

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ
Број захтева: 290/2-7.5.
Датум: 26.11.2014.

ВЕЋЕ НАУЧНИХ ОБЛАСТИ
БИОТЕХНИЧКИХ НАУКА

ЗАХТЕВ

за давање сагласности на реферат о урађеној докторској дисертацији
за кандидата на докторским студијама

Молимо да, сходно члану 47. став. 5. тачка 4. Статута Универзитета у Београду ("Гласник Универзитета", број 162/11-пречишћени текст, 167/12 и 172/13), дате сагласност на реферат о урађеној докторској дисертацији:

Кандидат **АНЂЕЛКА (Бошко) ПРОКИЋ**, студент докторских студија на студијском програму Пољопривредне науке, модул Фитомедицина, пријавила је докторску дисертацију под називом: «*Xanthomonas arboricola* pv. *corylina* – ИДЕНТИФИКАЦИЈА ПАТОГЕНА И БИОДИВЕРЗИТЕТ ПОПУЛАЦИЈЕ».

из научне области Фитомедицина.

Универзитет је дана 14.04.2010. године, својим актом број 020-767/21-10. дао сагласност на предлог теме докторске дисертације која је гласила: «*Xanthomonas arboricola* pv. *corylina* – ИДЕНТИФИКАЦИЈА ПАТОГЕНА И БИОДИВЕРЗИТЕТ ПОПУЛАЦИЈЕ».

Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације образована је на седници одржаној 17.09.2014. године, одлуком Факултета број 277/2-26.2. у саставу:

име и презиме члана комисије, звање, научна област, установа у којој је запослен

1. др Алекса Обрадовић, редовни професор, Фитопатологија, Универзитет у Београду - Пољопривредни факултет,
2. др Вељко Гавриловић, виши научни сарадник, Фитопатологија, Институт за заштиту биља и животну средину у Београду,
3. др Милан Ивановић, доцент, Фитопатологија, Универзитет у Београду - Пољопривредни факултет,
4. др Чедо Опарница, ванредни професор, Опште воћарство, Универзитет у Београду - Пољопривредни факултет,
5. др Катарина Гашић, научни сарадник, Фитопатологија, Институт за заштиту биља и животну средину у Београду.

Наставно-научно веће факултета прихватило је реферат Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације на седници одржаној 26.11.2014. године.

ДЕКАН ФАКУЛТЕТА
Проф. др Милица Петровић

Универзитет у Београду
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ
Број: 290/2-7.5.
Датум: 26.11.2014. године
БЕОГРАД-ЗЕМУН

На основу члана 123. Закона о високом образовању и члана 24. Правилника о последипломским студијама и докторату наука, Наставно-научно веће Факултета на седници одржаној 26.11.2014. године, донело је

О Д Л У К У

I ПРИХВАТА СЕ извештај о позитивној оцени урађене докторске дисертације коју је поднела **АНЂЕЛКА ПРОКИЋ**, дипл. инж. и одобрава јавна одбрана дисертације по добијању сагласности од Универзитета, под насловом: "***Xanthomonas arboricola* pv. *corylina* – ИДЕНТИФИКАЦИЈА ПАТОГЕНА И БИОДИВЕРЗИТЕТ ПОПУЛАЦИЈЕ**".

II Универзитет је дана 14.04.2010. године својим актом број 020-767/21-10 дао сагласност на предлог теме докторске дисертације.

III Рад кандидата у часопису међународног значаја:

Prokić, A., Gašić, K., Ivanović, M.M., Kuzmanović, N., Šević, M., Puławska, J., Obradović, A. (2012): Detection and identification methods and new tests as developed and used in the framework of cost873 for bacteria pathogenic to stone fruits and nuts - *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina*. Journal of Plant Pathology 94 (S1): 127-133.

**ПРЕДСЕДНИК
НАСТАВНО-НАУЧНОГ ВЕЋА
ДЕКАН**

(Проф. др Милица Петровић)

Доставити: кандидату, ментору др Алекси Обрадовићу, редовном професору, Институту за фитомедицину, Студентској служби и архиви.

**НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ
ПОЉОПРИВРЕДНОГ ФАКУЛТЕТА
УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ**
Датум: 05.10.2014.

