantitativnih studija je jasno pokazalo ulogu *P. syringae* IN aktivnih sojeva koje iniciraju precipitaciju, gde je utvrđen znatno veći broj IN aktivnih sojeva u precipitatu nego u drugim supstratima, a posebno u vodi iz oblaka (Morris et al., 2008; Attard et al., 2012; Monteil et al. 2014; Joly et al., 2013).

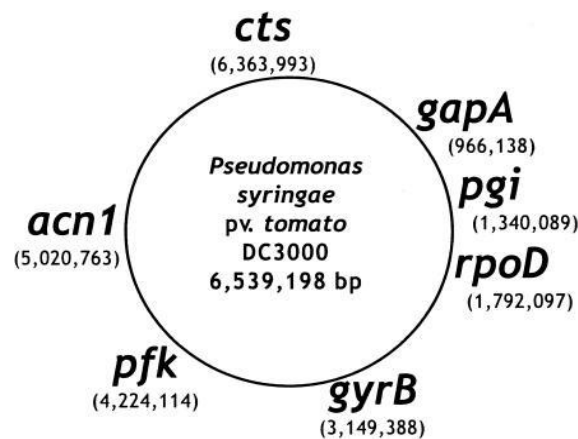
Ovakvi fenomeni su veoma bitni za biljnu patologiju iz nekoliko razloga. Pre svega, interakcija *P. syringae* sa zamrzavanjem atmosfere vode, čija je posledica stvaranje snega i kiše, može biti jedan od glavnih faktora diverzifikacije ovog patogena. Pretpostavlja se da može postojati „trade-off“ između patogenosti i opstanka *P. syringae* u ciklusu kruženja vode, a takođe da ova dva faktora mogu jedan drugog pojačavati (Morris et al., 2013). Sa stanovišta biljne patologije, sposobnost stvaranja čestica leda

kod epifitnih i endofitnih izuzetno patogenih *P. syringae* sojeva može dovesti do stvaranja leda u biljnim ćelijama i na taj način prodiranja sojeva do apoplasta, što posledično može dovesti do izazivanja bolesti. Takođe, uzimajući u obzir da *P. syringae* zauzima strateški važnu poziciju u stvaranju padavina, veoma je komplikovano uspešno izbegavati „prirodne rezervoare“ ovog patogena koji su veoma blizu ili su u kontaktu sa poljoprivrednim kulturama.

## 1.2. Genetički diverzitet *P. syringae*

Rod *Pseudomonas* predstavlja možda najvažniju i najraznovrsiju grupu bakterija na planeti, posmatrano kroz prizmu genetičkog diverziteta i ekologije vrsta koje ga sačinjavaju (Spiers et al., 2000). U prilog tome ide veliki broj radova koji pokazuju da su sojevi iz ove grupe prisutni u najrazličitijim ekološkim nišama, kao i u interakciji sa biljkama i životinjama (Bergan, 1981; Hofte & de Vos, 2007; Morris et al., 2013). Ovako velika i raznovrsna distribucija navodi da su predstavnici ovog roda izuzetno fiziološki, ekološki i genetički adaptabilni. Danas je *P. syringae* vrsta podeljena na 9 genetičkih grupa na osnovu DNK-DNK hibridizacije i 13 filogenetskih grupa na osnovu analize sekvenci više genskih lokusa, pri čemu su obuhvaćeni svi do sada poznati patovari *P. syringae* (Gardan et al., 1999; Sarkar & Guttman, 2004; Young, 2010; Berge et al., 2014). U sveobuhvatnom istraživanju, korišćenjem molekularne tehnike DNK-DNK hibridizacije, u okviru *Pseudomonas syringae* kompleksa identifikovano je devet genetičkih grupa („genomospecies“) (Gardan et al., 1999) (Tabela 1). Struktura genetičkih grupa omogućava veoma važan uvid u odnose između patovara u okviru *Pseudomonas syringae* kompleksa. Genetičku grupu 1 čini šest patovara među kojima i *P. syringae* **pv.** *aptata*. Napredovanjem molekularnih metoda, pre svega genetičkog profilisanja, sekvenciranja gena i genoma, kao i njihovom sve većom dostupnošću, taksonomske i filogenetske studije doživele su veliku ekspanziju (Bull & Koike, 2015). Genetičko profilisanje, koje uključuje metode kao što su umnožavanje ponavljajućih palindromskih sekvenci u bakterijskom genomu (Rep-PCR) i profilisanje čitavog genoma uz pomoć elektroforeze u pulsirajućem polju (PFGE), u velikoj meri poslužilo je za analizu bakterijskog diverziteta na sub-specijskom nivou (Schwartz and Cantor, 1984; Versalovic et al., 1994). Još jedna važna uloga genetičkog profilisanja ogleda se u

tome što se na taj način vrlo uspešno detektuje stepen klonalnosti među testiranim patogenima (Guven et al., 2004; Cepni & Gurel, 2012). Sa druge strane, studija koju su sprovedli Sarkar & Guttman (2004) predstavlja jednu od prvih filogenetskih studija *P. syringae* u kojoj su za analizu filogenetskih odnosa korišćeni visoko konzervirani geni odgovorni za niz bazičnih funkcija („housekeeping“ geni) za bakterijsku ćeliju (*acn1* - kodira akonitat hidratazu, *gyrB* - kodira DNK žirazu, *gapA* - kodira gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazu, *cts* – kodira citrat sintazu, *pfk* – kodira fosfofruktokinazu, *pgi* – kodira fosfoglukoizomerazu, *rpoD* – kodira sigma faktor 70) (Slika 1.3).



**Slika 1.3.** Šematski prikaz pozicije sedam „housekeeping“ gena na genomu najproučavanijeg soja iz *P. syringae* kompleksa, *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 (Preuzeto iz studije Sarkar & Guttman 2004)

Na osnovu analize sekvenci pomenutih gena u okviru celog *P. syringae* kompleksa izdvojene su 4 filogenetske grupe. *P. syringae* pv. *aptata* je svrstan u filogenetsku grupu 2. Na osnovu studije Parkinson et al. (2011), koja je uključivala 67 poznatih *P. syringae* patovara, korišćenjem *rpoD* gena izdvojeno je 7 filogenetskih grupa, pri čemu je *P. syringae* pv. *aptata* svrstan u grupu 2. Berge et al. (2014) su u svojoj studiji, korišćenjem *cts* gena, obuhvatili sve patovare u okviru kompleksa, kao i *P. syringae* sojeve izolovane sa različitih staništa u prirodi (uglavnom vodenih staništa, epilitičkog biofilma i precipitata) izdvojivši tako 13 filogenetskih grupa (Tabela 1.1).

**Tabela 1.1.** Spisak fitopatogenih sojeva *Pseudomonas* spp. i filogrupe kojima pripadaju. **Kolona A** - Lista svih *Pseudomonas* spp. sojeva i *P. syringae* patogenih varijeteta po Young et al. 2010. **Kolona B** - Genetičke grupe na osnovu Gardan et al. 1999. **Kolona C** - Filogenetske grupe na osnovu Sarkar & Guttman 2004., **Kolona D** - Filogenetske grupe na osnovu Parkinson et al. 2011, **Kolona E** - Filogenetske grupe na osnovu Berge et al. 2014.

A.	B.	C.	D.	E.
<i>P. amygdali</i>	2	/	03	/
<i>P. avellane</i>	8	/	01	01b
<i>P. cannabina</i>	9	/	05	05
<i>P. caricapapayae</i>	7	/	06	/
<i>P. cichorii</i>	/	/	/	11
<i>P. graminis</i>	/	/	/	/
<i>P. ficuserectae</i>	2	/	03	/
<i>P. meliae</i>	2	/	03	/
<i>P. savastanoi</i>	2	/	3b	/
<i>P. tremae</i>	5	/	03	/
<i>P. viridiflava</i>	6	/	07	07a,b
<i>P. syringae</i> pv. <i>aceris</i>	1	/	02	02b
<i>P. syringae</i> pv. <i>actinidiae</i>	8	01	01	01a,b
<i>P. syringae</i> pv. <i>aesculi</i>	2	/	03	03
<i>P. syringae</i> pv. <i>alisalensis</i>	9	/	05	/
<i>P. syringae</i> pv. <i>antirrhini</i>	3	/	01	/
<i>P. syringae</i> pv. <i>apii</i>	3	/	01	/
<i>P. syringae</i> pv. <i>aptata</i>	1	02	02	02b
<i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i>	1	/	02	02b
<i>P. syringae</i> pv. <i>atropurpurea</i>	4	/	04	/
<i>P. syringae</i> pv. <i>avii</i>	3	/	01	/
<i>P. syringae</i> pv. <i>berberidis</i>	3	/	01	/
<i>P. syringae</i> pv. <i>broussonetiae</i>	2	/	03	03
<i>P. syringae</i> pv. <i>castaneae</i>	/	/	03	/
<i>P. syringae</i> pv. <i>cerasicola</i>	2	/	03	/
<i>P. syringae</i> pv. <i>ciccaronei</i>	2	/	03	/
<i>P. syringae</i> pv. <i>coriandricola</i>	9	/	05	/
<i>P. syringae</i> pv. <i>coronofaciens</i>	4	04	04	04
<i>P. syringae</i> pv. <i>coryli</i>	/	/	/	/
<i>P. syringae</i> pv. <i>cunninghamiae</i>	2	/	03	/
<i>P. syringae</i> pv. <i>daphniphylli</i>	2	/	03	/

<i>P. syringae</i> pv. <i>delphinii</i>	3	/	01	/
<i>P. syringae</i> pv. <i>dendropanacis</i>	2	/	03	/
<i>P. syringae</i> pv. <i>dysoxylis</i>	1	/	02	/
<i>P. syringae</i> pv. <i>eriobotryae</i>	2	/	03	/
<i>P. syringae</i> pv. <i>fraxini</i>	2	/	03	/
<i>P. syringae</i> pv. <i>garcae</i>	4	/	04	/
<i>P. syringae</i> pv. <i>glycinea</i>	2	03	03	03
<i>P. syringae</i> pv. <i>helianthi</i>	7	/	06	06
<i>P. syringae</i> pv. <i>hibisci</i>	2	/	03	/
<i>P. syringae</i> pv. <i>japonica</i>	1	02	02	02b
<i>P. syringae</i> pv. <i>lachrymans</i>	3	03	01	03
<i>P. syringae</i> pv. <i>lapsa</i>	1	/	02	/
<i>P. syringae</i> pv. <i>maculicola</i>	3	01	01	05
<i>P. syringae</i> pv. <i>mellea</i>	2	03	03	/
<i>P. syringae</i> pv. <i>mori</i>	2	/	03	03
<i>P. syringae</i> pv. <i>morsprunorum</i>	8	/	01	01b
<i>P. syringae</i> pv. <i>myricae</i>	2	/	03	/
<i>P. syringae</i> pv. <i>nerii</i>	2	/	03	/
<i>P. syringae</i> pv. <i>oryzae</i>	4	04	04	04
<i>P. syringae</i> pv. <i>panici</i>	1	/	/	/
<i>P. syringae</i> pv. <i>papulans</i>	1	/	02	/
<i>P. syringae</i> pv. <i>passiflorae</i>	3	/	01	/
<i>P. syringae</i> pv. <i>persicae</i>	3	/	01	/
<i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>	2	03	03	03
<i>P. syringae</i> pv. <i>philadelphii</i>	9	/	05	/
<i>P. syringae</i> pv. <i>photinae</i>	2	/	03	/
<i>P. syringae</i> pv. <i>pisi</i>	1	02	02	02b
<i>P. syringae</i> pv. <i>porri</i>	4	/	/	/
<i>P. syringae</i> pv. <i>primulae</i>	6	/	07	/
<i>P. syringae</i> pv. <i>raphiolepidis</i>	2	/	03	/
<i>P. syringae</i> pv. <i>ribicola</i>	6	/	07	/
<i>P. syringae</i> pv. <i>retracarpa</i>	2	/	03	/
<i>P. syringae</i> pv. <i>savastanoi</i>	2	/	03	03
<i>P. syringae</i> pv. <i>sesami</i>	2	/	03	03
<i>P. syringae</i> pv. <i>solidagae</i>	1	/	02	/
<i>P. syringae</i> pv. <i>spinaceae</i>	3	/	01	/
<i>P. syringae</i> pv. <i>striaefaciens</i>	4	/	04	/
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>	1	02	02	02a,b,c

<i>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	2	03	03	03
<i>P. syringae</i> pv. <i>tagetis</i>	7	/	06	/
<i>P. syringae</i> pv. <i>theae</i>	8	01	01	01b
<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>	3	01	01	01a
<i>P. syringae</i> pv. <i>ulmi</i>	3	/	03	/
<i>P. syringae</i> pv. <i>viburni</i>	3	/	01	/
<i>P. syringae</i> pv. <i>zizaniae</i>	4	/	04	/
<i>P. syringae</i> – izolovan iz tekućih voda	/	/	/	01a,b; 02b,c,d,e; 05; 07a; 09a,b,c;10a,b,c,d,g,e,f; 13a
<i>P. syringae</i> – izolovan iz epilitičkog biofilma	/	/	/	01a,b; 02b,c,d; 07a; 09a; 10a,b,d,e; 13a
<i>P. syringae</i> – izolovan iz kišnice	/	/	/	01a,b; 02b,c,d; 03; 04; 07a,08; 10b
<i>P. syringae</i> – izolovan iz snega	/	/	/	02b,c,d; 07a; 10b
<i>P. syringae</i> – izolovan iz irigacionih kanala	/	/	/	01a; 02a,b,c,d;07a; 08; 09a; 12a,b;
<i>P. syringae</i> – izolovan iz podzemnih voda	/	/	/	02b,c,d; 07a; 10a
<i>P. syringae</i> – izolovan iz snežnog pokrivača	/	/	/	01a,b; 02c,b; 04; 07a; 10a,b,d; 13a
<i>P. syringae</i> – izolovan iz stelje	/	/	/	01a; 02b,c; 04; 07a; 10a,b,d; 13a,b;

/ - patovar/izolat nije obuhvaćen u datoj studiji

Revolucija koja je nastala prodorom metoda sekvenciranja gena spojena sa dugom istorijom fundamentalnih i aplikativnih istraživanja o *P. syringae*, svrstala je ovaj bakterijski kompleks na čelo istraživanja koja se tiču evolucije genoma kod fitopatogena, čime je dodatno omogućeno razumevanje načina na koji se genetički diverzitet širi unutar vrste (Baltrus et al., 2017). Mehanizmi koji dovode do velikog genetičkog diverziteta u okviru baktrijske vrste/populacije jesu mutacije, rekombinacije i horizontalni transfer gena. Veličina genoma različitih sojeva u okviru *P. syringae* kompleksa je približno ista (5-6 Mb), te možemo očekivati približno istu stopu mutacija po ćeliji/generaciji (O'Brien et al., 2011). Jedini faktor koji može poremetiti ovakve pretpostavke jeste uticaj sredinskih faktora na pojavu mutacija i favorizovanje istih (Gunasekera & Sundin, 2006). Takođe, za razliku od humane patologije, u fitopatologiji su do sada bili zanemareni „hipermutacioni izolati“ koji se odlikuju izuzetno visokom stopom spontanih mutacija usled defektnog DNK reparacionog sistema. Na ovaj način

se korisne mutacije brzo fiksiraju omogućavajući izolatima da se adaptiraju na uslove životne sredine u kojima se nalaze (Baltrus et al., 2017). Primer za „hipermutacione izolate“ koji razvijaju veoma brzu rezistenciju na antibiotike jesu izolati patogena *Pseudomonas aeruginosa*, uzročnika infekcija respiratornih organa kod pacijenata koji boluju od cistične fibroze (Oliver & Mena, 2010). Sa druge strane, homologa rekombinacija može se smatrati procesom koji homogenizuje genetički diverzitet, ipak rekombinacija između izolata iz različitih populacija, kao i u okviru populacije koja ima jasno definisanu strukturu populacije i različite individualne karakteristike donora i recipijenta može i te kako dovesti do genetičke diverzifikacije (Guttman & Dykhuizen, 1994; Baltrus et al., 2017). Horizontalni transfer gena predstavlja proces koji u velikoj meri utiče na fleksibilni deo genoma i na taj način doprinosi širenju intra- i inter-specijskog diverziteta, kao i adaptabilnosti izolata uslovima životne sredine (Baltrus et al., 2011).

### 1.3. Epidemiologija i patogeni diverzitet *P. syringae*

Epidemiologija i patogene karakteristike biljnih patogena koji kolonizuju listove nalazi se u fokusu istraživača još od početka 20. veka, dok je *Pseudomonas syringae* u istraživanjima koje se tiču interakcija između biljaka i patogena koje izazivaju bolesti listova pozicioniran kao osnovni model sistem (Hirano & Upper, 2000). Kada je u pitanju patogenost *P. syringae*, moramo se osvrnuti na tri aspekta koja predstavljaju ključne faktore u razumevanju celog procesa, a sa druge strane omogućavaju nam da na osnovu njih predložimo mere prevencije i kontrole. Prvi aspekt koji treba uzeti u obzir jeste životni ciklus samog patogena. *P. syringae* ima dve međusobno povezane faze rasta: epifitnu fazu, gde bakterije rastu na površini biljnog tkiva, na biljnim organima iznad zemljišta kao što su listovi, cvetovi, stablo i plodovi (sveobuhvatno nazvani *filosfera*); i endofitnu fazu, gde bakterije ulaze u biljno tkivo i kolonizuju međucelijski prostor, apoplast. *P. syringae* sojevi mogu imati izraženiju epifitnu (npr. *P. syringae* pv. *syrngae*) ili endofitnu (npr. *P. syringae* pv. *tomato*) fazu, ali u svim slučajevima bolest nastaje kada patogen uđe u međucelijski prostor i umnožava se tokom endofitne faze (Xin et al., 2018). Veliki broj patogena zapravo ne uspe da uspešno izvrši prelaz iz jedne u drugu fazu, što dovodi do toga da se bolest ne razvije, a upravo za to su zaslužni

odbrambeni mehanizmi domaćina koji na različite načine neutrališu ulazak bakterija u apoplast ili njihovo umnožavanje.

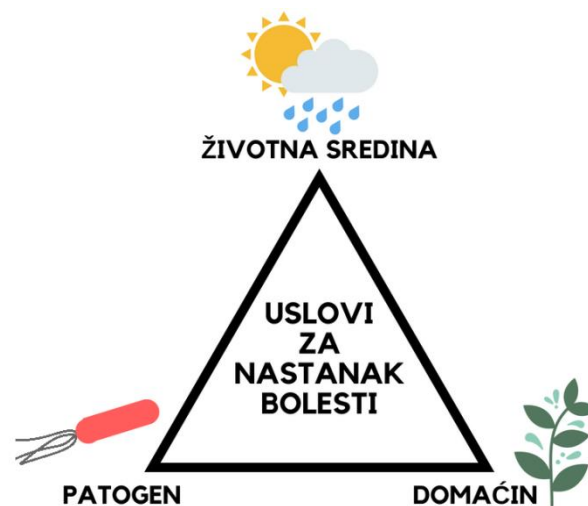
Drugo, kada govorimo o patogenosti *P. syringae* veoma bitan aspekt jeste produkcija faktora virulentnosti koje omogućavaju patogenu da izazove bolest. Najvažniji faktori virulentnosti jesu različiti tipovi toksina, kao i produkcija efektora koje sintetise Tip 3 sekrecioni sistem (T3SS). Govoreći o toksinima koje *P. syringae* proizvodi potrebno je spomenuti koronatin i siringomicin kao toksine koji imaju najaktivniju ulogu u patogenosti ove bakterije. Koronatin predstavlja molekularnu imitaciju aktivne forme biljnog hormona *jasmonata*, koji ima ulogu u regulisanju otvaranja i zatvaranja stoma. Ako uzmemo u obzir da stome predstavljaju jedna od osnovnih „ulaznih vrata“ za patogene, postaje jasno koliko važnu ulogu ima ovakav faktor virulentnosti. U studiji koju su sprovedeli Zheng et al. (2012) pokazana virulencija je posredovana aktivnošću koronatina koju izaziva *P. syringae* na biljkama *Arabidopsis thaliana* (L.). Sa druge strane siringomicin indukuje nekrozu biljnog tkiva, tako što se svojom amfipatičnom lipopeptidnom strukturom insertuje u lipidnu dvoslojnu membranu biljne ćelije formirajući pore kroz koje slobodno mogu difundovati katjoni (Hutchison et al., 1995). Siringomicin na taj način uzrokuje povećanje transmembranskog fluksa kalijuma ( $K^+$ ), vodonika ( $H^+$ ) i kalcijuma ( $Ca^{2+}$ ) koji je smrtonosan za ćeliju (Bidwai & Takemoto, 1987; Mott & Takemoto, 1898).

T3SS predstavlja membransku nanomašineriju, koja predstavlja ključni faktor patogenosti, pronađenu kod mnogih Gram negativnih bakterija, kako animalnih tako i biljnih patogena. Uloga T3SS jeste da patogen kolonizuje i destabilizuje svog domaćina, tako što direktno ubrizgava efektorske proteine u citoplazmu ćelija domaćina čime omogućava manipulaciju ćelijskih aktivnosti u svoju korist (Puhar & Sansonetti, 2014). Aktivnost T3SS je kodirana *hrp* genima koji su pronađeni kod svih poznatih Gram negativnih biljnih patogena (*P. syringae*, *Xanthomonas* spp., *Ralstonia solanacearum*, *Erwinia* spp.) (Alfano & Collmer, 2004; He et al., 2004; Buttner & Bonas, 2006). Što se tiče *P. syringae*, ova vrsta predstavlja model organizam za izučavanje T3SS kod biljnih patogena. Repertoar protein-efektora koji poseduje ovaj patogen sastoji se od 57 različitih familija (Prilog 2), od čega individualni sojevi ekspimiraju od 15-30 efektora (Lindeberg et al., 2012). Uloge efektora kao što su, manipulisanje otvaranja ili zatvaranja stoma, inhibiranje mehanizama imuniteta biljnih ćelija, delovanje na biljni



цитоскелет, хлоропласт и ćелијски зид, јасно показују да управо овакав “арсенал оруђија” који поседује *P. syringae* од њега чини једног од најефикаснијих и најразорнијих патогена уопште (He et al., 2006; Goel et al., 2008; Guo et al., 2016; Rodriguez-Herva et al., 2012; Shimono et al., 2016).

Трећи аспект представљају услови животне средине од којих у великој мери зависи да ли ће се патоген успешно колонизовати домаћина и самим тим изазвати болест. Једна од основних парадигми у фитопатологији (“disease triangle paradigm“) односи се на чињеницу да настанак инфективних болести зависи од три фактора: осетљивости домаћина, вируленције патогена и услова животне средине (Stivens, 1960) (Слика 1.4). Два срединска фактора која имају највећи утицај на настанак болести свакако јесу температура и влаћност.



**Слика 1.4.** Неопходни фактори настанка фитопатогених болести (tzv. Stivens-ov trougao)

Влаћност ваздуха је веома уско повезана са настанком болести на многим пољопривредним културима (Xin et al., 2018). Висока влаћност ваздуха, као и пропратне појаве као што су роса, магла и киша доводе до повећане бројности епифитних популација *P. syringae* на површини биљака (Lindeman et al., 1984; Hirano & Upper, 2000;). Такође, висока влаћност делује на отварање стома чиме је улазак бактерија у апопласт лакши, тако да отварање стома индуковано патогеном није ни потребно (Panchal et al., 2016). Висока влаћност омогућава бактеријама да се деле брже унутар апопласта, и

samim tim ubrzavaju proces infekcije i nastanka bolesti. Što se tiče temperature, kao veoma bitnog sredinskog faktora, približno 28°C se uzima kao optimalna temperatura za rast *P. syringae* u *in vitro* uslovima, iako ova temperatura ima negativan efekat na produkciju nekih faktora virulentnosti. Testiranjem u kulturi je pokazano da temperatura 28-30°C u poređenju sa 18°C inhibira produkciju nekih fitotoksina (npr. koronatina), ekspresiju gena za proizvodnju egzopolisaharida (npr. geni koji kodiraju produkciju levana), ekspresiju nekih T3SS gena, kao i pokretljivosti suprimirajući gene odgovorne za produkciju flagelina (van Dijk et al., 1999; Smirnova et al., 2001; Weingart et al., 2004; Li et al., 2006; Hockett et al., 2013). Nakon novijih istraživanja biljnog mikrobioma gde je pokazano da mikrobiom ima mogućnost iniciranja imunog odgovora biljaka, ovaj faktor se može postaviti kao četvrti vektor u okviru opisanog koncepta nastanka bolesti (Hacquard et al., 2017). *P. syringae* koegzistira sa drugim članovima biljnog mikrobioma, koji mogu uticati na njegovu virulentnost, kao i izazivati imunski odgovor biljke domaćina što definitivno utiče na sam nastanak bolesti (Hacquard et al., 2017). Veliki je broj naučnih radova koji su pokazali da drugi mikroorganizmi, često nazvani "biokontrolni agensi", produkcijom sekundarnih metabolita ili kompeticijom za nišu koju nastanjuju mogu uticati na smanjenje virulentnosti i epifitnog potencijala patogena (Bais et al., 2004; Andreote et al., 2009; Raaijmakers & Mazzola, 2012). Takođe, bakterije koji su normalni članovi mikrobiote domaćina mogu inhibirati „*quorum sensing*“ kod *P. syringae* (Dulla et al., 2010), koji ima funkciju u komunikaciji bakterijskih ćelija s ciljem da se vrši produkcija virulentnih faktora tek kada se uspostavi dovoljan broj bakterijskih ćelija koji će izazvati infekciju tkiva (Deep et al., 2011). Svi sredinski faktori, kao i mikrobiom domaćina definitivno utiču na oblikovanje interakcija između *P. syringae* i biljke domaćina.

Patogeni diverzitet *P. syringae* može se posmatrati kroz diverzitet simptoma bolesti koje izazivaju, s jedne strane, i spektar domaćina, s druge strane. Pre svega na osnovu tipova simptoma bolesti koju ovaj bakterijski kompleks izaziva na biljnim domaćinima. Simptomi bolesti mogu biti veoma raznovrsni i uglavnom se javljaju na svim nadzemnim delovima biljke. Pa tako, *P. syringae* može izazvati: tačkastu nekrozu listova i plodova, kancer stabla, uvenuće cvetova i pupoljaka, hiperplaziju čvorova na granama (Kennelly et al., 2007). Takođe, patogeni diverzitet *P. syringae* kompleksa se ogleda i u velikom opsegu domaćina na kojima sojevi u okviru ovog kompleksa

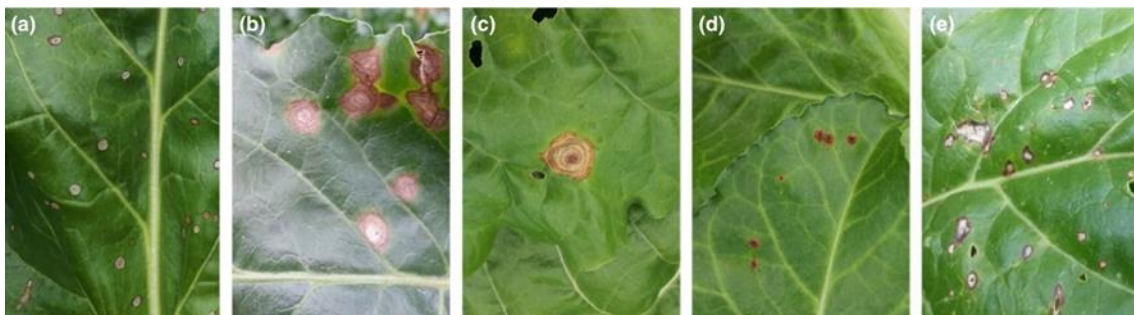
izazivaju bolest. Upravo zbog svoje opšteprisutnosti, evolutivne istorije i životnog ciklusa, ovaj patogen izaziva različite tipove bolesti na jednogodišnjim, dvogodišnjim, višegodišnjim zeljastim i drvenastim biljkama (Toben et al., 1989; Martin-Sanz et al., 2012; Lamichhane et al., 2014, 2015; Hulin et al. 2017; Ivanović et al. 2018).

Patogeni diverzitet *P. syringae* doveo je do intenzivnih diskusija u svetskoj naučnoj zajednici tokom koje su istraživači težili ka dodatnoj nomenklaturi u okviru vrste koja bi olakšala njeno proučavanje. S tim u vezi, prva podela sojeva na osnovu patogenih karakteristika, odnosno domaćina na kojima izazivaju bolest, objavljena je u studiji Young et al. (1978) i sadržala je 40 izdvojenih patogenih varijeteta (*patovara*) u okviru vrste *P. syringae*. Danas je izdvojeno 67 patogenih varijeteta (Young et al., 2010) (Tabela 1.1). Poznato je da mnogi *P. syringae* patovari rastu veoma dobro i izazivaju bolest na velikom broju različitih biljnih domaćina, ali takođe, neki patovari su usko specijalizovani samo za jednog domaćina. Taj dualizam između *P. syringae* patovara generalista i specijalista, otvorio je mnoge polemike u naučnoj zajednici poslednjih godina s ciljem da se uradi revizija celokupne taksonomske jedinice, što bi doprinelo poboljšanju studija koje se tiču epidemiologije ovog patogena.

#### **1.4. *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* – uzročnik bolesti lisne pegavosti šećerne repe**

Više od 20 fungalnih i preko 10 bakterijskih patogena izaziva različite bolesti na šećernoj repi (*Beta vulgaris*). Od toga, patogeni sojevi vrsta *Cercospora beticola*, *Romularia beticola*, *Pleospora betae*, *Uromyces betae* i *P. syringae* pv. *aptata* predstavljaju uzročnike bolesti lisne pegavosti šećerne repe (Hallau et al., 2018). Bakterijski biljni patogen *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* ima veoma široku distribuciju i kao uzročnik bolesti lisne pegavosti detektovan je u Severnoj Americi (SAD: Kalifornija, Kolorado, Džordžija, Kentaki, Montana, Severna Dakota, Nebraska i Oregon), Južnoj Americi (Urugvaj), Evropi (Belgija, Francuska, Gruzija, Italija, Holandija, Švedska, Švajcarska, Ukrajina i Ujedinjeno Kraljevstvo), Aziji (Demokratska narodna Republika Koreja, Indija, Iran, Japan i Južna Koreja) i Australija i Novi Zeland (Bradbury, 1986; Morris et al., 2000; Koike et al., 2003; Sedighian et al., 2014).

Bolest bakterijske pegavosti listova biljaka izazvana *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* je široko rasprostranjena bolest koja pogađa nekoliko različitih domaćina, kao što su šećerna repa (*Beta vulgaris* subsp. *vulgaris* convar. *vulgaris* var. *altissima*), blitva (*B. vulgaris* subsp. *cicla*), cvekla (*B. vulgaris* subsp. *vulgaris* var. *vulgaris*), dinja (*Cucumis melo* var. *cantalupo*) i bundeva (*Cucurbitamoschata*) (Morris et al., 2000; Koike et al., 2003; Sedighian et al., 2014; Stojšin et al. 2015). Simptomi bolesti koju izaziva *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* odlikuju se pojavom nepravilnih nekrotičnih pega na listovima, koje su oivičene tamnim marginama, dok je centar pege braon do sive boje (Koike et al., 2003). Simptomi su veoma slični onima koje izaziva fitopatogena gljiva *Cercospora beticola* koja je jedan od najdestruktivnijih i najvirulentnijih patogena šećerne repe (Hallau et al., 2018). Međutim, pege na biljnom tkivu koje formira *Cercospora* ne pokazuju staklastu crnu marginu i pojavljuju se kasnije u sezoni (jul, avgust) (Weiland & Koch, 2004). Takođe, bakterijska bolest lisne pegavosti može se pomešati sa ranim simptomima bolesti izazvanih *Pleospora betae*, dok se jasno formirani simptomi lako mogu razlikovati (Slika 1.5).



**Slika 1.5.** Simptomi lisne pegavosti šećerne repe uzrokovani najčešćim fitopatogenima. a) *Cercospora beticola*, b) *Romularia beticola*, c) *Pleospora betae*, d) *Uromyces betae*, e) *P. syringae* pv. *aptata* (preuzeto iz studije Hallau et al. 2018)

Bolest šećerne repe koju je izazvao ovaj patogen prvi put je zabeležena u Srbiji u proleće 2013. godine (maj i jun mesec) na komercijalnim usevima u Autonomnoj Pokrajini Vojvodina (Stojšin et al., 2015). Srbija predstavlja jednu od glavnih područja proizvodnje šećerne repe u jugoistočnoj Evropi, sa površinom od 62.895 ha i proizvodnjom  $3 \times 10^6$  tona sirove šećerne repe. Skoro sve komercijalne obradive

površine se nalaze u AP Vojvodina. Samim tim, od velikog je značaja identifikovati i proučavati patogene koji mogu značajno ugroziti prinos šećerne repe čime bi se naneli veliki gubici proizvodnji hrane i ekonomiji generalno. Bolest bakterijske pegavosti izazvana *P. syringae* pv. *aptata* do sada nije rezultirala velikim gubicima u Srbiji, ili do sada ti gubici nisu prijavljeni. Međutim, 1993. godine u Francuskoj su zabeleženi znatni gubici (80-100%) prinosa dinje (*Cucumis melo* var. *cantalupo*), koji svedoče o velikom patogenom potencijalu (Morris et al., 2000). Ovakvi nalazi svakako predstavljaju upozorenje i nagoveštaj da *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* može izazvati velike probleme zasadima i prinosu šećerne repe, ali i drugim potencijalnim biljnim domaćinima.

Generalno, patovar *aptata* je jedan od najslabije proučavanih patovara u okviru *P. syringae* kompleksa, međutim poslednih godina objavljeno je nekoliko radova koji ukazuju na pojavu bolesti poljoprivrednih kultura, najčešće šećerne repe, uzrokovane *P. syringae* pv. *aptata* čime se ukazuje da partovar *aptata* predstavlja jednog od nadolazećih patogena sa veoma visokim patogenim potencijalom (Dutta et al. 2014; Stojšin et al. 2015; Arabiat et al. 2016).

## 1.5. Prevencija i upravljanje bolestima bilja - Biološka kontrola

Upravljanje i kontrola biljnih bolesti predstavlja veoma važan aspekt u produkciji poljoprivrednih useva. Tradicionalni pristup u rešavanju problema bolesti biljaka u okviru agroekosistema odnosi se na uzgajanje rezistentnih poljoprivrednih kultura, higijeni supstrata i semena kao prevenciju unakrsne kontaminacije i korišćenje pesticida (insekticida, fungicida, herbicida, bakteriocida) za supresiju potencijalno infektivnih organizama (O'Brien, 2017). Međutim, efekat pesticida na životnu sredinu, a posebno njihova akumulacija u hrani, dovela je do zabrane korišćenja mnogih pesticida i sve većeg interesovanjem za biološku kontrolu patogena kao zamenu za hemijske preparate. U fitopatologiji termin biološka kontrola odnosi se na korišćenje mikroorganizama-antagonista u supresiji biljnih patogena, dok se mikroorganizmi koji imaju takvu sposobnost nazivaju biokontrolni agensi (Pal & Gardener, 2006). Uzevši u obzir da biološka kontrola podrazumeva veliki broj interakcija između antagoniste, patogena i domaćina, mehanizmi koje biokontrolni agensi koriste mogu se podeliti na

direktne i indirektne. Direktni mehanizmi biokontrole podrazumevaju direktan kontakt između antagoniste i patogena, te stoga u ovu grupu mehanizama ubrajamo hiperparazitizam, predatorstvo, proizvodnju sekundarnih metabolita koji vrše supresiju patogena (proizvodnja antibiotika u najširem smislu reči, proizvodnja litičkih enzima, hitinaze, proteaze), otpadnih produkata metabolizma (ugljen-dioksid, cijanovodonik), kao i ometanje komunikacije među kolonijama patogena (*quorum quenching*). Indirektni mehanizmi podrazumevaju prostorno nutritivnu kompeticiju i indukciju imunskog odgovora domaćina (Pal & Gardener, 2006).

Vrste iz roda *Bacillus* su često posmatrani kao izvor različitih biomolekula koji potencijalno mogu imati značaj u inhibiciji biljnih patogena, dok ih je njihova sposobnost formiranja spora činila dobrim kandidatom za formiranje stabilnog produkta biopesticida, sa tehnološke tačke gledišta (Ongena & Jackues, 2008). Antagonistički sojevi iz roda *Bacillus*, u biološkoj kontroli patogena koriste tri osnovna mehanizma supresije, i to proizvodnju antibiotika, indukciju imunskog odgovora domaćina i kompeticiju. Takođe, biopesticidi obično imaju različite načine delovanja u odnosu na konvencionalne pesticide, što podrazumijeva da mogu potisnuti već otporne štetočine i izbeći razvoj dalje rezistencije (Cawoy et al., 2011). Vrste kao što su *B. subtilis*, *B. amiloliquefaciens* i *B. pumilus*, karakterišu se veoma izraženom antimikrobnom aktivnošću i produkcijom lipopeptida koji su odgovorni za suzbijanje nekrotizirajućih patogena biljaka (Dimkić et al., 2013, 2017; Chowdhury et al., 2015; Agarwal et al., 2017). Brojne vrste u okviru roda *Bacillus* proizvode nekoliko porodica cikličnih neribozomalno sintetisanih lipopeptida kao što su *surfaktini*, *iturini*, *fengicini* i *kurstakini* čija je antimikrobna aktivnost veoma potentna i deluje na fungalne i bakterijske fitopatogene (Ongena & Jackues, 2008). Od pomenutih familija, surfaktini i iturini su do sada pokazali snažan antagonistički potencijal protiv bakterijskih biljnih patogena (Bais et al., 2004; Etchegaray et al., 2008; Dimkić et al., 2013). Lipopeptidi imaju sposobnost međusobne interakcije, tako usled sinergizma među sobom mogu povećavati antimikrobnu aktivnost koja omogućava brojne ekološke prednosti (Falardeau et al., 2013; Liu et al., 2014).

Izveštaji o biološkoj kontroli patogena koji izazivaju bolesti na šećernoj repi bili su uglavnom vezani za fungalne patogene, i to pre svega za vrste *Cercospora beticola*, *Sclerotium rolfsii* i *Rhizoctonia solani* (Collins & Jacobsen, 2003; Errakhi et al., 2007;

Zachow et al., 2010). S obzirom da *P. syringae* predstavlja sveprisutnog i ekonomski veoma važnog biljnog patogena koji utiče na veliki broj domaćina (Morris et al., 2000; Kennelly et al., 2007; Ferrante & Scortichini, 2010), biološka kontrola se izdvaja kao ekološki ispravan način za upravljanje ovim patogenom. Biološka kontrola patovara *P. syringae* od strane sojeva iz roda *Bacillus* istraživana je u nekoliko najnovijih studija (Sabir et al., 2017, Wicaksono et al., 2018). Međutim, biološka kontrola *P. syringae* pv. *aptata*, uzrokovaca lisne pegavosti šećerne repe, do sada nije istraživana u velikoj meri što može biti potencijalni problem u primeni za proizvođače ukoliko dođe do velikih epidemija uzrokovanih ovim patogenom, čiji se patogeni potencijal iz godine u godinu sve više detektuje.

# CILJEVI RADA



---

## 2. CILJEVI RADA

Imajući u vidu značaj podataka koji ukazuju da *P. syringae* pv. *aptata* predstavlja nadolazećeg fitopatogena šećerne repe koji se odlikuje visokim patogenim potencijalom i mogućim širokim spektrom domaćina, kao i na osnovu činjenice da do sada nije bilo izveštaja o detekciji *P. syringae* pv. *aptata* na teritoriji Srbije, ciljevi ove studije su:

- Identifikacija izolata *P. syringae* pv. *aptata* sa zaraženih listova šećerne repe na teritoriji AP Vojvodina.
- Molekularna karakterizacija, utvrđivanje genetičkog diverziteta i analiza filogenetskih odnosa izolata *P. syringae* pv. *aptata*.
- Određivanje filogenetskog statusa izolata *P. syringae* pv. *aptata* u okviru *P. syringae* kompleksa.
- Ispitivanje patogenih karakteristika izolata *P. syringae* pv. *aptata* korišćenjem *in planta* testova.
- Određivanje spektra potencijalnih biljnih domaćina kolekcije izolata *P. syringae* pv. *aptata*.
- Ispitivanje mogućnosti primene biološke kontrole bolesti koju izaziva *P. syringae* pv. *aptata*, primenom *Bacillus amyloliquefaciens* u *in planta* testovima.

# MATERIJAL I METODE

### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1. Bakterijski sojevi

U okviru date studije formirana je kolekcija od 104 bakterijskih izolata koji su izolovani sa komercijalnih zasada šećerne repe na teritoriji AP Vojvodina (Tabela 3.1). Referentni soj *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* CFBP2473 preuzet je iz francuske kolekcije fitopatogenih bakterija (Collection of Plant associated bacteria, bacterial plant pathogen genetic resources, INRA, Angers, France), dok su referentni sojevi *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* PD163 i PD193 preuzeti iz holandskog inspektorata za dijagnostiku biljnih patogena (Department of Laboratory Methods and Diagnostics, Dutch General Inspection Service (NAK), Emmeloord, Netherlands). Podaci o referentnim sojevima su prikazani u Tabeli 3.2.

*Bacillus amyloliquefaciens* SS-12.6 soj je korišćen kao model za utvrđivanje biološke kontrole bolesti lisne pegavosti šećerne repe. Soj SS-12.6 je deo kolekcije *Bacillus* sp. sojeva izolovanih sa različitih staništa, a koja se nalazi u okviru Laboratorije za mikrobiologiju, Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.

#### 3.2 Medijumi za gajenje bakterija, boje, reagensi i rastvori

##### LB

Kazein hidrolizat	10 g
Ekstrakt kvasca	5 g
NaCl	5 g
dH <sub>2</sub> O	1000 ml

##### LA

LB sa dodatkom 15 g agara / 1000 ml.

