

UNIVERZITET U BEOGRADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET

Tamara Đ. Popović

**BAKTERIJE KAO PARAZITI KOŠTIČAVIH
VOĆAKA I BADEMA NA PODRUČJU
CRNE GORE**

doktorska disertacija

Beograd, 2020

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF AGRICULTURE

Tamara Đ. Popović

**BACTERIA AS PATHOGENS OF STONE
FRUITS AND ALMOND IN MONTENEGRO**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2020

Komisija za ocjenu i odbranu:

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

Članovi komisije: dr Goran Delibašić, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu -
Poljoprivredni fakultet

dr Mila Grahovac, vanredni profesor, Univerzitet u Novom Sadu -
Poljoprivredni fakultet

dr Dragan Milatović, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu-
Poljoprivredni fakultet

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

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

Datum odbrane: _____

Zahvalnica

Ova doktorska disertacija urađena je u Laboratoriji za fitobakteriologiju Poljoprivrednog fakulteta u Beogradu.

Zahvaljujem mentoru, prof. dr Aleksu Obradoviću, na pomoći pri izboru teme disertacije, nesebičnoj podršci, savjetima i razumijevanju tokom izrade doktorske disertacije kao i cjelokupnih doktorskih studija.

Zahvaljujem koleginicama iz Laboratorije za fitobakteriologiju, Jeleni Menković, dr Anđelki Prokić i dr Neveni Zlatković na prijateljskom odnosu, prenesenom znanju i nesebičnoj pomoći koju su mi pružile u radu.

Jedan dio disertacije urađen je u Fitosanitarnoj laboratoriji Biotehničkog fakulteta u Podgorici.

Veliku zahvalnost dugujem prof. dr Jelki Todorović na pomoći i podršci tokom izrade doktorske disertacije.

Hvala Ministarstvu poljoprivrede i ruralnog razvoja Crne Gore na podršci tokom doktorskih studija.

Zahvaljujem direktorici Vesni Daković, pomoćnici direktorice Zorki Prljević i svim kolegama Uprave za bezbjednost hrane, veterinu i fitosanitarne poslove Crne Gore, na velikoj podršci i razumijevanju tokom doktorskih studija.

Na kraju najveću zahvalnost dugujem svojoj porodici na orgomnoj ljubavi i podršci tokom svih ovih godina.

Ovu disertaciju posvećujem majci Đurđi i preminulom ocu Đoku.

BAKTERIJE KAO PARAZITI KOŠTIČAVIH VOĆAKA I BADEMA NA PODRUČJU CRNE GORE

SAŽETAK

Proizvodnja koštičavog voća i badema ekonomski je važna i obezbjeđuje značajne prihode proizvođačima širom svijeta. U Crnoj Gori karakteriše je intenzivna i poluintenzivna proizvodnja, dok je gajenje badema uglavnom namijenjeno za potrebe domaćinstva.

Proizvodnja koštičavog voća i badema u Crnoj Gori često je ugrožena različitim fitopatogenim bakterijama, naročito kada povoljni klimatski uslovi pogoduju infekciji i širenju bolesti.

Tokom dvogodišnjeg nadzora (2017-2018), prikupljeni su simptomatični uzorci raznih organa koštičavih voćaka i badema, iz različitih lokaliteta širom Crne Gore. Iz oboljelog tkiva, izolovano je 68 sojeva fitopatogenih bakterija koji su proučeni primjenom klasičnih i savremenih metoda.

Svi proučavani sojevi su Gram negativni, stvaraju katalazu, ali ne i oksidazu, imaju oksidativan metabolizam glukoze i prouzrokuju hipersenzitivnu reakciju lista duvana i muškatle. Na osnovu patogenih, morfoloških, biohemijsko-fizioloških i molekularnih odlika, izolovani sojevi svrstani su u dva roda: *Xanthomonas* i *Pseudomonas*. Patogenost proučavanih sojeva potvrđena je reprodukcijom simptoma na listovima, plodovima i mladarcima odgovarajućih biljaka domaćina.

Na osnovu morfoloških, patogenih, biohemijsko-fizioloških i molekularnih karakteristika, 29 sojeva je svrstano u rod *Pseudomonas*. Proučavani sojevi stvaraju zeleni fluorescentni pigment na Kingovoj podlozi B i male, okrugle, sjajne, sivkasto-bjeličaste kolonije na podlozi od hranljivog agara. Uočena je varijabilnost u pogledu stvaranja levana i vitalnosti na hranljivoj podlozi obogaćenoj saharozom (NAS), kao i sposobnosti stvaranja čestica leda. Rezultati GATTA testova nisu dovoljni i pouzdani za diferencijaciju *P. syringae* sojeva do ili ispod nivoa patogenog varijeteta. Kod 25 proučavanih sojeva detektovan je *syxB* gen koji kodira sintezu siringomicina. Rezultati Rep-PCR primjenom BOX prajmera, pokazali su visok genetički diverzitet među proučavanim sojevima *Pseudomonas* sp. Analiza multilokusnih sekvenci (MLSA) je izvedena za 28 proučavanih sojeva, pri čemu su umnožene nukleotidne sekvence četiri konstitutivna gena: *gapA*, *gltA*, *gyrB* i *rpoD*. Rezultati MLSA pokazuju da 27 proučavanih sojeva pripada genomskoj vrsti 1, *P. syringae sensu stricto*, raspoređenih u filogrupi 2. Međutim, sojevi iz iste filogrupe 2, nisu grupisani u jedan monofiletski klaster. Izuzetak je predstavljao soj K6 izolovan iz kajsije, koji pripada genomskoj vrsti 2, filogrupi 3. Kod četiri soja kod kojih nije detektovan gen za sintezu siringomicina, analiziran je 16S rRNK gen. Poređenjem dobijenih sekvenci sa sekvencama u NCBI bazi, utvrđeno je da ti sojevi ipak pripadaju bakteriji *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. Na osnovu dobijenih rezultata, 29 sojeva je identifikovano kao *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*.

Na osnovu dobijenih rezultata morfoloških, patogenih, biohemijskih i molekularnih testova, 38 sojeva je identifikovano kao *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*. Na podlozi od kvašćevog ekstrakta, glukoze i kalcijum karbonata (YDC) formirali su žute, ispupčene i sluzaste kolonije. Svi proučavani sojevi hidrolizuju eskulin i ne razvijaju se pri 37°C. Od svih proučavanih sojeva četiri soja hidrolizuju škrob i dva soja ne hidrolizuju želatin. Rezultati Rep-PCR korišćenjem BOX prajmera, ukazali su na homogenost populacije *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* i nizak genetički diverzitet proučavanih sojeva ovog patovara. Korišćenjem specifičnih prajmera XapY17-F/XapY17-R u reakciji lančanog umnožavanja fragmenata DNK, umnožen je fragment veličine 943 bp kod 37 proučavanih sojeva. Sekvencionom analizom konstitutivnog *gyrB* gena određena je genotipska srodnost 10 reprezentativnih sojeva porijeklom iz Crne Gore sa referentnim sojevima. Na osnovu analize *gyrB* gena i grupisanja sojeva patovara *pruni* i *juglandis* u jednu homogenu grupu, može se zaključiti da *gyrB* gen ne predstavlja pogodan genetički marker za utvrđivanje

filogenetskih odnosa među patovarima *pruni* i *juglandis*. Sekvenciona analiza 16S rRNA gena, soja B15, izolovanog iz badema, pokazala je da proučavani soj takođe pripada bakteriji *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*.

Proučavanjem dejstva baktericida i antibiotika na razvoj bakterijskih ćelija u *in vitro* uslovima, ustanovljen je visok nivo otpornosti na bakar sulfat i visok nivo osjetljivosti na streptomycin sulfat.

Ključne riječi: koštičave voćke, badem, bakterioze, *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*, identifikacija, PCR, genetički diverzitet, MLSA

Naučna oblast: Biotehničke nauke

Uža naučna oblast: Fitopatologija

UDK broj: 632.35:[634.2+ 634.55(497.16)(043.3)]

BACTERIA AS PATHOGENS OF STONE FRUITS AND ALMOND IN MONTENEGRO

ABSTRACT

Stone fruit and almond production are economically important and provide considerable incomes for the growers worldwide. In Montenegro this production is characterized as intensive and semi-intensive, while almond production is mainly intended for household consumption.

The Montenegro stone fruit and almond production is often compromised by different phytopathogenic bacteria, especially when environmental conditions favour infection and spread of the disease.

During the two year survey (2017-2018), symptomatic samples of plant material of stone fruits and almond from different geographical locations in Montenegro were collected. From the diseased tissue, 68 bacterial strains were isolated, and studied using conventional and modern methods.

All studied strains were Gram-negative, catalase positive, oxidase negative, obligate aerobic, and caused hypersensitive reaction of tobacco and geranium leaves. Based on pathogenic, morphological, biochemical-physiological and molecular characteristics, isolated strains were classified into two genera: *Xanthomonas* i *Pseudomonas*. Pathogenicity of tested strains was confirmed by reproducing the symptoms on leaves, fruits and twigs of their corresponding host plants.

Based on morphological, pathogenic, biochemical and molecular characteristics, 29 strains were differentiated in the genus *Pseudomonas*. Investigated strains produced fluorescent pigment on King's medium B and small, circular, glossy, greyish-whitish colonies on nutrient agar. The strains differed in levan production, vitality on nutrient sucrose agar (NSA) and ice nucleation activity. Results of GATTA tests were not sufficient and reliable for differentiating *P. syringae* strains at or below the pathovar level. The *syrB* gene coding for syringomycin synthesis, was detected in 25 of tested strains. The results of Rep-PCR using BOX primer, revealed high genetic diversity of the *Pseudomonas* strains isolated from stone fruits and almond in Montenegro. Multilocus sequence analysis (MLSA) was performed for 28 strains, using four housekeeping genes: *gapA*, *gltA*, *gyrB* and *rpoD*. The results of MLSA showed that 27 studied strains belonged to the genomic species 1, *P. syringae sensu stricto*, corresponding to *P. syringae* phylogroup 2. However, strains from the same phylogroup 2 did not form a monophyletic cluster. The exception was the strain K6 isolated from apricot, which belonged to genomic species 2, phylogroup 3. The 16S rRNA gene was analyzed for four strains which did not have a gene for syringomycin synthesis. The comparison of the obtained sequences with those previously deposited in the NCBI database showed that these strains belong to *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. Based on the obtained results, 29 strains were identified as *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*.

A total of 38 strains were identified as *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* based on their morphological, pathogenic, biochemical and molecular characteristics. Colonies on yeast extract-dextrose-CaCO₃ agar medium (YDC) were yellow, convex and mucoid. All strains hydrolyzed esculin and didn't grow at 37°C. Out of all, four strains hydrolyzed starch and two strains didn't hydrolyze gelatin. The results of Rep-PCR using BOX primer, indicated population homogeneity of our *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* strains and low genetic diversity among them. PCR analysis, with a pair of primers XapY17-F/ XapY17-R, produced a single characteristic band of 943 bp in 37 strains. Sequence analysis of housekeeping *gyrB* gene revealed genotypic relatedness of ten representative strains originating from Montenegro with referent *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* strains. Based on the analysis *gyrB* gene and grouping of strains of pathovars *pruni* and *juglandis* into one homogeneous group, it can be concluded that the *gyrB* gene is not a suitable genetic marker for determining phylogenetic relationships between pathovars *pruni* and *juglandis*. Sequence

analysis of 16S rRNA gene of the strain B15, isolated from almond, showed that the strain belonged to *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* as well.

All tested strains *in vitro* showed high level of resistance to copper sulfate and high level of sensitivity to streptomycin sulfate.

Key words: stone fruits, almond, bacterial diseases, *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*, identification, PCR, genetic diversity, MLSA

Scientific field: Biotechnical Science

Scientific subfield: Phytopathology

UDC number: 632.35:[634.2+ 634.55(497.16)(043.3)]

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	2
2.1 Porijeklo, značaj i biologija koštičavih voćaka i badema	2
2.2 Proizvodnja koštičavih voćaka i badema u svijetu.....	3
2.3 Proizvodnja koštičavih voćaka i badema u Crnoj Gori.....	4
2.4 Bakterioze koštičavih voćaka i badema	5
2.4.1 <i>Pseudomonas syringae</i> – prouzročivač bakterioznog raka i izumiranja koštičavih voćaka	5
2.4.2 <i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>pruni</i> – prouzročivač bakteriozne pjegavosti koštičavih voćaka.....	12
2.4.3 <i>Xylella fastidiosa</i> - prouzročivač lažne patuljavosti breskve i paleži lišća badema, šljive i trešnje.....	23
2.4.4 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> - prouzročivač bakterioznog raka korijena.....	25
2.4.5 Pregled proučavanja bakterioza koštičavih voćaka i badema u Crnoj Gori.....	26
3. RADNA HIPOTEZA	28
4. MATERIJAL I METODE RADA	29
4.1 Obilazak terena i prikupljanje uzoraka biljnog materijala	29
4.2 Izolacija patogena iz biljnog materijala.....	29
4.3 Održavanje i čuvanje bakterija u kolekciji.....	29
4.4 Izgled i razvoj kolonija na hranljivim podlogama.....	30
4.5 Patogene odlike sojeva	30
4.5.1 Hipersenzitivna reakcija (HR)	30
4.5.2 Test patogenosti na biljci domaćinu	30
4.6 Opšti testovi za identifikaciju sojeva bakterija.....	31
4.6.1 Razlikovanje bakterija po Gramu	31
4.6.2 Aktivnost oksidaze.....	31
4.6.3 Aktivnost katalaze	32
4.6.4 Oksidativno-fermentativni metabolizam glukoze (O/F test)	32
4.7 Identifikacija sojeva bakterija roda <i>Pseudomonas</i>	32
4.7.1 Stvaranje fluorescentnog pigmenta.....	32
4.7.2 Vitalnost bakterija na NAS podlozi.....	32
4.7.3 LOPAT testovi.....	33
4.7.4 GATTa testovi	34
4.7.5 Stvaranje čestica leda.....	35
4.8 Identifikacija sojeva bakterija roda <i>Xanthomonas</i>	39
4.8.1 Hidroliza skroba.....	39

4.8.2 Hidroliza želatina.....	40
4.8.3 Hidroliza eskulina.....	40
4.8.4 Maksimalna temperatura razvoja.....	40
4.9 Molekularna identifikacija i karakterizacija proučavanih sojeva.....	40
4.9.1 Ekstrakcija DNK.....	40
4.9.2 Detekcija <i>syrB</i> gena.....	41
4.9.3 Detekcija <i>ftsX</i> gena.....	41
4.9.4 Sekvenciona analiza 16S rRNK gena.....	42
4.9.5 Rep-PCR.....	42
4.9.6 Analiza multilokusnih sekvenci (MLSA).....	43
4.9.7 Sekvenciona analiza <i>gyrB</i> gena.....	43
4.10 Proučavanje osjetljivosti sojeva prema baktericidima.....	44
5. REZULTATI.....	46
5.1 Obilazak terena i simptomi oboljenja.....	46
5.2 Izgled i razvoj kolonija na hranljivim podlogama.....	52
5.3 Patogene odlike sojeva.....	53
5.3.1 Hipersenzitivna reakcija.....	53
5.3.2 Test patogenosti na biljci domaćinu.....	54
5.4 Opšti testovi za identifikaciju sojeva bakterija.....	59
5.4.1 Razlikovanje bakterija po Gramu.....	59
5.4.3 Aktivnost katalaze.....	59
5.4.4 Oksidativno-fermentativni metabolizam glukoze (O/F test).....	60
5.5 Identifikacija sojeva bakterija roda <i>Pseudomonas</i>	60
5.5.1 Fluorescentnost sojeva.....	60
5.5.2 Vitalnost bakterija na NAS podlozi.....	61
5.5.3 LOPAT testovi.....	62
5.5.4 GATTa testovi.....	62
5.5.5 Stvaranje čestica leda.....	63
5.6 Identifikacija sojeva bakterija roda <i>Xanthomonas</i>	64
5.6.1 Hidroliza skroba.....	65
5.6.2 Hidroliza želatina.....	65
5.6.3 Hidroliza eskulina.....	65
5.6.4 Maksimalna temperatura razvoja.....	65
5.7 Molekularna identifikacija i karakterizacija proučavanih sojeva.....	69
5.7.1 Detekcija <i>syrB</i> gena.....	69
5.7.2 Detekcija <i>ftsX</i> gena.....	69

5.7.3 Sekvenciona analiza 16S rRNK gena sojeva roda <i>Pseudomonas</i>	70
5.7.4 Sekvenciona analiza 16S rRNK gena sojeva roda <i>Xanthomonas</i>	70
5.7.5 Rep-PCR analiza sojeva roda <i>Pseudomonas</i>	71
5.7.6 Rep-PCR analiza sojeva roda <i>Xanthomonas</i>	71
5.7.7 MLSA analiza	72
5.7.8 Analiza <i>gyrB</i> gena.....	75
5.8 Proučavanje osjetljivosti sojeva prema baktericidima	77
6. DISKUSIJA	78
7. ZAKLJUČAK	85
8. LITERATURA	86

1. UVOD

Rod *Prunus* pripada porodici *Rosaceae* i obuhvata vrste značajne za voćarsku proizvodnju kao što su *P. armeniaca* L. (kajsija), *P. persica* (L.) Batsch. (breskva/nektarina), *P. domestica* L. (evropska, domaća šljiva), *P. salicina* Lindl. (kinesko-japanska šljiva), *P. avium* L. (trešnja), *P. cerasus* L. (višnja) i *P. dulcis* (Mill.) D.A. Webb (badem). Voćne vrste kajsija, breskva, nektarina, šljiva, japanska šljiva, trešnja i višnja nazivaju se koštičave voćke zbog plodova tipa koštunice, koji se sastoje od sočnog mezokarpa (mesa ploda). U mesu ploda nalazi se čvrsta koštica (endokarp) u kojoj se nalazi sjemenka. Badem ima isti tip ploda kao koštičavo voće, ali se ubraja u jezgraste voćke jer je jestivi dio ploda sjemenka (jezgra) (Keserović i sar., 2016).

Proizvodni zasadi koštičavih voćaka i badema su među ekonomski najvažnijim zasadima širom svijeta i uzgajaju se u različitom obimu na svim kontinentima. Broj država koje gaje koštičave voćke se povećava u posljednjoj deceniji što je rezultiralo povećanjem površina u cijelom svijetu (Lamichhane, 2014). Plodovi koštičavih voćaka i sjemenke badema imaju veoma veliku biološku vrijednost zbog čega su značajni u ljudskoj ishrani, a u novije vrijeme postaju veoma važan faktor u prevenciji mnogih bolesti.

U svim područjima gajenja, rentabilnost proizvodnje koštičavih voćaka ugrožavaju različite biljne bolesti. Parazitiraju ih gljive, bakterije, fitoplazme i virusi. Po značaju, raširenosti, ali i nemogućnosti uspješne kontrole, izdvajaju se oboljenja bakterijske i fitoplazmne prirode (Obradović i sar., 2010).

Kao značajni patogeni koštičavih voćaka i badema do sada su opisane četiri vrste bakterija: *Pseudomonas syringae* sa svojim patogenim varijetetima: pv. *syringae* – prouzročivač rak-rana i bakterijskog izumiranja voćaka, pv. *morsprunorum* – prouzročivač rak-rana i izumiranja grana koštičavih voćaka, pv. *persicae* – prouzročivač bakterijskog izumiranja breskve, nektarine i kinesko-japanske šljive, pv. *avii* – prouzročivač bakterijskog raka trešnje; *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* – prouzročivač bakterijske pjegavosti koštičavih voćaka; *Xylella fastidiosa* – prouzročivač lažne patuljivosti breskve i paleži lišća badema, šljive i trešnje i *Agrobacterium tumefaciens* – prouzročivač bakterijskog raka korijena.

U državama sa dugom tradicijom u gajenju ovih voćnih vrsta veoma su rasprostranjene pojedine ekonomski značajne vrste patogenih bakterija, dok se u mnogim državama svijeta sve češće pojavljuju nalazi karantinskih bakterija, kao što su *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*, *Pseudomonas syringae* pv. *persicae* i *Xylella fastidiosa*.

Glavni izvor infekcije može biti zaražen sadni materijal. Sadnja zaraženog sadnog materijala rezultira pojavom infekcije značajnijeg intenziteta, što može ugroziti proizvodnju koštičavih voćaka i badema i umanjiti ekonomski efekat.

Širenje proizvodnih zasada koštičavih voćaka u Crnoj Gori i intenzivan uvoz sadnog materijala iz zaraženih područja, značajno povećavaju rizik od pojave bakterioza jačeg intenziteta ili od unošenja karantinskih vrsta bakterija. Iako u posljednjem periodu nisu zabilježene štete većeg obima, imajući u vidu da bakterioze koštičavih voćaka i badema nisu bile predmet intenzivnih proučavanja duži niz godina u Crnoj Gori, postoji opravdana potreba za sveobuhvatnim proučavanjem ovog problema, koji bi u povoljnim uslovima za nastanak infekcije, mogao značajno da ugrozi proizvodne zasade koštičavih voćaka. Karantinski status *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*, *Pseudomonas syringae* pv. *persicae* i *Xylella fastidiosa* opravdava potrebu da se provjeri i utvrdi njihovo eventualno prisustvo na teritoriji Crne Gore, kao i da se detaljnije prouče ranije utvrđene i ekonomski značajne vrste bakterija kao patogeni koštičavih voćaka i badema u Crnoj Gori, koji mogu prouzrokovati značajne štete.

2. PREGLED LITERATURE

2.1 Porijeklo, značaj i biologija koštičavih voćaka i badema

Koštičave voćke i badem pripadaju rodu *Prunus*, porodici *Rosaceae*, podporodici *Prunoideae*. Rod *Prunus* obuhvata nekoliko stotina vrsta drveća i žbunova (Keserović i sar., 2016). Plodovi koštičavih voćaka na tržištu se koriste u svježem stanju ili za preradu i proizvodnju raznih proizvoda. Iako plodovi sadrže manju količinu ugljenih hidrata, a zanemarljivu masti i bjelančevina, značajni su u ishrani ljudi zbog velike količine minerala i vitamina. Koštičave voćke uspješno se uzgajaju u širokom rasponu klimatskih i zemljišnih uslova, pri čemu plodnost i drenaža zemljišta imaju veliki uticaj na zdravstvenu ispravnost, proizvodnju i kvalitet voća.

Kajsija (*Prunus armeniaca* L.) se gaji u toplijim predjelima kontinentalne klime, između 30° južne i 45° sjeverne geografske širine (Keserović i sar., 2010), ali i u područjima sa suptropskom klimom. Porijeklom je iz Kine. Latinski naziv kajsije *Prunus armeniaca* dobijen je na osnovu pretpostavke da je njeno porijeklo iz Jerermenije (Armenije). Jerermenija je samo put kojim je kajsija stigla u Evropu. Kajsiju je u Grčku i Albaniju donio Aleksandar Veliki (356. – 323. godine p.n.e.), odakle je stigla u Italiju (Janick, 2005). U sedmom vijeku Arapi su donijeli kajsiju u Španiju, a u južnu Francusku prije 1000 godina. Kajsija je donijeta u Englesku i Rusiju tek u sedamnaestom vijeku. Dalje širenje kajsije po svijetu nastavili su španski doseljenici koji su kajsiju donijeli u osamnaestom vijeku, u Virdžiniju i Kaliforniju, a britanski doseljenici u Australiju (Faust et al., 2011). Plod kajsije se koristi u svježem, sušenom ili prerađenom stanju i izuzetno je vrijedan zbog visokog sadržaja β -karotena, kojeg ima više od 18 mg/kg (Kantoci, 2008). Visok sadržaj šećera u plodovima čini ih pogodnim za sušenje.

Breskva (*Prunus persica* (L.) Batsch.) je voćka umjerenog klimata i može se uspješno gajiti na 300 do 500 m nadmorske visine (Keserović i sar., 2016), dok uspijeva i u suptropskoj klimi. Latinski naziv breskve *Prunus persica* vezuje se za Persiju, gdje je breskva stigla vjerovatno iz Kine u prvom vijeku p.n.e. (Janick, 2005). Breskva je u Kini uzgajana 3300-2500 godine p.n.e. (Faust et al., 2011). Iz Kine, preko Persije prenijeta je u Grčku 332 godine p.n.e. (Janick, 2005), a zatim se proširila po cijelom svijetu. Breskva je značajna voćna vrsta, čiji se plodovi koriste u svježem i prerađenom stanju. Nektarina (*P. persica* var. *nectarina*) je varijetet breskve čiji plod ima potpuno glatku i sjajnu pokožicu.

Trešnja (*Prunus avium* L.) je najbolje prilagođena evropskoj kontinentalnoj klimi i uspeva do 1300 metara nadmorske visine (Keserović i sar., 2016). Potiče iz područja oko Kaspijskog i Crnog mora, odakle se polako širila, u početku i pomoću ptica, otuda i latinski naziv trešnje *P. avium* (Dirlewanger et al., 2007). Plodovi trešnje se pretežno koriste u svježem stanju, a u manjoj mjeri i za preradu u domaćinstvu ili industriji u: slatko, kompot, džem, voćne salate, sokove i sl.

Višnja (*Prunus cerasus* L.) je porijeklom iz sličnih područja kao i trešnja (Watkins, 1995) i najviše se koristi za industrijsku preradu. U industriji se od plodova višnje spravljaju sokovi, džem, marmelada, kompot, slatko, voćni jogurt, čokoladne bombone. Pored toga, plodovi višnje se mogu čuvati u zamrznutom stanju ili koristiti kao sušeni plodovi. Od plodova se mogu spravljati i alkoholna pića, kao što su liker i rakija višnjevača. Plodovi nekih sorti, koje se odlikuju manjim sadržajem kisjelina se mogu koristiti i za potrošnju u svježem stanju.

Šljiva (*Prunus domestica* L.) je porijeklom sa Bliskog istoka, sa područja južno od Kavkaza između Crnog i Kaspijskog mora koje obuhvata Gruziju, Jerermeniju, Azerbejdžan i sjevernu visoravan Irana (Hedrick, 1911). Nedavno otkriće divljih sastojina *P. domestica* u provinciji Xinjiang na sjeverozapadu Kine ukazuje na mogućnost kineskog porijekla šljive (Lin and Shi, 1990). Dosadašnja istraživanja ne mogu u potpunosti objasniti porijeklo *Prunus domestica*. Japanska šljiva (*Prunus salicina* Lindl.) vodi porijeklo iz Kine. Plod šljive se koristi kao svježe, sušeno ili prerađeno voće. Od plodova šljive se pravi pekmez, džem, kompot, sokovi i rakija.

Badem (*Prunus dulcis* (Mill.) D.A. Webb) je porijeklom iz centralne do jugozapadne Azije (Watkins, 1976). Badem se u početku pripitomio i širio po srednjoj i jugozapadnoj Aziji, od Irana do Kine, Indije, Pakistana, Turske, Izraela i Sirije. Grčka i persijska civilizacija imale su važnu ulogu u širenju badema u Sredozemlju. U Grčku je donesen oko 200 do 300 godine p.n.e. odakle se širio po Mediteranu (Janick, 2005). Jezgra badema se mogu konzumirati sirova ili pečena, mogu se mljeti u bademov maslac ili koristiti za proizvodnju bademovog mlijeka.

Vrste roda *Prunus* su višegodišnje biljke koje formiraju deblo i krošnju sa granama. Koštičave voćke imaju dvopolne (hermafroditne) cvjetove, a većina sorti trešnje i badema, neke sorte višnje, kajsije i šljive su stranooplodne voćne vrste. Većina vrsta roda *Prunus* su diploidi, čiji broj hromozoma iznosi 16, višnja (*P. cerasus* L.) je tetraploid sa 32 hromozoma, a evropska šljiva je heksaploid sa 48 hromozoma (Keserović i sar., 2016). Plod koštičavog voća je monokarpna koštunica. Mesnati dio ploda je jestiv, a sačinjavaju ga pokožica (egzokarp) i meso (mezokarp). U mesu ploda nalazi se čvrsta koštica (endokarp) i u njoj sjeme. Plod se razvija iz plodnika tučka i naziva se pravi. Kod badema plod je takođe tipa monokarpna koštunica prema botaničkoj klasifikaciji, ali se djelovi ploda egzokarp (pokožica), mezokarp (klapina) i endokarp (koštica) ne koriste u ishrani, već upotrebnu vrijednost ima sjemenka (Keserović i sar., 2016).

2.2 Proizvodnja koštičavih voćaka i badema u svijetu

Rod *Prunus* obuhvata oko 200 vrsta, koje su rasprostranjene uglavnom u sjevernim umjerenim područjima, dok gajene voćke ovog roda obuhvataju najmanje sedam različitih botaničkih vrsta: *P. persica* (breskva), *P. armeniaca* (kajsija), *P. domestica* (evropska šljiva), *P. salicina* (japanska šljiva), *P. avium* (trešnja), *P. cerasus* (višnja) i *P. dulcis* (badem). Koštičave voćke se u velikom obimu uzgajaju u većini država Europske unije, iako raspodjela vrsta varira među mediteranskim i sjevernim državama. Trešnje se uzgajaju na cijelom Evropskom kontinentu, dok se višnje uzgajaju u središnjim i sjevernim predjelima. Šljive se obično uzgajaju u središnjim, jugoistočnim i južnim državama, dok se japanska šljiva uzgaja u Mediteranskim područjima. Breskve, nektarine i kajsije najviše se uzgajaju oko Sredozemlja, u Španiji, južnoj Francuskoj, Italiji i Grčkoj. Proizvodnja badema prisutna je u najtoplijim područjima EU, kao što su: Španija, Grčka i južna Italija (EFSA, 2014).

Proizvodnja kajsije najvećim dijelom je koncentrisana u državama Azije, među kojima je Turska najveći proizvođač. U sezoni 2018. godine, ona je proizvela 750.000 tona kajsije. Uzbekistan je drugi najveći proizvođač kajsije sa 493.842 tona, dok je na trećem mjestu Iran sa 342.479 tone (FAOSTAT, 2018). Od evropskih država najveći proizvođač kajsije je Italija, koja je 2018. godine proizvela 229.020 tona (FAOSTAT, 2018).

