

UNIVERZITET U BEOGRADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET

Nevena Z. Zlatković

DETEKCIJA I IDENTIFIKACIJA BAKTERIJA
PARAZITA BILJAKA FAMILIJE
CUCURBITACEAE KLASIČNIM I
MOLEKULARNIM METODAMA

doktorska disertacija

Beograd, 2018.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF AGRICULTURE

Nevena Z. Zlatković

DETECTION AND IDENTIFICATION OF
CAUSAL AGENTS OF CUCURBIT
BACTERIAL DISEASES BY CLASSICAL AND
MOLECULAR METHODS

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2018

Komisija za ocenu i odbranu:

Mentor: dr Aleksa Obradović, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu - Poljoprivredni fakultet

Članovi komisije: dr Milan Ivanović, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu - Poljoprivredni fakultet

dr Katarina Gašić, viši naučni saradnik
Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Beograd

dr Đorđe Moravčević, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu - Poljoprivredni fakultet

dr Mila Grahovac, docent
Univerzitet u Novom Sadu – Poljoprivredni fakultet

Datum odbrane: _____

Zahvalnica

Doktorska disertacija realizovana je u Laboratoriji za fitobakteriologiju Poljoprivrednog fakulteta u Beogradu, u okviru projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije III46008: "Razvoj integrisanih sistema upravljanja štetnim organizmima u biljnoj proizvodnji sa ciljem prevazilaženja rezistentnosti i unapređenja kvaliteta i bezbednosti hrane", čiji je rukovodilac prof. dr Aleksa Obradović.

Veliko hvala mentoru, profesoru dr Aleksu Obradoviću na pomoći u izboru teme disertacije, nesebično prenetom znanju i bezrezervnoj podršci u svakom smislu u toku doktorskih studija i izrade ove disertacije.

Zahvaljujem se profesoru dr Đorđu Moravčeviću i dr Mili Grahovac, docentu, na saradnji i korisnim savetima tokom izrade disertacije.

Posebnu zahvalnost dugujem bivšim i sadašnjim kolegama iz Laboratorije za fitobakteriologiju Poljoprivrednog Fakulteta u Beogradu, dr Nemanji Kuzmanoviću, dr Katarini Gašić, dr Anđelki Prokić i profesoru dr Milanu Ivanoviću na nesebičnoj pomoći i podršci.

Zahvaljujem se kolegini dr Maji Ignjatov iz Instituta za ratarstvo i povrtarstvo u Novom Sadu i kolegi Milanu Ševiću na pruženoj pomoći u toku prikupljanja uzoraka biljnog materijala.

Takođe, zahvaljujem se kolegama sa Florida Univerziteta u Gainesville-u (SAD), dr Jeffrey Jones-u i dr Eric Newberry-u, koji su mi pomogli oko realizacije dela istraživanja.

Hvala Ministarstvu nauke, prosvete i tehnološkog razvoja za stipendiranje mojih doktorskih studija.

Zahvaljujem se svojoj porodici za svu pomoć i razumevanje tokom ovih godina.

Na kraju, najveću zahvalnost dugujem svojim roditeljima, Ljiljani i Zoranu, na podršci, veri i iskrenoj ljubavi koja me je uvek vodila napred, stoga ovu disertaciju posvećujem njima.

DETEKCIJA I IDENTIFIKACIJA BAKTERIJA PARAZITA BILJAKA FAMILIJE CUCURBITACEAE KLASIČNIM I MOLEKULARNIM METODAMA

REZIME

Familija Cucurbitaceae broji preko 800 biljnih vrsta, od kojih neke imaju široku primenu u ishrani ljudi, prerađivačkoj i farmaceutskoj industriji.

S obzirom da su biljke familije Cucurbitaceae posebno osetljive prema nekoliko vrsta fitopatogenih bakterija, u godinama sa uslovima pogodnim za nastanak infekcije, gubici mogu dosegnuti velike razmere.

U periodu od 2013-2016. godine, sa različitih lokaliteta širom Srbije, prikupljeni su simptomatični uzorci biljaka familije Cucurbitaceae. Iz obolelog tkiva, izolovano je ukupno 63 soja fitopatogenih bakterija. Sojevi su proučeni primenom standardnih i savremenih metoda.

Svi proučavani sojevi bili su Gram-negativni i katalaza pozitivni. Od 63 testirana soja, 61 soj je prouzrokovao pojavu hipersenzitivne reakcije biljaka duvana. Izuzetak su predstavljala 2 soja izolovana iz ploda lubenice sa simptomima bakteriozne mrljivosti koje prouzrokuje vrsta *Acidovorax citrulli*.

Na osnovu patogenih, morfoloških, biohemijsko-fizioloških i molekularnih odlika, izolovani sojevi svrstani su u 3 roda: *Acidovorax*, *Pseudomonas* i *Pectobacterium*.

Nepektolitički, oksidaza pozitivni sojevi, koji se razvijaju pri 41°C, pripadaju rodu *Acidovorax*. Sojevi na YDC podlozi obrazuju okrugle, ispupčene kolonije, krem boje, sa tendencijom porasta i promene boje kolonija u tamniju. Primenom prajmera BX-L1/BX-S-R2 specifičnih za vrstu *A. citrulli*, došlo je do umnožavanja fragmenta veličine 279 bp, čime je potvrđena pripadnost izolovanih sojeva ovoj vrsti. Proučavanjem sekvenci 16S rRNK gena, i njihovim poređenjem sa sekvencama iz NCBI baze, takođe je utvrđen visok stepen sličnosti (100%) sa drugim sojevima *A. citrulli*. U cilju proučavanja genetičkog diverziteta sojeva, primenjen je rep-PCR test. Iako je ispoljena potpuna homogenost sojeva, u BOX-PCR profilu jednog soja, umnožen je fragment koji nije uočen kod ostalih sojeva. Stoga se zaključuje da izolovani sojevi *A. citrulli* pripadaju populaciji zajedničkog porekla, koja je kod nas dospela zaraženim semenom. Sojevi su ispoljili su visok stepen virulentnosti u testovima patogenosti

na različitim domaćinima porodice Cucurbitaceae, kao i na različitim sortama lubenice. Bakteriozna mrljavost plodova lubenice do 2014. godine nije zabeležena u nas. Patogen ima karantinski status na teritoriji Srbije, kao i na području Evropske i mediteranske organizacije za zaštitu bilja (EPPO).

Dvadeset osam sojeva izolovanih iz simptomatičnih listova tikava, smešteni su u rod *Pseudomonas*. Uočena je varijabilnost u pogledu stvaranja levana na NAS podlozi, stvaranju fluorescentnog pigmenta na Kingovoj podlozi B, kao i stvaranju čestica leda. Primenom PCR reakcije za detekciju gena za sintezu siringomicina, kod 26 proučavanih sojeva umnožen je fragment karakteristične veličine, što ukazuje na pripadnost vrsti *Pseudomonas syringae*. Za 15 sojeva *P. syringae* kod kojih je uočen genetički diverzitet na osnovu BOX PCR profila, izvedena je multilokusna sekvenciona analiza (MLSA) umnožavanjem unutrašnjih fragmenata 4 „housekeeping“ gena. Utvrđeno je da svi proučavani sojevi poreklom iz Srbije pripadaju genomskoj vrsti 1, *P. syringae sensu stricto*, u okviru iste filogenetske grupe 2b. Za soj KFB 381 izvedeno je sekvenciranje celog genoma, a rezultati su pokazali visok stepen identičnosti (99,96-99,99%) sa sojevima *P. s. pv. syringae* izolovanim u Americi, Francuskoj i Australiji. Dva soja kod kojih nije detektovan gen za sintezu siringomicina, podvrgnuta su analizi 16S rRNK gena. Poređenjem dobijenih sekvenci sa sekvencama u NCBI bazi, utvrđeno je da ti sojevi pripadaju vrsti *Pseudomonas viridiflava*. Nijedan izolovan soj roda *Pseudomonas* nije ispoljio visok stepen virulentnosti na mladim biljkama lubenice i tikve.

Tri preostala soja izolovana iz srži vreža lubenice i ploda tikve poseduju pektolitičke karakteristike, kao i sposobnost redukcije nitrata i O/F metabolizam glukoze. Na osnovu proučenih osobina, sojevi su smešteni u rod *Pectobacterium*. Rezultati 16S rRNK analize ukazali su na pripadnost vrsti *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense*, koja do sada u Srbiji nije opisana.

U okviru ovog rada, proučena je specifičnost 12 sojeva bakteriofaga prema vrsti *A. citrulli*. Od 32 testirana soja bakterija, samo 2 soja poseduju rezistentnost prema svim sojevima faga, što ukazuje na mogućnost upotrebe bakteriofaga u biološkoj kontroli patogena ali i opasnost od širenja rezistentnih sojeva.

Proučavanjem dejstva baktericida i antibiotika na razvoj bakterijskih ćelija u *in vitro* uslovima, nije ustanovljena rezistentnost sojeva, ali je uočena razlika u osetljivosti, što ukazuje na mogućnost razvoja otpornosti bakterija na pojedina jedinjenja bakra i antibiotika.

Ključne reči: biljke familije Cucurbitaceae, bakterioze, *Acidovorax citrulli*, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas viridiflava*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense*, identifikacija, bakteriološke odlike, PCR, MLSA

Naučna oblast: Biotehničke nauke

Uža naučna oblast: Fitopatologija

UDK broj: 632.35:635.61/.63(043.3)

DETECTION AND IDENTIFICATION OF CAUSAL AGENTS OF CUCURBIT BACTERIAL DISEASES BY CLASSICAL AND MOLECULAR METHODS

ABSTRACT

The Cucurbitaceae family consists of over 800 plant species, some of which play an important role in human nutrition, processing and pharmaceutical industries.

Bearing in mind these plants are especially susceptible to several types of phytopathogenic bacteria, losses can be substantial in years with favorable conditions for the emergence of infection.

In the period 2013–2016, symptomatic cucurbit plant samples were collected from different locations throughout Serbia. A total of 63 strains of phytopathogenic bacteria were isolated from diseased tissues. The strains were studied using the standard and modern methods.

All studied strains were Gram-negative and catalase positive. Out of the 63 strains tested, 61 strains caused the hypersensitivity reaction of tobacco plants. The exceptions were two strains isolated from a watermelon fruit showing the symptoms of bacterial fruit blotch, caused by *Acidovorax citrulli*.

Based on pathogenic, morphological, biochemical-physiological and molecular characteristics, isolated strains were classified into 3 genera: *Acidovorax*, *Pseudomonas* and *Pectobacterium*.

Isolated strains, which did not produce potato soft rot, but were oxidase positive and grew at 41°C, were classified into the genus *Acidovorax*. They produced beige to tan-coloured, round, nonmucoid, convex colonies on yeast extract-dextrose-CaCO₃ (YDC) agar. After three days, spreading of the colony margins was noticed, and the colour of the colony became darker. The identity of the strains was also confirmed by using the *A. citrulli*-specific primer set BX-L1/BX-S-R2. A 279-bp DNA fragment was amplified. The 16S rRNA gene sequence from two strains showed 100% identity to *A. citrulli* strains, previously deposited in the NCBI GenBank database. Genetic relatedness among strains was investigated by the rep-PCR method. All tested strains, except one, showed the same BOX-PCR profiles. The obtained results show that *A. citrulli* strains isolated in Serbia belonged to a relatively

homogeneous population. These isolated occurrences were considered seed-borne. All tested strains, with the exception of the two already mentioned, exhibited a high degree of virulence in pathogenicity tests on different hosts of the Cucurbitaceae family as well as on various watermelon cultivars. Until 2014, bacterial fruit blotch was not recorded in our country. This pathogen has a quarantine status in the territory of Serbia, as well as in the area of the European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO).

Twenty-eight strains isolated from symptomatic cucurbit leaves, belonged to the genus *Pseudomonas*. It was observed variability of the strains in the formation of levan-positive colonies on NAS medium, the production of fluorescent pigment on King's medium B and the ice nucleation activity. The PCR reaction was performed to detect the gene for the synthesis of syringomycin. A specific fragment was amplified in twenty-six tested strains, which indicates their belonging to the species *Pseudomonas syringae*. Multilocus sequence analysis (MLSA) was performed for 15 strains of *P. syringae*, based on the BOX PCR profiles, using 4 “housekeeping” genes. It was established that all studied strains originating from Serbia belonged to the genomic species 1, *P. syringae sensu stricto*, within the same phylogenetic group 2b. In addition, whole genome sequencing was performed for the strain KFB 381. The result showed high identity level with *P. s. pv. syringae* strains isolated in the USA, France and Australia. The 16S rRNA gene was analyzed for two strains, which did not have a gene for syringomycin synthesis. The comparison of the obtained sequences with those previously deposited in the NCBI database shows that these strains belonged to the species *Pseudomonas viridiflava*. All tested *Pseudomonas* strains did not have a high degree of virulence in young plants of watermelon and pumpkin.

The three remaining strains did not produce the fluorescent pigment, but they showed pectolytic activity on potato slices. In addition, these strains were able to reduce nitrate and they had O/F glucose metabolism. The results of the 16S rRNA analysis indicate that the species belonged to *P. c. subsp. brasiliense*, which has not been described in Serbia so far.

It was also investigated the specificity of 12 bacteriophage strains to *A. citrulli* strains. Out of the 32 tested strains of bacteria, only 2 were resistant to all the phage strains. This result indicates the potential use of bacteriophages in biological control of the pathogen but also the risk of the phage-resistant strains spread.

The investigation of the effects of bactericides and antibiotics on the development of bacterial cells *in vitro* shows that all strains were susceptible. However, differences in the susceptibility of the strains observed in the experiment suggest the potential for the development of resistance to copper compounds and antibiotics.

Key words: plant family Cucurbitaceae, bacterial diseases, *Acidovorax citrulli*, *Pseudomonas syringae sensu stricto*, *Pseudomonas viridiflava*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense*, identification, bacteriological characteristics, PCR, MLSA

Scientific field: Biotechnical Science

Scientific discipline: Phytopathology

UDC number: 632.35:635.61/.63(043.3)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	2
2.1 Poreklo, rasprostranjenost i biologija biljaka porodice Cucurbitaceae	2
2.2 Oboljenja biljaka porodice Cucurbitaceae.....	5
2.3 Bakteriozna oboljenja biljaka porodice Cucurbitaceae	7
2.3.1 <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lachrymans</i> - prouzročivač uglaste pegavosti lišća krastavca.....	7
2.3.2 <i>Acidovorax citrulli</i> - prouzročivač bakteriozne mrljivosti plodova lubenice	9
2.3.3 <i>Xanthomonas cucurbitae</i> - prouzročivač bakteriozne pegavosti tikava.....	15
2.3.4 <i>Erwinia tracheiphila</i> – prouzročivač bakteriozne uvelosti krastavca	16
2.3.5 <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> – prouzročivač bakteriozne pegavosti i uvelosti zeljastih biljaka i rak-rana i bakterioznog izumiranja voćaka	17
2.3.6 <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> - prouzročivač bakteriozne vlažne truleži	18
2.3.7 <i>Serratia marcescens</i> – prouzročivač žutila vreža (eng. Cucurbit yellow vine disease, CYVD).....	20
3. RADNA HIPOTEZA	21
4. MATERIJAL I METODE RADA	22
4.1 Obilazak terena i prikupljanje materijala.....	22
4.2 Izolacija patogena iz biljnog materijala	22
4.3 Izolacija patogena iz zemljišta.....	23
4.4 Održavanje i čuvanje izolovanih bakterijskih sojeva.....	25
4.5 Patogene odlike sojeva.....	25

4.5.1	Hipersenzitivna reakcija (HR).....	25
4.5.2	Test patogenosti na biljci domaćinu.....	26
4.6	Morfološke i odgajivačke osobine.....	28
4.6.1	Bojenje bakterija po Gramu.....	28
4.6.2	Maksimalna temperatura razvoja.....	29
4.6.3	Fluorescentnost sojeva.....	29
4.6.4	Razvoj i izgled kolonija na hranljivim podlogama.....	29
4.7	LOPAT testovi.....	30
4.7.1	Stvaranje levana.....	30
4.7.2	Aktivnost oksidaze.....	30
4.7.3	Trulež kriški krompira.....	31
4.7.4	Metabolizam arginina.....	31
4.7.5	Hipersenzitivna reakcija (HR).....	32
4.8	Biohemijsko-fiziološke odlike sojeva.....	32
4.8.1	Aktivnost katalaze.....	32
4.8.2	Stvaranje kiseline iz arabinoze, saharoze, manitola, sorbitola i inozitola.....	33
4.8.3	Redukcija nitrata.....	33
4.8.4	Oksidativno-fermentativni metabolizam glukoze (O/F test).....	34
4.8.5	Stvaranje čestica leda.....	35
4.9	Molekularne metode proučavanja patogena.....	36
4.9.1	Ekstrakcija DNK.....	36
4.9.2	PCR analiza.....	39
4.9.2.1	Rep-PCR.....	40
4.9.2.2	Sekvencionana analiza 16S rRNK.....	41

4.9.2.3	Analiza multilokusnih sekvenci (MLSA)	42
4.9.3	Sekvenciranje genoma bakterije, sklapanje i anotacija	44
4.10	Spektar domaćina.....	45
4.11	Osetljivost sortimenta prema <i>A. citrulli</i>	45
4.12	Osetljivost sojeva bakterija prema baktericidima	45
4.13	Specifičnost bakteriofaga prema izolovanim sojevima <i>A. citrulli</i>	46
5.	REZULTATI.....	48
5.1	Obilazak terena i simptomi oboljenja	48
5.2	Izolacija patogena	51
5.3	Patogene odlike sojeva.....	53
5.3.1	Hipersenzitivna reakcija	53
5.3.2	Test patogenosti na biljci domaćinu	54
5.4	Diferencijacija roda izolovanih bakterija.....	57
5.5	Identifikacija predstavnika vrste <i>A. citrulli</i>	58
5.5.1	Morfološke i odgajivačke osobine sojeva <i>A. citrulli</i>	58
5.5.2	Biohemijsko-fiziološke odlike sojeva <i>A. citrulli</i>	59
5.5.3	PCR analiza sojeva <i>A. citrulli</i>	59
5.5.3.1	Rep-PCR analiza sojeva <i>A. citrulli</i>	60
5.5.3.2	Sekvencionarna analiza 16S rRNK gena sojeva <i>A. citrulli</i>	61
5.6	Identifikacija predstavnika roda <i>Pseudomonas</i>	62
5.6.1	Morfološke i odgajivačke osobine sojeva roda <i>Pseudomonas</i>	62
5.6.2	LOPAT testovi.....	63
5.6.3	Biohemijsko-fiziološke odlike sojeva roda <i>Pseudomonas</i>	64
5.6.4	PCR analiza sojeva roda <i>Pseudomonas</i>	65
5.6.4.1	Rep-PCR analiza sojeva roda <i>Pseudomonas</i>	65

5.6.4.2	Sekvenciona analiza 16S rRNK gena sojeva roda <i>Pseudomonas</i>	66
5.7	Identifikacija sojeva roda <i>Pectobacterium</i>	66
5.7.1	Biohemijsko-fiziološke osobine sojeva roda <i>Pectobacterium</i>	66
5.7.2	Sekvenciona analiza 16S rRNK gena sojeva roda <i>Pectobacterium</i>	67
5.7.3	Ekstrakcija DNK	71
5.7.3.1	MLSA analiza	71
5.7.3.2	Sekvenciranje genoma bakterije, sklapanje i anotacija	73
5.7.3.3	Real-time PCR detekcija patogena u semenu lubenice	73
5.8	Spektar domaćina.....	73
5.9	Osetljivost sortimenta lubenice prema <i>A. citrulli</i>	75
5.10	Osetljivost sojeva prema baktericidima	75
5.11	Specifičnost bakteriofaga prema izolovanim sojevima <i>A. citrulli</i>	78
6.	DISKUSIJA.....	80
7.	ZAKLJUČCI.....	94
8.	Literatura	95

1. UVOD

Familija Cucurbitaceae broji oko 120 rodova, u okviru kojih se nalazi preko 800 različitih vrsta. Pojedine vrste familije Cucurbitaceae dugi niz vekova imaju veliki značaj u ishrani ljudi. Jedan od najstarijih fosilnih ostataka iz vremena paleocena pronađenih u Montani (SAD), pripada vrsti *Cucurbitaciphyllum lobatum* (Manchester, 2014). U umerenim do tropskim klimatskim zonama gajenja, najznačajnije vrste ubrajaju se u tri roda – *Cucurbita* L., *Cucumis* L., *Citrullus* L. (Gaba et al., 2004; Ilina et al., 2012). Prema zasejanim površinama u našoj zemlji, prednjače krastavac (*Cucumis sativus*), potom lubenica (*Citrullus lanatus* L.) i dinja (*Cucumis melo* L.). Gajene vrste tikava kao što su: obična tikva (*Cucurbita pepo* L.), bundeva (*Cucurbita maxima* Duchense) i muskatna tikva (*Cucurbita moschata* Duchense) preovlađuju na poljima severnog dela Srbije. Osim upotrebe u svežem stanju, ove vrste su našle široku primenu u farmaceutskoj i prerađivačkoj industriji. Tako je najvažniji način korišćenja semena uljane tikve, koja predstavlja varijetet obične tikve, dobijanje ulja (Berenji, 2011), dok seme lubenice sadrži veliki udeo masti, proteina, složenih šećera, mineralnih materija i vitamina D (Gvozdanović-Varga, 2011). Plodovi krastavca obiluju vitaminom K, a različiti varijeteti se koriste u konzerviranom stanju, za potrebe zimnice. Prema podacima Organizacije za hranu i poljoprivredu (eng. Food and Agriculture Organization, FAO) iz 2014. godine, najveći svetski proizvođač krastavca, lubenice i dinje bila je Kina. Srbija pripada grupi srednjih proizvođača u Evropi, sa tendencijom rasta proizvodnje od 2011. godine (FAO, 2014).

Uspešnu poljoprivrednu proizvodnju redovno ometa pojava bolesti. Do sada je opisano preko 200 različitih oboljenja biljaka familije Cucurbitaceae, prouzrokovanih virusima, bakterijama, gljivama, pseudogljivama, kao i drugim biotskim i abiotskim činiocima (Zitter, 1996). Biljke iz porodice tikava naročito su osetljive prema nekoliko vrsta fitopatogenih bakterija (Zlatković i sar., 2015). U godinama sa uslovima pogodnim za razvoj infekcija, gubici u proizvodnji mogu dostići velike razmere.

2. PREGLED LITERATURE

2.1 Poreklo, rasprostranjenost i biologija biljaka familije Cucurbitaceae

Pojam “tikve” predstavlja zbirni naziv za različite vrežaste vrste familije Cucurbitaceae. Narodna imena su dosta neprecizna, pa tako ista vrsta ima različite narodne nazive, ili pak različite vrste nose isto ime. Većina tikava karakterističnih za naše podneblje, pripada rodu *Cucurbita* (Berenji, 2010). Vrste ovog roda gaje se nekoliko hiljada godina unazad. Prema pojedinim podacima, tikvica je možda i jedina biljna vrsta za koju je poznato da je korišćena u Starom i Novom svetu. Poljoprivredna proizvodnja starih naroda centralne i južne Amerike - Asteka, Maja i Inka, počivala je na proizvodnji biljaka familije Cucurbitaceae (Moreno and Roig, 1990). Obična tikva je “odomaćena” pre 9 000 - 10 000 godina (Smith, 1997; Wang et al., 2012), dok se krastavac uzgajao u Indiji još pre 3 000 godina. Vrg se zbog izgleda svog ploda u prošlosti koristio u svojstvu posuda, muzičkih instrumenta i za ribolov (Heiser, 1985; Erickson et al., 2005). Prema podacima Organizacije za hranu i poljoprivredu (FAO) iz 2014. godine, najveći proizvođač lubenice je Kina, sa prinosom oko 75 000 000 t. Osim lubenice, Kina je i najveći proizvođač krastavca sa prinosom oko 56 900 000 t, i dinje oko 14 800 000 t. Srbija pripada grupi srednjih proizvođača lubenice u Evropi. U periodu od 2009-2014. godine, zabeleženo je smanjenje površina zasejanih lubenicom, ali je istovremeno prinos znatno uvećan (FAOSTAT, 2016). Bogat sortiment i raznovrsnost genotipova omogućavaju uspešnu proizvodnju u našoj zemlji (Obradović i sar., 2014). U Srbiji se krastavac uzgaja na površini oko 4 000 ha (www.pks.rs). Proizvodnja lubenice i dinje odvija se na oko 6 400 ha, sa prosečnim prinosom 33,7 t/ha u periodu od 2012-2016. godine (www.stat.gov.rs).

Biljke familije Cucurbitaceae su uglavnom jednogodišnje i toploljubive, pa tako stradaju već od slabog mraza. Većina biljaka je jednodoma, sa odvojenim muškim i ženskim cvetovima. Insekti, naročito pčele, imaju veliku ulogu u procesu oprašivanja. Korenov sistem je dobro razvijen i proteže se uglavnom u površinskom sloju zemlje. Stabljika je u vidu razgranate puzajuće vreže ili se viticama drži za potporu (Lešić i sar., 2004). Plodovi čak i u okviru iste vrste se razlikuju po obliku, veličini, boji i izgledu kore

ploda, odnosno egzokarpa. Izuzetak predstavlja vrsta *Cucurbita ficifolia* (smokvolisna tikva), koja je karakteristična po uniformnim plodovima. Kao nedozreli plodovi, u ishrani se koriste krastavac i tikvice, dok se lubenica, dinja i bundeva upotrebljavaju u fazi fiziološke zrelosti (Lazić i sar., 2013).

Lubenica (*C. lanatus*) je povrtarska vrsta koja vodi poreklo iz centralne Afrike (obod pustinje Kalahari), odakle je prenesena na Bliski Istok i dalje u Indiju, Kinu, a zatim i u celi svet (Moravčević i sar., 2017). Gajena lubenica je nastala od divljih formi koje se nalaze sa obe strane ekvatora (Lazić i sar., 2013). U naše krajeve dospela je iz područja Turske, dok je u ostale zemlje Evrope doneta iz Sredozemlja (Đurovka, 2008). Areal rasprostranjenosti je usko povezan sa klimatskim faktorima. Lubenica se uspešno proizvodi u toplijim i suvim regionima, koje odlikuje visoka prosečna temperatura i duga vegetaciona sezona. Osim ovih faktora, za uspešan rast lubenica i dinja zahtevaju velike količine vode i svetlosti. Zbog svog prijatnog, osvežavajućeg i slatkog ukusa, u ljudskoj ishrani se najviše koristi plod u fiziološkoj zrelosti. Osim toga, lubenica ima primenu i u prerađivačkoj industriji - za proizvodnju slatka, sirupa, ekstrakciju vitamina D, kao i različitih nezasićenih masnih kiselina, kojima je seme izuzetno bogato. Naime, linolna kiselina, koja pripada grupi esencijalnih aminokiselina, zauzima 63% uljane frakcije semena lubenice. Jestivi, odnosno mesnati deo ploda, obuhvata 40-60% od ukupne mase ploda, od čega šećeri čine najveći deo suve materije. Prema sadržaju gvožđa, lubenica je odmah posle salate i spanaća, dok je pored paradajza jedina povrtarska vrsta koja u svom sastavu sadrži likopen (Lazić i sar., 2013).

Rod *Cucumis* obuhvata preko 40 vrsta, ali se samo 3 gaje kao povrće: krastavac, zapadnoindijski krastavac ili anguria i dinja (Đurovka, 2008). Postoje dva centra rasprostranjenja dinje. Prvi je Indija, gde se formirala grupa istočnoazijske ili polikulture dinje koja se danas može naći u Indiji, Kini, Japanu i Koreji, a drugi je Afrika. Zajedno sa lubenicom, u našim krajevima često se nazivaju bostan. Plodovi dinje imaju viši sadržaj suve materije od ploda lubenice, a bogati su i vitaminom C. Zbog svoje nutritivne vrednosti, poseduje dijetalna i lekovita svojstva. Ovo je vrsta koja dobro uspeva na lucerištima i razoranim ledinama, stoga u plodoredu zauzima prvo mesto. Što se klimatskih

faktora tiče, pogoduju joj isti uslovi kao i lubenici. Osetljiva je na monokulturu, kao i na gajenje nakon drugih biljaka porodice Cucurbitaceae (Lazić i sar., 2013).

Krastavac je prastara biljna vrsta koja se gaji vekovima. Poreklo vodi iz vlažnih rejona Indije, gde se uzgajao još pre 3 000 godina. Drugi centar porekla predstavljaju područja južne Kine i Burme. Gajenje krastavca u staklenicima započeto je u 19. veku u Engleskoj (Lešić i sar., 2004). Ovu vrstu karakteriše kratka vegetaciona sezona, pa se može gajiti i na većim nadmorskim visinama, ali u zaštićenom prostoru. Najveći deo, od 95-97%, ploda čini voda, dok ostatak predstavlja suhu materiju. U plodovima se nalaze eterična ulja koja krastavcu daju poseban miris. U uslovima stresa, odnosno preterano visoke temperature, niske relativne vlažnosti vazduha, zalivanja hladnom vodom u toku toplih dana itd., plodovi dobijaju gorak ukus koji potiče od glukozida kukurbitacina (Đurovka, 2008). Krastavac se gaji gotovo u celom svetu, a ima široku primenu u farmaceutskoj i prerađivačkoj industriji.

Običnu tikvu (*Cucurbita pepo*), odlikuje veliki broj varijeteta i formi. Među njima, najpoznatije su: uljana tikva, tikvica za jelo, ukrasne tikve, krivošije, cukini, patison itd. U poslednje vreme, na teritoriji naše zemlje, sve više se gaji uljana tikva. Postoje dve forme ove vrste - uljana tikva sa ljuskom i uljana tikva golica. Kao posledica jedne mutacije koja se spontano desila u prirodi, seme golice nema čvrstu ljusku, odnosno semenjaču. Zbog svojih osobina, pogodna je za preradu i dobijanje vrlo kvalitetnog nerafinisanog tikvinog ulja. Seme uljanih tikava sa ljuskom bele i krem boje uglavnom se koristi za pečenje i grickanje (Berenji, 2010). Pored *C. pepo*, značajne vrste u svetu, a i u nas su: muskatna tikva (*Cucurbita moschata* Poir.), bundeva ili ludaja (*Cucurbita maxima* Duch.), smokvolisna ili divlja tikva (*C. ficifolia* Bouche), vrg ili sudovnjača (*Lagenaria vulgaris* Stendl.) i lufa (*Lufa cylindrica* Roemer). U ishrani se koriste plodovi različite zrelosti, kako odmah po zametanju plodova, tako i u fiziološkoj zrelosti. Seme tikava ima lekovita svojstva, naročito kod tegoba sa prostatom (Lazić i sar., 2013).

Bundeva je veoma varijabilna vrsta, dok su kod nas najviše zastupljene forme sa krupnim ili srednjekrupnim belim ili svetlosivim plodovima, ovalnog i sferičnog oblika. Imaju dosta narodnih imena, koja uglavnom oslikavaju neke karakteristike, pa tako naziv ludaja potiče od osobine semena te vrste da sadrži otrovne materije koje deluju na nervni

sistem, pa ih ne treba konzumirati. Džinovske bundeve zameću više plodova, koje obično odbacuju kod težine između 30 i 50 kg, ali ako se odgaji jedan plod, može da teži i do 250 kg. Godine 2014., proizvođač iz Nemačke uspeo je da odgaji bundevu tešku preko 1 000 kg. Bundeva ima malu energetska vrednost, ali obiluje kalijumom, fosforom, gvožđem, kalcijumom, različitim mikroelementima, vitaminom B1, B2, B6, E, provitaminom A i folnom kiselinom.

Vrg ili tikva sudovnjača, lagenarija ili nategača, ima plodove različite veličine koji se koriste kao sudovi i ukrasi. Kao povrće za ishranu nema veliki značaj. Delovi kore i semena ove vrste nađeni su u staroegipatskim grobnicama. Zreli plodovi imaju čvrstu, teško lomljivu koru. U Africi, u zidu posuda od tikve sudovnjače, pronađena je vrsta gljive koja luči antibiotik sličan streptomycinu, koji uništava bacile tuberkuloze. Seme lagenarije se sve češće koristi za kalemljenje lubenice, tako što mlade biljke vrga služe kao podloga (Đurovka, 2008).

2.2 Oboljenja biljaka familije Cucurbitaceae

Biljke familije Cucurbitaceae gaje se širom sveta. Ipak, naročitu važnost u ekonomskom smislu imaju u zemljama srednje i istočne Azije, kao i u Latinskoj Americi. Uspešnu proizvodnju često narušava pojava različitih biljnih bolesti. Do sada je na tikvama opisano preko 200 različitih oboljenja. Među prouzrokovateljima infekcija nalaze se gljive, virusi i viroidi, bakterije i fitoplazme. Štete u proizvodnji prouzrokuju nematode, insekti i parazitske cvetnice (Zitter et al., 1996).

Preko 20 000 gljiva parazitira biljke i životinje, prouzrokujući različita oboljenja (Zitter et al., 1996). Infekcija se najčešće ostvaruje direktnim prodorom ili kroz prirodne otvore, kao što su stome i hidatode. Spore gljiva se vrlo lako raznose kišom i vetrom. Takođe, ljudi i životinje svojim kretanjem potpomažu širenje patogena u prirodi. Koren klijanaca krastavca, lubenice i dinje često biva zaražen vrstama roda *Fusarium*, *Phytium*, *Verticillium*, *Phytophthora* i *Rhizoctonia*. Simptomi oboljenja ispoljavaju se u vidu truleži podzemnih organa biljke. Fuzariozno uvenuće je čest i rasprostranjen patogen lubenice i dinje u svetu i u nas. U povoljnim uslovima, gubici mogu biti izuzetno veliki. Nadzemni

organi tikava, a naročito dinje i lubenice, posebno su osetljivi na vrstu *Alternaria cucumerina* koja prouzrokuje crnu pegavost listova. U slučaju jakih infekcija, ukupan prinos može opasti i za 50%. Antraknoza, oboljenje prouzrokovano vrstom *Colletotrichum lagenarium*, predstavlja jedno od najvažnijih za biljke familije Cucurbitaceae. Simptomi bolesti se ispoljavaju na svim nadzemnim delovima biljke: listovima, stablu (vreži) i plodovima. Najpre se simptomi uočavaju na starijim, prizemnim listovima, u vidu većih, žutih, uglastih ili okruglih pega, mada su najuočljiviji na plodovima tikava, izraženi kao ugnute, ovalne, vodenaste pege, prekrivene narandžastim eksudatom sa konidijama. Prouzrokovatelj plamenjače krastavca, *Pseudoperonospora cubensis*, pripada grupi ekonomski najznačajnijih patogena krastavca. U povoljnim uslovima, može doći i do potpunog uništenja lisne mase biljaka (Mijatović i sar., 2007).

Oboljenja prouzrokovana biljnim virusima predstavljaju pravi izazov u pogledu zaštite jer se izuzetno teško kontrolišu, a mogu prouzrokovati velike ekonomske gubitke. Opisano je preko 30 različitih virusa koji su posebno agresivni prema biljkama familije Cucurbitaceae. Većina se lako prenosi insektima vektorima, dok se za pojedine zna da se prenose zaraženim semenom (Zitter et al., 1997). Virus mozaika krastavca (*Cucumber mosaic virus*, CMV) je veoma rasprostranjen i prouzrokuje značajne gubitke u proizvodnji velikog broja jednogodišnjih i višegodišnjih zeljastih i drvenastih biljaka. Primarni domaćini su krastavac i dinja. Kod svih biljaka iz porodice tikava, virus ometa cvetanje i zametanje plodova. Virus zelenošarenog mozaika krastavca (*Cucumber green mottle mosaic virus*, CGMMV) stvara problem u proizvodnji krastavca u zatvorenom prostoru, gde narušava kvalitet plodova. Otporna vrsta je *C. pepo*, dok su pored krastavca, dinja i lubenica prirodni domaćini. U mnogim delovima sveta, fitopatogeni virusi smatraju se ograničavajućim faktorom proizvodnje lubenice (Guner and Wehner, 2008). Od virusa infektivnih za lubenicu, najznačajniji su virus žutog mozaika cukinija (*Zucchini yellow mosaic virus*, ZYMV), virus mozaika lubenice (*Watermelon mosaic virus*, WMV) i virus prstenaste pegavosti papaje (Papaya ringspot virus, PRSV). Značajne gubitke u proizvodnji može prouzrokovati i virus mozaika bundeve (*Squash mosaic virus*, SqMV) (Provvidenti, 1996). Najčešći simptomi virusnih zaraza na listu lubenice su mozaik, hlorotično šarenilo, deformacije, klobučavost i nitavost, a na plodu deformacije, često sa karakterističnim

bradavičastim izraštajima na površini i nekroza tek formiranih plodova (Vučurović i sar., 2008).

2.3 Bakteriozna oboljenja biljaka porodice Cucurbitaceae

Biljke porodice tikava naročito su osjetljive prema nekoliko vrsta fitopatogenih bakterija. U godinama sa vremenskim uslovima pogodnim za nastanak infekcije, bakterioze mogu prouzrokovati velike gubitke u proizvodnji. S obzirom na klimatske uslove u nas, bakterioze nisu značajno ograničavale proizvodnju biljaka porodice tikava, ali je u pojedinim kišnim i toplim godinama zabeležen značajan pad prinosa.