Предмет: Оцена урађене докторске дисертације Анђелке Прокић, дипл. инж.

Одлуком Наставно-научног већа Пољопривредног факултета - Универзитета у Београду бр.ВС-277/2-6.2 од. 17.09. 2014. године именована је Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације Анђелке Прокић, дипл. инж., под насловом: „*Xanthomonas arboricola* pv. *corylina*“ - идентификација патогена и биодиверзитет популације”. Комисија у саставу др Алекса Обрадовић, редовни професор Пољопривредног факултета Универзитета у Београду, др Вељко Гавриловић, виши научни сарадник Института за заштиту биља и животну средину у Београду, др Чедо Опарница, ванредни професор Пољопривредног факултета Универзитета у Београду, др Милан Ивановић, доцент Пољопривредног факултета Универзитета у Београду и др Катарина Гашић, научни сарадник Института за заштиту биља и животну средину у Београду, на основу прегледа докторске дисертације, подноси следећи:

ИЗВЕШТАЈ

ОПШТИ ПОДАЦИ О ДОКТОРСКОЈ ДИСЕРТАЦИЈИ

Докторска дисертација Анђелке Прокић, дипл. инж., написана је на 121 страни текста, и садржи 11 табела и 25 слика. Испред основног текста написан је резиме са кључним речима на српском и енглеском језику.

Докторска дисертација садржи 8 основних поглавља: Увод (стр. 1), Преглед литературе (2-26), Радна хипотеза и циљеви истраживања (27-28), Материјал и методе (29-58), Резултати (59-91), Дискусија (92-104), Закључак (105-106) и Литература (107-121). Поглавља Увод, Преглед литературе, Материјал и методе и Резултати садрже више потпоглавља. На крају текста дисертације налазе се Биографија кандидата и изјаве о ауторству.

1. ПРИКАЗ И АНАЛИЗА ДИСЕРТАЦИЈЕ

Увод. У уводу је указано на привредни значај производње леске, као и на значај проучавања болести проузрокованих фитопатогеним бактеријама. Истакнут је значај бактерије *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina* (у даљем тексту Хас), проузроковача бактериозне пламењаче леске, која по распрострањености и штетности представља најзначајније бактериозно обољење ове воћне врсте у свету. У нашој земљи болест је први пут уочена 50-их година прошлог века, након чега није било даљих проучавања овог патогена. Обзиром на све већи значај и учесталу појаву симптома бактериозне пламењаче последњих година, указано је на потребу детаљнијег проучавања овог проблема, који би могао да угрози новозасноване плантаже леске у нашој земљи, посебно у повољним условима за настанак инфекције.

Преглед литературе. Ово поглавље састоји се из 7 потпоглавља, где су представљени до сада објављени подаци везани за предмет проучавања докторске дисертације.

Прво потпоглавље *Порекло, распрострањеност и биологија леске* описује порекло, распрострањеност и основне карактеристике *Corylus* врста. У другом потпоглављу *Значај и производња леске у свету* указано је на и привредни значај гајења, начине примене,

производњу леске и висину приноса у свету и нашој земљи. У потпоглављу *Распрострањеност бактериоза леске и економски значај* наведене су економски најзначајније фитопатогене бактерије, патогени леске у свету, као и економске штете које могу проузроковати у производњи леске. У поглављу *Бактериозна пламењача леске* обрађени су литературни подаци који се односе на историјат појаве, распрострањеност и економски значај овог обољења. Детаљно је описана симптоматологија, наведени су најважнији подаци о биологији патогена, начинима преношења и одржавања у природи и начинима остварења инфекције. У петом потпоглављу *Сузбијање бактериозне пламењаче леске* обрађени су литературни подаци о мерама контроле болести. Указано је на недовољну ефикасност хемијских средстава и могућност појаве резистентних сојева према бактерицидима.

У потпоглављу *Опште карактеристике и таксономија *Xanthomonas* spp.* приказана је таксономска позиција патогена у систему класификације. Обрађени су и литературни подаци који се односе на опште одлике заједничке за род *Xanthomonas* spp., као и диференцијалне одлике врсте *Xanthomonas arboricola* и патовара *corylina*.