Najveću proizvodnju breskve i nektarine ima Kina sa 15 miliona tona u 2018. godini. U EU najveća proizvodnja breskve i nektarine je u Italiji, Grčkoj i Španiji. Italija je na drugom mjestu po proizvodnji, sa 1 milionom tona, a slijede Grčka sa 968.720 tona i Španija sa proizvodnjom od 903.809 tona (FAOSTAT, 2018).

Proizvodnja šljive najvećim dijelom je koncentrisana u Aziji, Evropi i Sjevernoj Americi. Najveći proizvođač šljive u svijetu je Kina, u kojoj je 2018. godine proizvedeno 6.8 miliona tona, a na drugom mjestu je Rumunija sa proizvodnjom od 842.132 tone, dok je na trećem mjestu Srbija sa 430.199 tona (FAOSTAT, 2018).

Vodeća država po proizvodnji trešnje u svjetu u 2018. godini je Turska, sa prosječnom proizvodnjom od 639.564 tone. Slijede SAD sa 312.430 tona i Uzbekistan sa 172.035 tona. Od evropskih država najveći proizvođači trešnje su Italija, koja je 2018. godine proizvela 114.798 tona i Španija sa proizvodnjom od 106.584 tone (FAOSTAT, 2018).

Proizvodnja višnje najvećim dijelom takođe je koncentrisana u Aziji. Vodeća država po proizvodnji višnje je Rusija, koja je 2018. godine proizvela 232.200 tona, na drugom mjestu je Ukrajina sa proizvodnjom od 218.700 tona, dok je na trećem mjestu Poljska sa 200.632 tone (FAOSTAT, 2018).

Badem se uzgaja u mnogim djelovima svijeta, a pet vodećih država su SAD, Španija, Iran Maroko i Turska. SAD dominiraju u svjetskoj proizvodnji badema sa godišnjom proizvodnjom u 2018. godini od 1,8 miliona tona. Slijede Španija sa 339.033 tone i Iran sa 139.029 tona (FAOSTAT, 2018).

2.3 Proizvodnja koštičavih voćaka i badema u Crnoj Gori

Posljednjih godina, mjerama podrške Ministarstva poljoprivrede Crne Gore za podizanje novih i modernizaciju/opremanje postojećih proizvodnih voćnih zasada, svjedoci smo povećanja površina pod voćnjacima. Investiranje u savremene zasade voćaka i redovna primjena agrotehnike imaju za cilj redovan i stabilan prinos visokog kvaliteta, što dugoročno utiče na povećanje obima i kvaliteta proizvoda, obima prerade, obogaćivanje asortimana proizvoda i dostizanje višeg nivoa konkurentnosti.

Voćarska proizvodnja u Crnoj Gori dobija sve veći značaj s obzirom na zemljišne, klimatske i ekonomske prilike. Centralni dio Crne Gore, tj. područje bazena Skadarskoj jezera, karakteriše mediteranska klima povoljna za voćarsku proizvodnju. Osim južnog i centralnog dijela izuzetno povoljni uslovi za gajenje voćarskih kultura su i u sjevernom dijelu Crne Gore. U Zetsko–Bjelopavličkoj ravnici dominantna vrsta postaje breskva, dok u kontinentalnom dijelu najveći značaj ima šljiva. Višnja i trešnja sve više zauzimaju značajno mjesto u voćarstvu, posebno u individualnom sektoru, dok su kajsija i badem sporadično zastupljene, uglavnom na okućnicama i za potrebe domaćinstva. U strukturi voćarstva u Crnoj Gori, voćnjaci breskve su na petom mjestu, dok su u strukturi koštičavih voćaka, na drugom mjestu, odmah nakon zasada šljive (Prekić et al., 2016).

Breskva je najznačajnija voćna vrsta u rejonu Podgorice i Crnogorskog primorja, gdje se gaje rane i srednje rane sorte. Zajedno sa agrumima u Crnoj Gori, breskva se najviše gaji u intenzivnim zasadima (Prekić i sar., 2011). Ukupna proizvodnja breskve u 2018. godini iznosila je 1.291,6 tona, od toga na plantažama se proizvodi 1.241,3 tone, sa površinom zasada od 61,4 ha i prinosom od 20,2 t/ha (MONSTAT, 2019).

Najveći dio proizvodnje trešnje i višnje u Crnoj Gori ostvaruje se na seoskim gazdinstvima gdje se ove kulture gaje ekstenzivno ili poluintenzivno. Trešnja se uspješno gaji u područjima sa umjereno-kontinentalnom klimom (Prekić i Odalović, 2012). U toplijim regionima Crne Gore, kao što je Crnogorsko primorje, rane sorte trešnje sazrijevaju početkom maja, dok na višim nadmorskim visinama pozne sorte trešnje sazrijevaju do kraja avgusta (Odalović i Prekić, 2011). Trešnja veoma dobro uspijeva u srednjem dijelu Crne Gore, ali i na brdovitim proplancima sa višom nadmorskom visinom. Višnja predstavlja veoma perspektivnu voćnu vrstu. Proizvodnja trešnje i višnje u 2006. godini iznosila je 1.916 tona (Prekić i sar., 2009).

Proizvodnja kajsije skoncentrisana je u široj okolini Podgorice i Bijelog Polja. Ova voćna vrsta se gaji ekstenzivno na okućnicama ili u vidu manjih zasada sa veoma oskudnom primjenom agrotehničkih mjera, pa je rodnost niska i alternativna (Odalović i Prekić, 2010).

U strukturi voćarstva Crne Gore, prema ukupnom broju stabala kao i prosječnoj godišnjoj proizvodnji plodova, šljiva već duži niz godina zauzima vodeće mjesto. Broj stabala šljive čini više od 50% ukupnog broja stabala kontinentalnih voćaka u Crnoj Gori (Prekić i sar., 2009). Ukupna proizvodnja šljive u 2018. godini iznosila je 11.835,8 tona. Od toga na plantažama se proizvodi 1.378,6 tona, sa površinom zasada od 281,8 ha i prinosom od 4,9 t/ha (MONSTAT, 2019). Šljiva se pretežno gaji u brdovitim i planinskim područjima sjevernog dijela Crne Gore. Ukupan broj stabala se posljednjih 10 godina neznatno smanjuje, ali se ukupna proizvodnja na godišnjem nivou povećava, što ukazuje na to da se ekstenzivna proizvodnja sve više zamjenjuje poluintenzivnim i intenzivnim načinima uzgoja. Očite su i promjene u sortimentu ove vrste voćaka (Šebek i sar., 2013).

U Crnoj Gori postoje povoljni prirodni i ekonomski uslovi za intenzivnu voćarsku proizvodnju, ali te mogućnosti još uvijek nisu dovoljno iskorišćene (Prekić i sar., 2009).

Upotrebna vrijednost plodova koštičavih voćaka u Crnoj Gori je uglavnom za svježu potrošnju, dok je prerada ograničena prerađivačkim kapacitetima.

2.4 Bakterioze koštičavih voćaka i badema

Kao značajni patogeni koštičavih voćaka i badema do sada je u svijetu opisano sedam vrsta bakterija: *Pseudomonas syringae* sa patogenim varijetetima *syringae*, *morsprunorum*, *avii*, *persicae* i *cerasicola* - prouzrokovajući bakteriozni rak i izumiranje koštičavih voćaka; *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* – prouzrokovatelj bakteriozne pjegavosti koštičavih voćaka; *Xylella fastidiosa* – prouzrokovatelj lažne patuljivosti breskve i paleži lišća badema, šljive i trešnje i *Agrobacterium tumefaciens* – prouzrokovatelj bakterioznog raka korijena. U novije vrijeme opisane su tri nove vrste bakterija: *Pseudomonas cerasi* - prouzrokovatelj bakterioznog raka trešnje u različitim regionima Poljske (Kałużna et al., 2016), *Xanthomonas prunicola* - novi patogen nektarine u Španiji (López et al., 2018) i *Agrobacterium arsenijevicii* patogen džanarike (*Prunus cerasifera*) (Kuzmanović et al., 2015).

2.4.1 *Pseudomonas syringae* – prouzrokovatelj bakterioznog raka i izumiranja koštičavih voćaka

Bakteriozni rak, nakon više od jednog vijeka od pojave i proučavanja, predstavlja i dalje aktuelan problem i prouzrokuje značajne gubitke u proizvodnji koštičavih voćaka širom svijeta. Do danas, opisano je šest filogenetski različitih patogenih varijeteta bakterije *P. syringae* koji prouzrokuju ekonomski značajne bolesti na vrstama roda *Prunus*: *P. syringae* pv. *syringae* (Pss), *P. syringae* pv. *morsprunorum* rasa 1 (Psm R1), *P. syringae* pv. *morsprunorum* rasa 2 (Psm R2), *P. syringae* pv. *avii* (Psa), *P. syringae* pv. *persicae* (Psp) i *P. syringae* pv. *cerasicola* (Psc).

Pss ima najširi krug domaćina u okviru vrste *P. syringae*, jer parazitira i jabučaste voćke kao i veliki broj drvenastih i zeljastih biljaka (Arsenijević, 1997). Patogeni varijeteti *syringae* i *morsprunorum* široko su rasprostranjeni i prouzrokuju značajne gubitke u rasadnicima i voćnjacima koštičavih voćaka i badema širom svijeta, redukujući kvalitet i kvantitet plodova.

2.4.1.1 Patogeni varijeteti bakterije *Pseudomonas syringae*

Pseudomonas syringae kao patogen voćaka je veoma rasprostranjen i smatra se ekonomski štetnom bakterijom u čitavom svijetu. Bakterija *Pseudomonas syringae* prvi put je opisana u Holandiji 1902. godine, od strane van Hall na jorgovanu (*Syringa vulgaris* L.), po čemu je i dobila ime. Prva proučavanja bakterioznog raka započeta su u Poljskoj od strane Brzezinski (1902), koji je ustanovio da je guma i izumiranje koštičavih voćaka (kajsije, breskve, šljive i trešnje) bakterioznog porijekla. U Engleskoj, Wormald (1932), opisuje bakteriju *Pseudomonas morsprunorum* kao prouzrokovatelja bakterioznog raka u zasadima šljive. U Americi, u državi Oregon, Cameron (1960; 1962) dokazuje da sušenje spavajućih popoljaka trešnje prouzrokuje bakterija *P. syringae*. Crosse i Garrett (1963) i Garrett i sar. (1966), na osnovu proučavanja osjetljivosti prema bakteriofagima, kao i biohemijsko-fizioloških karakteristika i testova patogenosti, dokazuju da su *P. syringae* i *P. morsprunorum* posebne vrste, iako prouzrokuju iste simptome (sušenje grana, cvjetova i formiranje rak-rana) na koštičavim voćkama. Kasnije Freigoun i Crosse (1975) u Engleskoj opisuju *P. morsprunorum* rasu 2 kao patogena trešnje, koja se razlikuje u patogenim i nekim biohemijskim karakteristikama od *P. morsprunorum* rase 1. Taksonomska pozicija *P. syringae* i *P. morsprunorum* je promijenjena nakon revizije statusa vrste *P. syringae*, kada dobijaju taksonomsku poziciju patogenog varijeteta vrste *P. syringae* (Young et al., 1978; Young et al., 1992). Kasnija klasifikacija *P. syringae* patogenih varijeteta u genomvrste, primjenom DNK:DNK hibridizacije, pokazuje da su Psm R1 i Psm R2, dva potpuno različita organizma jer pripadaju genomskoj vrsti 2 i 3, dok bakterija Pss pripada genomskoj vrsti 1 (Gardan et al., 1999). Psa, patogen divlje trešnje i Psp, patogen breskve, nektarine i japanske šljive,

prispadaju genomskoj vrsti 3, dok Psc, patogen trešnje i kajsije pripada genomskoj vrsti 2. Spektar domaćina patogenog varijeteta *morsprunorum* ograničen je na koštičave voćke, najčešće šljivu, višnju i trešnju, dok patogeni varijetet *syringae* može parazitirati i jabučaste voćke, kao i čitav niz drugih drvenastih i zeljastih biljaka (Arsenijević, 1997). Najnovija istraživanja svrstavaju patogene varijete bakterije *P. syringae* u tri filogenetske grupe (PG): PG1 obuhvata Psm R2, Psa i Psp; PG2 - Pss i PG3 - Psm R1 i Psc (Ruinelli et al., 2019).

Posljednjih godina, u Evropi, sojevi *P. syringae* porijeklom iz koštičavih voćaka i badema su proučavani u Njemačkoj (Hinrichs-Berger, 2004), Belgiji (Gilbert et al., 2009), Poljskoj (Sulikowska and Sobiczewski, 2008; Bultreys and Kałużna, 2010; Kałużna et al., 2010), Srbiji (Balaž et al., 2016), Engleskoj (Hulin et al., 2018), Italiji (Giovanardi et al., 2018), gdje različiti patogeni varijeteti i rase *P. syringae* prouzrokuju bakterijski rak koštičavih voćaka. U Americi, u državama Oregon (Spotts et al., 2010) i Mičigen (Renick et al., 2008), *P. syringae* prouzrokuje bakterijski rak trešnje i višnje. Bakterijski rak kajsije i breskve u regionu Kurdistan (Karimi-Kurdistani and Harighi, 2008), i badema u provinciji Isfahan (Samavatian, 2006) je jedna od najznačajnijih bolesti ovih vrsta u Iranu.

Problematika bakterijskog raka i izumiranja koštičavih voćaka proučavana je posljednjih 50 godina u Srbiji, što je od izuzetnog značaja i za Crnu Goru, zbog intenzivnog uvoza i zasnivanja voćnjaka sadnim materijalom porijeklom iz Srbije. U ranijem periodu *P. syringae* je najviše proučavan kao prouzročivač prevremenog sušenja kajsije (Arsenijević, 1968; Arsenijević, 1976; Arsenijević i Balaž, 1978; Arsenijević, 1982), a kasnije kao patogen plodova višnje na kojima prouzrokuje nekrozu u veoma visokom procentu (Balaž i sar., 1988; Balaž i Arsenijević, 1989). Detaljnija proučavanja bakterioza trešnje u Srbiji su započeta tokom posljednjih godina (Gavrilović and Milijašević, 2004; Gavrilović i sar., 2005). Bakterija je u Srbiji eksperimentalno potvrđena kao patogen kruške, jabuke, kajsije, trešnje, višnje, šljive i maline, a njeni patogeni sojevi su izolovani i iz džanarike i breskve (Gavrilović, 2006; Obradović et al., 2008; Gavrilović et al., 2009). Sušenje stabala šljive zabilježeno je u zapadnoj Srbiji u periodu od 2003-2005. godine, posle ekstremno niskih temperatura tokom zimskih mjeseci, a osjetljivom se naročito pokazala sorta Čačanska lepatica (Gavrilović, 2009). Bakterija *P. syringae* je izolovana i iz nekrotičnih pupoljaka breskve tokom 2008. i 2009. godine u regionu Smedereva, gdje breskva ima veliki ekonomski značaj i zastupljena je na velikim površinama (Gavrilović et al., 2009). Bakterijski rak je i dalje aktuelan patogen koštičavih voćaka u Srbiji (Ivanović et al., 2009; Obradović i sar., 2010; Ivanović et al., 2012; Balaž et al., 2016).

Psp prouzrokuje bakterijski rak breskve. Ova bakterija je prvi put izolovana iz breskve u Francuskoj (Vigouroux, 1967; loc. cit. EPPO Standards PM 7/43 (1)). Kasnije, utvrđena je na breskvi, nektarini i japanskoj šljivi u Novom Zelandu (Young, 1987, 1988) i na džanarici u Engleskoj (Garrett and Crosse, 1967; loc. cit. Young et al., 1996). Takođe, prisutna je i u Hrvatskoj, gdje se nalazi na A2 karantinskoj listi. Ovaj patogen može dovesti do brzog izumiranja voćaka i zabilježene su ozbiljne štete u regionima gajenja breskve i nektarine u Francuskoj i Novom Zelandu. S obzirom da su inficirani i plodovi, dolazi do značajnog smanjenja njihovog kvaliteta i prinosa.

Japanski naučnici su 2000. godine, opisali novi patogeni varijetet - Psc, koji prouzrokuje gale na stablu i grančicama trešnje (Kamiuntan et al., 2000), dok je u Francuskoj 2003. godine, opisan Psa kao patogen divlje trešnje (Ménard et al., 2003). Psa se odlikuje slabim razvojem na Kingovoj podlozi B, na kojoj se razvijaju kolonije od 1-1,5 mm u prečniku, koje ne proizvode fluorescentni pigment ni nakon tri dana inkubacije. Simptomi oboljenja koje prouzrokuje Psa slični su bakterijskom izumiranju. Na oboljelim biljkama uočavaju se rak-rane, isticanje smole i nekroza ksilema.

2.4.1.2 Ekonomski značaj

Posljednjih godina, *Pseudomonas syringae* na koštičavim voćkama prouzrokuje značajne gubitke širom svijeta i u povoljnim klimatskim uslovima može predstavljati ograničavajući faktor proizvodnje. Bakteriozni rak kajsije je široko rasprostranjen u Turskoj (Donmez et al., 2010), gdje je u periodu od 2006–2007. godine, u provinciji Malatya, stradalo do 20% stabala kajsije (Donmez et al., 2010), dok je u periodu od 1999-2001. godine, bolest primjećena na oko 80% stabala kajsije u komercijalnim voćnjacima i u okućnicama u provincijama Erzurum, Erzincan i Artvin (Kotan and Sahin, 2002). U sjeveroistočnom dijelu Bugarske, u provincijama Rouse, Silistra, Dobrich, više od 85% stabala kajsije je inficirano prouzrokovateljem bakterioznog raka u periodu od 2004-2006. godine (Ivanova, 2009). U centralnoj Italiji Pss uočen je u gotovo 30% jednogodišnjih stabala kajsije (Scortichini, 2006). U Poljskoj se zbog povoljnih klimatskih uslova, bolest javlja svake godine. Posljednja epidemija iz 2007. godine, prouzrokovala je značajne ekonomske gubitke u voćnjacima višnje (Bultreys and Kałużna, 2010). U Americi, u državi Oregon, štete na mladim stablima trešnje, u uslovima povoljnim za razvoj patogena, mogu biti i do 75% (Spotts et al., 2010).

2.4.1.3 Opšte karakteristike i taksonomija *Pseudomonas syringae*

P. syringae je aerobna, Gram-negativna, asporogena i štapičasta bakterija, sa lofotrihim ili amfitrihim rasporedom cilija. Pripada klasi III: *Gammaproteobacteria*, red IX: *Pseudomonadales*, familija: *Pseudomonadaceae*, rod: *Pseudomonas* (Garrity et al., 2004).

Rod *Pseudomonas* je podijeljen u dvije filogenetske linije (*Pseudomonas aeruginosa* i *Pseudomonas fluorescens*) na osnovu evolucionih odnosa, analizom multilokusnih sekvenci (MLSA) četiri konstitutivna gena (Mulet et al., 2010). Linija *P. fluorescens* sadrži šest filogenetskih grupa, jedna od njih predstavlja *Pseudomonas syringae* i uključuje većinu fitopatogena iz roda *Pseudomonas* (Bull et al., 2010).

Pseudomonas syringae kompleks se kao termin tradicionalno koristi da iskaže taksonomsku "zbrku" (Gutiérrez-Barranquero et al., 2019), trenutno obuhvata 15 bakterijskih vrsta i više od 60 različitih patogenih varijeteta vrste *P. syringae sensu stricto* (Gomila et al., 2017). Taksonomija *P. syringae* kompleksa se u posljednjih 40 godina znatno mijenjala, i još uvijek ostaje sporna i do kraja nedefinisana.

Na osnovu spektra domaćina i simptomatologije, vrsta *P. syringae* je podijeljena na patogene varijetete (Dye et al., 1980; Young et al., 1978; Young, 2010). Klasifikacija koja se zasniva na patogenim varijetetima široko je prihvaćena i danas, iako ne otkriva genetske odnose između patogenih varijeteta. Na osnovu DNK homologije u okviru *Pseudomonas syringae* kompleksa definisano je devet genomvrsta (eng. genomospecies) (Gardan et al., 1999), koje nam pružaju informacije o povezanosti patogenih varijeteta u okviru *Pseudomonas syringae* kompleksa. Pss pripada genomskoj vrsti 1, Psm R1 i Psm R2 genomskim vrstama 2 i 3, dok Psp i Psa genomskoj vrsti 3.

Filogenetski pristup zasnovan na analizi multilokusnih sekvenci (MLSA) imao je značajan uticaj na klasifikaciju vrste *P. syringae* (Sarkar and Guttman, 2004; Hwang et al., 2005; Almeida et al., 2010; Bull et al., 2011; Berge et al., 2014). *P. syringae* kompleks se analizom parcijalnog *rpoD* gena, sastoji od sedam različitih filogenetskih grupa (Parkinson et al., 2011). Takođe na osnovu analize 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). Do danas je unutar vrste *P. syringae* kompleksa definisano ukupno trinaest filogrupa, pri čemu grupe od 1. do 8. obuhvataju najzastupljenije patovare i patotipske sojeve, dok su u ostale uglavnom smješteni sojevi izolovani iz prirodnog okruženja (Berge et al., 2014). Nedavna studija koja se zasnivala na poređenju sekvenci čitavih genoma vrste *P. syringae* potvrdila je da je veliki broj sojeva pogrešno klasifikovan (Gomila et al., 2017).

2.4.1.4 Simptomi bolesti

Bakteriozni rak je najčešće korišćen naziv za oboljenja koje izazivaju patogeni Pss i Psm. Ovi patogeni mogu inficirati sve nadzemne biljne organe (stablo, grane, plodove, cvjetove, listove i pupoljke). Najkarakterističniji simptomi su nekroze i rak-rane koje se razvijaju na granama i stablu (Slika 1d), a koje mogu dovesti do izumiranja čitavih biljaka. Oboljeli ljetorasti zaostaju u porastu, požute i izumiru, dok rak-rane na starijim granama dovode do usporavanja njihovog razvoja, a na kraju i do potpunog sušenja. Ako je zaraza jaka dolazi do djelimičnog (Slika 1a) ili potpunog sušenja voćaka (Arsenijević, 1997). Povrede nastale orezivanjem ili nekim drugim mehaničkim putem, najčešće predstavljaju početna mjesta obrazovanja rak-rana. Na granama, u ranim fazama infekcije uočava se ulegnuto, vodenasto i blago smeđe obojeno tkivo, koje kasnije postaje tamnije i na kraju crvenkasto-crne boje (Bultreys and Kalužna, 2010). Rak-rane i nekroze su često praćene isticanjem smole. Izraženost simptoma zavisi od starosti biljke, tkiva koje je inficirano, agresivnosti bakterijskih sojeva, kao i klimatskih i zemljišnih faktora (Obradović i sar., 2010).

Rak-rane na grančicama razvijaju se u osnovi cvjetnih i lisnih pupoljaka. Na trešnji i višnji, većina rak-rana se uočava na rodnim grančicama i to na mjestima lisnih ožiljaka, što najčešće dovodi do izumiranja rodnih grančica. Na šljivi, rak-rane se većinom formiraju na stablu i glavnim granama, što dovodi do izumiranja odraslih biljaka (Obradović i sar., 2010).

Simptomi na listovima su u vidu sitnih okruglastih pjega (Slika 1b), različite veličine, koje mogu biti okružene hlorotičnim oreolom, u početku svijetlosmeđe, a koje kasnije postaju tamnosmeđe boje. Patogeni često inficiraju cvjetove, koji postaju smeđi i često opadaju prije punog otvaranja.

Lisni i cvjetni pupoljci na kajsiji, trešnji i breskvi inficirani ovim patogenima, se ne otvaraju u proljeće, suše se i izumiru (Slika 1c). Na mladim plodovima višnje i trešnje kod osjetljivih sorti, razvijaju se ulegnute, smeđe-crne, nekrotične površine različitog oblika (Slika 1e) (Bultreys and Kalužna, 2010).

2.4.1.5 Epidemiologija patogena

Bakterije Pss, Psm i Psp se tokom perioda mirovanja održavaju endofitno u rak-ranama na oboljelim granama i pupoljcima voćaka (Young, 1988; Scortichini, 2010). Pss i Psm se mogu održavati i na površini tkiva (na pupoljcima i granama), dok su korovi i biljni ostaci značajan izvor zaraze za Pss (Arsenijević, 1997; Obradović i sar., 2010).

Patogeni Pss i Psm u godišnjem ciklusu bolesti, imaju zimsku i ljetnju fazu (Crosse, 1966), pri čemu se zimska faza odvija u kori debla i grana, a ljetnja na listovima i drugim zelenim tkivima. Pss, Psm i Psp tokom jeseni i zime inficiraju razne djelove koštičavih voćaka kroz povrede nastale orezivanjem, preko inficiranih pupoljaka i lisnih ožiljaka (Arsenijević, 1997; Hinrichs- Berger, 2004; Obradović i sar., 2010). Na oboljelim voćkama obično se ispoljavaju simptomi rak-rana i sušenja voćaka već naredne godine (Arsenijević, 1997). Rak-rane se obrazuju tokom jeseni, sporije tokom zime, najintenzivnije početkom vegetacije, dok je njihov razvoj zaustavljen tokom ljeta (Obradović i sar., 2010). U slučaju infekcije debla nastaje izumiranje cijele voćke, a kod infekcije grana suše se njeni pojedini djelovi (Arsenijević, 1997; Kennelly et al., 2007). Infekcija pupoljaka bakterijama Pss i Psm dešava se u jesen kada širenjem bakterija kroz biljno tkivo dolazi do infekcije u osnovi pupoljaka i njihovog izmrzavanja tokom zime (Obradović i sar., 2010).

U vrijeme vegetacije bakterija Pss kolonizira elemente ksilema, dok tokom perioda mirovanja voćaka bakterija kolonizira kako elemente drveta (ksilema), tako i elemente kore (kambijum, floem) (Arsenijević, 1997).

U proljeće patogeni Pss i Psm koloniziraju listove, cvjetove i mlade plodove, što označava početak epifitne faze (Scortichini, 2010). Epifitna populacija bakterija Pss, Psm i Psp je veoma važan činilac u nastanku infekcije. Pri vlažnom i prohladnom vremenu tokom cvjetanja, preko prirodnih otvora i povreda, Pss i Psm vrše infekciju cvjetova. Bakterije kroz cvijet prodiru do rodnih grančica i glavnih grana gdje dolazi do formiranja rak-rana (Obradović i sar., 2010).

Infekcija lišća ostvaruje se kroz stomine otvore. Najčešće infekcije su tokom prohladnog i vlažnog proljeća. Pojava simptoma tipa pjegavosti na listovima je rezultat intercelularnog širenja patogena koji svojim toksinima izaziva smrt ćelija (Obradović i sar., 2010). Epifitna faza životnog ciklusa Pss i Psm odvija se na listovima gotovo tokom cijelog vegetacionog perioda, ali je brojnost epifitne populacije najveća tokom proljeća i jeseni, kada su temperature niže i povećava se količina padavina (Scortichini, 2010). Tokom ljetnjih mjeseci, nastupanjem visokih temperatura, brojnost epifitne populacije se smanjuje, a bakterije nalaze zaštitu u stominim dupljama. U jesen, kišovito vrijeme uvećava brojnost epifitne populacije, koja tada predstavlja izvor inokuluma za svježe lisne ožiljke, pupoljke i grane čime počinje zimska faza bolesti (Crosse, 1966). Inficirano lišće predstavlja takođe značajan izvor inokuluma za širenje patogena Psp tokom proljeća i jeseni.

Epidemiologija patovara *syringae* i *morsprunorum* na koštičavim voćkama je vrlo slična. Ipak, utvrđeno je postojanje razlike u pogledu održavanja bakterija u rak-ranama i razvoju rak-rana (Crosse, 1966; Arsenijević, 1997). Kao posljedica infekcije patogenim varijetetom *morsprunorum*, u jesen i zimu, formiraju se rak-rane, iz kojih se u proljeće infekcija širi na lišće. U slučaju patogenog varijeteta *syringae*, rak-rane mogu biti višegodišnje i u njima prezimljava manja populacija bakterija (Obradović i sar., 2010).



Slika 1. Simptomi bakterioznog raka i izumiranja koštičavih voćaka: (a) sušenje grana kajsije; (b) pjegavost listova trešnje; (c) nekroza i sušenje pupoljaka kajsije; (d) nekroza grane kajsije; (e) ulegnute nekroze na plodovima trešnje. (Foto: www.atlasplantpathogenicbacteria)

2.4.1.6 Detekcija, identifikacija i genetički diverzitet *Pseudomonas syringae*

Za identifikaciju sojeva *P. syringae* koriste se klasične i molekularne metode. Klasične bakteriološke metode su zahtjevne, iziskuju obiman laboratorijski rad i vrijeme za njihovo izvođenje, a dobijeni rezultati su nedovoljni za diferencijaciju patogena do nivoa patovara. Ipak

klasične metode u identifikaciji fitopatogenih bakterija su još uvijek nezaobilazne i obuhvataju izolaciju bakterija, proučavanje morfoloških, biohemijskih i patogenih odlika.

Provjera patogenosti na biljkama domaćinima, pored hipersenzitivne reakcije na listovima duvana, osnovni je test u identifikaciji sojeva *P. syringae*. Patogenost sojeva *P. syringae* može se provjeriti na biljci domaćinu, njenim mladima, listovima ili plodovima (Bedford et al., 2003; Kałużna and Sobiczewski, 2009; Hulin et al., 2018; Ruinelli et al., 2019).

Najčešće korišćena podloga za izolaciju patogena koštičavih voćaka i badema je Kingova podloga B. Među patogenim varijetetima koji parazitiraju koštičave voćke, *persicae* i *avii* ne stvaraju fluorescentni pigment na Kigovoj podlozi B, dok kod patogena varijeteta *morsprunorum* reakcija može biti promjenjiva (Bultreys and Kałużna, 2010).

LOPAT testovi (eng. levan production, oxidase activity, potato rot, arginine dihydrolase activity, tobacco hypersensitivity reaction) omogućuju razlikovanje *P. syringae* sojeva od ostalih fluorescentnih vrsta *Pseudomonas* (Lelliot et al., 1966).