2.3.1 *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* - prouzrokovatelj uglaste pegavosti lišća krastavca

Prouzrokovatelj uglaste lisne pegavosti, *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*, jedan je od preko 50 različitih patovara heterogene vrste *Pseudomonas syringae* (Young et al., 1996, loc. cit. Olczak-Woltmana et al., 2008). Ova vrsta pripada grupi najvažnijih i najproučavanijih patogena porodice Cucurbitaceae. Parazit je opisan 1915. godine od strane Bryan-a i Smith-a (Arsenijević, 1997). I u današnje vreme se ubraja u grupu najagresivnijih patogena u usevima krastavca širom Amerike (Bhat et al., 2010). Do nedavno, praktično svaka pegavost na biljkama porodice Cucurbitaceae dovodila se u vezu sa vrstom *P. s. pv. lachrymans*. Ova fitopatogena vrsta je dosta prilagodljiva, pa je tako izolovana na različitim geografskim širinama, u Danskoj, koja pripada hladnijem pojasu zemljine polulopte (Hellmers, 1950, loc. cit. Bhat et al., 2010), kao i u Kaliforniji (Stout, 1952, loc. cit. Bhat et al., 2010), poznatoj po toplijoj klimi. Patogen je izolovan u Rusiji (Galatchyan, 1937), Japanu (Tominaga and Tsuchiya, 1958), Engleskoj (Lelliott, 1958), Iranu (Banhashemi, 1971), Izraelu (Volcani, 1964). Takođe, zabeleženi su nalazi i u Turskoj, Australiji, Argentini, Brazilu, Venecueli, Kanadi, Kini, Singapuru, Tajlandu, Filipinima, većini evropskih i afričkih zemalja, stoga možemo reći da je rasprostranjen širom sveta (Bhat et al., 2010). Polovinom prošlog veka, u Rusiji i Japanu zabeleženi su gubici od oko 50% ukupnog prinosa, prouzrokovani vrstom *P. s. pv. lachrymans* (Gorlenko and Voronkevich, 1946; Watanabe and Ohuchi, 1983; loc. cit. Bhat et al., 2010). Osamdesetih godina prošlog

veka u američkoj saveznoj državi Viskonsin (Wisconsin), zabeležen je godišnji gubitak u proizvodnji od 0,5 miliona dolara (Kennedy and Alcorn, 1980). El-Sadek i saradnici (1992) utvrdili su da je kao posledica upotrebe zaraženog semena krastavca prilikom setve u Egiptu, oko 98% klijanaca bilo zaraženo vrstom *P. s. pv. lachrymans* (El-Sadek et al., 1992, loc. cit. Bhat et al., 2010). Uglasta pegavost krastavca važila je za dosta rasprostranjeno i štetno oboljenje 60ih i 70ih godina prošlog veka u nas, posebno u regionu Vojvodine. U uslovima povoljnim za razvoj bolesti, koji podrazumevaju temperature u opsegu od 25-30°C i vlažnost vazduha od 90% i više, patogen je izuzetno destruktivan, pa tako gubici mogu dosezati i do 80% ukupnog prinosa (Mijatović i sar., 2007). U proleće 2006. i 2007. godine, zabeležena je pojava infekcije dinje i krastavca, prouzrokovana *P. s. pv. lachrymans*. Intenzitet zaraze u usevu krastavca bio je izuzetno visok, stoga su biljke likvidirane pre plodonošenja (Ristić i sar., 2007). U poslednjih nekoliko godina, nisu zabeleženi značajniji gubici u proizvodnji.

Primarni način prenošenja *P. s. pv. lachrymans* je semenom. Najčešće su domaćini ovog patogena krastavac, bundeva, tikvica i dinja, ali do razvoja infekcije može doći i kod drugih srodnih vrsta, među kojima je i lubenica. *P. s. pv. lachrymans* takođe ima izraženu sposobnost preživljavanja u ostacima obolelih biljaka u zemljištu. Veliku ulogu u ovom procesu ima vlažnost zemljišta, koja pogoduje održavanju patogena (Kritzman and Zutra, 1983). Kišne kapi i insekti doprinose širenju bakterije s biljke na biljku i nastajanju sekundarnih infekcija.

Prvi simptomi oboljenja se obično pojavljuju na kotiledonima, s obzirom da se patogen uglavnom prenosi zaraženim semenom. Na površini kotiledona mogu se uočiti vodenaste, okruglaste pege. Vremenom tkivo u okviru pega izumire, dobijajući mrku boju, dok površina zahvaćena promenama formira nepravilan oblik. Kao posledica, dolazi do deformisanja i sušenja kotiledona. Nekada mlade biljke potpuno izumiru. Sekundarne infekcije nastaju tokom sezone. S naličja lista se uočavaju „uglaste“ pege, ograničene lisnim nervima. U početku razvoja imaju uljast izgled, kasnije se suše i postaju mrke (Arsenijević, 1997). Bakterijski eksudat, koji je moguće uočiti pri vlažnom vremenu s naličja lista, predstavlja dijagnostički simptom za razlikovanje od simptoma plamenjače krastavca prouzrokovane pseudogljivom *P. cubensis* (Mijatović i sar., 2007). Šupljikavost

lista koja nastaje usled nekroze i izumiranja tkiva, često podseća na štete od grada. Sa listova se zaraza prenosi dalje, na dršku ploda, a potom i na plod. Takođe se može pojaviti bakterijski eksudat ćilibarne boje, koji pomaže u uspostavljanju dijagnoze oboljenja. Mladi plodovi dobijaju žućkastu boju koja vremenom prelazi u mrku, smežuravaju se i na kraju otpadaju. Na starijim plodovima prvo se razvijaju sitne, uljaste pege, uglavnom kružnog oblika. Tkivo u okviru pege se razmekšava i puca, pri čemu dolazi do obilnog isticanja bakterijskog eksudata koji očvršćava i dobija mrku boju. Ime parazita potiče od pojave isticanja ovog eksudata u obliku suze (lat. *lachryma*). Sa obolelog ploda patogen dospeva i na seme, odakle se setvom infekcija prenosi dalje, na klicu i mlade klijance naredne godine (Arsenijević, 1997).

Na podlozi hranljivi agar (HA) bakterija formira bele, blago ispupčene, sjajne kolonije, okruglog oblika i ravnih ivica. Prouzrokuje hipersenzitivnu reakciju lista duvana i muškatle, a na King-ovoj podlozi B stvara difuzni fluorescentni pigment.

2.3.2 *Acidovorax citrulli* - prouzrokovatelj bakteriozne mrljavosti plodova lubenice

Godine 1965. godine u Džordžiji (Georgia, SAD) zabeležena je pojava bolesti opisana kao plamenjača klijanaca lubenice, a prouzrokovatelj je 1978. godine nazvan *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli* (Goth and Webb, 1965; Schaad et al., 1978; Schaad et al., 2008; loc. cit. Burdman and Walcott, 2012). Postoji pretpostavka da vremenski uslovi nisu pogodovali razvoju infekcije, pa je do pojave simptoma došlo na klijancima lubenice, dok su plodovi ostali nezaraženi. Crall i Schrenck 1969. godine objavljuju izveštaj o dvogodišnjoj pojavi truleži plodova lubenice u istraživačkoj stanici u Lizburgu (Leesburg), na Floridi. Izgled opisanih simptoma na zrelih plodovima u potpunosti je odgovarao simptomima bakteriozne mrljavosti lubenice (eng. bacterial fruit blotch, BFB), stoga možemo reći da je te godine uočena prva prava pojava infekcije. Iako je etiologija oboljenja bila nepoznata i izolovani patogeni nisu detaljno proučeni, naučnici su doveli u vezu ove dve pojave i pretpostavili da je uzrok oboljenja isti (Crall and Schrenck, 1969; loc. cit. Latin and Hopkins, 1995). Crall i saradnici su na osnovu oglada sprovedenih u polju zaključili da se patogen održava u semenu. Daljim izučavanjima, došlo je do izmene u taksonomiji pa je vrsta preimenovana u *A. citrulli* (Walcott et al., 2004). S

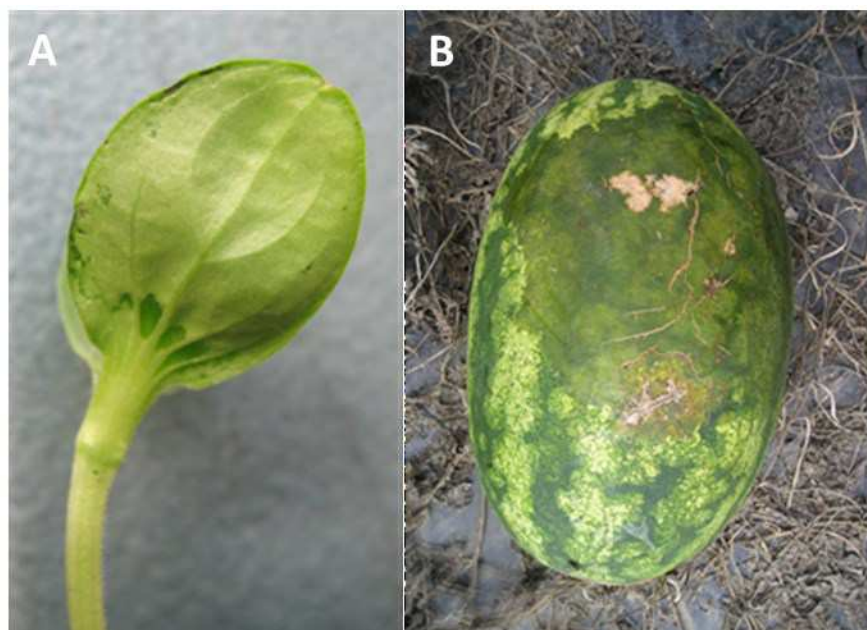
obzirom da do 80ih godina prošlog veka nisu zabeležene ponovne pojave ovog patogena, za vrstu *A. citrulli* se kaže da pripada grupi “novijih patogena”. Do pojave infekcije dolazilo je sporadično i bila je ograničena na klijance lubenice. Godine 1978., objavljen je još jedan kratak nalaz patogena u Australiji, koji osim fotografija simptoma, nije pružao značajne informacije kao što su mesto pojave infekcije ili pričinjene gubitke. U ovom izveštaju po prvi put je upotrebljen termin “bakteriozna mrljavost” (Latin and Hopkins, 1995). Za prouzrokovača oboljenja, navedena je bakterija iz roda *Pseudomonas* (Vock and Hampson, 1978; loc. cit. Latin and Hopkins, 1995). Međutim, 1987. godine na Marijanskim ostrvima i Floridi, zabeležena je prva nagla značajna pojava bakteriozne mrljavosti, kada su čitavi usevi lubenice bili izgnubljeni (Wall and Santos, 1988; Somodi et al., 1991). Do razvoja infekcije došlo je na plodovima u fazi fiziološke zrelosti, a materijalni gubici bili su ogromni. Ubrzo je došlo do pojave infekcije u savezima Indijani, Oklahomi i Teksasu (Latin and Rane, 1990; Jacobs et al., 1992; Black et al., 1994). Nedugo zatim, počela su da pristižu saopštenja o pojavi ovog oboljenja u mnogim državama širom sveta (Burdman and Walcott, 2012). Do 1996. godine, sva pažnja bila je usmerena na lubenicu, s obzirom da je iz godine u godinu dolazilo do sve većih gubitaka u proizvodnji. U tom periodu, nastaju infekcije i na drugim vrstama porodice Cucurbitaceae širom sveta. Od 1996-1999. godine, po prvi put, utvrđeno je prisustvo vrste *A. citrulli* na dinji u Teksasu i Brazilu (Isakeit et al., 1997; Assis et al., 1999), tikvi (Langston et al., 1999) i na krastavcu (Martin and O’Brien, 1999). Patogen se vrlo brzo proširio širom sveta, uglavnom putem zaraženog semena i sadnog materijala. Zanimljivo je da je 1997. godine u Izraelu patogen izolovan iz nekoliko lotova semena paradajza i plavog patlidžana, a ubrzo je uočena pojava infekcije na dinji i lubenici (Burdman et al., 2005; loc. cit. Burdman and Walcott, 2012). U periodu od 2003-2005. godine prisustvo *A. citrulli* zabeleženo je u Kini i mediteranskom delu Turske (Burdman et al., 2005; Ren et al., 2006; Mirik et al., 2006). U Mađarskoj je bakteriozna mrljavost prvi put uočena 2007. godine, dok su u Grčkoj ovo oboljenje Holeva i saradnici opisali 2010. godine (Palkovics et al., 2008; Holeva et al., 2010). U Srbiji, kao i na području Evropske i mediteranske organizacije za zaštitu bilja (EPPO), *A. citrulli* ima karantinski status i nalazi se na listi IA, I deo. Ipak, u leto 2014. godine prisustvo bakterije utvrđeno je na području Srema (Obradović i sar., 2014; Popović i Živanović, 2014).

U pogledu taksonomije i nomenklature, bilo je nekoliko izmena. Prvobitno je prouzrokovao oboljenja nazvan *P. p.* subsp. *citrulli*. Hu i saradnici (1991) su uočili visok stepen sličnosti između ovog patogena i vrste *Pseudomonas avenae*, pa je tako preimenovan u *P. avenae* subsp. *citrulli*. Daljim molekularnim proučavanjima Williems i saradnici (1992) su utvrdili da je ova vrsta fenotipski najbliže grupisana rodu *Acidovorax*, stoga dolazi do promene naziva u *A. avenae* subsp. *citrulli*. Konačno, 2008. godine vrsta je nazvana *A. citrulli* (Shaad et al., 2008).

Epidemiologija bakterijske mrljavosti još uvek nije dovoljno proučena. Mogućnost prezimljavanja patogena u zemljištu, alternativnim domaćinima, ostacima zaraženih biljaka, mogućnosti opstanka i širenja u našim agroekološkim uslovima, još uvek su nepoznanica. Utvrđeno je da se patogen održava i prenosi semenom, tako da seme predstavlja najvažniji izvor primarnog inokuluma (Rane and Latin, 1992). S obzirom da se na zaraženom semenu lubenice ne mogu uočiti nikakvi simptomi, prepoznavanje oboljenja je dosta otežano. Pojedine korovske vrste tikava, kao što su *Citrullus lanatus* var. *citroides* i *Cucumis anguria* var. *anguria*, kao i oboleli biljni ostaci, mogu predstavljati potencijalni izvor inokuluma (Isakeit et al., 1998). Kolika je njihova realna uloga u nastanku sekundarnih infekcija, i dalje je nepoznato. U nekoliko studija naučnici su utvrdili da patogen u fazi cvetanja lubenice relativno lako prodire preko žiga i stubića do plodnika cveta (Walcott et al., 2003; Lessl et al., 2007). Pretpostavlja se da na taj način dolazi do kontaminacije semena. Proizvodnja mladih biljaka lubenice u rasadniku je dominantnija u odnosu na proizvodnju istih na otvorenom polju. Mikroklimatski uslovi rasadnika su idealni za razvoj infekcije, što za posledicu može imati 100% infekciju klijanaca tokom proizvodnje rasada, a kasnije i visok procenat zaraze biljaka u polju. Širenju patogena doprinose i kišne kapi, zalivanje „odozgo“, gust sklop biljaka, visoka temperatura i vlažnost vazduha. Ispoljavanje simptoma je veoma varijabilno. Naime u zavisnosti od virulentnosti patogena, simptomi na kotiledonima mogu biti jasno izraženi, ili teško uočljivi. Osim toga, ukoliko nastupe nepovoljni uslovi, infekcija se zaustavlja, ali se bakterija i dalje održava u biljci domaćinu, ili kao epifit, na sejancima. Nakon rasađivanja na stalno mesto, zaražene biljke iz rasadnika postaju izvor za širenje sekundarnih infekcija tokom vegetacije (Obradović i sar., 2014). U polju značajnu ulogu u širenju infekcije imaju obilne prolećne i

letnje kiše i vetrovito vreme. Uspostavljanje pravilne dijagnoze otežava činjenica da simptomi na listovima biljke često podsećaju na posledice abiotskog stresa. Plodovi lubenice i dinje naročito su osetljivi prema vrsti *A. citrulli*. Do prodora patogena može doći putem prirodnih otvora ili povreda na epidermisu, ili pak patogen dospeva u biljku preko ženskog cveta u fazi cvetanja. Pojedini autori navode aktivnosti pčela u fazi oprašivanja kao faktor koji pomaže širenju patogena u prirodi (Fessehaie et al., 2005, loc cit. Bahar and Burdman, 2010). Poseban problem u semenskoj proizvodnji i detekciji patogena predstavlja činjenica da se iz plodova koji naizgled deluju zdravo može dobiti kontaminirano seme, upravo zbog latentnih infekcija ili neodgovarajućih vremenskih uslova za ispoljavanje simptoma.

Prvi simptomi bakteriozne mrljavosti mogu se uočiti na naličju kotiledona, u vidu pega duž nerava, vodenastog izgleda i nepravilnog oblika (Slika 1, A). Nakon nekoliko dana tkivo unutar pega postaje tamnije i nekrotira. Infekcija može zahvatiti i hipokotil, što dovodi do uginjavanja biljke. Ipak, najkarakterističniji simptomi bakteriozne mrljavosti se ispoljavaju na zrelim plodovima lubenice i dinje. Na gornjoj strani ploda formiraju se pege, vodenastog izgleda, nepravilnog oblika. Vremenom, pege zahvataju sve veću površinu, a tkivo kore puca. Kroz nastale lezije prodiru i drugi patogeni, pa tako dolazi do razmekšavanja unutrašnjeg tkiva ploda (Slika 1, B). Oboleli plodovi su potpuno neupotrebljivi i nemaju komercijalnu vrednost (Obradović i sar., 2014).



Slika 1. *Acidovorax citrulli* - Bakteriozna mrljavost plodova lubenice. Pege vodenastog izgleda na naličju kotiledona lubenice. Veštačka infekcija (A). Izgled simptoma na kori ploda u fazi fiziološke zrelosti lubenice. Prirodna infekcija (B). (Foto: N. Zlatković (A); A. Obradović (B))

A. citrulli je Gram-negativna bakterija, pravog ili blago zakrivljenog, štapićastog oblika, sa jednom polarnom flagelom. Prosečna dimenzija ćelije iznosi oko $0,5 \times 1,7 \mu\text{m}$. Sojevi su katalaza negativni, oksidaza pozitivni, nefluorescentni. Odgajivačke osobine koje su karakteristične za vrstu *A. citrulli* jesu rast pri 41°C i obrazovanje ispuščenih, okruglih kolonija, krem boje na podlozi od kvašćevog ekstrakta i CaCO_3 (YDC), sa tendencijom porasta, odnosno širenja ivice kolonija (Shaad et al., 2008). Većina sojeva prouzrokuje hipersenzitivnu reakciju duvana.

Još u početnim fazama proučavanja ovog patogena, uočene su izvesne razlike među sojevima. Utvrđeno je da sojevi izolovani na Floridi, za razliku od sojeva iz Džordžije, prouzrokuju hipersenzitivnu reakciju duvana. Nedugo zatim, O'Brien i Martin (1999) beleže značajne razlike u populaciji *A. citrulli* poreklom iz Australije (Burdman and Walcott, 2012). Primenom metoda elektroforeze u pulsirajućem polju jednosmerne struje (eng. Pulse Field Gel Electrophoresis- PFGE), analize masnih kiselina (GC-FAME) i rep-PCR, Walcott i saradnici (2000) su utvrdili da se sojevi *A. citrulli* mogu razdvojiti na bar dve genetički različite grupe. Sojevi koji pripadaju grupi I su izolovani iz različitih domaćina, dok su sojevi grupe II uglavnom izolovani iz lubenice prema kojoj su izuzetno

agresivni, za razliku od drugih domaćina, prema kojima ispoljavaju umerenu virulentnost. Daljim proučavanjima, zasnovanim na korišćenju izvora ugljenika, pokazano je da sojevi grupe I, izolovani uglavnom iz dinje, ne koriste L-leucin kao izvor ugljenika, dok 2-amino etanol koriste. Za sojeve grupe II L-leucin predstavlja izvor ugljenika, za razliku od 2-amino etanola (Živanović, 2014). U narednih nekoliko godina, pristizale su potvrde ovakvih rezultata iz različitih zemalja sveta (Burdman et al., 2005; Feng et al., 2009). Kod većine fitopatogenih bakterija utvrđeno je da sistem sekrecije tip III (T3SS) ima ključnu ulogu u pogledu patogenosti. Geni koji kodiraju komponente ovog sekrecionog aparata nazivaju se *hrp* geni. Istraživanja su pokazala da je upravo *hrp*-T3S sistem odgovoran za patogenost *A. citrulli* prema domaćinima iz porodice Cucurbitaceae, kao i za HR reakciju na vrstama koje nisu primarni domaćini, kao što su paradajz i duvan (Bahar and Burdman, 2010). Osim toga, na patogenost utiču i sistem sekrecije tip II (T2SS), tip IV pili (T4P), polarna flagela, kao i inicijacija ekspresije gena pri minimalnoj, odnosno graničnoj koncentraciji međucelijskih signalnih molekula, tzv. autoindusera (eng. quorum sensing) (Burdman and Walcott, 2012).

S obzirom da je primarni način održavanja patogena semenom, mere zaštite i kontrole patogena su dosta složene. Latentne infekcije doprinose dospevanju zaraženog semena na njive i daljoj distribuciji patogena. Epidemiološke karakteristike *A. citrulli*, kao što su prezimljavanje u zemljištu, u ostacima zaraženih biljaka, u alternativnim domaćinima, mogućnosti opstanka i širenja u našim agroekološkim uslovima, tek treba proučiti. U današnje vreme, veliku ulogu ima razvoj molekularnih metoda detekcije, na kome se intenzivno radi. Cilj istraživanja jeste da se poveća prag osetljivosti dostupnih metoda prilikom detekcije patogena. U velikim proizvodnim sistemima kontrola se vrši setvom i preko 10 000 semena u uslovima staklenika i detaljnim pregledom biljaka. I ova metoda ima svoje manjkavosti, s obzirom da se oslanja se subjektivan utisak. Uslovi staklenika su takvi da je sklop među biljkama gust, visoke su temperature i vlažnost vazduha, pa se propusti lako mogu dogoditi. Takođe, sve više pažnje se posvećuje biološkoj kontroli i otkrivanju bioloških agenasa za suzbijanje patogena. Johnson i saradnici (2011) su utvrdili da nepatogeni sojevi *A. citrulli* imaju potencijala u kontroli patogenih sojeva iste vrste. Fessehaie i Walcott (2005), su ustanovili da tretiranje lubenice

agensima biološke prirode u fazi cvetanja ima veoma pozitivan efekat na kontrolu ovog patogena. Adhikari i saradnici (2017) su utvrdili da dva soja rizobakterija imaju izuzetan inhibitorni efekat prema *A. citrulli*. Budućnost u polju biološke kontrole predstavlja i upotreba bakteriofaga specifičnih za ovu vrstu (Gašić Katarina, neobjavljeni podaci, lična komunikacija). U iščekivanju još preciznijih metoda detekcije patogena, treba se osloniti na kontrolisano poreklo i zdravstveno stanje semena, ispravan plodored i sanitarne mere u objektima za proizvodnju rasada (Obradović i sar., 2014).

2.3.3 *Xanthomonas cucurbitae* - prouzrokovatelj bakteriozne pegavosti tikava

Vrsta *Xanthomonas cucurbitae* prvi put je opisana 1926. godine, od strane istraživača Bryan-a, pod nazivom *Xanthomonas campestris* pv. *cucurbitae*. Na predlog Vauterin-a i saradnika (1995), vrsta je preimenovana u *X. cucurbitae*. Patogen je rasprostranjen uglavnom u tropskom i subtropskom regionu. Posebno značajne gubitke bakteriozna pegavost nanela je proizvođačima tikava u Americi. U periodu od 2010-2011. godine, u Ilinoisu (SAD), gde se Cucurbitaceae gaje na preko 10 000 ha, zabeleženi su gubici od 3-90% ukupnog prinosa (Babadoost and Ravanlou, 2012). Osim u Americi, zabeleženo je prisustvo patogena na ostrvima Reunion i Sejšelimima u Indijskom okeanu (Pruvost et al., 2008; Pruvost et al., 2009). Dutta i sar. (2013) su posle više od pola veka zabeležili nalaz *X. cucurbitae* na lubenici u Džordžiji (SAD). Između 20 i 25% biljaka bilo je zahvaćeno infekcijom, a simptomi su uočeni samo na listovima. Godine 2012., patogen je po prvi put detektovan u Kanadi (Ontario) (Trueman et al., 2014). Prema izveštaju Fitosanitarne uprave Crne Gore za 2010. godinu, na krastavcu gajenom u zaštićenom prostoru, utvrđeno je prisustvo bakteriozne pegavosti prouzrokovane ovom vrstom. U našoj zemlji, ovaj patogen nije bio predmet detaljnijih proučavanja, stoga nema izveštaja o njegovom prisustvu u nas.

Vrlo malo se zna o biologiji patogena i epidemiologiji bakteriozne pegavosti. Williems i Zitter (1995) navode da se bakterija prenosi semenom, ali da se i uspešno održava u ostacima obolelih biljaka. Idealni temperaturni opseg za nastanak infekcije je između 25 i 30°C, dok se pri temperaturi iznad 36°C patogen ne razvija.

Najčešći domaćini bakteriozne pegavosti su krastavac, tikva, bundeva i tikvica. Simptomi oboljenja prvo se uočavaju na kotiledonima biljaka u vidu blago ulegnutih pega mrke boje. Sa porastom vlažnosti vazduha i temperature, što se obično dešava početkom jula, dolazi i do napredovanja bolesti. Na listovima se uočavaju hlorotične zone između nerava koje vremenom dobijaju mrku boju i nekrotiraju. Na plodovima nastaju promene u vidu pega vodenastog izgleda, često oivičene svetlijim oreolom. U slučaju jačih infekcija, dolazi do formiranja dubokih lezija i pucanja kore, što za posledicu ima pojavu truleži ploda (Babadoost and Ravanlou, 2012). *X. campestris* se opisuje kao patogen lista, ali često može da prouzrokuje trulež plodova u visokoj meri (Babadoost and Zitter, 2009).

Na YDC podlozi ova vrsta formira kolonije žute boje, karakteristične za rod *Xanthomonas* (Babadoost and Ravanlou, 2012).

Za kontrolu bakteriozne pegavosti prouzrokovane vrstom *X. cucurbitae*, najvažnija mera zaštite jeste upotreba nezaraženog semena.

2.3.4 *Erwinia tracheiphila* – prouzrokovatelj bakteriozne uvelosti krastavca

Bakteriozna uvelost krastavca prvi put je opisana još 1895. godine u Americi, od strane Smith-a (Arsenijević, 1997). Dve godine ranije, jedan od prvih fitopatologa, Erwin Smith, zabeležio je pravu epidemiju u zasadima krastavca, dinje i bundeve u Mičigenu (SAD), prouzrokovane nepoznatim oboljenjem (Saalau Rojas et al., 2015). I danas se bakteriozna uvelost ubraja u grupu najznačajnijih oboljenja na teritoriji istočnog dela Amerike (Brust and Rane, 1995, loc. cit. Saalau Rojas et al., 2011). Prema navodima proizvođača, u našoj zemlji pojedinih godina su uočavani simptomi koji ukazuju na moguće prisustvo ove vrste, međutim ona do sada nije izolovana.

Odlučujuću ulogu u širenju ovog patogena imaju insekti vektori *Acalymma vittatum* i *Diabrotica undecimpunctata*. Utvrđeno je da *E. tracheiphila* može da prezimi u telu insekata, a svoju vitalnost ne gubi ni nakon prolaska kroz probavni trakt vektora. Do prenošenja patogena dolazi kada delovi usnog aparata zaraženog insekta dođu u kontakt sa svežim i sočnim tkivom zdrave biljke. Bakterija se umnožava i dalje kreće ksilemom (Saalau Rojas et al., 2011). Krastavac, dinja, bundeva i tikva su najpogodniji domaćini bakteriozne uvelosti, dok se za lubenicu dugo mislilo da je jedina otporna vrsta familije

Cucurbitaceae (Agrios, 2005). Međutim, Sanogo i saradnici (2011) uočili su pojavu bakterioznog uvenuća u zasadu lubenice u Meksiku, mada na manje od 1% biljaka.

Bakteriozna uvelost pripada grupi traheobakterioza, za koje je najkarakterističniji početni simptom uvelost listova. Kako bakterije zapušavaju sudovni sistem biljke, onemogućeno je kretanje hranljivih materija, što za posledicu ima postepeno sušenje listova, a potom i cele biljke. U prvo vreme, na listovima se mogu uočiti promene boje tkiva u tamniju. Zatim dolazi do gubitka turgora, uvenuća i sušenja, a nastali simptomi podsećaju na one usled nedostatka vode. Stablo se vremenom takođe suši. Na preseku obolelog stabla, u zoni sudova, uočava se prisustvo bakterijskog eksudata u vidu sluzi, što predstavlja dijagnostički znak (Babadoost et al., 2004). U početnim stadijumima infekcije, biljke venu sredinom dana, ali se u toku noći oporavljaju. Međutim, nakon nekog vremena, nastupa njihovo potpuno odumiranje.

E. tracheiphila obrazuje sitne, okrugle, sjajne kolonije, sivobeličaste do krem boje na podlozi HA. Za izolaciju patogena najbolje je aseptično korišćenje lepljive niti, odnosno eksudata, koji ističe iz biljnih sudova na poprečnom preseku vreže (Arsenijević, 1997).

S obzirom da se patogen prenosi vektorima, zaštita se svodi na kontrolu insekata vektora i stvaranje otpornih sorti domaćina prema prouzrokovaču bakteriozne uvelosti.

2.3.5 *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* – prouzrokovač bakteriozne pegavosti i uvelosti zeljastih biljaka i rak-rana i bakterioznog izumiranja voćaka

Prouzrokovač bakteriozne pegavosti i uvelosti zeljastih biljaka i rak-rana i bakterioznog izumiranja voćaka, *P. s.* pv. *syringae*, otkriven je 1902. godine, u Holandiji. Patogen je prvi put izolovan iz jorgovana (*Syringa vulgaris*), po kome je i dobio ime. Ovu vrstu karakterišu velika rasprostranjenost i polifagnost (Arsenijević, 1997). Vrsta *P. s.* pv. *syringae* nedavno je po prvi put zabeležena kao prouzrokovač lisne pegavosti uljane tikve u nas (Balaž i sar., 2014).

Patogen se na zeljastim biljkama prenosi uglavnom zaraženim semenom, mada do nastanka infekcije može doći i u toku vegetacije, u polju. Ova vrsta može prouzrokovati velike gubitke u proizvodnji različitih biljnih vrsta. Ono što je čini posebnom, jeste nedovoljno proučena priroda patogena.

Primenom savremenih molekularnih metoda došlo je do napretka u proučavanjima. Na osnovu velikog broja sojeva izolovanih iz različitih životnih staništa, utvrđeno je da u okviru vrste *P. syringae sensu lato* postoji veliki genetički diverzitet (Berge et al., 2014; Newberry et al., 2016). Naime, uglavnom se smatralo da se kompleks *P. syringae* sastoji od 7 različitih filogenetskih grupa (Parkinson et al., 2011). Pojedini autori u ovu podelu uključuju i vrstu *P. chitorii*, kao veoma blisku (Mulet et al., 2010, Berge et al., 2014). Kao i za većinu fitopatogenih bakterija, sojevi su klasifikovani u različite patovare u okviru vrste *P. syringae*. Ova vrsta broji i najviše patogenih varijeteta od svih fitopatogenih bakterija. Upravo su se patovari koristili kao osnova za analizu i klasifikaciju patogena u različite fenotipske grupe. S obzirom da je u skorije vreme vrsta izolovana iz različitih staništa (vode, zemljišta, itd.), gde je ispoljila isključivo saprofitnu prirodu, koncept patovara nema praktičnu primenu, posebno što se pojedini sojevi izdvajaju u potpuno nove, do tada nepoznate filogrupe (Morris et al., 2007; Berge et al., 2014). Na osnovu studije koja je izvedena analizom preko 700 sojeva *P. syringae*, izolovanih iz različitih okruženja, utvrđeno je da postoji 26 grana u okviru 13 filogrupa (Berge et al., 2014). Grupe od 1 do 8 obuhvataju najzastupljenije patovare i patotipske sojeve, dok su u ostale uglavnom smešteni sojevi izolovani iz prirodnog okruženja (Berge et al., 2014, loc. cit. Newberry et al., 2017).

2.3.6 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* - prouzrokovatelj bakteriozne vlažne truleži

Prouzrokovatelj vlažne truleži otkriven je još 1901. godine, od strane Jones-a (Arsenijević, 1997). Od tog vremena, patogen se redovno sreće gde god se gaje mesnate i sočne krtolasto-korenaste biljke. Ova bakterija ima kosmopolitski karakter, kada je rasprostranjenost u pitanju. Iako je u literaturi najviše opisuje kao patogena krompira, zabeleženo je njeno prisustvo i na lubenici, dinji, krastavcu, itd. (Nazerian et al., 2011; Dana et al., 2015; Gottsberger and Huss, 2016).

Duarte i saradnici (2004) u Brazilu su izolovali atipične sojeve vrste *P. carotovorum* subsp. *atroseptica*, prouzrokovatelja crne noge krompira. Primenom različitih biohemijsko-fizioloških i molekularnih metoda, utvrđeno je da se izolovani sojevi razlikuju od svih do tada poznatih podvrsta *P. carotovorum*, pa je na predlog grupe istraživača, autora rada,

vrsta dobila ime *P. carotovorum* subsp. *brasiliense*. Gottsberger i Huss (2016) po prvi put beleže prisustvo ovog patogena u Austriji, i to na biljkama uljane tikve.

Patogen najčešće prodire u unutrašnjost ploda kroz povrede i oštećenja nastalih ishranom insekata, gradom, dejstvom čoveka, mada infekcija može poticati i iz kontaminiranog semena. Širenju patogena pomažu i kišne kapi, vetar i muve (*Diptera*), koje privlači miris razmekšanog tkiva (Arsenijević, 1997). Često se patogen može izolovati u skladištima, nakon berbe plodova. S obzirom da se uglavnom umnožava u mesnatim, sočnim delovima biljke, plodovi lubenice, dinje i krastavca u fazi fiziološke zrelosti predstavljaju idealno stanište za vrstu *P. c.* subsp. *carotovorum* (Snowden, 2010).

Najčešće se promene prouzrokovane vrstom *P. c.* subsp. *carotovorum* zapažaju na sočnim plodovima koji su bogati različitim hranljivim sastojcima. Prvi simptomi se ispoljavaju u vidu pega različite veličine koje imaju vlažan izgled. Bakterija poseduje pektolitičke fermente koji deluju na srednju ćelisku lamelu i razgrađuju je. Kao posledica tog procesa, zahvaćeno tkivo razmekšava i truli, često sa pojavom obilne tečnosti. Tako je bolest i dobila naziv meka ili vlažna trulež (eng. „soft rot“). Osim korenasto-krtolastih biljaka i sočnih plodova, patogen zaražava i sočne stabljike kukuruza, suncokreta, sirka, duvana, itd. Posredstvom insekata, parazit dospeva i na listove, koji takođe bivaju zahvaćeni procesom truljenja (Arsenijević, 1997).

Prvi korak u sprovođenju kontrole patogena jeste uklanjanje obolelih biljnih delova. Primena plodoreda takođe daje dobre rezultate u zaštiti od vlažne truleži. Stoga je najbolje posle osetljivih biljaka sejati neke imune ili otpornije vrste kao što su trave, pasulj, strna žita, itd. Prekomerno zalivanje biljaka pogoduje patogenu, na taj način se lako raznosi i dopire do zdravih biljaka. Značajna mera jeste pažljivo postupanje sa zrelim plodovima, naročito tokom berbe i skladištenja. Proizvodi koji su namenjeni čuvanju moraju biti suvi i nepovređeni, a skladištenje treba izvesti pri što nižoj temperaturi, ali koja ne ugrožava kvalitet proizvoda.

2.3.7 *Serratia marcescens* – prouzročivač žutila vreža (eng. Cucurbit yellow vine disease, CYVD)

Oboljenje nazvano „žutilo vreža” prvi put je uočeno 1988. godine u Oklahomi i Teksasu (SAD). Prouzročivač bolesti je bakterija *Serratia marcescens*, čiji je glavni vektor insekt *Anasa tristis* (eng. squash bug) (Pair et al., 2004, loc. cit. Zlatković i sar., 2017). Sve biljke familije Cucurbitaceae mogu biti domaćin ovom vektoru. Ipak, najviše se sreće na biljkama tikve i bundeve. Patogen prezimljava u telu vektora i na proleće ishranom insekata dospeva u biljku domaćina.

Simptomi žutila vreža najčešće se ispoljavaju dve nedelje pred punu zrelost plodova u vidu zaostajanja u porastu ili žutila lišća. Čest simptom predstavlja prelazak boje floema iz zelene u smeđu. Ponekad dolazi do nagle uvelosti vreža, bez pojave ostalih simptoma (Zlatković i sar., 2017). Pravilno uspostavljanje dijagnoze bolesti otežava pojava nespecifičnih simptoma, kao i prodor drugih patogena u već oslabljenu biljku. Takođe, simptomi ovog oboljenja često se greškom dovode u vezu sa bakterioznim i fuzarioznim uvenućem krastavca (Seebold i Bessin, 2011).

Gubici u proizvodnji mogu dosezati od 5-100% ukupnog prinosa (Bruton i sar., 2003). Žutilo vreža predstavlja ograničavajući faktor proizvodnje širom američkog kontinenta, dok u Srbiji još uvek nije otkriveno.