У седмом потпоглављу *Детекција, идентификација и генетички диверзитет* *Xac* представљене су класичне, серолошке, аутоматизоване и молекуларне методе којима се може извршити детекција и идентификација патогена као и диференцијација до нивоа врсте. Указано је на предности и проблеме коришћења различитих дијагностичких тестова, као и на недостатак специфичних метода и стандардизованих протокола за рутинску и брзу детекцију патогена. Изнети су најновији литературни подаци везани за изолацију патогена, проучавање фенотипских и генотипских карактеристика. Истакнут је значај проучавања генетске структуре и диверзитета популације *Xac*.

Радна хипотеза и циљеви истраживања. Полазна претпоставка у овом истраживању је да проузроковач бактериозне пламењаче леске потенцијално значајан патоген који може угрозити производњу гајене леске и умањити њен економски ефекат. Планирана и изведена истраживања употпунила су знање о бактериозној пламењачи леске у нашој земљи, унапредила методе детекције и идентификације патогена што је предуслов за правовремену дијагнозу и ефикасну контролу обољења. Научни циљ ове докторске дисертације био је усмерен на изолацију, идентификацију и детаљну карактеризацију проузроковача овог обољења применом различитих дијагностичких техника. Такође, проучена је генетичка структура одабраних сојева, што доприноси бољем познавању диверзитета, филогенетске позиције и порекла популације овог патогена. Један од циљева истраживања био је утврђивање присуства јединствених региона у геному проучаваних сојева ради развоја метода за специфичну молекуларну детекцију патогена. Осетљивост сојева према појединим бактерицидима проучена је у циљу утврђивања евентуалне појаве резистентних сојева, као и могућности примене појединих супстанци за сузбијање патогена.

Материјал и методе рада. У 8 потпоглавља представљене су методе истраживања примењене у докторској дисертацији, спроведене у пољу и лабораторији. Узорци оболелих биљака гајене леске прикупљени су у периоду 2008 - 2011. године са различитих локалитета у Србији. У потпоглављу *Изолација патогена* представљени су поступак изолације бактерија из биљног материјала, начин одржавања и чувања сојева у колекцији, као и табеларни приказ свих изолованих сојева пореклом из Србије и контролних сојева пореклом из различитих колекција.

У потпоглављу *Патогене одлике проучаваних сојева* описан је поступак проучавања патогености сојева изолованих у нашој земљи. Оцена хиперсензитивне реакције изведена је на лишћу дувана, парадајза и махунама бораније. Патогеност сојева према биљци домаћину проучена је вештачком инокулацијом садница леске применом две различите технике инокулације.

У потпоглављу *Методе проучавања морфолошких и одгајивачких одлика сојева* наведене су методе: разликовање бактерија по Граму КОН тестом, посматрање морфологије

трансмисионим електронским микроскопом, изглед и развој колонија на хранљивим подлогама, развој бактерија при 35 и 36°C и у подлози са различитим концентрацијама NaCl. У потпоглављу *Биохемијско-физиолошке одлике* описане су методе проучавања следећих биохемијско-физиолошких карактеристика: активност оксидазе и каталазе, метаболизам глукозе, могућност коришћења глукозе, манозе, сахарозе, малтозе и сорбитола као извор угљеника, хидролиза скроба, желатина и ескулина, коришћење азотних једињења (редукција нитрата, стварање водоник-сулфида из пептона). Проучавање метаболичке активности репрезентативних сојева применом аутоматизованог Биолог система описано је у петом потпоглављу *Биолог тест*. Могућност детекције и идентификације сојева изолованих из леске проучена је коришћењем две серолошке методе: DAS-ELISA и теста имунофлуоресценције, а поступак рада детаљно је описан у потпоглављу *Серолошке одлике*.

Дејство различитих концентрација антибиотика (стрептомицин-сулфат и касугамицин) и бакарних једињења (бакар-сулфат, комерцијалне формулације бакар-хидроксида и бакар-оксихлорида) на развој бактеријских ћелија проучено је у *in vitro* условима, што је описано у потпоглављу *Проучавање осетљивости сојева према бактерицидима*.