GATTA testovi (eng. gelatine hydrolysis, aesculin hydrolysis, tyrosinase activity, utilization of tartaric acid), su korisni za diferencijaciju Pss i Psm R1 (Latorre and Jones, 1979), ali ne i za Psm R2 i druge patogene varijete *P. syringae*, za koje su uglavnom rezultati promjenjivi ili nepoznati (Gilbert et al., 2009).

Neke vrste roda *Pseudomonas*, uključujući Pss, *P. viridiflava* i *P. fluorescens*, posjeduju osobinu stvaranja čestica leda (eng. Ice Nucleation Activity - INA). Ovaj test se koristi za diferencijaciju sojeva Pss i Psm. INA nikada nije utvrđena u testiranim sojevima Psm R1 (Lindow, 1983; Mittelstädt and Rudolph, 1998; loc cit. Bultreys and Kałużna, 2010). Za stvaranje čestica leda kod Pss odgovoran je jedan gen koji kodira protein spoljne membrane (Moore, 1988).

Jedna od karakteristika Pss jeste sposobnost da sintetiše toksin siringomicin, koji ima važnu ulogu u patogenosti ove bakterije. Detekcija gena za sintezu siringomicina izvodi se PCR metodom korišćenjem specifičnih prajmera Syr B1/B2 (Sorensen et al., 1998). Bultreys i Kałużna (2010) navode da su rezultati ispitivanja toksina samo informativni, jer proizvodnja toksina nije konstantna kod Pss. Takođe, sinteza siringomicina može se ispitati korišćenjem gljiva indikatora *Geotrichum candidum* (Latorre and Jones, 1979), *Rhodotorula pilimanae* i *Saccharomyces cerevisiae*. Serološke metode (ELISA i IF test), takođe se primjenjuju za identifikaciju Pss i Psm (Vicente and Roberts, 2007; López et al., 2010).

U identifikaciji patogenih varijeteta *Pseudomonas syringae*, zbog njihove fenotipske i genomske heterogenosti, treba koristiti integrisani pristup, odabirom različitih raspoloživih tehnika (López et al., 2010). Molekularne metode nalaze sve više primjenu jer omogućuju brzu i preciznu identifikaciju kao i određivanje genetičkog diverziteta sojeva *P. syringae*. Najčešće korišćene molekularne metode su Rep-PCR analiza, analiza *gyrB* i *rpoD* sekvence, 16S rRNA sekvence, analiza multilokusne sekvence (MLSA) i druge metode.

U cilju utvrđivanja razlika u populaciji izolovanih sojeva koji uzrokuju bolesti koštičavih voćaka primjenu nalaze Rep-PCR metode (Versalovic et al., 1994; Schaad et al., 2001). Ove metode se zasnivaju na upotrebi specifičnih prajmera koji vezuju i umnožavaju relativno kratke ponavljajuće nukleotidne sekvence u genomu, označene kao repetitivne ekstragenomske palindromske sekvence (REP – PCR), enterobakterijske repetitivne intergenske konsenzus sekvence (ERIC – PCR) i BOX elementi. Za rod *Pseudomonas*, najveći prag diskriminacije imaju BOX prajmeri (Zlatković, 2018). Nedavne studije o ovim metodama potvrdile su da postoji homogenost u različitim DNA regionima kod rasa patovara *morsprunorum* i velika heterogenost među sojevima patovara *syringae* (Gilbert et al., 2009; Kałużna et al., 2010).

Analiza multilokusnih sekvenci (eng. Multilocus sequencing analysis - MLSA) predstavlja jednu od najsavremenijih i najpreciznijih molekularnih metoda. Koristi se u identifikaciji sojeva bakterija do nivoa vrste i podvrste, kao i proučavanjima genetičkog diverziteta usko povezanih vrsta. MLSA se zasniva na analizi konstitutivnih (eng. housekeeping) gena, koji su odgovorni za najvažnije procese i funkcionisanje svake ćelije. Na osnovu filogenetskih analiza konstitutivnih gena sojevi *Pseudomonas* spp. se svrstavaju u četiri (Sarkar and Guttman 2004; Hwang et al., 2005), sedam (Parkinson et al., 2011) i 13 filogenetskih grupa (Berge et al., 2014). Najnovija

proučavanja patogena koštičavih voćaka svrstavaju vrste i patovare unutar *P. syringae* kompleksa u tri filogenetske grupe (PG1, PG2 i PG3) (Ruinelli et al., 2019).

Genska sekvenca ribozomalne RNK nije podložna brzim promjenama tokom evolucije. Zato analiza 16S rRNA gena predstavlja relativno jednostavan i pouzdan put u filogenetskim proučavanjima različitih vrsta bakterija. Analiza sekvenci 16S rRNA gena i konstitutivnih gena, kao i ponavljajućih sekvenci u genomu su korisne metode za identifikaciju i klasifikaciju, kao i za proćavanje raznolikosti sojeva *P. syringae* (Hwang et al., 2005; Bultreys and Kaľuźna, 2010).

2.4.1.7 Kontrola bolesti

Suzbijanje fitopatogenih *Pseudomonas* spp. gotovo je nemoguće, zbog nedostatka efikasnih hemijskih ili bioloških preparata, osjetljivosti biljaka domaćina i endofitne prirode patogena (Kennelly et al., 2007). Nedostatak hemijskih preparata za zaštitu od bakterioznih bolesti u voćnjacima, nameće potrebu za alternativnim metodama kontrole patogena, koje se zasnivaju na preventivnim mjerama, biološkoj kontroli i otpornosti biljaka.

Zaštita od *P. syringae* podrazumjeva integralni pristup koji obuhvata primjenu agrotehničkih, mehaničkih i hemijskih mjera zaštite. Agrotehničke mjere podrazumjevaju korišćenje zdravstveno ispravnog sadnog materijala. Zato je neophodno kontrolisati zdravstveno stanje sadnog materijala prilikom uvoza, kao i u proizvodnji. Sadni materijal u rasadnicima može se inficirati preko pupoljaka ili podloge (Hattingh and Roos, 1995), pri čemu infekcija uglavnom ostaje latentna. Posebnu pažnju treba posvetiti izboru sortimenta i porijeklu sadnog materijala. Povećanju rizika od unošnja i širenja *P. syringae* u Crnoj Gori doprinosi i intenzivan uvoz sadnog materijala, kao i uvođenje u proizvodnju novog osjetljivog sortimenta. Stvaranje otpornih sorti i sadnja manje osjetljivih sorti je mjera koja u budućnosti može doprinijeti boljoj zaštiti od *P. syringae*. Ispitivanjem osjetljivosti sortimenta koštičavih voćaka bavili su se brojni autori (Scortichini et al., 1999; Santi et al., 2004; Singh et al., 2005; Donmez et al., 2010; Gormez et al., 2013; Soleimani et al., 2016). Od agrotehničkih mjera važno je vrijeme i način rezidbe. Tokom rezidbe važno je vršiti dezinfekciju alata, kako bi se ograničilo širenje patogena. Rezidba koja se vrši krajem ljeta, u odnosu na onu tokom jeseni i zime, smanjuje mogućnost infekcije (Hattingh and Roos, 1995).

Izbijanje bakterioznog raka u mladim voćnjacima često se pripisuje lošoj poljoprivrednoj praksi (Hattingh and Roos, 1995). Stresni uslovi prilikom zasnivanja voćnjaka (transport sadnica, povrede koje nastaju njihovom manipulacijom, manje optimalni uslovi proizvodnje) mogu doprinijeti osjetljivosti sadnog materijala na infekciju. Zato je važan i pravilan izbor podloga i sorti za određeni geografski region proizvodnje (Hattingh and Roos, 1995).

Bakteriozni rak se češće javlja na pjeskovitim zemljištima, na zemljištima koja se teško isušuju i tokom dugotrajnih suša. Takođe, mnogi drugi stresni uslovi (povrede od izmrzavanja, rane, prisustvo nematoda i fitopatogenih gljiva, neadekvatna primjena mineralnih đubriva i navodnjavanja) doprinose osjetljivosti biljaka i razvoju infekcije. Uklanjanje korova u voćnjacima na kojima se ova bakterija može održati epifitno, je važna mjera u cilju smanjenja infektionog potencijala.

Mehaničke mjere podrazumjevaju uklanjanje i spaljivanje grana i zaraženih stabala kako bi se sprijećilo dalje širenje patogena na zdrave biljke. Periodično uklanjanje grana sa simptomima rak-rana doprinosi smanjenju razvoja bolesti (Hattingh and Roos, 1995).

Hemijska zaštita uglavnom se zasniva na primjeni preparata na bazi bakra. Međutim njihova primjena ima nekoliko nedostataka: nedostatak sistemičnog djelovanja, pojava rezistentnosti i fitotoksićnost (Obradović i sar., 2010). Jesenjim tretiranjem bakarnim preparatima suzbija se epifitna populacija bakterija, sprijećava se infekcija tkiva kroz lisne ožiljke nastale tokom opadanja lišća i smanjuje se inokulum u rak-ranama. U proljeće, primjenom bakarnih preparata sprijećava se razvoj epifitne populacije, pri čemu se mora voditi računa o fitotoksićnosti. Za hemijsku zaštitu preporučuje se korišćenje antibiotika, koji u većini evropskih država, kao i u Crnoj Gori nemaju dozvolu za primjenu u zaštiti bilja. Primjena pojedinih antibiotika uglavnom daje pozitivne

rezultate, ali pored njihove ograničene dozvole za primjenu, utvrđena je i rezistentnost fitopatogenih bakterija prema većini antibiotika (McManus et al., 2002).

Usled pojave rezistentnih sojeva bakterija prema bakarnim preparatima i antibioticima sve veći značaj ima primjena bakteriofaga kao bioloških agenasa u kontroli bolesti prouzrokovanih fitopatogenim bakterijama. Bakteriofagi posjeduju specifičnost prema srodnim vrstama fitopatogenih bakterija, pa se osim za suzbijanje bolesti koriste i za diferencijaciju srodnih vrsta. Najnovija laboratorijska proučavanja o efikasnosti faga $\phi 6$ u kontroli bolesti Pss, pokazuju da se primjenom ovog faga može smanjiti koncentracija patogena. Kako je fag $\phi 6$ osjetljiv na UV dio spektra sunčevog zračenja, treba ga primjenjivati na kraju dana ili tokom noćnog perioda. Dalja proučavanja potrebno je obaviti u polju kako bi se u potpunosti potvrdio potencijal ovog faga za kontrolu infekcija uzrokovanih Pss (Pinheiro et al., 2019). Fag $\phi 6$ je jedan od najbolje proučenih faga i komercijalno dostupan, koji se koristi za suzbijanje infekcija prouzrokovanih patogenom *P. syringae* pv. *phaseolicola* (Vidaver et al., 1973).

2.4.2 *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* – prouzrokovatelj bakteriozne pjegavosti koštičavih voćaka

Xanthomonas arboricola pv. *pruni* (Vauterin et al., 1995; sin. *X. campestris* pv. *pruni* (Smith, 1903), spada u ekonomski veoma značajne fitopatogene bakterije u svijetu. *X. arboricola* pv. *pruni* (Xap) je regulisan štetni organizam u Evropskoj uniji i nalazi se na Aneksu II Direktive 2000/29/EC, a zbog organičene rasprostranjenosti unutar EPPO regiona nalazi se na EPPO A2 listi.

Ova bakterija inficira samo *Prunus* vrste prouzrokujući bolest poznatu pod različitim imenima: bakteriozni rak koštičavih voćaka, bakteriozna lisna pjegavost koštičavih voćaka, bakteriozna rešetavost koštičavih voćaka i crna pjegavost koštičavih voćaka (Chitambar, 2015). Najčešći domaćini su breskva, nektarina, japanska šljiva, kajsija i badem (Ritchie, 1995). Bakteriozna pjegavost koštičavih voćaka je prvo opisana u Sjevernoj Americi (Mičigen) 1902. godine, na japanskoj šljivi (Smith, 1903) i do danas je njeno prisustvo utvrđeno na svim kontinentima gdje se gaje koštičave voćke (EPPO Standards PM 7/64 (1)).

2.4.2.1. Rasprostranjenost i ekonomski značaj *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*

Xap je trenutno prisutna na pet kontinenata i u gotovo svim državama u kojima se proizvodi koštičavo voće (EFSA, 2014): Južna Afrika i Zimbabve u Africi; Argentina, Bermuda, Brazil, Kanada, Meksiko, SAD i Urugvaj u Americi; Kina, Indija, Japan, Sjeverna i Južna Koreja, Libanon, Pakistan, Saudijska Arabija, Tajvan i Tadžikistan u Aziji; Belgija, Francuska, Njemačka, Mađarska, Italija, Moldavija, Crna Gora, Holandija, Norveška, Rumunija, Rusija, Slovenija, Španija, Švajcarska i Ukrajina u Europi; Australija i Novi Zeland u Okeaniji (EPPO, 2020) (Slika 2). Distribucija patogena nije homogena, u nekim državama patogen je široko rasprostranjen, dok su u drugim zabilježene samo lokalne i sporadične epidemije (Garita-Cambronero et al., 2018). Trenutna rasprostranjenost Xap, gdje patogen povremeno uzrokuje značajne gubitke, ograničena je na nekoliko područja u Mediteranskom dijelu EU, kao što su neke središnje i istočne pokrajine Španije, nekoliko područja u jugoistočnoj Francuskoj i istočna dolina rijeke Po u Sjevernoj Italiji.

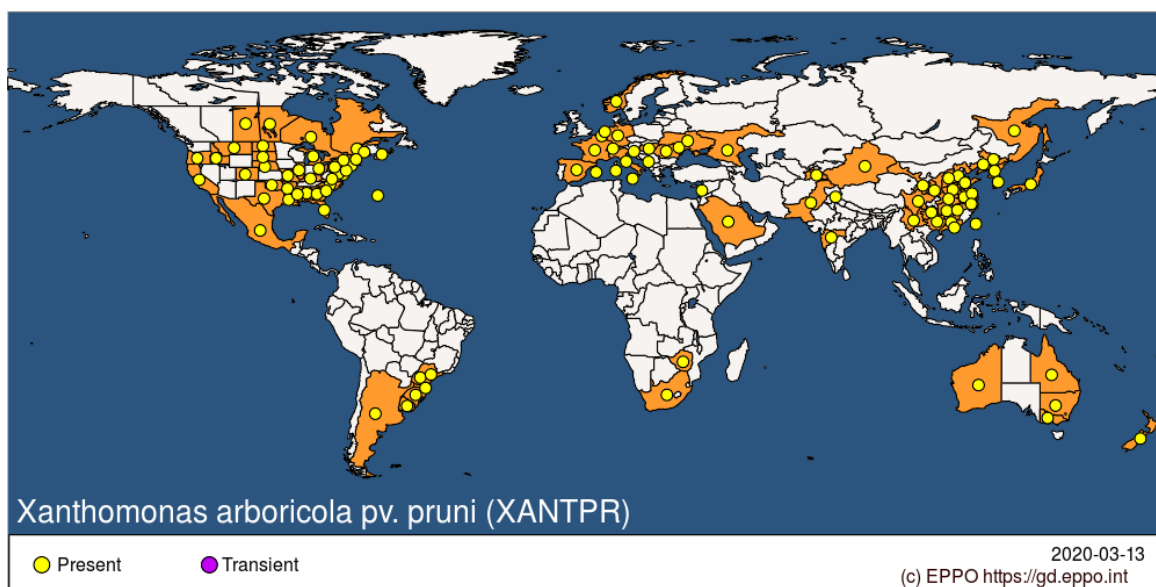
U Švajcarskoj patogen je prvi put identifikovan 2005. godine na stablima i plodovima kajsije (*Prunus armeniaca*), u četiri voćnjaka smještena u kantonu Valais, najznačajnijoj proizvodnoj regiji (Pothier et al., 2010). Tokom intenzivnih istraživanja između 2006. i 2009. u cijeloj regiji gdje je bakterija prvi put otkrivena (208 ha), nije zabilježena pojava bolesti izvan četiri izvorna zaražena voćnjaka, što ukazuje na vjerovatno unošenje patogena putem sadnog materijala (Pothier et al., 2010). U tri voćnjaka Xap se smatra iskorijenjenim, a u četvrtom su uklonjena sva stabla sa simptomima bolesti.

U Italiji patogen je povremeno zabilježen tridesetih godina i u kasnijim decenijama dvadesetog vijeka (Verneau, 1954; Ciccarone, 1958; Ercolani, 1970). Od kraja 1970-ih na sjeveroistoku države (Emilia Romagna, Veneto i Friuli Venezia Giulia) zabilježeno je nekoliko

pojava bolesti na šljivi i breskvi (Bazzi and Mazzucchi, 1980; Stefani et al., 1989; Saccardi and Goio, 1990), a kasnije i u centralnim i južnim italijanskim regionima (Scortichini, 1990; Balestra and Varvaro, 1997; Camele et al., 2001; Marchi et al., 2011). Ovi slučajevi izbijanja bolesti se povezuju sa uvođenjem nove sorte japanske šljive (*P. salicina*), pod nazivom Calita. Ova sorta je nastala ukrštanjem Gaviota × Eldorado i stvorena je 1963. godine u Americi. Sorta Calita je uvedena u proizvodnju zbog izuzetnog kvaliteta ploda. Međutim, Calita se pokazala kao visoko osjetljiva na Xap u klimatskim uslovima sjevernog italijanskog regiona. Većina voćnjaka pod ovom sortom je morala biti iskrčena. Takođe, zamjena evropskih sorti (*P. domestica*) japanskim sortama šljive, za koje je poznato da su umjereno do vrlo osjetljive (Topp et al., 1989; Bazzi et al., 1990), bila je uzrok ponovljenih epidemija u Italiji, sa negativnim ekonomskim efektima (Stefani, 2010). Uvođenje novih sorti breskve za svježiju potrošnju i industrijsku preradu imalo je za posljedicu nekoliko epidemija u sjevernoj Italiji (Stefani et al., 1989) i pojavu bolesti (sa ograničenom distribucijom) u drugim evropskim državama, poput Francuske na breskvi i Španije na breskvi i bademu (Bernadette et al., 1997; Roselló et al., 2012). U Pistoji (Toskana, centralna Italija), patogen je utvrđen na vrsti *Prunus laurocerasus*, sorta Novita, u rasadnicima, gdje može značajno uticati na komercijalnu proizvodnju ove ukrasne vrste (Marchi et al., 2011).

U Francuskoj, prisustvo Xap je prvi put utvrđeno 1995. godine, na breskvi pri čemu su inficirana tri voćnjaka u jugoistočnom djelu departmana Gard (Garcin, 2000). Tokom 2000. godine došlo je do pojave bolesti jačeg intenziteta, koja se širila svake godine u nove zasade koštičavih voćaka (Boudon et al., 2005). Trenutno, patogen je lokalno prisutan u slijedećim departmanima: Gard, Hérault, Drôme, Ardèche, Lot i Garonne, Bouches-du-Rhône (Anonymous, 2013). Glavni domaćini su breskva i japanska šljiva.

U Španiji Xap je sporadično pronađen prvo u Ekstremaduri na japanskoj šljivi 2002. godine i kasnije je došlo do nekoliko epidemija u različitim regijama, koje su pogodile uglavnom japansku šljivu, breskvu i badem, kako u komercijalnim voćnjacima, tako i u rasadnicima (Roselló et al., 2012). Patogen je po prvi put otkriven na bademu (*Prunus dulcis*) u Španiji, u 14 lokaliteta Comunidad Valenciana (istočna Španija) i Aragona (sjeveroistok Španije) između 2006. i 2009. godine. U Španiji, patogen pričinjava ozbiljne gubitke u proizvodnji najosjetljivijih sorata badema poput Antoñeta, Guara, Marta, Mas Bovera i Vayro (Palacio-Bielsa et al., 2010). Takođe došlo je do presretanja pošiljke *Prunus laurocerasus* koja je uvezena iz Francuske u sjevernu Španiju (Anonymous, 2013). Nekoliko presretanja je prijavljeno na biljkama bez simptoma, potvrđujući da je biljni materijal koji se uvozi ili premješta, glavni put unošenja i širenja patogena (Palacio-Bielsa et al., 2014).



Slika 2. Rasprostranjenost *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* u svijetu. <https://gd.eppo.int/taxon/XANTPR/distribution>

U Mađarskoj Xap je prvi put utvrđen na kajsiji (*Prunus armeniaca*), u komercijalnom voćnjaku u Fejér okrugu, pri čemu se infekcija kretala od 10% na sorti Toyesi do 90% na sorti Bergecot. Proizvodnja kajsije u Mađarskoj je ekonomski značajna (na oko 5.000 ha) i prisustvo patogena može značajno uticati na njenu profitabilnost (Schwarczinger et al., 2017). Takođe, patogen je prvi put identifikovan na breskvi (*Prunus persica*), na sortama: Royal Summer, Royal Time, Cresthaven, O'Henry i Redkal, u komercijalnom voćnjaku površine 100 ha, u okrugu Pest. Proizvodnja breskve je ekonomski značajna i odvija se na oko 6.000 ha u komercijalnim voćnjacima u Mađarskoj (Schwarczinger et al., 2018).

U sjevernom i južnom dijelu Holandije patogen je prvi put utvrđen na ukrasnoj vrsti *Prunus laurocerasus* (Tjou-Tam-Sin et al., 2013). U ostalim državama EU (Rumunija i Slovenija) Xap ima ograničenu rasprostranjenost u zasadima koštičavih voćaka. U Bugarskoj je pojava patogena povremeno prijavljena u prošlosti, ali nakon 2007. godine nema novih podataka (EFSA, 2014).

U Tajvanu, patogen je prvi put utvrđen na japanskoj šljivi (*Prunus salicina*), u voćnjaku u Lishanu (Shen et al., 2013). Xap je prvi put utvrđen na bedemu na Novom Zelandu, gdje predstavlja jednu od najznačajnijih bolesti koštičavih voćaka, jer je pronađen i na kajsiji, japanskoj šljivi, nektarini i breskvi (Young, 1977).

Uticaj Xap na *Prunus* vrste, izražava se kroz tri glavna ekonomska faktora: smanjenje kvaliteta i tržišnosti plodova, smanjenje produktivnosti voćnjaka i povećanje troškova proizvodnje sadnog materijala u rasadnicima (Stefani, 2010; Lamichhane, 2014). Patogen je sposoban da izazove ozbiljnu defolijaciju i time oslabi stabla. Jako zaražena stabla postepeno postaju neekonomična, a plodovi su sitni i često netržišni. Propisani standardi kvaliteta voća, koji važe za većinu država koje proizvode koštičavo voće, ne dozvoljavaju stavljanje na tržište plodova sa simptomima prisustva patogena ili kod nekih država, dozvoljeno je samo ako plod sadrži jednu ili dvije površinske pjege prečnika oko 1 mm² (Stefani, 2010). Infekcija patogenom utiče na produktivnost voćnjaka, koja se ogleda kroz dodatni rad koji je potreban da bi se rezidbom uklonile, a zatim i uništile grane i grančice sa simptomim prisustva patogena, što dodatno slabi i smanjuje produktivnost samog voćnjaka, kao i kroz povećan broj hemijskih tretmana (Stefani, 2010).

Procijenjeni gubici na *Prunus* vrstama u Australiji tokom godina pogodnih za razvoj bolesti, iznose 3,1 miliona australijskih dolara godišnje (Stefani, 2010). Bolest ima značajan ekonomski uticaj na proizvodnju japanske šljive, breskve i nektarine, gdje su procijenjeni gubici tokom epidemijskih godina, na više od 10.000 €/ha (Stefani, 2010). U sjevernoj Španiji gubici prinosa u komercijalnim voćnjacima badema iznosili su između 23% i 47% proizvodnje u 2013. i 2014. godini (Palacio-Bielsa et al., 2015).

2.4.2.2 Opšte karakteristike i taksonomija *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*

Prouzrokovatelj bakterijske pjegavosti koštičavih voćaka pripada razdjelu *Proteobacteria*, klasi *Gammaproteobacteria*, redu *Xanthomonadales*, familiji *Xanthomonadaceae*, rodu *Xanthomonas*, vrsti *Xanthomonas arboricola*, patovaru *pruni* (Saddler and Bradbury, 2005). Bakterije iz roda *Xanthomonas* (Dowson, 1939), široko su rasprostranjene u prirodi, većinom kao biljni patogeni, ali i kao epifiti, ne prouzrokujući vidljive simptome (Hayward, 1993).

Vrste roda *Xanthomonas* su Gram-negativne, obligatno aerobne, asporogene, štapičaste bakterije, veličine oko 0,8–2,0 μm × 0,4–0,6 μm (Saddler and Bradbury, 2005). Pokretne su pomoću pojedinačne polarne flagele. Većina se odlikuje stvaranjem žutog pigmenta ksantomonadina (Arsenijević, 1997; Saddler and Bradbury, 2005). Žuta boja ksantomonadina predstavlja važan činitelj za epifitni opstanak *Xanthomonas* vrsta, štiteći bakterije od štetnog dejstva UV zračenja i svjetla (Poplawsky et al., 2000). Naziv vrste "arboricola", što na latinskom jeziku znači "stanovnici stabla", pripisuje se Vauterin i sar. (1995), i obuhvata bakterije koje žive i uzrokuju bolesti drvenastih vrsta.

Rod *Xanthomonas* trenutno sadrži 32 bakterijske vrste koje parazitiraju širok spektar biljnih vrsta, prouzrokujući bolesti ekonomski važnih usjeva (Jacques et al., 2016; López et al., 2018).

Međutim, taksonomija roda *Xanthomonas* je do danas doživjela brojne promjene i još uvijek se mijenja. Prva klasifikacija roda *Xanthomonas* zasnivala se na konceptu "nova biljka domaćin – nova vrsta", na osnovu čega je rod sadržao više od 100 vrsta (Vauterin et al., 2000). Dye i Lelliott (1974) smanjuju broj vrsta roda *Xanthomonas* na pet: *Xanthomonas albilineans*, *Xanthomonas ampelina*, *Xanthomonas axonopodis*, *Xanthomonas campestris* i *Xanthomonas fragariae*. Glavnu reklasifikaciju roda *Xanthomonas* izvršili su Vauterin i sar. (1995), koji su na osnovu DNK-DNK hibridizacije i fizioloških testova, izdvojili 20 homologih DNK grupa. Ovom sistematikom, rod *Xanthomonas* je podijeljen na 20 vrsta i 62 patovara, pri čemu je najbrojnija vrsta *X. campestris*, podijeljena na 16 genetičkih grupa (Vauterin et al., 1995).

X. arboricola je kompleksna vrsta koja pripada DNK homologoj grupi 4 i na osnovu specijalizacije prema biljci domaćinu izdvojeno je šest patogenih varijeteta unutar vrste: *pruni* (*Prunus* sp., koštičave voćke), *corylina* (*Corylus* sp., lijeska), *juglandis* (*Juglans* sp., orah), *populi* (*Populus* sp., topola), *poinsetticola* (*Poinsettia* sp., poinsecija), *celebensis* (*Musa* sp., banana) (Vauterin et al., 1995). Svi imenovani *X. arboricola* patovari potiču iz grupe bakterija koje su prethodno pripadale vrsti *X. campestris*. Izuzetak je patogen jagode, pv. *fragariae*, koji nije bio opisan u to vrijeme. Janse i sar. (2001) opisali su novi patogeni varijetet unutar vrste *X. arboricola*, pv. *fragariae*, koji prouzrokuje palež lišća jagode. Nedavna proučavanja dovode u pitanje status patogenog varijeteta sojeva *X. arboricola* pv. *fragariae*, koji uključuje filogenetski različite sojeve koji ne čine jednu biološku cjelinu (Vandroemme et al., 2013).

Patovari *pruni*, *juglandis* i *corylina* su najvirulentniji i ekonomski najznačajniji. Krug domaćina ovih patogena ograničen je na jednu ili nekoliko biljnih vrsta, što ukazuje na visoku specifičnost i adaptaciju prema domaćinu. Patovari *pruni* i *corylina* klasifikovani su kao karantinski štetni organizmi u mnogim državama, kao i u EU (EFSA, 2014; Fischer-Le Saux et al., 2015). Među patovarima *pruni*, *juglandis* i *corylina*, patovar *pruni* je monomorfan, visoko prilagođen *Prunus* vrstama, sa izraženom patogenošću i niskom genetskom varijacijom između sojeva (Fischer-Le Saux et al., 2015). Preostali patovari *X. arboricola*, su sastavljeni od „slabo patogenih sojeva“ ili su „saprofitski ili oportunistički patogeni“, jer ne prouzrokuju epidemije na biljkama domaćinima (Vandroemme et al., 2013; Lamichhane, 2014; Fischer-Le Saux et al., 2015).

2.4.2.3 Simptomi bolesti

Simptomi bolesti koje prouzrokuje Xap, mogu varirati u zavisnosti od vrste inficirane biljke i biljnog dijela. Bakterija inficira kako zeljaste (listovi, pupoljci, mladi izdanci, plodovi) tako i drvenaste (grančice, grane, stablo) djelove. Međutim, simptomi se ne pojavljuju na cvjetovima.

Simptomi bakterijske pjegavosti koštičavih voćaka se mogu razlikovati u zavisnosti od regiona gajenja. U Italiji simptomi oboljenja su različiti od uobičajeno opisanih. Ispoljavaju se samo na listovima i plodovima breskve i nektarine, dok se rak-rane razvijaju na granama i stablu šljive (Battilani et al., 1999).

U proljeće u vršnom dijelu prezimljelih grančica breskve pojavljuju se rak-rane prije nego se razviju zeleni izdanci. Ove rak-rane su najčešće izdužene, mogu postepeno obuhvatiti granu, nakon čega djelovi grana iznad rane izumiru. Tkivo, neposredno ispod izumrle kore tamne je boje i u njemu su prisutne bakterije. Ovakve promjene na granama su poznate pod nazivom "crni vrh". Kasnijom infekcijom grančica, stvaraju se ljetnje rak-rane oko lenticela, koje su tamne, ulegnute, kružne do eliptične, oivičene vodenastom zonom. Na grančicama šljive i kajsije, rak-rane su višegodišnje i progresivno se šire u periodu od dvije do tri godine.