3. RADNA HIPOTEZA

Bakteriozna oboljenja predstavljaju ograničavajući faktor proizvodnje biljaka familije Cucurbitaceae širom sveta. Iako u poslednjih nekoliko godina u Srbiji nije zabeleženo prisustvo patogena u većem obimu, podaci iz svetske literature govore da gubici nastali dejstvom fitopatogenih bakterija mogu dostići ogromne razmere. Osnovna pretpostavka jeste da su u Srbiji prisutni različiti prouzrokovajući bakterioznih oboljenja biljaka familije Cucurbitaceae. Stoga je neophodno utvrditi prisustvo i izvršiti njihovu identifikaciju.

Usled intenzivne trgovinske razmene poljoprivrednih proizvoda, pa samim tim i semena raznih biljaka, u mnogim zemljama sveta sve češće se pojavljuju karantinske vrste fitopatogenih bakterija. Kako većina semenskog i sadnog materijala u našu zemlju dolazi iz inostranstva, postoji realna opasnost od unosa štetnih i do sada u nas neopisanih vrsta. Jedna od hipoteza jeste da je došlo do unosa jedne ili više karantinskih vrsta bakterija na teritoriju Srbije. Iz tog razloga će se vršiti višegodišnje posmatranje useva i pojava karakterističnih simptoma na biljkama familije Cucurbitaceae širom zemlje.

Pretpostavlja se da se većina fitopatogenih bakterija biljaka familije Cucurbitaceae održava i prenosi zaraženim semenom. Mogućnost detekcije patogena u zaraženom semenu često je ograničena osetljivošću primenjenih metoda detekcije. Stoga će se raditi na optimizaciji postojećih i uvođenju novih metoda detekcije patogena na i u semenu. Usvajanjem novih metoda za otkrivanje prisustva bakterija unapredila bi se osetljivost i efikasnost detekcije, što bi omogućilo lakše utvrđivanje izvora zaraze.

Takođe, pretpostavka je da sortiment biljaka koje se gaje poseduje različitu osetljivost prema patogenu. Stoga, biće proučena otpornost sortimenta familije Cucurbitaceae prema patogenim vrstama bakterija prisutnim u nas.

Dalje, pretpostavlja se da neka hemijska sredstva mogu posedovati baktericidni efekat prema bakterijama izolovanim iz obolelih biljaka familije Cucurbitaceae. Proučavanjem dejstva ovih baktericida, utvrdiće se mogućnost primene u zaštiti biljaka od navedenih patogena.

4. MATERIJAL I METODE RADA

4.1 Obilazak terena i prikupljanje materijala

U periodu od 2013-2016. godine, posećeni su tereni širom Srbije u cilju pregleda zasada različitih vrsta familije Cucurbitaceae. Biljni materijal je prikupljen sa lokaliteta gde je uočena pojava simptoma oboljenja, naročito lisne pegavosti. Nakon uzorkovanja, materijal je spakovan u plastične kese i u ručnom frižideru dopremljen u Laboratoriju za fitobakteriologiju Poljoprivrednog fakulteta u Beogradu. Obrada uzoraka vršena je neposredno po dopremanju, dok su uzorci bili još u svežem stanju. Takođe, materijal je kratkotrajno skladišten u frižideru, pri temperaturi 4-7°C, do završetka postupka izolacije bakterija.

4.2 Izolacija patogena iz biljnog materijala

Izolacija patogena vršena je iz uzoraka biljnog materijala sa vidljivim simptomima oboljenja. Uzorci su ispirani mlazom česmenske vode u trajanju 1 min, kako bi se otklonile mehaničke nečistoće i epifitni mikroorganizmi. Materijal je potom površinski dezinfikovao 95% alkoholom i prosušeno na filter-papiru. Na prelazu zdravog u obolelo tkivo, sterilnim skalpelom uzimani su fragmenti biljnog tkiva, koji su potom macerirani u kapi sterilne destilovane vode. Nakon nekoliko minuta, kap macerata zasejavana je metodom iscrpljivanja u četiri poteza pomoću bakteriološke petlje, na podlogu hranljivi agar (HA, hranljivi bujon 23,0 g; agar 15,0 g; destilovana voda do 1,0 l) u Petri-kutijama. Zasejane podloge su inkubirane u termostatu, pri 27°C, u trajanju 48 h.

Nakon 2 dana razvoja pri temperaturi 27°C, prihvaćene su predominantne, pojedinačne kolonije, najčešće beličaste ili krem boje, koje su presejane na novu HA podlogu, u cilju prečišćavanja i izdvajanja čistih kultura. Za dalje proučavanje odabrano je ukupno 63 soja (Tabela 1).

Kao kontrolni sojevi u različitim testovima, osim sojeva izolovanih u našoj zemlji, korišćeni su i inostrani sojevi, poreklom iz različitih međunarodnih kolekcija (Tabela 2).

4.3 Izolacija patogena iz zemljišta

Kako bi proučili epidemiološke karakteristike patogena, prikupljeni su uzorci zemljišta sa parcela gde je uočena pojava simptoma na plodovima lubenice u fiziološkoj fazi zrelosti, godinu dana nakon pojave infekcije. Cilj testa bio je da se utvrdi sposobnost patogena da preživi u zemljištu. U staklenu čašu odmereno je 10 g uzorka zemljišta, a potom je dodato 50 ml sterilne destilovane vode. Čaša je postavljena na magnetnu mešalicu, kako bi se uzorak homogenizovao. Nakon 2h mešanja, uzorak je ostavljen na taloženje, u trajanju sat vremena. Dobijeni supernatant korišćen je za zasejavanje na unapred pripremljenu podlogu obogaćenu saharozom (NAS, hranljivi bujon 23,0 g; agar 18,0 g; saharoza (5%) 50,0 g; voda do 1,0 l), u koju je nakon sterilizacije aseptičnim putem dodato 25 mg/l ampicilina i 250 mg/ml cikloheksimida. Osim matičnog ekstrakta, napravljena i serija razređenja za zasejavanje, počev od 10^{-1} .

Tabela 1. Proučavani sojevi bakterija izolovani iz biljaka familije Cucurbitaceae

Br.	Šifra soja	Domaćin (vrsta, sorta)	Biljni organ	Lokalitet	Godina izolacije
1	KFB 373	<i>C. lanatus</i>	List	Popinci	2013
2	KFB 374	<i>C. pepo</i>	List	Popinci	2013
3	KFB 375	<i>C. melo</i>	List	Popinci	2013
4	KFB 376	<i>C. melo</i>	List	Popinci	2013
5	KFB 377	<i>C. melo</i>	List	Popinci	2013
6	KFB 378	<i>C. sativus</i>	List	Popinci	2013
7	KFB 379	<i>C. melo</i>	List	Popinci	2013
8	KFB 380	<i>C. pepo</i> , GL Oscar	List	Bački Petrovac	2013
9	KFB 381	<i>C. pepo</i> , GL Opal	List	Bački Petrovac	2013
10	KFB 382	<i>C. pepo</i> , GL Rustikal	List	Bački Petrovac	2013
11	KFB 383	<i>C. pepo</i> , GL Maxima	List	Bački Petrovac	2013
12	KFB 384	<i>C. pepo</i> , GL Global	List	Bački Petrovac	2013
13	KFB 385	<i>C. pepo</i> , Olinka	List	Bački Petrovac	2013
14	KFB 386	<i>C. pepo</i> , Olinka	List	Bački Petrovac	2013
15	KFB 387	<i>C. pep</i> , Olinka	List	Bački Petrovac	2013
16	KFB 389	<i>C. pepo</i> , Olinka	List	Bački Petrovac	2013
17	KFB 390	<i>C. sativus</i>	List	Rimski Šančevi	2013
18	KFB 392	<i>C. pepo</i> , GL Maxima	List	Bački Petrovac	2013
19	KFB 393	<i>C. lanatus</i>	Vreže	Čelarevo	2014
20	KFB 394	<i>C. lanatus</i>	Vreže	Čelarevo	2014
21	KFB 395	<i>C. lanatus</i>	Vreže	Čelarevo	2014

Br.	Šifra soja	Domaćin (vrsta, sorta)	Biljni organ	Lokalitet	Godina izolacije
22	KFB 340	<i>C. lanatus</i> , Farao	Plod	Ašanja	2014
23	KFB 341	<i>C. lanatus</i> , Farao	Plod	Ašanja	2014
24	KFB 342	<i>C. lanatus</i> , Farao	Plod	Ašanja	2014
25	KFB 343	<i>C. lanatus</i> , Farao	Plod	Ašanja	2014
26	KFB 344	<i>C. lanatus</i> , Farao	Plod	Ašanja	2014
27	KFB 345	<i>C. lanatus</i> , Farao	Plod	Ašanja	2014
28	KFB 346	<i>C. lanatus</i> , Farao	Plod	Ašanja	2014
29	KFB 347	<i>C. lanatus</i> , Farao	Plod	Ašanja	2014
30	KFB 348	<i>C. lanatus</i> , Farao	Plod	Ašanja	2014
31	KFB 349	<i>C. lanatus</i> , Farao	Plod	Ašanja	2014
32	KFB 350	<i>C. lanatus</i> , Farao	Plod	Ašanja	2014
33	KFB 351	<i>C. lanatus</i>	Plod	Čelarevo	2014
34	KFB 352	<i>C. lanatus</i>	Plod	Čelarevo	2014
35	KFB 353	<i>C. lanatus</i>	Plod	Ašanja	2014
36	KFB 354	<i>C. lanatus</i>	Plod	Ašanja	2014
37	KFB 355	<i>C. lanatus</i>	Plod	Ašanja	2014
38	KFB 356	<i>C. lanatus</i>	Plod	Ašanja	2014
39	KFB 357	<i>C. lanatus</i>	Plod	Ašanja	2014
40	KFB 358	<i>C. lanatus</i>	Plod	Ašanja	2014
41	KFB 359	<i>C. lanatus</i>	Plod	Ašanja	2014
42	KFB 360	<i>C. lanatus</i>	Plod	Ašanja	2014
43	KFB 361	<i>C. lanatus</i>	Plod	Ašanja	2014
44	KFB 362	<i>C. lanatus</i>	Plod	Ašanja	2014
45	KFB 363	<i>C. lanatus</i>	Plod	Ašanja	2014
46	KFB 396	<i>C. lanatus</i> , Top Gun	List	Platičevo	2015
47	KFB 397	<i>C. lanatus</i> , Top Gun	List	Platičevo	2015
48	KFB 398	<i>C. lanatus</i> , Top Gun	List	Platičevo	2015
49	KFB 399	<i>C. sativus</i> , Ekron	List	Kujavica	2015
50	KFB 400	<i>C. lanatus</i> , Top Gun	List	Platičevo	2015
51	KFB 401	<i>C. sativus</i> , Caman	List	Kujavica	2015
52	KFB 365	<i>C. lanatus</i> , Top Gun	Plod	Rečka	2015
53	KFB 366	<i>C. lanatus</i> , Top Gun	Plod	Rečka	2015
54	KFB 367	<i>C. lanatus</i> , Top Gun	Plod	Rečka	2015
55	KFB 368	<i>C. lanatus</i> , Top Gun	Plod	Rečka	2015
56	KFB 402	<i>C. lanatus</i>	Klijanci	NP	2016
57	KFB 403	<i>C. lanatus</i>	Klijanci	NP	2016
58	KFB 404	<i>C. lanatus</i>	Klijanci	NP	2016
59	KFB 405	<i>C. lanatus</i>	Klijanci	NP	2016
60	KFB 369	<i>C. lanatus</i> , Eleta	Plod	Šabac	2016
61	KFB 370	<i>C. lanatus</i> , Eleta	Plod	Šabac	2016
62	KFB 371	<i>C. lanatus</i> , Eleta	Plod	Šabac	2016
63	KFB 372	<i>C. lanatus</i> , Eleta	Plod	Šabac	2016

4.4 Održavanje i čuvanje izolovanih bakterijskih sojeva

Radi održavanja kraći vremenski period, izolovani sojevi bakterija čuvani su u radnoj kolekciji u vidu suspenzije bakterija u sterilnoj vodi. Pun zahvat kolonija starosti 24h suspendovan je u 1 ml sterilne česmenske vode u mikroepruvetama i čuvan pri temperaturi 4-7°C u frižideru (Klement et al., 1990). Na duži vremenski period, sojevi su čuvani u podlozi sačinjenoj od hranljivog bujona sa 30% glicerola u krioepruvetama pri temperaturi -80°C u zamrzivaču (Schaad et al., 2001). Za sve oglede korišćene su sveže kulture, gajene u termostatu pri 27°C, u trajanju od 24-48h.

4.5 Patogene odlike sojeva

Patogene odlike izolovanih sojeva proučene su preliminarno proverom sposobnosti da prouzrokuju hipersenzitivnu reakciju, kao i inokulacijom različitih biljaka familije Cucurbitaceae, njihovih prirodnih domaćina.

4.5.1 Hipersenzitivna reakcija (HR)

Hipersenzitivna reakcija predstavlja odbrambeni mehanizam biljke, koji se aktivira u slučaju kada se patogen nađe u biljci koja nije njegov domaćin, kada patogen dospe u tkivo rezistentnog domaćina ili kada osetljiv domaćin dođe u kontakt sa bakterijom koja je izgubila svoju vitalnost (Klement and Goodman, 1967; Arsenijević, 1997). Umnožavanje bakterijskih ćelija unetih u intercelularni prostor lista duvana traje kratko, a potom dolazi do naglog izumiranja biljnih ćelija i do nekroze inokulisanog tkiva. Dakle, pojava nekrotičnih pega na mestu inokulacije, znak je pozitivne reakcije, odnosno patogenosti sojeva. Sposobnost izolovanih sojeva da prouzrokuju hipersenzitivnu reakciju proučena je na biljkama duvana sorte Samsun. Bakterijska suspenzija koncentracije $\sim 10^8$ CFU/ml pripremljena je u sterilnoj destilovanoj vodi. Inokulacija je izvedena infiltracijom suspenzije između dva lisna nerva sa naličja lista pomoću medicinskog šprica bez igle. Kao pozitivna kontrola korišćeni su sojevi bakterija *P. s. pv. syringae* (KFB 0103) i *A. citrulli* (KFB 0250), dok je kao negativna kontrola upotrebljena sterilna destilovana voda. Inokulisane biljke održavane su u laboratorijskim uslovima. Rezultati su očitani nakon 1-2

dana, a pojava nekroze tkiva mezofila lista na mestu inokulacije nakon 24-48h znak je patogenosti bakterije (Arsenijević, 1997).

4.5.2 Test patogenosti na biljci domaćinu

Kao preliminarni test patogenosti nakon izolacije bakterija, poslužili su klijanci tikve, gajeni na sterilnom filter papiru. Za izvođenje oglada korišćene su staklene Petri posude, prečnika 22,5 cm i visine 6,5 cm. U svaku posudu postavljen je filter papir, a potom je izvršena sterilizacija autoklaviranjem pri 121°C, u trajanju 20 min. Seme tikve (sorta Beogradska) površinski je dezinfikovano 1% rastvorom natrijum hipohlorita (NaClO), u trajanju 1 min, a potom isprano u 3 ponavljanja, u sterilnoj destilovanoj vodi. Nakon toga, aseptičnim putem je postavljeno u Petri kutije, na filter papir koji je prethodno navlažen takođe sterilnom destilovanom vodom. Kutije su oblepljene parafilmom, kako ne bi došlo do prodora neželjenih mikroorganizama i isušivanja i postavljene na tamno mesto do klijanja semena. Kada su se razvili kotiledoni, nakon njihovog otvaranja, aseptičnim putem je naneta kap bakterijske suspenzije koncentracije $\sim 10^8$ CFU/ml svakog proučavanog soja, u dva ponavljanja. Biljke su potom inkubirane u termostatu, pri 27°C, u trajanju 72 časa. Kao pozitivna kontrola, korišćen je soj *P. s. pv. syringae* (KFB 0103) (Tabela 2), a kao negativna kontrola sterilna destilovana voda, koja je korišćena i za pripremu bakterijskih suspenzija. Pozitivnom reakcijom smatrana je pojava pega vodenastog izgleda na kotiledonima ili hipokotilu biljke.

Patogenost proučavanih sojeva proučena je i inokulacijom drugih vrsta familije Cucurbitaceae, u zavisnosti od biljke domaćina iz koga je soj izolovan. Tako su kao test biljke poslužile: lubenica (sorta Rosa), krastavac (sorta Sunčani potok), dinja (sorta Sezam) i tikvica (sorta Beogradska). Biljke su gajene u tresetnom supstratu Floradur B Seed (Floragard) ili Potgrond H u plastičnim saksijama prečnika 13cm, u stakleniku. Za sojeve potencijalne predstavnike roda *Pseudomonas* ogled je izveden pri temperaturnim uslovima $24 \pm 3^\circ\text{C}$, dok je za potencijalne predstavnike rodova *Acidovorax* i *Pectobacterium*, ogled izveden pri $28 \pm 2^\circ\text{C}$. Inokulacija biljaka izvedena je u stadijumu otvorenih kotiledona, metodom prskanja bakterijskom suspenzijom, koncentracije $\sim 10^8$ CFU/ml, ručnom prskalicom. Kao pozitivna kontrola korišćene su biljke inokulisane kontrolnim sojevima *A.*

citrulli (KFB 0250), *P. s. pv. syringae* (KFB 0103) i *P. c. subsp. carotovorum* (KFB 85). Kao negativna kontrola, poslužile su biljke tretirane sterilnom destilovanom vodom. Preko inokulisanih biljaka postavljene su PVC kese, kako bi se obezbedili uslovi povišene vlažnosti, koja pogoduje razvoju infekcije. Kese su uklonjene posle 48h. Prvi rezultati su očitavani 3 dana nakon inokulacije. Test je izveden u 4 ponavljanja (2 saksije po 2 biljke). Pozitivnom reakcijom smatrana je pojava pega vodenastog izgleda sa naličja lista.

Za sojeve izolovane iz obolelih plodova lubenice, test patogenosti je izveden na još jedan način. Naime, zdravi, zreli plodovi lubenice površinski su dezinfikovani alkoholom, nakon čega su inokulisani suspenzijom bakterija koncentracije $\sim 10^8$ CFU/ml. Za inokulaciju su korišćeni sterilni medicinski špricevi sa iglom, a suspenzija je infiltrirana neposredno ispod pokožice ploda, na dubinu oko 1-2 mm ploda. Svako mesto uboda obeleženo je markerom. Nakon toga, preko plodova su navučene PVC kese. Plodovi su ostavljeni na inkubaciju u prostoriju sa kontrolisanom temperaturom ($24 \pm 2^\circ\text{C}$). Nakon tri dana, očitani su rezultati ogleđa. Kao pozitivna kontrola korišćen je soj *A. citrulli* (KFB 0250), dok je kao negativna korišćena sterilna destilovana voda.

Sav materijal koji je upotrebljen za realizaciju testova navedenih u ovom radu, a da je pritom bio u bilo kakvom kontaktu sa karantinskim patogenima je, uz najviše mere opreza, likvidiran. Tako su sve biljke i supstrat korišćeni za testove patogenosti, kao i hranljive podloge sa bakterijskim kolonijama, laboratorijsko posuđe i dr. autoklavirani pri 121°C , u trajanju 20 min.

Tabela 2. Kontrolni sojevi bakterija korišćeni u proučavanju bakterioloških odlika

Br.	Soj	Bakterija	Izvor ¹
1.	B 122	<i>Bacillus pumilus</i>	KFB
2.	KFB 148	<i>Erwinia Amylovora</i>	KFB
3.	KFB 85	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	KFB
4.	KFB 0250	<i>Acidovorax citrulli</i>	Italija
5.	B 130	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	KFB

Br.	Soj	Bakterija	Izvor ¹
6.	KFB 0102	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>persicae</i>	
7.	KFB 026	<i>Pseudomonas cichorii</i>	
8.	KFB 0103	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	Engleska
9.	KFB 062 (E-3)	<i>Xanthomonas</i> <i>euvesicatoria</i>	SAD, UFL
10	KFB 075	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	Kanada
11.	KFB 045	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>	Bugarska
12.	KFB 012	<i>Pseudomonas viridiflava</i>	Mađarska

¹Poreklo kontrolnih sojeva: KFB, Kolekcija fitopatogenih bakterija, Poljoprivredni fakultet, Beograd-Zemun, kurator: prof. Aleksa Obradović; UFL, University of Florida, SAD, kurator: prof. Jeffrey B. Jones.

4.6 Morfološke i odgajivačke osobine

Morfološke i odgajivačke osobine sojeva izolovanih iz biljaka familije Cucurbitaceae proučene su primenom različitih standardnih i diferencijalnih testova. Izvedeni su sledeći testovi: bojenje bakterija po Gramu, izgled i razvoj kolonija na različitim podlogama, razvoj pri 41°C, sposobnost sojeva da fluoresciraju na Kingovoj podlozi B.

4.6.1 Bojenje bakterija po Gramu

Bojenje po Gramu je metoda koja se koristi za razlikovanje Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija. Ova diferencijalna osobina proučena je primenom metode sa 3% KOH. Pun zahvat petlje bakterijskih kolonija starih 24h homogenizovan je u kapi 3% rastvora KOH sterilnom drvenom čačkalicom u plastičnoj Petri kutiji. Uticajem baze dolazi do razgradnje ćelijskog zida Gram-negativnih bakterija, pri čemu se oslobađa nukleinska kiselina. Ova reakcija se ispoljava pojavom sluzaste konzistencije jer dolazi do lizisa ćelijskog zida, pa se podizanjem čačkalice u vis formira elastična nit, što predstavlja pozitivnu reakciju. Kod Gram-pozitivnih bakterija, usled drugačije građe ćelijskog zida ne dolazi do razgradnje, pa izostaje i pojava sluzaste konzistencije kapi baze u kojoj su

suspendovane bakterijske kolonije (Arsenijević, 1997; Schaad et al., 2001). Kao kontrolna Gram-negativna bakterija, korišćen je soj *P. fluorescens* (B 130), a kao Gram-pozitivna bakterija *C. m. subsp. michiganensis*, (CM1) (Schaad et al., 2001).

4.6.2 Maksimalna temperatura razvoja

Maksimalna temperatura razvoja bakterija proučavana je kako bi se diferencirali sojevi koji pripadaju vrsti *A. citrulli* za koju je poznato da se razvija pri 41°C, za razliku od drugih bakterija koje mogu biti paraziti navedenih biljaka. Bakterije su zasejane u tečnu podlogu od kvašćevog ekstrakta i neorganskih soli (YS) (Schaad et al., 2001). Epruvete sa sterilisanom podlogom postavljene su u vodeno kupatilo pri 41°C i zasejane pipetiranjem po 100 µl suspenzije proučavanih bakterija u dva ponavljanja. Razvoj bakterija u vidu zamućenja podloge, posmatran je tokom 7 dana nakon zasejavanja (Arsenijević, 1997). Kao negativna kontrola korišćena je nezasejana podloga, a kao pozitivna kontrola soj *A. citrulli* (KFB 0250).

4.6.3 Fluorescentnost sojeva

Stvaranje fluorescentnog pigmenta proučeno je na Kingovoj podlozi B (King, 1954) u cilju diferencijacije bakterija roda *Pseudomonas*. Pojedinačne bakterijske kolonije su zasejavane bakteriološkom petljom, u 4 poteza, na podlogu u Petri kutijama. Kao rezultat pozitivne reakcije stvara se zeleni pigment koji izlaganjem podloge ultraljubičastom svetlu fluorescira. Reakcija se posmatra nakon 24 do 48h (Arsenijević, 1997). Kao pozitivna kontrola korišćen je soj *P. s. pv. syringae* (KFB 0103), dok je kao negativna kontrola korišćen soj *E. amylovora* (KFB 148).

4.6.4 Razvoj i izgled kolonija na hranljivim podlogama

Razvoj proučavanih sojeva i izgled pojedinačnih kolonija posmatrani su gajenjem bakterija na standardnoj podlozi od hranljivog agara i podlozi od glukoze, kvašćevog ekstrakta i CaCO₃ (YDC) (Lelliott and Stead, 1987; Schaad et al., 2001). Proučavani sojevi zasejavani su metodom razmaza pomoću bakteriološke petlje po površini podloge u Petri kutijama i inkubirani 3 dana u termostatu pri 27°C (Arsenijević, 1997). Obrazovanje

ispupčenih, okruglih kolonija, krem boje nakon 2-4 dana razvoja na podlozi sa glukozom, jedna je od karakterističnih osobina za vrste roda *Acidovorax* (Shaad et al., 2008). Kao pozitivna kontrola u ovom testu korišćen je soj *A. citrulli* (KFB 0250). Predstavnici roda *Pseudomonas* na podlozi HA obrazuju ispupčene, sjajne, sivobeličaste kolonije, dok bakterije roda *Pectobacterium* na podlozi od HA obrazuju kolonije sivobeličaste do beličastokrem boje.

4.7 LOPAT testovi

S obzirom da je jedna grupa sojeva na osnovu izgleda kolonija na HA podlozi i sposobnosti fluorescencije podsećala na vrste roda *Pseudomonas*, u njihovoj karakterizaciji su korišćeni LOPAT testovi. Ovi testovi služe za identifikaciju patogenih varijeteta vrste *P. syringae*. Naziv testa je akronim od početnih slova prvih reči naziva reakcija koje obuhvata: L (eng. Levan production) - stvaranje levana, O (eng. Oxidase activity) - aktivnost oksidaze, P (eng. Potato rot) - trulež kriški krompira, A (eng. Arginine dihydrolase activity) - aktivnost arginine-dehidrolaze, T (eng. Tobacco hypersensitivity reaction) - hipersenzitivna reakcija (HR) duvana (Lelliot et al., 1966, loc.cit. Arsenijević, 1997). Pojedine odlike, kao što su stvaranje levana, aktivnost oksidaze i aktivnost pektolitičkih fermenta (trulež kriški krompira) proverene su za sve izolovane sojeve u ovom radu. Takođe, testu hipersenzitivnosti, koji predstavlja jedan od prvih koraka u diferencijaciji patogenih od saprofitnih bakterija, podvrgnuti su svi izolovani sojevi.

4.7.1 Stvaranje levana

Sinteza levana se ogleda razvojem krupnih, ispupčenih, sjajnih i okruglastih kolonija na podlozi sa 5% saharoze (NAS), posle 2 do 3 dana inkubacije. Kao pozitivna kontrola korišćen je soj *E. amylovora* (KFB 148), a kao negativna, soj *P. cichorii* (KFB 026) (Schaad et al., 2001).

4.7.2 Aktivnost oksidaze

Za određivanje aktivnosti oksidaze koristi se metoda koju je opisao Kovacs (1956). Za izvođenje testa korišćene su bakterijske kulture gajene na čvrstoj Kingovoj podlozi B,

starosti 24h. U Petri posude aseptičnim putem je postavljen sterilan filter papir, koji je potom centralno natopljen sa nekoliko kapi 1% (w/v) vodenog rastvora N,N,N',N'-Tetrametil-parafenilen-diamin-dihlorhidrata (TMPPD). Ovo jedinjenje deluje kao veštački donor elektrona za enzim oksidazu, pa se na taj način oksidiše i menja boju u ljubičastu. Pun zahvat bakterijskih kolonija starih 24h prenosi se bakteriološkom petljom na filter papir. Pozitivnom reakcijom smatra se pojava ljubičaste boje na mestu razmaza u roku od 5-10 sekundi. Ukoliko do pojave boje dođe u periodu 10-60 sekundi takva reakcija se smatra odloženom. Reakcija je negativna ukoliko do pojave ljubičaste boje ne dođe ni nakon 60 sekundi. Prilikom rada, preporučuje se upotreba drvene čačkalice, ili platinaste ili plastične petlje. Kao pozitivna kontrola korišćen je soj *A. citrulli* (KFB 0250), dok je kao negativna kontrola korišćen soj *P. s. pv. syringae* (KFB 0103) (Arsenijević, 1997).

4.7.3 Trulež kriški krompira

Primenom ovog testa, utvrđuje se da li sojevi proučavanih bakterija stvaraju pektolitičke fermente koji su odgovorni za razgradnju srednje lamele ćelijskog zida, što za posledicu ima pojavu truleži. Krtole krompira se pod mlazom česmenske vode operu, prosuše na filter papiru, poprskaju alkoholom i flambiraju, a potom iseku na kriške debljine 7-8 mm. Kriške se zatim aseptičnim putem postave u sterilne Petri posude. Nakon toga, bakteriološkom petljom vrši se inokulacija nanošenjem kulture bakterija na središnji deo kriške krompira. U Petri kutije se naliva sterilna voda, tako da kriške budu potopljene do polovine svoje visine. Petri kutije su čuvane na sobnoj temperaturi. Rezultati su očitani nakon 24 i 48h. Trulež kriški na mestu inokulacije, usled aktivnosti pektolitičkih fermenta, označava pozitivnu reakciju (Arsenijević, 1997). Reakcija se može utvrditi vizuelno ili pomoću čačkalice, ubodom u predelu inokulisanog tkiva. Kao pozitivna kontrola korišćen je soj *P. c. subsp. carotovorum* (KFB 85), a kao negativna kontrola kap sterilne destilovane vode.

4.7.4 Metabolizam arginina

Ovom metodom se utvrđuje da li bakterija vrši razlaganje arginina aerobnim ili anaerobnim putem. Za izvođenje testa potrebno je pripremiti podlogu sledećeg sastava: 1 g

peptona, 5 g NaCl, 0,3 g K₂HPO₄, 0,01 g fenolcrveno, 10 g L-arginin-HCL, 3 g agara i destilovane vode do 1l. Pomoću NaOH, pH podloge se podešava na 7,2. Potom se razliva po 3 ml u staklene epruvete i autoklavira. Ubodom se zasejavaju po dve epruvete za svaki soj, od kojih se tečnim i sterilnim parafinom, visine oko 1,5 cm, zaliva jedna epruveta, kako bi se obezbedili anaerobni uslovi. Razlaganje arginina dejstvom stvorenog fermenta arginindehidrolaze pod aerobnim i anaerobnim uslovima, ogleda se promenom boje indikatora u ružičastocrvenu. Kao pozitivna kontrola se koristi *P. fluorescens* (B 130), a kao negativna nezasejane epruvete. Rezultati testa se očitavaju nakon 21 dana razvoja pri temperaturi 27°C.

4.7.5 Hipersenzitivna reakcija (HR)

Peta reakcija LOPAT testa izvedena je u okviru provere patogenosti sojeva, kao što je ranije opisano.

4.8 Biohemijsko-fiziološke odlike sojeva

Korišćenjem različitih diferencijalnih i standardnih testova, proučene su biohemijsko-fiziološke odlike sojeva izolovanih bakterija. Proučeni su aktivnost oksidaze i katalaze, stvaranje kiseline iz arabinoze, saharoze, manitola, sorbitola i inozitola, oksidativno-fermentativni metabolizam glukoze (O/F test), korišćenje azotnih jedinjenja, odnosno redukcija nitrata (Lelliott and Stead, 1987; Arsenijević, 1997; Klement et al., 1990). Takođe je proučena sposobnost sojeva da prouzrokuju trulež kriški krompira po ranije opisanoj metodi.

4.8.1 Aktivnost katalaze

Ferment katalaza katalizuje razgradnju toksičnog vodonik peroksida (H₂O₂). Primenom ovog testa se utvrđuje da li proučavani sojevi stvaraju enzim katalazu. Zahvat bakterijskih kolonija se sterilnom drvenom čačkalicom prenese na mikroskopsku pločicu i homogenizuje u kapi 3% H₂O₂. Pojava mehurića gasa, nastala kao rezultat izdvajanja slobodnog kiseonika, znak je pozitivne reakcije, odnosno prisustva fermenta katalaze u proučavanoj kulturi (Arsenijević, 1997). Kao pozitivna kontrola korišćen je soj *P. s. pv.*

syringae (KFB 0103), dok je kao negativna kontrola korišćen soj *P. c. subsp. carotovorum* (KFB 85).

4.8.2 Stvaranje kiseline iz arabinoze, saharoze, manitola, sorbitola i inozitola

U testovima stvaranja kiseline iz različitih ugljenikovitih jedinjenja, korišćena je osnovna podloga (Hayward, 1964, loc. cit. Schaad et al., 2001), u koju je nakon razlivanja u epruvete i sterilizacije aseptično dodat filterom sterilisan vodeni rastvor (10% w/v) odgovarajućeg izvora ugljenika do konačne koncentracije 1% (w/v). Kao izvor ugljenika, korišćeni su rastvori arabinoze, saharoze, manitola, sorbitola i inozitola. Sojevi bakterija zasejavani su ubodom, a epruvete su inkubirane pri 27°C, u trajanju 14 dana. U slučaju da proučavani soj koristi neki od navedenih izvora ugljenika, kao posledica razgradnje dolazi do stvaranja kiseline i snižavanja pH vrednosti u podlozi zbog čega prvobitno plava boja podloge prelazi u žutu. Za proveru korišćenja arabinoze, kao pozitivna kontrola korišćen je soj *A. citrulli* (KFB 0250), dok je kao negativna kontrola korišćen soj *P. s. pv. syringae* (KFB 0103). Kod testa sa saharozom i sorbitolom, kao pozitivna kontrola korišćen je soj *P. s. pv. syringae* (KFB 0103) a kao negativna *A. citrulli* (KFB 0250). Za proveru sposobnosti sojeva da iz inozitola stvaraju kiselinu, kao pozitivna kontrola korišćen je soj *P. s. pv. syringae* (KFB 0103), a kao negativna kontrola *P. s. pv. persicae* (KFB 0102). Kod testa sa manitolom, kao pozitivna kontrola korišćen je soj *P. s. pv. syringae* (KFB 0103), a kao negativna soj *P. s. pv. phaseolicola* (KFB 045).

4.8.3 Redukcija nitrata

Primenom ovog biohemijskog testa proučena je sposobnost sojeva da vrše redukciju nitrata (NO₃) u nitrite (NO₂). Ogled je izveden na dva načina. Podloga pripremljena od hranljivog bujona i 1% (w/v) NaNO₃ (Šutić i Panić, 1969) razlivena je u epruvete po 5 ml i zasejavana sa 100 µl suspenzije proučavanih bakterija. Nakon 10 dana razvoja pri 27°C u epruvete su redom dodati reagensi: 1 ml 0,5% rastvora skroba, 0,4% KJ i 5 ml 50% H₂SO₄. Trenutna pojava tamnomrke, ćilibarne boje nakon dodavanja reagensa znak je pozitivne reakcije, odnosno prisustva nitrita u podlozi. Kao pozitivna kontrola korišćen je soj *P.*

fluorescens (B 130), a kao negativna, nezasejana podloga i soj *P. s. pv. syringae* (KFB 0103).

Prema Klement-u i saradnicima (1990), proučavanje sposobnosti denitrifikacije može se izvesti i na sledeći način. Pripremljena podloga (pepton (Difco) 3 g; NaCl 5 g; KNO₃ 2 g; agar (Difco) 3 g; destilovana voda do 1l; pH 7,0) (Fahy and Hayward, 1983) razlivena je epruvete, a potom autoklavirana pri 121°C, u trajanju 20 min. Proučavani sojevi su zasejani ubodom, nakon čeka je u svaku epruvetu dodato po 2 ml 3% vodenog agara. Znak redukcije nitrata predstavlja dobar rast bakterija u roku od 5 dana, pri 27°C. Kao pozitivna kontrola, korišćen je soj *P. fluorescens* (B 130), a kao negativna, nezasejana podloga i soj *P. s. pv. syringae* (KFB 0103). Ovaj metod se prvenstveno preporučuje za proučavanje bakterijskih sojeva roda *Pseudomonas*.

4.8.4 Oksidativno-fermentativni metabolizam glukoze (O/F test)

Proučena je sposobnost bakterija da razlažu glukozu fermentativnim ili oksidativnim putem. Ovaj test je pogodan za diferencijaciju sojeva propadnika roda *Pectobacterium* koji imaju sposobnost da razlažu glukozu i bez prisustva kiseonika. Za proveru ove sposobnosti, korišćena je Hugh-Leifson-ova podloga (1953, loc. cit. Lelliott and Stead, 1987) u koju je nakon sterilizacije i hlađenja do 50°C, dodat filterom sterilisan 10% rastvor glukoze do konačne koncentracije 1%. Čiste kulture proučavanih bakterija zasejane su ubodom u po dve podloge u epruvetama. U jednu epruvetu sa inokulisanom podlogom dodato je oko 2 ml sterilnog parafina, kako bi se obezbedili anaerobni uslovi. Inokulisane podloge su inkubirane pri temperaturi 27°C. Rezultati testa očitani su nakon 4 i 7 dana, a reakcija je praćena do 14 dana. U slučaju pozitivne reakcije, dolazi do razgradnje glukoze i promene pH podloge usled stvaranja kiseline. Ova pojava se može zapaziti promenom boje indikatora u podlozi iz plave u žutu. Bakterije sa oksidativnim metabolizmom glukoze stvaraju kiselinu samo u aerobnim uslovima, što se ispoljava promenom boje podloge u gornjem sloju (Arsenijević, 1997). Kao pozitivne kontrole, u testu su korišćeni sojevi *P. c. subsp. carotovorum* (KFB 85), koji razlaže glukozu oksidativno i fermentativno i *P. s. pv. syringae* (KFB 0103), koji ima oksidativan metabolizam glukoze. Kao negativna kontrola korišćene su nezasejane epruvete.

4.8.5 Stvaranje čestica leda

Pojedine vrste roda *Pseudomonas*, među kojima je i *P. s. pv. syringae*, poseduju osobinu stvaranja čestica leda (eng. Ice Nucleation Activity - INA). Gen koji kodira protein spoljne membrane, odgovoran je za ovu pojavu. Proteini formiraju velike agregate koji molekule vode pretvaraju u strukture kristala pri temperaturama iznad -10°C , pojedine čak i pri $-1,5^{\circ}\text{C}$ (Moore, 1988). Ovakva pojava se veoma loše odražava na biljke, s obzirom da kao posledica dolazi do izmrzavanja i oštećenja biljnog tkiva. Kod vrsta *P. savastanoi* i *P. s. pv. tomato*, ova osobina nikada nije zabeležena. Test se koristi kao jedan od diferencijalnih među nekim vrstama roda *Pseudomonas*.