Молекуларна детекција и генотипизација проучаваних сојева представљени су у потпоглављу *Молекуларне методе проучавања патогена*. Описане су различите методе изолације ДНК из чистих култура бактерија. Идентификација сојева до нивоа рода извршена је применом PCR методе, умножавањем дела секвенце 16S rRNK гена. Применом дуплекс PCR методе извршена је истовремена детекција *gumA* гена специфичног за представнике врсте *X. arboricola* и сегмента *ftsX* гена, одговорног за синтезу трансмембранског протеина код врсте *X. arboricola* pv. *pruni*. Такође, код једног репрезентативног соја умножен је фрагмент 16S rRNK гена, извршено његово секвенцирање и анализа добијене секвенце. Молекуларна карактеризација и генетички диверзитет Xас сојева проучени су применом гер-PCR методе помоћу BOX, ERIC i REP прајмера и макрорестрикционе PFGE анализе молекула ДНК коришћењем рестрикционог ензима *SpeI*. Специфичне нуклеотидне секвенце идентификоване путем ERIC-PCR методе, потом су искоришћене за дизајн прајмера и развој PCR протокола за специфичну детекцију Xас сојева. Такође, филогенетска позиција сојева унутар врсте *X. arboricola* проучена је секвенционом анализом умножених ДНК фрагмената конститутивног *gpoD* гена и реконструкцијом филогенетског стабла. Могућност идентификације проучаваних сојева на основу овог гена извршена је поређењем добијених секвенци са познатим секвенцама доступним у NCBI GenBank бази.

Резултати. Резултати истраживања представљени су у оквиру 6 потпоглавља. Приказани су јасно, уз сажета тумачења, прегледне табеле и слике које илуструју делове спроведених истраживања.

У првом потпоглављу *Симптоми болести и изолација патогена* изнети су подаци о типу симптома и врсти биљног материјала из којих је вршена изолација бактерија. За даљи рад издвојено је укупно 36 репрезентативних сојева.

У поглављу *Идентификација проучаваних сојева на основу бактериолошких карактеристика* табеларно су приказани резултати бактериолошких тестова на основу којих је извршена прелиминарна идентификација проучаваних сојева. Морфолошке и одгајивачке одлике указују да су сви проучавани сојеви Грам и оксидаза негативни, каталаза-позитивни, стварају пигмент жуте боје и слузасте полисахарид на хранљивој подлози, развијају се у течној YS подлози при 35°C и у присуству 2% NaCl. Разлажу глукозу оксидативно, стварају каталазу, али не и оксидазу и пектолитичке ферменте; хидролизују скроб, желатин и ескулин, метаболишу квинате, врше хидролизу водоник сулфида и не поседују способност редукције нитрата. Као изворе угљеника користе глукозу, лактозу и сахарозу, али не и сорбитол. Једине разлике међу сојевима забележене су у погледу разлагања малтозе. Патогеност проучаваних сојева потврђена је применом две методе инокулације при чему су уочене разлике у реакцији биљака, изгледу и динамици појаве симптома. Стога је указано на разлике у поузданости коришћених метода тестирања патогености.

Резултати представљени у трећем потпоглављу *Биолог тест* указали су на метаболичку разноврсност проучаваних сојева установљену помоћу аутоматизоване Биолог методе. Добијени метаболички профили били су специфични за род *Xanthomonas*, и нису показали велику сличност са представницима других родова.

Резултати серолошких тестова, приказани у потпоглављу *Серолошке методе идентификације* указали су на униформне серолошке одлике проучаваних сојева који су реаговали са специфичним поликлоналним антителима произведеним за *X. a. pv. corylina*.

Према резултатима представљеним у потпоглављу *Проучавање осетљивости проучаваних сојева према бактерицидима* проучавани сојеви испољили су различиту осетљивост према употребљеним бактерицидима у *in vitro* условима. У погледу осетљивости према једињењима бакра, извесне разлике међу сојевима уочене су на подлози са 100 ppm активне супстанце, док су сви сојеви били осетљиви на 200 ppm коришћених формулација бакра. Према стрептомицину и касугамицину нису установљени резистентни сојеви, при чему је стрептомицин деловао инхибиторно на развој свих проучаваних сојева, при нижим концентрацијама у односу на касугамицин.