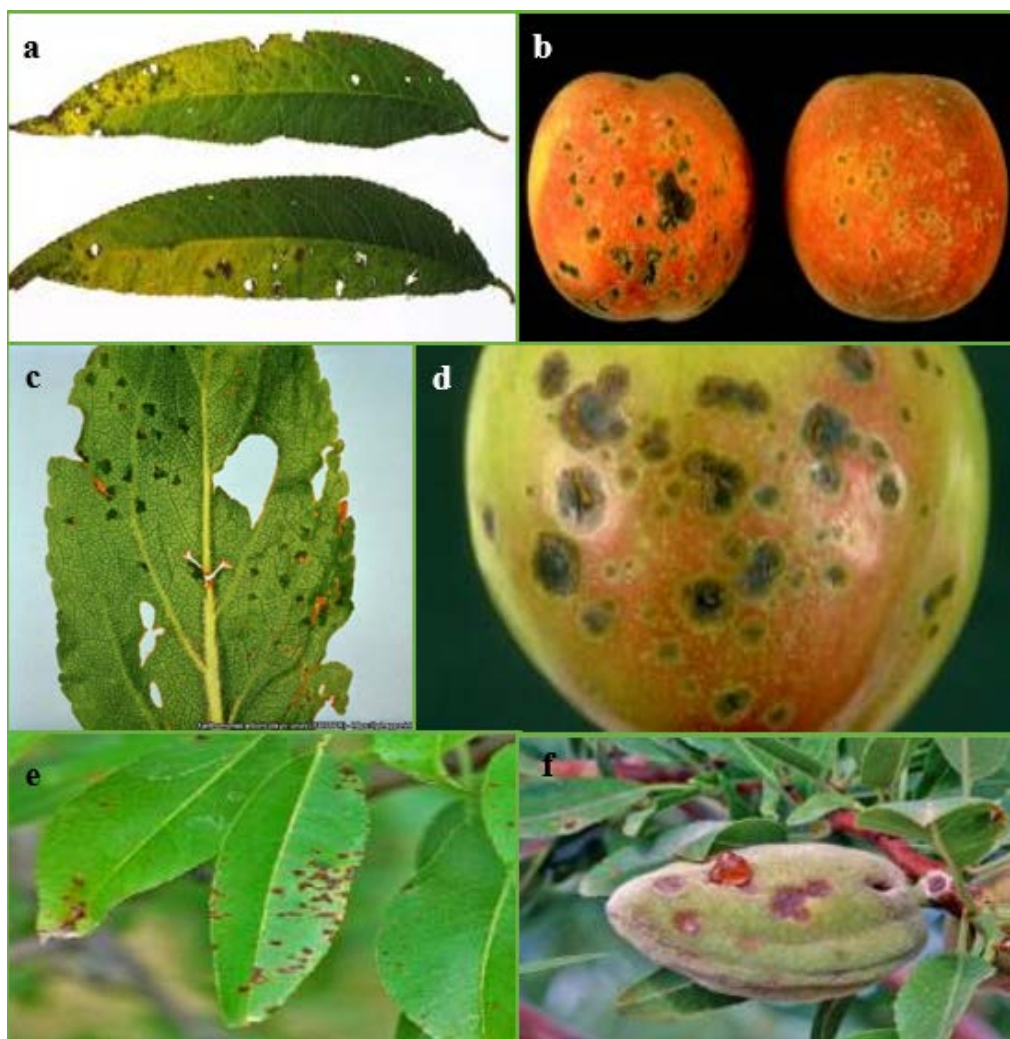
Na lišću breskve, simptomi se prvo uočavaju na naličju kao male, blijedo zelene do žute, kružne ili nepravilnog oblika zone sa svijetlijim centrom. Ove pjege se uvećavaju i postaju vidljive na licu lista, postaju uglaste i poprimaju tamnoljubičastu, smeđu ili crnu boju. Pjege mogu biti okružene hlorotičnim oreolom. Kasnije dolazi do ispadanja tkiva u okviru pjega čime lišće dobija šupljikav izgled (Slika 3a). Pjege su uglavnom koncentrisane pri vrhu lista ili duž centralnog nerva, zbog zadržavanja kapljica kiše ili rose, što utiče na povećanu koncentraciju bakterija. U jakim infekcijama može doći do defolijacije (EPPO Standards PM 7/64 (1)). Fenofaza u kojoj dolazi do

infekcije je obično neposredno prije nego što listovi dostignu svoj puni razvoj. Kod breskve i nektarine može se primjetiti karakteristično smjenjivanje boja smeđe, žute do zelene pri vršnom dijelu listova (Garita-Cambronerero et al., 2018).

Na površini nesazrelih plodova breskve pojavljuju se male, ulegnute kružne pjegae smeđe boje sa vodenastim ivicama ili svjetlozelenim oreolom. Usled prirodnog uvećavanja plodova dolazi do pucanja tkiva u okviru pjega (Slika 3b). Smola se može izlučiti iz pukotina na tkivu, posebno nakon obilnih kiša (EPPO Standards PM 7/64 (1)). Slični simptomi su i na podovima kajsije i nektarine.

Na lišću šljive, početni simptomi su u vidu nepravilnih vodenastih pjega, koje veoma brzo postaju crvenkasto-smeđe, zatim smeđe nakon čega dolazi do nekroze zaraženih djelova (Slika 3c). Nekrotične pjege ispadaju stvarajući šupljikavost lišća (EPPO Standards PM 7/64 (1)). Kod evropske i japanske šljive, trešnje i višnje lišće dobija šupljikav izgled i ostaje na drvetu (Garita-Cambronerero et al., 2018).

Simptomi na plodu šljive mogu biti različiti, od kružnih ulegnutih crnih zona vodenastih ivica do sitnih jamičastih pjega (Slika 3d). Na plodovima trešnje i višnje u nekim slučajevima, rane infekcije mogu izazvati njihovu deformaciju i bakterije su prisutne u tkivu epidermisa sve do koštice. Simptomi na podovima se pojavljuju 3-5 nedjelja nakon precvjetavanja i razvijaju se dok se mijenja boja ploda, tj. do početka procesa zrenja. Veoma često se simptomi pojavljuju nakon povreda nastalih kao posljedica grada (EPPO Standards PM 7/64 (1)).



Slika 3. Simptomi bakteriozne pjegavosti koštičavih voćaka: (a) pjegavosti i šupljikavosti lišća breskve; (b) ulegnute, nekrotične pjege na plodovima breskve; (c) uglaste i vodenaste pjege na listu šljive; (d) krupne, ulegnute, crne pjege na plodu šljive; (e) ulegnute, plutaste lezije iz kojih se izlučuje smola na plodu badema; (f) pjegavost listova badema. (Foto: <https://gd.eppo.int/taxon/XANTPR/photos>)

Na mladarima badema pojavljuju se sitne, okruglaste, vlažne pjegе, sive boje. One ubrzo postaju smeđe, slivaju se međusobno i na njima se, pri većoj vlažnosti vazduha uočava sluzasto-žučkast bakterijski eksudat. Na oboljelim granama badema pojavljuju se karakteristične rak-rane koje dovode do njihovog sušenja. Nekroza i sušenje grana počinje od perifernih grančica, prelazi postepeno na starije grane zahvatajući veći dio krošnje, što dovodi do sušenja cijelog stabla. Razvojem ovih simptoma kod badema, dolazi do masovne i prevremene defolijacije (Panić et al., 1998).

Na lišću badema prvo se pojavljuju sitne, prozirne pjegе, koje se proširuju dobijajući okruglast ili nepravilan oblik. Boja ovih pjega, u početku je žučkasto crvena, vremenom prelazi u crvenu i na kraju smeđu (Slika 3e). Pjega su okružene hlorotičnim oreolom. Tkivo u okviru pjega postepeno nekrotira, suši se i ispada, što dovodi do šupljikavosti ili rešetavosti lišća (Panić et al., 1998). Na lišću badema rijetko se primjećuje žućenje i defolijacija (Palacio-Bielsa et al., 2010; Rosellò et al., 2012).

U rano proljeće, na zaraženim plodovima badema uočavaju se ulegnute, plutaste lezije iz kojih se izlučuje smola (Palacio-Bielsa et al., 2010; Rosellò et al., 2012). Zaraženi plodovi prerano opadaju ili ostaju pričvršćeni na granama gdje vremenom mumificiraju. Mumificirani plodovi služe kao potencijalni izvor inokuluma (Slika 3f).

U literaturi je nedovoljno podataka o simptomima koje Xap prouzrokuje na trešnji i višnji. Na lišću trešnje razvijaju se simptomi slični kao i na breskvi, ali su rijetko značajni. Inficirano lišće ostaje na granama, dok u okviru pjega dolazi do ispadanja tkiva čime lišće dobija šupljikav izgled (Garita-Cambronero et al., 2018).

Simptomi bakteriozne pjegavosti koštičavih voćaka ponekad se mogu zamjeniti sa simptomima koje prouzrokuju druge bakterije, gljive, virusi ili koji nastaju zbog nedostatka hranjivih materija ili abiotičkih faktora (rane uzrokovane vjetrom ili mehaničkim putem) (Rosellò et al., 2012; Lamichhane, 2014). Simptom pjegavosti lišća osim Xap, prouzrokuju i gljivični patogeni *Wilsomyces carpophilus* i *Venturia carpophila* (Rosellò et al., 2012).

2.4.2.4 Epidemiološko - ekološke karakteristike patogena

Bakteriozna pjegavost prouzrokovana Xap razvija se po start/stop obrascu, tako da izbijanje i intenzitet bolesti uglavnom zavisi od proljećnih vremenskih uslova (Lamichhane, 2014). Zbog relativno dugog životnog ciklusa, koštičave voćke i badem pružaju stalno utočište za opstanak i umnožavanje patogenih bakterija. Na vrstama roda *Prunus*, patogen prezimljava u biljnim tkivima pupoljaka, pukotinama kore (koje pružaju zaštitu patogenu od nepovoljnih klimatskih uslova i hemijskih tretmana) i lisnim ožiljcima (Chitambar, 2015).

Utvrđeni su različiti izvori inokuluma, u zavisnosti od regiona ili *Prunus* vrste. Rak-rane na grančicama su prvo opisane kao najvjerojatnije mjesto za prezimljavanje bakterije na šljivi u Južnoj Africi i Sjevernoj Americi (Dunegan 1932; Du Plessis, 1987). Na breskvi Xap prezimljava pretežno u međučelijskom prostoru tkiva kore, floema i ksilema vršnih djelova ljetorasta (Ritchie, 1995: EPPO/CABI, 1997).

U Italiji, u dolini rijeke Po, utvrđeno je da patogen na breskvi može preživjeti tokom zime u inficiranom opalom lišću na zemlji, u pupoljcima (Dhavantari, 1973) i lisnim ožiljcima, ne prouzrokujući prolječne rak-rane (Zaccardelli et al., 1998). Tokom dvogodišnjeg proučavanja, nisu uočene prolječne i ljetnje rak-rane. Jedini simptomi nalik proljećnim rak-ranama su bili nekoliko nekrotičnih crnih vrhova, iz kojih patogen nije izolovan. Uprkos odsustvu rak-rana, prilično jake infekcije bakteriozne pjegavosti zabilježene su naročito u ljetnjim mjesecima. Ovi podaci potvrđuju prethodna zapažanja u regijama Veneto (Saccardi and Goio, 1990) i Friuli (Stefani et al., 1989) da pupoljci, lisni ožiljci i opalo lišće mogu biti važni izvori inokuluma za prolječne infekcije čak i u odsustvu simptoma „crnih vrhova“ na grančicama. Zaccardelli i sar. (1998) su uspješno izolovali bakterijske ćelije iz opalih listova, nakon sedam mjeseci od opadanja, dokazujući da se nastanak primarnih infekcija iz opalog lišća ne može isključiti. Kao zaključak Zaccardelli i sar. (1998), navode da se biološki ciklus Xap na breskvi u dolini rijeke Po razlikuje od biološkog ciklusa na

šljivi, gdje su rak-rane važni izvori inokuluma za rane infekcije (Bazzi and Mazzucchi, 1980). Do ozbiljnih infekcija breskve u voćnjacima može doći i ako se rijetko uočavaju rak-rane, jer patogen prezimljava u spavajućim pupoljcima i lisnim ožiljcima (Shepard and Zehr, 1994).

Na grančicama japanske šljive i kajsije, rak-rane nastale tokom prethodne sezone nastavljaju sa razvojem u proljeće i predstavljaju izvor inokuluma (Ritchie, 1995). Na bademu patogen prezimi na mumificiranim plodovima i rak-ranama na grančicama (Chitambar, 2015). Osim toga, bakterija može preživjeti i umnožavati se nekoliko sedmica na površini biljaka domaćina ne prouzrokujući simptome bolesti, a takođe može pod povoljnim uslovima preživjeti i umnožavati se i na biljkama koje nisu domaćini (Timmer et al., 1987). Simptomi rak-rana i pjegavosti koštičavih voćaka, koje prouzrokuju patovari *Pseudomonas syringae* se razvijaju sredinom proljeća, dok se simptomi koje prouzrokuje Xap pojavljuju tokom kasnog proljeća - početkom ljeta, a kasne infekcije mogu se pojaviti i u jesen (Stefani, 2010).

Pojava primarnih i sekundarnih infekcija zavisi uglavnom od lokalnih klimatskih uslova. Primarne infekcije nastaju nakon najmanje tri uzastopna kišna dana, sa temperaturama između 14 i 19°C, a napredovanje bolesti je usko povezano sa brojem kišnih dana nakon početka bolesti (Battilani et al., 1999). Temperatura 19–28°C i visoka vlažnost pogoduju umnožavanju bakterija (Morales et al., 2017).

U proljeće prije kretanja vegetacije, bakterija se umnožava u intercelularima prouzrokujući pucanje epidermisa i formiranje proljećnih rak-rana. Inokulum se iz ovih rak-rana širi kapljicama rose, vjetrom i kišom na novonastalo lišće i mlade plodove. Infekcija se odvija kroz prirodne otvore i rane (Lamichhane, 2014).

Prirodni otvori, lisni ožiljci i rane nastale prirodnim putem (kiša, grad i mraz) i pod uticajem čovjeka (rezidba i berba) ili od strane insekata, predstavljaju ulazna mjesta za infekciju. Iz ovog razloga, infekcije su češće i ozbiljnije tokom vegetativnog rasta u proljeće, naročito kada je praćen čestim padavinama. Prodor patogena kroz lisne ožiljke u jesen je potvrđen na japanskoj šljivi u dolini rijeke Po u sjevernoj Italiji (Gasperini et al., 1984).

Bakterija se intenzivno umnožava na površini listova i drugih nadzemnih organa biljke domaćina, gdje se održava u vidu epifitne populacije. Xap se može epifitno održavati na grančicama i pupoljcima breskve i šljive, ne prouzrokujući simptome bolesti (Shepard and Zehr, 1994).

Česti periodi vlage tokom kasnog cvjetanja do nekoliko sedmica nakon opadanja latica su veoma pogodni za primarne infekcije na plodovima i listovima breskve i nektarine (Ritchie, 1995; Battilani et al., 1999). Iz pjega koje se razvijaju na listovima, ističe bakterijski eksudat kojim se ostvaruju sekundarne infekcije. Topla sezona sa temperaturama od 19 do 28°C, česte kiše, vjetrovi i obimna rosa tokom vegetacije pogoduju razvoju sekundarnih infekcija (Zehr et al., 1996). Nasuprot tome, manji broj infekcija se javlja kada su klimatski uslovi topli i suvi, kao i kada je hladno, s obzirom da je Xap mezofilna bakterija i zahtjeva temperature iznad 20°C za njenu reprodukciju (Ritchie, 1995). Periodi vlažnosti duži od 10 h pri temperaturama oko 20°C ili 5 h pri temperaturama između 25 i 35°C bili su neophodni za razvoj bolesti jačeg inteziteta (Morales et al., 2018).

Bakterije se mogu sistemično širiti kroz grane sve do listova (Du Plessis, 1987), ali i u obrnutom pravcu. Glavni put infekcije grančica kod japanske šljive je sistemično premještanje bakterije kroz lisne peteljke iz zaženih listova (Ritchie, 1995). Broj pjega prouzrokovanih Xap na breskvi direktno je proporcionalan koncentraciji inokuluma (Civerolo, 1975).

Lisne pjege obezbjeđuju sekundarni inokulum koji inficira rane i kasno-sezonske plodove voća. Tokom kasno-sezonskih infekcija plodovi breskve su manje zahvaćeni infekcijom u odnosu na listove, što bi se moglo povezati sa nižom gustinom stoma na površini plodova u poređenju sa listovima. Pretpostavlja se da epifitna populacija bakterija, koja dugo opstaje na listovima (Shepard and Zehr, 1994), služi kao inokulum za razvoj bolesti na plodovima breskve.

Simptomi lisne pjegavosti se primjećuju 6-26 dana nakon kišnog perioda koji pogoduje uspostavljanju infekcije. Inkubacioni period na breskvi zavisi od temperature i trajanja vlažnosti listova (Zehr et al., 1996). Inkubacioni period varira između 7 i 25 dana u zavisnosti od toplog ili hladnog vremena, odnosno kada je temperatura 24°C inkubacioni period je 14 dana bez vlažnosti

listova i 10 dana sa 48 h vlaženja listova. Inkubacioni period se povećava od 6 do 14 dana kada se koncentracija inokuluma smanjuje od 10^7 do 10^5 cfu/ml (Battilani et al., 1999).

Uporođo sa infekcijom listova, na mladim izdancima se obrazuju ljetnje rak-rane, ali obično njihov rast biva zaustavljen sa stvaranjem peridermnog tkiva. Takođe, rak-rane imaju tendenciju da se isuše tokom ljetnih mjeseci čime se smanjuje vitalnost bakterija u njima. Iz tog razloga, rak-rane na grančicama šljive i breskve, nastale u ljetnim mjesecima, ne smatraju se važnim mjestom prezimljavanja ili izvora inokuluma za proljećne infekcije. Generalno, kasnije infekcije izdanaka koje se javljaju tokom jesenjeg kišnog perioda, neposredno prije opadanja lišća, kada odbrambena moć biljaka slabi, obezbjeđuju primarni izvor inokuluma za sljedeće proljeće (Obradović i sar., 2010).

Bolest se pojavljuje i širi u proljeće, zatim ljeti malo napreduje, ali u jesen se dešavaju kasne infekcije. Bolest je rijetka u suvljim regionima. Veće štete nastaju na oslabljenim stablima.

Xap se širi različitim putevima širenja lokalno i na daljinu. Lokalno širenje patogena dešava se kalemljenjem, rezidbom i vektorima kao što su grinje i insekti (Goodman and Hattingh, 1986, 1988; Lamichhane, 2014). Kalemljenjem u rasadnicima dokazano je prenošenje patogena (Hattingh, 1988). Lokalno širenje patogena iz rak-rana i mumificiranih plodova je ograničeno i zavisi od rose, kiše i vjetra.

Širenje Xap na daljinu uslovljeno je međunarodnom trgovinom preko zaraženog sadnog materijala i plodova (osim sjemena). Sadni materijal može biti latentno zaražen patogenom i predstavlja put za unošenje i širenje patogena u nova područja (Goodman and Hattingh, 1986; Anonymous, 2013; Palacio-Bielsa et al., 2014). Patogen može prezimjeti u spavajućim pupoljcima i nakon buđenja (otvaranja) pupoljaka, patogen kolonizira mlade listove i plodove (Zaccardelli et al., 1998).

U različitim državama i područjima primjećeno je da epidemije prouzrokovane Xap mogu biti povezane sa razlikama u patogenosti bakterijskih sojeva, varijacijama u osjetljivosti biljnih vrsta i sorti i stanjem zasada (navodnjavanje, ishrana bilja, vrijeme i učestalost rezidbe) (Stefani, 2010). Pojava bolesti je u visokoj korelaciji sa poljoprivrednom praksom i stresom uzrokovanim nepovoljnim zemljišnim i klimatskim uslovima. Bakteriozna pjegavost *Prunus* vrsta je izraženija u područjima gdje se koštičave voćke gaje na laganim, pjeskovitim zemljištima i u vlažnim i toplim uslovima tokom vegetacije (Scortichini, 2010). Pjeskovita i veoma glinovita zemljišta se smatraju predispozicionim faktorima za pojavu bakterijske pjegavosti (Matthee and Daines, 1968; Zehr et al., 1996).

Dodatno, uvođenjem u proizvodnju osjetljivog sortimenta *Prunus* vrsta došlo je do učestale pojave bolesti. Neke sorte japanske šljive (Calita, Angeleno, Frontier, Santa Rosa, Black grupa, Anna, T.C. Sun), kao i neke sorte breskve (Summer Rich, O'Henry, Rich Lady, Red Valley, Elegant Lady, Big Top, Flavorcrest, Flavortop, Cassiopea) su veoma osjetljive prema ovom patogenu (Ritchie, 1995; Scortichini, 2001). Sorte kajsije osjetljive na Xap su Blenril, Early Golden, Veecot, dok su umjereno osjetljive Newcastle, Stella, Superb, Viceroy i Moorpark (Ritchie, 1995). U Španiji sorte badema koje su najviše raširene u proizvodnji: Antoñeta, Guara, Marta, Masbovera i Vayro, pokazale su se osjetljivim (Palacio-Bielsa et al., 2010). U Kaliforniji najveće štete Xap je prouzrokovao u proizvodnji badema sorte Fritz, ali su slične štete primjećene i na sortama Monterey, Padre i Nonpareil (Holtz et al., 2013). U Australiji sorte badema Fritz, Neplus Ultra, Mission i Monterey su osjetljive, dok su sorte Nonpareil i Price srednje osjetljive prema patogenu (Holtz et al., 2013).

2.4.2.5 Detekcija, identifikacija i genetički diverzitet *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*

Xap je Gram negativna bakterija, štapićasta, pokretna jednom flagelom, veličine oko 0.2–0.4 × 0.8–1.0 μm, strogi aerob, sa optimalnom temperaturom za razvoj 24–29°C (EPPO Standards PM 7/64 (1)). EPPO standard iz 2006. godine (EPPO Standards PM 7/64 (1)), opisuje dijagnostički protokol za Xap koji se zasniva na izolaciji patogena na vještačkim hranjivim podlogama i njegovu naknadnu identifikaciju primjenom biohemijskih testova, profilisanjem proteina (SDS-PAGE),

analizom sadržaja masnih kisjelina (FAME), imunofluorescencijom (IF) i testovima patogenosti. Sve navedene metode u EPPO protokolu su efikasne i pouzdane ali i zahtjevne u dijelu laboratorijskog rada i vremena. Zato sve veću prednost u identifikaciji Xap dobijaju molekularne metode koje su vrlo efikasne i specifične.

U skadu sa Xap dijagnostičkim protokolom (EPPO Standards PM 7/64 (1)), prvi korak u detekciji patogena iz biljnog tkiva sa simptomima ili bez simptoma prisustva patogena, je izolacija bakterija. Za izolaciju patogena treba uzorkovati biljni materijal u ranijim fazama razvoja, sa simptomima prisustva patogena. Tokom vegetacije smanjuje se koncentracija bakterija u biljnom tkivu do nivoa koji se teže može detektovati. Ekstrakcija i izolacija patogena iz sadnog materijala koji je u fazi mirovanja, zahtjeva drugačiji postupak. Kod biljnog materijala bez simptoma, posebnu paznju treba obratiti na veličinu uzorka i koncentrovanja patogena u cilju njegove detekcije u niskoj koncentraciji (EPPO Standards PM 7/64 (1)).

Izolacija patogena vrši se na vještačkim hranljivim podlogama. Podloge koje sadrže kvašćev ekstrakt, glukozu i kalcijum karbonat (GYCA, YDC, YPGA) su pogodne za izolaciju vrsta roda *Xanthomonas* (Lelliot and Stead, 1987; Klement et al., 1990; Schaad et al., 2001). Nakon inkubacije od 2-3 dana pri $27 \pm 2^\circ \text{C}$, na hranjivim podlogama razvijaju se krupne, ispupčene, sjajne i sluzaste kolonije, svijetlo do krem žute boje (EPPO Standards PM 7/64 (1)). Selektivna podloga XPSM (Civerolo et al., 1982), može se koristiti za izolaciju epifitnih populacija Xap iz biljnog materijala bez simptoma (Shepard and Zehr, 1994; Ballard et al., 2011). Nakon izdvajanja čistih kultura karakterizacija bakterijskih sojeva Xap vrši se na osnovu biohemijsko-fizioloških osobina i testova patogenosti.

Prema Fahy i Persley (1983), Schaad i Stall (1988), Schaad i sar. (2001) i Palacio-Bielsa i sar. (2012) Xap ispoljava sljedeće karakteristike: Gram negativna; oksidaza negativna; katalaza pozitivna; posjeduje oksidativni metabolizam glukoze; ne hidrolizuje skrob, ne redukuje nitrate, arginindehidrolazu, ureazu, indol, ne raste u hranjivom bujonu pri koncentraciji 5% NaCl i pri 37°C ; hidrolizuje kazein, želatin, Tween 80 i eskulin, koristi citrate, raste u prisustvu 2% NaCl i u hranjivom bujonu pri 35°C . Xap proizvodi kisjelinu iz: galaktoze, D-glukoze, D-fruktoze, D-manoze, celobioze, saharoze, trehaloze, D-fukoze i L-fukoze (Palacio-Bielsa et al., 2012).

Provjera patogenosti na biljkama domaćinima, pored hipersenzitivne reakcije na listovima duvana, je osnovni test u identifikaciji sojeva Xap. Patogenost sojeva Xap može se provjeriti na listovima osjetljivih sorti breskve i šljive (Randhawa and Civerolo, 1985). Na inokulisanim listovima simptomi se pojavljuju nakon 6-9 dana u vidu vodenastih, tamnosmeđih, nekrotičnih zona na mjestu inokulacije. Na listovima mladih izdanaka breskve i šljive, nekrotične zone se mogu pojaviti 1 - 4 sedmice nakon inokulacije (Randhawa and Civerolo, 1985; Du Plessis, 1988). Patogenost sojeva se može provjeriti i na nesazrelim plodovima biljke domaćina (Giovanardi et al., 2016).

Primjena molekularnih metoda u identifikaciji Xap je postala nezaobilazna zbog brzine dobijanja rezultata i osjetljivosti metoda, kojima je moguće detektovati patogena i u veoma niskim koncentracijama, kako u simptomatičnim, tako i u asimptomatičnim uzorcima. Molekularne metode su posebno značajne u detekciji karantinskih patogena, kao što je i Xap, na sadnom materijalu, kada je izolacijom teško utvrditi njihovo prisustvo.

Posljednjih godina razvijene su brojne PCR metode koje omogućavaju brzu i pouzdanu detekciju i identifikaciju Xap. Prvi PCR protokol za identifikaciju Xap je razvio Pagani (2004), a nedavno je razvijeno nekoliko novih PCR protokola (Parkinson et al. 2007, 2009; Park et al., 2010; Pothier et al., 2011; Ballard et al., 2011; Palacio-Bielsa et al., 2011).

U proučavanju genetičkih varijacija u populaciji bakterija veliku primjenu nalazi Rep-PCR metoda (Repetitive sequence-based PCR). Ovom metodom se mogu diferencirati sojevi bakterija istog patogenog varijeteta. Metoda se zasniva na umnožavanju fragmenata DNK koji se nalaze između specifičnih, ponovljivih sekvenci u genomima prokariota (Louws et al., 1998). Ove ponovljive sekvence su označene kao REP (Repetitive Extragenic Palindromic), ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergeneric Consensus) i BOX (Box elements) sekvence, za čije umnožavanje su dizajnirani istoimeni prajmeri. Umnožavanjem djelova DNK ograničenih ovim

prajmerima, stvara se veliki broj DNK fragmenata različite veličine i dobija visoko specifičan genetski profil (Versalovic et al., 1991; 1994; Louws et al., 1998). Proučavanja strukture populacije Xap primjenom ove metode ukazala su na homogenu strukturu i mali diverzitet sojeva (Boudon et al., 2005; Rademaker et al., 2005; Barionovi and Scortichini, 2008; Kawaguchi, 2012, 2014; Giovanardi et al., 2016).

Analiza 16S rRNK gena predstavlja standardnu metodu za identifikaciju bakterija. Genska sekvenca ribozomalne RNK nije bila podložna promjenama tokom evolucije, zato je pogodna u filogenetskim proučavanjima različitih vrsta bakterija. Analiza multilokusnih sekvenci (eng. Multilocus sequencing analysis - MLSA) zasniva se na analizi konstitutivnih ("housekeeping") gena koji su odgovorni za sintezu proteina od vitalnog značaja za funkcionisanje svake ćelije (Parkinson, 2009).

Pojava bolesti u različitim geografskim područjima pruža mogućnost analize genetske strukture više populacija patogena, obezbjeđujući informacije o genetskoj raznolikosti patogena. Proučavanje genetske populacije Xap porijeklom iz Francuske, Italije i Sjedinjenih Američkih Država (SAD), ukazuje na nizak populacioni diverzitet. Isti genotip otkriven je u pet država na tri kontinenta, pa se geografska distribucija patogena može objasniti učešćem ljudskog faktora u širenju bakterija, što podržava hipotezu da se patogen iz države porijekla tj. SAD, dalje širio u druge regije proizvodnje koštičavih voćaka u svijetu (Boudon et al., 2005). Filogenetska analiza *rpoD* gena ukazala je na blisku filogenetsku srodnost unutar svjetske kolekcije sojeva Xap, što objašnjava hipotezu da sojevi patovara *pruni* pripadaju jednoj populaciji sa veoma niskim genetičkim diverzitetom koja se uspjela održati godinama i raširiti po cijelom svijetu (Hajri et al., 2012). Filogenetska analiza 97 sojeva roda *Xanthomonas*, zasnovana na parcijalnom sekvenciranju sedam konstitutivnih gena (Fischer-Le Saux et al., 2015), pokazala je da su tri ekonomski najznačajnija patovara (*pruni*, *corylina* i *juglandis*) genetski srodna i grupisana u tri klonska kompleksa, čime je podržana hipoteza o zajedničkom pretku ova tri patovara. Suprotno tome, sojevi izolovani iz različitih domaćina koji su slabo patogeni ili nisu patogeni, bili su genetski heterogeni. Među najznačajnijim patovarima, patovar *pruni* je najviše monomorfan, visoko prilagođen *Prunus* vrstama sa izraženom patogenošću, i pokazuje nisku genetsku varijaciju između sojeva (Fischer-Le Saux et al., 2015). MLSA konstitutivnih gena (*dnaK*, *fyuA*, *gyrB* i *rpoD*) (Young et al., 2008; Garita-Cambronero et al., 2018), takođe ukazuje na filogenetsku povezanost patovara *pruni*, *corylina* i *juglandis*. MLSA zasnovana na analizi *gyrB* i *rpoD* gena pokazala se korisnom u identifikaciji dva karantinska patovara *pruni* i *corylina* (Fischer-Le Saux et al., 2015).