U ovom istraživanju, testiranje sojeva na INA izvedeno je primenom dve metode. Prva metoda se sastojala u gajenju bakterija na CPG podlozi (Bacto casamino acid, 1g; Bacto peptone 10g; glukoza 10g; voda do 1l), koja je razlivena u zapremini od po 2 ml u staklene epruvete, standardne veličine. Bakterije su gajene u termostatu, u trajanju 24h, na horizontalnom mešaču. Pre izvođenja ogleada, zasejane podloge su postavljene u frižider, pri $4-5^{\circ}\text{C}$, u trajanju 2h. Za to vreme je pripremljena mešavina leda i 95% etanola, u koju je uronjen termometar, radi kontrole temperature. Dodavanjem obične vode, temperatura smeše je podešavana na -10 do -15°C . Iz zasejanih podloga, uzeto je po 10 μl kulture bakterija, koje su nanete na dno aluminijske posude, prethodno postavljene u plutajući položaj u smešu alkohola i leda. Pritom je posmatran prelazak kapi kulture bakterija iz tečnog u čvrsto agregatno stanje. Stvaranje čestica leda u roku nekoliko sekundi, smatra se pozitivnom reakcijom, odnosno takvi sojevi indukuju stvaranje čestica leda. Kao pozitivna kontrola, korišćen je soj *P. s. pv. syringae* (KFB 0103), dok je kao negativna kontrola upotrebljen soj *P. s. pv. tomato* (KFB 075).

Drugi metod (Fahy and Hayward, 1983, loc. cit. Cintas et al., 2002) se izvodi zasejavanjem bakterijskih sojeva na podlogu sledećeg sastava: 5g glukoze, 5g peptona, 5g agara, 5g kvašćevog ekstrakta, destilovana voda do 1l. Bakterije su gajene u inkubatoru pri 21°C , u trajanju 4 dana. Nakon toga, kolonije su suspendovane u epruvetama, u sterilnoj destilovanoj vodi. Koncentracija suspenzije iznosila je $\sim 10^9$ CFU/ml i čuvana je na ledu do samog izvođenja ogleada. Pripremljeno je alkoholno kupatilo mešanjem leda i etanola, a temperatura je podešena do -4°C dodavanjem vode. Epruvete sa bakterijskom suspenzijom

uronjene su u alkoholno kupatilo u trajanju 5 min. U slučaju pozitivnog rezultata, suspenzija se zamrzava u naznačenom vremenu. Kao pozitivna kontrola korišćen je soj *P.s. pv. syringae* (KFB 0103), a kao negativna kontrola sterilna destilovana voda i soj *P. s. pv. tomato* (KFB 075).

4.9 Molekularne metode proučavanja patogena

U cilju identifikacije svih izolovanih sojeva, kao i reizolata dobijenih iz veštački inokulisanih biljaka, primenjena je i metoda lančanog umnožavanja DNK fragmenata (eng. Polymerase Chain Reaction – PCR). Takođe, sojevi su proučeni primenom rep-PCR metode, umnožavanjem konstitutivnih gena (eng. Multilocus sequencing analysis - MLSA), a za soj KFB 380 izvedeno je sekvenciranje čitavog genoma. Pored toga, uvedena je i real-time PCR metoda za detekciju patogena *A. citrulli* iz semena lubenice.

4.9.1 Ekstrakcija DNK

DNK svih proučavanih sojeva izolovana je iz čistih kultura bakterija, gajenih 24-48h na HA podlozi, pri 27°C, korišćenjem sledećih metoda ekstrakcije: 1) lizisom bakterijskih ćelija; 2) prema proceduri Aljanabi i Martinez (1997) sa modifikacijama; 3) ekstrakcijom DNK iz semena pomoću komercijalnog Dneasy Plant Mini Kit-a; i 4) CTAB ekstrakcije.

Prva metoda primenjivana je prilikom ekstrakcije DNK za konvencionalni i real-time PCR, odnosno za potrebe detekcije patogena. Bakterijske suspenzije koncentracije ~ 10⁸ CFU/ml, inkubirane su pri temperaturi 95°C, u trajanju 10 min. Lizirane bakterijske ćelije su potom inkubirane 5 min na ledu i centrifugirane pri 8000 rpm, u trajanju 5 min. Dobijeni supernatant je korišćen direktno za PCR reakciju ili je čuvan pri -20°C za kasnija istraživanja.

Za izvođenje rep-PCR metode i umnožavanje konstitutivnih gena korišćen je ekstrakt genomske DNK dobijen ekstrakcijom prema proceduri Aljanabi i Martinez (1997) sa modifikacijama. Bakterije su gajene 24h na podlozi HA, pri 27°C. Zahvatom petlje, suspendovane su u 500 µl TE pufera (10 ml 0,1M Tris-Cl (pH 8.0); 0,2 ml EDTA (pH 6.0); 88,8 ml sterilne destilovane vode, a potom centrifugirane pri 5000-8000 rpm, u trajanju 5

min. Nakon odbacivanja supernatanta, talog je suspendovan u 400 μ l ekstrakcionog pufera (0,8 ml 5M NaCl; 1 ml 0,1M Tris-HCl (pH 8.0); 40 μ l 0,5 EDTA (pH 8.0); 8,16 ml sterilne destilovane vode), a potom izmešan na vorteks mešalici. Nakon toga, dodato je 8 μ l rastvora proteinaze K (20 mg/ml) i laganim pokretima promešano. Mikroeprevete su inkubirane pri temperaturi 37°C, u trajanju 30 min. Nakon ovog koraka, dodato je 40 μ l 20% natrijum dodecil sulfata (eng. sodium dodecyl sulphate, SDS) i intenzivno mešano na vorteks mešalici. Usledila je inkubacija u termobloku, u trajanju 1-1,5 h, pri 55-65°C. Potom su uzorci stavljeni na led, u trajanju 5 min. U toku ovog koraka, u svaku mikroeprevetu dodato je 360 μ l 5M NaCl. Nakon mešanja na vorteks mešalici, uzorci su centrifugirani pri 13 200 rpm, u trajanju 30 min. Dobijeni supernatant prebačen je u nove mikroeprevete zapremine 2 ml, u koje je potom dodat 1 μ l RNA-ze (10 mg/ml). Sadržaj u mikroeprevetama je nežnim pokretima homogenizovan. Sledeći korak se sastojao od inkubacije u trajanju 1h, pri temperaturi 37°C. Potom su uzorci ostavljeni da prenoće u zamrzivaču pri temperaturi oko -20°C. Sledećeg dana, nakon otapanja, sadržaj mikroepreveta je centrifugiran pri maksimalnom broju obrtaja u trajanju 15 min, supernatant je odbačen, a dobijeni talog je ispran sa 250 μ l 70% etanola. Uzorci su centrifugirani na maksimalnom broju obrtaja, u trajanju 5 min, a potom je pipetom pažljivo odstranjen supernatant. Mikroeprevete su ostavljene da se prosuše, kako bi mogući tragovi etanola bili uklonjeni. Rastvaranje dobijene prečišćene DNK izvedeno je pipetiranjem 100 μ l TE pufera u mikroeprevete. Takođe, korišćenjem 50 μ l pufera za rastvaranje postiže se veća koncentracija DNK u rastvoru, ali se istovremeno smanjuje celokupan prinos dobijene DNK. Kvalitet i prinos ekstrahovane DNK utvrđeni su gel elektroforezom 1 μ l uzorka DNK u 0,8% agaroznom gelu (120V, 30 min). Dobijeni ekstrakt čuvan je pri -20°C.

Za potrebe ekstrakcije DNK iz semena lubenice, korišćen je komercijalno dostupan komplet DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Testirano seme mase 1 g, potopljeno je u sterilan PBS pufer (NaCl 8,0 g; Na₂HPO₄ × 12H₂O 3,0 g; KH₂PO₄ 0,2 g; KCl 0,2 g; destilovana voda do 1l; pH 7-7,2), sa dodatkom Tween-a 20. Nakon inkubacije na magnetnoj mešalici preko noći (okvirno 16h), izdvojen je 1 ml ekstrakta u mikroeprevetu zapremine 1,5 ml koji je dalje korišćen za postupak izdvajanja DNK. U narednom koraku, uzorak je centrifugiran pri 10 000 g, u trajanju 15 min. Dobijeni

supernatant je odbačen, a talog suspendovan u 400 μ l AP1 pufera i 3 μ l RNase A (stock solution, 100 mg/ml) intenzivnim mešanjem na vorteks mešalici. Nakon toga, smeša je inkubirana u termobloku pri 65°C, u trajanju od 10 min, kako bi došlo do lizisa ćelija. Laganim okretanjem epruvete, sadržaj je nekoliko puta u toku inkubacije izmešan. U dobijeni lizat pipetirano je 130 μ l AP2 pufera, sadržaj je homogenizovan i inkubiran na ledu 5 min, nakon čega je izvedeno centrifugiranje 5 min, pri 16 100 g. U ovom koraku dolazi do taloženja deterdženta, proteina i polisaharida. Supernatant je potom pipetiran u QIAamp Mini spin kolonu postavljenu u kolekcionalnoj mikroepreveti i centrifugiran 2 min, pri 16 100 g, kako bi se uklonile nepotrebne materije. Dobijena tečnost iz kolekcione tube preneti je u novu mikroeprevetu zapremine 1,5 μ l, u koju je dodat AW1 pufer u 1,5 puta većoj količini u odnosu na zapreminu lizata. Nakon mešanja sadržaja nastavkom pipete, 650 μ l smeše pipetirano je u DNase Mini spin kolonu postavljenu u kolekcionalnoj tubi od 2 ml, a potom centrifugirano 1 min, na 6 000 g. Filtrirana tečnost je odbačena, a postupak je ponovljen sa ostatkom testiranog uzorka. Potom je u kolone dodato 500 μ l AW2 pufera, izvedeno je centrifugiranje na 6 000 g, u trajanju 1 min i odbacivanje tečnosti iz kolektorske tubice. Zatim je pipetirano 500 μ l AW2 pufera, nakon čega je centrifugiranjem pri 16 100 g, u toku 2 min, izvršeno dodatno ispiranje ostataka etanola sa membrane kolone. DNase Mini spin kolone prebačene su u nove mikroeprevete zapremine 1,5 μ l radi prihvatanja DNK. Rastvaranje prečišćene DNK vezane za membranu kolone izvedeno je pipetiranjem 50-100 μ l AE pufera direktno na membranu. Nakon inkubacije na sobnoj temperaturi u trajanju 5 min, izdvajanje rastvorene DNK u mikroeprevetu postignuto je centrifugiranjem na 6 000 g, u trajanju 1 min.

Za pripremu DNK soja KFB 380, za koji je izvedeno sekvenciranje čitavog genoma, DNK je ekstrahovana CTAB puferom (rastvoriti 4,1 g NaCl u 80 ml destilovane vode, zagrevati i mešati na magnetnoj mešalici pri \approx 65°C, a potom lagano dodati 10 g CTAB; nakon rastvaranja u trajanju oko 3h, podesiti konačnu zapreminu rastvora do 100 ml, a zatim sterilisati u autoklavu). Za izvođenje ove metode, koriste se bakterijske ćelije u kasnoj *log* ili ranoj stacionarnoj fazi. Proučavani soj gajen je na podlozi HA, odakle su kolonije upotrebljene za pripremu suspenzije u mikroepreveti zapremine 1,5 ml. Nakon koraka centrifugiranja pri 10 000 rpm, u trajanju 5 min, supernatant je odbačen. Dobijeni

talog je resuspendovan u TE puferu, tako da je dobijena suspenzija bakterije koncentracije $\sim 10^8$ CFU/ml. U novu mikroeprijetu zapremine 1,5 ml, prebačeno je 740 μ l bakterijske suspenzije. Usledio je korak inkubacije pri 37°C, u trajanju 30 min. Potom je dodato 40 μ l 10% SDS i 8 μ l proteinaze K (10 mg/ml), nakon čega je izvedeno mešanje na vorteks mešalici. Uzorak je inkubiran u trajanju 1-3 h pri 56°C. U narednom koraku, dodato je 100 μ l 5M NaCl, a potom 100 μ l CTAB pufera, zagrejanog na 65°C. Dobijena smeša promešana je na vorteks mešalici, pri manjem broju obrtaja, kako ne bi došlo do narušavanja strukture DNK. Uzorak je inkubiran pri 65°C, u trajanju 10 min. Potom je dodat hloroform : izoamil alkohol (24:1), u zapremini od 500 μ l. Nakon kratkog mešanja na vorteks mešalici, izvedeno je centrifugiranje pri maksimalnom broju obrtaja, u trajanju 10 min. Dobijeni supernatant je prebačen u novu mikroeprijetu zapremine 1,5 ml, i još u dva navrata ispran u hloroformu na već opisan način. Supernatant je potom pomešan sa izopropanolom (-20°C), u zapremini 0,6 puta većoj nego što je zapremina supernatanta. Uzorak je inkubiran pri -20°C, u minimalnom trajanju od 2h. U ovom koraku, nastavak ekstrakcije se može odložiti za jedan dan, odnosno u smeši sa izopropanolom, uzorak može i prenočiti. Nakon centrifugiranja pri maksimalnom broju obrtaja, u trajanju 15 min, pri 4°C, pelet je ispran hladnim 70% etanolom, a onda centrifugiran u trajanju 5 min, pri maksimalnom broju obrtaja. Pošto je supernatant odstranjen, pelet je osušen pri sobnoj temperaturi. Dobijena DNK je resuspendovana u približno 170 μ l „nuclease free“ vode. Ekstrahovana DNK čuvana je pri -20°C do upotrebe.

4.9.2 PCR analiza

Bakterijski sojevi izolovani u ovom istraživanju, preliminarno su identifikovani primenom lančanog umnožavanja fragmenata nukleinske kiseline, odnosno PCR analizom. Za identifikaciju proučavanih sojeva korišćeno je nekoliko različitih prajmera. Na osnovu biohemijsko-fizioloških i odgajivačkih osobina izolovanih sojeva, izvedene su pretpostavke o pripadnosti određenim rodovima, odnosno vrstama bakterija. U skladu sa tim, napravljen je izbor prajmera korišćenih u ovom radu.

Par prajmera BX-L1/BX-S-R2 (Bahar et al., 2008), kojim se umnožava fragment veličine 279 baznih parova (bp), specifičan je za vrstu *A. citrulli*. Prajmeri su dizajnirani na

osnovu specifičnog BOX-PCR fragmenta ove vrste. Za izvođenje reakcije korišćen je protokol preporučen od strane autora. Reakciona smeša krajnje zapremine 25 µl, sadržala je sledeće komponente: 15,55 µl „nuclease free“ vode, 2,5 µl 10 × DreamTaq Buffer, 1,25 µl MgCl₂ (50mM), 0,5 µl dNTPs (10mM), 1 µl BSA (0,1%), 1 µl prajmera, 0,2 µl *Taq* DNK polimeraze (Thermo Scientific, Vilnius, Lithuania) i 2 µl uzorka DNK. Reakcija se odvijala prema sledećem programu: početna denaturacija pri temperaturi 95°C u trajanju 1 min; 35 ciklusa denaturacije pri 94°C u trajanju 35 s, vezivanja prajmera pri 68,1°C u trajanju 35 s i ekstenzije pri 72°C u trajanju 45 s. Završna ekstenzija odvijala se pri temperaturi 72°C, u trajanju 7 minuta. Produkti PCR reakcije razdvojeni su elektroforezom (80V, 60mA) u 1,5% agaroznom gelu, dužine hoda 5 cm. Umnoženi fragmenti su potom obojeni potapanjem gela u rastvor etidijum-bromida (1µg/ml) u trajanju 20 min i posmatrani pod UV svetlom na transiluminatoru. Upotrebom Doc Print sistema za dokumentaciju (Vilber Lourmat, Francuska), izvedeno je fotografisanje analiziranog gela.

Jedna od karakteristika vrste *P. s. pv. syringae* jeste sposobnost da sintetiše toksin siringomicin, lipodepsinonapeptidno jedinjenje. Detekcija gena za sintezu siringomicina, izvodi se korišćenjem specifičnih prajmera Syr B1/B2 u reakciji lančanog umnožavanja fragmenata DNK (Sorensen et al., 1998). Ovom reakcijom, umnožava se fragment veličine 752 bp. Reakciona smeša sastojala se od sledećih komponenti: 10,14 µl „nuclease free“ vode, 1,5 µl 10 × DreamTaq zelenog pufera koji sadrži 20mM MgCl₂, 0,3 µl dNTPs (10mM), 0,75 µl prajmera, 0,06 µl *Taq* DNK polimeraze i 1,5 µl DNK uzorka. Program reakcije obuhvatio je: početnu denaturaciju pri temperaturi 94°C u trajanju 5 min; 35 ciklusa denaturacije pri 94°C u trajanju 1 min, vezivanja prajmera pri 67°C u trajanju 1 min i ekstenzije pri 72°C u trajanju 1 min. Završna ekstenzija odvijala se pri temperaturi 72°C, u trajanju 7 minuta.

4.9.2.1 Rep-PCR

Kako bi se utvrdile razlike u populaciji bakterija, veliku primenu ima metoda koja se bazira na vezivanju ponovljivih sekvenci u genomu. Ova metoda se naziva Rep-PCR i izvedena je prema protokolu Shaad et al. (2001). Ciljane sekvence kod proučavanih sojeva umnožene su izvođenjem tri PCR reakcije: REP PCR pomoću para prajmera Rep1R-1 i

Rep2-1, BOX PCR, upotrebom BOXA1R prajmera, ERIC PCR, korišćenjem para prajmera ERIC1R i ERIC2. Umnožavanje fragmenata DNK vršeno je u 25 μ l reakcione smeše koja je sadržala: 5,05 μ l „nuclease free“ vode, 12,5 μ l 2 \times PCR master mix-a (Thermo Scientific, Vilnius Lithuania), 0,2 μ g BSA (20 mg/ml), 2,5 μ l 10% DMSO, 3,75 μ l svakog prajmera (20 μ M) i 1,3 μ l „nuclease free“ vode za REP i ERIC PCR, odnosno 5.05 μ l za BOX PCR. Master miks je pripremljen na ledu, a potom je u sterilne PCR tubice raspoređeno po 24 μ l smeše. Za svaki uzorak dodato je po 1 μ l DNK. Kao pozitivna kontrola korišćeni su referentni sojevi *A. citrulli* (KFB 0250) i *P. s. pv. syringae* (KFB 0103), a kao negativna kontrola sterilna destilovana voda. Za sojeve koji su izgledom na hranljivim podlogama podsećali na pripadnike roda *Pseudomonas*, urađen je samo BOX PCR jer se primenom ove reakcije najbolje može uočiti potencijalni diverzitet među sojevima (Jeffrey Jones, lična komunikacija). U cilju provere ponovljivosti metode, rep-PCR analiza reprezentativnih sojeva izvedena je u tri ponavljanja. Program reakcije sastojao se od sledećih koraka: početna denaturacija pri 95°C, u trajanju 2 min; potom 35 ciklusa započetih dvema denaturacijama pri 94°C, u trajanju 3s, odnosno 92°C u toku 30s; vezivanja prajmera pri 50°C, u trajanju 1 min kod BOX i ERIC, odnosno pri 40°C kod REP PCR-a; sinteza lanaca pri 65°C u toku 8 min i finalne eskstenzije pod istim uslovima. Uspešnost izvedene PCR reakcije proverena je horizontalnom elektroforezom (15 \times 15 cm), u 1,5% agaroznom gelu, potopljenom u 0,5 \times TAE pufer (Tris, EDTA, pH 8.0), pri konstantnom naponu od 60 V u trajanju 30 min, a potom pri 80 V, u trajanju 3,5 h.

4.9.2.2 Sekvenciona analiza 16S rRNK

Genska sekvenca ribozomalne RNK nije podložna brzim promenama tokom evolucije, stoga njena analiza predstavlja relativno jednostavan, a pouzdan put u filogenetskim proučavanjima različitih vrsta bakterija. Upotrebom univerzalnih prajmera fd1/rp2 (Weisburg et al., 1991), umnožena je sekvenca ribozomalnog gena dužine oko 1450 bp za sledeće sojeve: KFB 343, KFB 344, KFB 389, KFB 392, KFB 394, KFB 395 i KFB 401. Reakciona smeša konačne zapremine 50 μ l sadržala je: 38,7 μ l „nuclease free“ vode, 5 μ l 10 \times DreamTaq Buffer sa 20 mM MgCl₂ (Thermo Scientific, Vilnius Lithuania), 1 μ l dNTPs (10mM), 1 μ M prajmera, 0,3 μ l DreamTaq DNK polimeraze (Thermo

Scientific, Vilnius Lithuania) i 3 μ l uzorka DNK. Reakcija se odvijala prema sledećem programu: početna denaturacija pri 95°C u trajanju 5 min, potom 35 ciklusa denaturacije pri 94°C u trajanju 1 min, vezivanja prajmera pri 55°C tokom 1 min i ekstenzije pri 72°C u trajanju 1,5 min. Poslednji ciklus ekstenzije trajao je 5 min, pri 72°C. Umnoženi DNK fragmenti odabranih sojeva sekvencirani su u oba smera (Macrogen Europe, Amsterdam, The Netherlands), korišćenjem istih prajmera koji su korišćeni za umnožavanje.

Dobijeni hromatogrami analizirani su korišćenjem softvera Finch TV 1.4.0 (Geospiza, Inc., Seattle, WA, USA; <http://www.geospiza.com>). Sekvence (“forward” i “reverse”) su obrađene korišćenjem softverskog paketa MEGA 6 (Tamura et al., 2011). Dobijene sekvence su upoređene sa sekvencama dostupnim u NCBI (National Collection of Plant Pathogenic Bacteria,) korišćenjem BLASTn algoritma (Altschul et al., 1997). Poravnanje sekvenci izvršeno je upotrebom CLUSTAL W algoritma, a dalja analiza pomoću softvera MEGA 6. Filogenetska analiza za sojeve KFB 343 i KFB 344 izvedena je primenom “neighbor-joining“ (NJ) metode (Saitou and Nei, 1987), sa genetičkom udaljenošću između sekvenci izračunatoj prema Kimura-2 modelu (Kimura, 1980). Statistička značajnost testirana je “bootstrap” analizom sa 1000 ponavljanja. Filogenetsko stablo ukorenjeno je korišćenjem sekvence 16S rRNK gena sojeva *A. delafieldii* i *A. facilis*.

4.9.2.3 Analiza multilokusnih sekvenci (MLSA)

Analiza multilokusnih sekvenci (eng. Multilocus sequencing analysis - MLSA) predstavlja jednu od najsavremenijih i najpreciznijih molekularnih metoda. Svoju primenu nalazi u identifikaciji sojeva bakterija do nivoa vrste i podvrste, kao i proučavanjima genetičkog diverziteta usko povezanih vrsta. Metod počiva na analizi konstitutivnih (eng. housekeeping) gena, koji su odgovorni za najvažnije procese i funkcionisanje svake ćelije. Konstitutivni geni su konzervirani, trpe male promene tokom evolucije, pa su stoga pogodni za dugoročne epidemiološke studije. Analiza je izvedena prema protokolu Hwang et al. (2005), umnožavanjem unutrašnjih fragmenata 4 konstitutivna gena: *gapA*, *gltA*, *gyrB*, *rpoD* 15 reprezentativnih bakterijskih sojeva (KFB 373-379, KFB 381, KFB 390, KFB 396-400 i KFB 403). Gen *gapA* katališe oksidativnu fosforilaciju gliceraldehid-3-fosfat

dehidrogenaze A, *gltA* kodira transkripciju citrat sintaze, *gyrB* kodira sintezu B subjedinice DNK giraze, dok je *rpoD* gen koji kontroliše RNA polimeraza sigma⁷⁰ faktor, zadužen za početak i usmeravanje transkripcije. Reakciona smeša krajnje zapremine 25 µl, sadržala je sledeće komponente: 17,9 µl „nuclease free“ vode, 2,5µl 10 × DreamTaq Buffer sa dodatkom 20mM MgCl₂ (Thermo Scientific, Vilnius Lithuania), 0,5 µl dNTPs (10mM), po 1 µl prajmera, 0,1 µl Taq DNK polimeraze (Thermo Scientific, Vilnius, Lithuania) i 2 µl uzorka DNK. Program reakcije obuhvatio je korak denaturacije pri 94°C u trajanju 5 min; 30 ciklusa denaturacije pri 94°C u trajanju 2 min, vezivanje prajmera pri 62°C kod *gapA* gena, 63°C kod *gyrB* i *rpoD* i 60°C kod *gltA* gena, u trajanju 1 min, potom ekstenzije pri 72°C u toku 1 min. Završna ekstenzija odvijala se pri 72°C, u trajanju 7 minuta.

Sve reakcije umnožavanja DNK su izvedene u aparatu Thermo Cycler 2240 (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA). Umnoženi DNK proizvodi razdvajani su elektroforezom u 1,5% agaroznom gelu. Nakon toga, gelovi su obojeni u rastvoru etidijum bromida (1 µg/ml) u trajanju 20 min i posmatrani pod UV svetlom na transiluminatoru (Vilber Lourmat, France).

Fragmenti su sekvencirani istim prajmerima koji su korišćeni za umnožavanje ili posebno dizajniranim za tu analizu (Macrogen Europe, Amsterdam, The Netherlands). Vizuelizacija hromatograma, obrada i određivanje konsenzus sekvenci izvršeni su korišćenjem istih programa kao i u slučaju analize 16S rRNK regiona. Za uporednu analizu dobijenih sekvenci sa sekvencama dostupnim u bazi podataka NCBI i Plant Associated Microbes Database (PAMDB) banke gena, korišćen je BLAST program.

Tabela 3. Prajmeri i PCR metode korišćeni u radu

PCR metoda	Naziv i sekvenca prajmera (5'-3')	Veličina Fragmenta	Literatura
<i>A. citrulli</i>	BX-L1: AGCTGGGAGCGATCTTCAT BX-S-R2: GCGTCAGGAGGGTGAGTAGCA	279 bp	Bahar et al., 2008
<i>SyrB</i>	B1: CTTCCGTGGTCTTGATGAGG B2 : TCGATTTTGCCGTGATGAGTC	752 bp	Takemoto, 1992

PCR metoda	Naziv i sekvenca prajmera (5'-3')	Veličina Fragmenta	Literatura
Rep PCR	BoxA1R: CTACGGCAAGGCGACGCTGACG Rep1R-1: III ICG ICG ICA TCI GGC Rep2-1: ICG ICTTATCIGGCCTAC Eric1R: ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC Eric2: AAGTAAGTGAAGTGGGGTGAGCG	Fragmenti različite veličine	Schaad et al., 2001
16S rRNK	fD1: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG rP2: ACGGCTACCTTGTTACGACTT	~ 1450 bp	Weisburg et al., 1991
<i>gapA</i>	gapAFp: CCGGCSGARCTGCCSTGG gapARps: GTGTGRTTGGCRTCGAARATCGA	~ 650 bp	Hwang et al., 2005
<i>gltA</i>	gltAFp: CCTCBTGCAGTCGAAGATCACC gltARp: TTGTAVGGRCYGGAGAGCATTTTC	~ 1050 bp	Hwang et al., 2005
<i>gyrB</i>	gyrBFps: TCBGCRGCVGARGTSATCATGAC gyrBRps: TTGTCYTTGGTCTGSGAGCTGAA	~ 750 bp	Hwang et al., 2005
<i>rpoD</i>	rpoDFp: AGGTGGAAGACATCATCCGCATG rpoDRps: CCGATGTTGCCTTCTGGATCAG	~ 1100 bp	Hwang et al., 2005

4.9.3 Sekvenciranje genoma bakterije, sklapanje i anotacija

Zahvaljujući saradnji sa profesorom Jeffrey Jones-om i njegovim saradnicima na Univerzitetu Florida (SAD), izvedeno je sekvenciranje čitavog genoma soja KFB 381, izolovanog iz uljane tikve.

Kultura bakterije poreklom iz jedne kolonije gajena je 24h na podlozi HA, pri 27 °C. Potom je genomska DNK ekstrahovana primenom CTAB metode, a njena koncentracija je proverena na aparatu NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Waltham, MA). Genomske biblioteke su pripremljene upotrebom Nextera Library Preparation Kit-a (Illumina Inc., San Diego, CA), dok je DNK sekvencirana korišćenjem Illumina MiSeq platforme u Interdisciplinarnom centru za biotehnoška istraživanja Univerziteta Florida. Dobijeni podaci su obrađeni u kontige upotrebom SPAdes Genome assembler v3.9.0 i

deponovani u NCBI PGAAP pipeline i IMG/JGI platformu (Markowitz et al., 2012) za anotaciju.

4.10 Spektar domaćina

Za reprezentativne sojeve izolovane u okviru ove studije, proveren je spektar domaćina među različitim biljnim vrstama porodice Cucurbitaceae. Kao test biljke poslužile su lubenica (Rosa), krastavac (Sunčani potok), dinja (Sezam), tikva (Beogradska), muskatna tikva (Nektar). Ogled je izveden na isti način kao i proučavanje patogenosti na biljci domaćinu (Poglavlje 4.5.2).

4.11 Osetljivost sortimenta prema *A. citrulli*

Od svih izolovanih sojeva u ovom istraživanju, kao predstavnik najzastupljenijeg i ekonomski najznačajnijeg patogena odabran je soj KFB 356 (*A. citrulli*), kako bi se proverila osetljivost sortimenta lubenice. Kao test biljke, poslužile su različite sorte lubenice (Rosa, Crimson Sweet, Top Gun, Bonta, Delta i Talisman), koje imaju široku primenu u poljoprivrednoj proizvodnji naše zemlje. Ogled je postavljen na isti način kao i kod proučavanja spektra domaćina i testa patogenosti na biljci domaćinu. Test je izveden u 6 ponavljanja (2 saksije po 3 biljke). Kao pozitivna kontrola korišćen je soj *A. citrulli* (KFB 0250), dok je kao negativna kontrola upotrebljena sterilna destilovana voda. Pozitivnom reakcijom smatrana je pojava pega vodenastog izgleda sa naličja lista nakon 48h.

4.12 Osetljivost sojeva bakterija prema baktericidima

Suzbijanje fitopatogenih bakterija predstavlja složen zadatak, obzirom na broj registrovanih baktericida za primenu u zaštiti bilja. Patogeni su dosta prilagodljivi, stoga često kao posledica jednolične i učestale primene dostupnih jedinjenja dolazi do pojave rezistentnosti. Tako je u Americi 60ih godina prošlog veka, ubrzo nakon početka primene antibiotika u zaštiti bilja, uočena pojava rezistentnosti u populaciji nekih fitopatogenih bakterija (Jones, 1982). Ubrzo su pristigla obaveštenja i iz drugih krajeva sveta o pojavi streptomycin-rezistentnih sojeva. Upotreba jedinjenja bakra, koja su dugi niz godina

najzastupljenija u kontroli bakterioznih oboljenja, takođe dovodi do česte pojave otpornosti sojeva pripadnika najznačajnijih rodova bakterija (Marco i Stall, 1983; Adaskaveg and Hine, 1985; Andersen et al., 1991). Osetljivost izolovanih sojeva prema baktericidima proučena je na podlozi sa saharozom i peptonom, SPA (20 g saharoze; 5 g peptona; 0,5 g K_2HPO_4 ; 0,25 g $MgSO_4 \times 7H_2O$; 12,0 g Oxoid agar No.3; destilovana voda do 1l) (Lelliot and Stead, 1987) u koju su nakon sterilizacije i hlađenja do 48°C aseptičnim putem dodate odgovarajuće količine baktericida. U ogledu je proučeno dejstvo 25 i 50 ppm streptomycin-sulfata, 50 i 100 ppm kasugamicina, 100 i 200 ppm komercijalnih formulacija bakar-hidroksida, $Cu(OH)_2$ (Funguran OH; Spiess-Urania) i bakar-oksihlorida, $Cu_2(OH)_3Cl$ (Cuprozin 35-WP, Galenika Fitofarmacija). Ova koncentracija baktericida odabrana je na osnovu ranije saopštenih istraživanja sprovedenih u svetu, kao i podatka da se u gotovim formulacijama pesticida nalaze koncentracije aktivnih materija koje su i po nekoliko puta više.

Oko 3 μ l suspenzije bakterija koncentracije približno 10^7 CFU/ml, pipetirano je na površinu podloge u Petri-posudama standardne veličine. Posude su postavljene u termostat pri 27°C u trajanju 72h. Osetljivost sojeva ocenjena je posmatranjem porasta bakterija na podlozi u prisustvu baktericida određene koncentracije. Soj *X. euvesicatoria* (E-3, KFB 062), rezistentan na pomenute koncentracije baktericida, korišćen je kao pozitivna kontrola, a zasejana podloga bez dodataka ovih jedinjenja kao negativna kontrola. Razvoj bakterija na podlozi ukazuje da je soj rezistentan na baktericid u korišćenoj koncentraciji. Ukoliko nema razvoja kolonija na podlozi, bakterija je osetljiva. Pojava pojedinačnih kolonija ili razvoja u vidu granulirane konzistencije na mestu nanošenja suspenzije smatra se slabim razvojem. Oglad je izveden za svaki soj u dva ponavljanja.

4.13 Specifičnost bakteriofaga prema izolovanim sojevima *A. citrulli*

Bakteriofagi predstavljaju viruse koji uništavaju bakterije. Fagi su prirodne komponente biosfere i predstavljaju najbrojnije mikroorganizme na planeti. Mogu se naći na svim mestima gde i bakterije, specifični su, eliminišu samo ciljanu bakteriju, bez uticaja na ostale članove životne sredine (Gašić i sar., 2007).

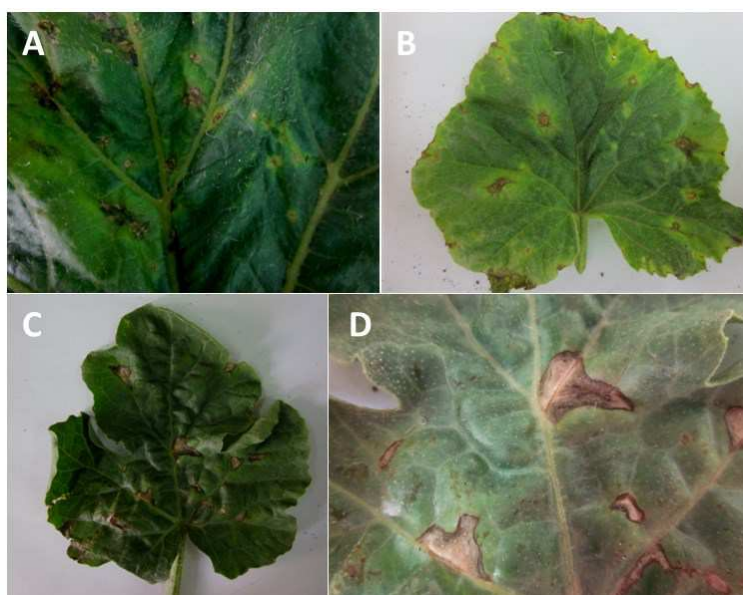
Na osnovu saradnje sa dr Katarinom Gašić (Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Beograd), u okviru ovog istraživanja, proučena je specifičnost 12 bakteriofaga specifičnih za vrstu *A. citrulli*, prema 32 izolovana soja ove bakterije. Specifičnost je proučena u cilju karakterizacije sojeva, a i potencijalne primene u biokontroli patogena.

5. REZULTATI

5.1 Obilazak terena i simptomi oboljenja

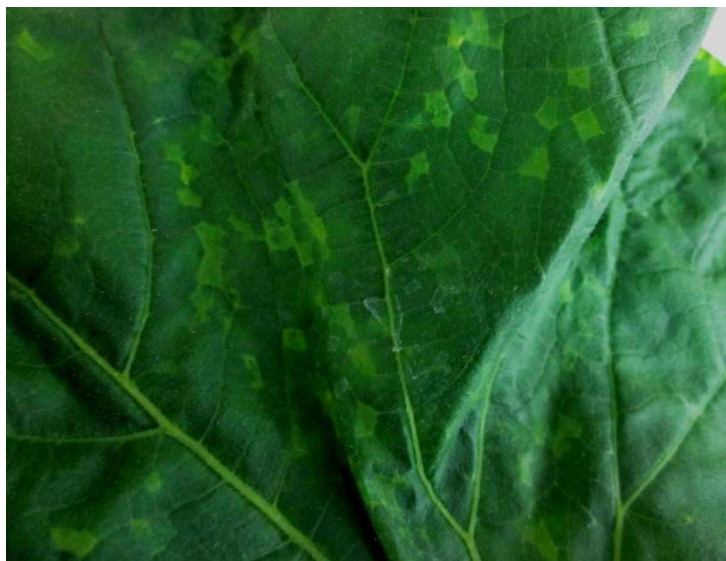
U periodu od 2013-2016. godine, izvršen je obilazak terena širom Srbije, u cilju pregleda useva različitih vrsta familije Cucurbitaceae i utvrđivanja pojave oboljenja bakteriozne prirode. Osim područja Vojvodine, koje je najpoznatije po proizvodnji krastavca, lubenice i dinje, istraživanjima su obuhvaćeni i lokaliteti u ostalim delovima zemlje. Biljni materijal, sa izraženim simptomima oboljenja, prikupljen je sa 17 različitih lokaliteta. Uprkos činjenici da su uočeni simptomi podsećali na bakterioznu prirodu oboljenja, iz uzoraka prikupljenih sa 7 lokaliteta (Orašac, Klenovnik - opština Požarevac, Kusiće - opština Veliko Gradište, Vranje, Lunovo selo - opština Požega, Zrenjanin, Hetin - opština Žitište) nisu izolovane fitopatogene bakterije.