У оквиру потпоглавља *Молекуларна идентификација и карактеризација*, детекцијом ДНК фрагмената 16S rRNK гена величине 480 bp извршена је идентификација до нивоа рода, док је детекцијом секвенце *qumA* гена величине 402 bp код свих проучаваних сојева установљена припадност врсти *X. arboricola*. Фрагмент *ftsX* гена од 943 bp умножен је код 38 сојева. Међутим, код три проучавана соја није умножен фрагмент очекиване величине. Секвенционом анализом PCR продукта 16S rRNK гена утврђена је сличност секвенце соја KFB 275 са одговарајућим секвенцама *Xanthomonas* врста доступним у бази података, чиме је потврђена таксономска припадност овом роду.

Резултати гер-PCR методе помоћу три PCR анализе (BOX-PCR, ERIC-PCR i REP-PCR) указали су на постојање диверзитета међу проучаваним сојевима. Поређењем добијених гер-PCR отисака, изведено је груписање сојева и конструкција филогенетског стабла, на основу чега је дефинисано укупно 8 генетичких група. Генетички диверзитет 16 репрезентативних Хас сојева, диференцираних на основу гер-PCR анализе, потврђен је применом макрорестриктионе PFGE методе, при чему су установљене разлике између појединих сојева који су поседовали исте гер-PCR профиле.

У овом истраживању, дизајнирана су два пара прајмера на основу нуклеотидних секвенци умножених ERIC-PCR методом. Помоћу једног сета прајмера AN10-F/AN10 умножени су PCR продукти очекиване величине код свих проучаваних *corylina* сојева. Међутим, приликом проучавања специфичности ових прајмера коришћењем референтних *Xanthomonas* spp., продукти ДНК исте дужине и јачине сигнала добијени су и код других *Xanthomonas* врста што је указало на њихову недовољну специфичност.

Код 16 репрезентативних сојева пореклом из наше земље умножени су фрагменти *rpoD* гена величине око 1300 bp. BLAST анализом умножених секвенци утврђена је 100% идентичност са Хас секвенцама доступним у бази. Изузетак су представљала три Хас соја из базе (CFBP 1159, CFBP 1847 и NCPPB 3870), са којима је проценат сличности износио 99%. Филогенетска анализа указала је на блиску филогенетску сродност унутар врсте *X. arboricola*. На филогенетском стаблу уочена је диференцијација сојева и формирање генетичких група које су углавном биле у сагласности са поделом према патогеној специјализацији. Проучавани Хас сојеви формирали су јасно издвојену групу са другим Хас сојевима доступним у бази. Изузетак је представљао референтни сој NCPPB 3870 чија се секвенца *rpoD* гена разликовала у односу на остале Хас сојеве.

Дискусија. Добијени резултати дискутовани су у оквиру девет потпоглавља уз сажета тумачења повезана са ранијим истраживањима спроведеним у нашој земљи и свету. Диференцијација и идентификација сојева извршена је применом како класичних бактериолошких тестова тако и молекуларних метода.

У потпоглављу *Изолација патогена* истакнуто је да су из већине симптоматичних узорака изоловане патогене бактерије чије су морфолошке одлике указивале на припадност роду *Xanthomonas*. Како би се смањила могућност присуства контаминаната приликом изолације, поред адекватне дезинфекције, препоручује се коришћење свежег биљног материјала и полуселективних подлога.

Проучавање бактериолошких и патогених одлика изведено је применом класичних бактериолошких метода које су услед једноставности извођења и ефикасности, и даље незаобилазне у експерименталним истраживањима фитопатогених бактерија. Проучавани сојеви испољили су већином хомогене фенотипске одлике које су одговарале одликама контролног Хас соја. Дискутоване су биохемијско-физиолошких одлике сојева које су већином биле хомогене. Извесне разлике забележене су у погледу коришћења шећера малтозе. Обзиром да подаци из литературе о коришћењу појединих угљеникових једињења од стране Хас сојева нису у потпуности сагласни, указано је на потребу стандардизације метода у погледу начина извођења и тумачења добијених резултата, али и на хетерогеност сојева у погледу ових карактеристика. Сви сојеви испољили су амилолитичку активност, што представља битну диференцијалну одлику већине припадника рода *Xanthomonas*. Обзиром да је метаболизам квината универзална одлика врсте *X. arboricola*, проучавањем разградње квината на SQ подлози сви сојеви идентификовани су до нивоа врсте. За прецизну идентификацију бактерија до нивоа врсте или соја, путем класичних метода, неопходно је извођење теста патогености на биљци домаћину. У овом раду, коришћењем две методе инокулације биљака леске репродуковани су симптоми природне инфекције, чиме је потврђена патогена природа проучаваних сојева. Такође установљена је различита поузданост примењених метода које су се разликовале у типу и динамици појаве симптома болести.