U novije vrijeme razvijaju se LAMP metode (loop-mediated isothermal amplification) koje predstavljaju brz, jeftin, jednostavan i prenosiv dijagnostički alat, koji se odlikuje velikom specifičnošću i osjetljivošću (Bühlmann et al., 2013; Palacio-Bielsa et al., 2015; Li et al., 2019). LAMP test za detekciju Xap može imati praktičnu primjenu u dijagnostici na terenu, a njegova glavna prednost je dobijanje rezultata reakcije za samo 15 minuta (Bühlmann et al., 2013), odnosno 45 minuta (Li et al., 2019). LAMP metodom može se testirati direktno svježe biljno tkivo, bez prethodne ekstrakcije DNK ili inkubacije (Li et al., 2019). LAMP test koji su predložili Li i sar. (2019), mogao je detektovati 1,8 ng/μl genomske DNK, što ukazuje na njegovu veću osjetljivost i specifičnost u odnosu na tradicionalnu PCR metodu (Pagani, 2004). LAMP testom mogu se uspješno testirati listovi i plodovi sa simptomima prisustva patogena, ali i listovi bez vidljivih simptoma bolesti, što govori o njegovoj visokoj osjetljivosti i preciznosti (Li et al., 2019). Ove metode detekcije patogena mogu naći primjenu u poboljšanju strategije kontrole bolesti.

2.4.2.6 Kontrola bolesti

Strategija za efikasnu i održivu kontrolu bolesti zasniva se na integrisanom pristupu koji podrazumjeva gajenje otpornih ili manje osjetljivih sorti, dobru poljoprivrednu praksu i primjenu hemijskih i/ili bioloških preparata na osnovu prognoze bolesti (Sundin et al., 2016). Budući da je Xap regulisan karantinski patogen, sadni materijal prilikom proizvodnje i uvoza, mora se zdravstveno pregledati u cilju sprječavanja unošenja i širenja Xap. Nakon utvrđenog prisustva Xap

obavezno je sprovođenje fitosanitarnih mjera koje podrazumijevaju uklanjanje zaraženih stabala kao i uništavanje zaraženih grana, lišća i plodova. Preporučuje se upotreba dezinfikovanog alata prilikom rezidbe i kalemljenja, kao i izbjegavanje upotrebe prskalica za navodnjavanje u cilju sprječavanja širenja patogena u voćnjaku i njegovoj okolini.

Agrotehničke mjere odnose se na izbor odgovarajućeg zemljišta za podizanje voćnjaka (vlažna i zbijena zemljišta pogodnija su za razvoj bolesti u odnosu na propusna i rastresita); izbor vrste i sorte i sadnju sertifikovanog sadnog materijala; izbalansiranu upotrebu sredstava za ishranu bilja (višak azota doprinosi osjetljivosti biljaka na bakterijske infekcije); vrijeme i način rezidbe (Stefani, 2010). Sorte breskve, nektarine, kajsije i šljive, koje su više ili manje tolerantne na Xap navode u svojim radovima Bazzi i sar. (1990), Garcin i sar. (2005), Garcin i Bresson (2009) i Cambra (2014).

Dugogodišnja primjena bakarnih preparata i antibiotika i veliki broj njihovih aplikacija tokom vegetacionih sezona, povezana je sa razvojem otpornosti patogena (Sundin et al., 2016). Ograničenja u korišćenju bakarnih preparata odnose se na pojavu fitotoksičnosti kod nekih vrsta koštičavih voćaka kao što su breskva i nektarina (Lalancette and McFarland, 2007). Upotreba bakarnih preparata u periodu od proljeća do jeseni, na koštičavim voćkama može prouzrokovati fitotoksičnost koja je praćena lisnom nekrozom i defolijacijom (Ritchie, 1995). U cilju izbjegavanja fitotoksičnosti primjenom bakarnih preparata, važno je voditi računa o fiziološkoj fazi biljke i koncentraciji aktivne materije (Stefani, 2010). U Francuskoj Garcin i sar. (2005), opsežno su proučavali kontrolu Xap primjenom bakarnih preparata formulacije oksihlorida i sulfata. Veće koncentracije bakarnih preparata se mogu koristiti za kasna jesenja, zimska tretiranja (prije otvaranja pupoljaka), dok se u toku vegetacije može vršiti tretiranje svakih 12-15 dana, u zavisnosti od vremenskih uslova. Takođe, došli su do zaključka da se fitotoksičnost i defolijacija može pojaviti na visoko osjetljivim sortama. Da bi se negativni uticaji primjene bakarnih preparata sveli na minimum i precizirala njihova efikasnost primjene razvijaju se različiti modeli za prognozu bolesti. Razvoj modela za prognozu bolesti doprinio bi procjeni širenja i pojave bolesti u polju, na osnovu predviđanja rizika od infekcije, kao i pravovremenoj primjeni baktericida, onda kada su uslovi povoljni za razmnožavanje bakterija i infekciju (Morales et al., 2017). Zbog visoke povezanosti klimatskih faktora (naročito kiše i temperature) i razvoja bolesti, razvijen je prognozni model za procjenu pravovremene primjene prskanja, koji može pomoći proizvođačima koštičavih voćaka da kontrolišu širenje bolesti. Model predviđanja uzima u obzir nivo inokuluma prethodne godine, datum otvaranja prvog cvijeta, dnevnu temperaturu i vlažnost (Garcin et al., 2011b). Međutim, ovaj model i dalje treba testirati u narednim godinama kako bi se poboljšala njegova preciznost. Takođe, razvijen je matematički model predviđanja razvoja Xap *in vitro*, u funkciji temperature (Morales et al., 2017).

Osim bakarnih preparata, u zaštiti bilja se upotrebljavaju i antibiotici. Međutim primjena antibiotika u zaštiti bilja zabranjena je u većini evropskih država kao i u Crnoj Gori, dok se u SAD oni uspješno primjenjuju. Antibiotici koje se najviše koriste u zaštiti bilja su streptomycin i oksitetraciklin. Rezistentnost biljnih patogena na oksitetraciklin je rijetka, i ovaj antibiotik je registrovan za suzbijanje Xap na breskvi i nektarini u SAD (McManus et al., 2002). U SAD, voćnjaci breskve u kojima je Xap raširen, tretiraju se u prosjeku, najmanje četiri puta godišnje oksitetraciklinom (McManus et al., 2002). Upotreba antibiotika za zaštitu bilja, poput streptomicina ili oksitetraciklina, pokazala se efikasnom protiv Xap (Dhanvantari et al., 1978; Blaauw et al., 2017). Nepravilnom i nekontrolisanom primjenom antibiotika i bakarnih preparata u zaštiti bilja došlo je do pojave rezistentnosti patogena, odnosno smanjene efikasnosti baktericida.

Stepen osjetljivosti sojeva prema baktericidima može se utvrditi u laboratorijskim uslovima mjerenjem koncentracije jedinjenja potrebnog za inhibiciju rasta. Koncentracija bakar sulfata od 300 ppm ihibira rast bakterijskih sojeva izolovanih iz breskve i šljive u Italiji (Giovanardi et al., 2016).

Aternativni pristup hemijskoj kontroli, u suzbijanju biljnih bolesti je biološka kontrola, gdje se kao biološki agensi koriste različita hemijska jedinjenja koja indukuju otpornost biljaka, bakterije antagonisti i bakteriofagi. Primjena bakterija antagonista (*Pseudomonas fluorescens*) pokazala se

efikasnom u inhibiciji Xap *in vitro*. Tokom poljskih ispitivanja 2006. i 2007. godine, *Pseudomonas fluorescens* je značajno smanjio intezitet bolesti (Biondi et al., 2009). Nepatogeni sojevi *Xanthomonas campestris* izolovani u Japanu, značajno su smanjili infekciju Xap na listovima i plodovima breskve u poljskim ispitivanjima (Kawaguchi et al., 2014). Najnovija proćavanja zasnovana su na upotrebi mliječnokisjelinskih bakterija (*Lactobacillus plantarum*) za kontrolu više patogena: *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* i *Xanthomonas fragariae*. Proućavani sojevi *L. plantarum* pokazali su efikasnost kada se koriste preventivno za kontrolu navedenih bakterijskih patogena. Međutim smanjenje populacije *L. plantarum* u nepovoljnim uslovima može ugroziti njihovu primjenu u zaštiti bilja. Potrebno je sprovesti i proćavanja u različitim poljoprivrednim i klimatskim uslovima da bi se potvrdila efikasnost sojeva *L. plantarum* u polju (Daranas et al., 2019).

Primjena bakteriofaga u biološkoj kontroli ima veliki potencijal jer su široko rasprostranjeni u prirodi, nisu toksićni za eukariote, specifićni su za odrećene bakterijske vrste ili sojeve, primjenom ne oštećuju druge korisne pripadnike autohtonog mikrobioma, prilićno jednostavno se mogu izolovati, proizvoditi i ćuvati (Jones et al., 2007). Dva glavna ogranićavajuća faktora koja utiću na efikasnost bakteriofaga su stabilnost u životnoj sredini (sunćeva svjetlost i UV zraćenje utiću na smanjenje populacije faga) i mutacije bakterija koje mogu dovesti do otpornosti prema fagima (korišćenje jedne vrste faga u kontroli bolesti je rizićno) (Jones et al., 2007; Sundin et al., 2016). Civerolo i Keil (1969) su utvrdili da je tretiranjem lišća breskve fagima, 1 h prije inokulacije bakterijom Xap, procenat inficiranih listova bio 22% u porećenju sa 58% kod kontrolnih biljaka. Saccardi i sar. (1993) redukuju pojavu Xap na breskvi dvonedjeljnom primjenom suspenzije faga. Kontrola Xap u voćnjacima breskve je moguća pomoću odabranih bakteriofaga dobijenih iz inficiranih voćnjaka breskve (Zaccardelli et al., 1992).

U cilju sprijećavanja pojave i širenja Xap rješenje treba traćiti u integralnom pristupu. Stvaranje otpornih sorti i biološke mjere borbe, još uvek nisu dovoljno razvijeni. Neophodna su dalja istraćivanja koja bi trebalo da budu usmjerena na biološke mjere borbe, primjenom bakterija antagonista i aktivatora sistemice otpornosti, kao i na pronalaćenje izvora otpornosti prema patogenu koje bi omogućilo trajniju kontrolu patogena.

2.4.3 *Xylella fastidiosa* - prouzrokovać laćne patuljavosti breskve i paleći lišća badema, šljive i trešnje

Xylella fastidiosa je trenutno jedna od najopasnijih fitopatogenih bakterija u podrućjima njenog rasprostranjenja. Prouzrokuje rezlićite bolesti sa velikim ekonomskim uticajem na poljoprivredu, javne površine i okolinu.

Bakterija *X. fastidiosa* je Gram-negativna, štapićasta, bez bićeva, dimenzija $0,3 \times 1-4 \mu\text{m}$, i obligatni je aerob. Optimalne temperature za razvoj bakterije kreću se od 26 do 28°C (Davis et al., 1978). Pripada razdjelu *Proteobacteria*, klasi *Gammaproteobacteria*, redu *Xanthomonadales*, familiji *Xanthomonadaceae*, rodu *Xylella*. To je ksilemom-ogranićena, teško-odgajiva bakterija, opisana kao prouzrokovać bolesti i poremećaja brojnih biljnih vrsta (Wells et al., 1987).

X. fastidiosa je regulisan karantinski štetni organizam u skladu sa Direktivom 2000/29, dok su Odlukom Evropske Komisije (EU 2015/789) propisane mjere za sprijećavanje unošenja i širenja patogena na teritoriju EU. Mjere se odnose na obiljećavanje podrućja u slućaju potvrćenog prisustva *X. fastidiosa*, posebne zahtjeve u vezi vršenja nadzora, uklanjanje zaraćenih biljaka i druge mjere koje ukljućuju dobru poljoprivrednu praksu i kontrolu populacije vektora.

X. fastidiosa je najveću paćnju privukla kao prouzrokovać Pirsove bolesti vinove loze (eng. Pierce's Disease) u SAD. Bolest je nazvana po naućniku N. B. Pierce, koji ju je prvi detaljno opisao nakon epidemije u vinogradima u Kaliforniji (1892).

Nakon više od jednog vijeka, *X. fastidiosa* je i dalje znaćajan patogen u vinogradima na jugu SAD, naroćito u Kaliforniji, Teksasu i Floridi (Janse and Obradović, 2010). Spektar biljaka domaćina još uvijek nije do kraja proućen, jer bakterija kolonizira, osim drvenastih višegodišnjih

biljaka, i brojne ukrasne i korovske biljke. Lista osjetljivih biljaka domaćina obuhvata 563 biljne vrste iz 82 botaničke familije (EFSA, 2018a).

Bakterija je u biljkama prisutna isključivo u ćelijama ksilema, a prenosi se iz zaraženih biljaka u zdrave insektima vektorima (*Cercopidae*, *Cicadellidae*, *Aphrophoridae*), koji se hrane sisanjem sokova iz ksilema. Livadska pjenuša – *Philaenus spumarius* L. (*Hemiptera*, *Aphrophoridae*), široko rasprostranjena insekatska vrsta u evropskim državama, potvrđeni je vektor *X. fastidiosa* soja CoDiRO u regiji Pulja u Italiji (Saponari et al., 2014; Cornara et al., 2016) i na Korzici u Francuskoj (Cruaud, 2018). Takođe, u eksperimentalnim uslovima, vektori mogu biti *Neophilaenus campestris* i *Philaenus italosignus* (*Hemiptera*, *Aphrophoridae*) (Cavalieri et al., 2018). Bakterija se može širiti i zaraženim biljnim materijalom za reprodukciju.

X. fastidiosa je rasprostranjena na američkom kontinentu, odakle vodi porijeklo i gdje značajno ugrožava gajenje vinove loze i citrusa. Velike gubitke pričinjava u proizvodnji breskve u SAD, gdje je bolest primjećena 1890. godine, a kasnije su zabilježene epidemije, uglavnom u Džordžiji (1929, 1951 i 1976) (Wells et al., 1983; Janse and Obradović, 2010). Bolest je na osnovu simptoma koje prouzrokuje na breskvi nazvana lažna patuljavost breskve (eng. Phony peach disease). *X. fastidiosa* je veoma značajan patogen badema i šljive na kojima izaziva palež lišća (eng. leaf scorch) (Davis et al., 1980; Janse and Obradović, 2010). Glavni areal rasprostranjenosti ove bakterije doskora bio je tropski i suptropski pojas. Međutim prisustvo *X. fastidiosa* utvrđeno je i na azijskom kontinentu, na Tajvanu (Su et al., 2014), na bademu u Iranu i Turskoj (Guldur et al., 2005; Amanifar et al., 2014).

Bakterija je nedavno unešena u Evropu što predstavlja važnu promjenu u geografskoj distribuciji bakterije. Prisustvo *X. fastidiosa* subsp. *pauca*, soj CoDIRO, otkriven je na maslinama u regiji Pulja, na jugu Italije, 2013. godine (Saponari et al., 2013). Od tada, patogen se širi na teritoriji Italije prouzrokujuću sušenje ogromnog broja stabala masline i velike ekonomske gubitke. *X. fastidiosa* subsp. *multiplex* je 2018. godine, utvrđena u Toskani (provincija Grosseto) na ukrasnom i samoniklom mediteranskom bilju (Saponari et al., 2019). U južnoj Francuskoj i Korzici tokom 2015-2017., utvrđeno je prisustvo *X. fastidiosa* subsp. *multiplex* i subsp. *pauca* na oko 30 različitih biljaka domaćina (Denancé et al., 2017). U Španiji je 2017. godine utvrđeno prisustvo *X. fastidiosa* subsp. *multiplex*, *pauca* i *fastidiosa* na bademu, trešnji, šljivi i vinovoj lozi, na Balearskim ostrvima, u provinciji Alikante i regionu Madrida (Olmo et al., 2017). Početkom 2019. godine prisustvo *X. fastidiosa* subsp. *multiplex* je potvrđeno u Portugaliji (Vila Nova de Gaia, područje Porto) (EUROPHYT, online).

X. fastidiosa je podijeljena na tri podvrste: *fastidiosa*, *multiplex* i *pauca*, na osnovu DNK-DNK hibridizacije (Schaad et al. 2004). Daljim molekularnim proučavanjima, analizom multilokusnih sekvenci (MLST) *X. fastidiosa* je podijeljena na šest podvrsta (*fastidiosa*, *multiplex*, *pauca*, *sandyi*, *tashke* i *morus*) (Scally et al., 2005; Yuan et al., 2010), međutim, samo su podvrste *fastidiosa* i *multiplex* zvanično prihvaćene i nalaze se na ažuriranoj listi imena fitopatogenih bakterija (Bull et al., 2012). Nedavno je predložena revizija podvrsta *X. fastidiosa* na osnovu uporednih analiza genoma (Marceletti and Scortichini, 2016).

X. fastidiosa se razvija isključivo u ksilemu biljke domaćina, a simptomi koje prouzrokuje posljedica su blokade ksilema u kojem se bakterija umnožava. Nakon zaraze, *X. fastidiosa* se unutar biljke širi u oba smjera, ali zaraza domaćina gotovo nikada nije sistemična i bakterija nije ravnomjerno raspoređena unutar biljke (Janse and Obradović, 2010).

Simptomi infekcije variraju u zavisnosti od podvrste patogena, starosti i vrste biljaka, kao i uslova spoljne sredine. Uopšteno, simptomi se mogu opisati kao: palež lišća, hloroza, kržljivost, izumiranje vrhova mladara, opšte slabljenje, sušenje i izumiranje stabla u cjelini. Na bademu, karakterističan simptom je palež lišća, koji je praćen umanjenom produktivnošću i slabljenjem zaraženih biljaka. Prvi simptomi se mogu uočiti tokom juna i jula mjeseca u vidu žutila oboda lista, a najuočljiviji su krajem jula i tokom avgusta kada vrhove i obod lista zahvata nekroza i sušenje. Zaražene biljke osjetljivih sorata mogu opstati više godina, ali smanjenje prinosa nastupa par godina posle infekcije kod većine sorata. Slično bademu, *X. fastidiosa* izaziva palež i ožegotine listova šljive i trešnje. Promjene su na šljivi najizraženije u drugoj polovini ljeta. *X. fastidiosa* može dovesti

do potpunog izumiranja stabla šljive. Simptomi tipa paleži lišća se uočavaju i na trešnji. Lišće dobija izgled kao da je spaljeno. Zaražena stabla trešnje izumiru u potpunosti. *X. fastidiosa* prouzrokuje oboljenje pod nazivom lažna patuljivost breskve. Zaražena stabla formiraju zbijenu krošnju zbog skraćenih internodija na izdancima, cvjetaju nekoliko dana prije zdravih biljaka, slabije rađaju, formiraju sitnije plodove koji imaju intenzivniju boju. Ova bakterija ne dovodi do izumiranja stabala breskve, ali povećava njihovu osjetljivost prema drugim patogenima (EPPO standards PM 7/24 (4)).

Bakteriju prenose insekti koji se hrane sisanjem sokova iz ksilema. Zaraženi biljni materijal je glavni put unošenja *X. fastidiosa* u nova područja. Posebnu opasnost predstavlja biljni materijal u fazi mirovanja, kao i latentna infekcija, odnosno odsustvo simptoma prisustva patogena. Postoji mogućnost unošenja *X. fastidiosa* i infektivnim vektorom.

Brza i tačna identifikacija izuzetno je važna u sprječavanju širenja *X. fastidiosa*. EPPO standard PM 7/24 (4) propisuje dijagnostički protokol za detekciju i identifikaciju *X. fastidiosa*. Za detekciju bakterije u velikom broju uzoraka kao prva brza metoda koristi se serološki ELISA test. Za potvrdu pozitivnih nalaza, kao druga brza metoda, koristi se molekularna metoda lančanog umnožavanja specifičnog fragmenta DNK patogena (Polymerase Chain Reaction - PCR). Lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu (Real-time PCR) još je osjetljivija metoda kojom je moguće detektovati bakteriju ako je ona u domaćinu prisutna u niskoj koncentraciji, a metodu je zbog osjetljivosti preporučljivo koristiti za uzorke biljnog materijala bez simptoma i za uzorke insekata - potencijalnih vektora.

Mjere zaštite od bolesti koje prozrokuje *X. fastidiosa* podrazumijevaju proizvodnju i upotrebu nezaraženog sadnog materijala, suzbijanje vektora, suzbijanje korovskih biljaka, uništavanje zaraženih biljaka domaćina (mehaničko uništavanje, vađenje biljaka sa korijenom i spaljivanje ili mljevenje svih biljnih ostataka) kao i selekciju i gajenje otpornih ili tolerantnih sorti. Mjere zaštite za sprječavanje unošenja *X. fastidiosa*, podrazumijevaju ograničavanje uvoza sadnog materijala iz područja gdje je patogen prisutan, zdravstvenu kontrolu biljaka domaćina na prisustvo patogena i insekata vektora.

Najveći broj istraživanja u prethodnom periodu, bio je usmjeren na razriješavanje etiologije, pronalazak i optimizaciju preciznih metoda detekcije, novih metoda identifikacije, opisivanje simptomatologije i utvrđivanje kruga domaćina, pronalazak vektora i dokazivanje prenošenja. Sva navedena područja istraživanja ključna su za uspješno propisivanje i sprovođenje fitosanitarnih mjera, kojima bi širenje bakterije u Evropi trebalo biti spriječeno.

Ovaj patogen nije prisutan u Crnoj Gori i nalazi se na listi karantinskih štetnih organizama. *X. fastidiosa* predstavlja veliki fitosanitarni rizik za Crnu Goru, zbog prisustva velikog broja biljaka domaćina i povoljnih klimatskih uslova za opstanak patogena i razvoj bolesti. Uvoz biljnog materijala porijeklom iz Italije, Španije i Francuske mogao bi biti primaran način unošenja bakterije u Crnu Goru. S obzirom da se koštičave voćke dosta gaje na području Crne Gore, nameće se potreba kontrole zdravstvenog stanja sadnog materijala *Prunus* vrsta u prometu preko granice jer postoji stalna opasnost od unošenja zaraženog biljnog materijala iz država u kojima je prisustvo patogena potvrđeno.

2.4.4 *Agrobacterium tumefaciens* - prouzrokovalac bakterioznog raka korijena

Agrobacterium tumefaciens prouzrokovalac bakterioznog raka korijena rasprostanjen je u svim krajevima svijeta, a štete od ove bakterije u voćarstvu mogu biti velike, pogotovo ako se javi u rasadnicima voćnog sadnog materijala (Pulawska, 2010; Pulawska et al., 2016), gdje mogu iznositi više od 80% (Garrett, 1987). Smatra se glavnim bakterioznim patogenom koštičavih voćaka u rasadnicima mediteranskih država (Krimi et al., 2002). Gubici od 10-30% u rasadnicima voćnog sadnog materijala su uobičajeni (Sobiczewski et al., 1991).

Agrobacterium tumefaciens ima širok krug domaćina među drvenastim i zeljastim biljkama, a najveće štete nanosi koštičavim i jabučastim voćkama (Arsenijević, 1997). Bakterija *A. tumefaciens* je aerob, pokretna, asporogena, Gram-negativna i štapičasta sa peritrihim flagelama.

Patogen rijetko izaziva sušenje biljaka, ali dovodi do usporenog rasta i smanjenja prinosa (Pulawska, 2010). Oboljeli zasadi badema (Flint, 2002) i trešnje (Holubowicz et al. 1988), mogu biti smanjene produktivnosti, a biljke su kržljavog izgleda.

Sojevi *A. tumefaciens*, prilikom infekcije biljaka, ugrađuju dio Ti plazmida (Tumor iducing – izazivač tumora) u biljni genom, što uzrokuje nekontrolisanu diobu i rast biljnih ćelija i rezultira stvaranjem tumora (Zhu et al., 2000). Simptomi raka ispoljavaju se pretežno u zoni korijenovog vrata ili na korijenu, a na mladim biljkama u rasadnicima mogu se uočiti i na stablu. Tumori su lokalizovani, sferičnog oblika i različite veličine. Bakterija prodire u biljku kroz ozlede nastale kalemljenjem, obradom zemljišta, rezidbom, insektima ili izmrzavanjem. Kada su temperature iznad 20°C, tumori se pojavljuju četiri nedjelje nakon infekcije. Infekcija se prenosi zaraženim zemljištem, alatom, sadnicama i podlogama. Širenju patogena doprinose i latentne zaraze, kada je patogen prisutan u biljnom materijalu bez ispoljavanja simptoma. Tumori inhibiraju fiziološke funkcije biljke kao što su transport vode i hranjivih sastojaka (Pulawska, 2010). Veliki i brojni tumori dovode do usporenog porasta i kržljivosti biljaka. Pored toga, tumori stvaraju rane na korijenu biljaka, koje su ulazno mjesto infekcije za druge patogene koji se prenose zemljištem (Pulawska, 2010).

Nomenklatura i taksonomski status roda *Agrobacterium* još uvek je u procesu revizije. Ranije su sve bakterije koje prouzrokuju tumore klasifikovane u vrstu *A. tumefaciens* (Conn, 1942). Međutim, daljim proučavanjima otkriveno je da bakterije razvrstane u rod *Agrobacterium* ne čine monofiletsku grupu organizama, na osnovu čega su Young i sar. (2001) vrste roda *Agrobacterium* pripojili rodu *Rhizobium*. Nedavna istraživanja genotipa, dovela su do izmjenjene filogenije familije *Rhizobiaceae* (Mousavi et al., 2015). Trenuto je opisano osam vrsta tumorogenih bakterija (*Agrobacterium arsenijevecii*, *A. larrymoorei*, *A. nepotum*, *A. radiobacter*, *A. rubi*, *A. skierniewicense*, *Allorhizobium vitis* i *Rhizobium rhizogenes*) i osam genomovara, koji formalno nisu imenovani, unutar kompleksa vrsta *A. tumefaciens* (ranije nazvan biovar 1 *Agrobacterium*) (Costechareyre et al., 2010; Puławska et al., 2016). Sekvenciona analiza sojeva porijeklom iz koštičavih voćaka u Poljskoj, pokazala je da je u većini slučajeva vrsta *R. rhizogenes* prouzrokuje tumore (Pulawska et al., 2016).

Identifikacija *Agrobacterium* vrsta može se izvršiti pomoću standardnih bakterioloških testova i primjenom molekularnih metoda. Od molekularnih metoda, najviše se primjenjuje lančana reakcija umnožavanja fragmenata DNK (PCR), kojom se pomoću specifičnih prajmera mogu diferencirati sojevi *Agrobacterium* (Haas et al., 1995; Sawada et al., 1995; Pulawska and Sobiczewski, 2005; Pulawska et al., 2006).

Kontrola bolesti podrazumijeva proizvodnju zdravog sadnog materijala. Prilikom proizvodnje sadnog materijala treba voditi računa o izboru parcele, dezinfekciji pribora za kalemljenje i izbjegavanju povreda biljaka tokom sadnje. Ukoliko je bolest prisutna, potrebno je oboljele biljke eliminisati i spaliti. Preporučuje se primjena plodoređa u trajanju od pet godina (Arsenijević, 1997).

U Crnoj Gori ova bakterija nije detaljnije proučavana. Pojava ove bakterije zabilježena je na sadnicama breskve i badema u Baru i Danilovgradu, gdje je u Baru više od 50% sadnica bilo zaraženo (Mijušković, 1999).

2.4.5 Pregled proučavanja bakterioza koštičavih voćaka i badema u Crnoj Gori

Intenzivnim uvozom sadnog materijala, porijeklom iz država u kojima su prisutni ovi patogeni koštičavih voćaka i badema, povećava se fitosanitarni rizik za Crnu Goru od njihovog unošenja i širenja, koji u povoljnim klimatskim uslovima mogu prouzrokovati velike ekonomske gubitke u proizvodnji. Zato se nameće potreba za stalnom zdravstvenom kontrolom biljaka *Prunus* vrsta, prilikom njihovog uvoza ali i kasnije na mjestu sadnje. Radi spriječavanja unošenja karantinskih štetnih organizama na teritoriju Crne Gore, neophodno je jačati sve kapacitete u fitosanitarnom sistemu, a naročito laboratorijske. Razvoj laboratorijskih kapaciteta za pouzdanu i brzu detekciju patogena je važan u cilju zaštite bilja kao nacionalnog blaga i značajnog privrednog

resursa koji je od naročitog značaja za mala domaćinstva i ruralna područja (Popović i Obradović, 2019).

Bakterije kao karantinski ili ekonomski štetni organizmi koštičavih voćaka i badema, nedovoljno su proučene u Crnoj Gori. Među saopštenjima o pojavi bakterioza *Prunus* vrsta, značajnijeg intenziteta u Crnoj Gori nalaze se proučavanja bakterija *Pseudomonas syringae* i Xap.