U pogledu simptoma, izdvojile su se dve grupe uzoraka. U prvoj grupi su se našli uzorci sa izraženim simptomima lisne pegavosti (Slika 2). Izgled pega je varirao u zavisnosti od vrste domaćina, ali su ipak ukazivale na bakterioznu prirodu. Oko središnjeg, nekrotiranog dela pege, uočavao se svetlo zeleni do žuti oreol, različite širine.



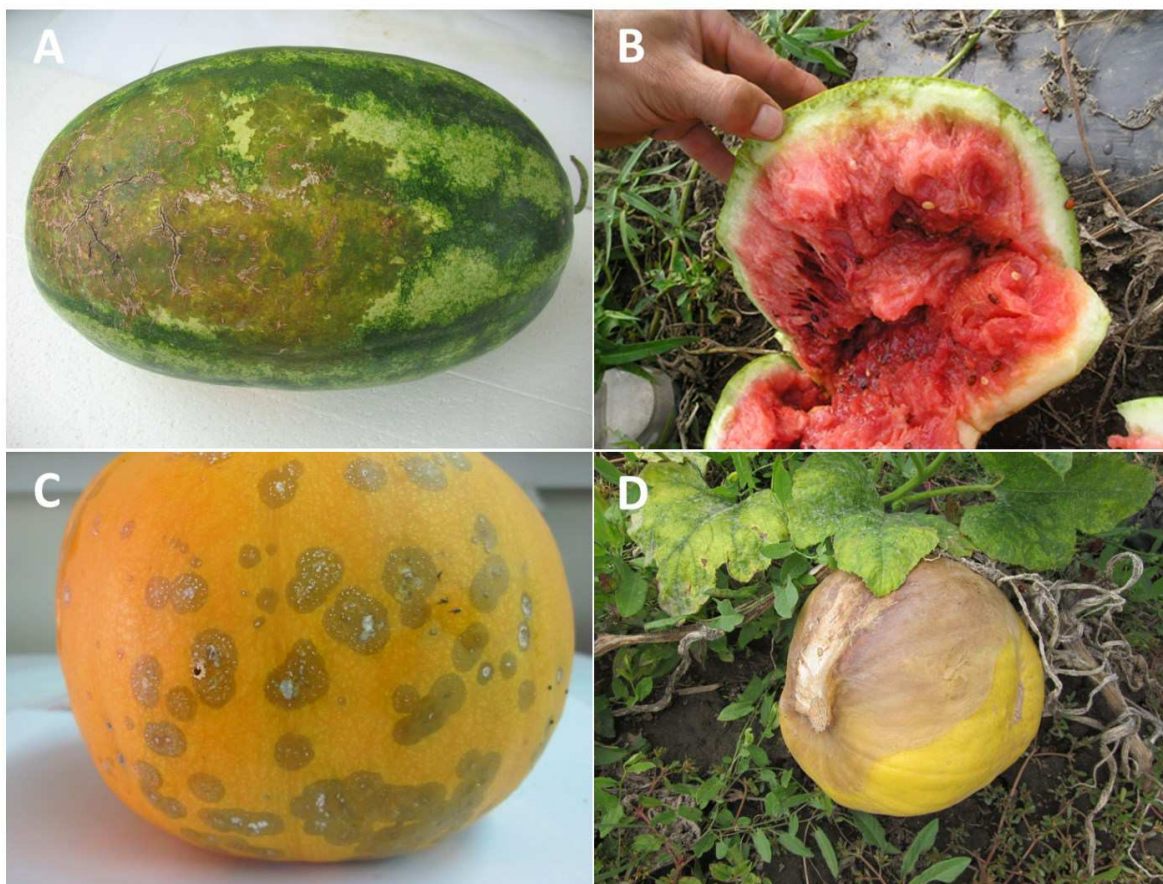
Slika 2. Simptomi lisne pegavosti na različitim vrstama biljaka familije Cucurbitaceae: bundeva (A), dinja (B), lubenica (C, D). (Foto: N. Zlatković)

Izgled simptoma na listovima krastavca iz lokaliteta Kujavica u velikoj meri podsećao je na uglastu bakterioznu pegavost koju prouzrokuje *P. s. pv. lachrymans* (Slika 3). Međutim, rezultati istraživanja ukazuju na to da je prozrokovatelj ovih simptoma vrsta *Pseudomonas viridiflava*, o čemu će biti reči u narednim poglavljima.



Slika 3. *P. s. pv. syringae* - Svetlozelene, uglaste pege na listovima krastavca. (Foto: N. Zlatković)

U drugoj grupi našli su se plodovi lubenice i dinje u fazi fiziološke zrelosti, sa simptomima u vidu nepravilnih pega sa gornje strane ploda, vodenastog izgleda i različite veličine (Slika 4, A). Vremenom, pege su zahvatale sve veću površinu, a ubrzo je dolazilo i do pucanja kore ploda. Nastale lezije su predstavljale idealan put za prodor drugih, oportunističkih patogena, što je dovodilo do razmekšavanja unutrašnjeg tkiva ploda (Slika 4, B). Ovakvi plodovi su neupotrebljivi i gube komercijalnu vrednost u potpunosti. Prilikom pregleda biljaka, uočeno je da se simptomi antraknoze koju prouzrokuju gljive iz roda *Colletotrichum*, mogu lako pomešati sa onim koje prouzrokuju bakterije, naročito u početnim fazama razvoja. Osim gljiva, trulež plodova mogu prouzrokovati i vrste iz roda *Pectobacterium* (Slika 4, D).



Slika 4. *A. citrulli* - Bakteriozna mrljavost plodova lubenice u kasnijoj fazi infekcije (A) i završnoj fazi, kada dolazi do pucanja kore i potpunog razmekšavanja unutrašnjeg tkiva ploda (B). *Colletotrichum* sp. - Simptomi na plodu tikve koji se mogu pomešati sa infekcijom prouzrokovanom vrstom *A. citrulli* (C). *Pectobacterium* spp. - Trulež ploda tikve (D). Prirodna infekcija. (Foto: A. Obradović (A, B), N. Zlatković (C, D))

Tokom leta 2015. godine, u nekoliko zasada krastavca u području Srema, uočena je pojava simptoma uvelosti koji su izuzetno podsećali na bakterioznu uvelost krastavca, prouzrokovanu vrstom *E. tracheiphila* (Slika 5). Karakteristično je bilo što su simptomi zahvatali biljke samo sorte Ekron u pojedinim delovima plastenika, uglavnom krajnje redove. Iz prikupljenog biljnog materijala je izvršena izolacija na hranljivu bakteriološku podlogu, međutim, fitopatogene bakterije nisu izolovane. Pretpostavlja se da je uzrok ove pojave dejstvo abiotskih faktora.



Slika 5. Uvelost krastavca, uzrok nepoznat. (Foto: N. Zlatković)

5.2 Izolacija patogena

Nakon 24-48h razvoja na podlozi HA, pri temperaturi 27°C, uočena je pojava kolonija različitog izgleda. Presejavanjem pojedinačnih kolonija u nekoliko navrata, dobijene su čiste kulture, odnosno sojevi bakterija. Sojevi poreklom iz listova različitih vrsta porodice Cucurbitaceae obrazovali su okrugle, ispupčene, sjajne kolonije, bele ili beličasto sive boje. Osim iz listova, jedan soj (KFB 392) izolovan je iz ploda uljane tikve, dok su 2 soja (KFB 394 i KFB 395) izolovana iz vreža lubenice, sa simptomima razmekšavanja tkiva, odnosno truleži. Sojevi, odabrani za dalje proučavanje, fenotipski su podsećali na predstavnike rodova *Pseudomonas* i *Pectobacterium* (Tabela 4).

Tabela 4. Diferencijacija sojeva na osnovu izgleda kolonija na HA podlozi

Šifra soja	Izgled kolonija na HA podlozi		
	sjajne, ispučene kolonije, bele boje, pravilnih ivica	sjajne, beličaste kolonije, nepravilnih ivica	sjajne, sivkasto-bele kolonije, okruglog oblika, pravilnih ivica i specifičnog mirisa
KFB 340	+		
KFB 341	+		
KFB 342	+		
KFB 343	+		
KFB 344	+		
KFB 345	+		
KFB 346	+		
KFB 347	+		
KFB 348	+		
KFB 349	+		
KFB 350	+		
KFB 351	+		
KFB 352	+		
KFB 353	+		
KFB 354	+		
KFB 355	+		
KFB 356	+		
KFB 357	+		
KFB 358	+		
KFB 359	+		
KFB 360	+		
KFB 361	+		
KFB 362	+		
KFB 363	+		
KFB 365	+		
KFB 366	+		
KFB 367	+		
KFB 368	+		
KFB 369	+		
KFB 370	+		
KFB 371	+		
KFB 372	+		
KFB 0250, <i>A. citrulli</i>	+		
KFB 373		+	
KFB 374		+	
KFB 375		+	
KFB 376		+	
KFB 377		+	
KFB 378		+	
KFB 379		+	
KFB 380		+	
KFB 381		+	
KFB 382		+	
KFB 383		+	
KFB 384		+	
KFB 385		+	
KFB 386		+	
KFB 387		+	
KFB 389		+	
KFB 390		+	
KFB 393		+	

Šifra soja	Izgled kolonija na HA podlozi		
	sjajne, ispupčene kolonije, bele boje, pravilnih ivica	sjajne, beličaste kolonije, nepravilnih ivica	sjajne, sivkasto-bele kolonije, okruglog oblika, pravilnih ivica i specifičnog mirisa
KFB 396		+	
KFB 397		+	
KFB 398		+	
KFB 399		+	
KFB 400		+	
KFB 401		+	
KFB 402		+	
KFB 403		+	
KFB 404		+	
KFB 405		+	
KFB 0103, <i>P. s. pv. syringae</i>		+	
KFB 392			+
KFB 394			+
KFB 395			+
KFB 85, <i>P. c. subsp. carotovorum</i>			+

Sojevi izolovani iz plodova lubenice na podlozi HA obrazovali su blago ispupčene i glatke kolonije, beličaste boje, okruglog oblika i pravilnih ivica. Uočeno je da bakterije gube vitalnost nakon mesec dana čuvanja u frižideru, u vidu suspenzije u vodi (Zlatković i sar., 2015). Poređenjem fenotipskih karakteristika ovih i kontrolnih sojeva, najveća sličnost je uočena sa vrstom *A. citrulli*, čije prisustvo do tada nije detektovano u Srbiji.

U leto 2014. godine na području Ašanje uočena je pojava bakteriozne mrljivosti na plodovima lubenice. Naredne godine sa istog terena uzorkovano je zemljište, kako bi se utvrdilo da li su se bakterije održale u toku zime. Iz prikupljenih uzoraka zemljišta nisu izolovane fitopatogene bakterije.

5.3 Patogene odlike sojeva

Patogene odlike izolovanih sojeva, proučene su kroz nekoliko testova.

5.3.1 Hipersenzitivna reakcija

Svi sojevi proučavani u ovom radu, osim dva (KFB 359 i KFB 363), prouzrokovali su hipersenzitivnu reakciju listova duvana sorte Samsun (Tabela 5).

5.3.2 Test patogenosti na biljci domaćinu

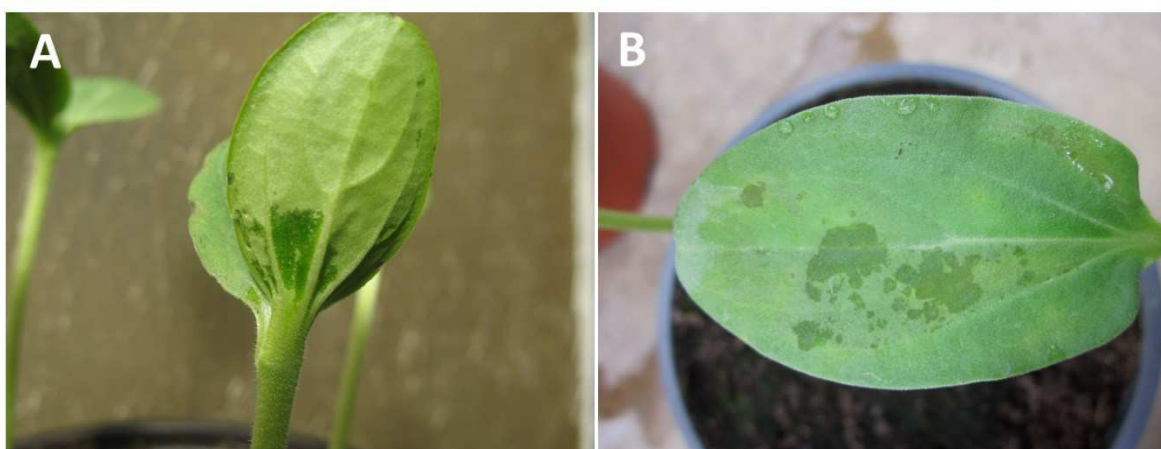
Kao preliminarni test u dokazivanju patogenosti, poslužili su klijanci tikve, gajeni na navlaženom filter papiru, u Petri kutijama, pod sterilnim uslovima. Test je izvođen neposredno nakon prečišćavanja izolata i dobijanja čistih bakterijskih kultura. Svi proučavani sojevi su prouzokovali pojavu simptoma na kotiledonima biljaka. U nekim slučajevima, dolazilo je do pojave razmekšavanja tkiva koje je zahvatalo čitav hipokotil, nakon čega bi biljke brzo uginule (Slika 6). Iako su preduzimate sve mere u pogledu sterilisanja ili dezinfekcije materijala za rad, često je dolazilo do razvoja saprofita na filter papiru ili samim biljkama, stoga je ovaj način provjere patogenosti ocenjen kao nedovoljno pouzdan.



Slika 6. Vlažna trulež hipokotila klijanca bundeve (veštačka inokulacija) (A). U završnoj fazi infekcije, zahvaćeni su i hipokotil i kotiledoni (B). (Foto: N. Zlatković)

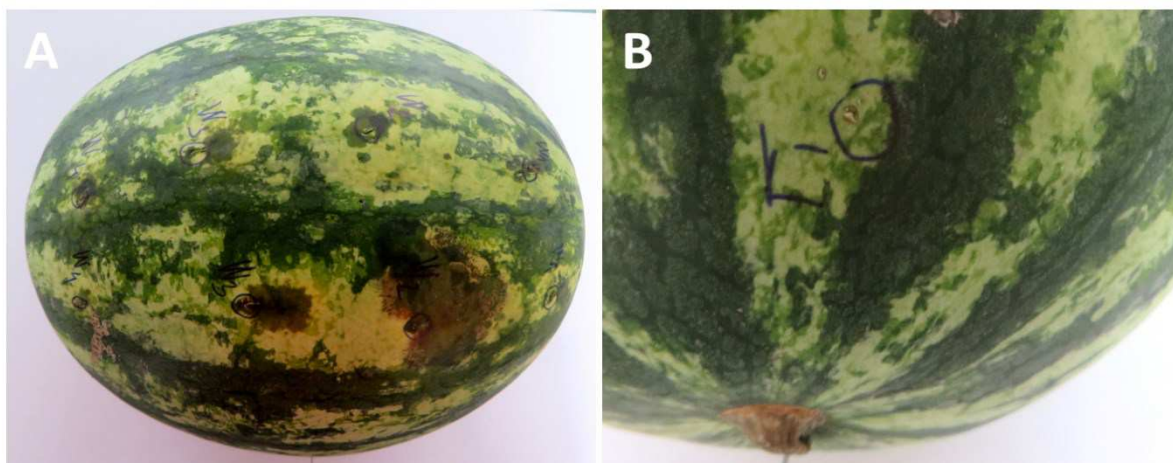
Kako bi se izbegla kontaminacija i razvoj oportunističkih patogena, test patogenosti je izveden na biljkama gajenim u saksijama. Kao test biljke poslužile su lubenica (*Rosa*), krastavac (Sunčani potok), dinja (Sezam) i tikvica (Beogradska). Metod prskanja ručnom prskalicom suspenzijom bakterija koncentracije $\sim 10^8$ CFU/ml pokazao se efikasnim. Dodatna relativna vlažnost vazduha koja je neophodna za nastanak infekcije i u prirodnim

uslovima, obezbeđena je postavljanjem PVC kesa preko inokulisanih biljaka u trajanju 24h. Svi proučavani sojevi, osim dva (KFB 359 i KFB 363), prouzrokovali su pojavu simptoma na testiranim biljkama. Simptomi su se ispoljavali u vidu pega vodenastog izgleda, nepravilnog oblika i različite veličine. Pege su se najlakše mogle uočiti sa naličja lista, mada je njihovo prisustvo bilo jasno vidljivo i sa lica (Slika 7). Kod biljaka inokulisanim sojevima KFB 392, KFB 394 i KFB 395 došlo je do razvoja simptoma u vidu vlažne truleži, koja je kod većine biljaka zahvatala i deo hipokotila.



Slika 7. Pege nepravilnog oblika i vodenastog izgleda sa naličja kotiledona lubenice (A) i lica kotiledona krastavca (B). Veštačka inokulacija. (Foto: N. Zlatković)

Na plodovima lubenice takođe je došlo do razvoja simptoma koji su izgledom odgovarali onima na obolelim plodovima iz kojih je patogen izolovan. Nakon 2 dana inkubacije pri temperaturi $28\pm 2^{\circ}\text{C}$, u uslovima povišene vlažnosti, došlo je do reprodukcije simptoma bolesti (Slika 8, A). Na mestu inokulacije sterilnom destilovanom vodom, nije došlo do pojave simptoma (Slika 8, B).



Slika 8. Bakteriozna mrljavost plodova lubenice (veštačka inokulacija). Pojava karakterističnih simptoma na mestima inokulacije proučavanim sojevima (A). Izgled mesta inokulacije sterilnom destilovanom vodom, odnosno negativnom kontrolom, K- (B). (Foto: N. Zlatković)

Tabela 5. Patogenost sojeva na duvanu (HR) i biljci domaćinu.

Redni broj	Šifra soja	Izolovan iz	HR	Test patogenosti
1	KFB 340	ploda lubenice	+	+
2	KFB 341	ploda lubenice	+	+
3	KFB 342	ploda lubenice	+	+
4	KFB 343	ploda lubenice	+	+
5	KFB 344	ploda lubenice	+	+
6	KFB 345	ploda lubenice	+	+
7	KFB 346	ploda lubenice	+	+
8	KFB 347	ploda lubenice	+	+
9	KFB 348	ploda lubenice	+	+
10	KFB 349	ploda lubenice	+	+
11	KFB 350	ploda lubenice	+	+
12	KFB 351	ploda lubenice	+	+
13	KFB 352	ploda lubenice	+	+
14	KFB 353	ploda lubenice	+	+
15	KFB 354	ploda lubenice	+	+
16	KFB 355	ploda lubenice	+	+
17	KFB 356	ploda lubenice	+	+
18	KFB 357	ploda lubenice	+	+
19	KFB 358	ploda lubenice	+	+
20	KFB 359	ploda lubenice	-	-
21	KFB 360	ploda lubenice	+	+
22	KFB 361	ploda lubenice	+	+
23	KFB 362	ploda lubenice	+	+
24	KFB 363	ploda lubenice	-	-
25	KFB 365	ploda lubenice	+	+
26	KFB 366	ploda lubenice	+	+
27	KFB 367	ploda lubenice	+	+
28	KFB 368	ploda lubenice	+	+

Redni broj	Šifra soja	Izolovan iz	HR	Test patogenosti
29	KFB 369	ploda lubenice	+	+
30	KFB 370	ploda lubenice	+	+
31	KFB 371	ploda lubenice	+	+
32	KFB 372	ploda lubenice	+	+
33	KFB 373	lista tikve	+	+
34	KFB 374	lista tikve	+	+
35	KFB 375	lista tikve	+	+
36	KFB 376	lista tikve	+	+
37	KFB 377	lista tikve	+	+
38	KFB 378	lista tikve	+	+
39	KFB 379	lista tikve	+	+
40	KFB 380	lista tikve	+	+
41	KFB 381	lista tikve	+	+
42	KFB 382	lista tikve	+	+
43	KFB 383	lista tikve	+	+
44	KFB 384	lista tikve	+	+
45	KFB 385	lista tikve	+	+
46	KFB 386	lista tikve	+	+
47	KFB 387	lista tikve	+	+
48	KFB 389	lista tikve	+	+
49	KFB 390	lista tikve	+	+
50	KFB 393	vreže lubenice	+	+
51	KFB 396	lista tikve	+	+
52	KFB 397	lista tikve	+	+
53	KFB 398	lista tikve	+	+
54	KFB 399	lista tikve	+	+
55	KFB 400	lista tikve	+	+
56	KFB 401	lista tikve	+	+
57	KFB 402	lista tikve	+	+
58	KFB 403	lista tikve	+	+
59	KFB 404	lista tikve	+	+
60	KFB 405	lista tikve	+	+
61	KFB 392	ploda tikve	+	+
62	KFB 394	srži vreže lubenice	+	+
63	KFB 395	srži vreže lubenice	+	+

5.4 Diferencijacija roda izolovanih bakterija

Svi proučavani sojevi su Gram-negativni, a na HA podlozi uočene su tri grupe kolonija. U prvoj grupi našli su se sojevi izolovani iz obolelih plodova lubenice, koji su formirali ispupčene, sjajne, okrugle kolonije, pravilnih ivica, bele boje (Slika 9, A). Svojim izgledom, odgovarali su kontrolnom soju *A. citrulli* (KFB 0250). U drugoj grupi su se našli sojevi izolovani iz listova, čije su kolonije beličaste boje, sjajnog izgleda, ali krupnije i nepravilnijih ivica u poređenju sa sojevima prve grupe (Slika 9, B). Izgleda ovih sojeva,

odgovarao je izgledu kontrolnog soja *P. s. pv. syringae* (KFB 0103). Treći tip kolonija bakterija izolovan je iz ploda uljane tikve i srži lubenice, a razlikovao se po sivkasto-beloj boji od ostalih sojeva (Slika 9, C). Poređenjem ovih, sa kontrolnim sojem *P. c. subsp. carotovorum* (KFB 85), uočena je velika sličnost među kolonijama.



Slika 9. Izgled bakterijskih kolonija nakon dva dana razvoja na podlozi HA: rod *Acidovorax* (A), rod *Pseudomonas* (B), rod *Pectobacterium* (C). (Foto: N. Zlatković)

5.5 Identifikacija predstavnika vrste *A. citrulli*

U cilju identifikacije patogena, izveden je veći broj standardnih i diferencijalnih testova, na osnovu kojih su bakterije diferencirane do nivoa vrste.

5.5.1 Morfološke i odgajivačke osobine sojeva *A. citrulli*

Sojevi izolovani iz plodova lubenice, koji su po izgledu kolonija najveću sličnost ispoljili sa kontrolnim sojem *A. citrulli* (KFB 0250) (Slika 9, A), gajeni su u tečnoj hranljivoj podlozi, pri temperaturi 41°C, što je ujedno i jedan od diferencijalnih testova za vrstu *A. citrulli*. Praćen je razvoj bakterija, koji se ispoljio zamućenjem podloge 7 dana nakon postavljanja ogleada. Pri ovoj temperaturi, razvijali su se samo sojevi izolovani iz plodova lubenice sa simptomima bakterijske mrljavosti (Tabela 6; Slika 13, A).

Ovi sojevi pripadaju grupi nefluorescentnih, oksidaza pozitivnih bakterija. Na NAS podlozi ne obrazuju levan pozitivne kolonije. Na YDC podlozi, obrazovali su okrugle, ispupčene kolonije krem boje. Nakon tri dana razvoja, uočena je tendencija porasta kolonija i promena boje u tamniju, što su takođe diferencijalni testovi za pripadnike vrste *A. citrulli*.

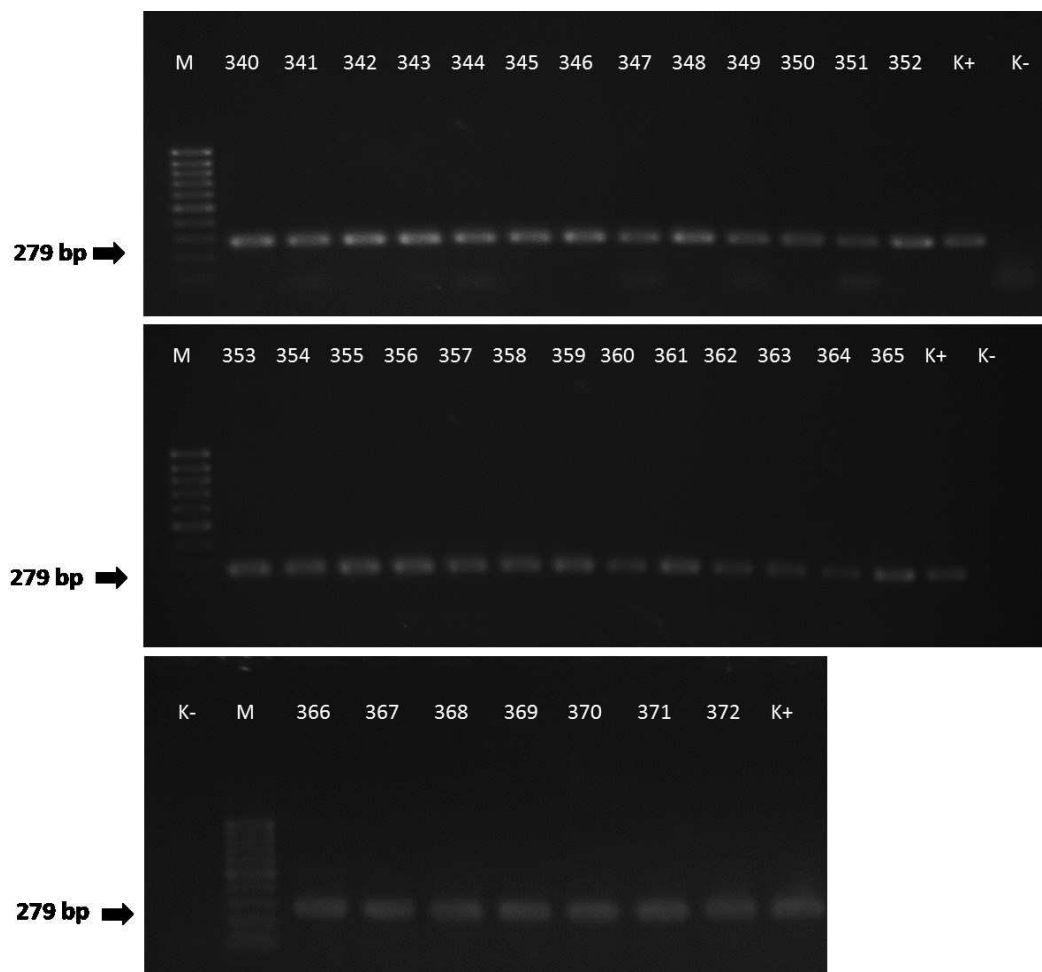
5.5.2 Biohemijsko-fiziološke odlike sojeva *A. citrulli*

Utvrđeno je da svi proučavani sojevi stvaraju enzim katalazu. Reakcija se ispoljila u vidu obrazovanja mehurića prilikom homogenizacije zahvata bakterijskih kolonija u kapi vodonik- peroksida H₂O₂ na sterilnoj mikroskopskoj pločici. Sojevi razlažu arabinozu, ali ne saharozu i sorbitol. Takođe, ne redukuju nitrate, niti poseduju pektolitičke fermente. Sojevi ispoljavaju negativnu reakciju u metabolizmu arginina, kao i kontrolni soj *A. citrulli* (KFB 0250) (Tabela 5).

5.5.3 PCR analiza sojeva *A. citrulli*

U okviru ove doktorske disertacije, primenjeno je nekoliko molekularnih metoda u cilju detekcije i identifikacije patogenih sojeva izolovanih iz lubenice, dinje, krastavca i tikve.

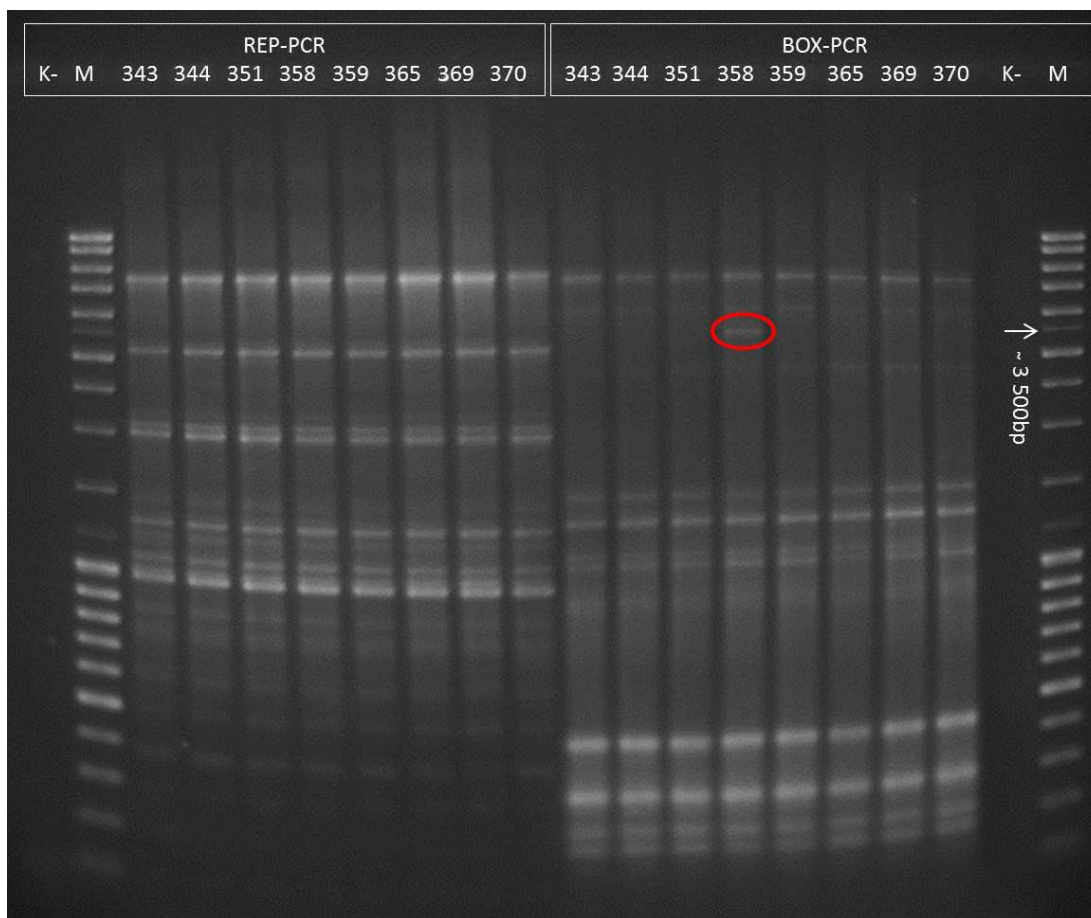
Primenom prajmera BX-L1/BX-S-R2 (Bahar et al., 2008), dizajniranih na osnovu specifičnog BOX-PCR fragmenta vrste *A. citrulli*, došlo je do umnožavanja fragmenta veličine 279 bp kod svih bakterijskih sojeva koji su prouzrokovali bakterioznu mrljavost lubenice, kao i kod pozitivne kontrole, soja *A. citrulli* (KFB 0250) (Slika 10).



Slika 10. Fragment veličine 279 bp, specifičan za vrstu *A. citrulli* umnožen je kod svih proučavanih sojeva izolovanih iz obolelih plodova lubenice pomoću prajmera BX-L1/BX-S-R2. M - marker (MassRuler LowRange DNA Ladder, Fermentas, Litvanija); Linije: 340-372, proučavani sojevi; K+, pozitivna kontrola, soj *A. citrulli* KFB 0250; K-, negativna kontrola.

5.5.3.1 Rep-PCR analiza sojeva *A. citrulli*

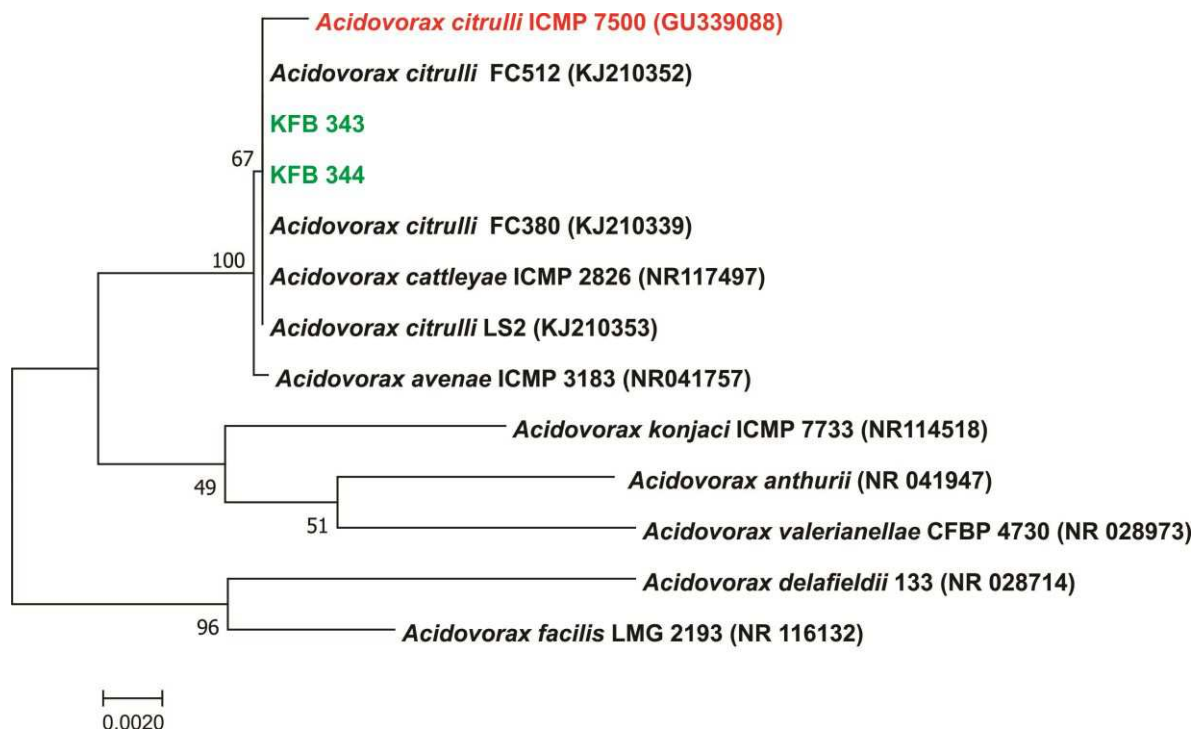
Kako bi se utvrdile razlike u populaciji bakterija, odnosno njihov diverzitet u okviru jedne vrste, primenjena je Rep-PCR metoda. REP-PCR i ERIC-PCR profili izolovanih sojeva *A. citrulli* bili su identični, dok se u BOX-PCR profilu soj KFB 358 razlikovao od ostalih. Razlika se ogledala u tome što je kod pomenutog soja umnožen fragment veličine oko 3500 bp, za razliku od drugih proučavanih sojeva (Slika 11).



Slika 11. REP-PCR i BOX-PCR za pojedine predstavnike sojeva *A. citrulli*. K-, negativna kontrola; M - marker (MassRuler LowRange DNA Ladder, Fermentas, Litvanija); Linije: 343, 344, 351, 358, 359, 365, 369 i 370 - proučavani sojevi. Crvenom bojom je obeležen fragment veličine ~3500bp, umnožen kod soja KFB 358.

5.5.3.2 Sekvenciona analiza 16S rRNK gena sojeva *A. citrulli*

Sekvenciona analiza 16S rRNK gena primenjena je za 2 soja *A. citrulli*, KFB 343 i KFB 344. Upoređivanjem sekvenci (GenBank pristupni brojevi KP410333 i KP410334) sa sekvencama iz NCBI baze, utvrđen je visok stepen identičnosti (100%) sa sojevima *A. citrulli*, poreklom iz Kine, Amerike i Tajlanda. Filogenetsko stablo konstruisano je primenom “neighbor-joining“ (NJ) metode (Saitou i Nei, 1987), sa genetičkom udaljenošću izračunatom prema Kimura-2 modelu. Statistička značajnost testirana je “bootstrap” analizom sa 1000 ponavljanja. Filogenetsko stablo ukorenjeno je korišćenjem sekvence 16S rRNK gena sojeva *A. delafieldii* i *A. facilis* (Slika 12).



Slika 12. Dendrogram konstruisan na osnovu sekvence 16SrRNK gena korišćenjem NJ metode, sa genetičkom udaljenošću izračunatom prema Kimura-2 modelu. Uz čvorišta su naznačene “bootstrap” vrednosti (1000 ponavljanja). Dužina grana odgovara stopi supstitucija baznih parova. Sojevi proučavani u ovom radu obeleženi su zelenom bojom, dok je tipski soj *A. citrulli* obeležen crvenom bojom. Pristupni brojevi navedeni su u zagradi. Filogenetsko stablo ukorenjeno je korišćenjem sekvenci sojeva *A. delafieldii* i *A. facilis*.

5.6 Identifikacija predstavnika roda *Pseudomonas*

Gajenjem izolovanih sojeva na podlozi HA, uočen je porast kolonija koje su svojim fenotipskim karakteristikama ukazivale na pripadnost rodu *Pseudomonas*. Stoga su primenjeni testovi koji se koriste za diferencijaciju bakterija ovog roda.