**Kingova podloga B (KB)**

Pepton	20 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,5 g
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	1,5 g
Glycerol	10 ml
Agar	15 g
dH <sub>2</sub> O	1000 ml

**Mesopeptonska podloga obogaćena saharozom (SNA)**

Hranljivi agar	41,3 g
Saharoza	50 g
dH <sub>2</sub> O	1000 ml

**Hugh-Leifson podloga (O/F test)**

Pepton	2 g
NaCl	5 g
Agar	3 g
Brom timol plavo	0,03 g
dH <sub>2</sub> O	1000 ml

**Podloga za aktivnost arginin dehidrolaze**

Pepton	1,0 g
NaCl	5,0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,3 g
Fenol crveno	0,01 g
Arginin (HCl)	10,0 g
Agar	3,0 g
dH <sub>2</sub> O	1000 ml

**Podloga za hidrolizu želatina**

Ekstrakt kvasca	3 g
Pepton	5 g
Želatin	120 g
dH <sub>2</sub> O	1000 ml

**Podloga za hidrolizu eskulina**

Pepton	10 g
Eskulin	1 g
Ferriamonijum citrat	0,5 g
Agar	12 g
dH <sub>2</sub> O	1000 ml

**Podloga za produkciju vodonik sulfida (H<sub>2</sub>S)**

Pepton	15 g
Proteaza pepton	5 g
Na-glicerofosfat	1 g
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0,03 g
Agar	15 g
dH <sub>2</sub> O	1000 ml

**Podloga za razlaganje skroba**

Pepton	15 g
Mesni ekstrakt	3 g
NaCl	5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,3 g
Agar	18 g
dH <sub>2</sub> O	1000 g
Skrobni rastvor 20%	10 ml

**Podloga za dokazivanje indola**

Pepton	10 g
NaCl	5 g
Triptofan	10 g
dH <sub>2</sub> O	1000 ml

**Lugolov rastvor**

Kristalni jod	1 g
Kalijum-jodid (KI)	2 g
dH <sub>2</sub> O	300 ml

**Skrobni rastvor**

Rastvorljiv skrob	20 g
dH <sub>2</sub> O	100 ml

**Kowacs-ev reagens**

<i>p</i> - dimetil aminobenzaldehid	5g
Amil alkohol	75 ml
HCl	25 ml

**Rastvor KOH (3%)**

KOH	3 g
dH <sub>2</sub> O	100 ml

**Rastvor feri amonijum citrata (0,05%)**

Feri amonijum citrat	0,05 g
dH <sub>2</sub> O	100 ml

**Reagens za citohrom *c***

Tetra-metil- <i>p</i> -fenilendiamin dihidrohlorid	1 g
dH <sub>2</sub> O	100 ml

**Kristal violet**

Kristal violet	2 g
Etanol 96%	20 ml
Amonijum oksalat	0,8 g
Destilovana voda	80 ml

**Safranin**

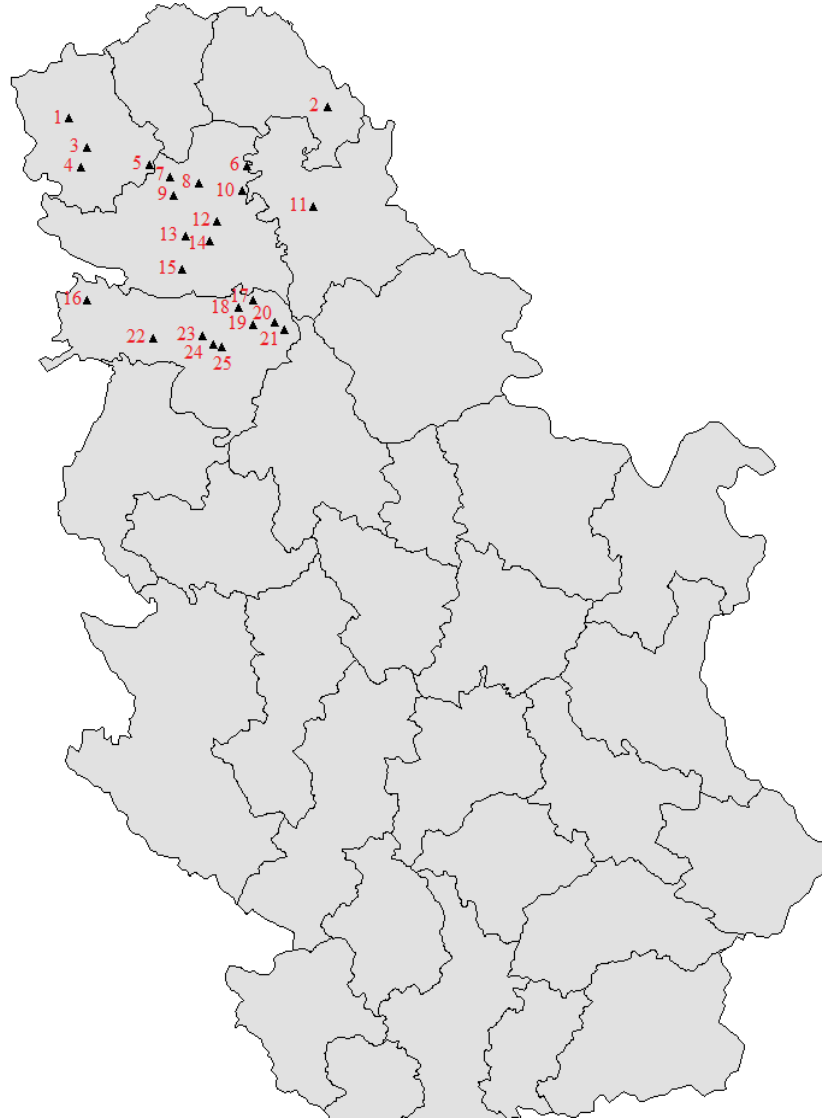
Safranin	0,25 g
Etanol 96%	10 ml
Destilovana voda	100 ml

\*pre upotrebe filtrirati

### 3.3. Sakupljanje uzoraka i izolacija bakterija

Kolekcija izolata *P. syringae* pv. *aptata* sakupljena je na teritoriji AP Vojvodina, pretežno u centralnim i južnim delovima pokrajine (Bačka i Srem) (Slika 3.1). Izolacije bakterijskih sojeva vršene su tokom proleća (maj i jun mesec) 2013. godine. U Tabeli 1 je prikazan spisak izolovanih sojeva, sa tipom sorte šećerne repe sa koje su izolovani, lokalitetom izolovanja i godinom izolacije. Bakterije su izolovane iz nekrotičnih lezija sa listova šećerne repe (10 listova po lokalitetu), i to sa 4 najzastupljenije sorte: Marinela, Serenada, Jasmina (KWS, Nemačka) i Lara (NS Seme, Srbija). Radi otklanjanja nečistoća sa površine lista i lakšeg izolovanja patogena, listovi su oprani sterilnom destilovanom vodom i ostavljeni da se suše na filter papiru na sobnoj temperaturi. Nakon toga, listovi su dezinfikovani u 2% rastvoru natrijum hipohlorita (varikina) u trajanju od 5 min. Mali delovi tkiva (3-5 mm) na prelazu zdravog u nekrotični deo su preneti u sterilni avan i macerirani tučkom u nekoliko kapi sterilne destilovane vode u trajanju od 1 min. Napravljeni macerat je razmazom išarane ploče bakteriološkom ezom zasejan na hranljivu podlogu sa saharozom (NSA). Zasejane ploče su inkubirane u termostatu na 26°C i izrasle kolonije su posmatrane nakon 48 sati. Kolonije koje su bile karakteristične za *P. syringae* su presejavane na King B (KB) medijum i podlogu sa saharozom (NSA) u cilju dobijanja čistih kultura.

Nakon 24 sata inkubacije na 26°C, izrasle bakterijske kolonije su dalje korišćene u testovima za identifikaciju.



**Slika 3.1.** Komercijalni zasadi šećerne repe u AP Vojvodina, Srbija. 1) Sombor 2) Kikinda 3) Stapar 4) Doroslovo 5) Bačko Dobro Polje 6) Bečež 7) Kula 8) Srbobran 9) Vrbas 10) Čurug 11) Mihajlovo 12) Temerin 13) Kisač 14) Rimski Šančevi 15) Futog 16) Šid 17) Novi Karlovci 18) Maradić 19) Inđija 20) Beška 21) Petrovića salaš 22) Lačarak 23) Kraljevci 24) Ruma 25) Dobrinici.



**Tabela 3.1.** Kolekcija *P. syringae* pv. *aptata* sa sortom šećerne repe sa koje je izolovana, lokalitetom izolovanja i godinom izolacije

Izolati	Sorta šećerne repe	Lokalitet	Godina izolacije
P1	Serenada	Doroslovo	2013
P2	Serenada	Doroslovo	2013
P3	Serenada	Doroslovo	2013
P4	Serenada	Doroslovo	2013
P5	Jasmina	Bačko Dobro Polje	2013
P6	Jasmina	Bačko Dobro Polje	2013
P7	Jasmina	Bačko Dobro Polje	2013
P8	Jasmina	Bačko Dobro Polje	2013
P9	Serenada	Stapar	2013
P10	Serenada	Stapar	2013
P11	Serenada	Stapar	2013
P12	Serenada	Stapar	2013
P13	Serenada	Stapar	2013
P14	Jasmina	Šid	2013
P15	Jasmina	Šid	2013
P16	Jasmina	Šid	2013
P17	Jasmina	Šid	2013
P18	Jasmina	Šid	2013
P19	Marinela	Čurug	2013
P20	Marinela	Čurug	2013
P21	Marinela	Čurug	2013
P22	Marinela	Čurug	2013
P23	Marinela	Čurug	2013
P24	Marinela	Čurug	2013
P25	Marinela	Čurug	2013
P26	Marinela	Čurug	2013
P27	Marinela	Čurug	2013
P28	Marinela	Čurug	2013
P29	Marinela	Čurug	2013
P30	Jasmina	Laćarak	2013
P31	Jasmina	Laćarak	2013
P32	Jasmina	Laćarak	2013
P33	Jasmina	Laćarak	2013

---

P34	Jasmina	Laćarak	2013
P35	Jasmina	Laćarak	2013
P36	Jasmina	Laćarak	2013
P37	Jasmina	Laćarak	2013
P38	Marinela	Vrbas	2013
P39	Marinela	Vrbas	2013
P40	Marinela	Vrbas	2013
P41	Marinela	Vrbas	2013
P42	Marinela	Vrbas	2013
P43	Marinela	Mihajlovo	2013
P44	Marinela	Mihajlovo	2013
P45	Marinela	Mihajlovo	2013
P46	Marinela	Mihajlovo	2013
P47	Marinela	Kula	2013
P48	Marinela	Kula	2013
P49	Marinela	Kula	2013
P50	Marinela	Kisač	2013
P51	Marinela	Kisač	2013
P52	Marinela	Kisač	2013
P53	Marinela	Kikinda	2013
P54	Marinela	Kikinda	2013
P55	Marinela	Kikinda	2013
P56	Marinela	Kikinda	2013
P57	Marinela	Kikinda	2013
P58	Jasmina	Indija	2013
P59	Jasmina	Indija	2013
P60	Jasmina	Indija	2013
P61	Jasmina	Maradik	2013
P62	Jasmina	Maradik	2013
P63	Jasmina	Maradik	2013
P65	Jasmina	Maradik	2013
P66	Jasmina	Ruma	2013
P67	Jasmina	Ruma	2013
P68	Jasmina	Beška	2013
P69	Jasmina	Beška	2013
P70	Jasmina	Beška	2013

---

P71	Jasmina	Petrovića salaš	2013
P72	Jasmina	Petrovića salaš	2013
P73	Jasmina	Novi Karlovci	2013
P74	Jasmina	Novi Karlovci	2013
P75	Marinela	Srbobran	2013
P76	Marinela	Srbobran	2013
P77	Jasmina	Dobrinci	2013
P78	Jasmina	Beška	2013
P79	Marinela	Sombor	2013
P80	Jasmina	Novi Karlovci	2013
P81	Jasmina	Novi Karlovci	2013
P82	Marinela	Bečej	2013
P83	Marinela	Bečej	2013
P84	Jasmina	Petrovića salaš	2013
P85	Jasmina	Petrovića salaš	2013
P86	Jasmina	Dobrinci	2013
P87	Jasmina	Dobrinci	2013
P88	Jasmina	Kraljevci	2013
P89	Jasmina	Kraljevci	2013
P90	Serenada	Stapar	2013
P91	Serenada	Stapar	2013
P92	Marinela	Futog	2013
P93	Jasmina	Bačko Dobro Polje	2013
P94	Jasmina	Bačko Dobro Polje	2013
P95	Lara	Rimski Šančevi	2013
P96	Lara	Rimski Šančevi	2013
P97	Lara	Rimski Šančevi	2013
P98	Lara	Rimski Šančevi	2013
P99	Serenada	Temerin	2013
P100	Serenada	Temerin	2013
P101	Serenada	Temerin	2013
P102	Serenada	Temerin	2013

P103	Serenada	Temerin	2013
P104	Jasmina	Indija	2013
P105	Jasmina	Indija	2013

**Tabela 3.2.** Referentni sojevi korišćeni u ovoj studiji sa domaćinom sa kog su izolovani, zemljom porekla i godinom izolacije.

Referentni soj	Šifra	Domaćin	Zemlja porekla	Godina izolacije
<i>P. syringae</i> pv. <i>aptata</i>	PD163	Šećerna repa	Holandija	1978
<i>P. syringae</i> pv. <i>aptata</i>	PD193	Šećerna repa	Holandija	1978
<i>P. syringae</i> pv. <i>aptata</i>	CFBP2473	Šećerna repa	Holandija	1979
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>	CFBP1582	Breskva	Francuska	1969
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>	NCPB28	Jorgovan	Engleska	-
<i>P. syringae</i> pv. <i>atofaciens</i>	DSM5025	Pšenica	-	-
<i>P. syringae</i> pv. <i>actinidae</i>	FTRS LI	Kivi	Japan	1984

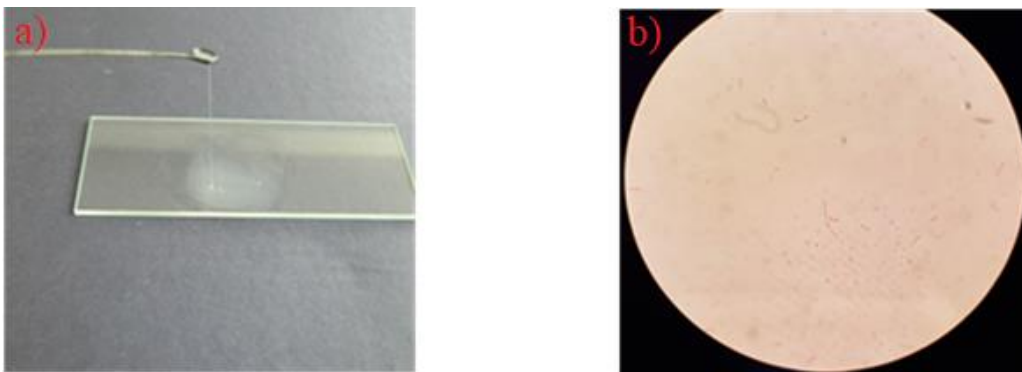
### 3.4. Morfološke i biohemijske odlike bakterijskih izolata

#### 3.4.1. Morfološke karakteristike kolonija

Proučavane su morfološke karakteristike na mesopeptonskoj podlozi sa saharozom (NSA) i na King B podlozi (KB). Bakterije su zasejavane na sterilne, čvrste podloge razlivenne u Petrijevim šoljama. Bakterije su nanošene bakterijskom ezom metodom išarane ploče u cilju dobijanja pojedinačnih kolonija. Posmatrani su oblik, boja, veličina, providnost, konzistencija, sjaj, ispupčenost, površinska struktura i izgled oboda kolonija.

#### 3.4.2. Razlikovanje bakterija po Gramu

Za testiranje bakterija korišćen je i metod sa 3% (w/v) KOH. Sterilnom bakteriološkom ezom je zahvaćen deo kulture bakterije starosti 24 časa i emulgovan u kapi 3% rastvora KOH na mikroskopskoj pločici. Podizanjem bakteriološke eze kod Gram negativnih bakterija uočava se pojava končića koji nastaje razgradnjom bakterijskih ćelija pod dejstvom KOH. Kod Gram pozitivnih bakterija izostaje obrazovanje končića (Slika 3.2a).



**Slika 3.2.** Gram reakcija: a) pojava končića nakon razmaza kolonije u 3% KOH rastvoru; b) crvene štapičaste ćelije obojene po Gramu

Bojenje po Gramu diferencira bakterije na osnovu građe ćelijskog zida. Fiksiranje preparata vrši se nanošenjem bakterijske kulture na mikroskopsku pločicu,

pri čemu se suspenzija suši nad plamenom. Nakon fiksiranja na preparat se nanosi boja Kristal violet koja se nakon 1-2 minuta ispira vodom. Nakon toga dodaje se par kapi Lugolovog rastvora koji fiksira boju, te se posle 1 minuta ispira 96% etanolom. Obezbojavanje etanolom se zaustavlja ispiranjem vodom. Nakon toga se dodaje 0,25% safranin koji se ispira vodom nakon 30 sekundi. Preparat se suši na sobnoj temperaturi. Crveno obojene ćelije predstavljaju G- bakterije, dok su ljubičaste G+ (Slika 3.2b).

### 3.4.3. Hidroliza želatina

Podloga od peptona, kvašćevog ekstrakta i želatina razlivena je (po 5 ml) u epruvete i sterilisana u autoklavu pri temperaturi od 121 °C u trajanju od 15 minuta. Kao kontrola korišćena je nezasejana podloga. Rezultati su očitavani nakon 3, 7, 14 i 21 dan. Pre očitivanja rezultata, epruvete s podlogom su postavljene u frižider na 4 °C u trajanju od 30 minuta. Ukoliko nakon tog perioda ne dođe do očvršćavanja podloge, bakterija razlaže želatin (Slika 3.3).

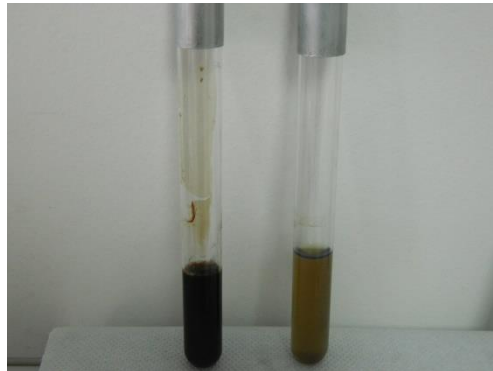


**Slika 3.3.** Pozitivna reakcija hidrolize želatina izolata P4 (tečna podloga) upoređena sa negativnom kontrolom (čvrsta podloga)

### 3.4.4. Hidroliza esculina

Podloga od esculina je posle sterilizacije zakošena i nakon očvršćavanja zasejavana kulturom bakterija starih 24 sata. Rezultati su očitavani nakon 4 dana

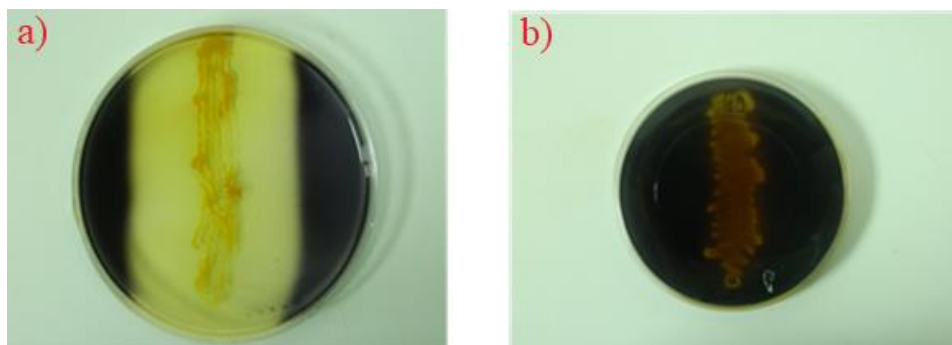
inkubacije na temperaturi od 26°C. Pojava tamnomrke boje podloge označava pozitivnu reakciju (Slika 3.4).



**Slika 3.4.** Pozitivna reakcija hidrolize eskulina izolata P12 (tamno-mrka podloga) upoređena sa negativnom kontrolom (svetla podloga)

### 3.4.5. Hidroliza skroba

Bakterije imaju sposobnost da hidrolizuju skrob u reakciji enzima amilaze, koji razlaže skrob do oligosaharida. Bakterije se zasejavaju na podlogu sa skrobnim agarom i inkubiraju na 26°C 48sati. Petrijeva šolja sa izraslim bakterijskim kolonijama se prelijeva Lugolovim rastvorom. Lugolov rastvor sadrži jod koji interaguje sa skrobom i boji ga u tamno plavo do teget boju. Oko kolonija koje proizvode amilazu neće doći do bojenja skroba jer je on hidrolizovan, pa pozitivnu reakciju u ovom testu čine neobojene zone na podlozi (Slika 3.5).



**Slika 3.5.** Hidroliza skroba: a) pozitivna kontrola (*Xanthomonas campestris* pv. *phaseolicola* 029); b) negativna reakcija testiranog izolata P49

### 3.4.6. Produkcija vodonik sulfida (H<sub>2</sub>S)

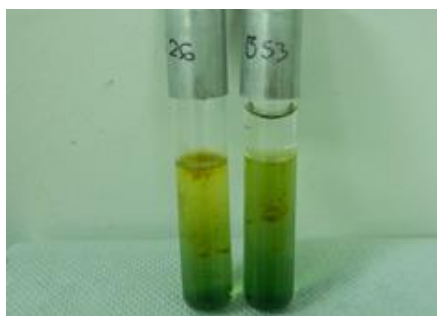
Produkcija vodonik sulfida se dokazuje u reakciji sa jonima gvožđa (Fe<sup>2+</sup>), gde dolazi do stvaranja crnog taloga đgvožđe sulfida (FeS). U epruvete sa pepton-gvožđe dubokim agrom se zasejavaju bakterije i testira se produkcija H<sub>2</sub>S. Pepton sadrži amino kiseline bogate sumporom, a filterpapir natopljen feri amonijum citratom se stavlja u epruvetu do 1 cm do podloge. Inkubacija se vrši 48 sati na temperaturi 26°C. Promena boje u crno na filterpapiu predstavlja pozitivnu reakciju (Slika 3.6).



**Slika 3.6.** Negativna (epruveta levo) reakcija izolata P100 i pozitivna (epruveta desno) reakcija izolata *Xanthomonas campestris* pv. *phaseolicola* 029 u testu za produkciju H<sub>2</sub>S

### 3.4.7. Metabolizam glukoze (O/F test)

Za određivanje metabolizma glukoze korišćena je Hugh-Leifson-ova podloga, kojoj je nakon sterilizacije i dhladenja do 50 °C dodat sterilisan rastvor glukoze do finalne koncentracije 1%. Podloga je zatim razlivena u sterilne epruvete.



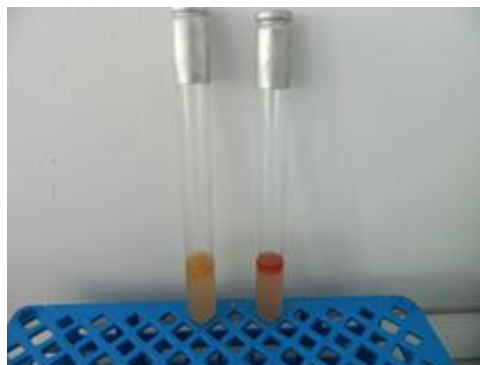
**Slika 3.7.** Pozitivna (epruveta levo) i negativna (epruveta desno) reakcija izolata P53 u O/F testu



Svaki izolat je zasejavan u po 4 epruvete, od kojih su po dve zalivane sterilnim parafinskim uljem, radi stvaranja anaerobnih uslova. Izolati su inkubirani tri dana u termostatu na temperaturi od 25 °C. Pojava žute boje u podlozi, nastala kao rezultat razgradnje glukoze i promene pH vrednosti, označava pozitivnu reakciju (Slika 3.7).

### 3.4.8. Produkcija indola

Produkcija indola nastaje nakon razlaganja aminokiseline triptofana u reakciji koju katalizuje enzim triptofanaza. Za dokazivanje produkcije indola korišćena je peptonska voda sa dodatkom 1% triptofana. Nakon inkubacije 48 sati na temperaturi 30°C u bakterijsku kulturu se dodaje 0,3 Kowacs-evog reagensa i suspenzija se dobro promućka. Dokazivanje indola se vrši preko reakcije sa *para*-dimetil amino benzaldehidom (*p*-DMAB), koji je sastavni deo Kowacs-evog reagensa, pri čemu se stvara crvena boja rosindol što predstavlja pozitivnu reakciju (Slika 3.8).



**Slika 3.8.** Negativna (epruveta levo) i pozitivna (epruveta desno) reakcija izolata P102 u testu za produkciju indola

### 3.4.9. Prisustvo katalaze

Bakterije sa aerobnim disanjem poseduju enzim katalazu koja razlaže toksične molekule vodonik peroksida ( $H_2O_2$ ), koje nastaju u procesu disanja, na vodu i molekularni kiseonik.



**Slika 3.9.** Pozitivna reakcija izolata P74 u katalaza testu i pojava mehurića O<sub>2</sub>

Prisustvo katalaze se dokazuje dodavanjem 3% hidrogena na bakterijske kolonije, a pozitivna reakcija se očitava detekcijom mehurića kiseonika koji se oslobađaju (Slika 3.9).

#### **3.4.10. Stvaranje zelenog pigmenta - fluorescencija**

Stvaranje zelenog pigmenta praćeno je zasejavanjem ispitivanih izolata na King B podlogu i inkubacijom 48h na 26 °C. Stvaranje zelenog pigmenta koji se u podlozi fluorescira kada se ova podloga osvetli UV svetlom (230 V; 50 Hz) znak je pozitivnog testa (Slika 3.10).



**Slika 3.10.** Prisustvo zelenog pigmenta kod izolata P31 detektovano pod UV svetlom

### 3.5. Metode za identifikaciju *P. syringae* pv. *aptata*

#### 3.5.1. LOPAT testovi

##### 3.5.1.1 Stvaranje levana

Levani predstavljaju polifruktozna ekstracelularna jedinjenja koja nastaju razgradnjom saharoze uz pomoć enzima levan-saharaze. Dokazivanje levana se vrši zasejavanjem bakterija na mesopeptonsku podlogu sa saharozom (NSA). Bakterije koje formiraju levane imaju karakterističan izgled kolonija koji se ogleda u tome da su kolonije ispupčene, krupne, sjajne, glatke, neprovidne, sluzave, sa oblim obodom. Pozitivna kontrola u ovom testu bio je soj *P.syringae* pv. *aptata* CFBP2473 (Slika 3.11).

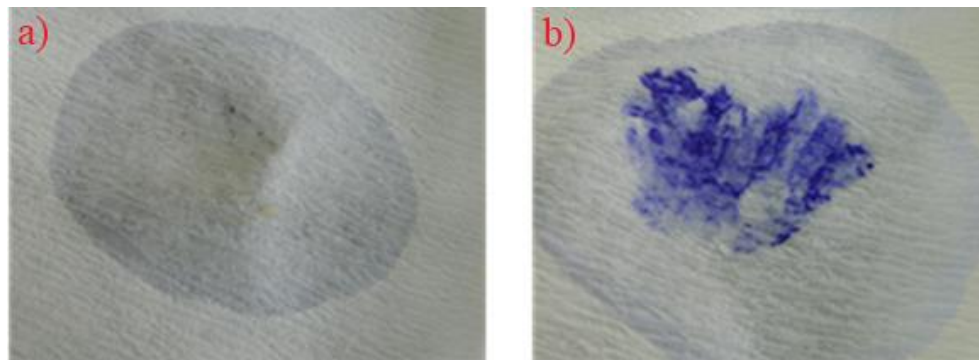


Slika 3.11. Izgled kolonija koje produkuju levane

##### 3.5.1.2. Oksidaza test

Aerobne bakterije imaju isključivo respiratorni katabolizam, čiji važan sastavni deo čine citohromi. Oksidaza test služi za dokazivanje prisustva citohroma *c* u respiratornom lancu, i to oksidacijom redukovane forme tetrametil-*p*-fenilendiamina koja je bezbojna, u ljubičastu oksidovanu formu. Potrebno je natopiti filterpapir reagensom za citohrom *c* i na njega bakteriološkom ezom naneti jednu koloniju i blago je razmazati. Pozitivna reakcija se očitava pojavom ljubičaste boje na filter papiru u

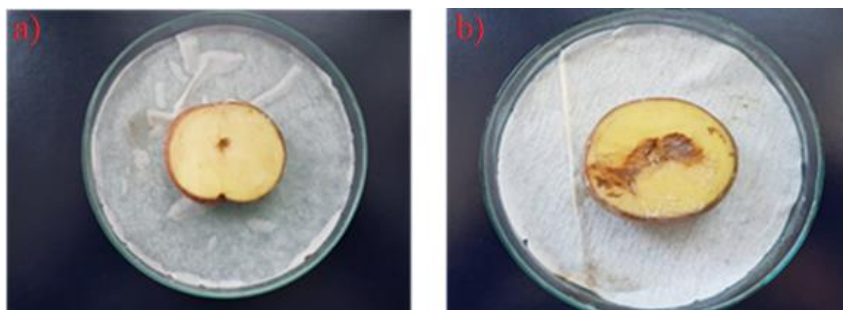
roku od 10 s od momenta nanošenja. Ako se promena boje pojavi nakon 10 s, to se smatra negativnom reakcijom (Slika 3.12).



**Slika 3.12.** Oksidaza test. a) negativna reakcija (izolat P12); b) pozitivna reakcija (*Pseudomonas fluorescens*)

### 3.5.1.3. Pektolitička aktivnost

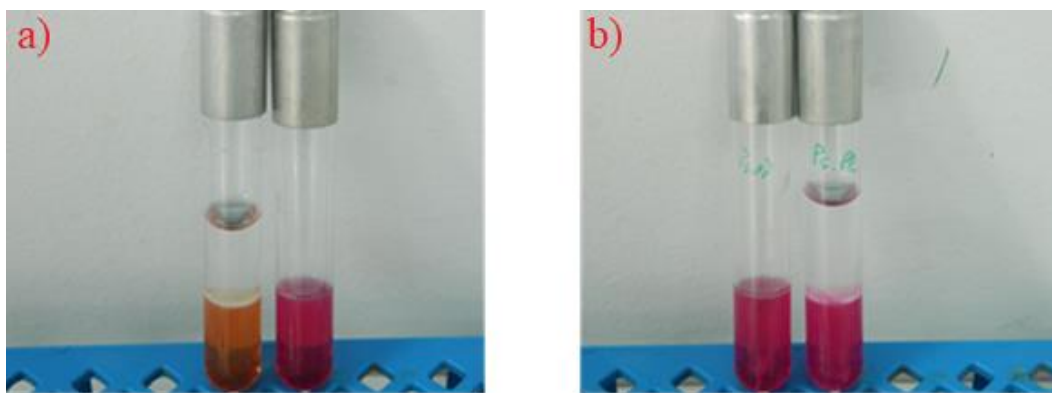
Određene bakterije imaju sposobnost da svojim enzimima, pektinazama, razlažu polisaharidno jedinjenje pektin koji je sastavni deo ćelijskog zida biljaka. Za ovaj test korišćene su krtolama krompira koje su isečene na kriške debljine 10 mm. U sredini kriški sterilnim bušačem napravljena su manja udubljenja u koja je nalivana suspenzija bakterija koncentracije  $10^8$  ćel./ml., starosti 24 sata. Ovako pripremljene kriške postavljene su sterilne Petri šolje, sa navlaženim filter papirom radi održavanja visoke vlažnosti. Očitavanje rezultata vršeno je nakon inkubacije 48 h na sobnoj temperaturi. Razmekšavanje tkiva znak je aktivnosti pektolitičkih fermenata (Slika 3.13).



**Slika 3.13.** Pektolitička aktivnost na krtolama krompira. a) negativna reakcija (izolat P74); b) pozitivna reakcija (*Bacillus amyloliquefaciens* SS-12.6)

### 3.5.1.4. Aktivnost arginin dehidrolaze

Sposobnost bakterija da koriste arginin kao izvor ugljenika i energije je uslovljena prisustvom enzima arginin dehidrolaze, čije je prisustvo ispitivano u ovom testu. U podlogu sa argininom ubodom bakteriološkom ezom su zasejavani ispitivani izolati, četiri epruvete za svaki izolat ponaosob. Nakon zasejavanja, dve epruvete su zalivene sterilnim parafinskim uljem, radi stvaranja anaerobnih uslova. Promena boje podloge u crveno-roze boju u epruvetama sa anaerobnim uslovima, označava pozitivnu reakciju (Slika 3.14).



**Slika 3.14.** Test za produkciju arginin dehidrolaze. a) negativna reakcija u epruveti zalivenoj parafinskim uljem (izolat P37); b) pozitivna reakcija (*Pseudomonas fluorescens*)

### 3.5.1.5 Hipersenzitivna reakcija (HR) na listovima duvana

Hipersenzitivna reakcija na listovima duvana (*Nicotiana tabacum* L.) vršena je pomoću medicinskog šprica inokulacijom suspenzije bakterija koncentracije  $10^7$  ćel./ml. u tkivo mezofila lista između dva bočna nerva. Kao pozitivna kontrola korišćen je referentni soj *P. syringae* pv. *aptata*CFBP2473. Negativnu kontrolu su predstavljali listovi duvana u koje je infiltracijom uneta destilovana voda. Rezultati su očitavani nakon 24 časa. Pojava nekroze inokulisanog tkiva mezofila lista duvana označavale su pozitivnu reakciju (Slika 3.15).



**Slika 3.15.** Hipersenzitivna reakcija na listovima duvana. a) izolat P16; b) referentni soj *P. syringae* pv. *aptata* CFBP2473; c) negativna kontrola (sterilna destilovana voda)

### 3.5.2. Molekularna metoda za identifikaciju *P. syringae* pv. *aptata*

#### 3.5.2.1. Izolacija ukupne DNK iz *P. syringae* pv. *aptata*

Ukupna genomska DNK je pripremljena prema modifikaciji postupka Ausubel et al. (1992). Kulture se uzgajaju na medijumu NSA tokom 24 h na 26°C. Bakterijske ćelije su isprane sterilnom destilovanom vodom i centrifugirane na 4000 g tokom 10 min na 4°C. Pelet je ispran dva puta u 0,85% NaCl i jednom u 0,1 M NaPO<sub>4</sub> puferu na pH 6,8. Ćelije su tretirane sa 10% natrijum dodecil sulfata (SDS) koji je rastvoren u sterilnoj vodi i inkubiran sa proteinazom K (20 mg/ml u 50% glicerolu) na 37°C tokom 1 h. DNK se dalje prečistila zagrevanjem rastvora 10% heksadeciltrimetil amonijum bromida (CTAB) u 1 M NaCl na 65°C tokom 10 minuta, nakon čega je usledila ekstrakcija hloroforma (800µl). DNK je precipitirana izopropanolom, isprana sa 1 ml 96% etanola, osušena na sobnoj temperaturi 45 minuta, rastvorena u Tris-EDTA (TE, 10 mM Tris, 1 mM EDTA i pH 8.0), kvantifikovana spektrofotometrijski na 260 nm i stokirana na -20°C.

#### 3.5.2.2. Umnožavanje *P. syringae* pv. *aptata*-specifičnih DNK fragmenata metodom PCR (Polymerase Chain Reaction)

Umnožavanje fragmenta *gyrB* gena, koji kodira sintezu enzima DNK žiraze subjedinica B, vršena je korišćenjem patovar-specifičnih prajmera Papt2F/1R (Cachatori, 2011). Nukleotidne sekvence prajmera prikazane su u Tabeli 3. Korišćeni prajmeri umnožavaju specifične sekvence (250 bp) *gyrB* gena koje su karakteristične za

*P. siringae* pv. *aptata*. Negativnu kontrolu predstavljao je soj *P. siringae* pv. *siringae* CFBP1582, dok su kao pozitivne kontrole korišćeni sojevi *P. siringae* pv. *aptata* PD163, PD193 i CFBP2473. Reakcije su izvedene u ukupnoj zapremini od 25 µl koja sadrži 1 x KAPA Taq mešavina [Taq DNA polimeraza, 0,5 U; 1 x KAPA Taq pufer; 0,2 mM svake dNTP; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> (KapaBiosystems)], 1 µM svakog prajmera i 40 ng ciljane DNK. Amplifikacija uzoraka izvedena je pomoću PCR aparata (model Mastercycler, Eppendorf, Nemačka) koristeći sledeću ciklusnu shemu:

- inicijalna denaturacija DNK, 2 min i 2 s na temperaturi od 94 °C;

- denaturacija, 30 s na temperaturi od 94 °C;	}	x 30
- hibridizacija, 30 s na temperaturi od 59,5 °C;		
- elongacija, 1 min na temperaturi od 72 °C;		

- finalna elongacija, 10 min na temperaturi od 72 °C.

### 3.5.2.3. Horizontalna elektroforeza DNK na agaroznom gelu

Elektroforeza totalne DNK i fragmenta DNK umnoženih PCR metodom je rađena na horizontalnim agaroznim gelovima. Gelovi su pravljani otapanjem agaroze u 0.5 x TBE puferu (45 mM Tris, 45 mM borna kiselina, 1 mM EDTA, pH 8.3) uz dodavanje etidijum bromida (0.5 µg/ml). Kao pufer za elektroforezu korišćen je, takođe, 0.5 x TBE pufer. Smeša od 5 µl uzoraka i 1,5 µl boje (Loading dye; Fermentas, Litvanija) su naliveni u 1% agarozne gelove, a elektroforeza je radila 1 h pri konstantnom naponu struje od 95 V. Vizuelizacija umnoženih fragmenata vršena je na UV transiluminatoru (LKB Brooma, Švedska). Nakon toga gelovi su fotografisani (DOC PRINT DP-001, FDC). Molekulska masa umnoženih DNK fragmenata određena je korišćenjem DNK markera (SmartLadder 200– 10000 bp; Eurogentec, Belgija).

**Tabela 3.3.** Spisak svih prajmera korišćenih u ovoj studiji, kao i njihove sekvence i broj nukleotida

Prajmer	Sekvenca	Dužina sekvence (nt)	pozicija (bp)
Papt2F	AGTCAGACCTTCACGCGCATCATCGCCA	28	250
Papt1R	ACACCAACAAAACACCGGTT	20	250
BoxAIR	CTACGGCAAGGCGACGCTGACG	22	100-3000
ERIC-IR	ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC	22	300-3000
ERIC-2	AAGTAAGTGACTGGGGTGTAGCG	23	300-3000
REP1R-I	IIICGICGICATCXGGC	18	250-3000
REP2-I	ICGICTTATCIGGCCTAC	18	250-3000
gyrBF	MGGCGGYAAGTTCGATGACAAYTC	24	610
gyrBR	TRATBKCAGTCARACCTTCRCGSGC	25	610
gapAF	CGCCATYCGCAACCCG	16	634
gapAR	CCCAATCGTTGTCGTACCA	19	634
rpoDF	AAGGCGARATCGAAATCGCCAAGCG	25	521
rpoDR	GGAACWKGCAGGAAGTCGGCACG	25	521
gltAF	AGTTGATCATCGAGGGCGCWGCC	22	556
gltAR	TGATCGGTTTGATCTCGCACGG	22	556
ctsF	CCCGTCGAGCTGCCAATWTTGCTGA	25	650
ctsR	ATCTCGCACGSGTRTTGAACATC	24	650
PsyF	ATGATCGGAGCGGACAAG	18	150
PsyR	GCTCTTGAGGCAAGCACT	18	150
PG1F	AGAACTTCTGTTGCTGACAGTACG	24	340
PG1R	CAATACCGTCATCGCGCTGGACA	23	340
PG2F	AGCAGCGATTTATTTTGTCTTGA	23	380
PG2R	ATGATCGCGTACCTGATGTC	20	380
PG3F	AAGCGTGCCAAAGAGCTTCT	20	860
PG3R	CTTGCCGAAGGTCATTGAC	20	860
PG4F	CACCTGACTTACTGATCAAT	20	880
PG4R	ACAGGCACGCATATATCGTT	20	880
ShcFF	CGACCTGCTTTCGATCA	17	850
ShcFR	TCAATACTCTGGAGATCAG	19	850
PG9F	CATTGCAGGAAGTATGATGAAC	20	490
PG9R	GGTTCAACTCTTCGAGACAA	20	490
PG10F	CACGACGACCTATATTGAAAAAAC	24	360
PG10R	CAGGGACCCATTTGCCGGTC	20	360
PG13F	GGATGTTCTACGACAACCTG	20	620
PG13R	AGCTGCGAGGTGACGTTTGA	20	620



### 3.6. Genetički diverzitet fitopatogena *P. syringae* pv. *aptata*

#### 3.6.1. Genetičko profilisanje

##### 3.6.1.1. Rep-PCR

Umnožavanje repetitivnih DNK sekvenci svih 104 izolata *P. syringae* pv. *aptata* vršen je primenom REP (repetitive extragenic palindromic), BOX (BOX A subjedinica BOX elementa *Streptococcus pneumoniae*) i ERIC (Enterobacterial repetitive intergenic consensus) prajmera (Louws et al., 1998; Versalovic et al., 1994). Amplifikacija je izvršena u ukupnoj zapremini od 25 µl koja sadrži 1 × KAPA Taq miks (1 × koncentrovani rastvor: Taq DNK polimeraza 0.5 U, KAPA Taq pufer, 0.2 mM svake dNTP, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, Kapa Biosystems, Ujedinjeno Kraljevstvo); 2 µM svakog prajmera i 40 ng ciljne DNK. Pozitivnu kontrolu su predstavljali referentni sojevi *P. syringae* pv. *aptata* PD163, PD193 i CFBP2473, a negativnu streilna destilovana voda. Umnožavanje DNK fragmenata je obavljeno u PCR aparatu (Eppendorf Master Cycler, Hamburg, Nemačka), po sledećim programima:

#### REP-PCR:

- inicijalna denaturacija DNK, 7 min na temperaturi od 95 °C;
  - denaturacija, 1 min na temperaturi od 95 °C;
  - hibridizacija, 30 s na temperaturi od 52 °C;
  - elongacija, 1 min na temperaturi od 72 °C;
  - finalna elongacija, 8 min na temperaturi od 65 °C.
- } x 35

#### BOX-PCR:

- inicijalna denaturacija DNK, 7 min na temperaturi od 95 °C;
  - denaturacija, 1 min na temperaturi od 95 °C;
  - hibridizacija, 30 s na temperaturi od 40 °C;
  - elongacija, 1 min na temperaturi od 72 °C;
  - finalna elongacija, 8 min na temperaturi od 65 °C.
- } x 30

## ERIC-PCR:

- inicijalna denaturacija DNK, 7 min na temperaturi od 95 °C;
  - denaturacija, 1 min na temperaturi od 95 °C;
  - hibridizacija, 30 s na temperaturi od 52 °C;
  - elongacija, 1 min na temperaturi od 72 °C;
  - finalna elongacija, 8 min na temperaturi od 65 °C.
- } x 30

Dobijeni PCR produkti su razdvojeni elektroforezom na 1,5 % agaroznom gelu u 0,5 x TBE puferu uz dodavanje etidijum bromida (0.5 µg/ml). Smeše od 5 µl uzorka i 1,5 µl boje (Loading dye, Fermentas, Litvanija) nanošene su na gel. Elektroforeza je tekla pri konstantnom naponu struje od 95 V u trajanju od 2,5 sata. Vizuelizacija umnoženih fragmenata vršena je na UV transiluminatoru (LKB Brooma, Švedska). Nakon toga gelovi su fotografisani (DOC PRINT DP-001, FDC). Molekulska masa umnoženih DNK fragmenata određena je korišćenjem DNK markera (SmartLadder 200– 10000 bp; Eurogentec, Belgija).