Pseudomonas syringae, iako opštepoznat patogen koštičavih voćaka, proučen je samo kao patogen višnje u Crnoj Gori. Pojava ove bakterioze višnje prvi put je zapažena 1979. godine u okolini Bjelog Polja, Nikšića i na pojedinim stablima na Primorju. U okviru plantažnog zasada višnje Agrokombinata „13. jul“ na Čemovskom polju 1983. godine ustanovljeno je da je od ukupnog broja 187.405 stabala, zarazom bilo zahvaćeno 11.668, a u 1984. godini ovaj broj uvećan je za još 32.000 stabala. Pri tome je konstatovano da je najveći broj zaraženih stabala pripadao sortama: Hajmanova konzervna, Reksele, Gorsemska i Hajmanov rubin. U plantažnom zasadu na Čemovskom polju, bolest se u toj mjeri proširila, da je 1987. godine utvrđeno da broj oboljelih stabala iznosi 51% od ukupnog broja. S obzirom da primjena hemijskih i drugih mjera borbe nije dala pozitivan efekat u suzbijanju patogena, moralo se pristupiti postepenom krčenju voćaka, tako da je više od 200 ha površine pod zasadom moralo biti iskrčeno. Brzo širenje bolesti objašnjava se visokom zastupljenošću osjetljivog sortimenta u ovom voćnjaku (oko 60%), kao i povoljnim vremenskim uslovima za razvoj bakterioza. Na osnovu patogenosti izolovanih sojeva i njihovih morfološko-odgajivačkih i nekih biohemijsko-fizioloških osobina, zaključeno je da oni predstavljaju patogeni varijetet bakterije *Pseudomonas syringae* i ispoljavaju najviše sličnosti sa Pss i Psm (Vučinić i sar., 1992).

Prisustvo Xap utvrđeno je na bademu u Crnoj Gori na području Podgorice. Tokom 1994. godine na dijelu plantažnog zasada badema (*Prunus dulcis*), PD „Plantaže“ u sastavu Agrokombinata „13. jul“ u Podgorici (objekat „Milješ, Tuzi, veličine 1.6 ha), zapažena je pojava pjegavosti i šupljikavosti lišća i rak-rana kao i sušenja grančica i grana badema. Zbog intenzivnog širenja ove, do tada nepoznate, bolesti badema i sušenja voćnih stabala uz prestanak plodonošenja, iskrčeno je 32.9 ha plantažnog zasada (objekat „Dubrave“, Tuzi). U blizini ovog zasada iskrčeno je oko 20 ha japanske šljive, na kojoj su se pojavili slični simptomi kao i na bademu. Sa preostale površine pod sortama Texas i Troito, tokom 1994-1996. godine, iz oboljelih biljnih organa badema, izvršena je izolacija bakterija. Proučavanjem patogenih, morfoloških, odgajivačkih i biohemijsko-fizioloških odlika izolovanih sojeva, oni su identifikovani kao Xap, čime je potvrđeno prisustvo ovog patogena u Crnoj Gori (Panić et al., 1998). Prisustvo Xap utvrđeno je na breskvi na području Podgorice, tokom 2017 – 2018. godine (Popović et al., 2020). Xap je regulisan karantinski štetni organizam u Crnoj Gori i nalazi se na listi štetnih organizama čije je prisustvo utvrđeno na teritoriji Crne Gore na ograničenom području.

3. RADNA HIPOTEZA

Polazna pretpostavka u ovom istraživanju je da vrste roda *Prunus* parazitira više vrsta patogenih bakterija. Takođe, glavni izvor infekcije može biti zaraženi sadni materijal. Sadnja zaraženog sadnog materijala rezultira pojavom infekcije značajnijeg intenziteta, što može ugroziti proizvodnju koštičavih voćaka i badema i umanjiti ekonomski efekat.

Imajući u vidu da bakterioze koštičavih voćaka i badema nisu bile predmet intenzivnih proučavanja u Crnoj Gori duži niz godina, kao i da se za zasnivanje proizvodnih zasada svake godine uveze značajna količina biljnog materijala, koji često dolazi iz rizičnih područja, osnovna pretpostavka je da se u populaciji bakterija prisutnih u zasadima ovih biljaka u Crnoj Gori mogu naći neke već ranije poznate vrste, ali i one koje su na listi karantinskih organizama.

Karantinski status *Xap*, *Psp* i *Xylella fastidiosa* opravdava potrebu da se provjeri i utvrdi njihovo eventualno prisustvo na teritoriji Crne Gore.

Takođe, pretpostavlja se da su u proizvodnim zasadima koštičavih voćaka prisutne nekarantinske vrste patogenih bakterija koje još uvijek nisu dovoljno proučene kao patogeni biljaka u Crnoj Gori, a koje mogu prouzrokovati značajne štete. Korišćenjem klasičnih i specifičnih diferencijalnih bakterioloških testova, kao i molekularnih metoda, izvršiće se identifikacija i proučavanje patogena, i tako provjeriti pretpostavka o prisustvu i rasprostranjenosti različitih vrsta fitopatogenih bakterija.

Preparati na bazi bakra se redovno koriste u zaštiti bilja, ne samo od patogenih bakterija, u Crnoj Gori. Pretpostavka je da se, usled neujednačene ili prekomjerne primjene ovih preparata, u populaciji fitopatogenih bakterija mogu naći sojevi različite osjetljivosti. Primjena antibiotika u zaštiti bilja zabranjena je u Crnoj Gori, pa je pretpostavka da se u populaciji fitopatogenih bakterija nalaze sojevi osjetljivi na antibiotike. Stoga, biće proučena reakcija izolovanih sojeva prema baktericidima.

Navedena istraživanja upotpunila bi znanje o patogenima koštičavih voćaka i badema u Crnoj Gori.

4. MATERIJAL I METODE RADA

4.1 Obilazak terena i prikupljanje uzoraka biljnog materijala

U periodu od 2017. do 2018. godine prikupljeni su uzorci koštičavih voćaka i badema, sa simptomima koji mogu biti bakteriozne etiologije, iz različitih lokaliteta širom Crne Gore, prvenstveno iz regiona značajnih po gajenju ovih voćaka. Uzorkovanje biljnog materijala vršeno je tokom cijele godine. Uzorkovan je biljni materijal sa simptomima nalik prisustvu i aktivnosti patogenih bakterija (rak-rane, sušenje jednogodišnjih grančica, crni vrhovi grančica, žutilo i uvelost lišća, pjegavost lišća i plodova, nekroza pupoljaka).

Uzorkovani biljni materijal je spakovan u plastične kese i obilježen karticom na kojoj su unošeni osnovni podaci o uzorku (vrsta biljnog materijala, sorta (ukoliko je poznata), lokalitet, datum uzorkovanja i GPS kordinate). Takođe, voćka sa koje je uzet biljni materijal je obilježena čime je uspostavljena sljedljivost uzorka.

Obrada uzoraka vršena je u Fitosanitarnoj laboratoriji Biotehničkog fakulteta u Podgorici. Uzorci su obrađivani neposredno po dopremanju u laboratoriju, a u periodu do obrade čuvani su u frižideru na 4°C, do završetka izolacije.

4.2 Izolacija patogena iz biljnog materijala

U cilju izolacije patogena iz svježeg biljnog materijala uzorci su kratko ispirani pod mlazom česmenske vode, a potom površinski dezinfikovani 70% alkoholom i prosušeni na filter papiru. Izolacija patogena vršena je isjecanjem fragmenata biljnog tkiva, na prelazu zdravog u oboljelo tkivo, sterilnim skalpelom. Fragmenti biljnog tkiva su potom macerirani u 1 ml sterilne destilovane vode sterilnim tučkom u avanu. Nakon nekoliko minuta, kap macerata zasijavana je metodom iscrpljivanja u četiri poteza pomoću bakteriološke petlje, na hranjivi agar (HA) (Klement et al., 1990; Arsenijević, 1997), u Petri-kutijama, u dva ponavljanja. Zasijane podloge su inkubirane u termostatu, pri 27°C, u trajanju 48 h. Nakon 2-4 dana razvijale su se bjeličaste ili žute kolonije. Pojedinačne bijele kolonije su prihvaćene i presijane na novu HA podlogu, a žute kolonije na podlogu od dekstroze, kvašćevog ekstrakta i CaCO₃ (YDC) (Lelliott and Stead, 1987; Schaad et al., 2001), radi prečišćavanja i izdvajanja čistih kultura. Za dalje proučavanje odabrano je ukupno 68 sojeva bakterija (Tabela 1).

Kao kontrolni sojevi u različitim testovima korišćeni su sojevi iz kolekcije fitopatogenih bakterija Poljoprivrednog fakulteta u Beogradu i inostrani sojevi, porijeklom iz različitih međunarodnih kolekcija (Tabela 2).

4.3 Održavanje i čuvanje bakterija u kolekciji

Sojevi bakterija čuvani su tokom nekoliko mjeseci, u radnoj kolekciji, u vidu suspenzije čiste kulture bakterija. Suspenzija je pripremljena tako što je pun zahvat kolonije starosti 24 h suspendovan u 1 ml sterilne česmenske vode u mikroepruvetama i čuvan pri temperaturi 4-7°C u frižideru (Klement et al., 1990). Sojevi bakterija se na duži vremenski period čuvaju u podlozi od hranljivog bujona sa 30% glicerola u krioepruvetama pri temperaturi -80°C u zamrzivaču (Schaad et al., 2001) u kolekciji fitopatogenih bakterija (KFB) Instituta za fitomedicinu Poljoprivrednog fakulteta u Beogradu. Za sve ogledne korišćene su kulture starosti 24-48 h, gajene u termostatu pri 27°C.

4.4 Izgled i razvoj kolonija na hranljivim podlogama

Razvoj i izgled proučavanih sojeva bijelih kolonija posmatrani su gajenjem bakterija na standardnoj podlozi od hranljivog agara (HA). Razvoj i izgled sojeva žutih kolonija posmatran na podlozi sa dektrozom, kvaščevim ekstraktom i CaCO₃ (YDC) (Lelliott and Stead, 1987; Arsenijević, 1997; Schaad et al., 2001). Proučavani sojevi zasijavani su metodom razmaza pomoću bakteriološke petlje po površini podloge u Petri kutijama i inkubirani 3 dana u termostatu pri 27°C (Arsenijević, 1997). Predstavnici roda *Pseudomonas* na podlozi HA obrazuju ispupčene, sjajne, sivobjeličaste kolonije, dok predstavnici roda *Xanthomonas* na podlozi YDC obrazuju mukoidne, ispupčene, sjajne, krem-žute kolonije (Arsenijević, 1997). Kao pozitivna kontrola u ovom testu na HA, korišćen je soj Pss (KFB 0103), dok je na podlozi YDC korišćen kontrolni soj Xap (KFB 0104).

4.5 Patogene odlike sojeva

Patogene odlike izolovanih sojeva proučene su provjerom sposobnosti da prouzrokuju hipersenzitivnu reakciju lista duvana i muškatile, kao preliminarnim testom za diferencijaciju patogenih sojeva, kao i inokulacijom *Prunus* vrsta, njihovih prirodnih domaćina.

4.5.1 Hipersenzitivna reakcija (HR)

Sposobnost sojeva da prouzrokuju hipersenzitivnu reakciju provjerena je na biljkama duvana sorte White Burley, u fazi razvoja 5-6 stalnih listova. Za ovaj test korišćena je suspenzija bakterija u sterilnoj destilovanoj vodi, koncentracije oko 10⁸ cfu/ml. Inokulacija duvana izvršena je infiltracijom suspenzije bakterija između dva lisna nerva sa naličja listova, pomoću medicinskog šprica bez igle. Kao pozitivne kontrole korišćeni su sojevi bakterija Pss (KFB 0103) i Xap (KFB 0104), a kao negativna - sterilna destilovana voda. Inokulisane biljke održavane su u laboratorijskim uslovima. Rezultati su očitani nakon 24-48 h, a pojava nekroze tkiva mezofila lista na mjestu infiltracije znak je patogenosti bakterije (Arsenijević, 1997). Takođe, provjerena je i sposobnost sojeva da prouzrokuju hipersenzitivnu reakciju listova muškatile (Arsenijević, 1997).

4.5.2 Test patogenosti na biljci domaćinu

Patogenost sojeva proučena je i na biljci domaćinu iz koje je soj izolovan. Patogenost sojeva izolovanih iz kajsije provjerena je na sortama kajsije Orange Rubis i Roksana, sojeva izolovanih iz breskve i nektarine provjerena je na sorti breskve Royal Time, sojeva iz trešnje provjerena je na sorti trešnje Stella, sojeva izolovanih iz badema je provjerena na sorti badema Texas, i sojeva iz japanske šljive provjerena je inokulacijom nepoznate sorte japanske šljive. Za provjeru patogenosti sojeva korišćeni su mladari, listovi i plodovi. Biljni materijal, vizuelno dobrog zdravstvenog stanja, je prije inokulacije kratko ispiran pod mlazom česemske vode, a potom površinski dezinfikovao 70% alkoholom i prosušen. Vještačka inokulacija je rađena istog dana kada je biljni materijal dopremljen u laboratoriju. Test je izveden u Fitosanitarnoj laboratoriji Biotehničkog fakulteta u Podgorici. Kao pozitivna kontrola za sojeve potencijalne predstavnike roda *Pseudomonas*, korišćeni su mladari, listovi i plodovi inokulisani kontrolnim sojem Pss (KFB 0103), dok su za sojeve potencijalne predstavnike roda *Xanthomonas*, mladari, listovi i plodovi inokulisani kontrolnim sojem Xap (KFB 0104). Kao negativna kontrola, biljni djelovi su inokulisani sterilnom destilovanom vodom. Test je izveden u tri ponavljanja (po tri mladara, lista i ploda za svaki soj).

Mladari breskve, kajsije, trešnje, japanske šljive i badema, stavljeni su u plastične čaše zapremine 250 ml, napunjene česemskom vodom i inokulisani metodom prskanja bakterijskom suspenzijom, koncentracije oko 10⁸ cfu/ml, ručnom prskalicom. Nakon inokulacije, mladari su održavani u vlažnoj komori pri sobnoj temperaturi. Simptomi su praćeni do 12 dana od dana inokulacije. Pozitivnom reakcijom smatrana je pojava nekroze na mladarima.

Mladi listovi breskve, kajsije, trešnje, japanske šljive i badema, inokulisani su infiltracijom suspenzije bakterija, koncentracije oko 10^8 cfu/ml, između dva lisna nerva sa naličja listova, na više mjesta, pomoću medicinskog šprica bez igle. Nakon toga, listovi su postavljeni u sterilne Petri kutije, na filter papir koji je prethodno navlažen sterilnom destilovanom vodom. Pojedini listovi su sterilnim makazama skraćeni kako bi bili postavljeni u Petri kutije. Petri kutije sa inokulisanim listovima su zatvorene i dalje čuvane u laboratorijskim uslovima. Simptomi su praćeni do sedam dana od dana inokulacije. Pozitivnom reakcijom smatrana je pojava nekroze tkiva mezofila lista na mjestu inokulacije.

Nesazreli plodovi trešnje i kajsije inokulisani su unošenjem suspenzije bakterija pipetom u tkivo ploda, dok su na plodovima breskve, badema i japanske šljive, pravljene bunarčiči dubine oko 2-3 mm, vrhom sterilnog šprica u koje je unošena suspenzija bakterija. Nakon inokulacije, plodovi su postavljeni u otvorene sterilne Petri kutije, na filter papir koji je prethodno navlažen sterilnom destilovanom vodom, a zatim smješteni u vlažnu komoru. Simptomi su praćeni do 10 dana od dana inokulacije. Pozitivnom reakcijom smatrana je pojava nekroze oko udubljenja na plodu ili mjesta inokulacije.

4.6 Opšti testovi za identifikaciju sojeva bakterija

U cilju grupisanja sojeva bakterija, osim odgajivačkih (izgled i razvoj kolonija na HA i YDC podlogama) i patogenih odlika, primjenjeni su opšti testovi: reakcija po Gramu, aktivnost oksidaze i katalaze i oksidativno-fermentativni metabolizam glukoze (O/F test).

4.6.1 Razlikovanje bakterija po Gramu

Reakcija po Gramu je diferencijalni test koji se koristi za razlikovanje Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija. Za proučavanje ove osobine sojeva primjenjena je metoda sa 3% KOH. Pun zahvat petlje bakterijskih kolonija starih 24h, homogenizovan je u kapi 3% rastvora KOH, sterilnom drvenom čačalicom u sterilnoj staklenoj Petri posudi. Pod uticajem baze dolazi do razgradnje ćelijskog zida kod Gram-negativnih bakterija i oslobađanja nukleinske kisjeline, što se ispoljava pojavom sluzaste konzistencije. Stvaranje elastične niti koja nastaje podizanjem čačalice u vis, predstavlja pozitivnu reakciju. Kod Gram-pozitivnih bakterija ne dolazi do razgradnje ćelijskog zida, pa izostaje pojava sluzaste konzistencije u kapi baze u kojoj su suspendovane bakterijske ćelije i stvaranje elastične niti (Arsenijević, 1997; Schaad et al., 2001). Kao pozitivna kontrola korišćen je soj *P. fluorescens* (B 130) (Gram-negativna bakterija), a kao negativna kontrola *Bacillus pumilus* (B122) (Gram-pozitivna bakterija) (Schaad et al., 2001).

4.6.2 Aktivnost oksidaze

Oksidaza test se koristi za identifikaciju bakterija roda *Pseudomonas*, pošto mnogi predstavnici ovog roda ne posjeduju citohrom c, za razliku od *P. cichorii*, *P. marginalis* pv. *marginalis* i saprofitskih vrsta ovog roda (Arsenijević, 1997). Za određivanje prisustva citohrom oksidaze u respiratornom lancu bakterija primjenjen je Kovačev metod (Kovacs, 1956., loc. cit. Arsenijević, 1997). Za izvođenje testa korišćene su bakterijske kulture gajene na HA, starosti 24 h. U Petri posude je postavljen sterilan filter papir, koji je potom navlažen sa nekoliko kapi 1% (w/v) vodenog rastvora tetrametil-parafenilen-diamin-dihlorhidrata (TMPPD). Pun zahvat bakterijskih kolonija starih 24 h, prenešen je i razmazan platinskom bakteriološkom petljom na filter papir. Pojava ljubičaste boje na mjestu razmaza u toku 5-10 sekundi znak je da bakterija posjeduje enzim citohrom oksidazu i smatra se pozitivnom reakcijom (Arsenijević, 1997). Odsustvo promjene boje na mjestu razmaza bakterijskih kolonija predstavlja negativan rezultat. Kao pozitivna kontrola korišćen je soj *P. fluorescens* (KFB B 130), a kao negativna kontrola soj Pss (KFB 0103). Takođe proučena je aktivnost oksidaze kod referentnih sojeva Psm R2 (KFB 0101), Psm R1 (KFB 0120 i KFB 0121), Psp (KFB 0102) i Xap (KFB 0104).

4.6.3 Aktivnost katalaze

Aerobne bakterije posjeduju enzim katalazu koja razlaže toksični vodonik peroksid (H_2O_2), koji nastaje u procesu disanja, na vodu i molekularni kiseonik. Bakterijske kolonije, stare 24 h, zahvaćene su sterilnom drvenom čačalicom i homogenizovane u kapi 3% H_2O_2 , na mikroskopskoj pločici. Pojava mjehurića gasa, nastala kao rezultat izdvajanja slobodnog kiseonika, znak je pozitivne reakcije, odnosno prisustva enzima katalaze (Arsenijević, 1997). Kao pozitivna kontrola korišćeni su sojevi Pss (KFB 0103) i Xap (KFB 0104).

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

Sposobnost razlaganja glukoze oksidativnim ili fermentativnim putem proučena je korišćenjem Hugh-Leifson-ove podloge (1953, loc. cit. Lelliott and Stead, 1987) u koju je nakon sterilizacije i hlađenja do $50^{\circ}C$, dodat filterom sterilisan 10% rastvor glukoze do konačne koncentracije 1%. U jednu epruvetu prije inokulacije, dodato je oko 2 ml sterilnog parafina radi stvaranja anaerobnih uslova. Čiste kulture bakterija zasijavane su ubodom pomoću igle u po dvije epruvete sa podlogom, jednu sa parafinskim uljem i drugu bez parafinskog ulja.

Inokulisana podloga inkubirana je pri temperaturi $27^{\circ}C$. Rezultati testa očitani su nakon četiri i sedam dana, a reakcija je praćena do 14 dana. Pozitivna reakcija ispoljava se promjenom boje podloge iz plave u žutu, usled stvaranja kisjeline iz glukoze. Bakterije sa oksidativnim metabolizmom glukoze stvaraju kisjelinu samo u aerobnim uslovima, što se ispoljava promjenom boje podloge u gornjem sloju (Arsenijević, 1997). Kao pozitivne kontrole, u testu su korišćeni sojevi: *Dickeya chrysanthemi* (KFB 206) koji razlaže glukozu oksidativno i fermentativno, Pss (KFB 0103), Psm R2 (KFB 0101), Psp (KFB 0102) i Xap (KFB 0104), koji imaju oksidativan metabolizam glukoze. Kao negativna kontrola korišćene su nezasijane epruvete.

4.7 Identifikacija sojeva bakterija roda *Pseudomonas*

Na osnovu rezultata proučavanja patogenih odlika, razvoja kolonija na podlozi HA, kao i rezultata opštih testova (Gram test, aktivnost oksidaze i katalaze, O/F test), grupa od 29 sojeva bakterija je ukazivala na pripadnost rodu *Pseudomonas*, stoga je dalje proučavana primjenom testova koji se koriste za identifikaciju i diferencijaciju bakterija roda *Pseudomonas*.

4.7.1 Stvaranje fluorescentnog pigmenta

U cilju diferencijacije bakterija roda *Pseudomonas* proučeno je stvaranje fluorescentnog pigmenta na Kingovoj podlozi B (King et al., 1954). Sojevi bijele boje kolonija su zasijavani bakteriološkom petljom u četiri poteza, na KB podlogu u Petri kutijama. Pozitivnom reakcijom se smatra stvaranje fluorescentnog pigmenta u podlozi, vidljivog izlaganjem podloge ultraljubičastom svjetlu (365 nm). Reakcija se posmatra nakon 24 do 48 h (Arsenijević, 1997). Kao pozitivne kontrole korišćeni su sojevi Pss (KFB 0103) i Psm R2 (KFB 0101), dok je kao negativna kontrola korišćen soj Psp (KFB 0102).

4.7.2 Vitalnost bakterija na NAS podlozi

U identifikaciji sojeva bakterija proučena je njihova vitalnost. Na hranljivoj podlozi sa 5% saharoze (NAS) zasijani su ispitivani sojevi, razmazom po površini podloge. Nakon razvoja, pojedinačne bakterijske kolonije prihvaćene su sterilnom drvenom čačalicom i homogenizovane u kapi 3% H_2O_2 , na mikroskopskoj pločici. Pojava mjehurića gasa, nastala kao rezultat izdvajanja slobodnog kiseonika, znak je pozitivne reakcije, odnosno vitalnosti bakterije (Garrett et al., 1966). Rezultati testa očitani su nakon 3, 4. i 7. dana. Kao kontrolni sojevi u testu su korišćeni Pss (KFB 0103), Psp (KFB 0102) i Psm R2 (KFB 0101).

4.7.3 LOPAT testovi

LOPAT testovi se koriste za identifikaciju patogenih varijeteta vrste *P. syringae*. Termin "LOPAT" je skraćenica (akronim) početnih slova naziva sljedećih pet reakcija: 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 arginin-dehidrolaze, T (eng. Tobacco hypersensitivity reaction) - hipersenzitivna reakcija (HR) duvana (Lelliot et al., 1966, loc.cit. Arsenijević, 1997). Na osnovu izgleda bakterijskih kolonija na HA podlozi i sposobnosti stvaranja fluorescentnog pigmenta na Kingovoj podlozi B, izdvojeno je 29 sojeva kao potencijalnih *Pseudomonas* vrsta čije su karakteristike provjerene LOPAT testovima.

4.7.3.1 Stvaranje levana

Levan je polisaharid koji nastaje razgradnjom saharoze. Bakterije koje stvaraju levan na podlogama obogaćenim saharozom, formiraju ispupčene, krupne, sjajne, glatke i sluzaste kolonije (levan tip). Sintaza levana proučena je na hranjivoj podlozi sa 5% saharoze (NAS) (Schaad et al., 2001), na osnovu izgleda kolonija nakon 2 do 3 dana razvoja u Petri kutijama. Razvoj krupnih, bijelih, sluzastih i ispupčenih kolonija ukazuje na pozitivnu reakciju. Kao pozitivne kontrole korišćeni su sojevi Pss (KFB 0103), Psm R2 (KFB 0101), Psm R1 (KFB 0120 i KFB 0121) i Psp (KFB 0102).

4.7.3.2 Aktivnost oksidaze

Aktivnost oksidaze proučena je kod 29 sojeva roda *Pseudomonas* na način kao što je već opisano u okviru opštih testova za identifikaciju sojeva bakterija.

4.7.3.3 Trulež kriški krompira

Ovim testom se utvrđuje da li proučavani sojevi stvaraju pektolitičke enzime koji su odgovorni za razgradnju pektina koji je sastavni dio srednje lamele ćelijskog zida, što za posledicu ima pojavu vlažne truleži. Krtole krompira su oprane pod mlazom česemske vode, površinski sterilisane alkoholom, prosušene i isječene na kriške debljine 7-8 mm. Kriške su zatim postavljene u sterilne Petri posude sa vlažnim sterilnim filter papirom i inokulisane. Inokulacija je vršena nanošenjem kulture bakterija na središnji dio kriške krompira pomoću bakteriološke petlje. Petri posude su inkubirane na sobnoj temperaturi. Rezultati su očitani nakon 72 h. Trulež kriški na mjestu inokulacije, usled aktivnosti pektolitičkih enzima, označava pozitivnu reakciju (Arsenijević, 1997). Reakcija se može utvrditi vizuelno ili dodirrom pomoću igle u dijelu inokulisanog tkiva. Kao pozitivna kontrola korišćen je soj *P. c.* subsp. *carotovorum* (KFB 85), a kao negativne kontrole sojevi Pss (KFB 0103), Psm R2 (KFB 0101), Psp (KFB 0102) i kap sterilne destilovane vode.

4.7.3.4 Metabolizam arginina

Sposobnost bakterija da vrše razlaganje arginina u aerobnim i anaerobnim uslovima, je uslovljena prisustvom enzima arginindehidrolaze. Za izvođenje ovog testa pripremljena je podloga sljedećeg 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 1 L. Pomoću NaOH, podešena je pH podloge na 7.2 (Thornley, 1960, loc.cit. Lelliot and Stead, 1987). Zatim je po 5 ml podloge razliveno u epruvete i autoklavirano. Sterilisana podloga je zasijavana ubodom, u dva ponavljanja za svaki soj, pri čemu je jedna epruveta zalivena sterilnim tečnim parafinom, visine oko 1,5 cm, kako bi se obezbjedili anaerobni uslovi. Razlaganje arginina dejstvom enzima arginindehidrolaze u aerobnim i anaerobnim uslovima, ogleda se promjenom boje indikatora u ružičastocrvenu, u vremenu od 4 do 14 dana za predstavnike

roda *Pseudomonas* (Misagni and Grogan, 1969; Tominaga et al., 1978, loc.cit. Arsenijević, 1997). Kao pozitivna kontrola korišćen je soj *P. fluorescens* (B 130), a kao negativna nezasijana podloga u epruvetama. Rezultati testa su očitani nakon 14 dana razvoja pri temperaturi 27°C.

4.7.3.5 Hipersenzitivna reakcija (HR)

Hipersenzitivna reakcija, posljednja od reakcija u LOPAT testovima, izvedena je za proučavanje sojeve kao što je već opisano u okviru preliminarne provjere patogenosti sojeva.

4.7.4 GATTa testovi

GATTa testovi su diferencijalni testovi za patogene varijetete *syringae* i *morsprunorum*. Ovi testovi obuhvataju proučavanje hidrolize želatina (eng. Gelatine hydrolysis), hidrolize eskulina (eng. Aesculin hydrolysis), stvaranje tirozinaze (eng. Tyrosinase activity) i korišćenje tartarata (eng. utilization of Tartarate) (Arsenijević, 1997).

4.7.4.1 Hidroliza želatina

Neke bakterije stvaraju proteolitički enzim želatinazu kojim razlažu želatin, pri čemu nastaju jedinjenja koja na nižim temperaturama ostaju u tečnom stanju. Sposobnost sojeva da vrše razlaganje želatina proučena je zasijavanjem podloge od: 3 g kvašćevog ekstrakta, 5 g peptona, 120 g želatina i 1000 ml destilovane vode. Po 3 ml podloge razliveno je u staklene epruvete i sterilisano u autoklavu pri temperaturi 120°C u trajanju 15 minuta. Sterilisana podloga je zasijana pipetiranjem po 100 µl suspenzije bakterija, u dva ponavljanja. Rezultati testa su očitani nakon tri dana razvoja u termostatu pri temperaturi 27°C. Prije očitavanja rezultata inokulisane podloge se postavljaju u frižider pri 4°C u trajanju 30 min. Ukoliko nakon tog perioda ne dođe do očvršćavanja podloge, bakterija hidrolizuje želatin (Lelliott and Stead, 1987). Kao pozitivna kontrola korišćen je soj Pss (KFB 0103), a kao negativne kontrole Psm (KFB 0101), Psp (KFB 0102) i nezasijane podloge.

4.7.4.2 Hidroliza eskulina

Korišćenje glukozyda eskulina proučeno je zasijavanjem čvrste podloge koja se sastojala od 10 g peptona, 12 g agara, 1 g eskulina, 0,5 g feriamonijum citrata i 1000 ml destilovane vode. Podloga je zasijavana ubodom bakteriološkom iglom prethodno uronjenom u koloniju bakterija starosti 24 h, u dva ponavljanja. Promjena boje podloge u tamnomrku ili crnu nakon 7-14 dana inkubacije znak je pozitivne reakcije, odnosno da je dejstvom bakterija došlo do razlaganja eskulina (Lelliott and Stead, 1987). Kao pozitivna kontrola korišćen je soj Pss (KFB 0103), a kao negativne kontrole sojevi Psm R2 (KFB 0101), Psp (KFB 0102) i nezasijane podloge.