На основу метаболичких профила добијених *Биолог тестом* било је могуће детерминисати супстрате које су разлагали сви или већина проучених сојева, као и једињења која су била својствена појединим сојевима. Међусобна сличност испољена је у погледу коришћења 20 извора угљеника, док је метаболичка разноврсност установљена у разлагању 25 проучаваних једињења. Помоћу овог теста диференцирани су и сојеви међусобно. Информације о коришћењу појединих извора угљеника од стране проучаваних сојева, могу се употребити у дијагностичке сврхе - за одређивање састава селективних подлога или за диференцијацију сојева унутар врсте или генетичке групе. Обзиром да Хас сојеви нису обухваћени коришћеном базом података, није било могуће извршити тачну идентификацију проучаваних сојева.

У петом потпоглављу *Серолошке методе идентификације* продискутовани су резултати DAS ELISA и IF теста. Обе методе омогућиле су брзу потврду идентитета сојева изолованих из леске. Предности ових метода су осетљивост и брзина извођења, док је главни недостатак недовољна специфичност, због употребе мање специфичних поликлоналних антитела. Упркос ризику од појаве укрштене и лажно позитивне серолошке реакције, пре свега приликом детекције бактерија из биљног материјала, ове методе могу се препоручити за рано откривање патогена у узорку и детекцију бактерија. Ипак, развој моноклоналних антитела допринео би повећању специфичности и поузданости серолошких метода у идентификацији Хас.

Осетљивост према бактерицидима проучена је према бакарним једињењима најчешће коришћеним у нашој пољопривредној пракси и антибиотицима који нису регистровани за примену у нашој земљи. Проучавани сојеви испољили су извесне разлике у погледу осетљивости према 100 ppm једињења бакар-сулфата, бакар-оксихлорида и бакар-хидроксида, при чему се већина сојева нормално развијала. Бактерицидна концентрација наведених формулација за све сојеве износила је 200 ppm. Обзиром да су примењене концентрације биле 10 и 5 пута ниже у односу на количину активне компоненте препоручене за третирање неких биљака у пољу може се закључити да у популацији Хас пореклом из

Србије није дошло до развоја резистентности и да примена ових бактерицида у контроли бактериозне пламењаче леске може бити ефикасна. Ипак, разлике у осетљивости сојева уочене у експерименту указују на могућност развоја отпорности сојева на поједина једињења бакра. Потврђено је да су сви проучавани сојеви осетљиви према стрептомицин сулфату и касугамицину. Указано је на неопходност контролисаних и рационалне примене бактерицида у пракси како би се успорио настанак резистентности и очувала њихова ефикасност у контроли бактериозне пламењаче леске.

Применом PCR методе извршена је идентификација сојева до нивоа врсте. Секвенционим анализом гена за 16 S рибозомалну субјединицу код одабраног соја KFB 275 уочен је висок степен нуклеотидне сличности (98-100%) са секвенцама других *Xanthomonas* spp. доступних у банци гена. На овај начин потврђена је претпоставка о високој хомогености овог региона код сродних бактерија, који стога није довољан за дефинисање односа између уско повезаних таксономских група.