Softver PyElph v. 1.4 korišćen je za procenu položaja traka Rep-PCR amplifikona, kao i za stvaranje filogenetskog stabla. Distanca na osnovu migracije svih traka korišćena je za izračunavanje matrice sličnosti pomoću Dice-ovog koeficijenta, koji izražava nivo sličnosti između svih DNK profila. Filogenetsko stablo je napravljeno UPGMA metodom (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean).

### 3.6.1.2. Elektroforeza u pulsirajućem polju (PFGE)

Gel elektroforeza pulsirajućeg polja izvedena je sa 25 reprezentativnih izolata odabranih na osnovu Rep-PCR metoda prema protokolu opisanom u studiji Kojić et al. (2006). Referentni sojevi korišćeni u ovom testu su bili PD163, PD193 i CFBP2473. Čelije su gajene u LB medijumu na 25 °C (rana logaritamska faza) tokom tri sata i centrifugirane na  $15000 \times g$  u trajanju od 1 min, a zatim isprane pomoću EET pufera (100 mM EDTA (SERVA), 10 mM EGTA (SERVA), 10 mM Tris-HCl, pH 8.0) i ponovo suspendovani u istom puferu da bi se dobilo  $1 \times 10^9$  ćel/ml koje su određene

spektrofotometrijski ( $OD_{610}$ ). Suspenzija ćelije je zagrejana do 42 °C, nakon čega je pomešana sa jednakim zapreminom prethodno zagrejanog rastvora od 2% m/v SeaPlaque GTG agaroze u EET puferu (FMC BioProducts, Rockland, USA). Ova smeša je sipana u blokove agaroze od 100  $\mu$ l, koji su ostavljeni da se stegnu na 4 °C. Inkubacija sa stresanjem blokova agaroze sa ugrađenim ćelijama vršena je 30 minuta na 50 °C u 10 zapremina EET pufera koji sadrži SDS (0,5% m/v) i proteinazu K (0,5 mg/ml). Zatim su blokovi agaroze isprani dva puta u 100 zapremina TE pufera (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) i dva puta u sterilnoj destilovanoj vodi (SDV) koja sadrži 0.1 mM PMSF (fenilmetilsulfonil fluorid), svaki put za 30 min na sobnoj temperaturi. Pripremljeni agarozni blokovi su iseckani skalpelom i svaki komad je inkubiran 30 min u 500  $\mu$ l TANGO pufera (33 mM Tris-acetat pH 7,9 na 37 °C, 10 mM magnezijum acetat, 66 mM kalijum acetat, 0,1 mg/ml BSA ) na 4 °C. Posle toga, pufer je uklonjen i zamenjen je novim TANGO puferom (100  $\mu$ l) koji sadrži 20 jedinica *SpeI* restrikcionog enzima. DNK digestija restrikcionim enzimom je izvedena u trajanju od 3 h na 35 °C. Stop rastvor (40% m/v saharoze, 10 mM EDTA, 0.01% (m/v) bromofenol plava, pH 8.0) je korišćen za zaustavljanje digestije i uzorci su držani na 4 °C, sve do analize rezultata. PFGE je obavljen sa Pulsafor jedinicom 2015 (LKB Instruments, Broma, Švedska) opremljen nizom heksagonalnih elektroda. Razdvajanje DNK fragmenata vršeno je na agaroznim gelovima (1.2% m/v) u puferu 0,5  $\times$  TBE (45 mM Tris, 45 mM borna kiselina, 1 mM EDTA, pH 8.3) tokom 15 sati na 300 V na 9 °C. Vreme pulsiranja je linearno povećavano sa 8 na 19 s tokom elektroforeze. Gelovi su obojeni etidijum bromidom (10 mM) i fotografisani pod UV osvetljavanjem ( $\lambda = 260$  nm). Konkatameri Lambda faga su korišćeni kao markeri veličine molekula i pripremljeni prema protokolu Waterbury & Lane (1987).

Softver PyElph v. 1.4 korišćen je za analizu PFGE agaroznih gelova, kao i za formiranje filogenetskog stabla. Distanca na osnovu migracije svih traka korišćena je za izračunavanje matrice sličnosti pomoću Dice-ovog koeficijenta, koji izražava nivo sličnosti između svih DNK profila. Filogenetsko stablo je napravljeno UPGMA metodom (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean).

### 3.6.2. Analiza sekvenci sa više genskih lokusa (Multi-Lokus Sequence Analysis)

Analiza multilokusne sekvence (MLSA) izvedena je sa 25 reprezentativnih izolata *P. syringae* pv. *aptata* odabrana na osnovu rezultata dobijenog korišćenjem Rep-PCR metode, i tri referentna soja (PD163, PD193 i CFBP2473) na četiri "housekeeping" gena (*gyrB*, *rpoD*, *gapA* i *gltA*), koji kodiraju DNK žirazu B, sigma faktor 70, gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazu i citrat sintazu. Frakcije gena su amplifikovane pomoću prajmera (Tabela 3) opisanih od strane Sarkar & Guttman (2004), a prema PCR proceduri koju su opisali Ferrante & Scortichini (2010). Amplifikacija je izvršena u ukupnom reakcionom volumenu od 25 ul, koja sadrži 1 × KAPA Taq miks (1 × koncentrovani rastvor: Taq DNK polimeraza 0,5 U; KAPA Taq pufer, 0,2 mM svake dNTP i 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; Kapa Biosystems, Velika Britanija), 1 μM svakog prajmera i 40 ng DNK. Amplifikacija PCR-a obavljena je sa aparatom Mastercycler (Eppendorf, Hamburg, Nemačka) koristeći sledeće programe:

- *gyrB* i *rpoD* gen
  - inicijalna denaturacija DNK, 2 min i 30 s na temperaturi od 94 °C;
  - denaturacija, 30 s na temperaturi od 94 °C;
  - hibridizacija, 1 min na temperaturi od 63 °C;
  - elongacija, 1 min na temperaturi od 72 °C;
  - finalna elongacija, 7 min na temperaturi od 72 °C.
  
- *gapA* i *gltA* gen
  - inicijalna denaturacija DNK, 2 min i 30 s na temperaturi od 94 °C;
  - denaturacija, 30 s na temperaturi od 94 °C;
  - hibridizacija, 1 min na temperaturi od 63 °C;
  - elongacija, 1 min na temperaturi od 72 °C;
  - finalna elongacija, 7 min na temperaturi od 72 °C.

Amplifikovani DNK fragmenti za sva 4 gena su sekvencionirani. Svi amplikoni su sekvencionirani u MacroGen Inc. (Južna Koreja) koristeći iste prajmere koji su korišćeni za amplifikaciju. Sekvence sojeva *P. syringae* pv. *syringae* NCPPB28

i *P. syringae* pv. *atrofaciens* DSM5025 su preuzete iz baze podataka o mikroorganizmima koji su u interakciji sa biljkama (Plant Associated and Environmental Microbes Database) i uključeni u analizu lančanih sekvenci, kako bi se utvrdile genetske razlike unutar filogenetskih grupa. *Pseudomonas syringae* pv. *actinidae* FTRS LI, koja spada u različitu *P. syringae* filogenetsku grupu, korišćena je kao "outgroup" za ukorenjivanje filogenetskog stabla. Godina izolacije i domaćin sa kog su izolovani referentni sojevi uključeni u filogenetske analize prikazani su u Tabeli 2. Dobijene sekvence svih testiranih sojeva su deponovane u banci gena u okviru Nacionalnog Centra za Biotehnoške Informacije (NCBI) pod sledećim pristupnim šiframa: *gyrB* (KJ950024–KJ950027 i KM282292–KM282312), *rpoD* (KM386830–KM386833 i KM282313–KM282333), *gapA* (KM386834–KM386837 i KM282334–KM282354), i *gltA* (KM386838–KM386841 i KM282355–KM282375).

Sekvence su editovane pomoću softverskog paketa Finch TV v. 1.4.0 (Geospiza Inc.) i prilagođene programom Clustal W integrisanim u softver MEGA 6. MLSA pojedinačnih gena i svih gena zajedno u vidu lančanih sekvenci korišćeni su za konstrukciju filogenetskih dendrograma u MEGA 6 korišćenjem *P*-distance i Neighbour-joining metode. Procenat replikatnih stabala u kojima su taksoni grupisani zajedno "bootstrap" testom (3000 replikata) prikazana je pored grana.

### **3.7. Filogenetski status izolata *P. syringae* pv. *aptata* u okviru *P. syringae* kompleksa**

#### **3.7.1. Multiplex-PCR**

Metoda Multiplex-PCR je korišćena za brzu detekciju filogenetske grupe kojoj pripadaju svih 104 izolata *P. syringae* pv. *aptata*, a u okviru *P. syringae* kompleksa. Prajmeri za 9 filogenetskih grupa su korišćeni na osnovu studije Bartoli et al. (2014) i njihove sekvence su prikazane u Tabeli 3.4. Referentni sojevi korišćeni kao pozitivne kontrole za svaku filogenetsku grupu prikazani su u Tabeli 5. Amlifikacija Multiplex-PCR je vršena korišćenjem 6,25 µl 2 x QIAGEN Multiplex-PCR Master Mix (Qiagen® Multiplex-PCR kit, Les Ulis, Francuska), 1,25 µl prajmera (koncentracija od 2 mmol/l po prajmeru), 1,25 µl Q rastvora, 2,75 µl milliQ vode i 2 µl bakterijske

suspencije koncentracije  $10^8$  ćel/ml. Konačna zapremina za multiplex-PCR je 11,5  $\mu$ l. Uzimajući u obzir veličine amplikona (Tabela 2), dve Multiplex-PCR reakcije su vršene: "Multiplex 1" koji sadrži univerzalni par prajmera Psi i prajmere specifične za filogrupu 1 (FG1), filogrupu 3 (FG3) i filogrupu 9 (FG9) i "Multiplex 2" koji sadrži par prajmera Psi i prajmere specifične za filogrupu 2 (FG2), filogrupu 4 (FG4) i filogrupu 13 (FG13).

Amplifikacija je vršena na osnovu sledećeg PCR programa:

- inicijalna denaturacija DNK, 15 min na temperaturi od 95 °C;
  - denaturacija, 30 s na temperaturi od 94 °C;
  - hibridizacija, 1 min i 30 s na temperaturi od 61 °C;
  - elongacija, 1 min i 30 s na temperaturi od 72 °C;
  - finalna elongacija, 10 min na temperaturi od 72 °C
- } x 30

Amplifikacija Multiplex-PCR za filogrupe 7, 8 (FG7 i FG8) i 10 (FG 10) vršena je u ukupnoj finalnoj zapremini od 25  $\mu$ l, korišćenjem 5  $\mu$ l 5 x Green Go Taq Flexi Buffer (Promega, USA), 2  $\mu$ l  $MgCl_2$  (25 mM), 0,2  $\mu$ l dNTP (25 mM each), 13,67  $\mu$ l milliQ vode, 0,13  $\mu$ l GoTaq G2 Flexi DNA polimeraza (5 U/ $\mu$ l ), 2  $\mu$ l prajmera SchA za FG7/FG8, odnosno 2  $\mu$ l prajmera PG 10 za FG 10, i 2  $\mu$ l bakterijske suspencije koncentracije  $10^8$  ćel/ml.

Amplifikacija je vršena na osnovu sledećeg PCR programa:

- inicijalna denaturacija DNK, 4 min na temperaturi od 94 °C;
  - denaturacija, 30 s na temperaturi od 94 °C;
  - hibridizacija, 30 s na temperaturi od 54 °C;
  - elongacija, 1 min na temperaturi od 72 °C;
  - finalna elongacija, 10 min na temperaturi od 72 °C
- } x 30

Proizvodi PCR-a su migrirali na 80V u 1,5% agaroznom gelu koji sadrži etidijum bromid (BET) (Euromedek, EU0070) u koncentraciji od 0,5 µg/ml. Vreme migracije umnoženih fragmenata varira u zavisnosti od veličine PCR-a amplikona, u našem slučaju je trajala 45 min. Posle migracije, proizvodi PCR-a su vizualizirani pod UV svetlom (320 nm).

**Tabela 3.4.** Referentni sojevi korišćeni u filogenetskim analizama u okviru *P. syringae* kompleksa.

Naziv soja	Šifra	Filogenetska grupa	Domaćin/habitat	Zemlja porekla	Godina izolacije
<i>P. syringae</i>	USA0007	1	Voda	USA	2007
<i>P. syringae</i>	CC0094	2	Dinja ( <i>Cucumis melo</i> L.)	Francuska	1997
<i>P. syringae</i>	1448a	3	Epilitički biofilm	Francuska	2005
<i>P. syringae</i>	CC1513	4	Alpsko bilje ( <i>Hornungia alpine</i> L.)	Francuska	2006
<i>P. syringae</i>	TA0043	7/8	Jagorčevina ( <i>Primula vulgaris</i> L.)	Francuska	2007
<i>P. syringae</i>	CC1418	9	Epilitički biofilm	USA	2004
<i>P. syringae</i>	USA0032	10	Voda	USA	2007
<i>P. syringae</i>	UB246	13	Voda sa Alpskih potoka	Francuska	2006

### 3.7.2. Sekvenciranje *cts* gena i filogenetska analiza

Umnožavanje DNK fragmenata *cts* gena, koji je odgovoran za sintezu citrat sintaze, vršeno je na 20 izolata *P. syringae* pv. *aptata* odabranih na osnovu genetičkog fingerprinting-a urađenog BOX-PCR prajmerima. Amplifikacija fragmenata *cts* gena vršena je u ukupnoj finalnoj zapremini od 25 µl, korišćenjem 5 µl 5 x Green Go Taq Flexi Buffer (Promega, USA), 2 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 0,5 µl dNTP (25 mM each), 13,37 µl milliQ vode, 0,13 µl GoTaq G2 Flexi DNA polimeraze (5 U/µl), 1 µl Cts prajmera

(koncentracija 10 pmol/ $\mu$ l) i 2  $\mu$ l bakterijske suspenzije koncentracije  $10^8$  ćel/ml. Amplifikacija je vršena na osnovu sledećeg PCR programa:

- inicijalna denaturacija DNK, 5 min na temperaturi od 96 °C;
  - denaturacija, 30 s na temperaturi od 94 °C;
  - hibridizacija, 1 min i 30 s na temperaturi od 58 °C;
  - elongacija, 2 min na temperaturi od 72 °C;
  - finalna elongacija, 7 min na temperaturi od 72 °C
- } x 35

Proizvodi PCR-a su migrirali na 80V u 1,5% agaroznom gelu koji sadrži etidijum bromid (BET) (Euromedek, EU0070) u koncentraciji od 0,5  $\mu$ g/ml. Vreme migracije umnoženih fragmenata trajalo je 45 min. Posle migracije, proizvodi PCR-a su vizualizirani pod UV svetlom (320 nm). Amplifikovani DNK fragmenti *cts* gena su sekvencionirani. Svi amplikoni su sekvencionirani u Macrogen Inc. (Južna Koreja) koristeći iste prajmere koji su korišćeni za amplifikaciju.

Sekvence *cts* gena su editovane pomoću softverskog paketa Chromas v. 2.5 (Technelysium Pty Ltd.; Australia) i poravnate programom Clustal W integrisanim u softver DAMBE (Xia & Xie, 2001). Sekvence *cts* gena svih 20 izolata *P. syringae* pv. *aptata* iz naše kolekcije i zajedno sa sekvencama 59 sojeva *P. syringae* koji obuhvataju sve filogenetske grupe u okviru *P. syringae* kompleksa korišćeni su za konstrukciju filogenetskih dendrograma u MEGA 6 softveru korišćenjem *P*-distance i Neighbour-joining metode. Topologija stabala je ocenjena "bootstrap" testom sa 3000 ponavljanja. Sekvence sojeva *Pseudomonas graminis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas rhizophraerae* i *Pseudomonas protegens* su korišćene kao "outgroup".

### 3.8. Patogene karakteristike izolata *P. syringae* pv. *aptata*

#### 3.8.1. Test patogenosti

Ispitivanje patogenosti obuhvatilo je korišćenje biljaka šećerne repe starosti 3 nedelje (sorte: Marinela, Serenada, Jasmina i Lara). Svaka testirana biljka bila je u fazi razvijenog prvog para listova. Biljke su tretirane metodom raspršivanja sa  $10^8$

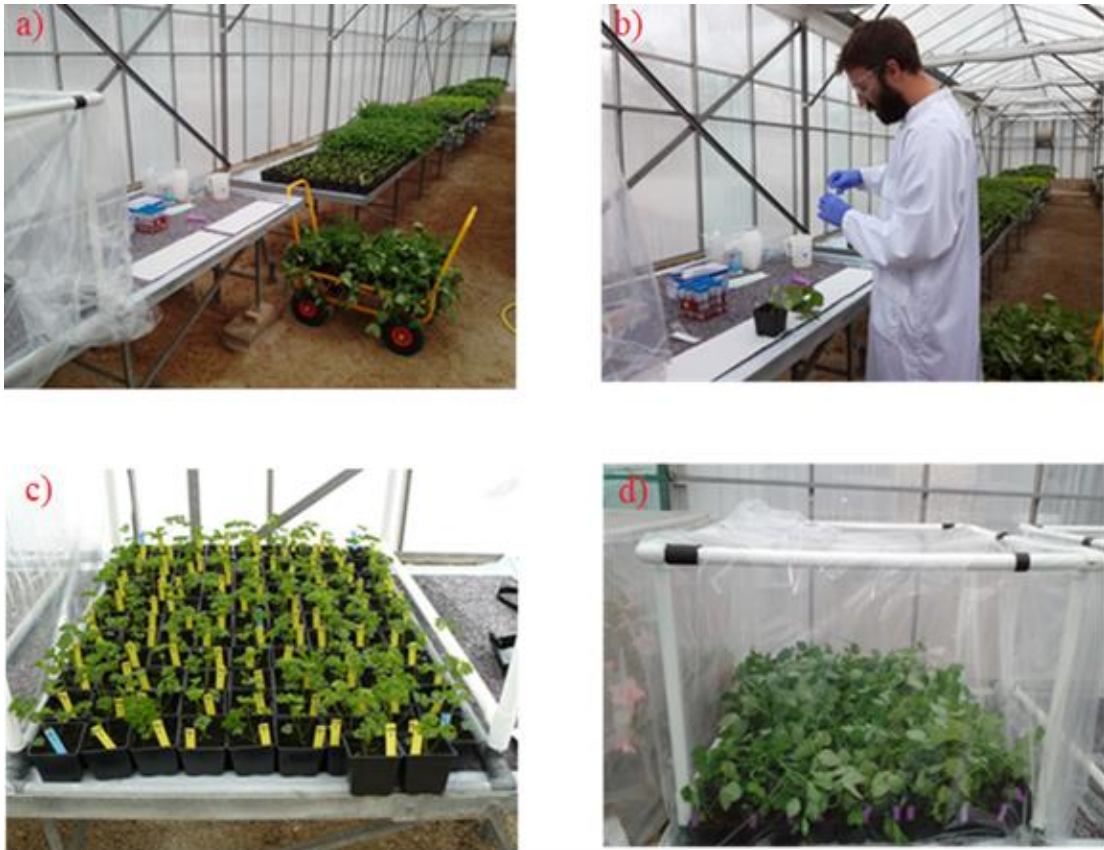


ćel/ml suspenzije kulture *P. syringae* pv. *aptata* prethodno uzgajane 24 h na NSA medijumu na temperaturi 26 °C. Bakterijske ćelije su suspendovane u sterilnoj destilovanoj vodi. Sojevi *P. syringae* pv. *aptata* CFBP2473 i PD193 su korišćeni kao pozitivna kontrola, a sterilna destilovana voda kao negativna kontrola. Svaka sorta je tretirana sa 25 reprezentativnih izolata u četiri replikacije i dva nezavisna ponavljanja. Inokulisane biljke su držane u plastičnim kutijama u komori za rast biljaka pod uslovima od 80-100% relativne vlažnosti,  $22 \pm 1$  °C, i fotoperioda od 12 sati (12 sati dan i 12 sati noć). Ispitivanje razvoja simptoma obavljeno je tokom perioda od 2 nedelje. Kao eksperimentalni dizajn za test patogenosti korišćen je randomizovani kompletni blok dizajn (Randomized Complete Block Design). Stepen infekcije je ocenjivan u nedeljnim intervalima (7 i 14 dana nakon inokulacije) na skali od 1-6 (1 = nema simptoma, 2 = 1-10%, 3 = 11-25%, 4 = 26-50%, 5 = 51-75% i 6 = 76-100% nekroze listova) da bi se utvrdila infekcija pojedinačnih listova i izračunala prosečna infekcija cele biljke (Griesbach & Tirach, 1999).

### 3.8.2. Utvrđivanje opsega potencijalnih domaćina izolata *P. syringae* pv. *aptata*

Određivanje opsega potencijalnih domaćina vršeno je primenom testa patogenosti na 16 različitih biljnih vrsta, pre svega povrtarskih i ratarskih kultura, iz 9 različitih biljnih familija (Tabela 3.5). Ukupno 20 izolata *P. syringae* pv. *aptata* je testirano u ovom ogledu, koji je vršen na svim biljkama u 5 ponavljanja. Sve biljke korišćene u ovom ogledu su bile starosti 4 sedmice u momentu inokulacije (Slika 3.16a). Inokulacija je vršena bakterijskom suspenzijom  $10^8$  ćel/ml, koja je određivana spektrofotometrijski na optičkoj gustini 580 nm. Inokulacija je vršena sa 10 µl bakterijske suspenzije medicinskim špricom (bez igle) i to na naličju svakog lista (Slika 3.16b). Pre inokulacije nanošena je rana plastičnim štapićem na površini lista, s ciljem da se suspenzija što efikasnije ubaci u apoplast. Inokulisan je po jedan list na svakoj biljci. Biljke su se nalazile u stakleniku u kutijama za inkubaciju koje obezbeđuju visoku vlažnost vazduha (80%) i na temperaturi od 25 °C (Slika 3.16 c i d). Relativna vlažnost vazduha i temperatura mereni su termo-higrometrom (model: HANA Hi 9564; Rumunija). Virulencija i agresivnost izolata su ocenjivani u dva intervala (48 h i 6 dana nakon inokulacije). Virulencija na različitim domaćinima se ocenjivala primenom

binarnog koda (1 = izaziva bolest; 0 = ne izaziva bolest), dok se agresivnost se merila na skali od 0-6 (0 = nema simptoma, 1 = slabi simptomi bez nekroze, 2 = nekroza prisutna samo na mestu inokulacije i ne širi se, 3 = do 25% lisne površine pod nekrozom, 4 = 26-50% nekroze, 5 = više od 50% nekroze listova i 6 = uvenuće celog lista).



**Slika 3.16.** Testiranje opsega domaćina izolata *P. syringae* pv. *aptata*. a) priprema biljaka za inokulaciju b) inokulacija biljaka c) postavljanje inokulisanih biljaka kutije d) pokrivanje kutija plastičnim celofanom koji omogućava visoku vlažnost vazduha

**Tabela 3.5.** Prikaz nazivabiljne vrste, latinskog naziva, sorte i familije biljaka koje su korišćene u testiranju opsega potencijalnih domaćina izolata *P. syringae* pv. *aptata*.

Naziv vrste	Latinski naziv vrste	Sorta	Familija
Šećerna repa	<i>Beta vulgaris</i> L.	Sucrière ardant	Amaranthaceae
Blitva	<i>Beta vulgaris</i> var. <i>cicla</i>	Testrel	Amaranthaceae
Cvekla	<i>Beta vulgaris</i> ssp. <i>vulgaris</i>	Verte à carde blanche sel Bressane	Amaranthaceae
Spanać	<i>Spinacia oleracea</i> L.	Andros	Amaranthaceae
Crni luk	<i>Allium cepa</i> L.	Jaune paille	Alliaceae
Peršun	<i>Petroselinum crispum</i>	Géant d'Italie	Apiaceae
Zelena salata	<i>Lactuca sativa</i> L.	Mantilia	Asteraceae
Kupus	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i> L.	De Mila Pontoise	Brassicaceae
Dinja	<i>Cucumis melo</i> var. <i>cantalupensis</i>	Margot	Cucurbitaceae
Krastavac	<i>Cucumis sativus</i> L.	Marketer	Cucurbitaceae
Tikvica	<i>Cucurbita pepo</i> var. <i>pepo</i>	Tigress F1	Cucurbitaceae
Lubenica	<i>Citrullus lanatus</i> (Thunb) Matsum. & Nakai	Sugar Baby	Cucurbitaceae
Muškatla	<i>Pelargonium hortorum</i>	Rouge	Geraniaceae
Grašak	<i>Pisum sativum</i> L.	Douce Provence	Fabaceae
Paprika	<i>Capsicum annuum</i> L.	Milord	Solanaceae
Paradajz	<i>Solanum lycopersicum</i> L.	Monalbo	Solanaceae

### 3.9. Biološka kontrola fitopatogena *P. syringae* pv. *aptata*

Biološka kontrola sa ćelijskom kulturom soja *Bacillus amyloliquefaciens* SS-12.6 protiv dva soja *P. syringae* pv. *aptata* (P53 i CFBP2473) je testirana na listovima četiri sorte šećerne repe, Marinela, Serenada, Jasmina (KWS, Nemačka) i Lara (NS Seme, Srbija). Semena su sterilisana 10 minuta u 0,3% (v/v) natrijum hipohlorita, isprana četiri puta u sterilnoj destilovanoj vodi i čuvana na 4 °C tokom 48h. Posle 48h semena su stavljena u plastične posude veličine 10 cm i inkubirane u

klimatskoj komori na 23 °C sa fotoperiodom od 12 h svetlosti i 12 h tame u trajanju od 4 nedelje. Biljke šećerne repe u starosti 28 dana su inokulisane direktno u petiole iznad listne ploče sa mešovitim ćelijskim kulturama *P. siringae* pv. *aptata* i *B. amyloliquefaciens* SS-12.6 u razmeri 1:4 (v/v). Koncentracije bakterijske suspenzije sojeva P53, CFBP2473 i SS-12.6 bile su  $10^7$  ćel/ml. Biljke su inokulirane samo sa patogenom (P53 ili CFBP2473) kao negativnom kontrolom. Takođe, biljke su inokulisane samo sojem *B. amyloliquefaciens* SS-12.6, u cilju provere efekta biokontrolnog agenta na biljno tkivo. Za jedan eksperiment korišćeno je 60 biljaka, gde su inokulacije izvedene u tri ponavljanja i eksperiment je ponovljen dva puta. U svakoj injekciji, dodato je 10 µL mešane suspenzije, i biljke su inkubirane 7 dana u klimatskoj komori na 23 °C sa veoma visokom vlažnošću (90%) i fotoperiodom koji se sastoji od 12 sati svetlosti i 12 sati tame. Nakon inkubacionog perioda, intenzitet bolesti je ocenjen na skali od 1 do 6 (1 = bez simptoma, 2 = 1-10%, 3 = 11-25%, 4 = 26-50%, 5 = 51-75% i 6 = 76-100% nekroze listova). Intenzitet bolesti kod pojedinačnih listova i prosečne infekcije cele biljke izračunat je prema Griesbach & Tirach (1999).

### 3.10. Statističke analize

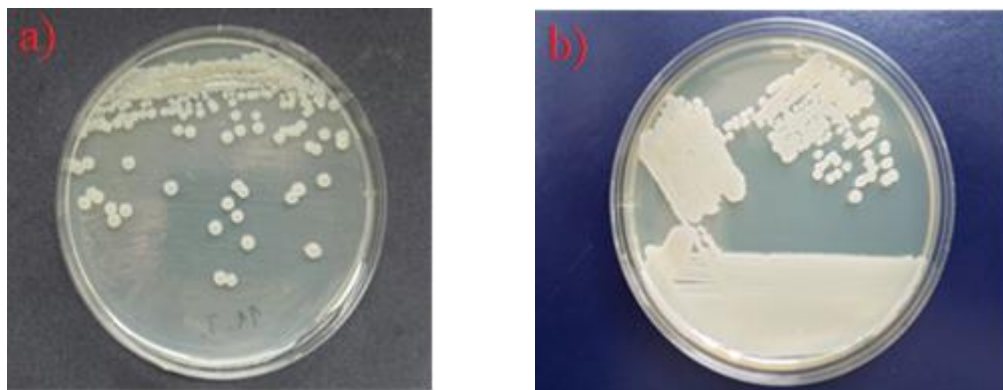
Analiza varijanse u okviru testa patogenosti, kao i u okviru testa biološke kontrole, podržana je neparametarskim Kolmogorov-Smirnovim testom za proveru normalnosti i Levenovim testom za homogenost varijanse. Prosečne vrednosti dva nezavisna eksperimenta su bili podvrgnuti analizi varijanse (ANOVA), a izdvajanje procentualnih srednjih vrednosti patogenosti 25 reprezentativnih izolata *in planta* postignuto je korišćenjem Tukey testa značajnosti (HSD). Rezultati su smatrani signifikantnim u slučaju kada je  $P < 0.05$ . Statističke analize su sprovedene korišćenjem softvera Statistica v.7 (StatSoft, Inc.; USA) i SPSS STATISTICS v. 20 (SPSS, Inc.; USA).

# REZULTATI

## 4. REZULTATI

### 4.1. Morfološke, biohemijske i fitopatološke karakteristike izolata

Izolacija čistih kultura bakterija vršena je zasejavanjem na mesopeptonsku podlogu sa saharozom (NSA) i King B podlogu. Formirane kolonije na podlozi sa saharozom su bile beličaste, izrazito ispupčene, kupolastog oblika zbog prisustva levana, glatke, sjajne, neprovidne, prečnika od 1-3 mm (Slika 4.1a). Kolonije gajene na King B podlozi su bile bele, okrugle, blago ispupčene, sjajne, neprovidne, ravnih ivica, blago fluorescentne na prirodnoj svetlosti i prečnika 0,5 – 1,5 mm (Slika 4.1b). Na ovaj način ukupno je izolovano 104 bakterijska izolata



**Slika 4.1.** Izgled kolonija bakterijskih sojeva izolovanih sa zaraženih listova šećerne repe. a) izgled kolonija na NSA podlozi; b) izgled kolonija na King B podlozi

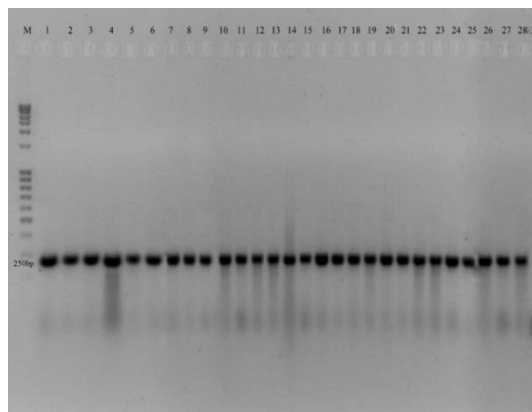
U cilju određivanja biohemijskih odlika 104 izolata, vršena je serija *in vitro* testova. Svi testirani sojevi okarakterisani su kao Gram negativne štapičaste bakterije, koje imaju sposobnost hidrolize želatina, hidrolize eskulina, produkuju  $H_2S$ , imaju oksidativni metabolizam za razlaganje glukoze, poseduju enzim katalazu, ne produkuju indole i ne vrše hidrolizu skroba (Prilog 3). Produkcija zelenog pigmenta rezultirala je fluorescencijom kod ukupno 51 izolata, dok 53 izolata nisu fluorescirala (Prilog 3).

Identifikacija izolata poreklom sa nekrotičnih listova šećerne repe započeta je baterijom testova (LOPAT) koja uključuje testove za produkciju levana, aktivnost

oksidaze, prisustvo pektolitičke aktivnosti, prisustva arginin dehidrolaze i hipersenzitivne reakcije na listovima duvana. Na osnovu LOPAT testova svi izolati koji su testirani, svrstani su u LOPAT Ia grupu (Prilog 4). Svi testirani sojevi su na NSA podlozi imali karakteristične kolonije levan tipa, koje su bile beličaste, izrazito ispupčene, kupolastog oblika, glatke, sjajne i neprovidne. Testiranjem prisustva oksidaze pokazano je da testirani izolati nisu doveli do promene boje na natopljenom filter papiru, što znači da ne poseduju citohrom c u svom respiratornom lancu. Testirani izolati nisu pokazali pektolitičku aktivnost, što ukazuje na to da ne produkuju enzim pektinazu, kao ni arginin dehidrolazu usled čega nije došlo ni do razlaganja arginina kao dodatnog izvora ugljenika. Svi testirani izolati su izazvali hipersenzitivnu reakciju tj. pojavu nekroze mezofila listova biljaka duvana.

#### 4.2. Patovar specifična molekularna identifikacija

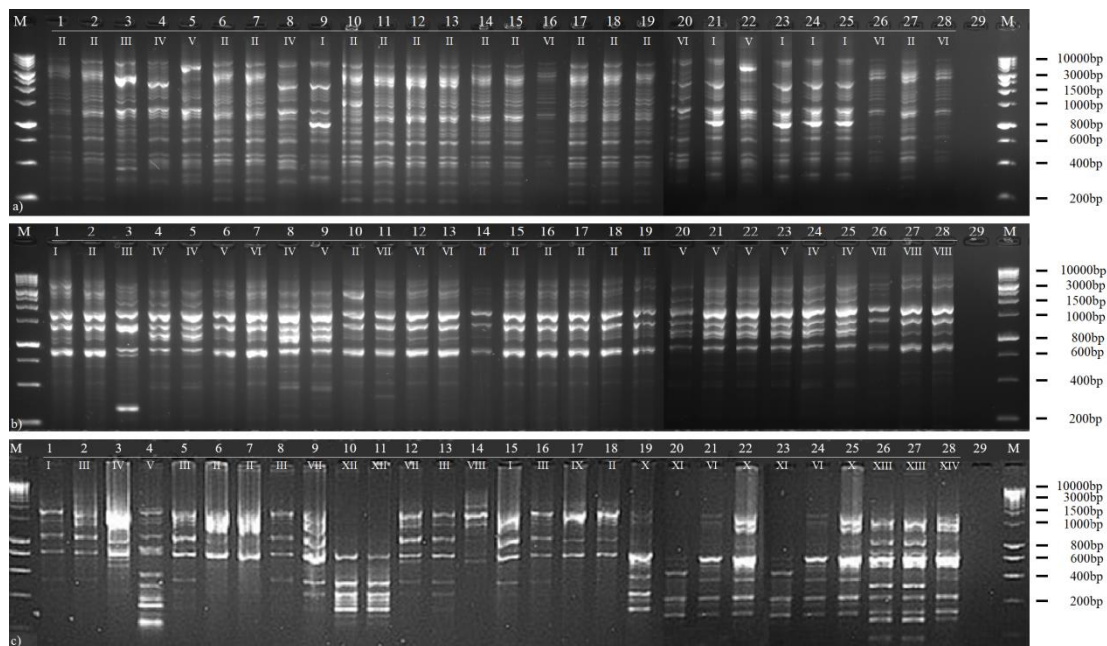
Papt2F/1R prajmeri, specifični za patovar aptata, korišćeni su u PCR reakciji sa izolovanom totalnom DNK iz 104 izolata. Iz DNK svih izolata umnožena je specifična traka dužine 250 bp (Prilog 4). Kada je korišćena DNK izolovana iz *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* CFBP1582, koja je predstavljala negativnu kontrolu, fragment od 250 bp je izostao (Slika 4.2).



**.Slika 4.2.** Amplifikovani specifični DNK fragmenti za 25 izolata *P. syringae* pv. *aptata* iz sakupljene kolekcije: M) SmartLadder 200 – 10000 bp; 1) P4; 2) P12; 3) P16; 4) P18; 5) P26; 6) P31; 7) P37; 8) P40; 9) P49; 10) P50; 11) P52; 12) P53; 13) P57; 14) P61; 15) P63; 16) P73; 17) P74; 18) P93; 19) P94; 20) P95; 21) P96; 22) P97; 23) P100; 24) P102; 25) P103; 26) referentni soj PD163; 27) referentni soj PD193; 28) referentni soj CFBP2473; 29) *P. syringae* pv. *syringae* CFBP1582

### 4.3. Genetički diverzitet *P. syringae* pv. *aptata*

Genetički diverzitet određen je primenom metode umnožavanja repetitivnih DNK sekvenci. Genetičko profilisanje korišćenjem Rep-PCR je urađeno je za sve izolate iz kolekcije (Prilozi 5, 6 i 7). Na osnovu vizuelno određenih genetičkih distanci između dobijenih profila korišćenjem BOX prajmera dobijeno je 12 grupa, REP prajmeri izdvojili su 7 različitih vrsta profila, dok su ERIC prajmeri diskriminisali 6 grupa različitih profila. Filogenetska stabla konstruisana metodom UPGMA na osnovu poređenja svih ERIC, REP i BOX genetičkih profila su data u prilogu 8., a pripadnost svakog izolata određenoj grupi profila je prikazana u Prilogu 9. U svakoj od dvadeset i pet grupa različitih profila izabran je po jedan reprezentativni izolat (Slika 4.3).

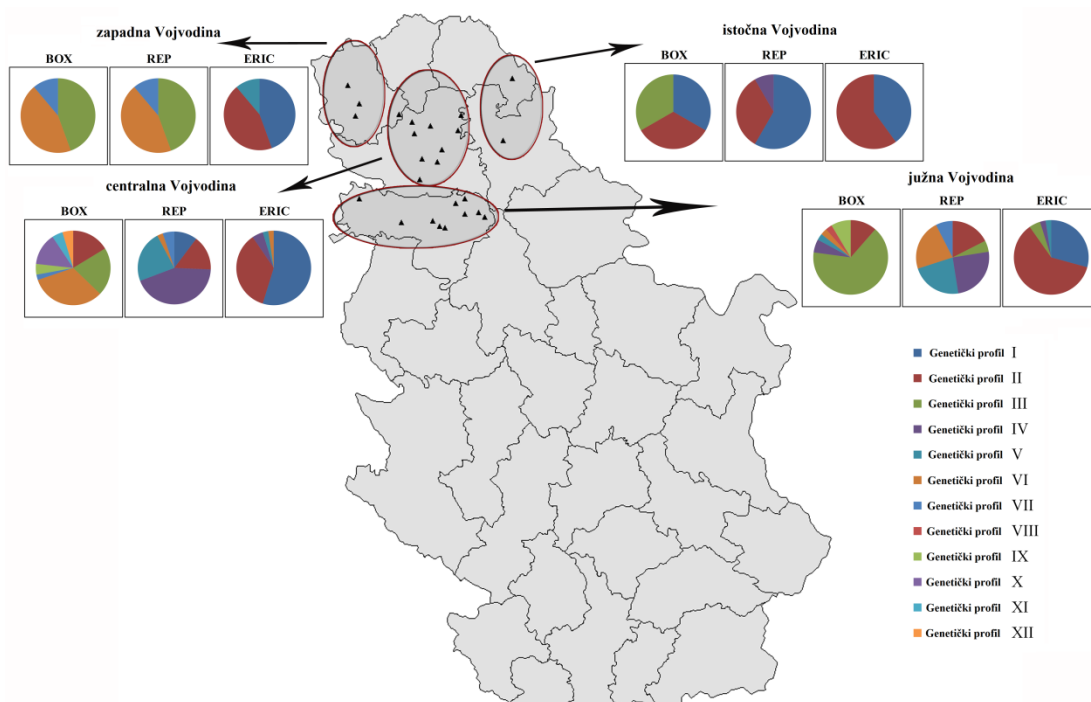


**Slika 4.3.** Genetički profili 25 reprezentativnih izolata *P. syringae* pv. *aptata*. Rimski brojevi predstavljaju grupe genetičkih profila: (a) ERIC-PCR; (b) REP-PCR; (c) BOX-PCR. M) DNA Smart Ladder; 1) P4; 2) P12; 3) P16; 4) P18; 5) P26; 6) P31; 7) P37; 8) P40; 9) P49; 10) P50; 11) P52; 12) P53; 13) P57; 14) P61; 15) P63; 16) P73; 17) P74; 18) P93; 19) P94; 20) P95; 21) P96; 22) P97; 23) P100; 24) P102; 25) P103; 26) PD163; 27) PD193; 28) CFBP2473; 29) Negativna kontrola (voda)



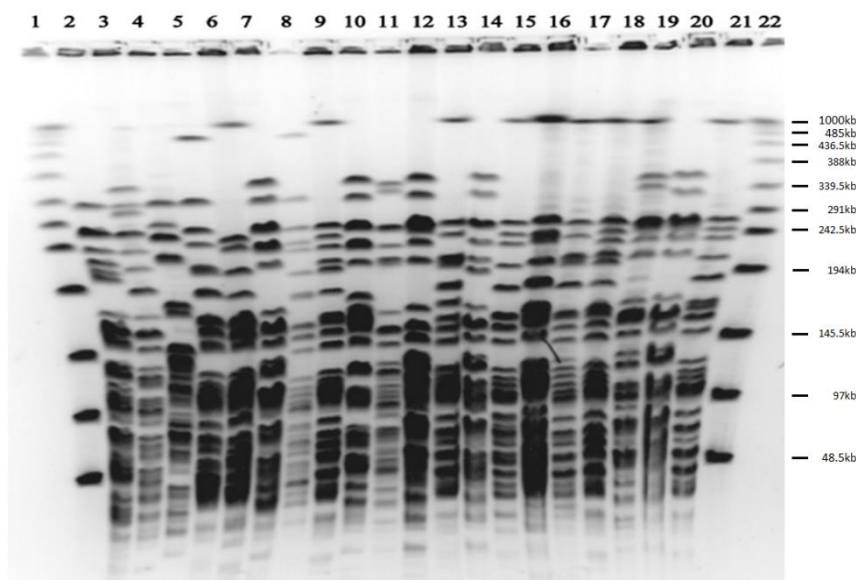
Referentni sojevi PD163, PD193 i CFBP2473 imali su različite genetičke profile, u poređenju sa izolatima sakupljenih sa nekrotičnih listova šećerne repe, kada su korišćeni REP i BOX prajmeri. U slučaju ERIC prajmera, identični profili su uočeni za referentne sojeve PD163 i CFBP2473, kao i za izolate P73 i P95. Referentni soj PD193 imao je isti genetički profil kao i grupa II (Slika 4.3).