4.7.4.3 Stvaranje tirozinaze

Stvaranje tirozinaze je proučeno na čvrstoj podlozi: 1 g L-tirozina, 5 g saharoze, 10 g casamino kisjelina (casamino acids), 5 g K₂HPO₄, 1,25 g MgSO₄ x 7H₂O, 20 g agara. Prije autoklaviranja podešena je pH vrijednost podloge na 7,2. Nakon sterilizacije podloga je razlivena u sterilne Petri kutije. Zasijavan je po jedan soj po površini podloge, po Petri posudi. Pojava crvenkasto-mrkog bojenja podloge u vremenu 3-4 dana, označava pozitivnu reakciju (Jones, 1971). Kao pozitivna kontrola korišćen je soj Psm R2 (KFB 0101), a kao negativne kontrole sojevi Pss (KFB 0103) i Psp (KFB 0102).

4.7.4.4 Korišćenje tartarata

Korišćenje L-tartarata je ispitano u tečnoj podlozi sljedećeg sastava: 1 g KH_2PO_4 , 0,2 g $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 1,5 g $\text{NaNH}_4\text{HPO}_4$, 1,5 g natrijum tartarata u 1000 ml 0,005% rastvora indikatora bromtimol plavog. pH vrijednost podloge je podešena na 7,2. Podloga je potom razlivena u epruvete (po 5 ml) i sterilisana. Zasijanje je vršeno resuspendovanjem punog zahvata kolonija starosti 24 h u podlozi. Rezultati su očitavani tokom 14 dana. Promjena boje podloge od zelene u plavu znak je pozitivne reakcije (Tominaga et al., 1978, loc.cit. Arsenijević, 1997). Kao pozitivna kontrola korišćen je soj Psm R2 (KFB 0101), a kao negativne kontrole sojevi Pss (KFB 0103) i Psp (KFB 0102).

4.7.5 Stvaranje čestica leda

Bakterija Pss posjeduje sposobnost stvaranja čestica leda (eng. Ice Nucleation Activity - INA). Ovo svojstvo se loše odražava na biljke, jer kao posljedica dolazi do izmrzavanja i oštećenja biljnog tkiva. Testiranje proučavanih sojeva na INA izvedeno je sljedećom metodom. Tečna CPG podloga (Bacto casamino acid, 1 g; Bacto peptone 10 g; glukoza 10 g; voda do 1 L) je razlivena u epruvete (po 2 ml) i sterilisana. Pun zahvat kolonije stare 24 h, bakteriološkom petljom je prenešen u podlogu. Bakterije su gajene u termostatu, u trajanju 24 h, na horizontalnom mješaču. Prije izvođenja oglada, zasijane podloge su postavljene u frižider, pri 4-5°C, u trajanju 2 h. Sa druge strane, pripremljeno je alkoholno kupatilo mješanjem leda i 95% etanola, u koje je uronjen termometar radi kontrole temperature. Dodavanjem etanola, temperatura je podešavana na -10°C. Iz zasijanih podloga, uzeto je po 10 μl kulture bakterija, koje su lagano pipetirane na dno aluminijske posude, prethodno postavljene u plutajući položaj u smešu alkohola i leda (Klement et al., 1990). Posmatran je prelazak kapi kulture bakterija iz tečnog u čvrsto agregatno stanje. Stvaranje čestica leda u roku od nekoliko sekundi, smatra se pozitivnom reakcijom. Kao pozitivne kontrole, korišćeni su sojevi *P. s. pv. glycinea* (KFB 085) i Pss (KFB 0103), a kao negativne sojevi Psm R2 (KFB 0101), Psm R1 (KFB 0120 i KFB 0121), Psp (KFB 0102) i *P. s. pv. tomato* (KFB 145).

Tabela 1. Proučavani sojevi bakterija izolovani iz *Prunus* vrsta

Broj	Šifra soja	Domačin	Biljni organ	Lokalitet	Datum izolacije	GenBank pristupni brojevi				
						<i>gyrB</i>	<i>rpoD</i>	<i>gapA</i>	<i>gltA</i>	16S rRNA
1	K1	<i>Prunus armeniaca</i>	Pupoljak	Pečurice, Bar	13.03.2017.	MT265365	MT250587	MT295219	MT345301	MT355196
2	K2	<i>Prunus armeniaca</i>	Pupoljak	Pečurice, Bar	13.03.2017.	MT265366	MT250588	MT295220	MT345302	MT355159
3	K3	<i>Prunus armeniaca</i>	Grana	Polje Mrkovsko, Bar	13.03.2017.	MT265367	MT250589	MT295221	MT345303	/
4	T2	<i>Prunus avium</i>	Grančica	Šas, Ulcinj	19.03.2017.	MN092937	/	/	/	/
5	JŠ1	<i>Prunus salicina</i>	Grančica	Šas, Ulcinj	19.03.2017.	MT265378	MT250600	MT295232	MT345314	/
6	BR1	<i>Prunus persica</i>	Grančica	Vukovci, Zeta	15.05.2017.	MT265375	MT250597	MT295229	MT345311	/
7	K4	<i>Prunus armeniaca</i>	Plod	Goričani, Zeta	20.05.2017.	MT265368	MT250590	MT295222	MT345304	/
8	T1	<i>Prunus avium</i>	List	Pečurice, Bar	29.05.2017.	MT265374	MT250596	MT295228	MT345310	/
9	K5	<i>Prunus armeniaca</i>	List	Stanjevića rupa, Danilovgrad	6.06.2017.	MT265369	MT250591	MT295223	MT345305	/
10	BR5	<i>Prunus persica</i> var. <i>nectarina</i>	Grančica	Čemovsko polje, Podgorica	10.12.2017.	MN 092938	/	/	/	/
11	K6	<i>Prunus armeniaca</i>	Grana	Stanjevića rupa, Danilovgrad	23.03.2018.	MT265370	MT250592	MT295224	MT345306	/
12	B1	<i>Prunus dulcis</i>	List	Milješ, Tuži	01.04.2018.	MT259031	MT212403	MT295206	MT314427	/
13	B2	<i>Prunus dulcis</i>	List	Milješ, Tuži	01.04.2018.	/	/	/	/	MT355441
14	K7	<i>Prunus armeniaca</i>	Grančica	Vukovci, Zeta	08.04.2018.	MT265371	MT250593	MT295225	MT345307	/
15	K8	<i>Prunus armeniaca</i>	Grančica	Velje selo, Bar	16.04.2018.	MT265372	MT250594	MT295226	MT345308	/
16	BR2	<i>Prunus persica</i>	Grančica	Lastva Grbaljska, Kotor	21.04.2018.	MT265376	MT250598	MT295230	MT345312	/
17	K9	<i>Prunus armeniaca</i>	Lisna drška	Mataguži, Zeta	18.05.2018.	MT265373	MT250595	MT295227	MT345309	/
18	N1	<i>Prunus persica</i> var. <i>nectarina</i>	Plod	Tuži	18.05.2018.	MT265377	MT250599	MT295231	MT345313	/
19	B3	<i>Prunus dulcis</i>	Plod	Ljajkovići, Zeta	21.05.2018.	MT259032	MT240937	MT295207	MT314428	/
20	B4	<i>Prunus dulcis</i>	List	Ljajkovići, Zeta	21.05.2018.	MT259033	MT240938	MT295208	MT314429	/
21	JŠ2	<i>Prunus salicina</i>	Grančica	Dabezić, Bar	26.05.2018.	MT265379	MT250601	MT295233	MT345315	/
22	B5	<i>Prunus dulcis</i>	List	Cijevna, Zeta	30.05.2018.	MT265355	MT240939	MT295209	MT314430	/
23	B6	<i>Prunus dulcis</i>	List	Cijevna, Zeta	30.05.2018.	MT265356	MT240940	MT295210	MT314431	/
24	B7	<i>Prunus dulcis</i>	List	Ubli, Kući, Podgorica	03.06.2018.	MT265357	MT240941	MT295211	MT345293	/
25	B8	<i>Prunus dulcis</i>	Grančica	Ubli, Kući, Podgorica	03.06.2018.	MT265358	MT240942	MT295212	MT345294	/
26	B9	<i>Prunus dulcis</i>	List	Farmaci, Podgorica	10.06.2018.	MT265359	MT240943	MT295213	MT345295	/

27	B10	<i>Prunus dulcis</i>	List	Ploče, Budva	15.06.2018.	MT265360	MT240944	MT295214	MT345296	/
28	B11	<i>Prunus dulcis</i>	List	Ploče, Budva	15.06.2018.	MT265361	MT240945	MT295215	MT345297	/
29	B12	<i>Prunus dulcis</i>	List	Ploče, Budva	15.06.2018.	MT265362	MT240946	MT295216	MT345298	/
30	B13	<i>Prunus dulcis</i>	List	Kočani, Nikšić	23.06.2018.	MT265363	MT240947	MT295217	MT345299	/
31	B14	<i>Prunus dulcis</i>	List	Kočani, Nikšić	23.06.2018.	MT265364	MT240948	MT295218	MT345300	MT355438
32	B15	<i>Prunus dulcis</i>	List	Danilovgrad	26.05.2018.	/	/	/	/	MT355437
33	BR6	<i>Prunus persica</i>	List	Ćemovsko polje, Podgorica	01.07.2018.	/	/	/	/	/
34	BR7	<i>Prunus persica</i>	List	Ćemovsko polje, Podgorica	01.07.2018.	/	/	/	/	/
35	BR8	<i>Prunus persica</i>	List	Ćemovsko polje, Podgorica	01.07.2018.	/	/	/	/	/
36	BR9	<i>Prunus persica</i>	Mladar	Ćemovsko polje, Podgorica	01.07.2018.	MN 092939	/	/	/	/
37	BR10	<i>Prunus persica</i>	List	Ćemovsko polje, Podgorica	01.07.2018.	/	/	/	/	/
38	BR11	<i>Prunus persica</i>	List	Ćemovsko polje, Podgorica	01.07.2018.	/	/	/	/	/
39	BR12	<i>Prunus persica</i>	List	Ćemovsko polje, Podgorica	01.07.2018.	MN 092940	/	/	/	/
40	BR13	<i>Prunus persica</i>	List	Ćemovsko polje, Podgorica	01.07.2018.	/	/	/	/	/
41	BR14	<i>Prunus persica</i>	List	Ćemovsko polje, Podgorica	05.07.2018.	MN 092941	/	/	/	/
42	BR15	<i>Prunus persica</i>	List	Ćemovsko polje, Podgorica	05.07.2018.	/	/	/	/	/
43	BR16	<i>Prunus persica</i>	List	Ćemovsko polje, Podgorica	05.07.2018.	/	/	/	/	/
44	BR17	<i>Prunus persica</i>	List	Ćemovsko polje, Podgorica	05.07.2018.	/	/	/	/	/
45	BR18	<i>Prunus persica</i>	List	Ćemovsko polje, Podgorica	05.07.2018.	/	/	/	/	/
46	BR19	<i>Prunus persica</i>	List	Ćemovsko polje, Podgorica	16.07.2018.	/	/	/	/	/
47	BR20	<i>Prunus persica</i>	List	Ćemovsko polje, Podgorica	16.07.2018.	/	/	/	/	/
48	BR21	<i>Prunus persica</i>	List	Ćemovsko polje, Podgorica	16.07.2018.	/	/	/	/	/
49	BR22	<i>Prunus persica</i>	List	Ćemovsko polje, Podgorica	16.07.2018.	MN 092942	/	/	/	/

50	BR23	<i>Prunus persica</i>	List	Ćemovsko polje, Podgorica	16.07.2018.	/	/	/	/	/
51	BR24	<i>Prunus persica</i>	List	Ćemovsko polje, Podgorica	16.07.2018.	/	/	/	/	/
52	BR25	<i>Prunus persica</i>	List	Ćemovsko polje, Podgorica	30.07.2018.	/	/	/	/	/
53	BR26	<i>Prunus persica</i>	List	Ćemovsko polje, Podgorica	30.07.2018.	MN 092943	/	/	/	/
54	BR27	<i>Prunus persica</i>	Plod	Ćemovsko polje, Podgorica	30.07.2018.	MN 092944	/	/	/	/
55	BR28	<i>Prunus persica</i>	List	Ćemovsko polje, Podgorica	12.08.2018.	/	/	/	/	/
56	BR29	<i>Prunus persica</i>	List	Ćemovsko polje, Podgorica	12.08.2018.	/	/	/	/	/
57	BR30	<i>Prunus persica</i>	List	Ćemovsko polje, Podgorica	26.08.2018.	MN 092945	/	/	/	/
58	BR31	<i>Prunus persica</i>	List	Ćemovsko polje, Podgorica	26.08.2018.	/	/	/	/	/
59	BR32	<i>Prunus persica</i>	List	Ćemovsko polje, Podgorica	26.08.2018.	/	/	/	/	/
60	BR33	<i>Prunus persica</i>	List	Ćemovsko polje, Podgorica	26.08.2018.	/	/	/	/	/
61	BR34	<i>Prunus persica</i>	Plod	Ćemovsko polje, Podgorica	26.08.2018.	/	/	/	/	/
62	BR35	<i>Prunus persica</i>	Plod	Ćemovsko polje, Podgorica	26.08.2018.	/	/	/	/	/
63	BR36	<i>Prunus persica</i>	List	Ćemovsko polje, Podgorica	8.09.2018.	/	/	/	/	/
64	BR37	<i>Prunus persica</i>	List	Ćemovsko polje, Podgorica	8.09.2018.	/	/	/	/	/
65	BR38	<i>Prunus persica</i>	List	Ćemovsko polje, Podgorica	8.09.2018.	/	/	/	/	/
66	BR39	<i>Prunus persica</i>	List	Ćemovsko polje, Podgorica	8.09.2018.	/	/	/	/	/
67	BR40	<i>Prunus persica</i>	List	Ćemovsko polje, Podgorica	8.09.2018.	/	/	/	/	/
68	BR41	<i>Prunus persica</i>	Plod	Ćemovsko polje, Podgorica	8.09.2018.	MN 092946	/	/	/	/

Tabela 2. Kontrolni sojevi bakterija korišćeni u testovima za proučavanje bakterioloških odlika

Broj	Soj	Bakterija	Izvor ¹
1.	KFB 0103	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	V. Britanija
2.	KFB 0102	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>persicae</i>	Francuska
3.	KFB 0120	<i>P. syringae</i> pv. <i>morsprunorum</i> rasa 1	Poljska
4.	KFB 0121	<i>P. syringae</i> pv. <i>morsprunorum</i> rasa 1	Poljska
5.	KFB 0101	<i>P. syringae</i> pv. <i>morsprunorum</i> rasa 2	/
6.	KFB 085	<i>P. syringae</i> pv. <i>glycinea</i>	Italija
7.	KFB 145	<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>	KFB
8.	B 130	<i>P. fluorescens</i>	UFL
9.	KFB 1	<i>X. euvesicatoria</i>	KFB
10.	KFB 206	<i>Dickeya chrysanthemi</i>	KFB
11.	KFB 85	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	KFB
12.	B 122	<i>Bacillus pumilus</i>	UFL
13.	KFB 0104	<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	Italija
14.	KFB 0114	<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>corylina</i>	V. Britanija
15.	KFB 062 (E-3)	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>	UFL

¹Porijeklo kontrolnih sojeva: KFB, Kolekcija fitopatogenih bakterija, Poljoprivredni fakultet, Beograd-Zemun, National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, York, UK; UFL, University of Florida, SAD

4.8 Identifikacija sojeva bakterija roda *Xanthomonas*

Rezultati proučavanja patogenih odlika, razvoja kolonija na YDC podlozi, kao i rezultata opštih testova (Gram test, aktivnost katalaze, O/F test), ukazivali su da grupa od 39 sojeva bakterija ispoljava karakteristike tipične za rod *Xanthomonas*, stoga je dalje proučavana primjenom testova koji se koriste za identifikaciju bakterija ovog roda.

4.8.1 Hidroliza skroba

Za dokazivanje hidrolize skroba koju vrši enzim amilaza, koristi se podloga od hranljivog agara sa 0,2% rastvorljivog skroba (Lelliot and Stead, 1987). Kulture bakterija, stare 24 h, zasijavane su bakteriološkom petljom, u vidu linije po površini podloge, po dva soja po Petri posudi. Nakon pet dana razvoja u termostatu pri 27°C, podloga je prelivena rastvorom Lugola (1 g J₂, 2 g KJ, sterilna destilovana voda, 300 ml). Reakcija se prati nekoliko sekundi. Odsustvo bojenja podloge u zoni oko razvoja bakterija predstavlja znak hidrolize skroba. Nerazloženi skrob u podlozi boji se indigo plavom bojom. Kao pozitivna kontrola korišćen je soj bakterije *X. arboricola* pv. *corylina* (KFB 0114), a kao negativne sojevi Pss (KFB 0103) i Xap (KFB 0104).

4.8.2 Hidroliza želatina

Sposobnost sojeva da razlažu želatin proučena je na prethodno opisan način (4.7.4.1 Hidroliza želatina). Kao pozitivna kontrola korišćen je soj Xap (KFB 0104), a kao negativna kontrola nezasijana podloga.

4.8.3 Hidroliza eskulina

Sposobnost sojeva da koriste glukozid eskulin proučena je na prethodno opisan način (4.7.4.2 Hidroliza eskulina). Kao pozitivne kontrole korišćeni su sojevi Pss (KFB 0103) i Xap (KFB 0104), a kao negativne kontrole soj *P. s. pv. tomato* (KFB 145) i nezasijana podloga.

4.8.4 Maksimalna temperatura razvoja

Razvoj sojeva bakterija pri 37°C proučen je u tečnoj podlozi sa kvašćevim ekstraktom i neorganskim solima (YS) (Schaad et al., 2001). Epruvete sa sterilisanom podlogom su zasijane pipetiranjem po 100 µl suspenzije bakterija u dva ponavljanja, a zatim postavljene u vodeno kupatilo pri 37°C. Razvoj bakterija u vidu zamućenja podloge, posmatran je tokom sedam dana nakon zasijavanja (Arsenijević, 1997). Kao pozitivna kontrola korišćen je soj Xap (KFB 0104) i nezasijana podloga, a kao negativna kontrola soj *Dickeya chrysanthemi* (KFB 206).

4.9 Molekularna identifikacija i karakterizacija proučavanih sojeva

U cilju identifikacije i karakterizacije proučavanih sojeva bakterija, primjenjene su molekularne metode zasnovane na lančanoj reakciji polimeraze (Polymerase Chain Reaction – PCR). Na osnovu biohemijско-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.

4.9.1 Ekstrakcija DNK

Ukupna DNK proučavanih sojeva izolovana je iz čistih kultura bakterija, gajenih 24-48 h na HA podlozi, pri 27°C korišćenjem Dneasy Plant Mini Kit-a (Qiagen, Hilden, Germany). Postupak ekstrakcije izveden je prema uputstvu proizvođača. Pun zahvat petlje bakterija prenijet je u mikroeprovete (1,5 ml) u koje je prethodno dodato 1 ml sterilne destilovane vode (SDW). Uzorak je centrifugiran pri 16 000 g, u trajanju 15 min. Dobijeni supernatant je odbačen, a talog suspendovan u 400 µl AP1 pufera i 3 µl RNase A (stock solution, 100 mg/ml) intenzivnim mešanjem na vorteks mješalici. Nakon toga, smješa je inkubirana u termobloku pri 65°C, u trajanju 10 min, kako bi došlo do lizisa ćelija. Laganim okretanjem mikroeprovete, sadržaj je nekoliko puta u toku inkubacije izmješšan. Zatim je u dobijeni lizat pipetirano 130 µl AP2 pufera, sadržaj je izmješšan i inkubiran na ledu 5 minuta, nakon čega je izvedeno centrifugiranje 5 min na 20 000 g (14000 rpm). U ovom koraku dolazi do taloženja deterdženta, proteina i polisaharida. Supernatant je zatim pipetiran u QIAamp Mini spin kolonu postavljenu u kolekcionalnoj mikroeproveti i centrifugiran 2 minuta na 20.000 g (14 000 rpm) u cilju uklanjanja istaloženih materija. Tečnost iz kolekcione tube prenijeta je u novu mikroeprovetu od 1,5 µl u koju je dodat AP3/E pufer u 1,5 puta većoj količini u odnosu na zapreminu lizata nakon čega je sadržaj izmješšan pomoću nastavka pipete. Zatim je 650 µl smeše pipetirano u DNase Mini spin kolonu postavljenu u kolekcionalnoj tubi od 2 ml, a potom centrifugirano 1 min na 6 000 g. Nakon što je tečnost iz kolektorske tubice odbačena, postupak je ponovljen sa ostatkom uzorka. Potom, u kolone je dodato 500 µl AW pufera, izvedeno je centrifugiranje 1 min na 6 000 g (8 000 rpm) i odbacivanje tečnosti iz kolektorske tubice. Zatim je pipetirano 500 µl AW pufera nakon čega je centrifugiranjem 2 min pri 20 000 g (14 000 rpm), izvršeno dodatno ispiranje ostataka etanola sa membrane kolone. DNase Mini spin kolone

prebačene su u nove mikroeprovete od 1,5 µl radi prihvatanja DNK. Rastvaranje prečišćene DNK vezane za membranu kolone izvedeno je pipetiranjem 100 µl AE pufera direktno na membranu. Nakon inkubacije na sobnoj temperaturi 5 min, izdvajanje rastvorene DNK u mikroeprovetu postignuto je centrifugiranjem 1 min na 6 000 g (8 000 rpm).

Kvalitet i prinos ekstrahovane DNK utvrđeni su gel elektroforezom, 1 µl uzorka DNK u 0,8% agaroznom gelu. Dobijeni ekstrakt čuvan je pri -20°C i korišćen za sve dalje molekularne analize.

4.9.2 Detekcija *syrB* gena

Jedna od karakteristika vrste Pss je sposobnost da sintetiše toksin siringomicin. Prisustvo *syrB* gena, odgovornog za sintezu siringomicina, proučeno je kod 29 sojeva porijeklom iz koštičavih voćaka i badema, koji su diferencirani u rod *Pseudomonas*. Detekcija *syrB* gena izvršena je pomoću specifičnih prajmera Syr B1/B2 u reakciji lančanog umnožavanja fragmenata DNK (Sorensen et al., 1998). Ovom reakcijom, umnožava se fragment veličine 752 bazna para (bp). Nazivi i oligonukleotidne sekvence prajmera i izvor literature sumirani su u Tabeli 3.

Reakciona smjesa konačne koncentracije 25 µl za jedan uzorak se sastojala od sljedećih komponenata: 18,25 µl „nuclease free“ vode, 2,5 µl 10 × Dream Taq Green Buffer koji sadrži 20 mM MgCl₂ (Thermo Scientific, Vilnius, Lithuania), 0,5 µl (10 mM) dNTP mix, 0,25 µl (5 U/µl) Dream Taq DNA polimeraze (Thermo Scientific, Vilnius, Lithuania), 1,25 µl (10 µM) prajmera B1/B2 i 1 µl uzorka DNK.

Program reakcije obuhvatio je: početnu denaturaciju pri temperaturi 94°C u trajanju 3 min, zatim 35 ciklusa denaturacije pri 94°C u trajanju 1,5 min, vezivanja prajmera pri 60°C u trajanju 1,5 min i ekstenzije pri 72°C u trajanju 3 min. Završna ekstenzija odvijala se pri temperaturi 72°C, u trajanju 10 minuta. Ekstrakt DNK soja Pss (KFB 0103) korišćen je kao pozitivna kontrola, dok je kao negativna kontrola korišćena SDW.

PCR reakcije izvedene su u aparatu Thermal Cycler 2720 (Applied Biosystems, SAD). Proizvodi PCR reakcije razdvojeni su elektroforezom u 1,5% agaroznom gelu i 1 × Tris-acetat-EDTA (TAE) puferu, pri konstantnom naponu od 80 V, u trajanju od 80 min, a zatim obojeni potapanjem gela u rastvor etidijum-bromida (1 µg/ml) u trajanju od 20 min. Fragmenti su posmatrani pod UV svjetlom na transiluminatoru i fotografisani pomoću Doc Print sistema (Vilber Lourmat, Francuska).

4.9.3 Detekcija *ftsX* gena

Detekcija *ftsX* gena, odgovornog za sintezu transmembranskog proteina vrste Xap, kod 39 proučavanih sojeva koji su diferencirani u rod *Xanthomonas*, porijeklom iz breskve, trešnje i badema, izvršena je pomoću specifičnih prajmera XapY17-F/XapY17-R u reakciji lančanog umnožavanja fragmenata DNK (Tabela 3; Pagani, 2004; Pothier et al., 2011). Ovom reakcijom, umnožava se fragment veličine 943 bp.

Reakciona smeša za PCR sastojala se od: 8 µl „nuclease free“ vode, 12,5 µl PCR master mix (Thermo Scientific), 1,25 µl (0,5µM) prajmera XapY17-F i XapY17-R i 2 µl uzorka DNK. Ukupna zapremina PCR smeše iznosila je 25 µl po uzorku.

Program PCR reakcije se sastojao od početne denaturacije pri 95°C u trajanju 4 min, 30 ciklusa pri 92°C u trajanju 60 s, 53°C u trajanju 60 s i 72°C u trajanju 2 min, praćeno finalnom ekstenzijom pri 72°C tokom 5 minuta. Ekstrakt DNK soja Xap (KFB 0104) korišćen je kao pozitivna kontrola, dok je uzorak bez DNK predstavljao negativnu kontrolu. Proizvodi PCR analize analizirani su nakon gel elektroforeze i bojenja sa etidijum bromidom na prethodno opisan način.

4.9.4 Sekvenciona analiza 16S rRNK gena

Genska sekvenca ribozomalne RNK nije podložna brzim promjenama tokom evolucije i zato njena analiza predstavlja pouzdan način u filogenetskim proučavanjima različitih vrsta bakterija. Za sekvencionu analizu 16S rRNK gena je odabrano šest sojeva: K1, K1, B2, B14, B15 i BR13. Razlog izbora ovih sojeva je što je analiza pokazala da sojevi K1, K2, B2 i B14 ne posjeduju *syrB* gen, kao i da sojevi B15 i BR13 ne posjeduju *ftsX* gena. Parcijalna sekvenca ribozomalnog gena umnožena je korišćenjem univerzalnih prajmera fD1/rP2 (Weisburg et al., 1991) (Tabela 3).

Reakciona smješa 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 (10 mM), 1 μ l prajmera, 0,3 μ l DreamTaq DNK polimeraze (Thermo Scientific, Vilnius, Lithuania) i 3 μ l uzorka DNK. Reakcija se odvijala prema sljedećem programu: početna denaturacija pri temperaturi 95°C 5 min, 35 ciklusa denaturacije pri 94°C u trajanju 1 min, vezivanja prajmera pri 55°C u trajanju 1 min i ekstenzije pri 72°C u trajanju 1,5 min i posljednji ciklus ekstenzija 5 minuta 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 X (Kumar et al., 2018), nakon čega je određena konsenzus nukleotidna sekvenca ukupne dužine 1024 bp. Dobijene sekvence su upoređene sa sekvencama dostupnim u National Collection of Plant Pathogenic Bacteria (NCBI) korišćenjem BLASTn algoritma (Altschul et al., 1997). Konsenzus sekvence dostavljene su banci gena, nakon čega im je dodijeljen pristupni broj (Tabela 1).

4.9.5 Rep-PCR

Molekularna karakterizacija i genetički diverzitet sojeva proučeni su primjenom rep-PCR metode pomoću BOX prajmera. U cilju utvrđivanja razlika u populaciji bakterija, primjenjuje se metoda koja se zasniva na vezivanju ponovljivih sekvenci u genomu. Ova metoda se naziva Rep-PCR i izvedena je prema protokolu Shaad i sar. (2001). Umetnute ponavljajuće sekvence kod 68 proučavanih sojeva umnožene su izvođenjem BOX PCR, upotrebom BOXA1R prajmera (Tabela 3).

Umnožavanje fragmenata DNK vršeno je u 25 μ l reakcione smješe 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 prajmera (20 μ M) i 1 μ l uzorka DNK. Master miks je pripremljen na ledu, a potom je u sterilne PCR tubice raspoređeno po 25 μ l smješe. Kao pozitivna kontrola za 29 sojeva koji pripadaju rodu *Pseudomonas*, korišćeni su referentni sojevi Pss (KFB 0103), Psp (KFB 0102), Psm R1 (KFB 0120) i Psm R2 (KFB 0101), dok je za 39 sojeva koji pripadaju rodu *Xanthomonas*, korišćen referentni soj Xap (KFB 0104). Kao negativna kontrola korišćena je SDW.

Program reakcije sastojao se od sljedećih koraka: početna denaturacija pri 95°C, u trajanju 2 min, potom 35 ciklusa započetih dvijema denaturacijama pri 94°C u trajanju 3 s, odnosno 92°C u toku 30 s, vezivanja prajmera pri 50°C u trajanju 1 min, sinteza lanaca pri 65°C u toku 8 min i finalna ekstenzija pod istim uslovima.

Analiza 5 μ l PCR proizvoda obavljena je nakon razdvajanja u 1,5% agaroznom gelu i 0,5 \times TAE puferu (Tris, EDTA, pH 8,0) korišćenjem horizontalne elektroforeze (15 \times 15 cm) pri konstantnom naponu od 60 V u trajanju 30 min, a potom pri 80 V, u trajanju 3,5 h. Fragmenti su obojeni potapanjem gela u rastvor etidijum-bromida (1 μ g/ml) u trajanju od 20 min, posmatrani pod UV svjetlom na transiluminatoru i fotografisani pomoću Doc Print sistema za dokumentaciju (Vilber Lourmat, Francuska).

4.9.6 Analiza multilokusnih sekvenci (MLSA)

Analiza multilokusnih sekvenci (eng. Multilocus sequencing analysis - MLSA) zasniva se na analizi konstitutivnih (eng. housekeeping) gena, koji su odgovorni za najvažnije procese i funkcionisanje svake ćelije. Konstitutivni geni trpe male promjene tokom evolucije, pa se smatraju konzerviranim i zato su pogodni za dugoročne epidemiološke studije. MLSA nalazi primjenu u identifikaciji sojeva bakterija do nivoa vrste i podvrste, kao i proučavanjima genetičkog diverziteta i filogenetskih odnosa usko povezanih vrsta.