5.6.1 Morfološke i odgajivačke osobine sojeva roda *Pseudomonas*

Osim sličnosti kolonija na HA podlozi sa kontrolnim sojem *P. s. pv. syringae* (KFB 0103), u drugoj grupi izolovanih bakterija (Slika 9, B), našli su se sojevi koji imaju sposobnost stvaranja fluorescentnog pigmenta na Kingovoj podlozi B. Naime, u slučaju pozitivne reakcije, pod ultravioletnim svetlom, podloga svetluca žućkasto zelenom bojom. Sojevi ove grupe ispoljili su varijabilne rezultate u pogledu sposobnosti stvaranja fluorescentnog pigmenta (Tabela 7). Sojevi koji poseduju ovu osobinu, mogu se svrstati u

rod *Pseudomonas*, ali u literaturi postoje navodi i o odstupanjima pojedinih sojeva (Newberry et al, 2017).

5.6.2 LOPAT testovi

LOPAT testovi se koriste prilikom identifikacije predstavnika roda *Pseudomonas*, mada se pojedine reakcije koriste i za proučavanja drugih rodova bakterija.

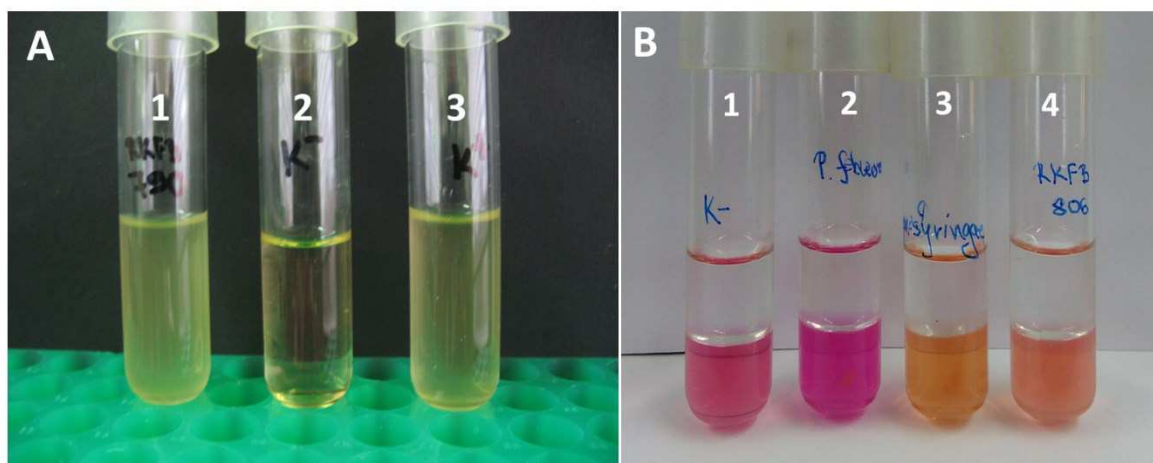
U prvom testu, proučeno je stvaranje polisaharida levana na NAS podlozi. Od 28 testiranih sojeva, 26 je obrazovalo levan pozitivne kolonije, što je odlika nekih bakterija roda *Pseudomonas* i *Erwinia*. Dva soja (KFB 389 i KFB 401) nisu formirala sluzaste i sjajne kolonije, tj. nisu formirali levan na NAS podlozi, kao ni kontrolni soj *P. viridiflava* (KFB 012) (Tabela 7).

Testirani sojevi nisu ispoljili oksidaza pozitivnu reakciju, niti su prouzrokovali trulež kriški krompira.

U testu metabolizma arginina utvrđuje se prisustvo dva enzima koji omogućavaju pojedinim predstavnicima roda *Pseudomonas* da se razvijaju u anaerobnim uslovima. Alkalna reakcija u slučaju pozitivnog rezultata se uočava pojavom tamno ružičaste obojenosti podloge. Soj *P. fluorescens* korišćen je kao pozitivna kontrola, dok je soj *P. s. pv. syringae*, KFB 0103 upotrebljen kao negativna kontrola (Slika 13, B). Svi proučavani sojevi ispoljili su negativnu reakciju, što takođe ukazuje na pripadnost proučavanih sojeva vrsti *P. syringae pv. syringae* (Tabela 6).

Hipersenzitivna reakcija na duvanu proučena je u okviru testa patogenosti i kao što je već pomenuto, svi sojevi ove grupe su prouzrokovali reakciju, kao i kontrolni soj *P. s. pv. syringae* (Tabela 5).

Na osnovu rezultata LOPAT testova, svi sojevi osim dva, KFB 389 i KFB 401, svrstani su u Ia LOPAT grupu roda *Pseudomonas*, u kojoj se nalazi i vrsta *P. s. pv. syringae*. Sojevi KFB 389 i KFB 401, smešteni su II LOPAT grupu roda *Pseudomonas*.



Slika 13. Razvoj sojeva pri 41 °C: 1 - proučavani soj, izolovan u ovom istraživanju; 2 - negativna kontrola, odnosno nezasejana podloga; 3 - pozitivna kontrola, *A. citrulli* KFB 0250 (A). Metabolizam arginina: 1 - nezasejana podloga; 2 - pozitivna kontrola, *P. fluorescens* B130; 3 - negativna kontrola, *P. s. pv. syringae* KFB 0103; 4 - proučavani soj, izolovan u ovom istraživanju (B). (Foto: N. Zlatković)

5.6.3 Biohemijsko-fiziološke odlike sojeva roda *Pseudomonas*

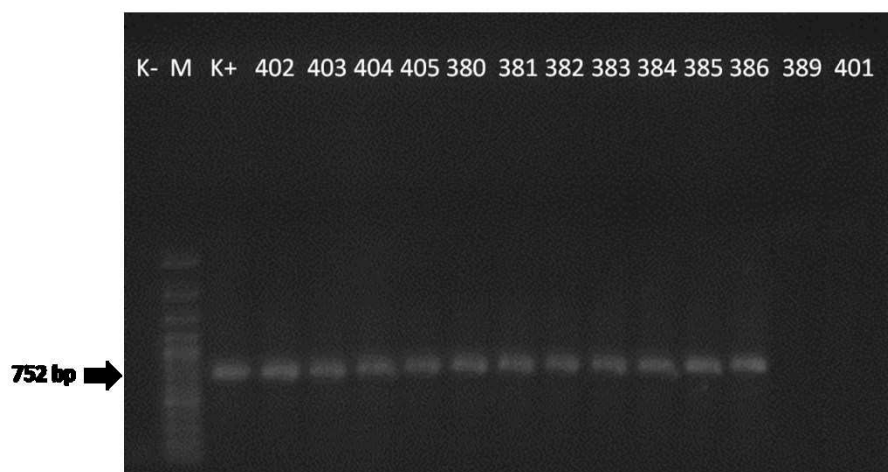
Proučavanjem biohemijsko-fizioloških karakteristika izvršena je dalja diferencijacija sojeva.

Sojevi ove grupe razlažu saharozu, manitol, sorbitol i inozitol, ne razlažu arabinozu, niti redukuju nitrate u nitrite. U pogledu metabolizma glukoze, sojevi su ispoljili oksidativna svojstva, odnosno glukozu razlažu u aerobnim uslovima, kao i kontrolni soj *P. s. pv. syringae* (Tabela 7).

Stvaranje čestica leda je test koji se često koristi u diferencijaciji vrsta roda *Pseudomonas*. Od ukupno 28 sojeva za koje se pretpostavljalo da pripadaju rodu *Pseudomonas*, samo 4 soja (KFB 373, KFB 374, KFB 379 i KFB 390) nisu ispoljila sposobnost stvaranja čestica leda pri temperaturi oko -4 °C (Tabela 7). Stvaranje čestica leda predstavlja karakterističnu osobinu za sojeve *P. s. pv. syringae*, ali je u literaturi zabeleženo odsustvo pozitivne reakcije kod pojedinih sojeva ove vrste (Newberry et al., 2017).

5.6.4 PCR analiza sojeva roda *Pseudomonas*

Jedna od karakteristika vrste *P. s. pv. syringae* jeste sposobnost da sintetiše siringomicin. Primenom PCR reakcije izvršena je detekcija gena za sintezu siringomicina, za sojeve koji su prema morfološkim, odgajivačkim i biohemijsko-fiziološkim karakteristikama preliminarno smešteni u rod *Pseudomonas*. Korišćenjem specifičnih prajmera Syr B1/B2 u reakciji lančanog umnožavanja fragmenata DNK (Sorensen et al., 1998), umnožen je fragment veličine 752 bp kod 26 proučavanih sojeva (Slika 14). Kod sojeva KFB 389 i KFB 401 nije došlo do umnožavanja odgovarajućeg fragmenta, iako su pojedini testovi ukazivali na njihovu pripadnost vrsti *P. s. pv. syringae*.



Slika 14. Fragment veličine 752 bp, umnožen primenom PCR metode sa parom prajmera Syr B1/B2 (deo rezultata). Kod soja KFB 389 nije došlo do umnožavanja fragmenta. K- negativna kontrola; M - marker (MassRuler LowRange DNA Ladder, Fermentas, Litvanija); K+ pozitivna kontrola, soj *P. s. pv. syringae* KFB 0103; Linije: 402-401, proučavani sojevi.

5.6.4.1 Rep-PCR analiza sojeva roda *Pseudomonas*

Rep-PCR analiza primenjena je u cilju utvrđivanja razlika u populaciji izolovanih sojeva, ali kao i prvi korak u sprovođenju MLSA analize, kada se izdvajaju predstavnici različitih genetskih profila bakterija. Ciljane sekvence kod proučavanih sojeva umnožene su izvođenjem tri PCR reakcije: REP PCR pomoću para prajmera Rep1R-1 i Rep2-1, BOX PCR, upotrebom BOXA1R prajmera, ERIC PCR, korišćenjem para prajmera ERIC1R i ERIC2. Za rod *Pseudomonas*, najveći prag diskriminacije imaju BOX prajmeri. Stoga je njihovom primenom utvrđeno postojanje klonova među sojevima, odnosno izdvojeni su

pojedini predstavnici različitih grupa za dalje proučavanje. Na osnovu dobijenih rezultata, odabrano je 15 sojeva (KFB 373-379, KFB 381, KFB 390, KFB 396-400 i KFB 403), koji su dalje proučavani primenom MLSA analize.

5.6.4.2 Sekvenciona analiza 16S rRNK gena sojeva roda *Pseudomonas*

Sekvenciona analiza 16S rRNK gena primenjena je za 5 sojeva (KFB 389, KFB 392, KFB 394, KFB 395 i KFB 401) koji se nisu uklapali ni u jednu postojeću grupu, koje su formirane na osnovu prethodno urađenih testova. Prema rezultatima odgajivačkih, morfoloških i biohemijsko-fizioloških testova, sojevi KFB 389 i KFB 401 preliminarno su smešteni u rod *Pseudomonas*, ali kod njih nije došlo do umnožavanja *syrB* fragmenta, za razliku od ostalih sojeva sličnih karakteristika. Na osnovu dobijenih hromatograma vizuelizovanih korišćenjem softvera Finch TV 1.4.0 (Geospiza, Inc., Seattle, WA, USA; <http://www.geospiza.com>) i sekvenci obrađenih korišćenjem softverskog paketa MEGA 6 (Tamura et al., 2011), dobijene su sređene sekvence proučavanih sojeva. One su dalje upoređene sa sekvencama dostupnim u NCBI bazi, korišćenjem BLASTn algoritma (Altschul et al., 1997). Rezultati su pokazali da sojevi KFB 389 i KFB 401 pripadaju vrsti *P. viridiflava*, s obzirom da je stepen identičnosti proučavanih sojeva sa sojevima izolovanim iz vrste *Ligusticum wallichii* u Kini, iz trešnje u Švajcarskoj, iz drenovca (*Leucojum aestivum*) u Bugarskoj i iz krastavca u Jordanu (GenBank pristupni brojevi KY460680, LT855380, KY050588, KU686699) iznosio 99%.

5.7 Identifikacija sojeva roda *Pectobacterium*

S obzirom da su sojevi treće grupe KFB 392, KFB 394 i KFB 395 izolovani iz biljnog tkiva sa simptomima vlažne truleži, pretpostavljeno je da pripadaju rodu *Pectobacterium*. Primenom različitih testova, izvršena je identifikacija ovih sojeva.

5.7.1 Biohemijsko-fiziološke osobine sojeva roda *Pectobacterium*

Proučavani sojevi poseduju pektolitičke fermente, čija aktivnost prouzrokuje trulež kriški krompira, kao i pozitivna kontrola, *P. c. subsp. carotovorum* (KFB 85) (Tabela 8).

Takođe, sojevi nisu ispoljili pozitivnu reakciju u metabolizmu arginina, niti su stvarali kiselinu iz saharoze, sorbitola i inozitola. Vršili su redukciju nitrata, a u testu metabolizma glukoze, ispoljili su oksidativno-fermentativna svojstva, odnosno, glukozu razlažu i u aerobnim, i u anaerobnim uslovima (Tabela 7). Ovakvi rezultati ukazuju na pripadnost sojeva rodu *Pectobacterium*.

5.7.2 Sekvenciona analiza 16S rRNK gena sojeva roda *Pectobacterium*

Diferencijacija do nivoa podvrste roda *Pectobacterium* na osnovu biohemijsko-fizioloških testova nije pouzdana i precizna. Stoga je za analizu ova tri soja primenjena sekvenciona analiza 16S rRNK gena. Rezultati analize su pokazali da sojevi KFB 392, KFB 394 i KFB 395 ispoljavaju visok stepen sličnosti (99%), sa sojevima *P. c.* subsp. *brasiliense* izolovanim iz krastavca, paprike i kupusa u Kini (GenBank pristupni brojevi CP020350, KX377597, KY021040), i krompira u Japanu (GenBank pristupni broj LC146476).

Tabela 6. Rezultati biohemijsko-fizioloških testova sojeva *A. citrulli*

Šifra soja	Naziv testa													
	Reakcija po Gramu	Fluorescentnost soja	Razvoj pri 41 °C	L	O	P	A	T	Stvaranje kiseline iz			Redukcija nitrata	O/F	
									Aktivnost katalaze	Arabinoze	Saharoze			Sorbitola
KFB 340	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	(0)
KFB 341	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	(0)
KFB 342	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	(0)
KFB 343	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	(0)
KFB 344	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	(0)
KFB 345	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	(0)
KFB 346	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	(0)
KFB 347	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	(0)
KFB 348	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	(0)
KFB 349	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	(0)
KFB 350	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	(0)
KFB 351	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	(0)
KFB 352	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	(0)
KFB 353	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	(0)
KFB 354	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	(0)
KFB 355	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	(0)
KFB 356	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	(0)
KFB 357	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	(0)
KFB 358	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	(0)
KFB 359	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	(0)
KFB 360	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	(0)
KFB 361	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	(0)
KFB 362	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	(0)
KFB 363	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	(0)
KFB 365	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	(0)
KFB 366	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	(0)
KFB 367	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	(0)
KFB 368	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	(0)
KFB 369	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	(0)
KFB 370	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	(0)
KFB 371	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	(0)
KFB 372	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	(0)
<i>A. citrulli</i> (KFB 0250)	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	(0)

Tabela 7. Rezultati biohemijsko-fizioloških testova sojeva *P. s. pv. syringae* i *P. viridiflava*

Šifra soja	Naziv testa														Redukcija nitrata	O/F	INA
	Reakcija po Gramu	Fluorescentnost soja	Razvoj pri 41 °C	L	O	P	A	T	Aktivnost katalaze	Stvaranje kiseline iz							
										Arabinoze	Saharoze	Manitola	Sorbitola	Inozitola			
KFB 373	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	O	-
KFB 374	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	O	-
KFB 375	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	O	+
KFB 376	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	O	+
KFB 377	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	O	+
KFB 378	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	O	+
KFB 379	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	O	-
KFB 380	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	O	+
KFB 381	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	O	+
KFB 382	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	O	+
KFB 383	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	O	+
KFB 384	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	O	+
KFB 385	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	O	+
KFB 386	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	O	+
KFB 387	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	O	+
KFB 390	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	O	-
KFB 393	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	O	+
KFB 396	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	O	+
KFB 397	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	O	+
KFB 398	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	O	+
KFB 399	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	O	+
KFB 400	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	O	+
KFB 402	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	O	+
KFB 403	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	O	+
KFB 404	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	O	+
KFB 405	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	O	+
<i>P. s. pv. syringae</i> , KFB 0103	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	O	+
KFB 389	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	O	+
KFB 401	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	O	+
<i>P. viridiflava</i> , KFB 012	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	O	+

Tabela 8. Rezultati biohemijsko-fizioloških testova *P. c. subsp. brasiliense*

Šifra soja	Naziv testa												
	Reakcija po Gramu	Fluorescentnost soja	Razvoj pri 41°C	L	O	P	A	T	Stvaranje kiseline iz			Redukcija nitrata	O/F
									Saharoze	Sorbitola	Inozitola		
KFB 392	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	O/F
KFB 394	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	O/F
KFB 395	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	O/F
<i>P. c. subsp. carotovorum</i> , KFB 85	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	O/F

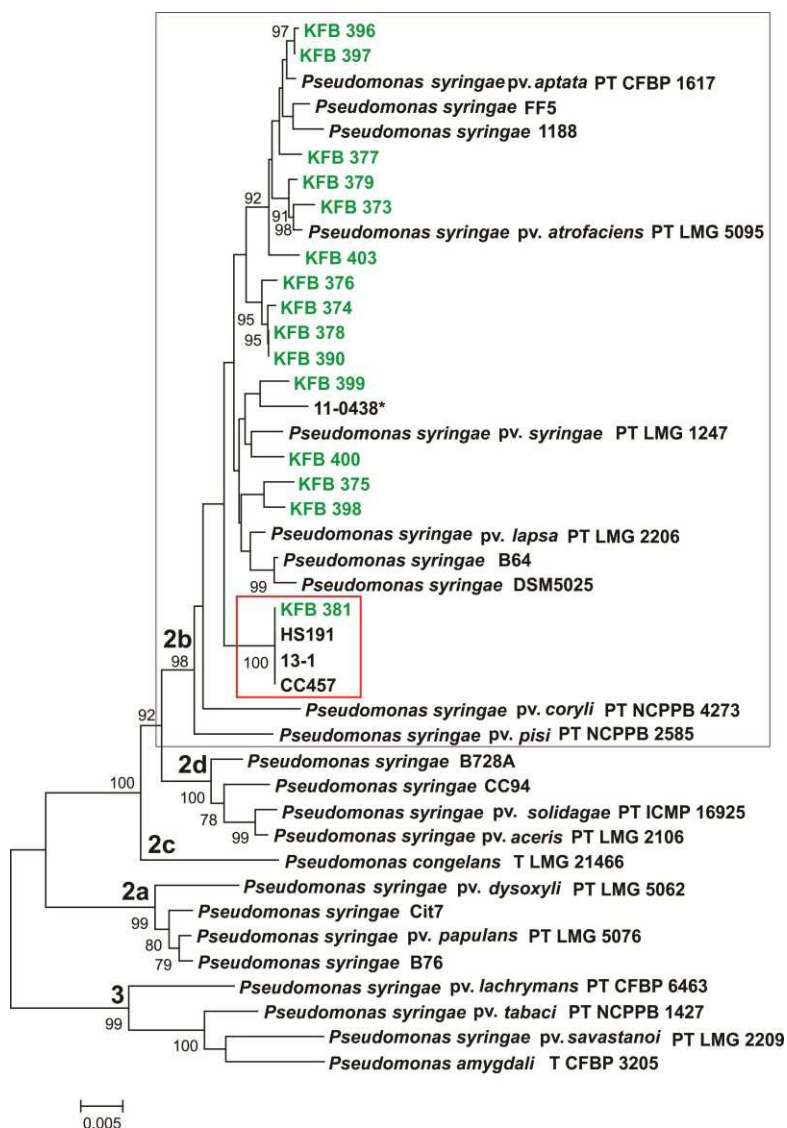
5.7.3 Ekstrakcija DNK

Ekstrakcija DNK bakterija izvedena je na četiri načina. U slučaju da kvalitet izolovane DNK nije bio zadovoljavajući, postupak ekstrakcije je ponavljan. Sve primenjene metode su se pokazale efikasnim za dobijanje kvalitetne DNK.

5.7.3.1 MLSA analiza

Za sojeve kod kojih je umnožen *syfB* gen odgovoran za sintezu siringomicina, urađena je analiza multilokusnih sekvenci. Naime, umnoženi su unutrašnji fragmenti 4 konstitutivna gena: *gapA*, *gltA*, *gyrB* i *rpoD*. Na osnovu BOX-PCR profila, odabrano je ukupno 15 reprezentativnih sojeva za sekvenciranje. Sirove sekvence su obrađene upotrebom softverskog paketa MEGA 6 (Tamura et al., 2011). One su potom upoređene sa sekvencama dostupnim u NCBI i PAMBD bazi, korišćenjem BLASTn algoritma (Altschul et al., 1997). Filogenetsko stablo konstruisano je primenom "neighbor-joining" (NJ) metode (Saitou i Nei, 1987), sa genetičkom udaljenošću izračunatom prema Kimura-2 modelu. Statistička značajnost testirana je "bootstrap" analizom sa 1000 ponavljanja (Slika 15). Na stablu su prikazane bootstrap vrednosti veće od 75%. Osim tipskih i patotipskih sojeva roda *Pseudomonas*, u analizu su uključeni i sojevi poreklom iz biljaka porodice Cucurbitaceae sa simptomima lisne pegavosti, izolovani u Floridi i Džordžiji od strane kolega sa Univerziteta Florida. Dobijeni rezultati su pokazali da svi sojevi izolovani u Srbiji pripadaju genomskoj vrsti 1, *P. s. sensu stricto*, u okviru iste filogenetske grupe 2b. Uočljivo je da se sojevi KFB 396 i KFB 397, poreklom iz lubenice, granaju iz soja *P. s. pv. aptata*. „Bootstrap“ vrednost za 1000 ponavljanja je izuzetno niska, stoga ne možemo sa sigurnošću reći da ovi sojevi pripadaju istoj vrsti. Osim toga, lubenica nije tipičan domaćin ovog patogena. Sojevi KFB 379 i KFB 373, izolovani iz dinje i lubenice, ispoljili su visok prag sličnosti sa sojem *P. s. pv. atrofaciens*. Međutim, detaljna izučavanja ove i vrste *P. s. pv. syringae*, pokazuju da među njima postoji dosta sličnosti u pogledu biohemijsko-fizioloških i patogenih osobina, stoga postoji pretpostavka da su možda u pitanju sinonimi, odnosno jedna vrsta (Jacobellis et al., 1997). Zanimljivost predstavlja činjenica da su svi sojevi poreklom iz Srbije grupisani u istoj filogenetskoj grupi, što nam govori o relativno

niskom stepenu diverziteta među sojevima. Posebnu pažnju je privukao soj KFB 381, koji je na osnovu MLSA analize, ispoljio 100% identičnost sa sojevima *P. s. pv. syringae* izolovanim iz tikava na Floridi (13-1), u Francuskoj (CC457) i u Australiji (HS191). Na osnovu izgleda filogenetskog stabla zaključujemo da je vrsta *P. s. pv. lachrymans* dosta udaljena od sojeva izolovanih u okviru ovog istraživanja. Naime, ona pripada genomskoj vrsti 2, filogrupi 3, čiji su sojevi upotrebljeni za ukorenjivanje stabla (Slika 15).



Slika 10. Dendrogram konstruisan na osnovu MLSA sekvenci korišćenjem NJ metode, sa genetičkom udaljenošću izračunatom prema Kimura-2 modelu. Uz čvorišta su naznačene "bootstrap" vrednosti (1000 ponavljanja) čija je vrednost iznad 75%. Dužina grana odgovara stopi supstitucija baznih parova. Sojevi proučavani u ovom radu obeleženi su zelenom bojom.

5.7.3.2 Sekvenciranje genoma bakterije, sklapanje i anotacija

S obzirom da je soj KFB 381 na osnovu MLSA analize ispoljio visok stepen identičnosti sa sojevima *P. s. pv. syringae*, izolovanim u Americi, Francuskoj i Australiji, odabran je za sekvenciranje celog genoma. Rezultati analize pokazali su visok stepen nukleotidne sličnosti (99,96-99,99%) sa sojevima poreklom iz Amerike, što ukazuje na moguće širenje patogena putem kontaminiranog semena.

5.7.3.3 Real-time PCR detekcija patogena u semenu lubenice

Otkrivanje brzih, efikasnih i pouzdanih metoda detekcije patogena, koje pritom ne iziskuju velika materijalna sredstva, već dugo vremena predstavlja pravi izazov. Posebno složena jeste detekcija bakterija u semenu biljaka. S obzirom da se većina fitopatogenih bakterija prenosi i održava semenom, provera zdravstvene ispravnosti semenskog materijala predstavlja prvi i ključni korak u kontroli ovih patogena. Iz tog razloga, u upotrebu u Laboratoriji za fitobakteriologiju Poljoprivrednog fakulteta u Beogradu uvedena je metoda detekcije patogena u semenu lubenice primenom real-time PCR reakcije. Analiza je izvedena prema metodi koju su opisali Cho i saradnici (2015), sa malim modifikacijama u pogledu programa reakcije. Testirana su dva uzorka semena lubenice, jedan uzorak je sadržao zdravstveno ispravno seme, dok je drugi uzorak veštački kontaminiran bakterijom *A. citrulli*. Real-time PCR reakcijom, detektovano je umnožavanje specifičnog fragmenta u pozitivnom uzorku, kao i u pozitivnoj kontroli. Prisutnost patogena evidentirana je pojavom amplifikacione krive sa eksponencijalnim rastom.

5.8 Spektar domaćina

S obzirom da se sojevi *A. citrulli*, izolovani iz obolelih plodova, svrstavaju u grupu značajnih patogena lubenice širom sveta, proučen je spektar domaćina među vrstama familije Cucurbitaceae koje se u nas najviše gaje. Tako su testom bile obuhvaćene sledeće vrste: krastavac (Sunčani potok), dinja (Sezam), tikva (Beogradska) i muskatna tikva (Nektar). Ukupno je testirano 32 soja bakterija. Samo dva soja (KFB 359 i KFB 363) kao i

u slučaju testa patogenosti na biljci domaćinu, nisu prouzrokovali pojavu simptoma. Iz ugla virulentnosti, odnosno agresivnosti proučavanih sojeva, zaključeno je da su sojevi na ujednačenom nivou, izuzev dva pomenuta. Biljke krastavca su ispoljile visoku osetljivost. Na svakoj testiranoj biljci, osim onih koje su inokulisane sojevima KFB 359, KFB 363 i sterilnom destilovanom vodom, došlo je do intenzivnog razvoja simptoma oboljenja, u vidu pega vodenastog izgleda i nepravilnog oblika sa naličja lista. Rezultati testa patogenosti na dinji, bili su slični rezultatima na lubenici i krastavcu, dok su bundeva i tikvica bile otpornije. Naime, postojala je bar jedna biljka na kojoj su simptomi bili razvijeni u manjoj meri.

Za sojeve koji fenotipski spadaju u rod *Pseudomonas* (Tabela 7), proverena je patogenost sojeva na biljkama lubenice i tikve. Ovi sojevi nisu ispoljili izraženu virulentnost. Na većem broju biljaka nije došlo do razvoja simptoma, dok je na nekim detektovana blaga pojava promena u vidu pega vodenastog izgleda, koje su mahom zahvatale obod lista i bile su ograničenog porasta (Slika 16). Simptomi prouzrokovani kontrolnim sojem *P. s. pv. syringae* (KFB 0103), ispoljeni su intenzivnijom pojavom pega vodenastog izgleda, naročito po obodu lista.



Slika 16. Test patogenosti sa sojevima roda *Pseudomonas*. Reprodukovani simptomi u vidu tamnijih pega nepravilnog oblika su slabog intenziteta, uglavnom po obodu lista. (Foto: N. Zlatković)

5.9 Osetljivost sortimenta lubenice prema *A. citrulli*

S obzirom da kao prouzrokovatelj bakteriozne mrljivosti plodova lubenice, prouzrokuje ogromne gubitke u proizvodnji širom sveta, a da nije do sada opisan u nas, od svih sojeva izolovanih u ovom radu, sojevi *A. citrulli* imaju najveći značaj (Tabela 5). U cilju provjere otpornosti sortimenta lubenice, inokulisane su sorte koje se u našoj zemlji najviše gaje: Rosa, Crimson Sweet, Top Gun, Talisman, Bonta i Delta. Na biljkama testiranih sorti, odnosno na kotiledonima inokulisanih biljaka, uočena je pojava simptoma karakterističnih za oboljenje prouzrokovano vrstom *A. citrulli*, kao i na biljkama inokulisanim kontrolnim sojem KFB 0250. Do razvoja simptoma nije došlo na biljkama koje su korišćene kao negativna kontrola. Stoga možemo reći da nijedna testirana sorta nije ispoljila otpornost prema patogenu *A. citrulli*.

5.10 Osetljivost sojeva prema baktericidima

Uočene su razlike među sojevima u pogledu osetljivosti na različita hemijska jedinjenja. U podlozi sa 25 ppm streptomycin sulfata, uočen je slab razvoj pojedinih sojeva *A. citrulli*. Pri koncentraciji od 50 ppm streptomycin-sulfata, većina sojeva se ne razvija na podlozi. Ipak, uočen je slab razvoj pojedinačnih kolonija sojeva KFB 347, KFB 348, KFB 352, KFB 359 i KFB 362, kao i normalan razvoj kontrolnog soja KFB 062. Na podlozi sa 100 ppm bakar-hidroksida, došlo je do razvoja oko polovine proučavanih sojeva. Pri koncentraciji od 200 ppm, samo su sojevi KFB 368 i KFB 393 imali slab razvoj. Zanimljivo je da na podlogama sa koncentracijom 200 ppm bakar-oksihlorida nije došlo do razvoja nijednog bakterijskog soja, uključujući i pozitivnu kontrolu, KFB 062. Razlog tome može biti činjenica da je za izvođenje testa korišćena zadata koncentracija čiste aktivne materije, a ne komercijalnog preparata koji sadrži i primese ili da je soj usled dugogodišnjeg čuvanja i presejavanja izgubio neka svojstva, među kojima je i rezistentnost na pomenutu koncentraciju jedinjenja (Tabela 9, Slika 17).

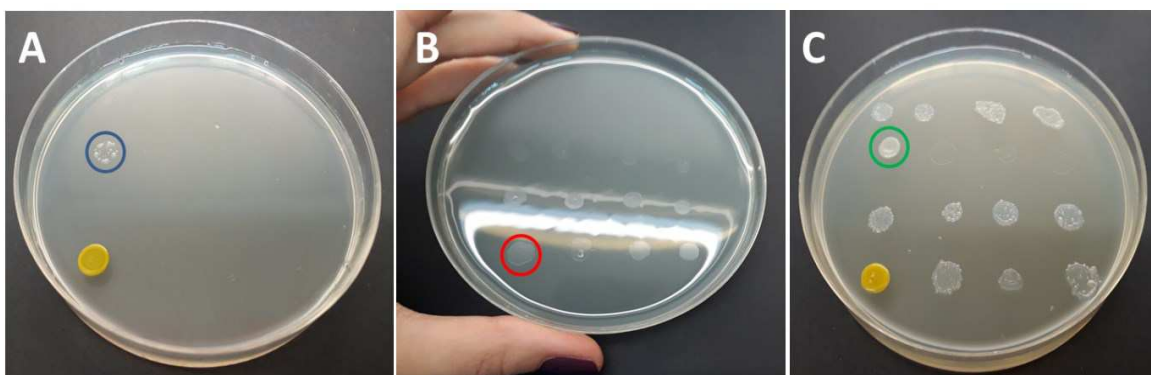
Tabela 9. Osetljivost izolovanih sojeva prema baktericidima.

Šifra soja	Streptomicin sulfat		Kasugamicin		Cu(OH) ₂		Cu ₂ (OH) ₃ Cl		SPA (neg. kontr.)
	25 ppm	50 ppm	50 ppm	100 ppm	100 ppm	200 ppm	100 ppm	200 ppm	/
KFB 340	(+)	-	+	+	-	-	-	-	+
KFB 341	(+)	-	+	+	-	-	-	-	+
KFB 342	-	-	+	+	-	-	-	-	+
KFB 343	-	-	+	+	-	-	-	-	+
KFB 344	-	-	+	+	-	-	-	-	+
KFB 345	-	-	+	+	-	-	-	-	+
KFB 346	(+)	-	+	+	-	-	-	-	+
KFB 347	(+)	(+)	+	+	-	-	-	-	+
KFB 348	(+)	(+)	+	+	+	-	-	-	+
KFB 349	-	-	+	+	-	-	-	-	+
KFB 350	-	-	+	+	-	-	-	-	+
KFB 351	-	-	+	+	-	-	-	-	+
KFB 352	(+)	(+)	+	+	-	-	-	-	+
KFB 353	-	-	+	+	-	-	-	-	+
KFB 354	(+)	-	+	+	-	-	-	-	+
KFB 355	-	-	+	+	-	-	-	-	+
KFB 356	(+)	-	+	+	-	-	-	-	+
KFB 357	-	-	+	+	-	-	-	-	+
KFB 358	-	-	+	+	-	-	-	-	+
KFB 359	(+)	(+)	+	+	-	-	-	-	+
KFB 360	(+)	-	+	+	-	-	-	-	+
KFB 361	-	-	+	+	-	-	-	-	+
KFB 362	(+)	(+)	+	+	-	-	-	-	+
KFB 363	(+)	-	+	+	-	-	-	-	+
KFB 365	(+)	-	+	+	-	-	-	-	+
KFB 366	-	-	+	+	-	-	-	-	+
KFB 367	(+)	-	+	+	-	-	-	-	+
KFB 368	-	-	+	+	+	(+)	+	-	+
KFB 369	-	-	+	+	-	-	-	-	+
KFB 370	(+)	-	+	+	-	-	-	-	+
KFB 371	-	-	+	+	-	-	-	-	+
KFB 372	-	-	+	+	-	-	-	-	+
KFB 373	-	-	+	+	-	-	-	-	+
KFB 374	-	-	+	+	+	-	-	-	+

(Nastavak na sledećoj strani)

Šifra soja	Streptomicin sulfat		Kasugamicin		Cu(OH) ₂		Cu ₂ (OH) ₃ Cl		SPA (neg. kontr.)
	25 ppm	50 ppm	50 ppm	100 ppm	100 ppm	200 ppm	100 ppm	200 ppm	/
KFB 375	-	-	+	+	+	-	+	-	+
KFB 376	-	-	+	+	+	-	+	-	+
KFB 377	-	-	+	+	+	-	-	-	+
KFB 378	-	-	+	+	+	-	+	-	+
KFB 379	-	-	+	+	+	-	-	-	+
KFB 380	-	-	+	+	+	-	+	-	+
KFB 381	-	-	+	+	+	-	-	-	+
KFB 382	-	-	+	+	-	-	-	-	+
KFB 383	-	-	+	+	+	-	+	-	+
KFB 384	-	-	+	+	+	-	-	-	+
KFB 385	-	-	+	+	+	-	+	-	+
KFB 386	-	-	+	+	+	-	-	-	+
KFB 387	-	-	+	+	-	-	-	-	+
KFB 389	-	-	+	+	+	-	+	-	+
KFB 390	-	-	+	+	+	-	-	-	+
KFB 393	-	-	+	+	+	(+)	-	-	+
KFB 396	-	-	+	+	(+)	-	-	-	+
KFB 397	-	-	+	+	+	-	-	-	+
KFB 398	-	-	+	+	+	-	-	-	+
KFB 399	-	-	+	+	+	-	+	-	+
KFB 400	-	-	+	+	+	-	-	-	+
KFB 401	-	-	+	+	-	-	-	-	+
KFB 402	-	-	+	+	+	-	+	-	+
KFB 403	-	-	+	+	+	-	+	-	+
KFB 404	-	-	+	+	+	-	+	-	+
KFB 405	-	-	+	+	+	-	+	-	+
KFB 392	-	-	+	+	+	-	-	-	+
KFB 394	-	-	+	+	+	-	-	-	+
KFB 395	-	-	+	+	+	-	-	-	+
KFB 062	+	+	+	+	+	+	+	-	+

Legenda: +, normalan razvoj bakterija na podlozi; (+), slab, usporen razvoj na podlozi; -, bakterija se ne razvija na podlozi. Preparati: Cuprozin 35W; aktivna materija: bakar oksihlorid - Cu₂(OH)₃Cl. Sastav: 350+/- 17,5 g a.m/kg. Koncentracija primene 0,35% (1225ppm). U eksperimentu je korišćena koncentracija aktivne supstance od 100 i 200 ppm. Funguran OH (Spiess-Urania); aktivna metrija: bakar hidroksid- Cu(OH)₂, Sastav: 500 g/kg. Koncentracija primene: 0,1-0,4% (1076 ppm). U eksperimentu je korišćena koncentracija aktivne supstance od 100 i 200 ppm.



Slika 17. Razvoj proučavanih sojeva na podlozi sa baktericidima. A) $\text{Cu}(\text{OH})_2$ (Funguran OH; Spiess-Urania) - 200 ppm; B) $\text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}$ (Cuprozin 35-WP, Galenika Fitofarmacija) - 200 ppm C) $\text{Cu}(\text{OH})_2$ (Funguran OH; Spiess-Urania) - 100 ppm. Kružnicama su obeleženi: razvoj slabijeg intenziteta (plava); izostanak razvoja kolonija (crvena) i normalan porast kolonija (zeleni).