Geografska raspodela Rep-PCR genetičkih profila pokazala je da su u istočnoj Vojvodini izolati iz grupe I i II za sva tri prajmera bili najčešći. U zapadnoj Vojvodini su bile dominantne grupe III i VI za BOX i REP, dok su za ERIC prajmer najdominantnije grupe bile I i II. Centralni i južni delovi Vojvodine su bili znatno raznovrsniji. U centralnoj Vojvodini su uočeni izolati iz osam BOX grupa profila, a šest iz REP i ERIC grupa profila. Najčešće su bile grupe II, III i VI za BOX prajmer, grupe II, IV i V za REP prajmer, i grupe I i II za ERIC prajmer. U južnoj Vojvodini, dominantni genetički profil za BOX prajmer bio je iz grupe III, najčešći profili za REP prajmer bili su iz grupa II, IV, V i VI, a najdominantniji ERIC profili bili su iz grupa I i II (Slika 4.4).



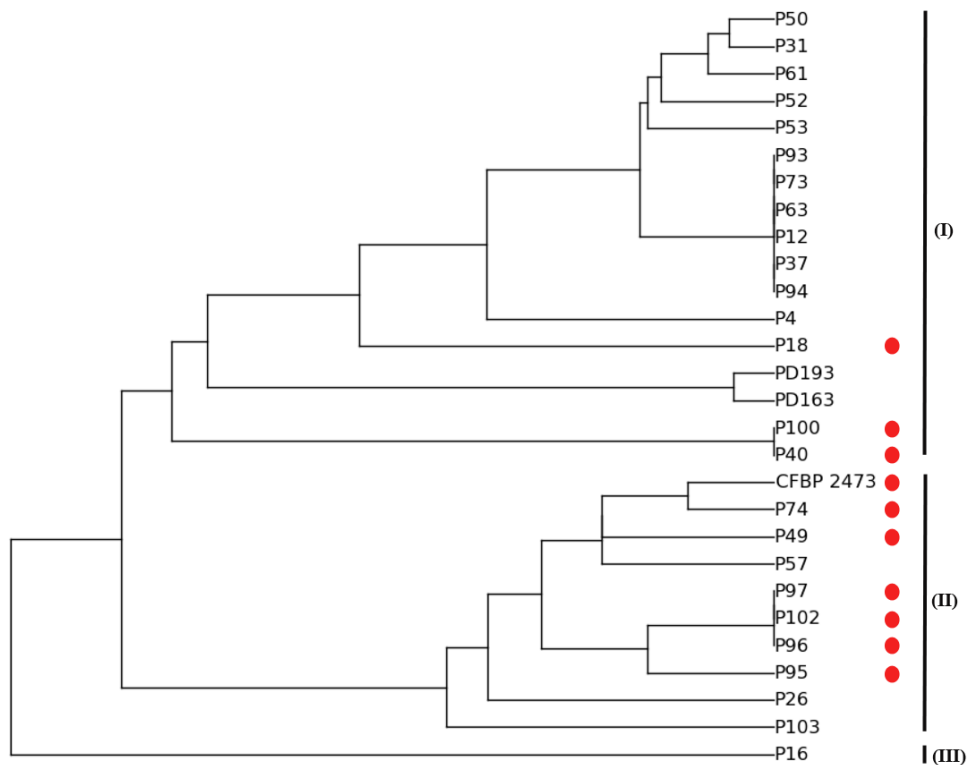
**Slika 4.4.** Geografska raspodela Rep-PCR genetičkih profila na teritoriji AP Vojvodina

Primenom metode elektroforeze u pulsirajućem polju određen je genetički diverzitet na nivou čitavog genoma. Ukupna DNK iz 25 reprezentativnih izolata i tri referentna soja *P. syringae* pv. *aptata* je isečena restrikcijom enzimom *SpeI*, i tom prilikom proizvedeno je 498 traka u opsegu veličine od 48.5 - 582 kb (Prilog 10). Većina traka se nalazila u opsegu ispod 194 kb. Dobijeno je sedamnaest različitih genetičkih profila (Slika 4.5). Uzorci P12, P37, P63, P73, P93 i P94 pokazali su isti genetički profil (na slici agaroznog gela predstavljen je samo P12). Izolati P96, P97 i P102 su takođe pokazali isti genetički profil (na slici agaroznog gela predstavljen je samo P102), kao i izolati P40 i P100 (na slici agaroznog gela predstavljen je P40).



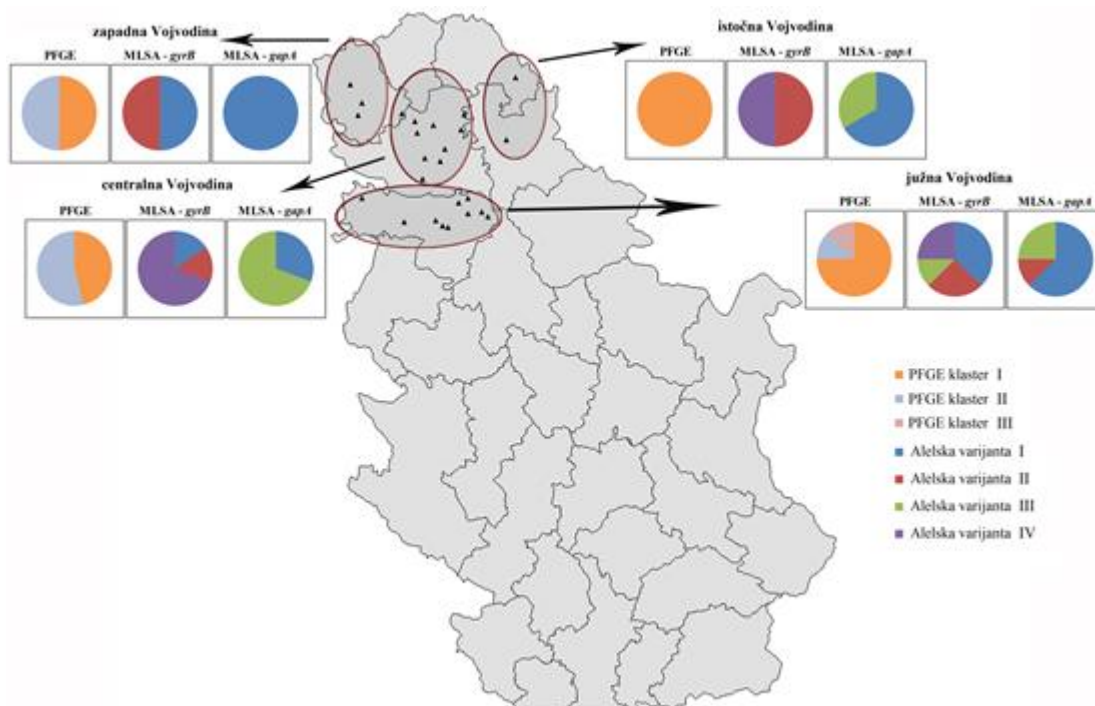
**Slika 4.5.** Genetički profili dobijeni na osnovu elektroforeze u pulsirajućem polju. Na slici je prikazano 17 različitih profila reprezentativnih izolata i tri profila referentnih sojeva: 1) i 22) Lambda fag konkateri kao markeri za određivanje pozicije traka; 2) P4; 3) P12; 4) P16; 5) P18; 6) P26; 7) P31; 8) P40; 9) P49; 10) P50; 11) P52; 12) P53; 13) P57; 14) P61; 15) P74; 16) P95; 17) P102; 18) P103; 19) PD163; 20) PD193; 21) CFBP24732

Na filogenetskom stablu dobijenom pomoću UPGMA analize izdvojila su se tri klastera (Slika 4.6). Klaster I sadržao je profile 15 izolata iz Srbije (sa 11 lokaliteta) i dva referentna soja (PD163 i PD193). Klaster II su činili profili devet izolata iz Srbije (sa 6 lokaliteta) i referentnog soja CFBP2473. Klaster III je činio genetički profil samo jednog izolata (P16) iz Šida (južna Vojvodina).



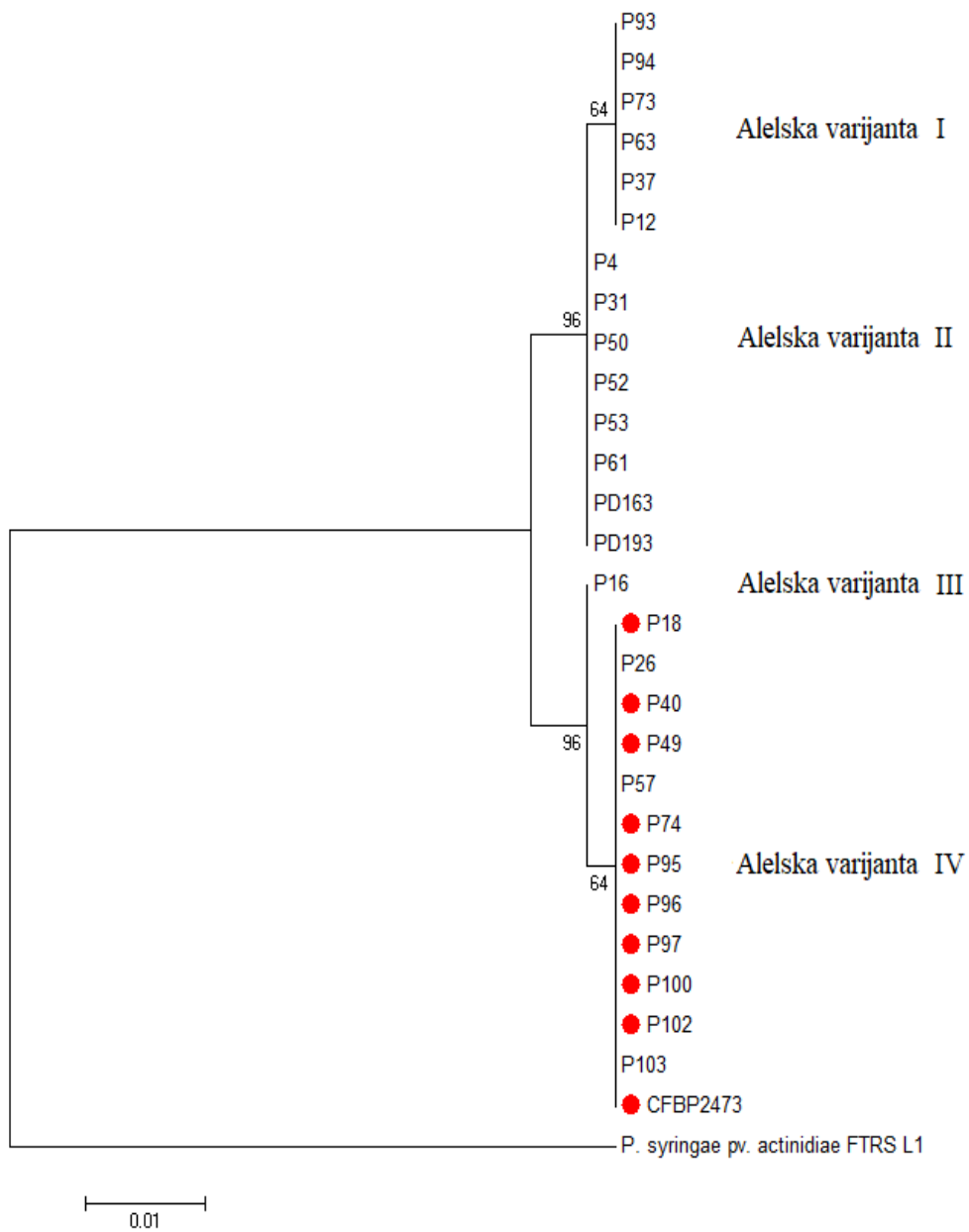
**Slika 4.6.** Filogenetsko stablo konstruisano na osnovu genetičkih profila dobijenih korišćenjem elektroforeze u pulsirajućem polju (PFGE). Dendrogram je napravljen UPMGA metodom i pokazuje genetičke udaljenosti između reprezentativnih izolata *P. siringae* pv. *aptata* i referentnih sojeva PD163, PD193 i CFBP2473. Crvena tačka ukazuje na izuzetno agresivne izolate

Klasteri dobijeni analizom PFGE profilisanja jasno su pokazali da su profili iz klastera I bili češći od profila iz klastera II u južnoj, zapadnoj i istočnoj Vojvodini, dok je u centralnoj Vojvodini bilo obrnuto (Slika 4.7). Nije uočena korelacija između geografske distribucije za profile iz klastera I, II i III. Lokaliteti Novi Karlovci (južna Vojvodina), Temerin (centralna Vojvodina) i Kikinda (istočna Vojvodina) sadržali su izolate iz klastera I i II, dok je lokalitet Šid (južna Vojvodina) sadržao izolate iz klastera I i III (Slika 4.7). Svi ostali lokaliteti sadržali su izolate iz samo jednog PFGE klastera.

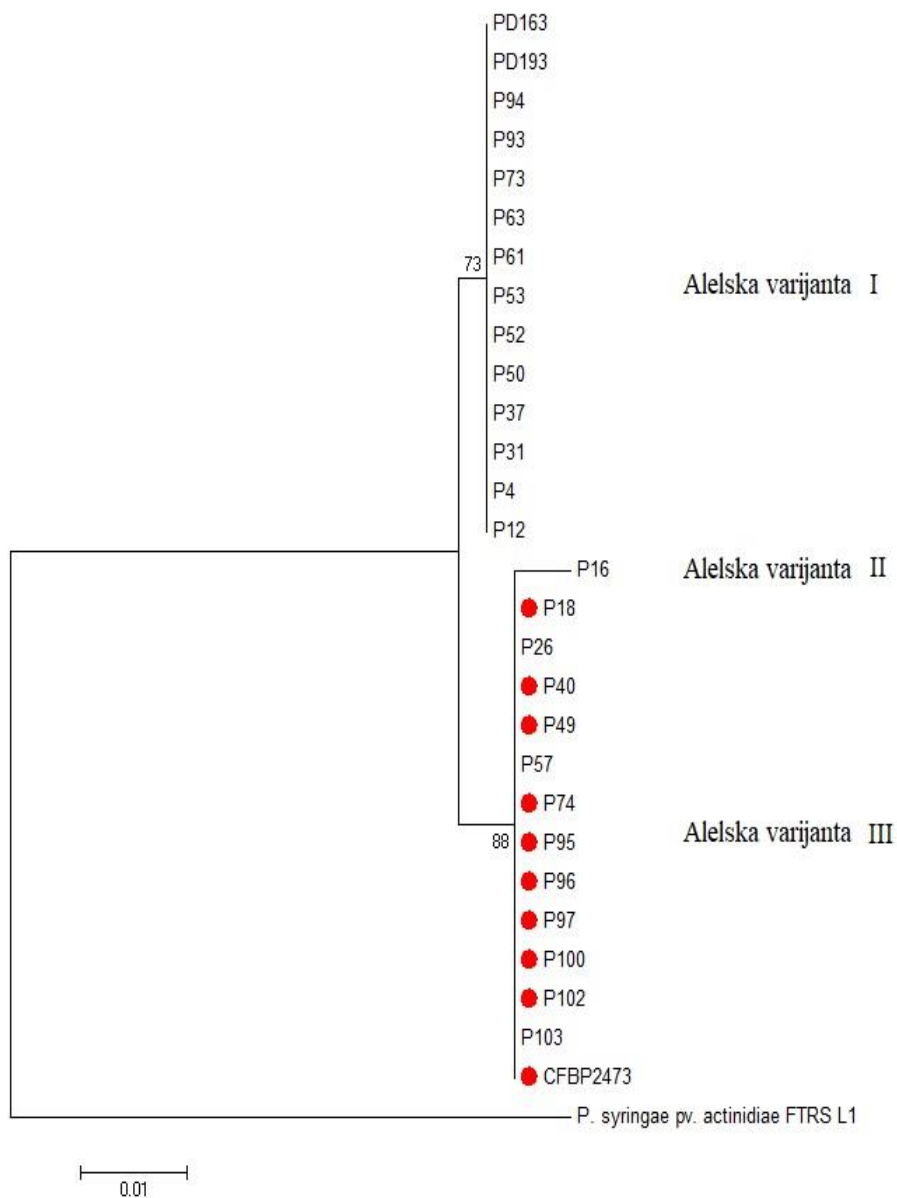


**Slika 4.7.** Geografska raspodela PFGE klastera, *gyrB* i *gapA* alelskih varijanti na teritoriji AP Vojvodina

DNK sekvenciranje četiri "housekeeping" gena (*gyrB*, *gapA*, *rpoD* i *gltA*) urađeno je za svih 25 reprezentativnih izolata. Sekvence svih pojedinačnih gena su pokazale 99-100% poklapanja sa sekvencom odgovarajućeg gena *P. siringae* pv. *aptata* CFBP1617 koji je deponovan u bazama podataka NCBI i PAMDB. Filogenetsko stablo sekvenci *gyrB* pokazalo je da postoje 4 različite alelske varijante (Slika 4.8) dok su na filogenetskom stablu dobijenom analizom *gapA* gena izdvojene tri različite alelske varijante (Slika 4.9). Izolat P16 imao je jedinstvene alelne varijante gena *gyrB* i *gapA* u odnosu na sve ostale izolate.

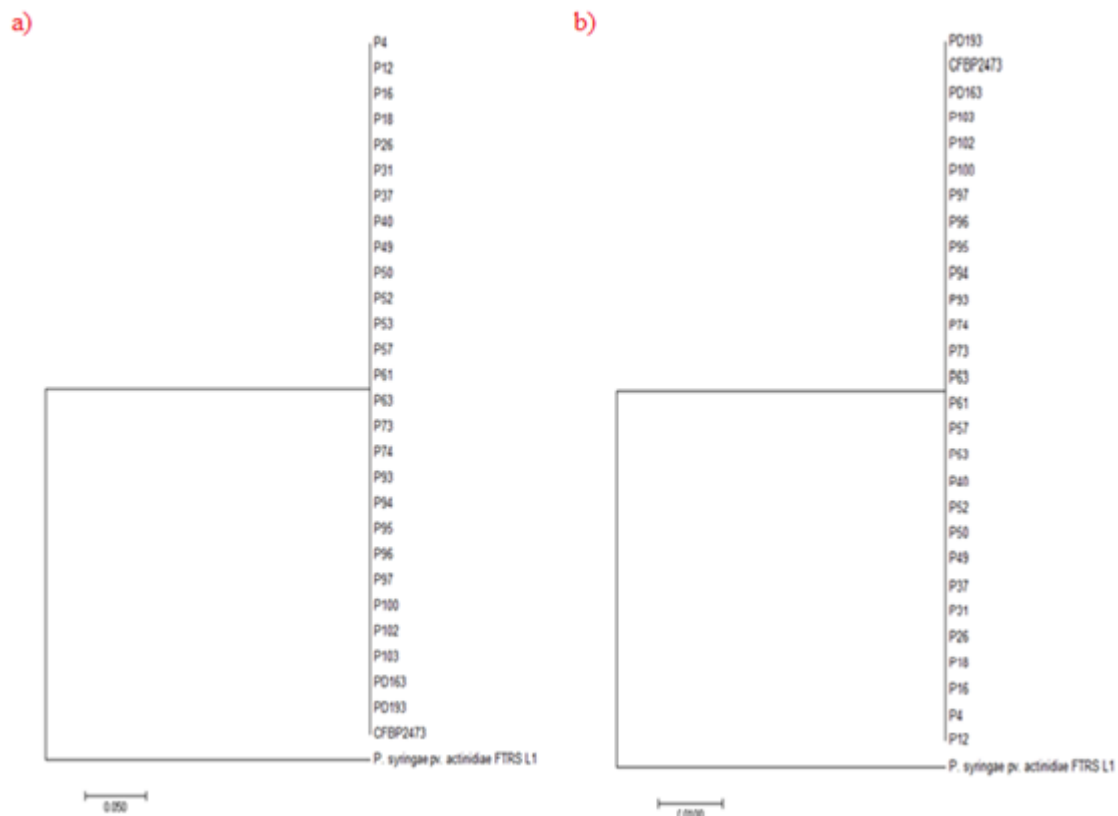


**Slika 4.8.** Filogenetska stabla 25 reprezentativnih izolata i tri referentna soja (PD163, PD193 i CFBP2473) napravljena Neighbour-joining metodom na osnovu *gyrB* gena. Crvena tačka označava izuzetno agresivne izolate na osnovu testa patogenosti



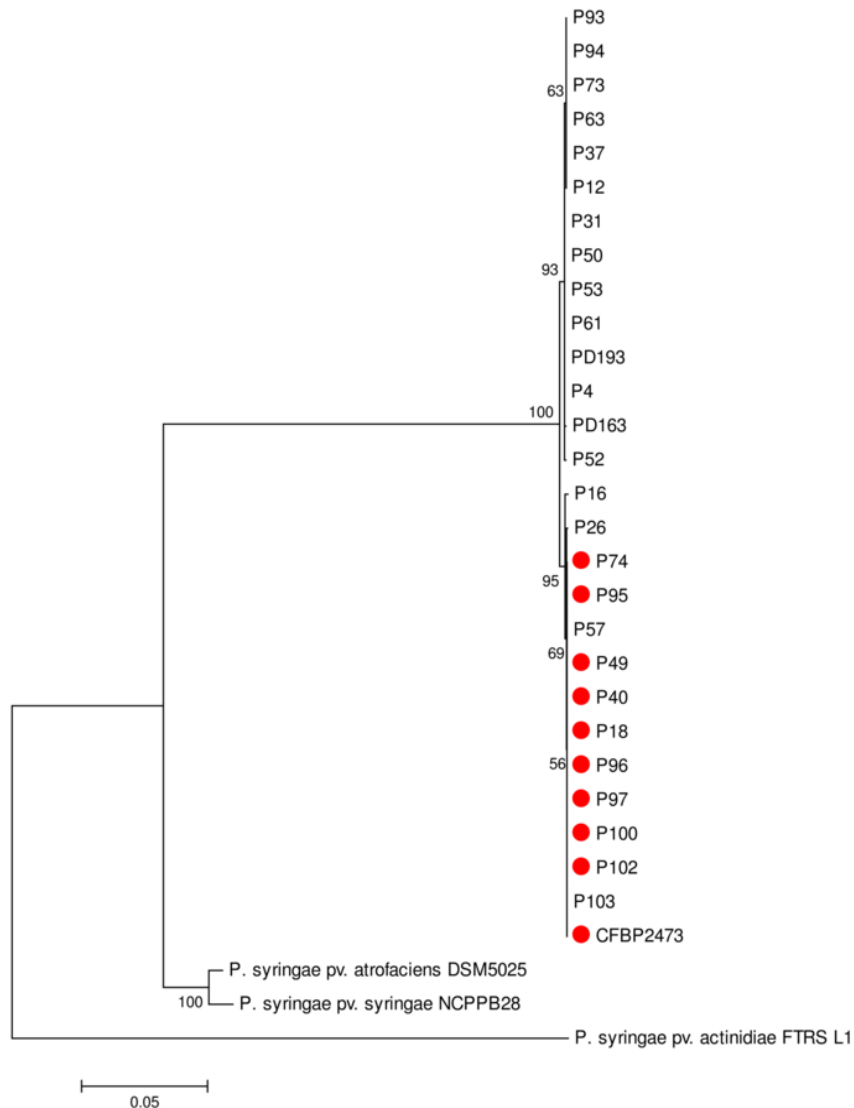
**Slika 4.9.** Filogenetska stabla 25 reprezentativnih izolata i tri referentna soja (PD163, PD193 i CFBP2473) napravljena Neighbour-joining metodom na osnovu *gapA* gena. Crvena tačka označava izuzetno agresivne izolate na osnovu testa patogenosti

Što se tiče *rpoD* i *gltA* gena (Slike 4.10 a i b), sve su sekvence bile međusobno identične (100% sličnosti) odnosno, izolati su grupisani u jedan monofiletski klaster zajedno sa referentnim sojevima (PD163, PD193 i CFBP2473).



**Slika 4.10.** Filogenetsko stablo na osnovu sekvenci *rpoD* gena za 25 reprezentativnih izolata i tri referentna soja (PD163, PD193 i CFBP2473) napravljeno Neighbour-joining metodom

Pored analize pojedinačnih genskih sekvenci urađena je i analiza sekvenci spojenih u konkatamer od 2321 poravnatog nukleotida koji je generisan iz parcijalne sekvence četiri gena (*gyrB* 610 bp, *gapA* 634 bp, *gltA* 556 bp i *rpoD* 521 bp). Na filogenetskom stablu su se izdvojila dva glavna klastera (Slika 4.11). Prvi klaster sadržao je izolate: P4, P12, P31, P37, P50, P52, P53, P61, P63, P73, P93, P94 i dva referentna soja, PD163 i PD193. Drugi klaster su činili: P16, P18, P26, P40, P49, P57, P74, P95, P96, P97, P100, P102, P103, kao i referentni soj CFBP2473. Na dendogramu se uočava genetička razlika između *P. syringae* pv. *aptata* i *P. syringae* pv. *atrofaciens* i *P. syringae* pv. *syringae*, koji su članovi iste filogenetske grupe (2b).



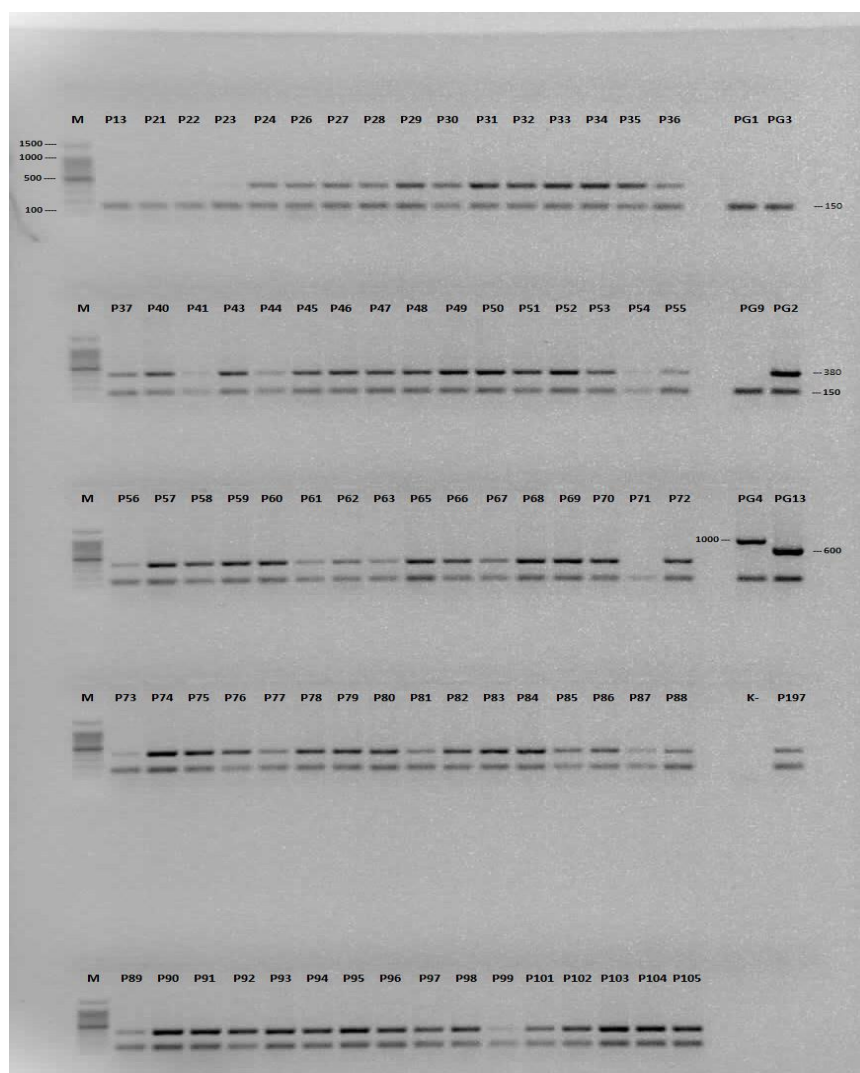
**Slika 4.11.** Filogenetsko stablo konkatamera sekvenci sva 4 gena (*gyrB*, *gapA*, *rpoD*, *gltA*) za 25 reprezentativnih izolata i tri referentna soja (PD163, PD193 i CFBP2473) napravljena Neighbour-joining metodom. Crvena tačka označava izuzetno agresivne izolate na osnovu testa patogenosti

Najzastupljenija distribucija *gyrB* i *gapA* alelskih varijanti pronađena je u centralnoj i južnoj Vojvodini, sa velikim prisustvom alelskih varijanti I i IV za *gyrB* i alelne varijante I i III za *gapA*. U istočnoj Vojvodini prevladavale su *gyrB* alelske varijante II i IV, kao i *gapA* alelske varijante I i III. U zapadnoj Vojvodini potvrđeno je prisustvo alelskih varijanti I i II iz analize *gyrB* gena i jedine varijante I iz analize gena *gapA* (Slika 4.7).



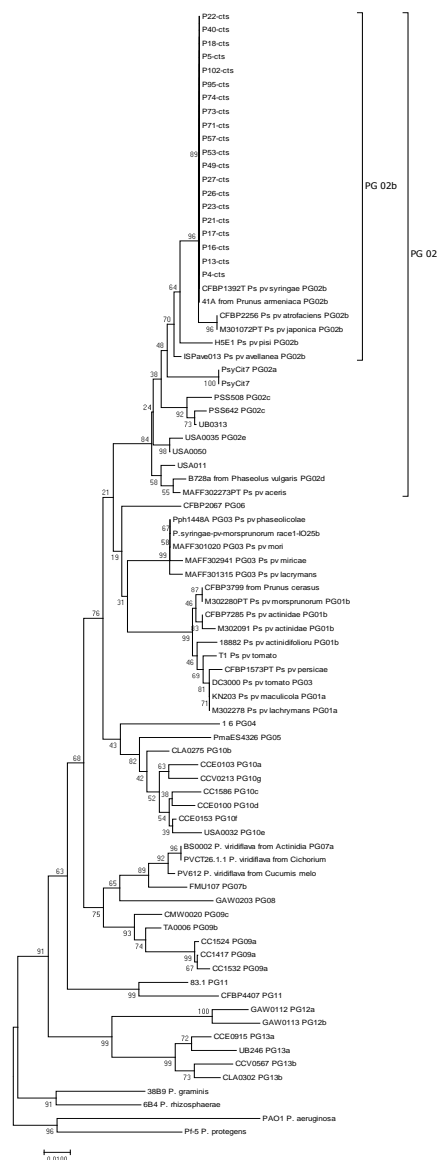
#### 4.4. Filogenetski status *P. syringae* pv. *aptata* izolata u okviru *P. syringae* kompleksa

Kompleks vrste *P. syringae* sadrži 13 filogenetskih grupa. Utvrđivanje filogenetske grupe kojoj pripadaju izolati izolovani sa šećerne repe, vršeno je sa ciljem da se utvrdi filogenetski status datih izolata. Koristeći metodu Multiplex PCR, umnoženi su fragmenti na poziciji od 380 bp uz pomoć prajmera PG2, što svrstava testirane izolate u filogenetsku grupu 2 (Slika 4.12).



**Slika 4.12.** Agarozni gel sa amplifikovanim DNK fragmentima na poziciji 380 bp (Filogenetska grupa 2). PG1 - pozitivna kontrola za filogenetsku grupu 1, PG2 - pozitivna kontrola za filogenetsku grupu 2, PG3 - pozitivna kontrola za filogenetsku grupu 3, PG4 - pozitivna kontrola za filogenetsku grupu 4, PG9 - pozitivna kontrola za filogenetsku grupu 9, PG13- pozitivna kontrola za filogenetsku grupu 13

Takođe, na osnovu sekvencioniranja *cts* gena, 20 reprezentativnih izolata *P. syringae* pv. *aptata* izdvojenih na osnovu BOX-PCR, poređeno je sa *cts* sekvencama od 59 referentnih izolata koji su predstavnici svih 13 filogenetskih grupa u okviru *P. syringae* kompleksa. Dobijeno filogenetsko stablo jasno pokazuje da svih 20 izolata pripada 2b filogenetskoj grupi, zajedno sa patovarima: *P. syringae* pv. *pisi*, *P. syringae* pv. *syringae*, *P. syringae* pv. *atrofaciens*, *P. syringae* pv. *avellanea* i *P. syringae* pv. *japonica* (Slika 4.13).



**Slika 4.13.** Neighbor-joining filogenetsko stablo *P. syringae* kompleksa napravljeno na osnovu sekvenci *cts* gena. PG2 – filogenetska grupa 2, PG2b – filogenetska grupa 2 podgrupa b

#### 4.5. Patogene karakteristike izolata *P. syringae* pv. *aptata* i korelacija sa genetičkim diverzitetom

Svih 25 reprezentativnih izolata koji su korišćeni za inokulaciju biljaka šećerne repe proizveli su nepravilne nekrotične pege sa tamnim marginama i tankim slojem hloroze, uglavnom na ivicama lista. Lezije su bile vidljive 3 dana nakon inokulacije, osim u slučaju izolata P16, koji je razvio simptome nakon 10 dana. Sedam dana nakon inokulacije, nekrotične pege su se uglavnom spojile tako da je veći deo lisne ploče pod nekrozom, dok su neki listovi izgubili turgor i postali deformisani (Slike 4.14, 4.15).



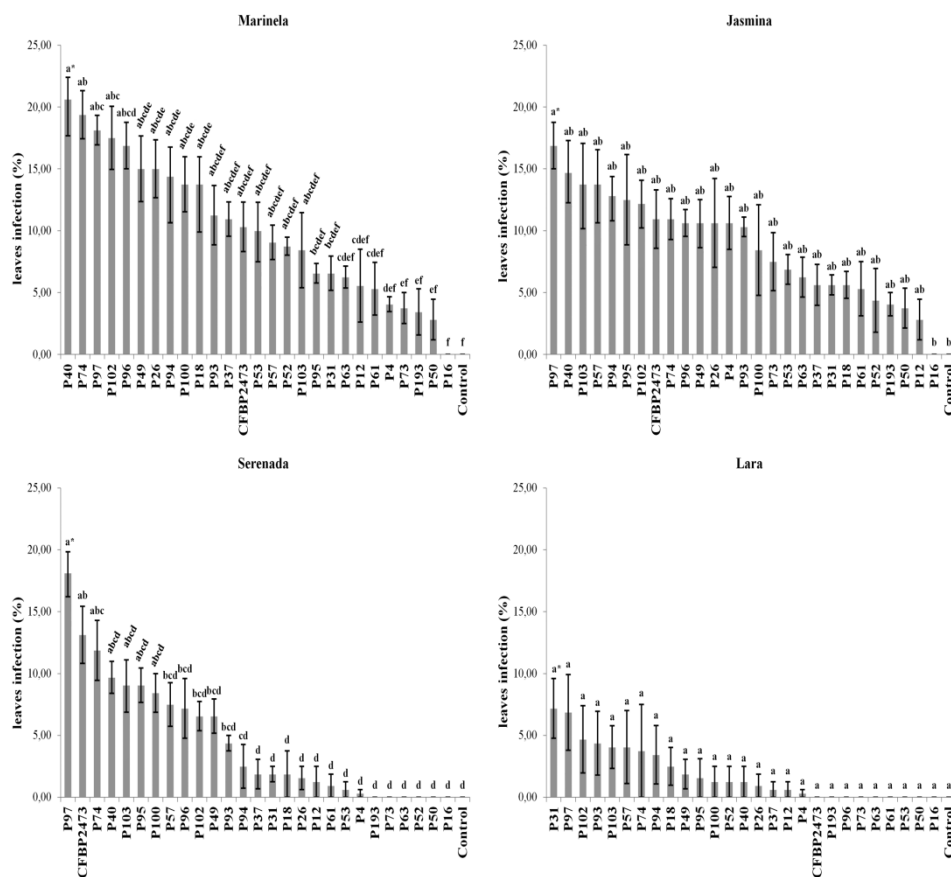
**Slika 4.14.** Simptomi bakterijske pegavosti listova šećerne repe dobijenih inokulacijom po jednog izolata iz sve 4 *gyrB* alalske varijante na sortama Marinela i Jasmina nakon 7 i 14 dana nakon inokulacije. (a) P95; (b) P12; (c) P57; (d) P16; (e) CFBP2473; (f) voda (negativna kontrola)



**Slika 4.15.** Simptomi bakterijske pegavosti listova šećerne repe dobijenih inokulacijom po jednog izolata iz sve 4 *gyrB* alalske varijante na sorti Serenada nakon 7 i 14 dana nakon inokulacije. (a) P95; (b) P12; (c) P57; (d) P16; (e) CFBP2473; (f) voda (negativna kontrola)

Razlike u osetljivosti testiranih sorti (Lara, Serenada, Marinela, Jasmina) bile su očigledne nakon 7 dana, osim u slučaju sorte Lara, u kojoj je slaba patogenost svih izolata bila statistički značajna i nakon 14 dana inkubacije (Slike 4.16 i 4.17). Vrednosti očitavanja nekroze tkiva izražene u procentima u odnosu na ukupnu površinu lista, srednja vrednost svih očitavanja za 4 ponavljanja i standardna devijacija nakon 7 i 14 dana od inokulacije prikazani su u priložima 11 i 12. Najveću agresivnost, na osnovu stepena infekcije listova (15-21%) nakon 7 dana imalo je 20% ispitivanih izolata (P26, P40, P49, P74, P96, P97 i P102) na sorti Marinela, a samo je izolat P97 pokazao statistički značajnu agresivnost na sortama Jasmina i Serenada. Interesantno je

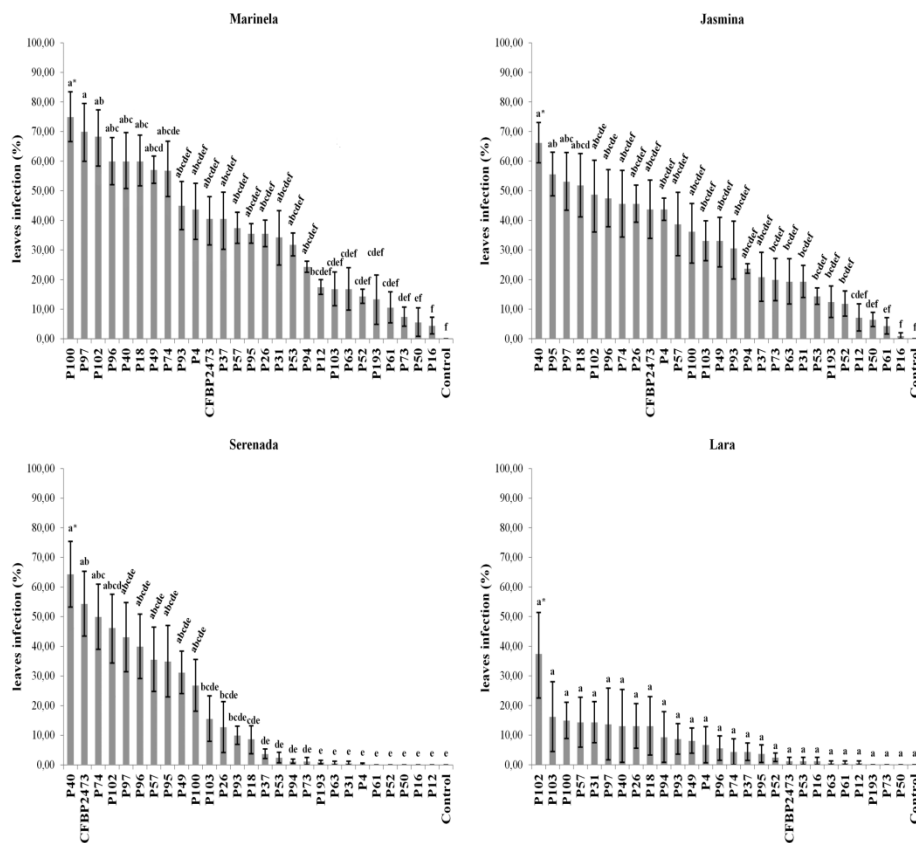
napomenuti da većina izolata nije izazivala značajno visok stepen bolesti na sorti Jasmina (Slika 4.16). Značajna intermedijarna agresivnost (5-15%) je primećena za 68% ispitivanih izolata na sorti Marinela i 36% na sorti Serenada.