Анализа генетичког диверзитета проучаваних сојева указала је на постојање варијација унутар Хас популације, али и на висок степен хомологије међу сојевима пореклом из Србије. Rep-PCR методом, на основу добијених гер-PCR профила, утврђено је постојање полиморфизма, на основу којег је извршена диференцијација проучаваних сојева. Издвојено је више клоналних група, између којих је максимална генетичка удаљеност износила 96%, док су сојеви унутар једне групе имали исте или скоро идентичне профиле. PFGE анализом потврђено је постојање генетичких варијација унутар Хас популације. Добијени макрорестрикциони профили 16 репрезентативних сојева били су различити, са веома малим бројем заједничких фрагмената. Услед израженог ДНК полиморфизма, помоћу ове методе није било могуће утврдити фрагменте ДНК заједничке свим проучаваним сојевима, који би послужили као потенцијални молекуларни маркери. Постојање диверзитета може указати на више различитих интродукција патогена, вероватно путем садног материјала пореклом из различитих географских подручја. Међутим, за потврду ове претпоставке, потребно је анализирати велики број сојева, како би се утврдило постојање хаплотипова и значаја географског порекла за диверзитет сојева. Осим тога, крајњи циљ наведених анализа био је развој молекуларних маркера за детекцију патогена путем PCR методе.

Иако је проузроковач бактериозне пламењаче леске давно познат и широко распрострањен патоген, поуздана и брза детекција и идентификација Хас сојева базирани су на конвенционалним методама. Због тога је један од циљева у овом раду био развој осетљиве, специфичне и брзе молекуларне методе за детекцију патогена. У осмом потпоглављу дискутује се погодност прајмера дизајнираних у овом раду за успешну детекцију и идентификацију Хас сојева. Проучавања специфичности дизајнираних прајмера указала су на њихову недовољну специфичност. Стога је наглашено да њихова примена може бити погодна за детекцију *Xanthomonas* колонија пореклом из леске, али не и за диференцијацију од сродних представника овог рода код којих, такође, долази до умножавања циљаног PCR фрагмента. Потешкоће приликом развоја PCR методе за специфичну детекцију *X. arboricola* патовара, већ су описани у литератури, што се може објаснити високом генетичком сличношћу сојева у оквиру врсте.

Конститутивни гени представљају погодне генетичке маркере за проучавање диверзитета сојева и филогенетских односа међу сојевима исте врсте. На основу спроведене филогенетске анализе *rpoD* гена потврђено је да *X. arboricola* патовари представљају одвојене генетичке врсте, јер су на филогенетском стаблу већином формирали јасне генетичке гупе. Уочен је висок степен хомологије међу секвенцама Хас сојева пореклом из Србије. Ови сојеви формирали су хомогену групу са већином проучаваних сојева из иностранства, што указује на њихово заједничко порекло. Једино је референтни сој NCPPB 3870 пореклом из Италије, сврстан у посебну групу, што је показатељ постојања диверзитета у популацији Хас.

Закључак. Закључак је правилно изведен и у потпуности произилази из добијених резултата.

Производњу леске у нашим условима угрожава појава фитопатогених бактерија. Проучавањем патогених, морфолошких, одгајивачких и биохемијско-физиолошких одлика утврђено је да карактеристике изолованих сојева одговарају одликама бактерије *Xas* описаним у литератури. Коришћењем Биолог теста установљене су разлике у метаболичкој активности међу проучаваним сојевима. Метаболички профили сојева специфични су за бактерије рода *Xanthomonas*, и немају велику сличност са представницима других родова. Применом DAS-ELISA и IF теста потврђено је да сви проучавани сојеви поседују заједничке антигене карактеристике као и контролни сој. Експериментална проучавања *in vitro* указала су на осетљивост проучаваних сојева на бактерициде. Највећу осетљивост сојеви испољавају на антибиотике, што је и очекивано, обзиром да ови препарати нису регистровани за примену у нашој земљи. Различита осетљивост сојева према препаратима на бази бакра указује на могућност развоја отпорности *Xas* сојева на поједина једињења бакра, те је, стога неопходна њихова рационална и контролисана примена. Молекуларне PCR методе показале су се погодним за идентификацију проучаваних сојева до нивоа врсте. Молекуларна карактеризација сојева указала је на значајан генетички диверзитет и хетерогеност проучаваних сојева различитог географског порекла. Велика сродност *X. arboricola* патогена отежава развој молекуларних метода за детекцију и диференцијацију на нивоу патовара. Иако је постигнута успешна детекција свих проучаваних сојева, специфичност прајмера дизајнираних у овом раду није била задовољавајућа. Секвенцирањем конститутивног *rpoD* гена проучени су филогенетски односи међу *X. arboricola* патоварима који су указали на груписање сојева према фитопатогеној специјализацији. Сојеви из Србије испољили су висок степен хомологије секвенци *rpoD* гена.