5.11 Specifičnost bakteriofaga prema izolovanim sojevima *A. citrulli*

U okviru ovog oglada proučena je specifičnost 12 sojeva faga prema izolovanim bakterijama roda *Acidovorax*. Rezultati testa pokazuju da su dva soja bakterija *A. citrulli* (KFB 354 i KFB 355), od 32 testiranih, rezistentna na sve testirane sojeve faga (Tabela 10). Ostali bakterijski sojevi su ispoljili osetljivost prema proučavanim fagima.

Tabela 10. Specifičnost 12 sojeva faga prema izolovanim sojevima *A. citrulli*.

Šifra soja bakterija	Sojevi faga											
	ϕAc 1	ϕAc 2	ϕAc 3	ϕAc 4	ϕAc 5	ϕAc 6	ϕAc 7	ϕAc 8	ϕAc 9	ϕAc 10	ϕAc 11	ϕAc 12
KFB 340	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KFB 341	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KFB 342	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KFB 343	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KFB 344	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KFB 345	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KFB 346	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KFB 347	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KFB 348	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KFB 349	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KFB 350	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KFB 351	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KFB 352	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

(Nastavak na sledećoj strani)

Šifra soja bakterija	Sojevi faga											
	φAc 1	φAc 2	φAc 3	φAc 4	φAc 5	φAc 6	φAc 7	φAc 8	φAc 9	φAc 10	φAc 11	φAc 12
KFB 353	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KFB 354	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KFB 355	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KFB 356	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KFB 357	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KFB 358	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KFB 359	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KFB 360	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KFB 361	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KFB 362	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KFB 363	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KFB 365	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KFB 366	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KFB 367	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KFB 368	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KFB 369	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KFB 370	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KFB 371	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KFB 372	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

6. DISKUSIJA

Biljke familije Cucurbitaceae se dugi niz godina gaje širom sveta. U pojedinim krajevima naše zemlje, krastavac, lubenica i dinja predstavljaju osnovu biljne proizvodnje i glavni izvor prihoda mnogih porodica. Pored upotrebe u svežem stanju, pomenute vrste imaju široku primenu u industriji. U današnje vreme, sve više se potencira blagotvorno svojstvo bundeve, krastavca, lubenice, pa tako postoji čitav niz farmaceutskih proizvoda zasnovanih na ekstrakciji lekovitih jedinjenja, najčešće iz semena ovih biljaka.

Osim Kine, koja predstavlja lidera u pogledu proizvodnje lubenice, krastavca i dinje, razvijenu proizvodnju imaju i Turska, Iran, Brazil i Amerika. U proizvodnji krastavca prednjače Rusija i Španija, dok se dinja dosta proizvodi i u Egiptu.

Visok prinos i zaradu često umanjuju različiti biotski i abiotski faktori. Fitopatogene bakterije zauzimaju važno mesto među prouzrokovateljima oboljenja biljaka familije Cucurbitaceae. Pri uslovima povoljnim za nastanak infekcije, bakterioze mogu dovesti do ozbiljnih gubitaka u proizvodnji.

U ovom radu predstavljene su bakterioze biljaka familije Cucurbitaceae, uočene na teritoriji naše zemlje u periodu od 2013-2016. godine. Kako bi se utvrdila prisutnost bakterioznih oboljenja biljaka familije Cucurbitaceae na području Srbije, iz prikupljenog simptomatičnog biljnog materijala izvršena je izolacija i identifikacija patogena. Uzorci su prikupljeni sa 17 različitih lokaliteta. Uprkos uočenim simptomima, iz biljnog materijala uzorkovanog sa 7 lokaliteta, nisu izolovane fitopatogene bakterije, što ukazuje da simptomi nisu pouzdan dijagnostički pokazatelj. U okviru ovog istraživanja, ukupno je proučeno 63 soja fitopatogenih bakterija. Na osnovu patogenih, morfoloških, biohemijsko-fizioloških i molekularnih odlika, proučavani sojevi svrstani su u tri roda: *Acidovorax*, *Pseudomonas* i *Pectobacterium* (Tabele 5, 6 i 7).

Prvi korak u diferencijaciji patogenih od nepatogenih izolovanih sojeva, bila je provera sposobnosti da prouzrokuju hipersenzitivnu reakciju biljaka duvana. Od ukupno 63 proučena soja, 61 je prouzrokovao hipersenzitivnu reakciju lista duvana sorte Samsun. Izuzetak su sojevi KFB 359 i KFB 363. Isti sojevi nisu prouzrokovali ni pojavu karakterističnih simptoma na inokulisanim biljkama lubenice, za razliku od ostalih

proučavanih sojeva. Ovi sojevi su izolovani iz obolelih plodova lubenice, čiji su simptomi nedvosmisleno upućivali na bakterijsku mrljavost plodova prouzrokovanu bakterijom *A. citrulli*. U literaturi postoje podaci da većina sojeva *A. citrulli* prouzrokuje hipersenzitivnu reakciju, ali ima i onih koji je ne indukuju (Shaad et al., 2001), kao i da postoje nepatogeni sojevi ove vrste, koji svoju primenu sve češće nalaze u biološkoj kontroli virulentnih sojeva (Jonson et al., 2011). Takođe, prema ostalim biohemijsko-fiziološkim i molekularnim osobinama, ova dva soja su odgovarala vrsti *A. citrulli*. U cilju potvrde patogenosti preostalih sojeva, iz inokulisanih test biljaka, izvršena je reizolacija bakterija i njihova ponovna identifikacija korišćenjem PCR metode, čime su ispunjeni Kohovi postulati.

Nakon provere patogenosti, identifikacija proučavanih sojeva nastavljena je proučavanjem morfoloških, odgajivačkih i biohemijsko-fizioloških odlika. Prva diferencijacija sojeva izvršena je na osnovu izgleda kolonija na podlozi HA, King-ovoj podlozi B i YDC. Poređenjem njihovih odgajivačkih odlika na navedenim podlogama, kao i nekih diferencijalnih odlika, izvršena je podela sojeva na tri grupe, čija je pripadnost rodovima fitopatogenih bakterija – *Acidovorax*, *Pseudomonas* i *Pectobacterium* potvrđena rezultatima biohemijsko-fizioloških testova.

Tako su pored zajedničkih karakteristika sa drugim sojevima, kao što su negativno bojenje po Gramu i aktivnost katalaze, nefluorescentni, oksidaza pozitivni, nepektolitički sojevi, koji se razvijaju pri 41°C, svrstani u rod *Acidovorax*. Poređenjem preostalih proučavanih biohemijsko-fizioloških odlika, kao što je korišćenje različitih izvora ugljenika, sa odlikama kontrolnog soja, potvrđena pripadnost vrsti *A. citrulli* (Tabela 6).

Iako je proučavanje morfoloških, odgajivačkih i biohemijsko-fizioloških karakteristika osnova fitobakteriologije, ove metode često iziskuju veliki utrošak vremena i materijala. Međutim, primenom molekularnih metoda, karakterizacijom delova ili celog genoma, dobijamo potpuniju i pouzdaniju sliku prilikom identifikacije i karakterizacije patogena. Zbog svega navedenog, u identifikaciji patogena proučavanih u okviru ove doktorske disertacije, primenjeno je nekoliko molekularnih metoda.

U cilju molekularne identifikacije sojeva izolovanih iz plodova lubenice i prethodno grupisanih u rod *Acidovorax* na osnovu osnovnih bakterioloških odlika, primenjen je postupak lančanog umnožavanja fragmenta DNK korišćenjem para prajmera BX-L1/BX-S-

R2 (Bahar et al., 2008), dizajniranih na osnovu specifičnog BOX-PCR fragmenta vrste *A. citrulli*. Obzirom da je kod svih sojeva ove grupe došlo do umnožavanja fragmenta veličine 279 bp, smatramo da je uz rezultate prethodnih testova ovo još jedan pouzdan pokazatelj pripadnosti ovih sojeva navedenoj vrsti.

Ribozomalne RNA predstavljaju neophodne elemente za postojanje i funkcionisanje bakterijske ćelije. Tokom evolucije nisu podložne brzim promenama, stoga analiza genskih sekvenci rRNA operona predstavlja standardnu metodu za identifikaciju bakterija. Proučavanje 16S rRNK gena pokazalo se kao pogodan metod za identifikaciju nekoliko bakterijskih sojeva izolovanih u ovom radu. Naime, upotrebom univerzalnih prajmera fD1/rP2 (Weisburg et al., 1991), umnožena je sekvenca ribozomalnog gena dužine oko 1450 bp za sojeve KFB 343 i KFB 344. Upoređivanjem sekvenci 16S rRNK gena proučavanih sojeva (GenBank pristupni brojevi KP410333 i KP410334) sa sekvencama iz NCBI baze, utvrđen je visok stepen identičnosti (100%) sa sojevima *A. citrulli*, poreklom iz Kine, Amerike i Tajlanda.

U cilju proučavanja diverziteta u populaciji bakterija, odnosno klonalnih populacija unutar vrste, primenjena je Rep-PCR metoda. REP-PCR i ERIC-PCR profili izolovanih sojeva *A. citrulli* bili su identični, dok je u BOX-PCR profilu soja KFB 358, umnožen jedan fragment više u odnosu na ostale proučavane sojeve. Osim odstupanja u pogledu hipersenzitivnosti i patogenosti na biljci domaćinu kod sojeva KFB 359 i KFB 363, i BOX-PCR profilu soja KFB 358, nisu uočene druge razlike među 32 izolovana soja *A. citrulli*. Stoga, možemo reći da sojevi *A. citrulli* izolovani u periodu od 2014-2016. godine u Srbiji, pripadaju populaciji zajedničkog porekla, dospelaj najverovatnije uvozom zaraženog semena.

Za diferencijaciju sojeva u rod *Pseudomonas* korišćeno je više kriterijuma, s obzirom da je uočena heterogenost karakteristika u pojedinim diferencijalnim testovima. Osim morfološke sličnosti kolonija na HA podlozi sa kolonijama kontrolnog soja, levan pozitivni sojevi, i oni koji stvaraju zeleni fluorescentni pigment, preliminarno su smešteni u rod *Pseudomonas*. Od ukupno 63 izolovana soja, 28 je posedovalo karakteristike roda *Pseudomonas*. U LOPAT testovima 26 proučavanih sojeva je ispoljilo odlike koje odgovaraju grupi Ia roda *Pseudomonas*, u kojoj se nalazi i kontrolni soj *P. s. pv. syringae*

(KFB 0103). Svi su oksidaza negativni, nisu prouzrokovali trulež kriški krompira, niti su ispoljili pozitivnu reakciju metabolizma arginina u anaerobnim uslovima. Sedam sojeva (KFB 380 - KFB 386) nije ispoljilo sposobnost fluorescencije na Kingovoj podlozi B (Tabela 5). U ranijim proučavanjima prouzrokovača lisne pegavosti, zabeležena je pojava nefluorescentnih sojeva vrste *P. s. pv. syringae* (Newberry et al., 2017). Četiri soja (KFB 373, KFB 374, KFB 379 i KFB 390) nisu ispoljila sposobnost stvaranja čestica leda pri temperaturi oko -4 °C (Tabela 7). Ovakav rezultat nije tipičan za sojeve *P. s. pv. syringae*, ali je takođe zabeležen u prethodnim istraživanjima (Newberry et al., 2017). Dva soja (KFB 389 i KFB 401) koja nisu obrazovala levan pozitivne kolonije na NAS podlozi, smeštena su u IIa grupu roda *Pseudomonas*.

Jedna od karakteristika vrste *P. s. pv. syringae* je sposobnost sinteze siringomicina. Stoga je primenom PCR reakcije izvršena detekcija gena za sintezu siringomicina. Primenom specifičnih prajmera Syr B1/B2 u reakciji lančanog umnožavanja fragmenata DNK (Sorensen et al., 1998), umnožen je fragment veličine 752 bp kod 26 proučavanih sojeva, prethodno smeštenih u Ia grupu roda *Pseudomonas*. Kod sojeva KFB 389 i KFB 401 u PCR reakciji nije došlo do umnožavanja ovog specifičnog fragmenta, stoga smo proučili ribozomalnu DNK ova dva soja. Poređenjem dobijenih i obrađenih sekvenci sa sekvencama u NCBI bazi, utvrđeno je da sojevi KFB 389 i KFB 401 pripadaju vrsti *P. viridiflava*, s obzirom da je stepen identičnosti proučavanih sojeva sa sojevima u bazi podataka (GenBank pristupni brojevi KY460680, LT855380, KY050588, KU686699) iznosio 99%. Takođe, u literaturi postoje navodi da pojedini sojevi *P. viridiflava* ne prouzrokuju trulež kriški krompira, ili je za nastanak reakcije potrebno više vremena (Arsenijević, 1997), što je u skladu sa rezultatima dobijenim u okviru ovog istraživanja.

U proučavanju *Pseudomonas* vrsta, najveći prag diskriminacije imaju BOX prajmeri (dr Jeffrey Jones, lična komunikacija). Na osnovu BOX-PCR profila, odabrani su sojevi za dalje proučavanje. Ukupno je odabrano 15 sojeva koji su na osnovu rezultata prethodno izvedenih testova, smešteni u Ia grupu roda *Pseudomonas*. U istom periodu kada su proučavani sojevi iz Srbije, na teritoriji saveznih država Floride i Džordžije (SAD) istraživači sa Univerziteta Florida, prikupili su veliki broj uzoraka biljnog materijala familije Cucurbitaceae sa izraženim simptomima lisne pegavosti. S obzirom na uspešnu

naučnu saradnju sa Laboratorijom za fitobakteriologiju Univerziteta Florida, izvršena je uporedna analiza izolovanih sojeva bakterija. Posebna pažnja posvećena je genetičkom diverzitetu proučavanih sojeva. S obzirom da su konstitutivni geni podložniji promenama tokom evolucije u odnosu na 16S rRNK region, izvedena je multilokusna sekvenciona analiza umnožavanjem unutrašnjih fragmenata 4 „housekeeping“ gena: *gapA*, *gltA*, *gyrB* i *rpoD*. U analizu je uključeno 15 sojeva izolovanih u okviru našeg istraživanja (KFB 373-379, KFB 381, KFB 390, KFB 396-400 i KFB 403) i 20 sojeva izolovanih na teritoriji Floride i Džordžije, uglavnom iz biljaka lubenice i bundeve. Poređenjem dobijenih sekvenci sa postojećim sekvencama u NCBI i PAMBD bazi podataka, utvrđeno je da svi proučavani sojevi poreklom iz Srbije pripadaju genomskoj vrsti 1, *P. s. sensu stricto*, u okviru iste filogenetske grupe 2b, dok se vrsta *P. s. pv. lachrymans* nalazi u genomskoj vrsti 2, u okviru filogrupe 3. Pojedini sojevi grupisali su se blizu nekih drugih patogenih varijeteta vrste *P. syringae*, kao što su *P. s. pv. aptata* i *P. s. pv. atrofaciens*. U slučaju grananja iz soja *P. s. pv. aptata*, uočena je veoma niska „bootstrap“ vrednost od oko 40%, stoga se ovaj rezultat ne može smatrati pouzdanim i mora se uzeti sa rezervom. Prethodno sprovedena istraživanja ukazuju na to da na osnovu biohemijsko-fizioloških i patogenih karakteristika, varijeteti *syringae* i *atrofaciens* možda predstavljaju istu vrstu (Iacobellis et al, 1997). Takođe, u okviru genomske vrste 1, 2b filogrupe, nalazi se i referentni soj *P. s. pv. syringae*, stoga, na osnovu sveobuhvatnih rezultata, domaćina iz kojih su bakterije izolovane, možemo reći da i sojevi poreklom iz Srbije najverovatnije pripadaju ovom patogenom varijetetu. Soj KFB 381 naročito je privukao našu pažnju. Naime, na osnovu MLSA analize, grupisao se zajedno sa sojevima izolovanim u Americi sa 100% „bootstrap“ vrednosti. Kako bi se precizno utvrdio genetički stepen sličnosti među ovim sojevima, izvedeno je sekvenciranje čitavog genoma soja KFB 381. Dobijeni rezultati pokazali su da soj poreklom iz Srbije ima visok stepen nukleotidne sličnosti (99,96-99,99%) sa sojevima izolovanim na američkom kontinentu koji su identifikovani kao *P. syringae pv. syringae* i koji su odgovorni za pojavu simptoma pegavosti na biljkama porodice Cucurbitaceae. Ovakav rezultat potkrepljuje teorije o prenošenju patogena na velike udaljenosti zaraženim semenom (Lamichhane et al. 2015). Proučavanje genetičkog diverziteta bakterijskih sojeva od izuzetnog je značaja za razumevanje strukture populacije, utvrđivanje razlika u

populacijama jednog patogena, širenje na udaljena geografska područja, a samim tim i praćenje kretanja jednog patogena.

Na osnovu proučenih karakteristika, od 63 izolovana soja bakterija, 3 soja su smeštena u rod *Pectobacterium* (KFB 392, KFB 394 i KFB 395) (Tabela 8). Ovi sojevi su jedini ispoljili osobinu stvaranja truleži kriški krompira. Takođe, sojevi imaju oksidativno-fermentativni metabolizam glukoze i sposobnost redukcije nitrata, što su potvrde hipoteze o njihovoj pripadnosti rodu *Pectobacterium*. Rezultati 16S rRNK analize pokazali su da sojevi KFB 392, KFB 394 i KFB 395 imaju visok stepen identičnosti (99 i 100%), sa sojevima *P. c.* subsp. *brasiliense* izolovanim iz krastavca, paprike i kupusa u Kini (GenBank pristupni brojevi CP020350, KX377597, KY021040) i krompira u Japanu (GenBank pristupni broj LC146476). Prema našim saznanjima, ovo je ujedno i prvi nalaz ovog patogena na teritoriji Srbije.

Na osnovu svih odgajivačkih, morfoloških, biohemijско-fizioloških i molekularnih testova primenjenih u ovom radu, utvrđeno je da uočene simptome oboljenja na biljkama familije Cucurbitaceae sa područja Srbije prouzrokuju bakterije predstavnici rodova: *Acidovorax*, *Pseudomonas* i *Pectobacterium*. Vrsta *A. citrulli* izolovana je iz biljaka lubenice sa karakterističnim simptomima bakterijske mrljavosti. Predstavnici roda *Pseudomonas* izolovani su iz različitih biljaka familije Cucurbitaceae sa simptomima lisne pegavosti, dok je nekoliko sojeva *P. c.* subsp. *brasiliense*, po prvi put u nas, izolovano iz plodova uljane tikve i vreža lubenice sa simptomima vlažne truleži.

S obzirom na svetske literaturne podatke o ekonomskom značaju vrste *A. citrulli*, za izolovane sojeve je urađen test spektra domaćina i otpornosti sortimenta lubenice. U okviru ovog istraživanja, utvrđeno je da osim lubenice, krastavac, dinja, tikva i muskatna tikva mogu takođe biti domaćini vrste *A. citrulli*. Ovakav rezultat govori o velikoj opasnosti u pogledu epidemiologije i širenja patogena. Gubici koji bi mogli nastati pojavom infekcija i u proizvodnim zasadima srodnih vrsta, bili bi značajni. Proučavanjem spektra domaćina, utvrđeno je da su testirane sorte lubenice ispoljile visoku osetljivost, što ukazuje da među najzastupljenijim komercijalnim sortama u nas nema otpornih. Istraživanja u svetu su pokazala da su sorte lubenice svetlije kore osetljivije na prisustvo patogena, za razliku od sorti tamne kore (Hopkins et al, 1993). U okviru našeg istraživanja, utvrđeno je da od 32

soja *A. citrulli*, samo dva (KFB 359 i KFB 363), kao i u slučaju testa patogenosti na biljci domaćinu, nisu prouzrokovala pojavu simptoma. Ostali sojevi prouzrokovali su pojavu simptoma ujednačenog intenziteta, u vidu pega vodenastog izgleda i nepravilnog oblika, koje se prvo uočavaju sa naličja lista. Osim lubenice, koja je domaćin izolovanih sojeva, krastavac je ispoljio visok stepen osetljivosti, pa su se karakteristični simptomi mogli uočiti na svim test biljkama. Slični rezultati su uočeni i na dinji, dok su bundeva i tikvica bile manje osetljive.

U pogledu otpornosti sortimenta, nijedna testirana sorta lubenice nije ispoljila otpornost prema *A. citrulli*. Naime, proučavana je otpornost 6 najčešće korišćenih sorti u nas: Rosa, Crimson Sweet, Top Gun, Talisman, Bonta i Delta. Na kotiledonima svih testiranih biljaka, uočena je pojava simptoma karakterističnih za infekciju bakterijom *A. citrulli*.

Takođe, proučena je patogenost sojeva koji su identifikovani kao *P. s. pv. syringae*, na biljkama lubenice i tikve. Utvrđeno je da ovi sojevi nemaju visoko izraženu virulentnost. Na većem broju biljaka nije došlo do razvoja simptoma, dok je na nekim detektovana blaga pojava promena u vidu pega vodenastog izgleda, koje su mahom zahvatale obod lista i bile su ograničenog porasta.

Detekcija vrste *A. citrulli*, iz opravdanih razloga unela je nemir među proizvođače lubenice u Srbiji. Ovaj patogen ima karantinski status u našoj zemlji i području Evropske i mediteranske organizacije za zaštitu bilja (EPPO). Uprkos tome, njegovo prisustvo po prvi put je detektovano 2014. godine na području Srema (Obradović i sar., 2014; Popović i Ivanović, 2014). Bakteriozna mrljavost plodova lubenice predstavlja najozbiljnije oboljenje lubenice i dinje širom sveta. Sve je veći broj zemalja u kojima je prisustvo ovog patogena zabeleženo (Feng et al., 2013). Najveći problem predstavlja rana detekcija, odnosno pravovremeno uspostavljanje dijagnoze. Pošto infekcija primarno potiče iz zaraženog semena, neophodno je pouzdano utvrditi prisustvo patogena. Vizuelnim pregledom semena, teško je ili nemoguće otkriti bilo kakve promene na semenjači koje bi ukazale na zarazu, a metode molekularne detekcije *A. citrulli* u semenu su neprekidno u fazi usavršavanja. One su se pokazale kao dosta efikasne, ali cilj koji treba dosegnuti u budućnosti predstavlja povećanje praga detekcije. U slučaju „propuštanja patogena“ u semenu, prvi simptomi će se

najverovatnije pojaviti na kotiledonima odmah nakon nicanja biljaka. Pege vlažnog izgleda i nepravilnog oblika, najlakše se uočavaju sa naličja. Vizuelni pregled biljaka u velikim staklenicima, u kojim se proizvodi rasadpo nekoliko desetina hiljada biljaka, jako je otežan. Stoga se pregledom biljaka ne može sa sigurnošću utvrditi da li je patogen prisutan ili ne. Epidemiologija oboljenja je takva da proces infekcije može biti zaustavljen usled nepovoljnih uslova, ali se može nastaviti kasnije, tokom cele sezone, praktično sve do same berbe. U proizvodnji, prisustvo zaraze se najčešće primeti u fazi fiziološke zrelosti plodova lubenice i dinje, jer se tada ispoljavaju najuočljiviji i po izgledu karakteristični simptomi mrljavosti ploda, koji imaju dijagnostički značaj. Oboleli plodovi su potpuno neupotrebljivi, odnosno gube svoju komercijalnu vrednost. S obzirom da su pojedini proizvođači ukazivali na pojavu simptoma sličnih mrljavosti lubenice, pretpostavlja se da je patogen već neko vreme sporadično prisutan u našim poljima, ali je zvanično detektovan i opisan 2014. godine. Iako se u periodu od prve detekcije pa do danas bakteriozna mrljavost pojavljivala 3 uzastopne godine, ove infekcije nisu imale epidemijske razmere. Naime, bile su lokalnog karaktera i uglavnom je zaraza poticala iz jednog zaraženog lota semena. Izuzetak predstavlja 2013. godina, kada je proizvođač iz Ašanje imao veliki finansijski gubitak, s obzirom da je kompletan prinos sa nekoliko parcela bio potpuno neupotrebljiv.

U svetu, a i u nas, najrasprostranjenija vrsta među patogenima biljaka porodice Cucurbitaceae jeste *P. s. pv. lachrymans*, prouzorkovač uglaste pegavosti krastavca. Godinama unazad važno je uverenje da simptome tipa lisne pegavosti na biljkama porodice Cucurbitaceae uglavnom prouzrokuje vrsta *P. s. pv. lachrymans* (Zitter et al., 1996; Newberry et al., 2016). Smatrano je da patogeni varijetet, koji se određuje uglavnom na osnovu kruga domaćina i patogenosti, predstavlja homogenu taksonomsku jedinicu u fiziološkom i genetičkom smislu (Morris et al., 2008). Međutim, sve češće su se pojavljivali nalazi ovog patogena na biljkama koje nisu označavane kao primarni domaćini, a uočene su razlike i u pogledu virulentnosti i genetičkog diverziteta. Razvojem molekularnih metoda koje predstavljaju izuzetno efikasan i pouzdan put u istraživanjima ove vrste, utvrđeno je da su sve češće uzročnici epidemija na biljkama porodice Cucurbitaceae drugi patogeni varijeteti vrste *P. syringae*. U svetu je sprovedeno nekoliko naučnih studija kojima je dokazano da pegavost prouzrokuju i filogenetski dosta udaljeni

sojevi vrste *P. syringae* (Slomnicka et al., 2015; Newberry et al., 2016), što je u skladu sa rezultatima dobijenim u okviru ovog istraživanja. Izvedenim testovima pokazano je da od ukupno 28 sojeva pripadnika roda *Pseudomonas*, nijedan soj ne pripada vrsti *P. s. pv. lachrymans*. Sojevi KFB 389 i KFB 401 identifikovani su kao vrsta *P. viridiflava*. U domaćoj literaturi do sada nije bilo saopštenja o pojavi oboljenja biljaka porodice Cucurbitaceae, prouzrokovanih ovom vrstom. Ostali izolovani sojevi pripadaju vrsti *P. s. sensu stricto*. Ova informacija nam nažalost ne otkriva mnogo toga, s obzirom da vrsta *P. syringae* pv. *syringae* ima širok spektar domaćina, a zajedno sa ostalim pripadnicima genomske vrste 1 predstavlja najneistraženiju grupu u okviru roda *Pseudomonas*. Naime, iza ovih vrsta kriju se mnoge nedoumice u pogledu same prirode i genetičkog diverziteta patogena. Zanimljivost predstavlja činjenica da su sojevi *P. syringae* koji ispoljavaju izuzetnu virulentnost na različitim biljnim vrstama, izolovani i iz različitih staništa životne sredine, od kojih se neke ubrajaju u grupu netaknutih, i nalaze se daleko od poljoprivrednih površina. Ovakva otkrića dovela su do nastanka različitih teorija. Jednu od njih, izneli su Morris i saradnici (2008). Oni smatraju da je životni ciklus patogena usko povezan sa kruženjem vode u prirodi. Svi sojevi izolovani iz snega imaju izuzetno izraženiju sposobnost stvaranja čestica leda u odnosu na sojeve izolovane iz drugih supstrata, stoga veruju da *P. syringae* igra važnu ulogu čak i u stvaranju snežnih oblaka u atmosferi. Neprestanim razvojem molekularnih i bioinformatičkih metoda koje predstavljaju „zlatne standarde“ u taksonomskim proučavanjima, zasigurno će u budućnosti mnoge nedoumice biti rešene.

Vrste roda *Pectobacterium* često se mogu izolovati iz sočnih delova različitih biljnih vrsta. Nastanku infekcije doprinose povrede prilikom izvođenja agrotehničkih mera ili manipulacije biljnim delovima u polju. Stoga, njihova pojava na plodovima tikve i vrežama lubenice nije iznenađujuća. Za tri soja prouzrokovala vlažne truleži (KFB 392, KFB 394 i KFB 395), na osnovu sekvencione analize 16SrRNK, ispostavilo se da pripadaju vrsti *P. c. subsp. brasiliense*, čije prisustvo u našoj zemlji do sada nije opisano. Soj KFB 392 izolovan je 2013. godine iz ploda uljane tikve, čije seme je poreklom iz Austrije. Već sledeće godine, austrijski istraživači Gottsberger i Huss, beleže pojavu ovog patogena po prvi put na teritoriji Austrije, takođe na uljanoj tikvi. Ovakvi rezultati mogu predstavljati

slučajnost, ali se isto tako može postaviti hipoteza o održavanju i prenošenju patogena zaraženim semenom, s obzirom na isto poreklo semenskog materijala. Ova vrsta, *P. c. subsp. brasiliense* (KFB 394 i KFB 395) izolovana je i naredne godine u nas, ali iz srži i vreža lubenice. Takođe, lokaliteti sa kojih je prikupljen biljni materijal su dosta prostorno udaljeni, stoga je mala verovatnoća da je patogen mogao za kratko vreme da se proširi na tako udaljeno područje. Verovatnije objašnjenje je to da je vrsta *P. c. subsp. brasiliense* prisutna na širem području Srbije. Reklasifikacija roda *Pectobacterium* izvršena je u relativno skorije vreme, kada su izdvojene i nove vrste patogena (Gardan et al., 2003; Duarte et al., 2004). Osim toga, sojevi izolovani u prethodnom periodu nisu detaljnije proučavani korišćenjem molekularnih metoda, stoga je pretpostavka da su opisivani kao *P. c. subsp. carotovorum*, iako predstavljaju vrstu *P. c. subsp. brasiliense*.

Prisustvo vrste *E. tracheiphila* nikada zvanično nije potvrđeno na teritoriji naše zemlje, iako se proizvođači relativno često žale na simptome koji bi mogli odgovarati bakterioznoj uvelosti krastavca. Obilaskom terena tokom 2015. godine, imali smo priliku da se uverimo da simptomi mogu zavarati i da u postavljanju konačne dijagnoze, izolacija i identifikacija patogena definitivno ima ključnu ulogu. Iz biljaka sa simptomima opšteg pada turgora, uvelosti i hloroze listova, nisu izolovane fitopatogene bakterije. Uzrok ove pojave i dalje nije potpuno razjašnjen, ali kao jedan od mogućih razloga je da drenaža zemljišta u delu plastenika gde su biljke zaostajale u porastu ili potpuno propadale, nije bila odgovarajuća kao u ostalim delovima plastenika.

U toku ovog istraživanja, prikupljen je veliki broj uzoraka biljnog materijala sa izraženim simptomima pegavosti, kako na listovima, tako i na plodovima biljaka porodice Cucurbitaceae. Iako vrsta *X. cucurbitae*, prouzrokovatelj bakteriozne pegavosti tikava, u svetu, a naročito na američkom kontinentu, prouzrokuje znatne materijalne gubitke, na teritoriji naše zemlje, njeno prisustvo još uvek nije potvrđeno.

Prouzrokovatelj žutila vreža, vrsta *Serratia marcescens*, takođe nije detektovana u nas. Ovo oboljenje narušava uspešnu proizvodnju tikava širom Amerike (Bruton et al, 2003).

Bakterioze bilja predstavljaju ozbiljan problem u poljoprivrednoj proizvodnji širom sveta, a njihova kontrola je pravi izazov. Kada patogen dospe u unutrašnjost biljnog tkiva,

praktično je nemoguće bilo šta učiniti. Kako još uvek nema dovoljno efikasnih preparata i načina kojima bi se bakteriozna oboljenja mogla kontrolisati, u novije vreme sve više se okreće biološkim merama kontrole patogena. Primena bakteriofaga, kao veoma popularnih bioloških agenasa, sve više je predmet različitih studija. Bakteriofagi su široko prisutni u prirodi, umnožavaju se samo u prisustvu ćelije domaćina, usko su specifični eliminišući samo kompatibilnu vrstu ili soj bakterije i netoksični su za eukariote (Gašić i sar., 2012). U okviru ovog istraživanja, proučena je specifičnost 12 sojeva bakteriofaga prema izolovanim sojevima *A. citrulli*. Rezultati testa su pokazali da od 32 soja bakterija, dva (KFB 354 i KFB 355) poseduju rezistentnost na sve testirane sojeve faga. Ovakvi rezultati su ohrabrujući, s obzirom da je više od 90% proučavanih sojeva ispoljilo osetljivost prema bakteriofagima. Ovi sojevi se nisu razlikovali od ostalih izolovanih *A. citrulli* sojeva u pogledu biohemijsko-fizioloških odlika i genetičkih profila. Primena bakteriofaga u ovom radu se može posmatrati i iz ugla dodatne metode za detekciju i identifikaciju izolovanih fitopatogenih bakterija. Njihovom aktivnošću pokazano je na još jedan način da sojevi izolovani iz lubenice pripadaju vrsti *A. citrulli*. Problem rezistentnosti bi mogao da se prevaziđe kombinacijom (koktelom) različitih faga. Takođe, ograničavajući faktor primene bakteriofaga i dalje predstavlja formulacija koja bi našla primenu u poljoprivrednoj proizvodnji, s obzirom da su fagi osetljivi na uticaje spoljne sredine i vrlo lako dolazi do njihovog degradiranja. Formulacija sa obranim mlekom i saharozom se pokazala kao dosta efikasna u suzbijanju bakteriozne pegavosti paradajza na Floridi (SAD). Visok sadržaj proteina i šećera u mleku pogoduje održavanju virusa na površini listova (Balogh et al., 2003; Iriarte et al., 2007; Jones et al., 2012).

Jedinjenja bakra i antibiotici su trenutno osnovna mera hemijske kontrole bakterioza biljaka. Problem predstavlja nedovoljna efikasnost bakarnih jedinjenja, posebno u momentu kada do nastanka infekcije već dođe. S druge strane, upotreba antibiotika u zaštiti bilja je u mnogim zemljama, kao i u nas, zabranjena (Obradović i Ivanović, 2007). Razlog njihove zabrane ili ograničene upotrebe je eventualna pojava sojeva bakterija rezistentnih na antibiotike, usled čega postaju neefikasni. Poseban problem bi predstavljalo širenje gena odgovornih za rezistentnost iz poljoprivrednih okruženja u medicinsko okruženje i patogene čoveka, što bi moglo imati nesagledive posledice za čitav ljudski rod. S druge

strane, u SAD antibiotici imaju primenu u zaštiti bilja više od pola veka, a problem rezistentnosti rešavaju upotrebom jače koncentracije antibiotika, ili uvođenjem antibiotika iz drugih grupa. U okviru ovog istraživanja, proučena je *in vitro* osetljivost izolovanih sojeva bakterija na bakarna jedinjenja koja se najčešće koriste u našoj poljoprivrednoj praksi, kao i na antibiotike koji, kao što je rečeno, nisu dozvoljeni za upotrebu u Srbiji. Proučavani sojevi su ispoljili različitu osetljivost na jedinjenja bakra. Skoro polovina sojeva bila je otporna na 100 ppm bakar-hidroksida, dok je prema istoj koncentraciji bakar-oksihlorida svega 15 sojeva bilo rezistentno. Koncentracija od 200 ppm bakar-hidroksida, bila je letalna za sve proučavane sojeve osim za KFB 368 i KFB 393, kod kojih je zabeležen slab porast kolonija. Ista koncentracija bakar-oksihlorida bila je inhibitorna za sve proučavane sojeve. Na osnovu toga zaključujemo da je bakar-oksihlorid ispoljio veću efikasnost u poređenju sa bakar-hidroksidom. Zanimljiv rezultat predstavlja inhibicioni efekat bakar-oksihlorida pri koncentraciji od 200 ppm na kontrolni soj *X. euvesicatoria* KFB 062, koji je važio za rezistentan na sva testirana jedinjenja. Pretpostavlja se da je inhibicioni efekat posledica dugoročnog čuvanja bakterije. Naime, usled relativno čestog presejavanja, dešava se da bakterije gube neka svojstva (dr Aleksa Obradović, lična komunikacija). To se najčešće može odraziti u pogledu patogenosti, odnosno nivoa virulentnosti, ali i otpornosti na određena jedinjenja, kao što je ovde slučaj. Primenjene koncentracije jedinjenja bile su znatno niže u odnosu na preporučenu dozu aktivne materije za primenu u polju, što nam ukazuje da u populaciji izolovanih bakterija nije došlo do razvoja rezistentnosti na primenjena jedinjenja. S druge strane, razlika u osetljivosti sojeva na bakar-hidroksid i bakar-oksihlorid nam govori o potencijalnoj mogućnosti razvoja otpornosti na pojedina jedinjenja bakra.

U našem istraživanju, streptomycin-sulfat se pokazao kao manje efikasan u pogledu inhibicije razvoja izolovanih sojeva, u odnosu na bakarna jedinjenja. Naime, većina sojeva bila je osetljiva već na koncentraciju od 25 ppm, ali 5 sojeva je imalo slab porast i pri koncentraciji od 50 ppm. Iako se razvilo svega nekoliko kolonija, njihovo prisustvo ne treba zanemariti jer i ono ukazuje na mogući razvoj rezistentnosti u slučaju primene ovog jedinjenja. Pojava otpornosti sojeva na baktericide, nastaje kao posledica česte i neadekvatne primene ovih jedinjenja. Stoga je neophodno racionalno koristiti sva sredstva

predviđena za zaštitu bilja. U slučaju nepravilne primene preparata, odnosno višekratnoj izloženosti patogena baktericidima, kao i u humanoj medicini, tolerantnost sojeva se znatno povećava, odnosno dolazi do razvoja rezistentnosti. U zasadima gde se koristi hemijska zaštita, neophodna je stalna kontrola, praćenje populacije bakterija, posebno pojave rezistencije.