**Slika 4.16.** Procena agresivnosti 7 dana nakon inokulacije sa 25 reprezentativnih izolata i 2 referentna soja *P. syringae* pv. *aptata*. Vrednosti među histogramima sa istim slovom nisu značajno različite (Tukey HSD test,  $P < 0.05$ ). Podaci predstavljaju prosečne vrednosti dva odvojena eksperimenta

Četrnaest dana više od 29% izolata (P18, P40, P49, P74, P96, P97 i P100) postiglo je 5 na skali za stepen bolesti (51-75% agresivnosti), a izolati P97 i P100 su pokazali da su najagresivniji (Slika 4.17). Statistički najznačajna intermedijarna agresivnost (20-50%) primećena je za 10 izolata na Marineli, 15 na Jasmini i 7 na Serenadi. Izolat P40 imao je statistički značajno veću agresivnost na sortama Jasmina i Serenada, dok je izolat P100 pokazao srednju agresivnost na ove dve sorte. Visok nivo agresivnosti takođe je primećen za izolat P97 na sorti Jasmina. Štaviše, broj izolata sa

najslabijom agresivnošću smanjen je 14 dana nakon inokulacije u slučaju sorte Serenada. Biljke koje su poslužile kao negativna kontrola, tretirane sterilnom vodom, su bile bez simptoma. Reizolacija je bila izvedena za sve izolate na NSA medijumu, a podaci o morfologiji kolonija, rezultati LOPAT testova i *gyrB* parcijalne genske sekvence su bile u skladu sa originalnim izolatima iz kolekcije (rezultati nisu prikazani).



**Slika 4.17.** Procena agresivnosti 7 dana nakon inokulacije sa 25 reprezentativnih izolata i 2 referentna soja *P. syringae* pv. *aptata*. Vrednosti u okviru histograma istim slovom nisu značajno različite (Tukey HSD test,  $P < 0.05$ ). Podaci predstavljaju prosečne vrednosti dva odvojena eksperimenta

Prema rezultatima testiranja patogenosti, sorte Jasmina i Marinela su osetljivije na bolest lisne pegavosti izazvane *P. syringae* pv. *aptata*, nego sorte Lara i Serenada, dok je sorta Lara pokazala najveću otpornost na sve testirane patogene izolate.

Korelacija između genetičkog i patogenog diverziteta vršena je sa ciljem da se ispita povezanost između Rep-PCR grupa, PFGE grupa i MLSA alelskih varijanti sa

stepenom agresivnosti reprezentativnih *P. siringae* pv. *aptata* izolata. S tim u vezi, analize Rep-PCR filogenetskih stabala dobijenih na osnovu poređenja genetičkih profila pokazale su da su najagresivniji izolati raspoređeni u svim kladama, te da ne postoji jasna korelacija između agresivnosti patogena i utvrđenog diverziteta na osnovu Rep-PCR genetičkih profila (Prilog 8). Sa druge strane, analiza PFGE klada, dobijenih na osnovu poređenja profila čitavih genoma reprezentativnih izolata, i njihove patogene agresivnosti pokazala je prisustvo najagresivnijih izolata u 2 od 3 PFGE klade. Klada 1 sadržala je 3 agresivna izolata, dok je u okviru klade 2 uočeno 6 izolata i referentni soj CFBP2473 (Slika 4.6). PFGE klada 3 sastojala se samo od jednog izolata (P16) koji je okarakterisan kao izolat sa najslabijim patogenim karakteristikama. Konačno, vrlo jasna korelacija uočena je analizom *gyrB* i *gapA* alelskih varijanti i najagresivnijih reprezentativnih *P. siringae* pv. *aptata* izolata. Svi najagresivniji izolati za sorte Marinela, Jasmina i Serenada grupisali su se u okviru IV *gyrB* alelske varijante i III *gapA* alelske varijante (Slike 4.7 i 4.8). Takođe, u okviru pomenutih alelskih varijanti se nalaze i izolati sa intermedijarnom i slabom agresivnošću (P26, P57 i P103). Generalno, izolati sa intermedijarnom agresivnošću za sorte Marinela (P4, P26, P31, P37, P53, P57, P93, P94, P95 i CFBP2473), Jasmina (P4, P26, P31, P37, P49, P57, P63, P73, P74, P93, P94, P96, P100, P102, P103 i CFBP2473) i Serenada (P49, P57, P74, P95, P96, P97, P100 i P102) raspoređeni su u I, II i IV *gyrB* alelsku varijantu, kao i u I i II *gapA* alelsku varijantu. Izolati sa najslabijom patogenom agresivnošću za sorte Marinela (P12, P16, P50, P52, P61, P63, P73, P103 i PD193), Jasmina (P12, P16, P50, P52, P53, P61 i PD193) i Serenada (P4, P12, P16, P18, P26, P31, P37, P50, P52, P53, P61, P63, P73, P93, P94, P103 i PD193) svrstani su u sve *gyrB* alelske varijante i u I i III *gapA* alelsku varijantu. Izolat P16 je imao apsolutno najslabiju agresivnost među testiranim izolatima i takođe je okarakterisan kao genetički različit od svih reprezentativnih izolata i referentnih sojeva.

#### 4.6. Opseg domaćina *P. syringae* pv. *aptata* izolata i korelacija sa filogenetskim statusom u okviru *P. syringae* kompleksa

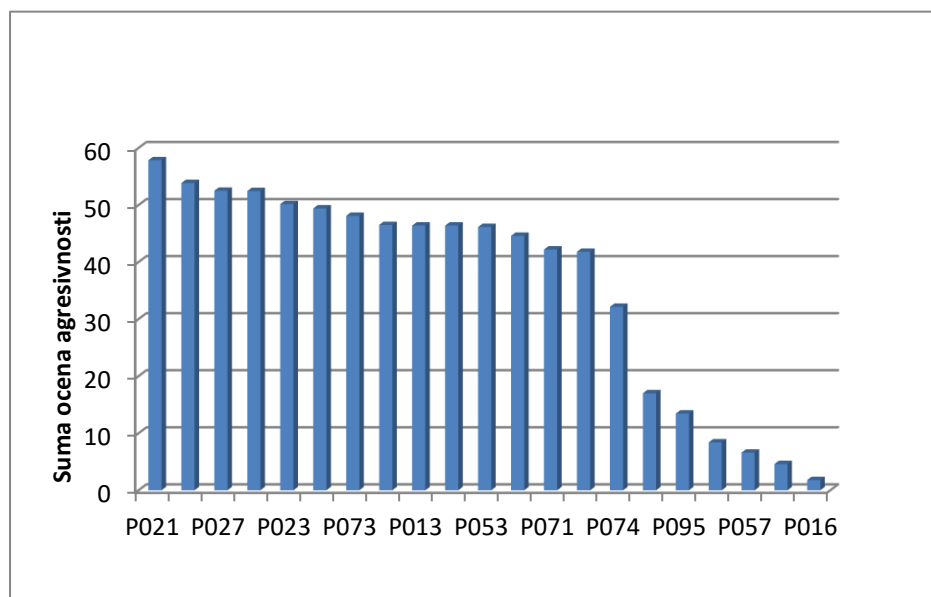
Testiranje opsega potencijalnih domaćina zasnivalo se na ispitivanju patogenosti, u vidu virulencije i agresivnosti, 20 fitopatogenih izolata *P. syringae* pv. *aptata* na 16 različitih biljnih kultura (Slika 4.18). Izolati P21 i P23 su bili virulentni na svim testiranim biljkama, dok izolati P22 i P53 nisu bili virulentni na paprici, odnosno izolati P27 i P49 na muškatli. Izolati P40 i P102 nisu izazvali bolest na muškatli i krastavcu, dok izolati P73 i P74 nisu izazvali bolest na biljkama paprike i muškate. Takođe, izolati P4 i P13 nisu bili virulentni na dva potencijalna domaćina, i to P4 na paprici i krastavcu, a P13 na paprici i dinji. Izolati P16, P17 i P57 su pokazali najslabiju virulentnost. Izolat P16 je izazvao bolest samo na biljkama peršuna, dok su izolati P17 i P57 bili virulentni samo na crnom luku i peršunu. Sa druge strane, najsenzitivnije biljke su bile peršun, crni luk, cvekla, paradajz, grašak i blitva, dok su najotpornije biljke bile paprika i muškatla.

	Paprika	Muškatla	Krastavac	Dinja	Spanać	Šećerna repa	Kupus	Lubenica	Zelena salata	Tikvica	Blitva	Grašak	Paradajz	Cvekla	Crni luk	Peršun
P16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
P17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
P57	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
P26	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1
P18	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1
P95	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1
P74	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
P5	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
P4	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
P13	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
P40	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
P71	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
P73	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
P102	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
P22	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
P27	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
P49	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
P53	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
P21	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
P23	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Slika 4.18. Ocena virulentnosti nakon 6 dana

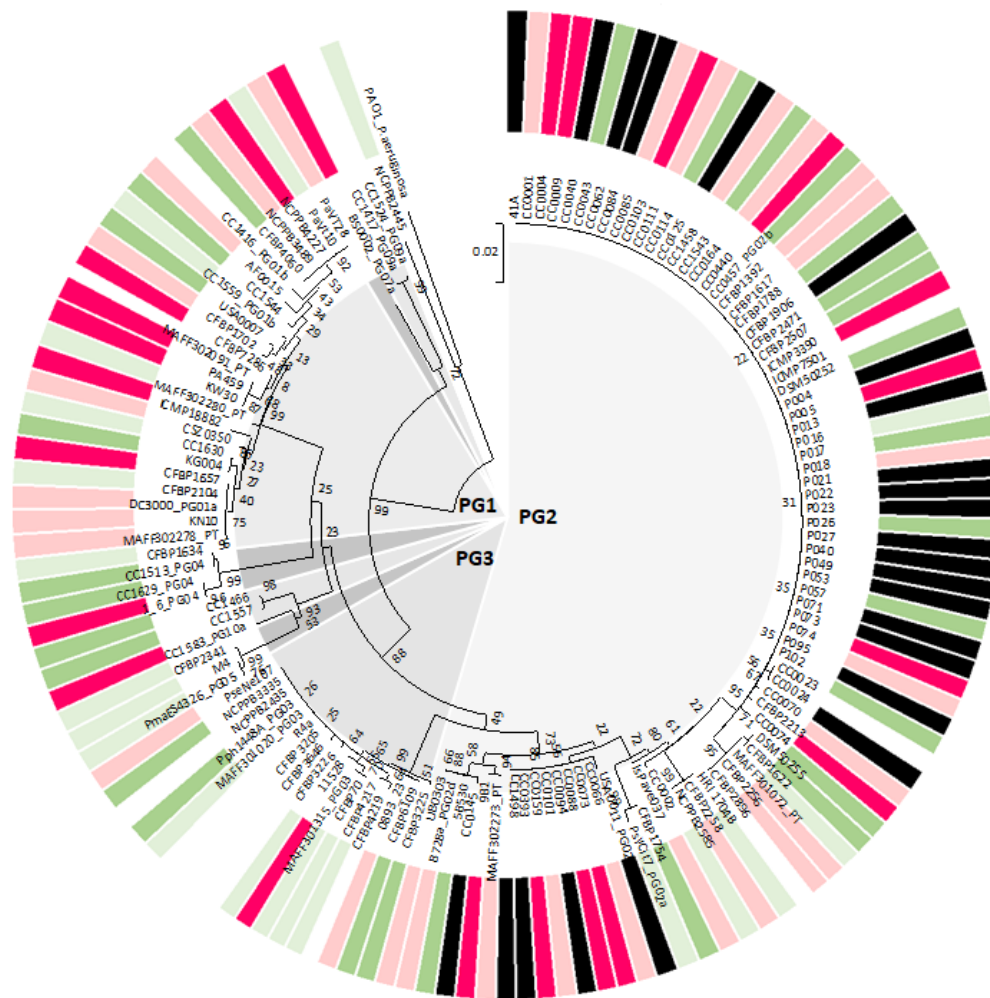


Ocena agresivnosti prema odgovarajućoj skali nam je pokazala da se izdvajaju dve grupe izolata koje se razlikuju po agresivnosti (Slika 4.19). Grupu izuzetno agresivnih izolata čine izolati P21, P49, P27, P40, P23, P102, P73, P4, P13, P22, P53, CC94, P71 i P5, gde je sveukupno najagresivniji izolat P21. Grupu izolata koje karakteriše slaba agresivnost čine izolati P74, P18, P95, P26, P57, P17 i P16, a izolat sa najslabijom agresivnošću je P16.



**Slika 4.19.** Grafički prikaz sumiranih ocena agresivnosti testiranih izolata *P. syringae* pv. *aptata*

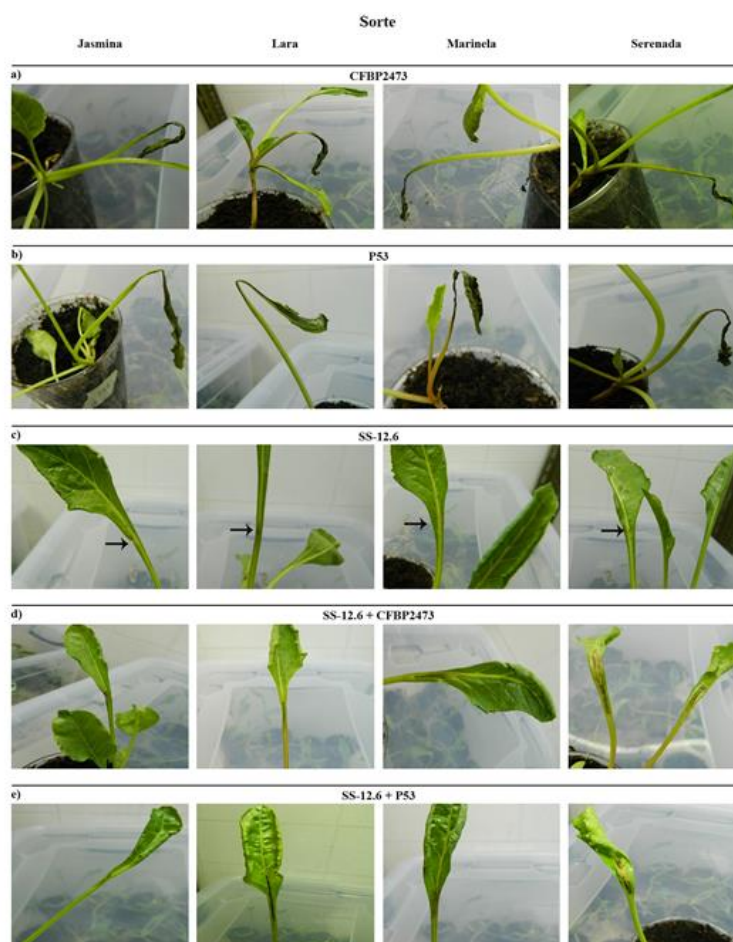
Korelacija između filogenetskog statusa i opsega domaćina testirana je korišćenjem 134 izolata *P. syringae* koji predstavljaju 8 filogrupa, gde je opseg spektra domaćina ocenjivan na skali od 0% do 100%. Opseg je bio izrazito varijabilan među filogrupama, ali jedino je filogrupa 2 sadržala izolate koji su virulentni na više od 75% testiranih biljaka (Slika 4.20). Takođe, jasno se može uočiti da 12 izolata *P. syringae* pv. *aptata* (P4, P13, P21, P22, P23, P27, P40, P49, P53, P71, P73, P95), koji su deo kolekcije sakupljene u Srbiji, spada u grupu najvirulentnijih izolata sa izuzetno velikim opsegom domaćina (>75%).



**Slika 4.20.** Filogenetsko stablo 134 izolata *P. syringae* iz 8 filogenetskih grupa i *P. corrugata* čija je virulencija ocenjivana na 16-22 biljnih vrsta. Opseg spektra domaćina je prikazan bojom (izolat virulentan na >75% testiranih biljaka: crna; >50% - 75%: crvena; >25% - 50%: roze; >10% - 25%: tamno zelena; >0% - 10%: svetlo zelena; 0%: bela). Izolati su smatrani virulentnim ako su uzrokovali simptome bolesti na najmalne polovini biljaka replikata u svakom testu. Neighbor-joining filogenetsko stablo je konstruisano na osnovu parcijalnih sekvenci *cts* gena (Slika preuzeta iz Morris et al. 2018).

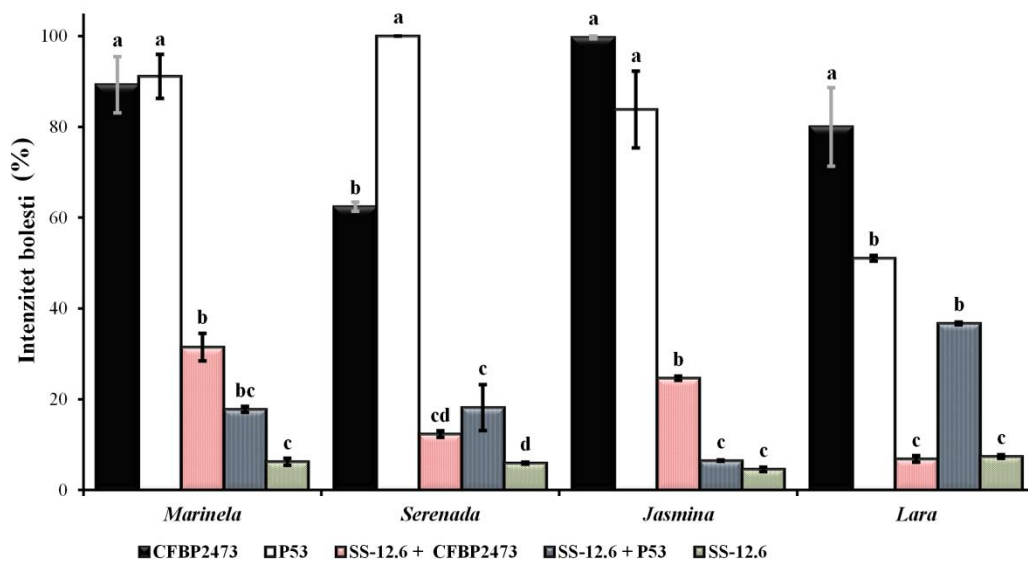
## 4.7. Biološka kontrola

U biokontrolnim eksperimentima obavljena je istovremena inokulacija listova petiola na četiri sorte šećerne repe sa *B. amyloliquefaciens* SS-12.6 i patogenim sojevima *P. syringae* pv. *aptata* P53 i CFBP2473. Efekat na zasađene biljke nakon 7 dana inkubacije prikazan je na Slici 4.21. Stanje biljaka tretiranih samo patogenom je bilo vrlo slabo, biljke su izgubile turgor i lisna ploča je bila savijena (Slika 4.21 a i b), dok su biljke tretirane SS-12.6 ćelijskom kulturom (Slika 4.21 c) i kombinacijom SS-12.6 ćelijske kulture i sojeva patogena (Slika 4.21 d i e) bile u evidentno dobrom stanju. Vrednosti očitavanja nekroze tkiva izražene u procentima u odnosu na ukupnu površinu lista, srednja vrednost svih očitavanja za 3 ponavljanja i standardna devijacija nakon 7 dana od momenta inokulacije prikazani su u Prilogu 13.



**Slika 4.21.** Biokontrolna aktivnost *B. amyloliquefaciens* SS-12.6 protiv *P. syringae* pv. *aptata* P53 i referentnog soja CFBP2473 na četiri sorte šećerne repe nakon 7 dana inkubacije: a) CFBP2473; b) P53; c) SS-12.6; d) SS-12.6 + CFBP2473; e) SS-12.6 + P53.

Simptomi bolesti izazvani sojevima P53 i CFBP2473 kreću se od 50% do 100% nekroze za sve sorte šećerne repe (Slika 4.22). Najveći intenzitet bolesti (100%) za sojeve P53 i CFBP2473 je zabeležen za sorte Serenada i Jasmina. Najniži intenzitet bolesti za soj P53 (50%) je primećen kod sorte Lara. Soj CFBP2473 je izazvao najniži intenzitet bolesti (65%) na sorti Serenada. Sa druge strane, biljke tretirane mešavinom SS-12.6 ćelijske kulture i patogena razvijale su nekrozu u rasponu od 8% do 40% (Slika 4.22). Najniži intenzitet bolesti na biljkama inokulisanim sa SS-12.6 i P53 bio je 8% na sorti Serenada, dok je za SS-12.6 i CFBP2473 bio 9% na sorti Lara. Tretman sa SS-12.6 ćelijskom kulturom i patogenima P53 i CFBP2473 potpuno je inhibirao nekrotične lezije na sortama Jasmina i Lara, a statističke razlike nisu zabeležene u odnosu na negativnu kontrolu. Ne tako visoko, ali statistički značajno smanjenje intenziteta bolesti zabeleženo je kod SS-12.6 ćelijske kulture i CFBP2473 za sorte Marinela i Jasmina. Najslabiji biokontrolni efekat SS-12.6 na patogen P53 uočen je za sortu Lara.



**Slika 4.22.** Procena intenziteta bolesti nakon 7 dana inokulacije sa ćelijskim kulturama sojeva *B. amyloliquefaciens* SS-12.6 i *P. syringae* pv. *aptata* P53 i CFBP2473.

# DISKUSIJA

## 5. DISKUSIJA

Klimatski uslovi mogu biti veoma važan faktor za pojavu bakterijskih bolesti, posebno uzrokovanih fitopatogenom *P. syringae* (Cuppels & Elmhirst, 1999; Morris et al., 2000). Bolest lisne pegavosti se najčešće razvija usled visoke vlažnosti vazduha, i obično je ozbiljnijeg karaktera kada su temperature hladne do umerene, dok suvo vreme i visoke temperature sprečavaju širenje bolesti (Lamichhane et al., 2015). Takođe, mraz može doprineti pojavi bolesti, koja se opet veoma lako razvija na zemljištu sa visokim sadržajem vlage (Lamichhane et al., 2015). Agrometrološki uslovi u 2013. godini, kada je uočena bolest listova šećerne repe, su se ogledali u prisustvu neuobičajeno visoke vlažnosti vazduha u prolećnim mesecima (april, maj i jun), velike količine padavina tokom vegetacionog perioda i nešto veće prosečne temperature u proleće (Prilog 14).

Generalno, epifitne patogene bakterije prodiru u lisno tkivo najčešće preko hidatoda koje se nalaze na krajevima listova i služe za primanje i odavanje vode, te stoga bakterijska infekcija listova uglavnom počinje sa ivica lisne ploče gde se mogu uočiti prve nekrotične lezije. Samim tim, usled visoke relativne vlažnosti, stome i hidatode su otvorene i bakterije mogu lako prodrati u biljno tkivo, tako da je vrlo jasna povezanost između agrometeoroloških uslova i pojave bolesti uzrokovanih bakterijskim biljnim patogenima. Nakon toga provodnim sistemima fitopatogen se širi u lisno tkivo i dolazi do pojave hlorotičnih pega, a onda do stvaranja karakterističnih nekrotičnih pega. Pega se javljaju po čitavoj lisnoj ploči i mogu se spajati kako bolest napreduje.

Stepen zaraze na komercijalnim zasadima šećerne repe na teritoriji AP Vojvodina bio je izuzetno visok, dok je infekcija bila najintenzivnija na mladim listovima. Prolećni period (april, maj i jun) predstavlja najosetljiviju fazu čitave biljke jer tada niču mladi listovi koji su vrlo podložni potencijalnim infekcijama. Kako se simptomi bolesti lisne pegavosti koju izaziva fungalni patogen *Cercospora beticola* javljaju kasnije tokom leta, kada su prisutniji nešto drugačiji klimatski uslovi, ukazivalo je da se radi o prisustvu nekog drugog uzročnika infekcije listova šećerne repe. Simptomi bolesti koja je detektovana na listovima šećerne repe odlikuju se uglavnom nepravilnim nekrotičnim pegama veličine 5 – 20 mm, čiji je centar svetlo braon boje a oivičene su sjajno mrkim marginama (Slika 5.1). Na osnovu simptomatologije,

agrometeoroloških uslova i vremenskog okvira u kojem je bolest detektovana, formirana je pretpostavka da je potencijalni uzročnik bolesti bakterijski biljni patogen *P. syringae*.



**Slika 5.1.** Simptomi bolesti lisne pegavosti šećerne repe detektovane 2013. godine na teritoriji AP Vojvodina

*P. syringae* sa svim svojim karakteristikama koje se odnose na biologiju i ekologiju vrste, životnu istoriju i epidemiologiju, predstavlja arhetip biljnih patogena i svakako jednog od najviše proučavanih biljnih patogena. (Mansfield et al., 2012) su označili *P. syringae* kao patogen koji po svim svojim karakteristikama zauzima prvo mesto među bakterijskim biljnim patogenima, posmatrano sa naučnog i ekonomskog aspekta. U naučnom smislu *P. syringae* predstavlja model organizam za brojna istraživanja o mehanizmima patogenosti, naročito u vezi interakcija domaćina i patogena. Takođe, veliki broj različitih tipova bolesti koje izaziva *P. syringae* kompleks na različitim domaćinima svrstava ga u red patogena koji u najvećoj meri utiču na smanjenje prinosa poljoprivrednih kultura, i samim tim na ekonomiju u celini. Otkrivanje potencijalnih izvora infekcije i predlaganje mera za potrebe kontrole bolesti, pre svega zahteva karakterizaciju samog patogena, određivanje njegovog potencijalnog genetičkog diverziteta i utvrđivanje intenziteta patogenosti i različitih linija infekcije.

U ovom radu, korišćene su brojne metode za identifikaciju i karakterizaciju bakterijskih izolata poreklom sa komercijalnih zasada šećerne repe. Takođe, izvršena je procena patogenog diverziteta i intenziteta bolesti koju je izazvao ovaj bakterijski fitopatogen, kao i određivanje genetičke raznovrsnosti celokupne kolekcije izolata, kao i za utvrđivanje biološke kontrole ovog biljnog patogena koja bi predstavljala alternativu korišćenju hemijskih pesticida u zaštiti bilja. Ukupno 104 bakterijska izolata od 250

uzoraka listova šećerne repe sa simptomima bolesti, identifikovani su kao *P. syringae* pv. *apata* na osnovu morfoloških, biohemijskih i molekularnih karakteristika. Utvrđivanje morfoloških karakteristika i biohemijskih odlika testiranih izolata su nam nesumnjivo pokazale da su rezultati testova koje smo dobili karakteristični za bakterijsku vrstu *P. syringae*. Rezultati testova kao što su reakcija bojenja po Gramu, katalaza test, O/F test, produkcija indola, H<sub>2</sub>S, kao i hidroliza skroba, želatina i eskulina su poslužili u identifikaciji izolata do nivoa roda, i to roda *Pseudomonas*. Sa druge strane rezultati testova koji su nas doveli do saznanja, da zapravo izolati pripadaju vrsti *P. syringae* svakako jesu rezultati LOPAT testova i upoređivanje sa referentnim sojevima *P. syringae* pv. *apata*. Na osnovu LOPAT testova potvrđeno je da svi testirani izolati pripadaju Ia LOPAT grupi. Biohemijski testovi, iako korisni za identifikaciju rodova i vrsta, često nisu dovoljno diskriminatorsni za određivanje patovara *P. syringae*, kao što su patovari *apata*, *syringae*, *atrofaciens*, *dysosylyi* i *japonica* (Morris et al. 2000). Da bi se detektovali i identifikovali patovari *P. syringae* kompleksa, razvijeni su specifični oligonukleotidni prajmeri (Musa et al., 2001; Vaseghi et al., 2014; Kalužna et al., 2016). U ovoj studiji korišćeni su Papt2F/1R specifični oligonukleotidni prajmeri za identifikaciju *P. syringae* pv. *apata*, koji umnožavaju DNK fragment *gyrB* gena. Činjenica da se umnožava specifičan DNK fragment konzerviranog dela genoma svakako daje na pouzdanosti ovoj metodi i dokazuje da su razlike u sekvenci *gyrB* gena ovog patovara u poređenju sa drugim patovarima, fiksirane u ovom delu genoma koji se evolutivno veoma sporo menjao. Sa druge strane, fleksibilni deo genoma može podleći čestim promenama usled, npr. horizontalnog transfera gena, što ga čini svakako manje pouzdanim prilikom manipulacija u dijagnostičkim metodama (Boto, 2010). Uspešna amplifikacija specifičnog regiona kod svih 104 izolata, bila je pouzdan pokazatelj da svi testirani izolati pripadaju patovaru *apata*.

Molekularne tehnike kao što je Rep-PCR, uspešno su korišćene za utvrđivanje genetičke raznovrsnosti raznih patovara vrste *P. syringae* (Morris et al., 2000). Ponavljajuće palindromske sekvence mogu biti zastupljene u velikom broju kopija u hromozomima bakterija i njihove funkcije su višestruke. Rep elementi obezbeđuju vezujuća mesta za proteine kao što su Integrativni faktor domaćina (Integrated Host Factor) i DNK polimeraza I, ali i obezbeđuje mesta za isecanje koja koristi DNK žiraza kada raspliće DNK lanac (Messing et al., 2012). Takođe, detekcija Rep elemenata je



korišćena za brzu identifikaciju biljnih patogena (Louws et al. 1998). Jedna od najzastupljenijih uloga ponavljajućih palindromskih sekvenci jeste u genetičkoj karakterizaciji i utvrđivanju genetičkog diverziteta biljnih patogena. U studiji (Martin-Sanz et al., 2012), korišćen je Rep-PCR za proučavanje intra-patovarske genetičke raznovrsnosti *P. syringae* pv. *pisi* sojeva, i uspešno je izdvojeno 19 različitih genetičkih profila, a REP-PCR prajmerima je generisan najveći broj polimorfni traka. Studija koju su radili Prencipe et al., (2018) pokazala je da je ERIC-PCR prajmer za *P. syringae* pv. *actinidae* formirao identične genetičke profile za sve izolate sakupljene na teritoriji Italije izolovane u periodu od 2 godine. Međutim, u istoj studiji analiza GTG<sub>5</sub>-PCR i RAPD metodom otkrila je veliku varijabilnost povezanu sa godinom izolacije i geografskim poreklom. U studiji Giovanardi et al., (2018) rađenoj na *P. syringae* izolatima sa inficiranih listova, plodova i grana kajsija (*Prunus armeniaca* L.), detektovano je 11 grupa koje su imale različite genetičke profile na osnovu Rep-PCR karakterizacije. Takođe, u radu Gilbert et al., (2009) prikazan je visok diverzitet između *P. syringae* izolata prikupljenih sa različitih voćnjaka višnje (*Prunus cerasus* L.), trešnje (*Prunus avium* L.), kruške (*Pyrus communis* L.) i šljive (*Prunus domestica* L.) u Belgiji, koji je postignut korišćenjem Rep-PCR genetičkog profilisanja, pri čemu je BOX-PCR bio izuzetno koristan u razlikovanju rase 1 i rase 2 *P. syringae* pv. *morsprunorum* izolata. Ovim je pokazana sposobnost BOX-PCR metode u detektovanju *P. syringae* inter-patovarskog diverziteta.

U ovom radu, Rep-PCR diskriminisao je 25 različitih genetičkih profila korišćenjem sva tri prajmera, pri čemu je BOX-PCR generisao najveći broj polimorfni traka. Ovim metodom omogućeno je detektovanje klonova (izolati koji su imali identične genetičke profile), njihovo isključivanje iz daljih istraživanja, kao i formiranje reprezentativnih grupa svih tipova genetičkih profila. Takođe, na osnovu Rep-PCR profilisanja napravljen je prvi korak u genetičkoj karakterizaciji izolata koja će koristiti upravo za skrining genetičkog diverziteta. Veliki broj različitih genetičkih profila nam je ukazao da se radi o izuzetno visokom diverzitetu populacije *P. syringae* pv. *aptata* u Srbiji. Ovakva saznanja potvrđuje mišljenje da *P. syringae* predstavlja izuzetno genetički heterogenu vrstu (Baltrus et al., 2017), s tim što rezultati predstavljeni u ovoj studiji nagoveštavaju veoma visok intra-patovarski diverzitet. Veliki diverzitet na osnovu repetitivnih elementa nam je pomogao u formiranju pretpostavke da infekcija listova

šećerne repe nije monoklonalna, odnosno da postoji više različitih linija infekcije. Sa druge strane, uzrok visokog genetičkog diverziteta može biti i veliki broj rekombinacija (Baltrus et al., 2017). Distribucija svih grupa profila dobijenih na osnovu Rep-PCR nam nije pokazala poseban obrazac geografske raspodele na osnovu kojeg bismo mogli da tvrdimo da je prisutnost određenih genetičkih profila karakteristična za pojedine delove AP Vojvodina. Profili su disperzivno raspoređeni po celoj ispitivanoj teritoriji, što nam može govoriti da je *P. syringae* pv. *aptata* prisutan duže nego što znamo na teritoriji Republike Srbije. Takođe, zbog nedostatka neke geografske barijere, kao i praksi koje se primenjuju u okviru konvencionalne poljoprivrede, na teritoriji severne pokrajine bilo bi potrebno izuzetno malo vremena da dođe do mešanja svih genetičkih profila. Analiziranjem rezultata distribucije grupa genetičkih profila primećeno je da je na lokalitetima u okviru centralne i južne Vojvodine prisutan izuzetno veliki diverzitet. Objašnjenje takvog rezultata se može potražiti u tome što se upravo u tim delovima AP Vojvodina nalazi najveći broj zasada šećerne repe pa je i najveći broj ispitivanih uzoraka došao sa tih područja. Istraživanja sa ciljem da se detektuje genetička heterogenost u okviru patovara *P. syringae* pv. *aptata* do sada nisu sprovedena. Stoga, ovaj rad predstavlja nove i izuzetno korisne informacije o nadolazećem patogenu koji iz godine u godinu predstavlja sve češći problem na poljima šećerne repe širom sveta.

Uzimajući u obzir metode koje se u poslednjih 30 godina koriste za pravljenje i analizu genetičkih profila, elektroforeza u pulsirajućem polju predstavlja metodu koja je imala veoma široku primenu u analizi epidemioloških odnosa na osnovu poređenja genetičkih profila između patogenih kliničkih bakterijskih izolata (Goering, 2010). PFGE predstavlja veoma diskriminativnu i informativnu metodu koja podrazumeva stvaranje genetičkih profila na osnovu analize celokupnog genoma, uz čiju pomoć se mogu detektovati promene na DNK molekulu koje imaju uticaj na restrikcione fragmente i PFGE profile (insercije, delecije, substitucije i rekombinacije) (Cantor et al., 1988; Goering, 2010). Što se tiče biljnih patogena, PFGE metoda se uglavnom koristila za utvrđivanje genetičkog srodstva između bakterijskih izolata koji su uzrokovali bolesti na biljkama (Egel et al., 1991; Grothues & Rudolph 1991; Zhang & Geider 1997; Basim & Basim 2018; Caruso et al., 2017). Analiza genetičkog diverziteta *P. syringae* patovara uz korišćenje PFGE metode se vršila u nekoliko značajnih studija. Konkretno, u studiji Ivanović et al., (2012) o sojevima *P. syringae* izolovanim sa različitih voćnih kultura u

Srbiji, PFGE se koristio za potvrđivanje visokih genetičkih varijacija u okviru bakterijskog hromozoma dobijenih pomoću REP-PCR, kao i za uspješno razlikovanje sojeve izolovanih sa listova višnje (*Prunus cerasus* L.) i šljive (*Prunus domestica* L.). Takođe, u studiji Guven et al. (2004) vršeno je određivanje genetičke raznovrsnosti *P. syringae* pv. *phaseolicola* sojeva koji su imali različito geografsko poreklo korišćenjem dva restrikciona enzima kada je otkrivena visoka genetička varijabilnost (28 i 29 različitih PFGE profila) 56 testiranih sojeva.

U ovom radu nakon izdvajanja reprezentativnih izolata na osnovu Rep-PCR metode, PFGE metoda je korišćena za dalje utvrđivanje intra-patovarske genetičke varijabilnosti *P. syringae* pv. *aptata* i grupisanje izolata. Ukupno je detektovano 17 različitih PFGE genetičkih profila, od 25 reprezentativnih izolata *P. syringae* pv. *aptata* izabranih na osnovu rep-PCR analize, dok je filogenetska analiza jasno izdvojila tri odvojene klade. Genetička raznolikost pokazuje da infekcija šećerne repe sa *P. syringae* pv. *aptata* u Vojvodini definitivno nije klonalna. Filogenetske analize nam sugerišu da izdvajanje tri jasno odvojene klade, potencijalno predstavljaju tri različite linije infekcije. Jedan od mogućih uzročnika velike genetičke varijabilnosti i novog genetičkog kapaciteta u okviru populacije, svakako jeste horizontalni transfer gena. Ovaj fenomen je veoma intenzivan kod bakterija, i s obzirom da *P. syringae* u okviru vrste ima različite ekotipove, (patogeni i nepatogeni sojevi; sojevi koji žive u agroekosistemima i sojevi koji žive u rečnim ekosistemima) vrlo lako može doći do horizontalnog transfera gena i samim tim ovako velikog diverziteta u populaciji. Svakako ne treba zaboraviti ni potencijalni doprinos rekombinacija ovakvom diverzitetu. Metoda PFGE se pokazala kao informativnija od rep-PCR i veoma je pogodna za karakterizaciju *P. syringae* pv. *aptata*.

Dalje razjašnjenje prethodno navedenih pretpostavki kao uzroka genetičkog diverziteta utvrđeno je korišćenjem analize sekvenci gena koji su odgovorni za najosnovnije funkcije u ćeliji. Genotipizacija patogenih bakterija predstavlja veoma važan faktor za klasifikaciju i identifikaciju različitih taksonomskih nivoa, kao i za analize genetičkog diverziteta (Glaeser & Kämpfer, 2015). Konkretno, MLSA se bazira na metodi genotipizacije sekvenci više različitih genskih lokusa (MLST) koja omogućava izučavanje molekularne epidemiologije i populacione genetike patogenih bakterija (Glaeser & Kämpfer, 2015). Ciljevi korišćenja ovakve genotipizacije jesu

utvrđivanje visokog intra-specijskog diverziteta, utvrđivanje klonalnosti kao i određivanje filogenetskih odnosa između testiranih izolata. Izbor i broj lokusa koji se analizira zavisi od bakterijskog taksona koji se izučava. Uglavnom se istražuju geni koji kodiraju proteine koji imaju ključne funkcije u ćeliji, jer se oni smatraju stabilnijim i manje podložnim genskim mutacijama a opet nisu toliko konzervirani kao geni za rRNK. Protein-kodirajući geni imaju niz prednosti u odnosu na RNK-kodirajuće gene koji se koriste kao molekularni markeri, kao i u filogenetskim analizama diverziteta. Protein-kodirajući geni se mogu koristiti na oba nivoa za filogenetsku analizu, analizu na osnovu aminokiselina i analizu na osnovu nukleotida. Poravnanje proteina omogućava rešavanje filogenetskih odnosa na višim taksonomskim nivoima (domen ili razdeo) kada su jedna ili više kodon pozicija zasićene (Rajwar & Sahgal, 2016).

Nakon genetičkog profilisanja, odabrani reprezentativni izolati su podvrgnuti analizi intra-patovarske genetičke raznovrsnosti na osnovu sekvenci 4 gena koja su u radu (Hwang et al., 2005) potvrđena kao dovoljno diskriminatorska za istraživanje diverziteta patogena *P. syringae*.

U radu Case et al. (2007) pokazano je da protein kodirajući gen (*rpoB* gen) omogućava istu količinu informacija u filogeniji bakterija kao 16S rRNK, koja je predstavljala zlatni standard, čak je na nivou vrste i podvrste gen *rpoB* pružio bolju filogenetsku rezoluciju. Filogenetska rezolucija predstavlja sposobnost razdvajanja ili raspodele organizama podvrgnutih filogenetskim analizama u više odvojenih grupa, te stoga veća rezolucija omogućava potpunije istraživanje diverziteta (Swenson, 2009). Takođe, u studiji koju su sprovedi Rajwar & Sahgal (2016) vršeno je poređenje između 16S rRNK i *rpoD* gena na primeru vrsta iz roda *Pseudomonas*, s ciljem da se proceni korišćenje alternativnog gena, koji bi imao diskriminatorski potencijal kao sveobuhvatni genetički marker u molekularnoj mikrobijalnoj ekologiji kao i u studijama diverziteta vrsta iz ovog roda. U istoj studiji pokazano je da *rpoD* gen obezbeđuje veću rezoluciju u filogenetskim analizama. (Rajwar & Sahgal, 2016). Ovo je verovatno razlog zašto je *rpoD* gen korisniji od 16S rRNA gena u analizi diverziteta na nivou taksonomskih kategorija ispod nivoa vrste. Takođe, *rpoD* gen je često i vrlo uspešno korišćen za klasifikaciju filogrupa ili "genomovrsta" u okviru *P. syringae* kompleksa (Parkinson et al., 2011).