Литература. У дисертацији је наведено 156 референци, од чега 11 домаћих и 145 страних аутора, које представљају избор најзначајнијих радова објављених у овој области. Цитиране референце обухватају широк спектар извора литературе што указује на темељно проучену проблематику од стране кандидата. Избор литературних извора је актуелан, а цитирање је изведено на правилан начин.

2. ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ

Докторска дисертација Анђелке Прокић, дипл. инж., под насловом: „*Xanthomonas arboricola* pv. *corylina*“ - идентификација патогена и биодиверзитет популације“ представља оригиналан истраживачки рад од научног и практичног значаја. Спроведеним истраживањима испуњен је план наведен у пријави докторске дисертације.

Резултати истраживања у оквиру ове докторске дисертације представљају допринос у проучавању проузроковача бактериозне пламењаче леске у нашој земљи. Научни значај огледа се у примени и развоју различитих класичних, имунодијагностичких, аутоматизованих и молекуларних метода, којима је постављен оквир за развој и стандардизацију протокола за брзу, осетљиву и поуздану детекцију и идентификацију патогена. Неке од метода примењене су по први пут у свету и код нас. Проучена је генетичка структура сојева, што доприноси бољем познавању диверзитета, филогенетске позиције и порекла популације овог патогена. Међу проучаваним сојевима пореклом из Србије установљене су генетичке разлике и постојање клоналних група. Потврда генотипске сродности конститутивног *rpoD* гена са сојевима из иностранства, од посебног је практичног значаја и доприноси разумевању епидемиологије обољења. У оквиру ових истраживања дизајнирани су прајмери и развијен је PCR протокол који се може користити за брзу детекцију патогена. Овим радом је по први пут од открића бактериозне пламењаче леске у Србији, применом најсавременијих метода, извршена правилна идентификација патогена. Методе коришћене у истраживањима омогућиле су кандидату да адекватно и у потпуности

провери постављену хипотезу и тако оствари постављени задатак и циљ. Рад је написан јасним стилем, а резултати су коректно објашњени, документовани и дискутовани. Тумачења резултата су научно заснована и исправно поређена са резултатима других аутора. Током израде докторске дисертације, на темељу добијених резултата, проистекао је рад објављен у часопису међународног значаја категорије М23. У часописима националног значаја, категорије М51, објављен је један рад, као и више усмених саопштења на научним и стручним скуповима у земљи и иностранству.

Имајући у виду остварене резултате, Комисија позитивно оцењује докторску дисертацију кандидата Анђелке Прокић, дипл. инж., под насловом: „*Xanthomonas arboricola pv. corylina*“ - идентификација патогена и биодиверзитет популације“ и предлаже Наставно-научном већу Пољопривредног факултета, Универзитета у Београду, да ову позитивну оцену усвоји и тиме омогући кандидату да пред истом Комисијом јавно брани докторску дисертацију.

Београд, 05.10.2014.

Чланови Комисије:

Др Алекса Обрадовић, редовни професор,
Пољопривредни Факултет - Универзитет у Београду
(област Фитопатологија) - ментор

Др Вељко Гавриловић, виши научни сарадник,
Институт за заштиту биља и животну средину, Београд
(област Фитопатологија)

Др Милан Ивановић, доцент,
Пољопривредни Факултет - Универзитет у Београду
(област Фитопатологија)

Др Чедо Опарница, ванредни професор,
Пољопривредни Факултет - Универзитет у Београду
(област Опште воћарство)

Др Катарина Гашић, научни сарадник,
Институт за заштиту биља и животну средину, Београд
(област Фитопатологија)

Прилог:

Рад кандидата у часопису међународног значаја који омогућава одбрану докторске дисертације:

Prokić, A., Gašić, K., Ivanović, M.M., Kuzmanović, N., Šević, M., Puławska, J., Obradović, A. (2012): Detection and identification methods and new tests as developed and used in the framework of cost873 for bacteria pathogenic to stone fruits and nuts - *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina*. *Journal of Plant Pathology* 94 (S1): 127-133.