Na svetskom tržištu postoji veliki broj semenskih proizvođača koji neprestano rade na razvijanju novih genotipova, kako bi zadovoljili ukus i najizbirljivijih potrošača. Stoga veliki deo semena za proizvodnju na područje naše zemlje stiže upravo iz inostranstva, što sa sobom nosi opasnost od unošenja različitih karantinskih patogena. Bakteriozna oboljenja biljaka familije Cucurbitaceae uz povoljne vremenske uslove, obilne padavine i uglavnom povišene temperature, mogu dovesti do velikih gubitaka u proizvodnji. Osim toga, nikako ne smemo zaboraviti pojavu epidemije uglaste pegavosti krastavca u Vojvodini (Sombor, 1968; Sirig, 1977). Udeo obolelih plodova prelazio je i 80% (Arsenijević, 1997). Pojava bakteriozne mrljavosti lubenice i dinje u Americi 70ih godina prošlog veka je dokaz koliko fitopatogene bakterije mogu negativno uticati na tok gajenja biljaka. Ako se u obzir uzme i činjenica da zemlje koje predstavljaju najveće proizvođače semena lubenice i dinje u širem okruženju (Italija, Turska, Grčka, Mađarska) već neko vreme beleže prisustvo ovog patogena, bilo je pitanje dana kada će dospeti i do nas. Ispostavilo se da su strahovi kako proizvođača, tako i stručne javnosti u pogledu unosa *A. citrulli* u Srbiju, bili potpuno opravdani.

Kao što je rečeno, za većinu fitopatogenih bakterija, osnovni način prenošenja i širenja predstavlja zaraženo seme. Rezultati našeg istraživanja ukazuju na potvrdu ove teze. Naime, sa sigurnošću možemo reći da je vrsta *A. citrulli* unešena zaraženim semenom ili rasadom. Osim toga, s obzirom na rezultate genetičkog diverziteta sojeva *P. syringae* pv. *syringae*, i njihovu sličnost od 99,98% sa sojevima izolovanim u Americi, s pravom možemo reći da je distribucija semena i u ovom slučaju imala presudnu ulogu. Zanimljiv je i podatak o pojavi vrste *P. c.* subsp. *brasiliense* u nas, koja do sada nije bila predmet izučavanja u Srbiji. Bakterija je izolovana iz obolelih biljaka uljane tikve, poreklom iz Austrije, u istom periodu kada je patogen detektovan takođe u plodovima uljane tikve u istočnoj oblasti te zemlje.

Iz svega navedenog, možemo zaključiti da je osnovna mera zaštite od bakterioza bilja, upotreba deklarisanog semena i zdravstveno ispravnog rasada. Kako metode detekcije patogena koje su trenutno u upotrebi, imaju svojih ograničenja, može se dogoditi da patogen ipak dospe u proizvodni zasad. Stoga je neophodno stalno kontrolisati biljke i eliminisati sve čiji izgled ukazuje na potencijalno oboljenje. Objekti za proizvodnju trebalo bi da budu provetreni, redovno održavani u smislu dezinfekcije čišćenja radnih površina i alata. Iako za većinu fitopatogenih bakterija epidemiologija nije do kraja proučena, sigurno je da oboleli biljni ostaci imaju ulogu u održavanju patogena iz sezone u sezonu. Primena plodoreda je takođe vrlo bitna mera zaštite, kao i setva savremenih, otpornijih genotipova povrća. Strategija zaštite treba da se zasniva na principu prevencije, naročito sada, kada nema dovoljno efikasnih registrovanih preparata za primenu u cilju suzbijanja bakterioznih oboljenja.

7. ZAKLJUČCI

- ❖ U periodu od 2013-2016. godine na teritoriji Srbije iz biljaka porodice Cucurbitaceae izolovane su fitopatogene bakterije.
- ❖ Proučeni sojevi pripadaju rodovima *Acidovorax*, *Pseudomonas* i *Pectobacterium*.
- ❖ Karantinska vrsta *A. citrulli* po prvi put je detektovana na teritoriji Srbije u leto 2014. godine.
- ❖ Kao prouzrokovatelj različitih vidova pegavosti listova biljaka porodice Cucurbitaceae, identifikovana je vrsta *P. s. pv. syringae sensu stricto*.
- ❖ Prema našim saznanjima, po prvi put je zvanično zabeleženo prisustvo vrste *P. c. subsp. brasiliense* na biljkama porodice Cucurbitaceae u Srbiji.
- ❖ Rezultati izvedenih istraživanja ukazuju da je za iznenadne pojave novih vrsta bakterija u Srbiji, najverovatnije odgovorna distribucija zaraženog semena.
- ❖ Sojevi *A. citrulli* imaju širok spektar domaćina među vrstama porodice Cucurbitaceae u Srbiji.
- ❖ Na osnovu ispoljenog intenziteta infekcije, najosetljiviji domaćini *A. citrulli* su lubenica, krastavac i dinja, dok su bundeva i tikvica manje osetljive.
- ❖ U pogledu osetljivosti sortimenta, sve testirane sorte lubenice ispoljile su visok stepen osetljivosti prema *A. citrulli*.
- ❖ Od 32 soja *A. citrulli*, 30 sojeva ispoljilo je osetljivost prema bakteriofagima specifičnim za ovu vrstu.

8. Literatura

- Adaskaveg, J. E., Hine, R. B. (1985): Copper tolerance and zinc sensitivity of Mexican strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, causal agent of bacterial spot on pepper. *Plant Disease* 69: 993-996.
- Adhikari, M., Yadav, D. R., Kim, S. W., Um, Y. H., Kim, H. S., Lee, S. C., Song, J., Y., H. G., Kim, Lee, Y. S. (2017): Biological Control of Bacterial Fruit Blotch of Watermelon Pathogen (*Acidovorax citrulli*) with Rhizosphere Associated Bacteria. *Plant Pathology Journal* 33(2): 170-183.
- Agrios, G. N. (2005): *Plant Pathology* (5th edition). Elsevier Academic Press, Burlington, MA. Pp. 618.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*. 25:3389-3402.
- Aljanabi, S. M., Martinez, I. (1997): Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic acids research* 25(22):4692-4693.
- Andersen, G. L., Menkissoglou, O., Lindow, S. E. (1991): Occurrence and properties of copper-tolerant strains of *Pseudomonas syringae* isolated from fruit trees in California. *Phytopathology* 81:648-656.
- Arsenijević, M. (1997): *Bakterioze biljaka*. S-Print, Novi Sad, (treće izmenjeno i dopunjeno izdanje).
- Assis, S. M. P., R. L. R. Mariano, D. M. W. Silva-Hanlin, V. Duart (1999): Bacterial fruit blotch caused by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in melon, in the state of Rio Grande do Norte, Brazil. *Phytopathology Brasilia* 24, 191.
- Babadoost, M., Ravanlou, A. (2012): Outbreak of Bacterial Spot (*Xanthomonas cucurbitae*) in Pumpkin Fields in Illinois. *Plant Disease*, Vol. 96, No. 8: 1222.
- Babadoost, M., Weinzierl, R. A., Masiunas, J. B. (2004): *Identifying and Managing Cucurbit Pests*. University of Illinois Extension.
- Babadoost, M., Zitter, T. A. (2009): Fruit Rots of Pumpkin: A Serious Threat to the Pumpkin Industry. *Plant Disease*, Vol. 93, No. 8: 772-782.

- Bahar, O., Burdman, S. (2010): Bacterial fruit blotch: A threat to the cucurbit industry. *Israel Journal of Plant Sciences* 58(1):19-31.
- Bahar, O., Efrat, M., Hadar, E., Dutta, B., Walcott, R. R. and Burdman, S. (2008). New subspecies-specific polymerase chain reaction-based assay for the detection of *Acidovorax avenae* subsp.citrulli. *Plant Pathology*, 57, 754-763.
- Balaž, J., Ilinčić, R., Maširević, S. (2014): First Report of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Causing Bacterial Leaf Spots of Oil Pumpkin (*Cucurbita pepo*) in Serbia. *Plant Disease*, Vol. 98, No. 5: 684.
- Balogh B., Jones J.B., Momol M.T., Olson S.M., Obradovic A., King P. (2003): Improved efficacy of newly formulated bacteriophages for management of bacterial spot on tomato. *Plant Disease* 87: 949–954.
- Banihashemi, Z. (1971): Bacterial angular leaf spot of cucurbits in Iran. *Phytopathology Zeitschrift* 72: 368-370.
- Berenji, J. (2010): Uljana tikva i njena proizvodnja, Institut za ratarstvo i povrtnarstvo, Novi Sad. Stojkov, 65 str.
- Berenji, J. (2011): Genetika uljane tikve, *Cucurbita pepo* L.. *Selekcija i semesarstvo*, Vol. XVII (1): 19-35.
- Berge, O., 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*, Vol. 9, No. 9: e105547.
- Bhat, N. A., Bhat, K. A., Zargar, M. Y., Teli, M. A., Nazir, M., Zargar, S. M. (2010): Review article current status of angular leaf spot (*Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*) of cucumber: a review article. *International Journal of Current Research*, Vol.8: 1-11.
- Black, M. C., T. Isakeit, L. W. Barnes, T. A. Kucharek, R. J. Hoover, N. C. Hodge (1994): First report of bacterial fruit blotch of watermelon in Texas. *Plant Disease*, Vol. 78: 831.
- Brust, G. E., Rane, K. K. (1995). Differential occurrence of bacterial wilt in muskmelon due to preferential striped cucumber beetle feeding. *Hort Science* 30:1043-1045.

- Bruton, B. D., Mitchell, F., Fletcher, J., Pair, S. D., Wayadande, A., Melcher, U., Brady, J., Bextine, B., and Popham, T. W. (2003): *Serratia marcescens*, a phloem-colonizing, squash bugtransmitted bacterium: Causal agent of cucurbit yellow vine disease. *Plant Disease*. 87:937-944.
- Burdman, J., Walcott, R. (2012): *Acidovorax citrulli*: Generating basic and applied knowledge to tackle a global threat to the cucurbit industry. *Molecular Plant Pathology*, 13(8): 805–815.
- Burdman, S., Kots, N., Kritzman, G., Kopelowitz, J. (2005): Molecular, Physiological, and Host-Range Characterization of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* Isolates from Watermelon and melon in Israel. *Plant disease* 89: 1339-1347.
- Cho, M. S., Park, D. H., Ahn, T. Y., Park, D. S. (2015): Rapid and Specific Detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* Using SYBR Green-Based Real-Time PCR Amplification of the YD-Repeat Protein Gene. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(9): 1401–1409.
- Cintas, N. A., Koike, S. T., Bull, C. T.(2002): A new pathovar, *Pseudomonas syringae* pv. *alisalensis* pv. nov., proposed for the causal agent of bacterial blight of broccoli and broccoli raab. *Plant Disease* 86: 992-998.
- Crall, J. M., Schneck, N. C. (1969): Bacterial fruit rot of watermelon in Florida. *Plant Disease Report* 53:74-75.
- Dana, H., Khodakaramian, G., Rouhrazi, K. (2015): Characterization of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* Causing Watermelon Soft Rot Disease in Iran. *Journal of Phytopathology*, Vol. 163 (9): 703-710.
- Duarte, V., De Boer, S.H., Ward, L.J., de Oliveira, A.M.R. (2004): Characterization of atypical *Erwinia carotovora* strains causing blackleg of potato in Brazil. *Journal of Applied Microbiology*, 96(3): 535-545.
- Dutta, B., Gitaitis, R. D., Lewis, K.J. , Langston, D. B. (2013): A New Report of *Xanthomonas cucurbitae* Causing Bacterial Leaf Spot of Watermelon in Georgia, USA. *Plant Disease*, Vol. 97, No. 4: 556.
- Durovka, M. (2008): Gajenje povrća na otvorenom polju. Poljoprivredni fakultet, Novi Sad, Tampograf.

- El-Sadek, S. A. M., Abdel-Latif, M. R., Abdel-Gawad, T. I., Hussein, N. A. (1992): Occurrence of angular leaf spot disease in greenhouse cucumbers in Egypt. *Egyptian Journal of Chemistry* 27: 157-175.
- Erickson, D. L., Smith, B. D., Clarke, A. C., Sandweiss, D. H., Tuross, N. (2005): An Asian origin for a 10,000-year-old domesticated plant in the Americas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 102 (51): 18315–18320.
- Fahy, P. C., Hayward, A. C. (1983): Media and Methods for Isolation and Diagnostic Tests. pp. 337-378. In: Fahy, P. C. and Parsley, G. J. (Eds.), *Plant Bacteria Diseases, A Diagnostic Guide*. Academic Press, Australia. 1983.
- FAO (2014, 2016): The FAO Statistical Database (FAOSTAT): Food and Agriculture Organization of the United Nations. Retrieved from <http://faostat.fao.org>
- Feng, J., Li, J. Q., Walcott, R. R., Zhang, G. M., Luo, L. X., Kang, L., Zheng, Y., Schaad, N. W. (2013): Advances in detection of *Acidovorax citrulli*, the causal agent of bacterial fruit blotch of cucurbits. *Seed Science and Technology*, Vol. 41: 1-15.
- Feng, J., Schuenzel, E. L., Li, J., Schaad, N. W. (2009): Multilocus sequence typing reveals two evolutionary lineages of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. *Phytopathology* 99(8): 913-920.
- Fessehaie, A., Hopkins, D., Gitaitis, R., Langston, D., Walcott, R. (2005). Role of honey bees in watermelon seed infestation by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. *Phytopathology* ; 93(5): 528-534.
- Gaba, V., Zelcer, A., Gal-On, A. (2004): Cucurbit biotechnology: The importance of virus resistance. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 40: 346-358.
- Galatchyan, P. M. (1937): The etiology of green spotting in cucumbers under glass house conditions in the Leningrad region as a basis for control measures. *Plant protection Leningrad*, 15: 44-56.
- Gardan, L., Gouy, C., Christen, R., Samson, R. (2003): Elevation of three subspecies of *Pectobacterium carotovorum* to species level: *Pectobacterium atrosepticum* sp. nov., *Pectobacterium betavasculorum* sp. nov. and *Pectobacterium wasabiae* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. Vol. 53: 381–391.

- Gašić, K., Ivanović M., Prokić A., Kuzmanović N., Ignjatov M., Obradović A. (2012): Izolacija bakteriofaga i njihova primena u diferencijaciji sojeva *Xanthomonas* spp. *Zaštita bilja*, Vol. 63, br. 2: 62-75.
- Gašić, K., Ivanović, M., Obradović, A. (2007): Proučavanje specifičnosti bakteriofaga prema *Xanthomonas* sp. patogena paprike i paradajza. XIII simpozijum sa savetovanjem o zaštiti bilja, Zlatibor, Zbornik rezimea, str. 121-122.
- Gorlenko, M. V., Voronkevich, I. V. (1946). The cycle of development of the agent of the bacteriosis of cucumbers *Bacterium lachrymans* Smith and Bryan under natural conditions. *CR Academy of Sciences USSR* 51: 641-644.
- Gottsberger, R. A., Huss, H. (2016): *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* causing a soft rot on Styrian oil pumpkin in Austria. *New Disease Reports* 33, 12.
- Goth, R. W., Webb, R. E. (1975): Bacterial wilt of watermelon. Abstract. *Proceedings of the American Phytopathological Society*. 2: 122-123.
- Guner, N., Wehner T. C. (2008): Overview of Potyvirus resistance in watermelon. In: M Pitrat (eds.), *Cucurbitaceae*, 2008: Proceedings of the IXth EUCARPIA meeting on genetics and breeding of *Cucurbitaceae*. INRA, Avignon, France, pp, 445-451.
- Gvozdanić-Varga, J. (2011): Proizvodnja lubenica, 223-225. *Semenarstvo*. Milošević, M., Kobiljski, B. Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad, SP Print.
- Heiser, C. B., Jr. (1985): *Of Plants and People*, University of Oklahoma Press, Norman and London.
- Hellmers, E. (1950): Angular leaf spot of cucumbers *Pseudomonas lachrymans* (Smith and Bryan) Casner in Denmark. *Transactions of Denmark Academy of Technology and Sciences* No. 9, p. 28 . Hopkins, D. L. and Schenck, N. C. 1972.
- Holeva, M. C., Karafla, C. D., Glynos, P. E., Alivizatos, A. S. (2010): *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* newly reported to cause bacterial fruit blotch of watermelon in Greece. *Plant Pathology*, 59: 797.
- Hopkins, D. L., Thompson, C. M., Elmstrom, G. W. (1993): Resistance of Watermelon Seedlings and Fruit to the Fruit Blotch Bacterium. *HortScience* 28(2): 122-123.
- Hu, F. P., Young, J. M., Triggs, C. M. (1991): Numerical analysis and determinative tests for nonfluorescent plant-pathogenic *Pseudomonas* spp. and genomic analysis and

- reclassification of species related to *Pseudomonas avenae* Manns 1909. International Journal of Systematic Bacteriology, 41(4): 516-525.
- Hwang, M. S. H., 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.
- Iacobellis, N. S., Figliuolo, G., Janse, J., Scortichini, M., Ciuffreda, G. (1997): Characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *atropaciens*. In: *Pseudomonas syringae* Pathovars and Related Pathogens, Ed.: Rudolph, K., Burr, T. J. , Mansfield, J. W., Stead, D., Vivian, A., von Kietzell, J. Springer, Dordrecht. pp. 500-504.
- Iilina, E. L, Logachov, A. A., Laplaze, L., Demchenko, N. P., Pawlowski, K., Demchenko, K. N. (2012): Composite *Cucurbita pepo* plants with transgenic roots as a tool to study root development. Annals of Botany 05/2012; 110(2): 479-489.
- Iriarte, F. B., Balogh, B., Momol, M. T., Smith, L. M., Wilson, M., Jones, J. B. (2007): Factors Affecting Survival of Bacteriophage on Tomato Leaf Surfaces. Applied and Environmental Microbiology: 73(6): 1704–1711.
- Isakeit, T., M. C. Black, L. W. Barnes, J. B. Jones (1997): First report of infection of honeydew with *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. Plant Disease. Vol. 81: 694.
- Isakeit, T., M. C. Black, L., J. B. Jones (1998): Natural Infection of Citronmelon with *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. Plant Disease 82: 351.
- Jacobs, J. L., Damicone, J. P., McCraw, B. D. (1992): First report of bacterial fruit blotch of watermelon in Oklahoma. Plant Disease, Vol. 76: 1185.
- Johnson, K. L., Minsavage, G. V., Le, T., Jones, J. B., and Walcott, R. R. (2011): Efficacy of a nonpathogenic *Acidovorax citrulli* strain as a biocontrol seed treatment for bacterial fruit blotch of cucurbits. Plant Disease 95: 697-704.
- Jones A. (1982): Chemical control of phytopathogenic prokaryotes. In: Mount M, Lacy G, eds. Phytopathogenic prokaryotes. New York: Academic Press, pp. 399–414.
- Jones, J. B., Vallad, G.E., Iriarte, F. B., Obradović, A., Wernsing, M. H., Jackson, L. E., Balogh, B., Hong, J. C., Momol, M. T. (2012): Considerations for using bacteriophages for plant disease control. Bacteriophage, 2(4): 208–214.

- Kennedy, B. W. and Alcorn, S. M. (1980). Estimates of US crop losses to prokaryote plant pathogens. *Plant Disease* 64: 674-676.
- King, E. O., Ward, M., Raney, D. E. (1954): Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 44: 301-307.
- Klement, Z., Goodman, R. N. (1967): The hypersensitive reaction to infection by bacterial plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 5: 17-44.
- Klement, Z., Rudolf, K., Sands, D. C. (1990): *Methods in phytobacteriology*. Akadémiai Kiadó, Budapest.
- Kritzman, G., Zutra, D. (1983): Survival of *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* in soil, plant debris, and the rhizosphere of non-host plants. *Phytoparasitica* 11(2): 99-108.
- Lamichhane, J. R., Messean, A., and 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: 331-350.
- Langston, D. B. Jr, R. R. Walcott, R. D. Gitaitis, F. H. Sanders (1999): First report of a fruit rot of pumpkin caused by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in Georgia. *Plant Disease*. Vol. 83: 100.
- Latin, R. X., Hopkins, D. L. (1995): Bacterial Fruit Blotch of Watermelon. The Hypothetical Exam Question Becomes Reality. *Plant Disease*, Vol. 79, No. 8: 761-765.
- Latin, R. X., Rane, K. K. (1990): Bacterial fruit blotch of watermelon in Indiana. *Plant Disease*, Vol. 74: 331.
- Lazić, B., Ilić, Z. S., Đurovka, M. (2013): *Specijalno organsko povrtarstvo*. Tapograf, Novi Sad, 336.
- Lelliott, R. A. (1958): Angular leaf spot on cucumber in England. *Plant Pathology*, Vol. 7 (4): 132.
- Lelliott, R. A., Stead, D. E. (1987): *Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants*, Vol. 2. British Society for Plant Pathology & Blackwell, London
- Lessl, J.T., Fessehaie, A., Walcott, R.R. (2007): Colonization of female watermelon blossoms by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, and the relationship between blossom inoculation dosage and seed infestation. *Phytopathology* 155:114-121.

- Lešić, R., Borošić, J., Buturac, I., Herak-Ćustić, M., Poljak, M., Romić, D. (2004): Povrčarstvo, II dopunjeno izdanje. Zrinski Čakovec.
- Manchester, S. R. (2014): Revisions to Roland Brown's North American Paleocene flora. – Acta Musi Nationalis Pragae, Series B - Historia Naturalis, 70(3-4): 153–210.
- Marco, G. M., Stall, R. E. (1983): Control of bacterial spot of pepper initiated by strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that differ in sensitivity to copper. Plant Disease 67: 779-781.
- Martin, H. L., O'Brien, R. G. (1999): First report of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* as a pathogen of cucumber. Plant Disease. Vol.83: 965.
- Mijatović, M., Obradović, A., Ivanović, M. (2007): Zaštita povrća. AgroMivas, Smederevska Palanka, 264 str.
- Mirik, M., Aysan, Y., Sahin, F. (2006): Occurrence of Bacterial Fruit Blotch of Watermelon Caused by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in the Eastern Mediterranean Region of Turkey. Plant Disease 90: 829.
- Moore, L.W. (1988): *Pseudomonas syringae*: disease and ice nucleation activity. Ornamentals Northwest Newsletter 12: 4-16.
- Moravčević, Đ., Todorović, V., Pavlović, N. (2017): Povrtarstvo (praktikum). Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, str. 102.
- Moreno, V., Roig, L. A. (1990): Somaclonal variation in cucurbits. Y.P.S. Bajaj (Ed.), Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. II, Springer-Verlag, Berlin (1990), pp. 435–464.
- Morris C.E., Kinkel L.L., Xiao K., Prior P., Sands D.C. (2007): Surprising niche for the plant pathogen *Pseudomonas syringae*. Infection Genetic Evolution 7: 84–92.
- Morris, C. E., Sands, D. C., Vinatzer, B. A., Glaux, C. Guilbaud, C., Buffière, A., Yan, S., Dominguez, H., and Thompson, B. M. (2008). The life history of the plant pathogen *Pseudomonas syringae* is linked to the water cycle. The ISME Journal 2:321–334.
- Mulet, M., Lalucat, J., García-Valdés, E. (2010): DNA sequence-based analysis of the *Pseudomonas* species. Environmental Microbiology 12: 1513–1530.

- Nazerian, E., Sijam, K., Zainal Abidin, M. A., Vadamalai, G. (2011): First Report of Soft Rot Caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* on Cucumber in Malaysia. *Plant Disease*, Vol. 95, No. 11: 1474.
- Newberry, E. A. , Jardini, T. M., Rubio, I., Roberts, P. D, Babu, B., Koike, S. T., Bouzar, H., Goss, E. M., Jones, J. B., Bull, C. T., Paret, M. L. (2016): Angular leaf spot of cucurbits is associated with genetically diverse *Pseudomonas syringae* strains. *Plant Disease* 100: 1397-1404.
- Newberry, E., Babu, B., P. D. Roberts, N. S., Dufault, Goss, E. M., Jones, J. B., Paret, M. (2017): Molecular epidemiology of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* causing bacterial leaf spot of watermelon and squash in Florida. *Plant Disease*, Vol. 102., No. 3: 511-518.
- O'Brien, R. G., Martin, H. L. (1999): Bacterial blotch of melons caused by strains of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 39: 479-485.
- Obradović, A., Ivanović, M. (2007): O primeni antibiotika u zaštiti bilja. *Biljni lekar*, Vol. 35, br. 1: 52-59.
- Obradović, A., Prokić, A., Zlatković, N., Gašić, K. (2014): Mrljavost ploda - nova bakterioza lubenice u Srbiji. *Zbornik radova, XV savetovanje „Savremena proizvodnja povrća“*. *Savremeni povrtar*, br. 52: 24-26.
- Olczak-Woltmana, H., Schollenberger, M., Madry, W., Niemirowicz-Szczytt, K. (2008): Evaluation of cucumber (*Cucumis sativus*) cultivars grown in Eastern Europe and progress in breeding for resistance to angular leaf spot (*Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*). *European Journal of Plant Pathology*, 122: 385-393.
- Pair, S. D., Bruton, B. D., Mitchell, F., Fletcher, J., Wayadande, A., Melcher, U. (2004): Overwintering squash bugs harbor and transmit the causal agent of cucurbit yellow vine disease. *Journal of Economic Entomology*. 97(1): 74-78.
- Palkovics, L., Petróczy, M., Kertész, B., Németh, J., Bársony, Cs., Mike, Zs., Hevesi, M. (2008): First Report of Bacterial Fruit Blotch of Watermelon Caused by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in Hungary. *Plant Disease*, 92: 834-835.

- 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: 338–344.
- Popović, T., Ivanović, Ž. (2014): Occurrence of *Acidovorax citrulli* Causing Bacterial Fruit Blotch of Watermelon in Serbia. *Plant Disease*, Vol. 99, No. 6: 886.
- Provvidenti, R. (1996): Diseases Caused by Viruses. In; Zitter, T. A., Hopkins, D. L. and Thomas, C. E. (eds.), *Compendium of Cucurbit Diseases*. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA, pp. 37-40.
- Pruvost, O., Robène-Soustrade, I., Ah-You, N., Jouen, E., Boyer, Waller, C. F., Hostachy, B. (2008): First Report of *Xanthomonas cucurbitae* Causing Bacterial Leaf Spot of Pumpkin on Réunion Island. *Plant Disease*, Vol. 92, No. 11: 1591.
- Pruvost, O., Robène-Soustrade, N. Ah-You, E. Jouen, and C. Boyer, Wuster, G., Hostachy, B., Napoles, C., Dogley, W. (2009): First Report of *Xanthomonas cucurbitae* Causing Bacterial Leaf Spot of Watermelon in the Seychelles. *Plant Disease*, Vol. 93, No. 6 : 671.
- Queensland Department of primary Industries (1978). *A handbook of Plant diseases in Colour*. Vol. 1. Fruit and vegetables, N. T. Vock, ed. S.R. Hampson, Government Printer, Queensland, Australia.
- Rane, K.K., Latin, R.X. (1992): Bacterial fruit blotch of watermelon: Association of the pathogen with seed. *Plant Disease*, 76: 509-512.
- Ren, Y. Z., Li, H., Li, G. Y., Wang, Q. Y., Li, J. Q. (2006): First Report of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* Infecting Edible Seed Watermelon (*Citrullus lanatus* var. *lanatus*) in China. *Plant Disease*, 90: 1112.
- Ristić, D., Gašić, K., Ivanović, M., Obradović, A. (2007): Iznenađna pojava *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* na krastavcu i dinji u Srbiji. XIII Simpozijum sa savetovanjem o zaštiti bilja, Zlatibor, 26-30.11. Zbornik rezimea, str. 122-123.
- Saalau Rojas, E., Batzer, J. C., Beattie, G. A., Fleischer, S. J., Shapiro, L. R., Williams, M. A., Bessin, R., Bruton, B. D., Boucher, T. J., Jesse, L. C. H., Gleason, M. L. (2015): Bacterial Wilt of Cucurbits: Resurrecting a Classic Pathosystem. *Plant Disease*, Vol. 99, No. 5: 564-574.

- Saalau Rojas, E., Gleason, M. L., Batzer, J. C., Duffy, M. (2011): Feasibility of Delaying Removal of Row Covers to Suppress Bacterial Wilt of Muskmelon (*Cucumis melo*). *Plant Disease*, Vol. 95, No. 6: 729-734.
- Sanogo, S., Etarock, B. F., Clary, M. (2011): First Report of Bacterial Wilt Caused by *Erwinia tracheiphila* on Pumpkin and Watermelon in New Mexico. *Plant Disease*, Vol. 19, No. 12: 1583.
- Schaad, N. W., Postnikova, E., Sechler, A., Clafin, L. E., Vidaver, A. K., Jones, J. B., Agarkova, I., Ignatov, A., Dickstein, E., Ramundo, B.A. (2008): Reclassification of subspecies of *Acidovorax avenae* as *A. avenae* (Manns 1905) emend., *A. cattleyae* (Pavarino, 1911) comb. nov., *A. citrulli* Schaad et al., 1978) comb. nov., and proposal of *A. oryzae* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 31(6-8): 434-446.
- Schaad, N. W., Sowell, G., Jr., Goth, R., N., Colwell, R. R., Webb, R. G. (1978): *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli* subsp. nov. *International Journal of Systemic Bacteriology* 28: 117-125.
- Schaad, N.W., Jones, J.B., Lacy, G.H. (2001): *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*, 3rd edition. (eds) Schaad N. W, Jones J. B, Chun W., APS Press, St. Paul, MN, pp.373.
- Seebold, K.W., Bessin, R. T. (2011): *Plant Pathology Fact Sheet Yellow Vine Decline of Cucurbits*. Cooperative Extension Service, University of Kentucky- College of Agriculture.
- Slomnicka, R., Olczak-Woltman, H., Bartoszewski, G., and Niemirowicz-Szczytt, K. (2015): Genetic and pathogenic diversity of *Pseudomonas syringae* strains isolated from cucurbits. *European Journal of Plant Pathology*, 141: 1–14.
- Smith, B. D. (1997): The Initial Domestication of *Cucurbita pepo* in the Americas 10,000 Years Ago. *Science*, Vol. 276 (5314): 932-934.
- Snowden, A. (2010): *Post-Harvest Diseases and Disorders of Fruits and Vegetables*, Vol.1: General introduction and fruits. Manson Publishing LTD: pp. 272.
- Somodi, G. C., Jones, J. B., Hopkins, D. L., Stall, R. E., Kucharek, T. A. , Hodge, N. C., Watterson, J. C. (1991): Occurrence of a bacterial watermelon fruit blotch in Florida. *Plant Disease* 75: 1053–1056.

- Sorensen, K. N., Kim, K. H., Takemoto, J. Y. (1998): PCR Detection of Cyclic Lipodepsinonapeptide-Producing *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and Similarity of Strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(1): 226–230.
- Stout, G. L. (1952): Bureau of plant pathology. Bulletin Department of Agriculture California 41: 265-283.
- Takemoto, J. Y. (1992): Bacterial phytotoxin syringomycin and its interaction with host membranes. In: Verma D P S, editor. *Molecular signals in plant-microbe communications*. Boca Raton, Fla: CRC Press; pp. 247–260.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. (2011): MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.
- Tominaga, T., Tsuchiya, Y. (1958): Occurrence of cucumber angular leaf spot. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 23: 35 (Abstract in Japanese).
- Trueman, C. L., Roddy, E., Goodwin, P. H. (2014): First report of bacterial spot (*Xanthomonas cucurbitae*) of pumpkin in Ontario, Canada. *New Disease Reports* 30: 8.
- Vauterin, L., Hoste, B., Kersters, K., Swings, J. (1995): Reclassification of *Xanthomonas*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 45: 472-489.
- Volcani, Z. (1964): Development of angular leaf spot of cucumbers grown under plastic in Israel. *Plant Disease Reporter* 48: 256-257.
- Vučurović, A., Bulajić, A., Đekić, I., Berenji, J., Krstić, B. (2008): Virusi – stalni problem u usevu tikava u Srbiji. *Zbornik rezimea IX savetovanja o zaštiti bilja, Zlatibor*, str. 96-97.
- Walcott, R. R., Fessehaie A., Castro, A. C. (2004): Differences in Pathogenicity between two Genetically Distinct Groups of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* on Cucurbit Hosts. *Journal of Phytopathology*, 152, 277–285.
- Walcott, R. R., Langston, D. B., Jr., Sanders, F. H., Jr., Gitaitis, R. D. (2000): Investigating Intraspecific Variation of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* Using DNA Fingerprinting and Whole Cell Fatty Acid Analysis. *Phytopathology* 90: 191-196.

- Walcott, R.R., Gitaitis, R.D., Castro, A.C. (2003): Role of blossoms in watermelon seed infestation by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. *Phytopathology* 93:528-534.
- Wall, G. C., and Santos, V. M. 1988. A new bacterial disease on watermelon in the Mariana Islands. *Phytopathology* 78: 1605.
- Wang, Y. H., Behera, T. K., Kole, C. (2012): Genetics, genomics and breeding of Cucurbits. Science Publishers, CRC Press.
- Watanabe, Y., Ohuchi, A. (1983): Angular leaf spot of cucumber in Japan. *Journal of Agricultural Research Quarterly* 17: 112-119.
- www.faostat.org
- www.pks.rs
- Young, J. M., Saddler, G. S., Takikawa, Y., De Boer, S. H., Vauterin, L., Gardan, L., (1996). Names of plantpathogenic bacteria 1864–1995. Review in *Plant Pathology*, 75: 721–763.
- Zitter, T. A. (1996): Cucurbit Diseases. In: Zitter, T. A., Hopkins, D. L., Thomas, C. E. (eds.), *Compendium of Cucurbit Diseases*. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA, pp. 1-2.
- Zlatković, N., Prokić, A., Kuzmanović, N., Gašić, K., Ivanović, M., Obradović, A. (2017): Bakteriozna oboljenja biljaka familije Cucurbitaceae. *Biljni lekar* 45, 4/2017: 390-400.
- Zlatković, N., Prokić, A., Kuzmanović, N., Gašić, K., Šević, M., Ivanović, M., Obradović, A. (2015): Bakteriozna mrljavost plodova lubenice u Srbiji. *Biljni lekar*, 43, 3: 265-272.
- Živanovic, M. (2014). Characterization of *Acidovorax citrulli* virulence on watermelon and melon. MSc. Thesis. Athens, GA: The University of Georgia.

BIOGRAFIJA

Diplomirani inženjer Nevena Zlatković (rođ. Blagojević) rođena je 08.10.1987. godine u Beogradu. Nakon završetka Devete beogradske gimnazije „Mihailo Petrović-Alas“, prirodno-matematičkog smera, školske 2006/7. godine upisala je Poljoprivredni fakultet Univerziteta u Beogradu, na Odseku za zaštitu bilja i prehrambenih proizvoda. Diplomirala je 12.07.2011. godine, sa prosečnom ocenom 9,47 (devet i 47/100). Diplomski rad pod nazivom „Ispitivanje efikasnosti i fitotoksičnosti preparata SEDEF (fenoksaprop-p-etil) za suzbijanje korova u usevu suncokreta“ odbranila je ocenom 10 (deset). Doktorske studije na Poljoprivrednom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, upisala je školske 2011/12. godine, na smeru Poljoprivredne nauke, modul: Fitomedicina. Od 2012-2016. godine bila je angažovana u Laboratoriji za fitobakteriologiju Poljoprivrednog fakulteta u Beogradu kao stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. Počev od januara 2017. godine, angažovanje je nastavila kao istraživač-saradnik.

U toku studiranja, obavila je nekoliko studijskih boravaka u svetu. Kao apsolvant, 2010. godine, obavila je tromesečni studentski praktični rad na University of Saskatchewan, Department of Plant Science, u Kanadi. Godine 2012., u okviru saradnje između Srbije i USDA/ARS, realizovala je trening iz oblasti fitobakteriologije u Kaliforniji (SAD). Takođe, 2015. godine, obavila je jednomesečnu obuku u Bariju (Italija), u instituciji National research council (CNR), Institute for Sustainable Plant Protection (IPSP), gde je usvajala znanja o detekciji invazivne fitopatogene bakterije *Xylella fastidiosa*. Takođe, pohađala je i nekoliko treninga iz oblasti bakterioza bilja.

Tokom 2013-2016. godine, učestvovala je u realizaciji FP7 projekta: „Advancing research in agricultural and food sciences at Faculty of Agriculture, University of Belgrade, AREA“ (No. 316004). Takođe, trenutno učestvuje u realizaciji nacionalnog projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije III46008: “Razvoj integrisanih sistema upravljanja štetnim organizmima u biljnoj proizvodnji sa ciljem prevazilaženja rezistentnosti i unapređenja kvaliteta i bezbednosti hrane“, kao i međunarodnog projekta Horizon 2020: „Pest Organisms Threatening Europe, POnTE“ (635646).

Tokom doktorskih studija, kao autor ili koautor, objavila je 62 naučna i stručna rada. Učestvovala je na većem broju međunarodnih i domaćih skupova i konferencija. Govori engleski i španski jezik. Član je Društva za zaštitu bilja Srbije, kao i Udruženja mikrobiologa Srbije.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a _____ Nevena Zlatković _____

Broj indeksa ili prijave doktorske disertacije _____ 11/1 _____

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom:

Detekcija i identifikacija bakterija parazita biljaka familije Cucurbitaceae klasičnim i molekularnim metodama

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena doktorska disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio/la intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu, _____ 30.03.2018. _____

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Nevena Zlatković

Broj indeksa 11/1

Studijski program Poljoprivredne nauke

Naslov rada Detekcija i identifikacija bakterija parazita biljaka familije
 Cucurbitaceae klasičnim i molekularnim metodama

Mentor prof. dr Aleksa Obradović, redovni profesor

Potpisani/a Nevena Zlatković

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 30.03.2018.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Detekcija i identifikacija bakterija parazita biljaka familije Cucurbitaceae

klasičnim i molekularnim metodama

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poleđini lista).

Potpis doktoranda

U Beogradu, 30.03.2018.