Međutim, u ovom radu analiza parcijalne sekvence *rpoD*, kao i *gltA* gena za 25 reprezentativnih izolata *P. syringae* pv. *aptata* pokazala je da su svi izolati imali identične sekvence. Ovim rezultatima se došlo do zaključka da *rpoD* i *gltA* geni nisu dovoljno diskriminatorski za utvrđivanje intra-patovarskog diverziteta kao i za razlikovanje izolata iz *P. syringae* pv. *aptata* kolekcije. Sa druge strane, *gyrB* i *gapA* geni su se pokazali kao veoma informativni i diskriminatorski za genetičku diferencijaciju *P. syringae* pv. *aptata* izolata. Četiri različite alelske varijante koje su izdvojene na osnovu *gyrB*, odnosno 3 na osnovu *gapA* gena, potvrdile su prethodno utvrđeno grupisanje analizom PFGE genetičkih profila. Za gen *gyrB*, slične grupe su izdvojene kao u PFGE analizi, osim što je PFGE klaster I bio podeljen u dve grupe, *gyrB* alelske varijante I i II. Alelske varijante dobijene iz analize gena *gapA* su se preklapale sa PFGE klasterima, izuzev izolata P100, P18 i P40, koji su bili locirani u *gapA* alelskoj varijanti I, a u PFGE analizi u klaster II. Filogenetsko stablo dobijeno na osnovu podataka konkatamera sekvenci četiri testirana gena pokazalo je da su izolati *P. syringae* pv. *aptata* odvojeni u 2 velika klastera koji je, svaki za sebe, podeljen u dva podklastera (slika 4.11). Takođe, analiza konkatemernih sekvenci nam je pokazala da se *P. syringae* pv. *aptata*, iako veoma slična, ipak razlikuje od *P. syringae* pv. *atrofaciens* i *P. syringae* pv. *syringae*. Utvrđenim diverzitetom na osnovu sekvenci "housekeeping" gena, koji su veoma evolutivno stabilni, možemo zaključiti da je uzrok ovako velikog diverziteta najverovatnije prisustvo više različitih linija (izvora) infekcije šećerne repe. Horizontalni transfer gena, iako veoma čest među mikroorganizmima nije mogao u velikoj meri uticati na "housekeeping" gene jer su deo konzerviranog dela genoma, te stoga nije mogao biti izvor ovako velikog diverziteta među obrađivanim sekvencama. Njegov uticaj bi mnogo biti veći na diverzitet patogenosti, jer upravo mobilni genetički elementi mogu kodirati faktore patogenosti (npr. efektore), odnosno na razmenu gena odgovornih za virulenciju koji su uglavnom deo fleksibilnog dela genoma (Hacker et al., 1997). Na osnovu rezultata utvrđivanja intra-patovarskog genetičkog diverziteta u ovom radu može se zaključiti da se klasteri dobijeni korišćenjem PFGE i MLSA preklapaju i pokazuju da u Srbiji postoji genetički promenljiva populacija *P. syringae* pv. *aptata*. Međutim, ova studija nije bila u stanju da potvrdi korelaciju između genetičke varijabilnosti i geografske lokalizacije izolata.

Filogenetska analiza *P. syringae* kompleksa je sprovedena u brojnim studijama (Sawada et al., 1999; Sarkar & Guttman, 2004; Berge et al., 2014). Najnovija filogenetska studija o *P. syringae* pokazuje da filogrupa 2 predstavlja najrasprostranjeniju i ujedno najraznovrsniju filogrupu *P. syringae* kompleksa, koja je podeljena u 5 odvojenih podgrupa, od čega svaka sadrži sojeve koji nisu izolovani sa biljaka (Berge et al., 2014). Filogrupo 2b pripadaju patovari *aptata*, *atrofaciens* i *syringae*, kao i veliki broj izolata izolovanih sa različitih prirodnih staništa (Berge et al., 2014). Raznovrsnost ove grupe se ogleda u tome što uključuje izuzetno patogene sojeve, ali i sojeve sa veoma slabom patogenim potencijalom, kao i u tome što se u okviru ove grupe nalaze sojevi koji naseljavaju veoma raznovrsna staništa i različite ekološke niše. Međutim, ovaj rad predstavlja prvi izveštaj o genetičkom diverzitetu u okviru patovara *P. syringae* pv. *aptata*. Na osnovu Multiplex PCR metode ustanovljeno je da svi izolati u sakupljenoj kolekciji pripadaju filogenetskoj grupi 2, što je bilo i očekivano s obzirom da su izolati identifikovani kao *P. syringae* pv. *aptata*. U filogenetskoj analizi *cts* gena, koja je urađena Neighbour-joining metodom, uzimajući u obzir reprezentativne izolate iz kolekcije i referentne sojeve, koji obuhvataju sve filogenetske grupe i sve do sada poznate patovare, jasno je potvrđen njihov filogenetski status. Svi izolati su bili filogenetski slični sa sojevima iz 02b filogenetske klade, čak identični sa *P. syringae* sojem izolovanim sa listova kajsije.

Svih 25 reprezentativnih izolata iz šećerne repe pokazalo je sposobnost da izazovu bolest (virulenciju), što je uzrokovalo slične simptome lisne pegavosti kao što su oni uočeni na terenu. Sa druge strane, intenzitet infekcije (agresivnost) među testiranim izolatima je bio jako raznovrstan. Četiri sorte šećerne repe korišćene u ovoj studiji predstavljaju najčešće sorte na komercijalnim zasadima u Srbiji, i sve predstavljaju hibride sa ugrađenim genom za otpornost prema *Cercospora* i *Rhizoctonia* fungalnim patogenima. Rezultati koji ukazuju da su sorte Jasmina i Marinela bile osetljivije na bakterijsku pegavost listova koje je izazivao *P. syringae* pv. *aptata*, u poređenju sa sortama Lara i Serenada, mogla bi imati praktičnu važnost za buduće upravljanje proizvodnjom šećerne repe u Srbiji. Visok stepen genetičke i patogene raznovrsnosti *P. syringae* pv. *aptata* otkriven u istoj godini kada i prvo otkriće ovog patogena može se objasniti činjenicom da je ovaj patogen verovatno bio prisutan ranije u poljima šećerne repe. Agrometeorološki uslovi u momentu detektovanja bolesti

nesumnjivo su doprineli ozbiljnosti i širenju infekcije izazvane *P. syringae* pv. *aptata*, koja je bila mnogo primetnija nego u prethodnim godinama. Takođe je moguće da je zbog sličnosti sa simptomima koje izaziva fungalni patogeni iz roda *Cercospora* infekcija šećerne repe sa *P. syringae* pv. *aptata* nije primećena tokom prethodnih godina.

Razumevanje bakterijske klonalne populacione strukture je suštinska komponenta za razumevanje bakterijske patogeneze, stoga ispitivanje nastanka klonalnih linija sa visokom virulencijom i agresivnošću kod bakterijskih populacija nije samo nezaobilazni epidemiološki cilj istraživanja, već i sredstvo za identifikaciju i karakterizaciju faktora povezanih sa virulencijom (Sarkar & Guttman 2004). Da bismo bolje razumeli i procenili strukturu populacije *P. syringae* pv. *aptata* u Srbiji, u ovom radu je izvršena korelacija MLSA i patogenih karakteristika izolata iz kolekcije. Jednostavno poređenje pokazalo je da su svi visoko agresivni izolati na svim sortama grupisani u jedan MLSA klaster, *gyrB* (alelska varijanta IV) i *gapA* (alelska varijanta II) gena. Ove alelske varijante su, takođe, uključivale i sojeve koji su uzrokovali intermedijerni i slabi intenzitet infekcije (slike 4.8 i 4.9). Ostali klasteri sastojali su se samo od sojeva koje uzrokuju intermedijarni i slabi intenzitet infekcije. Ovakvi rezultati istraživanja potvrđuju postojanje različitih filogenetskih i patogenih grupa *P. syringae* pv. *aptata* u Srbiji.

*P. syringae* filogenetski kompleks je podeljen na domaćin-specifične taksonomske jedinice, patovare, koji predstavljaju patogene varijetete, izazivače bolesti samo na specifičnim domaćinima (Dye et al., 1980). Međutim, poslednjih godina su publikovani brojni izveštaji koji pokazuju da "specijalizovani" patovari imaju znatno širi opseg domaćina nego što se mislilo. *P. syringae* pv. *lachrymans*, uzročnik pegavosti listova na biljkama iz familije Cucurbitaceae, uzrokuje bolesti na višegodišnjoj biljnoj vrsti, beli ptičji raj (*Strelitzia augusta* Thunb.), u prirodnim uslovima (Polizzi et al., 2005). Isto tako, *P. syringae* pv. *tabaci* uzročnik bolest na biljkama duvana, izaziva bolest na biljkama kafe (Destéfano et al., 2010). Što se tiče *P. syringae* pv. *aptata*, takođe je publikovano nekoliko radova koji izveštavaju o tome da izaziva bolest na različitim biljnim vrstama, i to iz familija Cucurbitaceae i Amaranthaceae (Morris et al., 2000; Koike et al., 2003; Dutta et al., 2014; Sedighian et al., 2014; Arabiat et al., 2016). Na osnovu svih ovih podataka u naučnoj zajednici se počeo preispitivati koncept

patovara, kao i same specifičnosti za određene domaćine (Vinatzer et al., 2016). Takođe, (Lamichhane et al., 2015) navode da trenutni taksonomski sistem patovara može imati izuzetno negativne posledice na razumevanje epidemiologije i upravljanje bolestima uzrokovanim ovim bakterijskim biljnim patogenom. S tim u vezi, u ovom radu je ispitivan, opseg domaćina korišćenjem 20 izolata *P. syringae* pv. *aptata* na 16 različitih biljnih vrsta. Na osnovu rezultata ustanovljen je izuzetno heterogen patogeni diverzitet testiranih izolata. Posebno veliki opseg potencijalnih domaćina su pokazali izolati koji su visoko agresivni, i to sojevi P21 i P23 koji su izazvali bolest na svim testiranim biljkama. Sa druge strane soj P16 je izazvao bolest samo na biljkama peršuna. Visok patogeni diverzitet u okviru *P. syringae* pv. *aptata* populacije je potpuno u skladu sa karakteristikama filogenetske grupe kojoj pripada. Na osnovu poređenja filogenetskog statusa i opsega domaćina jasno je pokazano da u okviru populacija *P. syringae* pv. *aptata* postoje izrazito agresivni sojevi koji imaju sposobnost da izazovu bolest na veoma širokom opsegu domaćina iz različitih biljnih familija. Ova činjenica jasno stavlja do znanja da treba voditi računa o biljnim kulturama koje se gaje na lokalnom nivou, kao i o kulturama koje se koriste u rotaciji sa originalnim domaćinima sa kojeg su sojevi izolovani, jer mogu biti u opasnosti od pojave bolesti izazvane ovim patogenom. Takođe, ovakvi rezultati dovode do zaključka da je ovaj biljni patogen u potpunosti sposoban da na drugim biljnim monokulturama "preživi" nepovoljne uslove i nakon toga ponovo "oživi" uzrokujući bolest.

*P. syringae* predstavlja visoko klonalnu vrstu biljnog patogena, čije klonalne linije mogu da se razvijaju u okviru populacije apsolutno nezavisno od drugih linija i to u smislu konzerviranog dela genoma (Sarkar & Guttman, 2004). U ovom radu pokazano je da postoji više različitih klonalnih linija, koje verovatno vode poreklo od različitih izvora infekcije, i koje sadrže sojeve sa izuzetno jakim patogenim potencijalom (*gyrB* alelska varijanta IV, *gapA* alelska varijanta III). Na osnovu ovoga možemo zaključiti da postoje indicije da se klonalna linija sa izuzetno virulentnim i agresivnim sojevima širi i razvija nezavisno u populaciji i samim tim saznanjem otvara se mogućnost za pojavu još jačih epidemija na širokom opsegu biljnih domaćina ovog patogena. S tim u vezi, u ovom radu prikazan je jedan od alternativnih načina tretmana bolesti biljaka uzrokovanih ovim patogenom, a to je biološka kontrola korišćenjem proverenog antibakterijskog agensa, kao što je *Bacillus amyloliquefaciens*.



Brojne studije pokazale su ulogu lipopeptidnih jedinjenja u direktnom uticaju na inhibiciju biljnih patogena (Toure et al., 2004; Berić et al., 2012; Cao et al., 2012; Dimkić et al., 2013, 2015). Skrining potencijalnih antimikrobnih supstanci protiv patogena se obično vrši određivanjem minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) (Kadaikunnan et al., 2015; Balouiri et al., 2016). Na taj način, u studiji Bais et al., (2004) pokazano je na osnovu mikrodilucione metode da surfaktin koji proizvodi soj *B. subtilis* 6051 ima vrednost MIC od 25 mg/mL za *P. syringae* pv. *tomato* DC3000. U studiji Nikolić et al. (2018) najniža MIC vrednost svih suvih lipopetidnih ekstrakata zabeležena je za ekstrakt *B. amyloliquefaciens* SS-12.6 (0.63 mg/mL). Takođe, sve kombinacije koje su sadržale sirovi ekstrakt iz SS-12.6 imale su najmanju vrednost MIC-a protiv *P. syringae* pv. *aptata*. Ekstrakti iz ko-kultivisanih sojeva *B. amyloliquefaciens* (SS-12.6; SS-38.4) i soja *Bacillus pumilus* (SS-10.7) imali su nisku MIC vrednost (0,83 mg/mL), znatno nižu od mešavine sirovih ekstrakata ekstrahovanih iz istih pojedinačnih sojeva (2,5 mg/mL) (Nikolić et al., 2018).

*Bacillus* sojevi proizvode više od jedne familije lipopetida koja bi mogla biti od koristi zbog interakcije između različitih jedinjenja (Falardeau et al., 2013). Mnoge studije koje su uključivale i različite mešavine sojeva, bile su posvećene inhibiciji fungalnih patogena, te su stoga studije o biološkoj kontroli bakterijskih fitopatogena oskudne. (Etchegaray et al., 2008) pokazali su da mešavina lipopeptida surfaktina i iturina uspešno modifikuje i dezintegriše ćelijski zid *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* i *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, koji su uzročni agensi stvaranja biljnog kancera citrusa. Takođe, u studiji (Mora et al., 2015) potvrđen je pozitivan odnos između jakih antibakterijskih aktivnosti *Bacillus* izolata (*B. subtilis/amyloliquefaciens*) sa prisustvom gena za surfaktin i fengicin protiv *Ralstonia solanacearum*, *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Xanthomonas arboricola* pv. *fragariae* i *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*. Studija (Dimkić et al., 2017) je evaluirala proizvodnju i sadržaj sirovih lipopetidnih ekstrakata iz nekoliko sojeva koji pripadaju rodu *Bacillus*, uključujući izolat testiran u ovoj studiji. Utvrđeno je da su lipopetidni ekstrakti SS-10.7, SS-12.6 i SS-38.4 uglavnom sastavljeni od surfaktina, fengicina A i iturin A, a za iturin je pokazano da je odgovoran za inhibiciju rasta *P. syringae* pv. *aptata* P16 . Na ovaj način je detektovan lipopetid koji ima najviše uticaja na supresiju patogena.

U ovoj studiji istraživana je antimikrobni potencijal ćelijske kulture *B. amyloliquefaciens* SS-12.6 *in planta*, protiv *P. syringae* pv. *aptata* izolovane iz nekrotičnih listova šećerne repe, kako bi se obezbedilo potencijalno rešenje za kontrolu uzročnika bolesti lisne pegavosti. Do danas su objavljene brojne studije o biološkoj kontroli biljnih patogena korišćenjem čiste bakterijske kulture sojeva iz grupe *B. subtilis* (Zerouh et al., 2011; Jiang et al., 2015; Huang et al., 2016). Prema studiji koju su sprovedi Lanna Filho et al. (2013) *B. amyloliquefaciens* i *B. pumilus* su uspešno korišćeni za biokontrolu fitopatogena *P. syringae* pv. *tomato* na mladim biljkama paradajza. Oni su zabeležili smanjenje populacije patogena i do 84% i 97% na listovima prethodno tretiranim *B. pumilus* i *B. amyloliquefaciens*. U radu (Fousia et al., 2016) autori su pokazali da su biljke paradajza tretirane patogenom *P. syringae* pv. *tomato* i nakon toga sa sojem *B. subtilis* KST 713 imale samo 7% nekrotičnih listova. Takođe, 60% svih tretiranih biljaka sa sojem *B. subtilis* KST 713 je bilo bez simptoma, dok su biljke tretirane samo patogenom, kao i 70% biljaka tretiranih hidroksidom bakra pokazale simptome bolesti (Fousia et al., 2016).

Slično tome, u ovom radu koristili smo čistu kulturu *B. amyloliquefaciens* SS-12.6, koja se već pokazala kao veoma dobar mikrobijalni antagonist, za inokulaciju lisnih petiola na biljkama šećerne repe. Razarajući simptomi bolesti sa nekrotičnim tkivom na glavnom nervu i lisnoj ploči pojavili su se na biljkama tretiranim samo sojem P53. Kod biljaka tretiranih patogenom i sojem SS-12.6 nekroza se lagano širila samo kroz glavni nerv. Ostali delovi lisnih ploča ostali su netaknuti, a opšte stanje biljaka bilo je dobro. Smanjenje intenziteta bolesti u rasponu od 60% - 92% dobijeno tretiranjem sojem SS-12.6 preporučuje ga za biološku kontrolu *P. syringae* pv. *aptata*. Kako je ranije navedeno, intenzitet bolesti *P. syringae* pv. *aptata* na sortama šećerne repe (Marinela, Jasmina, Serenada i Lara) ocenjen je u ovoj studiji, i sorte Jasmina i Marinela su predstavljene kao najosetljivije. Što se tiče suzbijanja simptoma bolesti bilo je podjednako značajno za sve testirane sorte u poređenju sa biljkama tretiranim samo patogenom.

Ovaj uvid u trenutni status *P. syringae* pv. *aptata* populacija će pružiti korisne informacije za dalje istraživanje epidemiologije, ekologije i genetičke raznovrsnosti ovog biljnog patogena. Takvo istraživanje je neophodno kako bi se istražili potencijalno novi izvori infekcije, utvrdili agrometeorološki uslovi povoljni za izbijanje bolesti i

osigurali efikasnu kontrolu bolesti i proizvodnju šećerne repe. Buduća istraživanja biće usresređena na izolaciju *P. syringae* pv. *aptata* iz različitih prirodnih staništa i traženje prirodnih rezervoara (rezervoara van agroekosistema) ovog patogena u Srbiji, kao i detaljnije određivanje filogenetskog statusa kolekcije dopunjene sa izolatima iz prirode. Ovakvi nalazi bi mogli poslužiti za dalje istraživanje interakcija patogena i antagonista, kao i alternativnu i efikasnu strategiju za kontrolu bolesti. Srbija predstavlja jednog od najvećih proizvođača šećerne repe u jugoistočnoj Evropi. Ova činjenica stavlja rezultate naše studije u fokus interesovanja i ističe potrebu za dodatnim istraživanjima o potencijalnoj upotrebi biokontronih agenasa. Što se tiče biološke kontrole, naredno istraživanje će biti fokusirano na testiranje biopesticida baziranih na sojevima iz roda *Bacillus*, direktno na poljima šećerne repe, čija implementacija predstavlja završni korak u istraživanju biološke kontrole ovog patogena i svakako može predstavljati prekretnicu u menadžmentu kontrole bolesti bilja i same proizvodnje šećerne repe.

# ZAKLJUČCI

## 6. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata prikazanih u ovom radu, mogu se izvesti sledeći zaključci:

- ❖ Na osnovu morfoloških, nutritivnih i fitopatoloških karakteristika svi izolati iz sakupljene kolekcije su determinisani kao vrata *Pseudomonas syringae*.
- ❖ Molekularnom identifikacijom uz pomoć specifičnih prajmera Papt2F/1R utvrđeno je da svi izolati pripadaju patovaru *Pseudomonas syringae* pv. *aptata*.
- ❖ Genetičko profilisanje na osnovu repetitivnih palindromskih sekvenci (rep-PCR) unutar genoma pokazalo je postojanje 25 grupa (12 različitih BOX profila, 7 REP profila i 6 ERIC profila) u okviru kolekcije. Genetičko profilisanje na osnovu celokupnog genoma (PFGE) 25 reprezentativnih izolata otkrilo je 17 različitih genetičkih profila.
- ❖ Na osnovu sekvencioniranja visoko konzervativnog *gyrB* gena reprezentativnih izolata i analize dobijenih sekvenci utvrđeno je postojanje 4 različite alelske varijante, dok su analizom *gapA* gena izdvojene 3 različite alelske varijante.
- ❖ Analizom sekvenci *rpoD* i *gltA* gena dobijena su monofiletička stabla, i utvrđeno je da ova dva gena nisu dovoljno diskriminatorna za utvrđivanje intrapatovarskog diverziteta izolata *P. syringae* pv. *aptata*.
- ❖ Geografska distribucija genetičkih profila i alelskih varijanti nije pokazala određeni obrazac raspodele, već su profili disperzivno raspoređeni na teritoriji AP Vojvodina, sa tim da je nešto veći diverzitet profila primećen je u centralnoj i južnoj Vojvodini.
- ❖ Utvrđivanjem filogenetskog statusa izolata *P. syringae* pv. *aptata* u okviru *P. syringae* kompleksa pokazano je da svi izolati iz kolekcije pripadaju 02b filogenetskoj grupi.

- ❖ Analizom patogenih karakteristika reprezentativnih izolata 14 dana nakon inokulacije listova šećerne repe utvrđeno je da je najveću agresivnost imalo 30% testiranih izolata na sorti Marinela, 15% izolata na sorti Jasmina i 7% izolata na sorti Serenada. Intermedijarnu agresivnost imalo je 44% izolata na sorti Jasmina, 37% na sorti Marinela, 30% na sorti Serenada i 4% na sorti Lara. Najslabiju agresivnost imalo je 96% izolata na sorti Lara, 63% na sorti Serenada, 41% na sorti Jasmina i 33% na sorti Marinela.
- ❖ Na osnovu patogenih karakteristika izolati P97 i P100 su se pokazali kao najagresivniji, izolat P16 je pokazao najslabiju agresivnost, dok se Lara pokazala kao najrezistentnija sorta šećerne repe na lisnu pegavost koju izaziva *P. syringae* pv. *aptata*.
- ❖ Analizom potencijalnog opsega biljnih domaćina utvrđeno je izuzetno veliki opseg za većinu izolata *P. syringae* pv. *aptata*, osim za izolate P16, P17 i P57 koji su izazivali bolest na malom broju novih domaćina. Izolati P21 i P22 su bili najvirulentniji i izazvali su simptome bolesti na svih 16 testiranih biljnih kultura, dok je P21 ujedno označen i kao najagresivniji izolat na potencijalno novim domaćinima.
- ❖ Korelacijom genetičkih i patogenih karakteristika utvrđeno je da najagresivniji *P. syringae* pv. *aptata* izolati pripadaju istoj alelskoj varijanti na osnovu analize *gyrB* (alelska varijanta IV) i *gapA* (alelskoj varijanti III) parcijalnih sekvenci.
- ❖ Analizom molekularnih i patogenih karakteristika celokupne kolekcije izolata *P. syringae* pv. *aptata* pretpostavljamo postojanje najmanje 3 različite linije infekcije zasada šećerne repe na teritoriji AP Vojvodina.

- ❖ Analizom biokontrolnog efekta u *in planta* testovima utvrđen je veoma visok stepen biološke kontrole izolata *P. syringae* pv. *aptata* P53 korišćenjem soja *Bacillus amyloliquefaciens* SS-12.6. Stepem supresije patogena na sorti Serenada bio je za 80%, na sorti Jasmina je za 77%, na sorti Marinela za 72% i na sorti Lara za 10%.
- ❖ Gledano sveobuhvatno, dobijeni rezultati upozoravaju na pretećeg patogena šećerne repe, koji već poseduje veliki inta-patovarski diverzitet, koji može poteći sa drugih biljaka ili biti rezervoar infekcije za druge biljke. Biološka kontrola izolata *P. syringae* pv. *aptata* je moguća i efikasna.

# LITERATURA



## 7. LITERATURA

- Agarwal, M., Dheeman, S., Dubey, R. C., Kumar, P., Maheshwari, D. K., & Bajpai, V. K. (2017). Differential antagonistic responses of *Bacillus pumilus* MSUA3 against *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* causing fungal diseases in *Fagopyrum esculentum* Moench. *Microbiological research*, 205, 40-47.
- Alfano, J. R., & Collmer, A. (2004). Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense. *Annual Review of Phytopathology*, 42, 385-414.
- Andreote, F. D., de Araújo, W. L., de Azevedo, J. L., van Elsas, J. D., da Rocha, U. N., & van Overbeek, L. S. (2009). Endophytic colonization of potato (*Solanum tuberosum* L.) by a novel competent bacterial endophyte, *Pseudomonas putida* strain P9, and its effect on associated bacterial communities. *Applied and environmental microbiology*, 75(11), 3396-3406.
- Arabiati, S., Chanda, A. K., Chittem, K., & Khan, M. F. R. (2016). First report of *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* causing bacterial blight of sugar beet (*Beta vulgaris*) in Oregon. *Plant Disease*, 100(11), 2334-2334.
- Attard, E., Yang, H., Delort, A. M., Amato, P., Pöschl, U., Glaux, C., Koop, T., & Morris, C. E. (2012). Effects of atmospheric conditions on ice nucleation activity of *Pseudomonas*. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 12(22), 10667-10677.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE et al., 1992. Current Protocols in Molecular Biology. Vol. I: Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York, USA.
- Bais, H. P., Fall, R., & Vivanco, J. M. (2004). Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. *Plant physiology*, 134(1), 307-319.
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of pharmaceutical analysis*, 6(2), 71-79.
- Baltrus, D. A., Nishimura, M. T., Romanchuk, A., Chang, J. H., Mukhtar, M. S., Cherkis, K., Roach, J., Grant, S. R., Jones, C. D., & Dangl, J. L. (2011). Dynamic evolution of pathogenicity revealed by sequencing and comparative genomics of 19 *Pseudomonas syringae* isolates. *PLoS pathogens*, 7(7), e1002132.

- Baltrus, D. A., McCann, H. C., & Guttman, D. S. (2017). Evolution, genomics and epidemiology of *Pseudomonas syringae*: challenges in bacterial molecular plant pathology. *Molecular plant pathology*, *18*(1), 152-168.
- Bartoli, C., Berge, O., Monteil, C. L., Guilbaud, C., Balestra, G. M., Varvaro, L., Jones, C., Dangl, J. L., Baltrus, D. A., Sands, D. C., & Morris, C. E. (2014). The *Pseudomonasviridiflava* phylogroups in the *P. syringae* species complex are characterized by genetic variability and phenotypic plasticity of pathogenicity-related traits. *Environmental microbiology*, *16*(7), 2301-2315.
- Basım, H., & Basım, E. (2018). Phenotypic and genotypic characterization of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* causing tomato bacterial canker and wilt disease in Turkey. *European Journal of Plant Pathology*, *151*(2), 355-369.
- Bergan, T. (1981). Human-and animal-pathogenic members of the genus *Pseudomonas*. In *The prokaryotes*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 666-700.
- Berge, O., Monteil, C. L., Bartoli, C., Chandeysson, C., Guilbaud, C., Sands, D. C., & Morris, C. E. (2014). A user's guide to a data base of the diversity of *Pseudomonas syringae* and its application to classifying strains in this phylogenetic complex. *PLoS one*, *9*(9), e105547.
- Berić, T., Kojić, M., Stanković, S., Topisirović, L., Degrassi, G., Myers, M., Venturi, V., & Fira, Đ. (2012). Antimicrobial activity of *Bacillus sp.* natural isolates and their potential use in the biocontrol of phytopathogenic bacteria. *Food Technology and Biotechnology*, *50*(1), 25-31.
- Bidwai, A. P., & Takemoto, J. Y. (1987). Bacterial phytotoxin, syringomycin, induces a protein kinase-mediated phosphorylation of red beet plasma membrane polypeptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *84*(19), 6755-6759.
- Biers, E. J., Sun, S., & Howard, E. C. (2009). Prokaryotic genomes and diversity in surface ocean waters: interrogating the global ocean sampling metagenome. *Applied and environmental microbiology*, *75*(7), 2221-2229.
- Boto, L. (2010). Horizontal gene transfer in evolution: facts and challenges. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, *277*(1683), 819-827.
- Bradbury, J. F. (1986). *Guide to plant pathogenic bacteria*. CAB international. Oxfordshire, UK.
- Bull, C. T., & Koike, S. T. (2015). Practical benefits of knowing the enemy: modern molecular tools for diagnosing the etiology of bacterial diseases and understanding the taxonomy and diversity of plant-pathogenic bacteria. *Annual review of phytopathology*, *53*, 157-180.

- Buttimer, C., McAuliffe, O., Ross, R. P., Hill, C., O'Mahony, J., & Coffey, A. (2017). Bacteriophages and bacterial plant diseases. *Frontiers in microbiology*, 8, 34.
- Buttner, D., & Bonas, U. (2006). Who comes first? How plant pathogenic bacteria orchestrate type III secretion. *Current opinion in microbiology*, 9(2), 193-200.
- Cachatori JR, 2011. Development methodology for the diagnosis of *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* causal agent of bacterial spot of beet leaves. PhD thesis, Insitute of Biology-Agency for Agribusiness Technology, Sao Paulo, Brasil.
- Cantor, C. R., Smith, C. L., & Mathew, M. K. (1988). Pulsed-field gel electrophoresis of very large DNA molecules. *Annual review of biophysics and biophysical chemistry*, 17(1), 287-304.
- Cao, Y., Xu, Z., Ling, N., Yuan, Y., Yang, X., Chen, L., Shen, B., & Shen, Q. (2012). Isolation and identification of lipopeptides produced by *B. subtilis* SQR 9 for suppressing Fusarium wilt of cucumber. *Scientia horticulturae*, 135, 32-39.
- Caruso, P., Biosca, E. G., Bertolini, E., Marco-Noales, E., Gorris, M. T., Licciardello, C., & López, M. M. (2017). Genetic diversity reflects geographical origin of *Ralstonia solanacearum* strains isolated from plant and water sources in Spain. *International Microbiology*, 20(4), 155-164.
- Case, R. J., Boucher, Y., Dahllöf, I., Holmström, C., Doolittle, W. F., & Kjelleberg, S. (2007). Use of 16S rRNA and rpoB genes as molecular markers for microbial ecology studies. *Applied and environmental microbiology*, 73(1), 278-288.
- Cawoy, H., Bettiol, W., Fickers, P., & Ongena, M. (2011). *Bacillus*-based biological control of plant diseases. In *Pesticides in the modern world-pesticides use and management*. InTech. London, UK.
- Cepni, E., & Gurel, F. (2012). Variation in extragenic repetitive DNA sequences in *Pseudomonas syringae* and potential use of modified REP primers in the identification of closely related isolates. *Genetics and molecular biology*, 35(3), 650-656.
- Chowdhury, S. P., Hartmann, A., Gao, X., & Borriss, R. (2015). Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42—a review. *Frontiers in microbiology*, 6, 780.
- Cochet, N., & Widehem, P. (2000). Ice crystallization by *Pseudomonas syringae*. *Applied microbiology and biotechnology*, 54(2), 153-161.
- Collins, D. P., & Jacobsen, B. J. (2003). Optimizing a *Bacillus subtilis* isolate for biological control of sugar beet *Cercospora* leaf spot. *Biological control*, 26(2), 153-161.

- Considine, D. M. (2012). *Foods and food production encyclopedia*. Springer Science & Business Media. Berlin, Germany.
- Cunnac, S., Lindeberg, M., & Collmer, A. (2009). *Pseudomonas syringae* type III secretion system effectors: repertoires in search of functions. *Current opinion in microbiology*, 12(1), 53-60.
- Cuppels, D. A., & Elmhirst, J. (1999). Disease development and changes in the natural *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* populations on field tomato plants. *Plant disease*, 83(8), 759-764.
- Deep, A., Chaudhary, U., & Gupta, V. (2011). Quorum sensing and bacterial pathogenicity: from molecules to disease. *Journal of laboratory physicians*, 3(1), 4.
- Destéfano, S. A. L., Rodrigues, L. M. R., Beriam, L. O. S., Patrício, F. R. A., Thomaziello, R. A., & Rodrigues-Neto, J. (2010). Bacterial leaf spot of coffee caused by *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* in Brazil. *Plant Pathology*, 59(6), 1162-1163.
- Dimkić, I., Živković, S., Berić, T., Ivanović, Ž., Gavrilović, V., Stanković, S., & Fira, D. (2013). Characterization and evaluation of two *Bacillus* strains, SS-12.6 and SS-13.1, as potential agents for the control of phytopathogenic bacteria and fungi. *Biological Control*, 65(3), 312-321.
- Dimkić, I., Berić, T., Stević, T., Pavlović, S., Šavikin, K., Fira, D., & Stanković, S. (2015). Additive and synergistic effects of *Bacillus* spp. isolates and essential oils on the control of phytopathogenic and saprophytic fungi from medicinal plants and marigold seeds. *Biological Control*, 87, 6-13.
- Dimkić, I., Stanković, S., Nišavić, M., Petković, M., Ristivojević, P., Fira, D., & Berić, T. (2017). The profile and antimicrobial activity of bacillus lipopeptide extracts of five potential biocontrol strains. *Frontiers in microbiology*, 8, 925.
- Dulla, G. F., Krasileva, K. V., & Lindow, S. E. (2010). Interference of quorum sensing in *Pseudomonas syringae* by bacterial epiphytes that limit iron availability. *Environmental microbiology*, 12(6), 1762-1774.
- Dutta, B., Ingram, T., Gitaitis, R. D., Langston, D. B., Brenneman, T., Webster, T. M., & Davis, R. F. (2014). First report of bacterial blight of sugar beet caused by *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* in Georgia, USA. *Plant Disease*, 98(10), 1423-1423.
- Dye, D. W., Bradbury, J., Goto, M., Hayward, A. C., Lelliott, R. A., & Schroth, M. N. (1980). International standards for naming pathovars of phytopathogenic bacteria and a list of pathovar names and pathotype strains. *Review of Plant Pathology*, 59(4), 153-168.

- Egel, D. S., Graham, J. H., & Stall, R. E. (1991). Genomic relatedness of *Xanthomonas campestris* strains causing diseases of citrus. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(9), 2724-2730.
- Errakhi, R., Bouteau, F., Lebrihi, A., & Barakate, M. (2007). Evidences of biological control capacities of *Streptomyces* spp. against *Sclerotium rolfsii* responsible for damping-off disease in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(11), 1503-1509.
- Etchegaray, A., de Castro Bueno, C., de Melo, I. S., Tsai, S. M., de Fátima Fiore, M., Silva-Stenico, M. E., Beraldo de Moraes, L. A., & Teschke, O. (2008). Effect of a highly concentrated lipopeptide extract of *Bacillus subtilis* on fungal and bacterial cells. *Archives of microbiology*, 190(6), 611-622.
- Falardeau, J., Wise, C., Novitsky, L., & Avis, T. J. (2013). Ecological and mechanistic insights into the direct and indirect antimicrobial properties of *Bacillus subtilis* lipopeptides on plant pathogens. *Journal of chemical ecology*, 39(7), 869-878.
- Ferrante, P., & Scortichini, M. (2010). Molecular and phenotypic features of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* isolated during recent epidemics of bacterial canker on yellow kiwifruit (*Actinidia chinensis*) in central Italy. *Plant pathology*, 59(5), 954-962.
- Fousia, S., Paplomatas, E. J., & Tjamos, S. E. (2016). *Bacillus subtilis* QST 713 confers protection to tomato plants against *Pseudomonas syringae* pv *tomato* and induces plant defence-related genes. *Journal of Phytopathology*, 164(4), 264-270.
- Fuentes, E., Coe, H., Green, D., Leeuw, G. D., & McFiggans, G. (2010). Laboratory-generated primary marine aerosol via bubble-bursting and atomization. *Atmospheric Measurement Techniques*, 3(1), 141-162.
- 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 and Evolutionary Microbiology*, 49(2), 469-478.
- 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(2), 199-218.

- Giovanardi, D., Ferrante, P., Scortichini, M., & Stefani, E. (2018). Characterisation of *Pseudomonas syringae* isolates from apricot orchards in north-eastern Italy. *European Journal of Plant Pathology*, 1-17.
- Glaeser, S. P., & Kämpfer, P. (2015). Multilocus sequence analysis (MLSA) in prokaryotic taxonomy. *Systematic and applied microbiology*, 38(4), 237-245.
- Goel, A. K., Lundberg, D., Torres, M. A., Matthews, R., Akimoto-Tomiyama, C., Farmer, L., Dangl, J., & Grant, S. R. (2008). The *Pseudomonas syringae* type III effector HopAM1 enhances virulence on water-stressed plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21(3), 361-370.
- Goering, R. V. (2010). Pulsed field gel electrophoresis: a review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease. *Infection, Genetics and Evolution*, 10(7), 866-875.
- Green, S., Studholme, D. J., Laue, B. E., Dorati, F., Lovell, H., Arnold, D., Joan E. Cottrell, J. E., Bridgett, S., Blaxter, M., Huitema, E., Thwaites, R., Sharp, P. M., Jackson, R. W., & Kamoun, S. (2010). Comparative genome analysis provides insights into the evolution and adaptation of *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi* on *Aesculus hippocastanum*. *PLoS One*, 5(4), e10224.
- Griesbach E, Tyrach A, 1999. Evaluation of resistance to *Xanthomonas hortorum* pv. *pelargonii* at Pelargonium. *Beitrage zur Zuchtungsforchung*, 1, 68 –69.
- Grothues, D., & Rudolph, K. (1991). Macrorestriction analysis of plant pathogenic *Pseudomonas* species and pathovars. *FEMS microbiology letters*, 79(1), 83-88.
- Gunasekera, T. S., & Sundin, G. W. (2006). Role of nucleotide excision repair and photoreactivation in the solar UVB radiation survival of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a. *Journal of applied microbiology*, 100(5), 1073-1083.
- Guo, M., Kim, P., Li, G., Elowsky, C. G., & Alfano, J. R. (2016). A bacterial effector co-opts calmodulin to target the plant microtubule network. *Cell host & microbe*, 19(1), 67-78.
- Guttman, D. S., & Dykhuizen, D. E. (1994). Clonal divergence in *Escherichia coli* as a result of recombination, not mutation. *Science*, 266(5189), 1380-1383.
- Güven, K., Jones, J. B., Momol, M. T., & Dickstein, E. R. (2004). Phenotypic and genetic diversity among *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Journal of phytopathology*, 152(11-12), 658-666.
- Hacker, J., Blum-Oehler, G., Mühldorfer, I., & Tschäpe, H. (1997). Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Molecular microbiology*, 23(6), 1089-1097.

- Hacquard, S., Spaepen, S., Garrido-Oter, R., & Schulze-Lefert, P. (2017). Interplay between innate immunity and the plant microbiota. *Annual review of phytopathology*, *55*, 565-589.
- Hallau, L., Neumann, M., Klatt, B., Kleinhenz, B., Klein, T., Kuhn, C., Röhrig, M., Bauckhage, C., Kersting, K., Mahlein, A.-K., Steiner, U., Oerke, E.-C., & Steiner, U. (2018). Automated identification of sugar beet diseases using smartphones. *Plant Pathology*, *67*(2), 399-410.
- He, S. Y., Nomura, K., & Whittam, T. S. (2004). Type III protein secretion mechanism in mammalian and plant pathogens. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, *1694*(1-3), 181-206.
- He, P., Shan, L., Lin, N. C., Martin, G. B., Kemmerling, B., Nürnberger, T., & Sheen, J. (2006). Specific bacterial suppressors of MAMP signaling upstream of MAPKKK in *Arabidopsis* innate immunity. *Cell*, *125*(3), 563-575.
- Hirano, S. S., & Upper, C. D. (2000). Bacteria in the Leaf Ecosystem with Emphasis on *Pseudomonas syringae*—a Pathogen, Ice Nucleus, and Epiphyte. *Microbiology and molecular biology reviews*, *64*(3), 624-653.
- Hockett, K. L., Burch, A. Y., & Lindow, S. E. (2013). Thermo-regulation of genes mediating motility and plant interactions in *Pseudomonas syringae*. *PLoS One*, *8*(3), e59850.
- Hofte, M., & De Vos, P. (2007). Plant pathogenic *Pseudomonas* species. In *Plant-associated bacteria*. Springer, Dordrecht, Netherland. pp. 507-533.
- Huang, C. N., Lin, C. P., Hsieh, F. C., Lee, S. K., Cheng, K. C., & Liu, C. T. (2016). Characterization and evaluation of *Bacillus amyloliquefaciens* strain WF02 regarding its biocontrol activities and genetic responses against bacterial wilt in two different resistant tomato cultivars. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *32*(11), 183.
- Hulin, M. T., Mansfield, J. W., Brain, P., Xu, X., Jackson, R. W., & Harrison, R. J. (2018). Characterization of the pathogenicity of strains of *Pseudomonas syringae* towards cherry and plum. *Plant Pathology*, *67*(5), 1177-1193.
- Hutchison, M. L., Tester, M. A., & Gross, D. C. (1995). Role of biosurfactant and ion channel-forming activities of syringomycin in transmembrane ion flux: a model for the mechanism of action in the plant-pathogen interaction. *Molecular plant-microbe interactions: MPMI*, *8*(4), 610-620.

- Hwang, M. S., Morgan, R. L., Sarkar, S. F., Wang, P. W., & Guttman, D. S. (2005). Phylogenetic characterization of virulence and resistance phenotypes of *Pseudomonas syringae*. *Applied and Environmental Microbiology*, *71*(9), 5182-5191.
- Ivanović, Ž., Stanković, S., Živković, S., Gavrilović, V., Kojić, M., & Fira, D. (2012). Molecular characterization of *Pseudomonas syringae* isolates from fruit trees and raspberry in Serbia. *European journal of plant pathology*, *134*(1), 191-203.
- Ivanović, Ž., Blagojević, J., & Nikolić, I. (2018). Leaf spot disease on *Philodendron scandens*, *Ficus carica* and *Actinidia deliciosa* caused by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* in Serbia. *European Journal of Plant Pathology*, 1-7.
- Jiang, C. H., Wu, F., Yu, Z. Y., Xie, P., Ke, H. J., Li, H. W., Yu, Y. Y., . & Guo, J. H. (2015). Study on screening and antagonistic mechanisms of *Bacillus amyloliquefaciens* 54 against bacterial fruit blotch (BFB) caused by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. *Microbiological research*, *170*, 95-104.
- Joly, M., Attard, E., Sancelme, M., Deguillaume, L., Guilbaud, C., Morris, C. E., Amato, P., & Delort, A. M. (2013). Ice nucleation activity of bacteria isolated from cloud water. *Atmospheric environment*, *70*, 392-400.
- Kadaikunnan, S., Rejiniemon, T. S., Khaled, J. M., Alharbi, N. S., & Mothana, R. (2015). In-vitro antibacterial, antifungal, antioxidant and functional properties of *Bacillus amyloliquefaciens*. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, *14*(1), 9.
- Kaluźna, M., Albuquerque, P., Tavares, F., Sobiczewski, P., & Puławska, J. (2016). Development of SCAR markers for rapid and specific detection of *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* races 1 and 2, using conventional and real-time PCR. *Applied microbiology and biotechnology*, *100*(8), 3693-3711.
- Kennelly, M. M., Cazorla, F. M., de Vicente, A., Ramos, C., & Sundin, G. W. (2007). *Pseudomonas syringae* diseases of fruit trees: progress toward understanding and control. *Plant disease*, *91*(1), 4-17.
- Koike, S. T., Henderson, D. M., Bull, C. T., Goldman, P. H., & Lewellen, R. T. (2003). First report of bacterial leaf spot of Swiss chard caused by *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* in California. *Plant Disease*, *87*(11), 1397-1397.
- Kojić, M., Strahinić, I., Fira, Đ., Jovčić, B., & Topisirović, L.J., (2006). Plasmid content and bacteriocin production by five strains of *Lactococcus lactis* isolated from semi-hard homemade cheese. *Canadian Journal of Microbiology* *52*, 1110–1120.



- Lamichhane, J. R., Varvaro, L., Parisi, L., Audergon, J. M., & Morris, C. E. (2014). Disease and frost damage of woody plants caused by *Pseudomonas syringae*: seeing the forest for the trees. In *Advances in agronomy* (Vol. 126, pp. 235-295). Academic Press.
- Lamichhane, J. R., Messéan, A., & Morris, C. E. (2015). Insights into epidemiology and control of diseases of annual plants caused by the *Pseudomonas syringae* species complex. *Journal of general plant pathology*, 81(5), 331-350.
- Lanna Filho, R., De Souza, R. M., Ferreira, A., Quecine, M. C., Alves, E., & De Azevedo, J. L. (2013). Biocontrol activity of *Bacillus* against a GFP-marked *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* on tomato phylloplane. *Australasian Plant Pathology*, 42(6), 643-651.
- Li, H., Schenk, A., Srivastava, A., Zhurina, D., & Ullrich, M. S. (2006). Thermo-responsive expression and differential secretion of the extracellular enzyme levansucrase in the plant pathogenic bacterium *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. *FEMS microbiology letters*, 265(2), 178-185.
- Lindeberg, M., Cunnac, S., & Collmer, A. (2012). *Pseudomonas syringae* type III effector repertoires: last words in endless arguments. *Trends in microbiology*, 20(4), 199-208.
- Lindemann, J., Army, D. C., & Upper, C. D. (1984). Epiphytic population of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* on snap bean and nonhost plants and the incidence of bacterial brown spot disease in relation to cropping patterns. *Phytopathology*, 74(11), 1329-1333.
- Liu, J., Hagberg, I., Novitsky, L., Hadj-Moussa, H., & Avis, T. J. (2014). Interaction of antimicrobial cyclic lipopeptides from *Bacillus subtilis* influences their effect on spore germination and membrane permeability in fungal plant pathogens. *Fungal biology*, 118(11), 855-861.
- Louws, F. J., Bell, J., Medina-Mora, C. M., Smart, C. D., Opgenorth, D., Ishimaru, C. A., Hausbeck, M. K., de Bruijn, F. J., & Fulbright, D. W. (1998). rep-PCR-mediated genomic fingerprinting: a rapid and effective method to identify *Clavibacter michiganensis*. *Phytopathology*, 88(8), 862-868.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Dunlap, P. V., & Clark, D. P. (2008). Brock biology of microorganisms 12th edn. *Int. Microbiol*, 11, 65-73.
- Maki, L. R., Galyan, E. L., Chang-Chien, M. M., & Caldwell, D. R. (1974). Ice nucleation induced by *Pseudomonas syringae*. *Applied microbiology*, 28(3), 456-459.

- Mansfield, J., Genin, S., Magori, S., Citovsky, V., Sriariyanum, M., Ronald, P., Dow, M., Verdier, V., Beer, S. V., Machado, M. A., Toth, I., Salmond, G., & Foster G. D. (2012). Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology*, 13(6), 614-629.
- Martin-Sanz, A., Pérez de la Vega, M., Murillo, J., & Caminero, C. (2012). Genetic, biochemical and pathogenic diversity of *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* strains. *Plant pathology*, 61(6), 1063-1072.
- Messing, S. A., Ton-Hoang, B., Hickman, A. B., McCubbin, A. J., Peaslee, G. F., Ghirlando, R., Chandler, M., & Dyda, F. (2012). The processing of repetitive extragenic palindromes: the structure of a repetitive extragenic palindrome bound to its associated nuclease. *Nucleic acids research*, 40(19), 9964-9979.
- Mohler, O., DeMott, P. J., Vali, G., & Levin, Z. (2007). Microbiology and atmospheric processes: the role of biological particles in cloud physics. *Biogeosciences Discussions*, 4(4), 2559-2591.
- Monteil, C. L., Bardin, M., & Morris, C. E. (2014). Features of air masses associated with the deposition of *Pseudomonas syringae* and *Botrytis cinerea* by rain and snowfall. *The ISME journal*, 8(11), 2290.
- Mora, I., Cabrefiga, J., & Montesinos, E. (2015). Cyclic lipopeptide biosynthetic genes and products, and inhibitory activity of plant-associated *Bacillus* against phytopathogenic bacteria. *PLoS One*, 10(5), e0127738.
- Morris, C. E., Glaux, C., Latour, X., Gardan, L., Samson, R., & Pitrat, M. (2000). The relationship of host range, physiology, and genotype to virulence on cantaloupe in *Pseudomonas syringae* from cantaloupe blight epidemics in France. *Phytopathology*, 90(6), 636-646.
- Morris, C. E., Sands, D. C., Vinatzer, B. A., Glaux, C., Guilbaud, C., Buffiere, A., Yan, S., Dominguez, H., & Thompson, B. M. (2008). The life history of the plant pathogen *Pseudomonas syringae* is linked to the water cycle. *The ISME journal*, 2(3), 321.
- Morris, C. E., Sands, D. C., Vanneste, J. L., Montarry, J., Oakley, B., Guilbaud, C., & Glaux, C. (2010). Inferring the evolutionary history of the plant pathogen *Pseudomonas syringae* from its biogeography in headwaters of rivers in North America, Europe, and New Zealand. *MBio*, 1(3), e00107-10.
- Morris, C. E., Monteil, C. L., & Berge, O. (2013). The life history of *Pseudomonas syringae*: linking agriculture to earth system processes. *Annual review of phytopathology*, 51, 85-104.

- Mott, K. A., & Takemoto, J. Y. (1989). Syringomycin, a bacterial phytotoxin, closes stomata. *Plant physiology*, 90(4), 1435-1439.
- Musa, A. R., Minardi, P., & Mazzucchi, U. (2001). Identification and expression of the *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* hrpZPsa gene which encodes an harpin elicitor. *Antonie van Leeuwenhoek*, 79(1), 61-71.
- Newton, R. J., Jones, S. E., Eiler, A., McMahon, K. D., & Bertilsson, S. (2011). A guide to the natural history of freshwater lake bacteria. *Microbiology and molecular biology reviews*, 75(1), 14-49.
- Nikolić, I., Berić, T., Dimkic, I., Popović, T., Lozo, J., Fira, D., & Stanković, S. (2018). Biological control of *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* on sugar beet with *Bacillus pumilus* SS-10.7 and *Bacillus amyloliquefaciens* (SS-12.6 and SS-38.4) strains. *Journal of applied microbiology*. doi.org/10.1111/jam.14070
- O'Brien, H. E., Thakur, S., & Guttman, D. S. (2011). Evolution of plant pathogenesis in *Pseudomonas syringae*: a genomics perspective. *Annual review of phytopathology*, 49, 269-289.
- O'Brien, P. A. (2017). Biological control of plant diseases. *Australasian Plant Pathology*, 46(4), 293-304.
- Oliver, A., & Mena, A. (2010). Bacterial hypermutation in cystic fibrosis, not only for antibiotic resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 16(7), 798-808.
- Ongena, M., & Jacques, P. (2008). *Bacillus lipopeptides*: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in microbiology*, 16(3), 115-125.
- Pal, K. K., & Gardener, B. M. (2006). Biological control of plant pathogens. *The plant health instructor*, 2, 1117-1142.
- Panchal, S., Chitrakar, R., Thompson, B. K., Obulareddy, N., Roy, D., Hambright, W. S., & Melotto, M. (2016). Regulation of stomatal defense by air relative humidity. *Plant physiology*, pp-00696.
- Parkinson, N., Bryant, R., Bew, J., & Elphinstone, J. (2011). Rapid phylogenetic identification of members of the *Pseudomonas syringae* species complex using the rpoD locus. *Plant Pathology*, 60(2), 338-344.
- Peix, A., Ramírez-Bahena, M. H., & Velázquez, E. (2009). Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*. *Infection, Genetics and Evolution*, 9(6), 1132-1147.

- Pesciaroli, C., Cupini, F., Selbmann, L., Barghini, P., & Fenice, M. (2012). Temperature preferences of bacteria isolated from seawater collected in Kandalaksha Bay, White Sea, Russia. *Polar biology*, *35*(3), 435-445.
- Polizzi, G., Castello, I., Parlavecchio, G., & Cirvilleri, G. (2005). First report of bacterial blight of *Strelitzia augusta* caused by *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*. *Plant disease*, *89*(9), 1010-1010.
- Portillo, M. C., Anderson, S. P., & Fierer, N. (2012). Temporal variability in the diversity and composition of stream bacterioplankton communities. *Environmental microbiology*, *14*(9), 2417-2428.
- Prencipe, S., Gullino, M. L., & Spadaro, D. (2018). *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* isolated from *Actinidia chinensis* Var. *deliciosa* in Northern Italy: genetic diversity and virulence. *European Journal of Plant Pathology*, *150*(1), 191-204.
- Puhar, A., & Sansonetti, P. J. (2014). Type III secretion system. *Current Biology*, *24*(17), R784-R791.
- Raaijmakers, J. M., & Mazzola, M. (2012). Diversity and natural functions of antibiotics produced by beneficial and plant pathogenic bacteria. *Annual review of phytopathology*, *50*, 403-424.
- Rajwar, A., & Sahgal, M. (2016). Phylogenetic relationships of fluorescent pseudomonads deduced from the sequence analysis of 16S rRNA, *Pseudomonas*-specific and rpoD genes. *3 Biotech*, *6*(1), 80.
- Rodríguez-Herva, J. J., González-Melendi, P., Cuartas-Lanza, R., Antúnez-Lamas, M., Río-Alvarez, I., Li, Z., López-Torrejón, G., Díaz, I., del Pozo, J. C., Chakravarthy, S., Collmer, A., Rodríguez-Palenzuela, P., & López-Solanilla, E. (2012). A bacterial cysteine protease effector protein interferes with photosynthesis to suppress plant innate immune responses. *Cellular microbiology*, *14*(5), 669-681.
- Sabir, A., El-Khalfi, B., Errachidi, F., Chems, I., & Serrano, A. (2017). Evaluation of the potential of some essential oils in biological control against phytopathogenic agent *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 responsible for the tomatoes speck. *J Plant Pathol Microbiol*, *8*(420), 2.
- Sarkar, 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*(4), 1999-2012.
- Sawada, H., Suzuki, F., Matsuda, I., & Saitou, N. (1999). Phylogenetic analysis of *Pseudomonas syringae* pathovars suggests the horizontal gene transfer of argK and the evolutionary stability of hrp gene cluster. *Journal of Molecular Evolution*, *49*(5), 627-644.

- Schwartz, D. C., & Cantor, C. R. (1984). Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell*, 37(1), 67-75.
- Scortichini, M., Marcelletti, S., Ferrante, P., Petriccione, M., & Firrao, G. (2012). *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*: a re-emerging, multi-faceted, pandemic pathogen. *Molecular plant pathology*, 13(7), 631-640.
- Sedighian, N., Shams-Bakhsh, M., Osdaghi, E., & Khodaygan, P. (2014). Etiology and host range of bacterial leaf blight and necrosis of squash and muskmelon in Iran. *Journal of plant pathology*, 96(3), 507-514.
- Shimono, M., Lu, Y. J., Porter, K., Kvitko, B. H., Henty-Ridilla, J. L., Creason, A., He, S. Y., Chang, J. H., Staiger, C., J., & Day, B. (2016). The *Pseudomonas syringae* type-III effector HopG1 induces actin remodeling to promote symptom development and susceptibility during infection. *Plant physiology*, pp-01593.
- Smirnova, A., Li, H., Weingart, H., Aufhammer, S., Burse, A., Finis, K., Schenk, A., & Ullrich, M. S. (2001). Thermoregulated expression of virulence factors in plant-associated bacteria. *Archives of microbiology*, 176(6), 393-399.
- Spiers, A. J., Buckling, A., & Rainey, P. B. (2000). The causes of *Pseudomonas* diversity. *Microbiology*, 146(10), 2345-2350.
- Stivens, R. B. (1960). Cultural practices in disease control. In *Plant pathology*, pp. 357-429.
- Stojšin, V., Balaž, J., Budakov, D., Stanković, S., Nikolić, I., Ivanović, Ž., & Popović, T. (2015). First report of *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* causing bacterial leaf spot on sugar beet in Serbia. *Plant Disease*, 99(2), 281-281.
- Strange, R. N., & Scott, P. R. (2005). Plant disease: a threat to global food security. *Annual Review of Phytopathology*, 43, 83-116.
- Swenson, N. G. (2009). Phylogenetic resolution and quantifying the phylogenetic diversity and dispersion of communities. *PloS one*, 4(2), e4390.
- Toben, H., Mavridis, A., & Rudolph, K. W. E. (1989). Basal glume rot (*Pseudomonas syringae* pv. *atofaciens*) on wheat and barley in FRG and resistance screening of wheat 1. *EPPO Bulletin*, 19(1), 119-125.
- Toure, Y., Ongena, M. A. R. C., Jacques, P., Guiro, A., & Thonart, P. (2004). Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. *Journal of applied microbiology*, 96(5), 1151-1160.

- Van Dijk, K., Fouts, D. E., Rehm, A. H., Hill, A. R., Collmer, A., & Alfano, J. R. (1999). The Avr (effector) proteins HrmA (HopPsyA) and AvrPto are secreted in culture from *Pseudomonas syringae* pathovars via the Hrp (type III) protein secretion system in a temperature- and pH-sensitive manner. *Journal of bacteriology*, *181*(16), 4790-4797.
- Vaseghi, A., Bakhshinejad, B., Safaie, N., Parchin, R. A., & Sadeghizadeh, M. (2014). PCR amplification of the *hrcV* gene through specific primers for detecting *Pseudomonas syringae* pathovars. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *30*(2), 413-421.
- Versalovic, J., Schneider, M., De Bruijn, F. J., & Lupski, J. R. (1994). Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in molecular and cellular biology*, *5*(1), 25-40.
- Vinatzer, B. A., Weisberg, A. J., Monteil, C. L., Elmarakeby, H. A., Sheppard, S. K., & Heath, L. S. (2016). A proposal for a genome similarity-based taxonomy for plant-pathogenic bacteria that is sufficiently precise to reflect phylogeny, host range, and outbreak affiliation applied to *Pseudomonas syringae sensu lato* as a proof of concept. *Phytopathology*, *107*(1), 18-28.
- Waterbury PG, Lane MJ, 1987. Generation of lambda phage concatemers for use as pulsed field electrophoresis size markers. *Nucleic Acids Research*, *15*, 3930
- Weiland, J., & Koch, G. (2004). Sugarbeet leaf spot disease (*Cercospora beticola* Sacc.). *Molecular plant pathology*, *5*(3), 157-166.
- Weingart, H., Stubner, S., Schenk, A., & Ullrich, M. S. (2004). Impact of temperature on in planta expression of genes involved in synthesis of the *Pseudomonas syringae* phytotoxin coronatine. *Molecular plant-microbe interactions*, *17*(10), 1095-1102.
- Wicaksono, W. A., Jones, E. E., Casonato, S., Monk, J., & Ridgway, H. J. (2018). Biological control of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa), the causal agent of bacterial canker of kiwifruit, using endophytic bacteria recovered from a medicinal plant. *Biological Control*, *116*, 103-112.
- Xia, X., & Xie, Z. (2001). DAMBE: software package for data analysis in molecular biology and evolution. *Journal of heredity*, *92*(4), 371-373.
- Xin, X. F., Kvitko, B., & He, S. Y. (2018). *Pseudomonas syringae*: what it takes to be a pathogen. *Nature Reviews Microbiology*, *16*(5), 316.
- Young, J. M. (2010). Taxonomy of *Pseudomonas syringae*. *Journal of Plant Pathology*, S5-S14.

- 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(1), 153-177.
- Zachow, C., Fatehi, J., Cardinale, M., Tilcher, R., & Berg, G. (2010). Strain-specific colonization pattern of *Rhizoctonia antagonists* in the root system of sugar beet. *FEMS microbiology ecology*, 74(1), 124-135.
- Zeriouh, H., Romero, D., García-Gutiérrez, L., Cazorla, F. M., de Vicente, A., & Pérez-García, A. (2011). The iturin-like lipopeptides are essential components in the biological control arsenal of *Bacillus subtilis* against bacterial diseases of cucurbits. *Molecular plant-microbe interactions*, 24(12), 1540-1552.
- Zhang, Y., & Geider, K. (1997). Differentiation of *Erwinia amylovora* strains by pulsed-field gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(11), 4421-4426.
- Zheng, X. Y., Spivey, N. W., Zeng, W., Liu, P. P., Fu, Z. Q., Klessig, D. F., He, S. Y., & Dong, X. (2012). Coronatine promotes *Pseudomonas syringae* virulence in plants by activating a signaling cascade that inhibits salicylic acid accumulation. *Cell host & microbe*, 11(6), 587-596.

# PRILOG



## 8. PRILOZI

**Prilog 1.** Spisak svih poznatih vrsta u okviru roda *Pseudomonas* (preuzeto iz Peix et al. 2009).

<i>P. abietaniphila</i>	<i>P. cuatrocienegasensis</i>	<i>P. mandelii</i>	<i>P. pseudoalcaligenes</i>
<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. delhiensis</i>	<i>P. marginalis</i>	<i>P. psychrophila</i>
<i>P. agarici</i>	<i>P. duriflava</i>	<i>P. marincola</i>	<i>P. psychrotolerans</i>
<i>P. alcaligenes</i>	<i>P. extremorientalis</i>	<i>P. mediterranea</i>	<i>P. putida</i>
<i>P. alcaliphila</i>	<i>P. ficuserectae</i>	<i>P. meliae</i>	<i>P. reinekei</i>
<i>P. amygdali</i>	<i>P. flavescens</i>	<i>P. mendocina</i>	<i>P. resinovorans</i>
<i>P. anguilliseptica</i>	<i>P. flectens</i>	<i>P. meridiana</i>	<i>P. rhizosphaerae</i>
<i>P. antarctica</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. migulae</i>	<i>P. rhodesiae</i>
<i>P. argentinensis</i>	<i>P. fragi</i>	<i>P. mohnii</i>	<i>P. sabulinigri</i>
<i>P. asplenii</i>	<i>P. frederiksbergensis</i>	<i>P. monteilii</i>	<i>P. salomonii</i>
<i>P. avellanae</i>	<i>P. fulva</i>	<i>P. moorei</i>	<i>P. savastanoi</i>
<i>P. azotifigens</i>	<i>P. fuscovaginae</i>	<i>P. moraviensis</i>	<i>P. segetis</i>
<i>P. azotoformans</i>	<i>P. gelidicola</i>	<i>P. mosselii</i>	<i>P. simiae</i>
<i>P. balearica</i>	<i>P. geniculata</i>	<i>P. mucidolens</i>	<i>P. straminea</i>
<i>P. beteli</i>	<i>P. gessardii</i>	<i>P. multiresinivorans</i>	<i>P. stutzeri</i>
<i>P. borbori</i>	<i>P. graminis</i>	<i>P. nitroreducens</i>	<i>P. synxantha</i>
<i>P. boreopolis</i>	<i>P. grimontii</i>	<i>P. oleovorans</i>	<i>P. syringae</i>
<i>P. brassicacearum</i>	<i>P. guineae</i>	<i>P. orientalis</i>	<i>P. taetrolens</i>
<i>P. brenneri</i>	<i>P. halophila</i>	<i>P. oryzihabitans</i>	<i>P. thermotolerans</i>
<i>P. caeni</i>	<i>P. indica</i>	<i>P. otitidis</i>	<i>P. thivervalensis</i>
<i>P. cannabina</i>	<i>P. japonica</i>	<i>P. pachastrellae</i>	<i>P. tolaasii</i>
<i>P. caricapayae</i>	<i>P. jessenii</i>	<i>P. palleroniana</i>	<i>P. tremae</i>
<i>P. cedrella</i>	<i>P. jinjuensis</i>	<i>P. panacis</i>	<i>P. trivialis</i>
<i>P. chloritidismutans</i>	<i>P. kilonensis</i>	<i>P. panipatensis</i>	<i>P. tuomuerensis</i>
<i>P. chlororaphis</i>	<i>P. knackmussii</i>	<i>P. parafulva</i>	<i>P. umsongensis</i>
<i>P. cichorii</i>	<i>P. koreensis</i>	<i>P. peli</i>	<i>P. vancouverensis</i>
<i>P. cissicola</i>	<i>P. libanensis</i>	<i>P. pertucinogena</i>	<i>P. veronii</i>
<i>P. citronellolis</i>	<i>P. lini</i>	<i>P. pictorum</i>	<i>P. viridiflava</i>
<i>P. congelans</i>	<i>P. lundensis</i>	<i>P. plecoglossicida</i>	<i>P. vranovensis</i>
<i>P. corrugata</i>	<i>P. lurida</i>	<i>P. poae</i>	<i>P. xanthomarina</i>
<i>P. constantinii</i>	<i>P. lutea</i>	<i>P. pohangensis</i>	<i>P. xiamenensis</i>
<i>P. cremoricolorata</i>	<i>P. luteola</i>	<i>P. proteolytica</i>	<i>P. xinjiangensis</i>

**Prilog 2.** Spisak svih do sada detektovanih T3SS familija u okviru vrste *P. syringae* i prisustvo efekora kod model sistema *P. syringae* pv. *tomato* D3000.

T3SS familija	Prisustvo efekora kod <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> D3000	T3SS familija	Prisustvo efekora kod <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> D3000
AvrE	+	HopAG	
HopI	+	HopC	+
HopM	+	HopE	+
HopAA	+	HopBD	
HopX	+	AvrRpm	
HopAE		AvrRps4	
HopAF	+	HopAD	
HopR	+	HopAM	+
HopAS		HopAY	
HopAB	+	AvrA	
HopQ	+	HopB	+
HopT	+	HopAX	
HopD	+	HopBA	
HopO	+	HopBB	
HopW		HopBG	
HopF	+	HopBF	
HopV	+	HopAQ	
HopAZ		AvrRpt2	
AvrPto	+	HopU	+
HopG	+	HopBC	
HopAU		HopBE	
HopAW		HopK	+
HopAO	+	HopAL	
HopAV		AvrB	
HopAT		HopN	+
HopZ		HopY	+
HopA	+	HopS	+
HopH	+	HopAR	
HopAI			

**Prilog 3.** Biohemijske karakteristike testirane kolekcije izolata

Izolati	Gram reakcija	Hidroliza želatina	Hidroliza eskulina	Hidroliza skroba	Produkcija H <sub>2</sub> S	Produkcija indola	Katalaza test	O/F test	Prisustvo pigmenta
P1	-	+	+	-	-	-	+	+	+
P2	-	+	+	-	-	-	+	+	-
P3	-	+	+	-	-	-	+	+	+
P4	-	+	+	-	-	-	+	+	+
P5	-	+	+	-	-	-	+	+	+
P6	-	+	+	-	-	-	+	+	+
P7	-	+	+	-	-	-	+	+	+
P8	-	+	+	-	-	-	+	+	+
P9	-	+	+	-	-	-	+	+	+
P10	-	+	+	-	-	-	+	+	+
P11	-	+	+	-	-	-	+	+	+
P12	-	+	+	-	-	-	+	+	+
P13	-	+	+	-	-	-	+	+	+
P14	-	+	+	-	-	-	+	+	+
P15	-	+	+	-	-	-	+	+	+
P16	-	+	+	-	-	-	+	+	+
P17	-	+	+	-	-	-	+	+	+
P18	-	+	+	-	-	-	+	+	-
P19	-	+	+	-	-	-	+	+	+
P20	-	+	+	-	-	-	+	+	-
P21	-	+	+	-	-	-	+	+	-
P22	-	+	+	-	-	-	+	+	+
P23	-	+	+	-	-	-	+	+	+
P24	-	+	+	-	-	-	+	+	-
P25	-	+	+	-	-	-	+	+	-

---

P26	-	+	+	-	-	-	+	+	-
P27	-	+	+	-	-	-	+	+	-
P28	-	+	+	-	-	-	+	+	-
P29	-	+	+	-	-	-	+	+	-
P30	-	+	+	-	-	-	+	+	+
P31	-	+	+	-	-	-	+	+	+
P32	-	+	+	-	-	-	+	+	+
P33	-	+	+	-	-	-	+	+	+
P34	-	+	+	-	-	-	+	+	+
P35	-	+	+	-	-	-	+	+	+
P36	-	+	+	-	-	-	+	+	+
P37	-	+	+	-	-	-	+	+	+
P38	-	+	+	-	-	-	+	+	-
P39	-	+	+	-	-	-	+	+	-
P40	-	+	+	-	-	-	+	+	-
P41	-	+	+	-	-	-	+	+	-
P42	-	+	+	-	-	-	+	+	+
P43	-	+	+	-	-	-	+	+	-
P44	-	+	+	-	-	-	+	+	-
P45	-	+	+	-	-	-	+	+	+
P46	-	+	+	-	-	-	+	+	-
P47	-	+	+	-	-	-	+	+	-
P48	-	+	+	-	-	-	+	+	-
P49	-	+	+	-	-	-	+	+	-
P50	-	+	+	-	-	-	+	+	+
P51	-	+	+	-	-	-	+	+	-
P52	-	+	+	-	-	-	+	+	+
P53	-	+	+	-	-	-	+	+	+

---

P54	-	+	+	-	-	-	+	+	+
P55	-	+	+	-	-	-	+	+	-
P56	-	+	+	-	-	-	+	+	+
P57	-	+	+	-	-	-	+	+	-
P58	-	+	+	-	-	-	+	+	+
P59	-	+	+	-	-	-	+	+	+
P60	-	+	+	-	-	-	+	+	-
P61	-	+	+	-	-	-	+	+	+
P62	-	+	+	-	-	-	+	+	+
P63	-	+	+	-	-	-	+	+	+
P65	-	+	+	-	-	-	+	+	
P66	-	+	+	-	-	-	+	+	+
P67	-	+	+	-	-	-	+	+	-
P68	-	+	+	-	-	-	+	+	+
P69	-	+	+	-	-	-	+	+	-
P70	-	+	+	-	-	-	+	+	-
P71	-	+	+	-	-	-	+	+	+
P72	-	+	+	-	-	-	+	+	+
P73	-	+	+	-	-	-	+	+	-
P74	-	+	+	-	-	-	+	+	-
P75	-	+	+	-	-	-	+	+	-
P76	-	+	+	-	-	-	+	+	-
P77	-	+	+	-	-	-	+	+	-
P78	-	+	+	-	-	-	+	+	-
P79	-	+	+	-	-	-	+	+	-
P80	-	+	+	-	-	-	+	+	-
P81	-	+	+	-	-	-	+	+	-
P82	-	+	+	-	-	-	+	+	-

---

P83	-	+	+	-	-	-	+	+	-
P84	-	+	+	-	-	-	+	+	+
P85	-	+	+	-	-	-	+	+	-
P86	-	+	+	-	-	-	+	+	-
P87	-	+	+	-	-	-	+	+	-
P88	-	+	+	-	-	-	+	+	-
P89	-	+	+	-	-	-	+	+	-
P90	-	+	+	-	-	-	+	+	+
P91	-	+	+	-	-	-	+	+	+
P92	-	+	+	-	-	-	+	+	+
P93	-	+	+	-	-	-	+	+	+
P94	-	+	+	-	-	-	+	+	+
P95	-	+	+	-	-	-	+	+	-
P96	-	+	+	-	-	-	+	+	-
P97	-	+	+	-	-	-	+	+	-
P98	-	+	+	-	-	-	+	+	-
P99	-	+	+	-	-	-	+	+	-
P100	-	+	+	-	-	-	+	+	+
P101	-	+	+	-	-	-	+	+	-
P102	-	+	+	-	-	-	+	+	-
P103	-	+	+	-	-	-	+	+	-
P104	-	+	+	-	-	-	+	+	-
P105	-	+	+	-	-	-	+	+	+

---

**Prilog 4.** Rezultati testova za identifikaciju *P.syringae* pv. *aptata*

Izolati	LOPAT testovi					LOPAT grupa	Specifični DNA fragmenti za <i>P.syringae</i> pv. <i>aptata</i>
	L	O	P	A	T		
P1	+	-	-	-	+	Ia	+
P2	+	-	-	-	+	Ia	+
P3	+	-	-	-	+	Ia	+
P4	+	-	-	-	+	Ia	+
P5	+	-	-	-	+	Ia	+
P6	+	-	-	-	+	Ia	+
P7	+	-	-	-	+	Ia	+
P8	+	-	-	-	+	Ia	+
P9	+	-	-	-	+	Ia	+
P10	+	-	-	-	+	Ia	+
P11	+	-	-	-	+	Ia	+
P12	+	-	-	-	+	Ia	+
P13	+	-	-	-	+	Ia	+
P14	+	-	-	-	+	Ia	+
P15	+	-	-	-	+	Ia	+
P16	+	-	-	-	+	Ia	+
P17	+	-	-	-	+	Ia	+
P18	+	-	-	-	+	Ia	+
P19	+	-	-	-	+	Ia	+
P20	+	-	-	-	+	Ia	+
P21	+	-	-	-	+	Ia	+
P22	+	-	-	-	+	Ia	+
P23	+	-	-	-	+	Ia	+
P24	+	-	-	-	+	Ia	+
P25	+	-	-	-	+	Ia	+

---

P26	+ - - - +	Ia	+
P27	+ - - - +	Ia	+
P28	+ - - - +	Ia	+
P29	+ - - - +	Ia	+
P30	+ - - - +	Ia	+
P31	+ - - - +	Ia	+
P32	+ - - - +	Ia	+
P33	+ - - - +	Ia	+
P34	+ - - - +	Ia	+
P35	+ - - - +	Ia	+
P36	+ - - - +	Ia	+
P37	+ - - - +	Ia	+
P38	+ - - - +	Ia	+
P39	+ - - - +	Ia	+
P40	+ - - - +	Ia	+
P41	+ - - - +	Ia	+
P42	+ - - - +	Ia	+
P43	+ - - - +	Ia	+
P44	+ - - - +	Ia	+
P45	+ - - - +	Ia	+
P46	+ - - - +	Ia	+
P47	+ - - - +	Ia	+
P48	+ - - - +	Ia	+
P49	+ - - - +	Ia	+
P50	+ - - - +	Ia	+
P51	+ - - - +	Ia	+
P52	+ - - - +	Ia	+
P53	+ - - - +	Ia	+



---

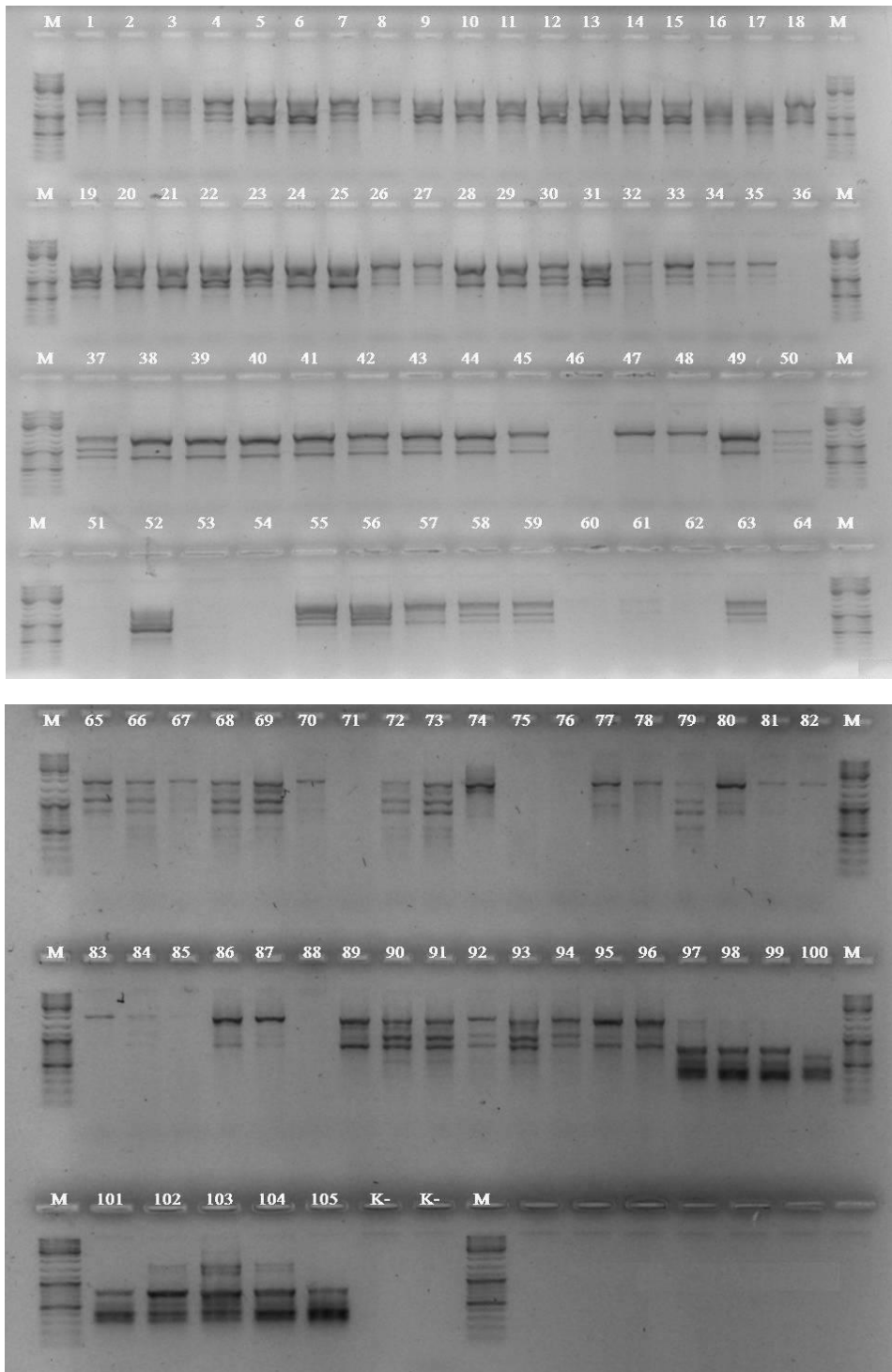
P54	+ - - - +	Ia	+
P55	+ - - - +	Ia	+
P56	+ - - - +	Ia	+
P57	+ - - - +	Ia	+
P58	+ - - - +	Ia	+
P59	+ - - - +	Ia	+
P60	+ - - - +	Ia	+
P61	+ - - - +	Ia	+
P62	+ - - - +	Ia	+
P63	+ - - - +	Ia	+
P65	+ - - - +	Ia	+
P66	+ - - - +	Ia	+
P67	+ - - - +	Ia	+
P68	+ - - - +	Ia	+
P69	+ - - - +	Ia	+
P70	+ - - - +	Ia	+
P71	+ - - - +	Ia	+
P72	+ - - - +	Ia	+
P73	+ - - - +	Ia	+
P74	+ - - - +	Ia	+
P75	+ - - - +	Ia	+
P76	+ - - - +	Ia	+
P77	+ - - - +	Ia	+
P78	+ - - - +	Ia	+
P79	+ - - - +	Ia	+
P80	+ - - - +	Ia	+
P81	+ - - - +	Ia	+
P82	+ - - - +	Ia	+

---

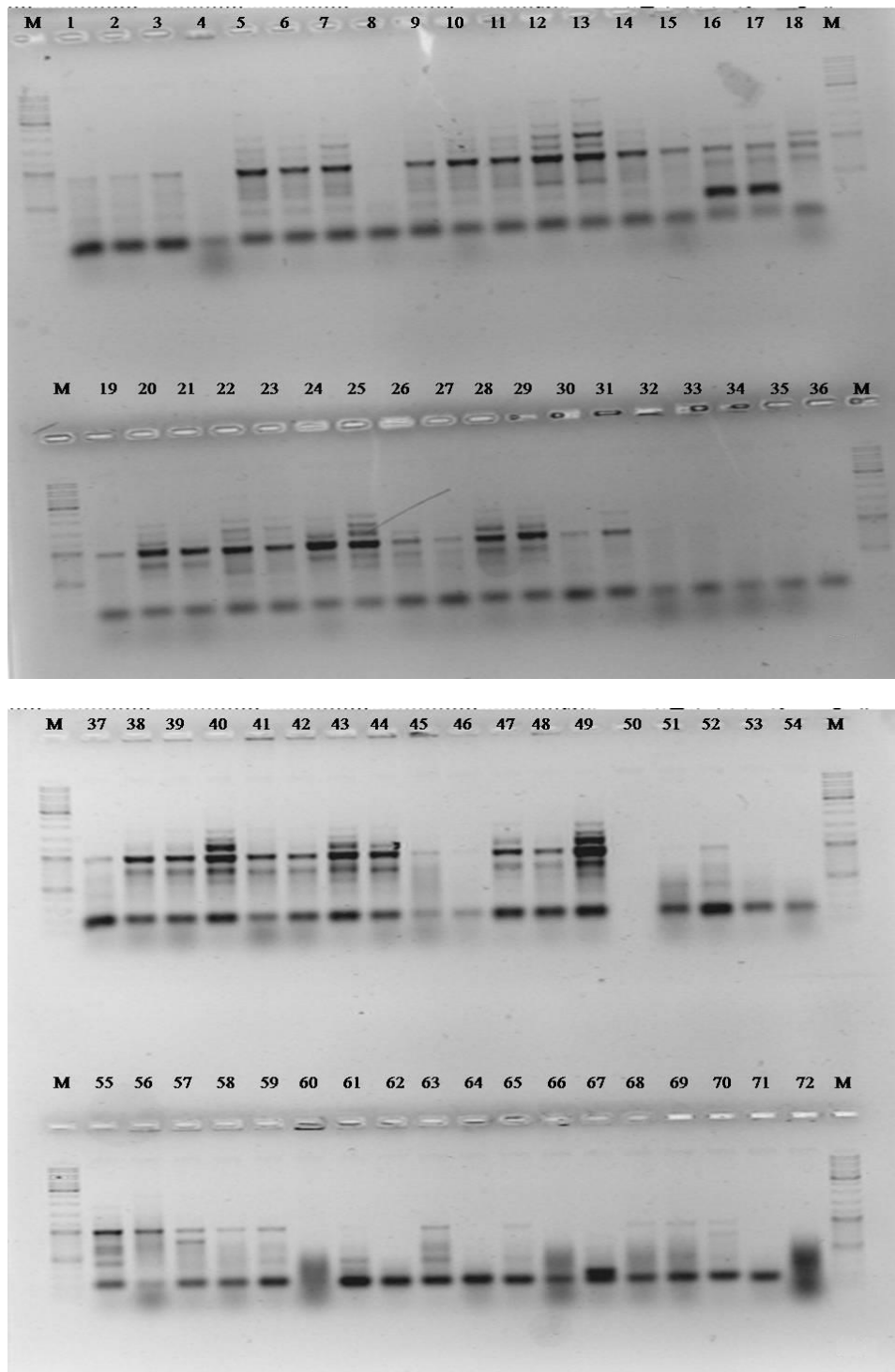
P83	+ - - - +	Ia	+
P84	+ - - - +	Ia	+
P85	+ - - - +	Ia	+
P86	+ - - - +	Ia	+
P87	+ - - - +	Ia	+
P88	+ - - - +	Ia	+
P89	+ - - - +	Ia	+
P90	+ - - - +	Ia	+
P91	+ - - - +	Ia	+
P92	+ - - - +	Ia	+
P93	+ - - - +	Ia	+
P94	+ - - - +	Ia	+
P95	+ - - - +	Ia	+
P96	+ - - - +	Ia	+
P97	+ - - - +	Ia	+
P98	+ - - - +	Ia	+
P99	+ - - - +	Ia	+
P100	+ - - - +	Ia	+
P101	+ - - - +	Ia	+
P102	+ - - - +	Ia	+
P103	+ - - - +	Ia	+
P104	+ - - - +	Ia	+
P105	+ - - - +	Ia	+

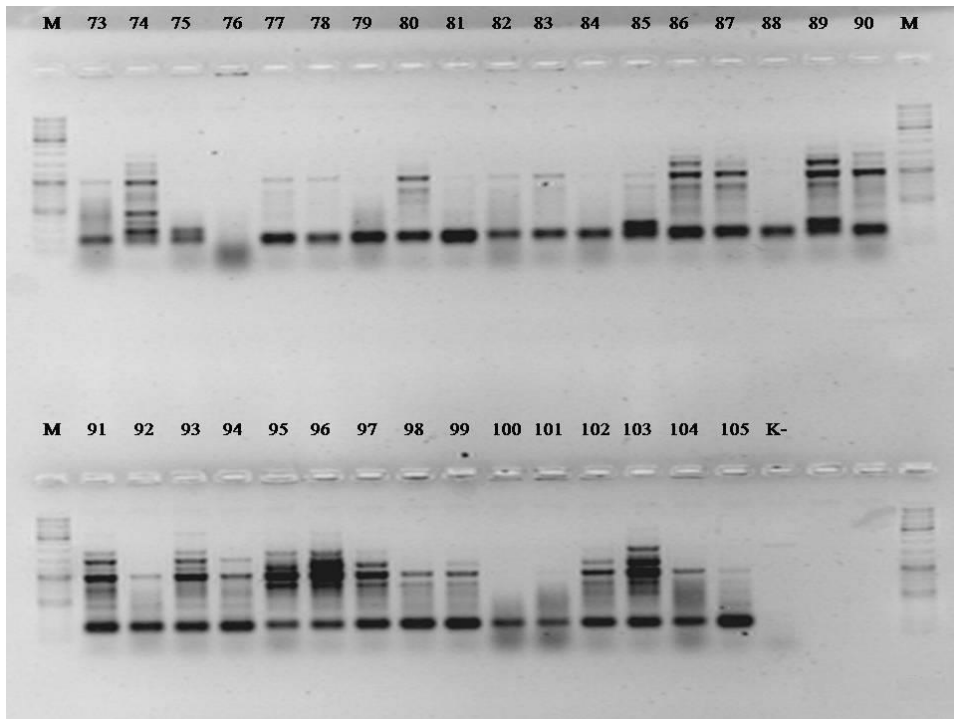
---

**Prilog 5.** Genetički profili svih 104 izolata *P. syringae* pv. *aptata* dobijeni na osnovu BOX-PCR prajmera. Brojevi iznad svakog profila predstavljaju šifru izolata

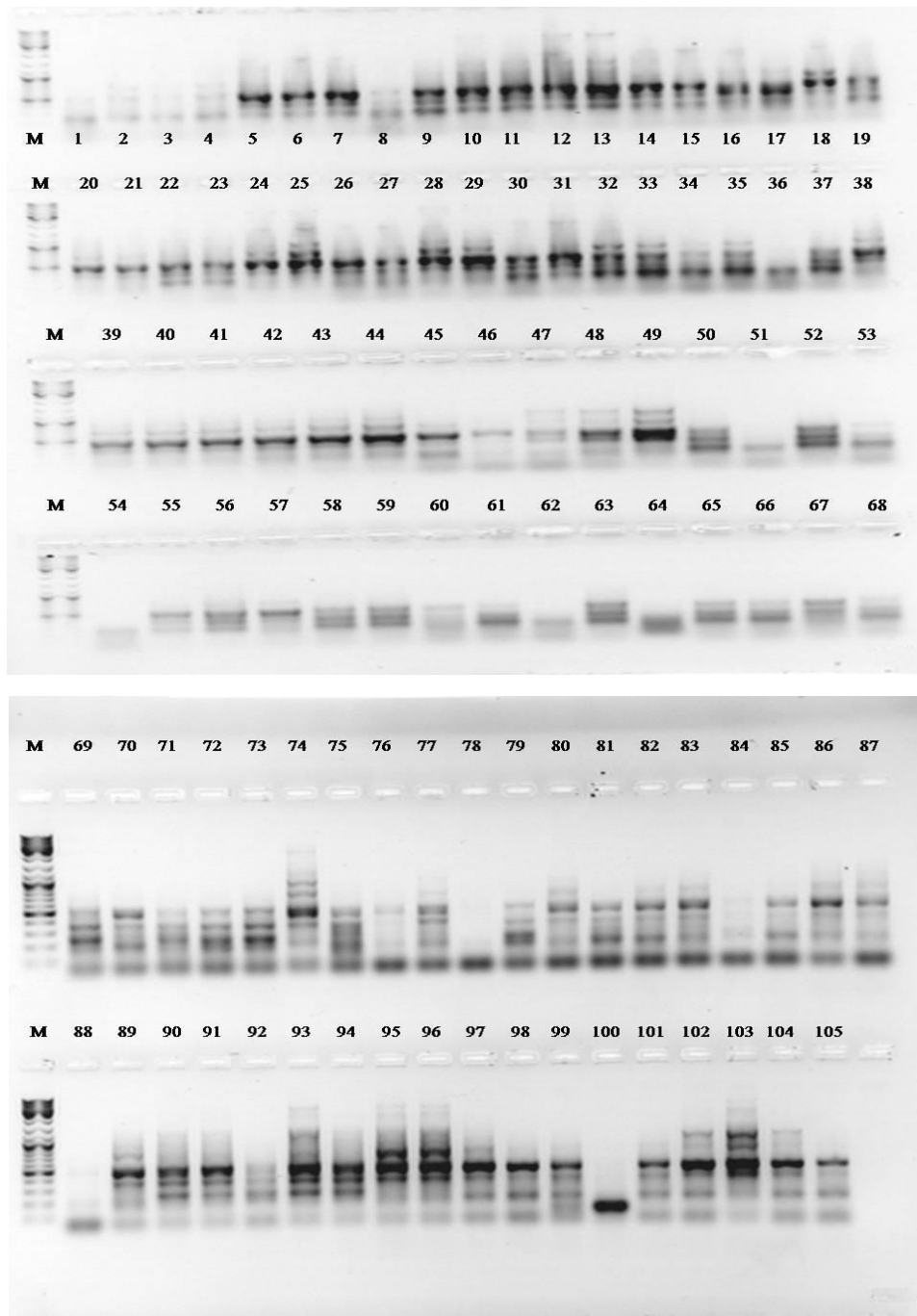


**Prilog 6.** Genetički profili svih 104 izolata *P. syringae* pv. *aptata* dobijeni na osnovu REP-PCR prajmera. Brojevi iznad svakog profila predstavljaju šifru izolata

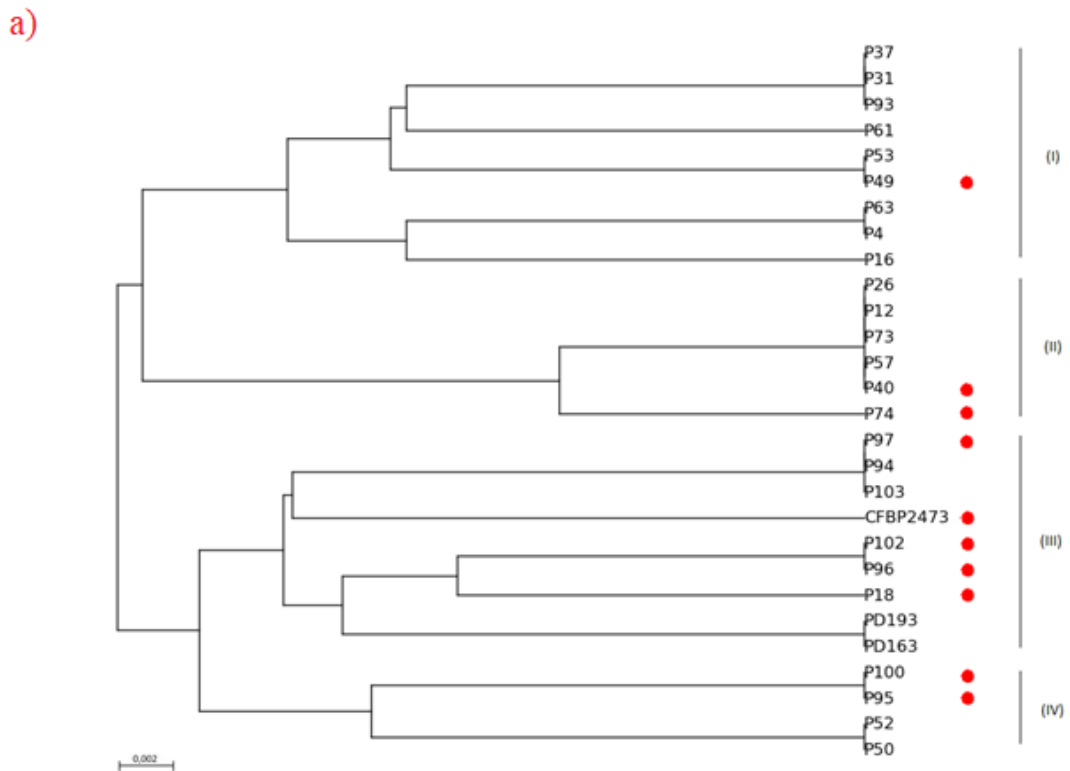




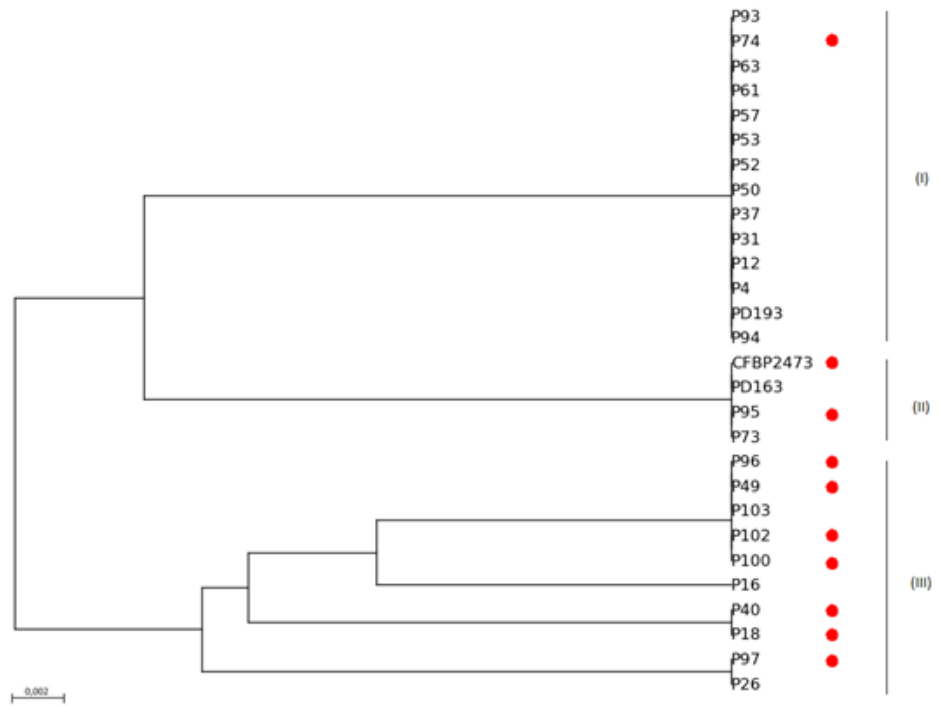
**Prilog 7.** Genetički profili svih 104 izolata *P. syringae* pv. *aptata* dobijeni na osnovu ERIC-PCR prajmera. Brojevi iznad svakog profila predstavljaju šifru izolata.



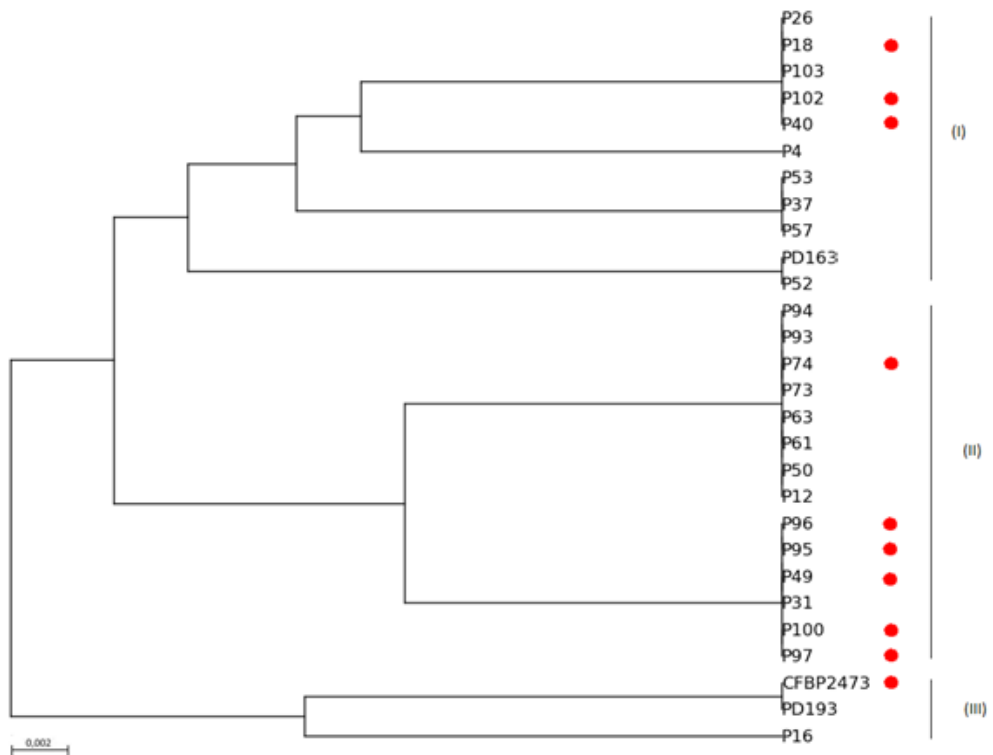
**Prilog 8.** Filogenetska stabla konstruisana na osnovu rep-PCR genetičkih profila. Filogenetsko stablo je dobijeno uz pomoć UPMGA filogenetske metode, koja je pokazala genetičke distance između reprezentativnih izolata *P. syringae* pv. *aptata* i referentnih sojeva. Crvena tačka označava izuzetno agresivne izolate na osnovu testa patogenosti. a) BOX-PCR b) REP-PCR c) ERIC-PCR.



b)



c)





## Prilog 9. Grupisanje svih testiranih izolata na osnovu Rep-PCR, PFGE i MLSA.

Izolat	rep-PCR			PFGE	MLST	
	Box	Rep	Eric		gyrB	gapA
P1	I	I	I	/	/	/
P2	I	I	I	/	/	/
P3	I	I	I	/	/	/
<b>P4</b>	I	I	II	I	II	I
P5	II	I	II	/	/	/
P6	II	I	II	/	/	/
P7	III	I	II	/	/	/
P8	III	I	II	/	/	/
P9	II	I	II	/	/	/
P10	II	I	II	/	/	/
P11	II	I	II	/	/	/
<b>P12</b>	III	II	II	I	I	I
P13	II	II	II	/	/	/
P14	II	II	II	/	/	/
P15	II	II	II	/	/	/
<b>P16</b>	IV	III	III	III	III	II
P17	IV	III	III	/	/	/
<b>P18</b>	V	IV	IV	I	IV	III
P19	II	V	II	/	/	/
P20	VI	IV	I	/	/	/
P21	VI	IV	I	/	/	/
P22	II	II	II	/	/	/
P23	II	II	II	/	/	/
P24	VI	IV	I	/	/	/
P25	VI	IV	I	/	/	/
<b>P26</b>	III	IV	V	II	IV	III
P27	III	IV	I	/	/	/
P28	VI	IV	I	/	/	/
P29	VI	IV	I	/	/	/
P30	III	V	II	/	/	/
<b>P31</b>	II	V	II	I	II	I
P32	III	VI	II	/	/	/
P33	III	VI	II	/	/	/
P34	III	VI	II	/	/	/
P35	III	VI	II	/	/	/
P36	III	VI	II	/	/	/
<b>P37</b>	II	VI	II	I	I	I
P38	VI	IV	IV	/	/	/
P39	VI	IV	I	/	/	/
<b>P40</b>	III	IV	IV	I	IV	III
P41	VI	IV	I	/	/	/
P42	VI	IV	I	/	/	/
P43	VI	IV	I	/	/	/
P44	VI	IV	I	/	/	/
P45	VI	IV	I	/	/	/
P46	VI	VI	I	/	/	/
P47	VI	IV	I	/	/	/
P48	VI	IV	I	/	/	/
<b>P49</b>	VII	V	I	II	IV	III
<b>P50</b>	XII	II	II	I	II	I
P51	III	V	II	/	/	/
<b>P52</b>	XII	VII	II	I	II	I
<b>P53</b>	VII	VI	II	I	II	I
P54	III	VI	V	/	/	/
P55	III	I	II	/	/	/
P56	III	V	II	/	/	/
<b>P57</b>	III	VI	II	II	IV	III

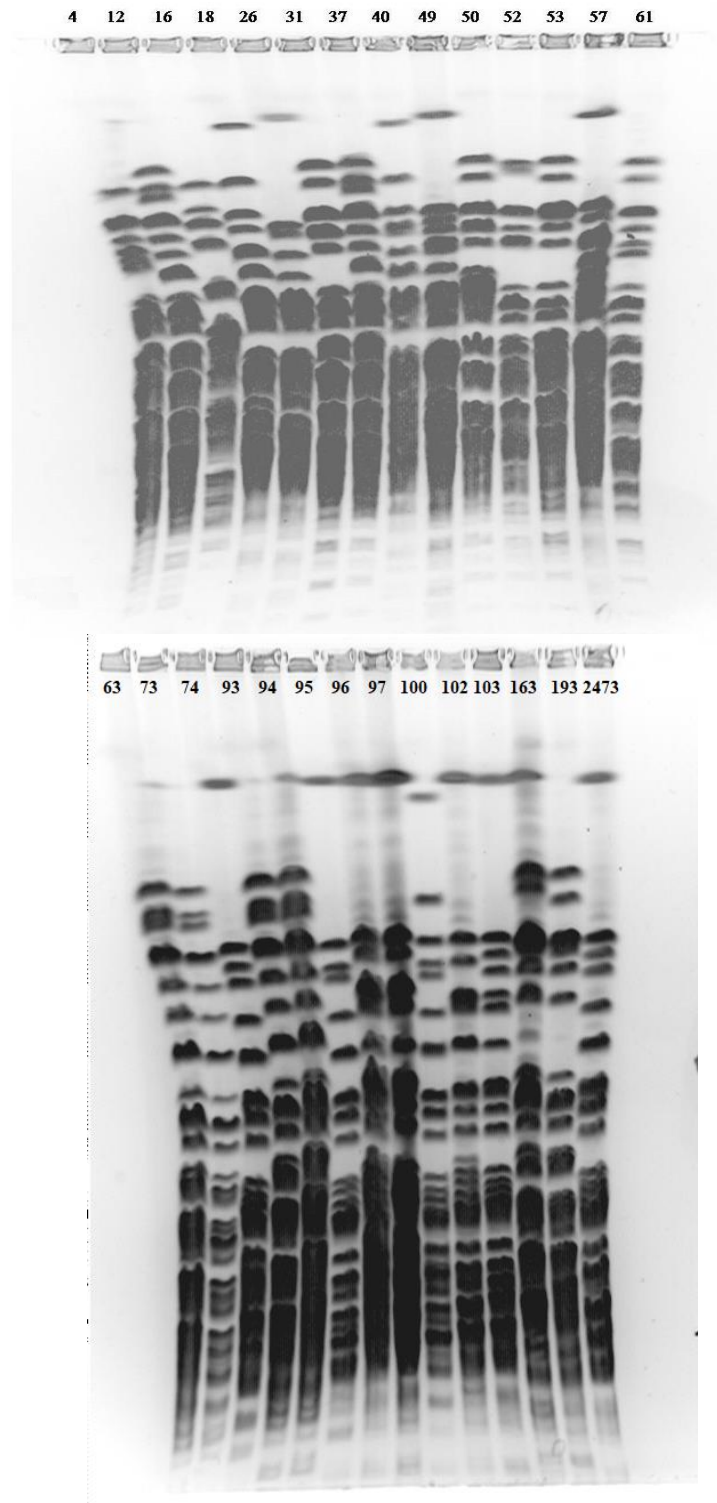
P58	III	V	II	/	/	/
P59	III	V	II	/	/	/
P60	VIII	V	II	/	/	/
<b>P61</b>	VIII	II	II	I	II	I
P62	VIII	VI	V	/	/	/
<b>P63</b>	I	II	II	I	I	I
P65	III	V	II	/	/	/
P66	III	V	II	/	/	/
P67	III	VII	II	/	/	/
P68	III	V	II	/	/	/
P69	III	V	II	/	/	/
P70	III	IV	I	/	/	/
P71	III	VI	II	/	/	/
P72	III	VII	II	/	/	/
<b>P73</b>	III	II	VI	I	I	I
<b>P74</b>	IX	II	II	II	IV	III
P75	IX	VII	II	/	/	/
P76	IX	VI	I	/	/	/
P77	IX	IV	I	/	/	/
P78	IX	IV	I	/	/	/
P79	III	IV	II	/	/	/
P80	III	IV	I	/	/	/
P81	III	IV	I	/	/	/
P82	III	IV	I	/	/	/
P83	III	IV	I	/	/	/
P84	III	IV	II	/	/	/
P85	III	IV	I	/	/	/
P86	III	IV	I	/	/	/
P87	III	IV	I	/	/	/
P88	III	VI	I	/	/	/
P89	VI	VII	I	/	/	/
P90	III	II	II	/	/	/
P91	III	II	II	/	/	/
P92	III	II	II	/	/	/
<b>P93</b>	II	II	II	I	I	I
<b>P94</b>	X	II	II	I	I	I
<b>P95</b>	XI	V	VI	II	IV	III
<b>P96</b>	VI	V	I	II	IV	III
<b>P97</b>	X	V	V	II	IV	III
P98	X	V	I	/	/	/
P99	X	V	I	/	/	/
<b>P100</b>	XI	V	I	I	IV	III
P101	X	VI	I	/	/	/
<b>P102</b>	VI	IV	I	II	IV	III
<b>P103</b>	X	IV	I	II	IV	III
P104	XI	II	I	/	/	/
P105	X	IV	I	/	/	/
PD163	XIII	VII	VI	I	II	I
PD193	XIII	VIII	II	I	II	I
CFBP2 473	XIV	VIII	VI	II	IV	III

<sup>a</sup>CFBP – Kolekcija Collection of Plant associated bacteria, bacterial plant pathogen genetic resources, INRA, Angers, France

<sup>b</sup>Sojevi čije su šifre boldovane spadaju u grupu reprezentativnih izolata odabranih za detaljnije analize

<sup>c</sup>PD = Kolekcija sojeva Servisa za zaštitu bilja (Plant Protection Service - NVWA), Wageningen, The Netherlands

**Prilog 10.** Genetički profili svih 25 reprezentativnih izolata i referentnih sojeva *P. syringae* pv. *aptata* dobijeni na osnovu PFGE. Brojevi iznad svakog profila predstavljaju šifru izolata.



**Prilog 11.** Intenzitet infekcije *P. syringae* pv. *aptata* u okviru testa patogenosti na listovima šećerne repe. Očitavanja su vršena 7 dana nakon inokulacije. a) vrednosti očitavanja nekroze listnog tkiva izražene u procentima (4 ponavljanja); b) Srednja vrednost i standardna devijacija.

a)

Izolati	Marinela 1	Jamina 1	Serenada 1	Lara 1	Marinela 2	Jamina 2	Serenada 2	Lara 2	Marinela 3	Jamina 3	Serenada 3	Lara 3	Marinela 4	Jamina 4	Serenada 4	Lara 4
P4	2.5	5	1.25	0	3.75	15	0	0	0	5	10	0	0	5	12.5	0
P12	2.5	6.25	0	2.5	6.25	0	0	0	13.75	5	5	0	0	0	0	0
P16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P18	2.5	5	7.5	6.25	8.75	5	0	0	12.5	8.75	12.5	0	3.75	8.75	3.75	0
P26	8.75	15	3.75	3.75	15	0	2.5	0	16.25	7.5	5	2.5	8.75	10	6.25	0
P31	3.75	7.5	2.5	10	5	3.75	2.5	2.5	10	3.75	3.75	0	7.5	10	6.25	0
P37	13.75	6.25	5	2.5	12.5	2.5	2.5	2.5	10	3.75	8.75	0	7.5	10	6.25	0
P40	12.5	17.5	7.5	5	25	7.5	7.5	0	25	8.75	12.5	0	20	25	11.25	0
P49	7.5	15	8.75	2.5	15	16.25	7.5	5	18.75	11.25	7.5	0	18.75	0	2.5	0
P50	5	7.5	0	0	6.25	5	0	0	0	2.5	0	0	0	0	0	0
P52	7.5	10	5	5	7.5	7.5	0	0	10	10	0	0	10	0	0	0
P53	20	5	2.5	0	7.5	5	0	0	12.5	7.5	0	0	0	10	0	0
P57	12.5	7.5	5	12.5	7.5	16.25	12.5	3.75	30	25	5	0	6.25	6.25	7.5	0
P61	3.75	3.75	3.75	0	8.75	7.5	0	0	8.75	10	10	0	0	0	0	0
P63	7.5	2.5	0	0	7.5	5	0	0	6.25	7.5	0	0	3.75	10	0	0
P73	5	13.75	0	0	0	5	7.5	0	0	5	6.25	0	0	0	2.5	0
P74	17.5	12.5	12.5	15	25	6.25	13.75	0	18.75	13.75	16.25	0	16.25	11.25	5	0
P93	7.5	10	5	10	12.5	10	5	7.5	7.5	8.75	5	0	17.5	12.5	2.5	0
P94	12.5	15	2.5	10	25	7.5	7.5	3.75	12.5	3.75	0	0	7.5	25	0	0
P95	6.25	18.75	10	6.25	8.75	5	7.5	7.5	6.25	7.5	12.5	0	5	18.75	6.25	0
P96	20	8.75	10	10	20	8.75	8.75	0	15	12.5	10	0	12.5	12.5	0	0
P97	20	15	7.5	25	20	15	25	2.5	17.5	22.5	15	0	15	15	25	0
P100	11.25	10	5	5	8.75	6.25	12.5	0	17.5	17.5	7.5	0	17.5	0	8.75	0
P102	25	18.75	6.25	8.75	16.25	8.75	5	10	13.75	21.25	10	0	15	0	5	0
P103	25	25	25	6.25	5	3.75	5	7.5	3.75	20	6.25	2.5	0	6.25	0	0
P193	8.75	5	0	0	2.5	2.5	0	0	2.5	6.25	10	0	0	0	2.5	0
P197	6.25	5	11.25	0	13.75	12.5	20	0	7.5	16.25	10	0	13.75	10	11.25	0
K-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

b)

Srednja vrednost					Standardna devijacija				
Izolati	Marinela	Jasmina	Serenada	Lara	Izolati	Marinela	Jasmina	Serenada	Lara
P4	4.0625	10.625	0.3125	0.3125	P4	1.0364452	3.69755	0.5412659	0.541266
P12	5.625	2.8125	1.25	0.625	P12	5.1916399	2.84701	2.1650635	1.082532
P16	0	0	0	0	P16	0	0	0	0
P18	13.75	5.625	1.875	2.5	P18	6.6731739	1.875	3.2475953	2.65165
P26	15	10.625	1.5625	0.9375	P26	4.0504629	6.218671	1.6237976	1.623798
P31	6.5625	5.625	1.875	7.1875	P31	2.400358	1.397542	1.0825318	4.180965
P37	10.9375	5.625	1.875	0.625	P37	2.400358	2.86411	2.0728905	1.082532
P40	20.625	14.6875	9.6875	1.25	P40	5.1158455	7.091754	2.2316964	2.165064
P49	15	10.625	6.5625	1.875	P49	4.5927933	6.404344	2.400358	2.07289
P50	2.8125	3.75	0	0	P50	2.8470105	2.795085	0	0
P52	8.75	4.375	0	1.25	P52	1.25	4.463393	0	2.165064
P53	10	6.875	0.625	0	P53	7.2886899	2.07289	1.0825318	0
P57	9.0625	13.75	7.5	4.0625	P57	2.400358	7.551904	3.0618622	5.106292
P61	5.3125	5.3125	0.9375	0	P61	3.6843207	3.788861	1.6237976	0
P63	6.25	6.25	0	0	P63	1.5309311	2.795085	0	0
P73	3.75	7.5	0	0	P73	2.1650635	4.050463	0	0
P74	19.375	10.9375	11.875	3.75	P74	3.365728	2.84701	4.1926275	6.495191
P93	11.25	10.3125	4.375	4.375	P93	4.145781	1.362156	1.0825318	4.463393
P94	14.375	12.8125	2.5	3.4375	P94	6.4650503	8.118988	3.0618622	4.086468
P95	6.5625	12.5	9.0625	1.5625	P95	1.3621559	6.312191	2.400358	2.706329
P96	16.875	10.625	7.1875	0	P96	3.2475953	1.875	4.1809651	0
P97	18.125	16.875	18.125	6.875	P97	2.0728905	3.247595	7.3686413	10.51413
P100	13.75	8.4375	8.4375	1.25	P100	3.8527588	6.335355	2.7063294	2.165064
P102	17.5	12.1875	6.5625	4.6875	P102	4.4194174	8.449066	2.0491995	4.708287
P103	8.4375	13.75	9.0625	4.0625	P103	9.7377728	8.970438	9.494036	2.98106
P193	3.4375	4.0625	0	0	P193	3.2325251	1.623798	0	0
P197	10.3125	10.9375	13.125	0	P197	3.4657927	4.086468	4.0019526	0
K-	0	0	0	0	K-	0	0	0	0

**Prilog 12.** Intenzitet infekcije *P. syringae* pv. *aptata* u okviru testa patogenosti na listovima šećerne repe. Očitavanja su vršena 14 dana nakon inokulacije. a) vrednosti očitavanja nekroze listnog tkiva izražene u procentima (4 ponavljanja) b) Srednja vrednost i standardna devijacija.

a)

Izolati	Marinela 1	Jamina 1	Serenada 1	Lara 1	Marinela 2	Jamina 2	Serenada 2	Lara 2	Marinela 3	Jamina 3	Serenada 3	Lara 3	Marinela 4	Jamina 4	Serenada 4	Lara 4
P4	85	50	1.25	25	40	50	0	0	40	40	0	0	2	10	35	0
P12	25	0	0	2.5	15	1.25	0	0	15	7.5	0	0	0	15	20	0
P16	4	4	0	0	12.5	0	0	0	0	0	0	0	5	1.25	0	0
P18	50	30	0	5	50	55	2.5	42.5	40	80	32.5	5	100	42.5	0	0
P26	27.5	32.5	47.5	17.5	30	37.5	3.75	3.75	47.5	55	0	32.5	37.5	57.5	0	0
P31	7.5	30	0	10	20	5	0	7.5	80	17.5	0	0	35	30	25	2.5
P37	7.5	10	0	0	20	37.5	5	12.5	72.5	3.7	2.5	5	62.5	32.5	7.5	0
P40	52.5	60	35	2.5	50	50	87.5	50	37.5	77.5	35	0	100	77.5	100	0
P49	70	50	30	7.5	57.5	57.5	30	5	51	0	50	20	50	25	15	0
P50	2.5	12.5	0	0	0	1	0	0	20	7.5	0	0	0	0	5	0
P52	7.5	12.5	0	5	17.5	20	0	0	15	15	0	0	5	17.5	0	0
P53	32.5	20	0	5	42.5	17.5	0	0	27.5	12.5	2.5	0	25	7.5	7.5	0
P57	50	22.5	30	25	35	67.5	55	32.5	25	22.5	7.5	0	40	42.5	50	0
P61	7.5	2.5	0	0	10	2.5	0	0	0	12.5	0	0	2.5	25	0	0
P63	5	0	0	2.5	37.5	15	0	0	15	35	0	0	0	10	27.5	0
P73	10	27.5	0	0	15	35	0	0	5	15	0	0	0	0	2.5	5
P74	77.5	17.5	30	0	77.5	37.5	77.5	17.5	25	62.5	57.5	0	0	47.5	65	35
P93	27.5	7.5	17.5	20	65	12.5	12.5	15	37.5	22.5	5	0	0	50	80	5
P94	27.5	22.5	0	35	27.5	27.5	0	2.5	20	20	0	0	0	22.5	25	2.5
P95	30	70	27.5	12.5	40	35	7.5	2.5	42.5	60	65	0	30	57.5	40	0
P96	47.5	60	50	17.5	82.5	35	52.5	5	50	27.5	50	0	60	67.5	7.5	0
P97	67.5	35	37.5	50	100	77.5	30	5	85	40	77.5	0	27.5	60	27.5	0
P100	50	35	10	25	85	2.5	50	10	85	32.5	17.5	25	80	75	30	0
P102	27.5	60	2.5	100	76	85	100	50	95	25	20	0	75	25	62.5	0
P103	25	25	30	50	22.5	37.5	27.5	15	0	50	0	0	20	20	5	0
P193	0	5	2.5	0	50	27.5	1.25	0	2.5	12.5	0	0	1.25	5	0	0
P197	12.5	47.5	60	5	65	70	27.5	0	57.5	30	50	0	27.5	27.5	80	0
K-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

b)

Srednja vrednost					Standardna devijacija				
Izolati	Marinela	Jasmina	Serenada	Lara	Izolati	Marinela	Jasmina	Serenada	Lara
P4	43.75	43.75	0.3125	6.75	P4	26.780357	8.934484	9.7539886	10.49425
P12	17.5	7.1875	0	0.625	P12	14.952772	7.738365	5.7395276	5.154576
P16	4.4375	1	0	1.25	P16	6.1269478	2.570155	2.2926908	2.32615
P18	60	51.875	8.75	13.125	P18	33.569729	18.08455	14.520007	14.68292
P26	35.625	45.625	12.8125	13.125	P26	17.026949	14.97642	16.478953	9.983847
P31	34.375	19.375	0.625	14.375	P31	22.24708	8.50043	8.0540575	10.09563
P37	40.625	20.925	3.75	4.375	P37	24.233866	12.91144	8.0446331	7.914896
P40	60	66.25	64.375	13.125	P40	29.147521	18.20728	31.085701	17.74546
P49	57.125	33.125	31.25	8.125	P49	16.799222	21.2387	11.747829	7.418894
P50	5.625	6.5	0	0	P50	19.093871	6.267128	7.0315492	6.583516
P52	14.375	11.875	0	2.5	P52	6.7238897	6.905283	3.2128535	2.680306
P53	31.875	14.375	2.5	1.25	P53	13.900982	4.298075	4.8593487	4.595903
P57	37.5	38.75	35.625	14.375	P57	16.509349	18.78546	17.503348	11.18107
P61	10.625	4.375	0	0.625	P61	14.165422	5.81153	5.2902419	4.758818
P63	16.875	19.375	0.625	0.625	P63	11.318962	12.30128	5.3538023	4.969005
P73	7.5	20	1.25	0	P73	7.4280402	12.15684	4.6048602	4.481347
P74	56.875	45.625	50	4.375	P74	29.882174	18.52273	19.955659	11.25907
P93	45	30.625	10	8.75	P93	17.809587	26.45213	7.5944829	9.425334
P94	24.375	23.75	1.25	9.375	P94	10.932756	5.703953	3.797712	11.45331
P95	35.625	55.625	35	3.75	P95	13.187167	20.47175	19.167061	8.15629
P96	60	47.5	40	5.625	P96	21.366866	18.21457	18.083243	8.689185
P97	70	53.125	43.125	13.75	P97	28.669959	18.00348	19.186261	16.70107
P100	75	36.25	26.875	15	P100	23.240842	23.62897	12.470243	9.018976
P102	68.375	48.75	46.25	37.5	P102	28.101305	24.12403	32.416154	31.75178
P103	16.875	33.125	15.625	16.25	P103	19.764624	11.70459	11.084415	15.68877
P193	13.4375	12.5	0.9375	0	P193	16.197142	8.347875	5.8653256	5.785743
P197	40.625	43.75	54.375	1.25	P197	23.180229	17.29013	22.36467	10.0291
K-	0	0	0	0	K-	22.562846	9.025139	8.4086763	7.862276

**Prilog 13.** Intenzitet infekcije *P. syringae* pv. *aptata* nakon tretmana ćelijskom kulturom *Bacillus amyloliquefaciens* SS-12.6 u okviru testa biološke kontrole na listovima šećerne repe. a) vrednosti očitavanja nekroze listnog tkiva izražene u procentima; b) Srednja vrednost i standardna devijacija.

a)

Tretman	Br. ponavljanja	Marinela	Serenada	Jasmina	Lara
SS-12.6 + P197	1. ponavljanje	37.48	33.12	25.56	8.12
	2. ponavljanje	29.15	11.07	24	5.6
	3. ponavljanje	27.77	13.57	8.33	66.5
SS-12.6 + P53	1. ponavljanje	18.89	27.38	6.25	66.66
	2. ponavljanje	16.66	10	35	36.11
	3. ponavljanje	34.37	17.06	6.69	36.94
P197	1. ponavljanje	100	35.57	15.33	95
	2. ponavljanje	21.25	60.71	100	65
	3. ponavljanje	78.57	64.1	100	80
P53	1. ponavljanje	100	100	80	50
	2. ponavljanje	90	100	100	33.48
	3. ponavljanje	83.33	100	71.43	52.14
SS-12.6	1. ponavljanje	4.74	5.56	3.76	6.66
	2. ponavljanje	6.45	6.34	5.45	8
	3. ponavljanje	7.44	5.87	4.45	7.43

b)

Sorta	Tretman	Srednja vrednost	Standardna devijacija
Marinela	P197	89.29	6.2
	P53	91.11	4.8
	SS-12.6 + P197	31.47	3.0
	SS-12.6 + P53	17.78	0.6
	SS-12.6	6.21	0.8
Serenada	P197	62.40	1.0
	P53	100.00	0.0
	SS-12.6 + P197	12.32	0.7
	SS-12.6 + P53	18.15	5.0
	SS-12.6	5.92	0.2
Jasmina	P197	99.71	0.3
	P53	83.81	8.5
	SS-12.6 + P197	24.63	0.5
	SS-12.6 + P53	6.48	0.1
	SS-12.6	4.55	0.5
Lara	P197	80.00	8.7
	P53	51.05	0.6
	SS-12.6 + P197	6.86	0.7
	SS-12.6 + P53	36.71	0.3
	SS-12.6	7.36	0.4



**Prilog 14.** Toplotne i padavinske karakteristike vegetacionog perioda 2013.godine (april-septembar) na teritoriji Republike Srbije. Podaci su preuzeti iz Republičkoghidrometeorološkog zavoda Srbije.

Станица	Одступање T <sub>ср</sub> (°C)	Бр. дана са T <sub>мак</sub> >20°C	Бр. дана са T <sub>мак</sub> >30°C	Бр. дана са T <sub>мак</sub> >35°C	Бр. кишних дана	Остварене вегетацијске падавине у мм	Остварене вегетацијске падавине у %
Палић	1.1	132	35	7	43	296	91
Сомбор	1.0	139	37	8	53	389	115
Бечеј	0.9	140	38	8	40	250	75
Банатски Карловац	0.8	145	46	7	44	306	85
Римски Шанчеви	1.0	141	32	4	57	445	126
Кикинда	1.0	138	39	4	48	292	91
Зрењанин	0.9	138	43	7	50	288	84
Вршац	1.2	144	41	8	46	329	81
Сремска Митровица	1.0	148	35	7	47	331	94
Београд	1.5	144	43	7	48	277	69
Лозница	1.3	145	37	10	62	427	90
Ваљево	1.6	138	37	8	57	338	73
Велико Градиште	1.0	148	48	12	48	292	74
Смедеревска Паланка	1.0	145	45	10	44	305	82
Крагујевац	0.9	140	39	8	43	352	96
Краљево	1.2	145	39	9	46	347	81
Пожега	0.9	137	30	6	52	330	76
Ђуприја	1.2	151	48	14	44	281	77
Крушевац	1.2	151	46	10	44	268	74
Неготин	1.6	161	46	9	32	280	89
Зајечар	1.0	161	48	9	28	195	61
Димитровград	1.3	145	34	1	45	267	76
Ниш	1.6	156	52	16	37	231	73
Лесковац	1.5	159	55	19	46	250	76
Врање	1.4	148	40	3	40	254	80
Војводина	1.0	141	38	7	48	325	94
западна Србија	1.2	146	44	10	45	303	79
централна Србија	1.3	140	35	8	57	365	80
источна Србија	1.3	156	43	6	35	247	75
јужна Србија	1.5	154	49	13	41	245	76
РЕПУБЛИКА СРБИЈА	1.2	146	41	8	46	305	84

## BIOGRAFIJA

Ivan S. Nikolić rođen je 23.07.1987. godine u Čačku, gde je završio osnovnu školu i Čačansku gimnaziju. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu upisao je školske 2006/2007 godine, studijska grupa Ekologija, a diplomirao je 2012. godine sa prosečnom ocenom 8,52 i ocenom 10 na diplomskom ispitu. Diplomski rad pod nazivom „Molekularna identifikacija vrste *Orobancha cumana* u Srbiji” uradio je na Institutu za zaštitu bilja i životnu sredinu pod rukovodstvom dr Dragane Marisavljević. Školske 2012/2013 godine upisao je doktorske akademske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, na studijskom programu Biologija, modul Mikrobiologija. Od septembra 2014. godine angažovan je kao istraživač pripravnik na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije OI 173026 „Molekularna karakterizacija bakterija iz rodova *Bacillus* i *Pseudomonas* kao potencijalnih agenasa za biološku kontrolu“. Na istom projektu je od decembra 2015. godine angažovan kao istraživač saradnik. U okviru ovih istraživanja bavi se ekologijom i molekularnom epidemiologijom fitopatogenih izolata vrste *Pseudomonas syringae*, kao i potencijalnom primenom bakterijskih agenasa iz roda *Bacillus* u cilju biološke kontrole bolesti bilja. Od 2014. godine angažovan je kao student doktorskih studija u izvođenju praktične nastave na Katedri za mikrobiologiju na predmetima Mikrobiologija, Mikrobiološki praktikum i Metode u mikrobiologiji. Od 2014. godine član je Udruženja mikrobiologa Srbije, Srpskog biološkog društva i Društva genetičara Srbije. Dobio je stipendiju „FEMS Research Grant“ za istraživački boravak 2017. godine u Nacionalnom institutu za istraživanja u poljoprivredi (INRA), Avinjon, Republika Francuska. Dobio je stipendiju za učešće na konferenciji „FEMS Microbiology Congress“ 2017. godine održanoj u Valensiji, Kraljevina Španija. Do sada je objavio 4 naučna rada, od kojih su 3 iz kategorije M21 i jedan iz kategorije M22. Takođe, učestvovao je sa 10 saopštenja na naučnim skupovima u zemlji i inostranstvu.

## Изјава о ауторству

Име и презиме аутора \_\_\_\_\_ Иван Николић \_\_\_\_\_

Број индекса \_\_\_\_\_ Б3028/2012 \_\_\_\_\_

Изјављујем


да је докторска дисертација под насловом

Идентификација, генетички диверзитет и биолошка контрола *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* са подручја Србије.

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, 12.10.2018.god.



## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора \_\_\_\_\_ Иван Николић \_\_\_\_\_

Број индекса \_\_\_\_\_ Б3028/2012 \_\_\_\_\_

Студијски програм \_\_\_\_\_ Биологија \_\_\_\_\_

Наслов рада Идентификација, генетички диверзитет и биолошка контрола *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* са подручја Србије.

Ментор \_\_\_\_\_ Проф. др Славиша Станковић \_\_\_\_\_

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, 12.10.2018.god.



\_\_\_\_\_

# Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Идентификација, генетички диверзитет и биолошка контрола *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* са подручја Србије.

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално(CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада(CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада(CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима(CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.

Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 12.10.2018.god.



1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.