MLSA je izvedena za 28 proučavanih sojeva porijeklom iz koštičavih voćaka i badema. Soj B2 nije uključen u MLSA analizu zbog niskog kvaliteta dobijene sekvence *rpoD* gena. Analiza je izvedena prema protokolu Hwang i sar. (2005) (Tabela 3), umnožavanjem fragmenata četiri konstitutivna gena: *gapA*, *gltA*, *gyrB*, *rpoD* kod 29 reprezentativnih bakterijskih sojeva, koji pripadaju rodu *Pseudomonas*. Gen *gapA* katališe oksidativnu fosforilaciju gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaze A, *gltA* kodira transkripciju citrat sintaze, *gyrB* kodira sintezu B subjediničice DNK giraze, dok je *rpoD* gen koji kontroliše RNA polimeraza sigma70 faktor, zadužen za početak i usmjeravanje transkripcije.

Reakciona smješa krajnje zapremine 25 μ l, sadržala je sljedeće komponente: 17,9 μ l „nuclease free“ vode, 2,5 μ l 10 \times DreamTaq Buffer sa dodatkom 20mM MgCl₂ (Thermo Scientific, Vilnius Lithuania), 0,5 μ l dNTPs (10mM), po 1 μ l prajmera, 0,1 μ l Taq DNK polimeraze (Thermo Scientific, Vilnius, Lithuania) i 2 μ l 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. PCR reakcije izvedene su u aparatu Thermal Cycler 2720 (Applied Biosystems, SAD). Umnoženi DNK proizvodi razdvajani su elektroforezom u 1,5% agaroznom gelu. Nakon toga, gelovi su obojeni u rastvoru etidijum bromida (1 μ g/ml) u trajanju 20 min i posmatrani pod UV svjetlom 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 banke gena, korišćen je BLAST program.

Konsenzus sekvence dostavljene su banci gena, nakon čega im je dodijeljen pristupni broj (Tabela 1). Genske sekvence proučavanih sojeva korišćene su za filogenetsku analizu i poređenje sa sekvencama tipskih i patotipskih sojeva roda *Pseudomonas* koje su preuzete iz NCBI i PAMDB (Plant Associated Microbes Database) banke gena.

Filogenetskoo stablo izgrađeno je korištenjem pojedinačnih poravnanja sljedećim redosledom: *rpoD* (498 bp), *gapA* (468 bp), *gltA* (528 bp) i *gyrB* (507 bp). Filogenetska analiza izvedena je primjenom „Maximum Likelihood“ metode, sa genetičkom udaljenošću između nukleotidnih sekvenci izračunatoj prema Kimura-2 modelu (Kimura, 1980). Statistička značajnost testirana je „bootstrap“ analizom sa 1000 ponavljanja.

4.9.7 Sekvenciona analiza *gyrB* gena

Filogenetska analiza *Xanthomonas* vrsta, koja se zasniva na poravnanju parcijalnih sekvenci *gyrB* gena, ukazuje na srodnost sojeva i predstavlja alat za jednostavnu i pouzdanu identifikaciju na nivou vrsta (Parkinson et al., 2007).

Parcijalna sekvenca *gyrB* gena umnožena je korišćenjem specifičnih prajmera XgyrPCR2F i X.gyr.rsp (Parkinson et al., 2007) (Tabela 3), kojim se umnožava fragment veličine 729 bp. PCR analiza je izvedena prema modifikovanom protokolu Parkinson i sar. 2007 (usled nespecifičnog umnožavanja izvršena je modifikacija u temperaturi vezivanja prajmera koja je povećana sa 50°C

na 57°C). Za sekvencionu analizu *gyrB* gena odabrano je, na osnovu BOX PCR profila, 10 reprezentativnih sojeva koji pripadaju rodu *Xanthomonas*.

Reakciona smješa konačne zapremine 25 µl sadržala je: 17,9 µl „nuclease free“ vode, 2,5 µl 10 × Dream Taq Buffer koji sadrži 20 mM MgCl₂ (Thermo Scientific, Vilnius, Lithuania), 0,5 µl dNTPs (10 mM, Invitrogen), 0,1 µl (5 U/µl) Dream Taq DNA polimeraze (Thermo Scientific, Vilnius, Lithuania), po 1 µl prajmera (10 µM) i 2 µl uzorka DNK. PCR reakcija se odvijala po sljedećem programu: početna denaturacija pri temperaturi 94°C u trajanju 2,5 minuta koju sledi 34 ciklusa denaturacije pri 94°C u trajanju 30 sekundi, vezivanje prajmera pri 57°C za 45 sekundi i sinteza pri 68°C u trajanju 1 minuta. Finalna ekstenzija odvijala se pri 68°C tokom 7 minuta.

PCR reakcije izvedene su u aparatu Thermal Cycler 2720 (Applied Biosystems, SAD). Proizvodi PCR reakcije razdvojeni su elektroforezom u 1,5% agaroznom gelu i 1 × Tris-acetat-EDTA (TAE) puferu, pri konstantnom naponu od 80 V, u trajanju od 45 min, a zatim obojeni potapanjem gela u rastvor etidijum-bromida (1 µg/ml) u trajanju od 20 min. Fragmenti su posmatrani pod UV svjetlom na transiluminatoru i fotografisani pomoću Doc Print sistema (Vilber Lourmat, Francuska).

Umnoženi DNK fragmenti odabranih sojeva sekvencirani su u oba smera (Macrogen Europe, Amsterdam, The Netherlands), korišćenjem posebnih prajmera za sekvenciranje: X.gyr.fsp.short i X.gyr.rsp3 (Parkinson et al., 2007). 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 X (Kumar et al., 2018), nakon čega je određena konsenzus nukleotidna sekvenca ukupne dužine 446 bp. Mogućnost identifikacije proučavanih sojeva na osnovu ovog gena izvršena je poređenjem dobijenih sekvenci sa sekvencama dostupnim u NCBI korišćenjem BLASTn algoritma (Altschul et al., 1997). Poravnanje sekvenci izvršeno je upotrebom CLUSTAL W algoritma, a dalja analiza pomoću softvera MEGA X.

Filogenetska analiza za odabrane sojeve izvedena je primjenom “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. Genske sekvence proučavanih sojeva korišćene su za filogenetsku analizu i poređenje sa sekvencama *X. arboricola* patovara *pruni*, *corylina*, *juglandis*, *celebensis*, *arracaciae*, *guizotiae*, *fragariae* i *populi* i *Xanthomonas prunicola*. Filogenetsko stablo ukorijenjeno je korišćenjem sekvence *gyrB* gena sojeva *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (CPBF 1136 i ICMP 13).

4.10 Proučavanje osjetljivosti sojeva prema baktericidima

Osjetljivost izolovanih sojeva prema baktericidima proučena je na podlozi sa saharozom i peptonom (SPA) (20 g saharoze; 5 g peptona; 0,5 g K₂HPO₄; 0,25 g MgSO₄ × 7H₂O; 12,0 g Oxoid agar No.3; destilovana voda do 1 L) (Lelliot and Stead, 1987). U podlogu su nakon sterilizacije i hlađenja do 48°C, aseptično dodate odgovarajuće količine baktericida.

U ogledu je proučeno dejstvo 25 i 50 ppm streptomycin-sulfata i 100 i 200 ppm bakar-sulfata (CuSO₄). Bakterije su zasijavane pipetiranjem 3 µl suspenzije koncentracije približno 10⁷ cfu/ml, na površinu podloge. Ogled je izveden za svaki izolovani soj, kao i za kontrolne sojeve Pss (KFB 0103), Psm R2 (KFB 0101), Psm R1 (KFB 0120), Xap (KFB 0104), u dva ponavljanja. Posmatran je porast bakterija na podlogama, 72 h nakon inkubacije pri 27°C.

Soj *X. euvesicatoria* (E-3, KFB 062), rezistentan na pomenute koncentracije baktericida, korišćen je kao pozitivna kontrola, dok je nezasijana podloga korišćena kao negativna kontrola. Razvoj bakterija na podlozi ukazuje da je soj rezistentan na proučavanu koncentraciju baktericida, dok odsustvo razvoja ukazuje da je bakterija osjetljiva.

Tabela 3. Prajmeri i PCR metode korišćeni u radu

PCR metoda	Naziv i sekvenca prajmera (5'-3')	Veličina fragmenta	Literatura
<i>gyrB</i>	B1: CTTTCCGTGGTCTTGATGAGG	752 bp	Sorensen et al., 1998
	B2 : TCGATTTTGCCGTGATGAGTC		
<i>X. a. pv. pruni</i>	XapY17-F: CGTGGTGATCAGCGAGTCATTC	943 bp	Pothier et al., 2011
	XapY17-R: GACGTGGTGATGATGATCTGC		
16S r RNK	fD1: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	~ 1450 bp	Weisburg et al., 1991
	rP2: ACGGCTACCTTGTTACGACTT		
<i>gyrB</i>	XgyrPCR2F: AAGCAGGGCAAGAGCGAGCTGTA	729 bp	Parkinson et al., 2007
	X.gyr.rsp1: CAAGGTGCTGAAGATCTGGTC		
<i>gapA</i>	gapAFp: CCGGCSGARCTGCCSTGG	~ 650 bp	Hwang et al., 2005
	gapARps:GTGTGRTTGGCRTC GAARATCGA		
<i>gltA</i>	gltAFp: CCTCBTGCGAGTCGAAGATCACC	~ 1050 bp	Hwang et al., 2005
	gltARp: TTGTAVGGRCYGGAGAGCATTTC		
<i>gyrB</i>	gyrBFps: TCBGCRGCVGARGTSATCATGAC	~ 750 bp	Hwang et al., 2005
	gyrBRps: TTGTCYTTGGTCTGSGAGCTGAA		
<i>rpoD</i>	rpoDFp: AGGTGGAAGACATCATCCGCATG	~ 1100 bp	Hwang et al., 2005
	rpoDRps: CCGATGTTGCCTTCCTGGATCAG		
Rep PCR	BoxA1R:CTACGGCAAGGCGACGCTGACG	fragmenti različite veličine	Schaad et al., 2001

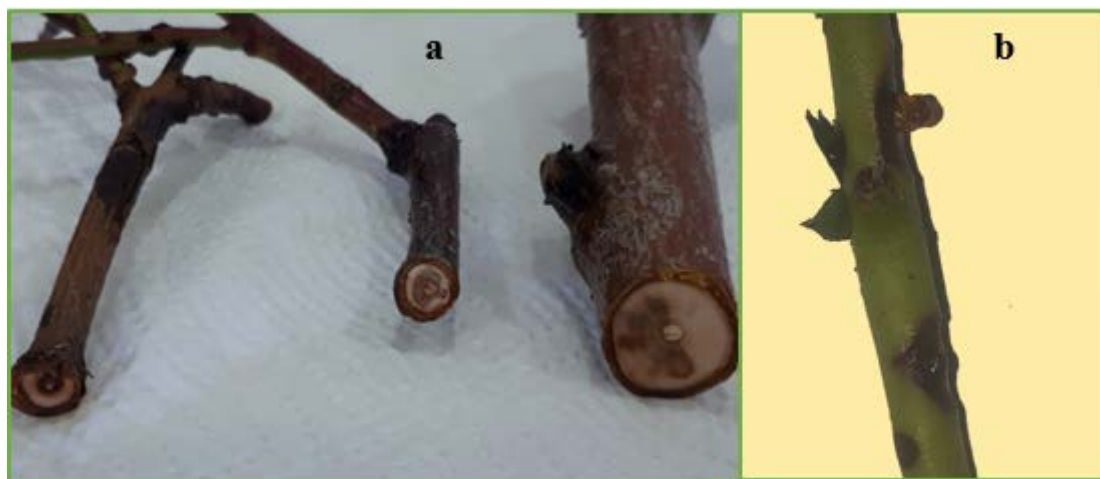
5. REZULTATI

5.1 Obilazak terena i simptomi oboljenja

U periodu od 2017. do 2018. godine izvršen je obilazak terena širom Crne Gore u cilju zdravstvenog pregleda stabala koštičavih voćaka i badema i utvrđivanja prisustva i rasprostranjenosti bakterioznih oboljenja. Pregledani su regioni najznačajniji po gajenju koštičavih voćaka i badema u Crnoj Gori. Biljni materijal sa simptomima koji mogu ukazivati na prisustvo patogenih bakterija, prikupljen je sa više od 50 različitih lokaliteta. Međutim, fitopatogene bakterije su izolovane iz uzoraka prikupljenih sa 20 lokaliteta koji pripadaju centralnom i južnom dijelu Crne Gore (opština Bar: Pečurice, Polje Mrkovsko, Velje selo, Dabezić; opština Ulcinj: Šas; opština Budva: Ploče; opština Kotor: Lastva Grbaljska; opština Zeta: Cijevna, Ljajkovići, Mataguži, Vukovci, Goričani; opština Danilovgrad: Stanjevića rupa, Ćurilac; opština Tuzi: Tuzi, Milješ; opština Podgorica: Farmaci, Kuči (Ubli), Ćemovsko polje; opština Nikšić: Kočani). U okviru ovog istraživanja, ukupno je izolovano i proučeno 68 sojeva. Najveći broj sojeva (37) je izolovan sa lokaliteta Ćemovsko polje, gdje i skoncentrisana najznačajnija proizvodnja breskve u Crnoj Gori.

Uzorkovanje biljnog materijala vršeno je tokom cijele godine, ali je najuspješniji period za izolaciju sojeva bakterija bio tokom kasnog proljeća i kasnog ljeta. Sojevi bakterija su izolovani iz različitih biljnih organa. Najveća uspješnost izolacije postignuta je iz listova sa simptomima pjegavosti (oko 66,1%), dok su ostali sojevi izolovani iz plodova, lisne peteljke, pupoljaka, grančica i grana.

Simptomi nalik bakteriozama uočeni su tokom 2017. i 2018. godine na grančicama breskve i nektarine. U decembru 2017. godine, na stablu mladih sadnica nektarine uočene su ulegnute nekroze koje su se spuštale duž stabla nekta od vrha prema dolje, što je prouzrokovalo sušenje bočnih grančica. Sakupljen je veći broj uzoraka, međutim uspješno je izolovan samo jedan soj žutih kolonija iz sorte nektarine Big Top (Slika 4a). Na mladim grančicama breskve, tokom kasnog proljeća i ranog ljeta 2018. godine, uočeni su simptomi ljetnjih rak-rana, koje su bile tamne, izdužene, praćene lučenjem smole i nekroze pupoljaka u okviru kojih je biljno tkivo bilo tamno, ulegnuto (Slika 4b).



Slika 4. Simptomi nekroze grančica: (a) nekroza pupoljaka nektarine; (b) nekroza grančica breskve. Prirodna infekcija. (Foto: T. Popović)

Prvi simptomi na listovima breskve uočeni su početkom jula mjeseca 2018. godine. Simptomi su praćeni naredna dva i po mjeseca (do 15. septembra 2018. godine). Tokom ovog perioda sakupljeni su uzorci listova sa simptomima pjegavosti, sa različitih parcela, različitog

sortimenta i različite starosti iz kojih su uspješno izolovani sojevi bakterija. Pjege na lišću breskve su u početku male, uglaste, vodenaste (slika 5a), kasnije se uvećavaju, i poprimaju tamnoljubičastu, smeđu ili crnu boju (Slika 5b). Pjege mogu biti okružene hlorotičnim oreolom. Vrhovi lišća najčešće nekrotiraju, do nekrotičnog dijela obično se javlja hloroza, odnosno žućenje lišća, na osnovu čega se inficirano lišće lako uočava u voćnjaku (Slika 5c, d). Pjege su uglavnom koncentrisane na vrhu lista i duž centralnog lisnog nerva, ali i rasute po cijeloj lisnoj površini. Napredovanjem bolesti, lisne pjege se spajaju i nekrotično tkivo ispada čime lišće dobija šupljikav izgled. Inficirano lišće žuti i opada. Na pojedinim parcelama, početkom jula, intenzitet bolesti je iznosio od 30% do preko 80% (Slika 6a, b) i biljke su odbacile oko 5% lisne mase. Kako je bolest napredovala, sredinom septembra 2018. godine, na pojedinim parcelama intenzitet bolesti je iznosio 100%, a biljke su odbacile preko 30% lisne mase (Slika 6c, d). Najveću osjetljivost je ispoljila sorta breskve Royal Bel.

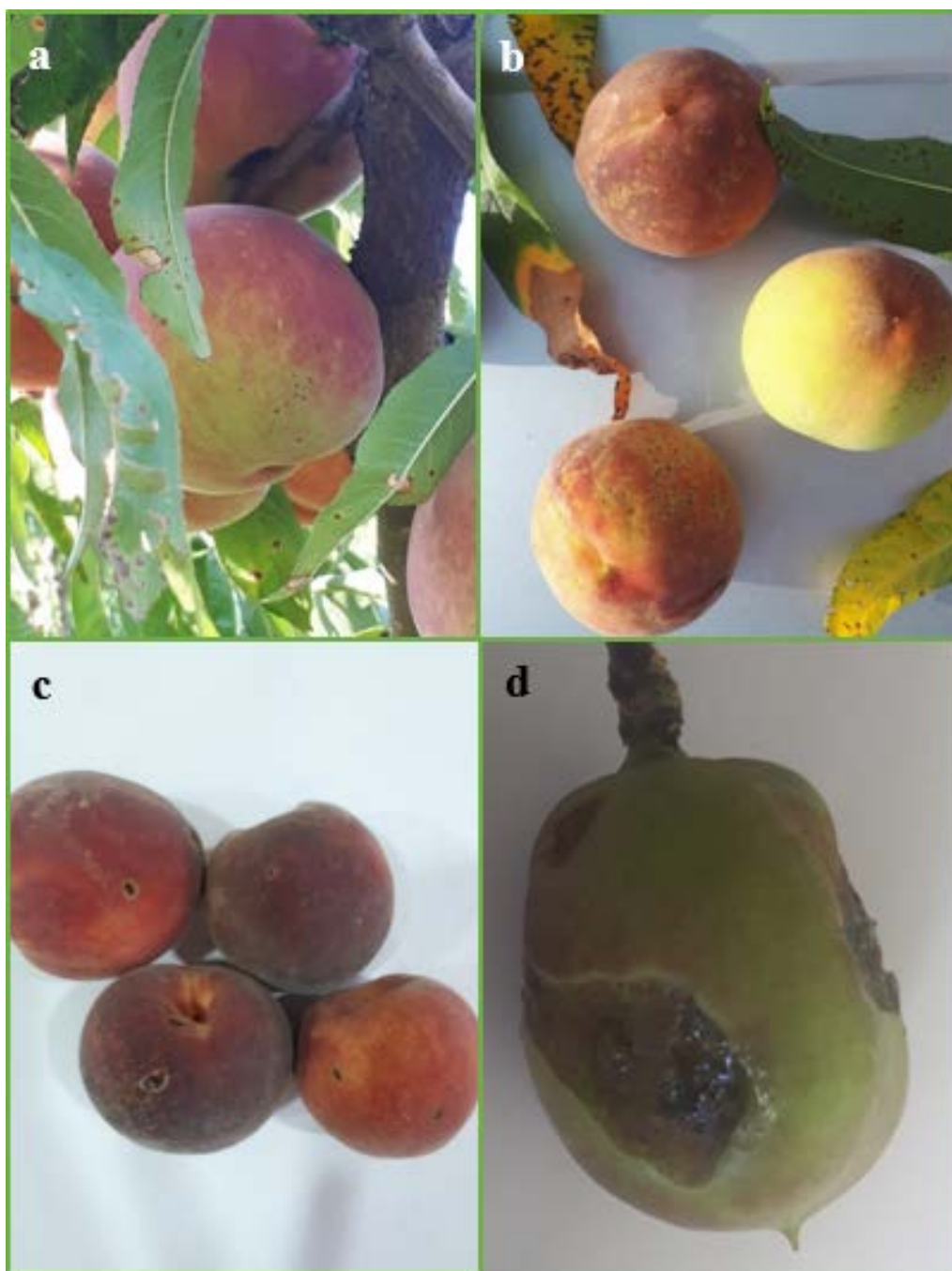


Slika 5. Simptomi lisne pjegavosti breskve: (a) uglaste, vodenaste pjege; (b) tamnoljubičaste, smeđe i crne pjege; (c, d) nekroza vrhova listova. Prirodna infekcija. (Foto: T. Popović)



Slika 6. Simptomi lisne pjegavosti breskve: (a) početni stadijum hloroze i opadanja pojedinačnih listova; (b) jači intenzitet zaraze krošnje i početak defolijacije; (c, d) masovno odbacivanje zaraženog lišća breskve. (Foto: T. Popović)

Na plodovima breskve prve pjege su uočene krajem jula mjeseca, dok su na plodovima nektarine uočene krajem maja. Sojevi bakterija su uspješno izolovani iz pjega na plodovima breskve tokom jula, avgusta i septembra 2018. godine. Na površini još nesazrelih plodova breskve uočavale su se male, ulegnute, kružne pjege braon boje sa vodenastim ivicama ili svjetlozelenim oreolom (Slika 7a, b). Kasnije na plodovima, u okviru pjega dolazilo je do pucanja tkiva i lučenja smole (Slika 7c). Na plodovima nektarine uočene su ulegnute braon pjege iz kojih se izlučuje smola (Slika 7d).



Slika 7. Simptomi pjegavosti plodova breskve i nektarine: (a, b) sitne, ulegnute, kružne braon pjege na plodovima breskve; (c) pucanje tkiva u okviru pjega na plodovima breskve; (d) ulegnute braon pjege iz kojih se izlučuje smola na plodu nektarine. Prirodna infekcija. (Foto: T. Popović)

Zdavstvenom pregledu badema poklonjena je posebna pažnja iz razloga što je prisustvo Xap na ovoj vrsti u Crnoj Gori utvrđeno 1994. godine. Najveći broj sojeva bakterija porijeklom iz badema izolovan je iz listova (12 sojeva), tokom kasnog proljeća 2018. godine. Simptomi na listovima badema su bili intenzivni i često su zahvatili više od 80% listova. Uočene su sitne, okruglaste pjege, okružene hlorotičnim oreolom, u početku žućkasto-crvene, vremenom prelaze u crvenu i na kraju mrku boju (Slika 8a). Tkivo u okviru pjega postepeno nekrotira, suši se i ispada, te nastaje šupljikavost lišća. Nekroza je izražena i na vršnim djelovima listova, koji se suše i uvijaju. Pjege se šire i spajaju, što dovodi do nekroze veće površine lista (Slika 8b). Lišće zahvaćeno infekcijom masovno opada.

Osim listova, sojevi bakterija izolovani su krajem maja, početkom juna 2018. godine, iz ploda i grančice badema. Na plodu badema uočene su ulegnute pjege iz kojih se izlučuje smola

(Slika 8c). Na mladoj grančici pupoljci se ne razvijaju i oko njih uočavaju se tamne, ulegnute i izdužene nekroze praćene lučenjem smole (Slika 8d).



Slika 8. Simptomi na bademu: (a, b) pjegavosti listova badema; (c) ulegnute pjege na plodu badema iz kojih se izlučuje smola; (d) nekroza pupoljaka na grančici badema. Prirodna infekcija. (Foto: T. Popović)

Sojevi bakterija izolovani su u proljećnjem periodu 2017. i 2018. godine, iz različitih biljnih organa kajsije: pupoljaka, lisnih peteljki, ploda, grančica i grana. Najpovoljniji period za izolaciju ove grupe sojeva je bio u proljeće. U mladim voćnjacima kajsije u proljeće, primjećeno je sušenje grana sa suvim lišćem koje ne otpada, već ostaje pričvršćeno za grane kajsije (Slika 9a). Uklanjanjem površinskog sloja kore na oboljelim granama uočava se nekroza tkiva ispod kore. Iz nekrotičnih pupoljaka i lisnih drški, kao i površinskih smeđih pjega na plodu kajsije (Slika 9b), izolovani su sojevi bakterija.



Slika 9. Simptomi na kajsiji: (a) sušenje grana kajsije; (b) smeđe pjege na plodu kajsije. Prirodna infekcija. (Foto: T. Popović)

Na japanskoj šljivi u proljeće 2017. i 2018. godine, uočeni su suvi vrhovi grančica, ali i sušenje grančica i grana (Slika 10a). Uklanjanjem površinskog sloja kore na oboljelim granama uočava se nekroza tkiva ispod kore (Slika 10b). Iz oboljelih grančica su uspješno izolovani sojevi bakterija.



Slika 10. Simptomi na japanskoj šljivi: (a) sušenje grana Japanske šljive; (b) nekroza grančice japanske šljive. Prirodna infekcija. (Foto: T. Popović)

Tokom proljeća 2017. godine, na granačicama trešnje razvijale su se tamne, izdužene, rak-rane praćene isticanjem smole (Slika 11a, b). Simptomi na listovima trešnje su bili u vidu nekrotičnih pjega, veličine 1-3 mm. Iz rak-rana na grančicama i pjega na listovima trešnje izolovani su sojevi bakterija.



Slika 11. Simptom rak-rana na trešnji: (a, b) tamne, izdužene rak-rane na grančicama trešnje. Prirodna infekcija. (Foto: T. Popović)

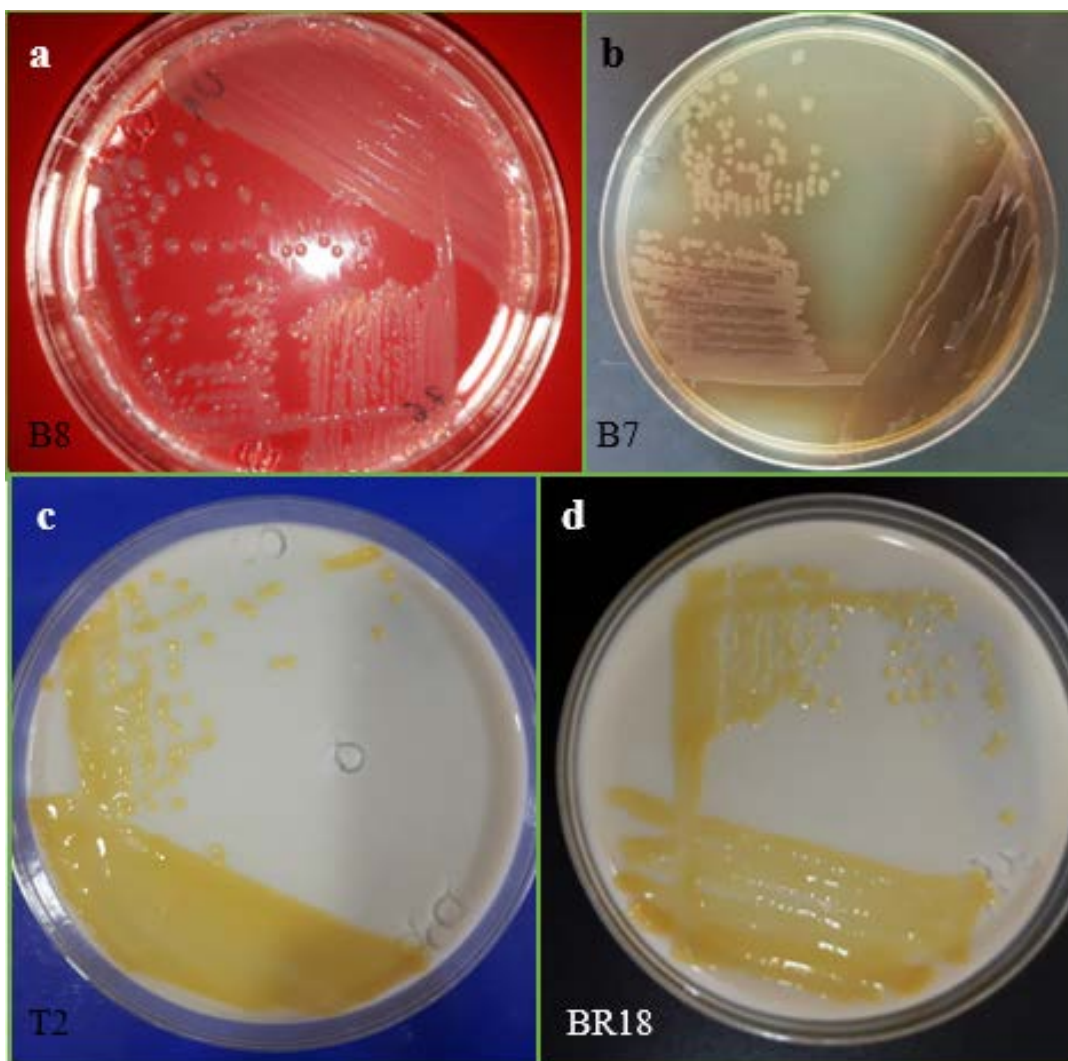
Na pregledanim zasadima koštičavih voćaka i badema tokom 2017-2018. godine, nisu uočeni simptomi karkateristični za prisustvo *Xylella fastidiosa* i *Agrobacterium tumefaciens*.

5.2 Izgled i razvoj kolonija na hranljivim podlogama

Na standardnoj podlozi od hranljivog agara (HA), tri dana nakon zasijavanja uočene su dvije grupe bakterijskih kolonija (Tabela 4). Jedna grupa sojeva (29 sojeva) je nakon 24 h formirala ispupčene, sjajne, sivo-bjeličaste krupne kolonije (Slika 12a). Izgled ovih kolonija odgovarao je izgledu kontrolnog soja Pss (KFB 0103). Soj B7, izolovan iz badema, je stvarao braon pigment u HA podlozi (Slika 12b). Druga grupa sojeva (39 sojeva) je nakon 48 h gajenja na HA formirala okrugle, ispupčene, sjajne, svjetložute kolonije, dok je na YDC podlozi formirala sjajne, ispupčene kolonije krem-žute boje, sluzaste konzistencije (Slika 12c, d). Izgled ovih kolonija odgovarao je izgledu kontrolnog soja Xap (KFB 0104) na podlogama HA i YDC.

Tabela 4. Izgled kolonija na HA i YDC podlogama

Šifra soja	HA podloga kolonije sjajne, bjeličaste, ispupčene, nepravilnih ivica	YDC podloga kolonije sjajne, ispupčene, krem-žute, sluzaste konzistencije
K1, K2, K3, JŠ1, BR1, K4,T1, K5, K6, B1, B2, K7, K8, BR2, K9, N1, B3, B4, JŠ2, B5, B6, B7, B8, B9, B10, B11, B12, B13, B14	+	/
T2, B15, BR5, BR6, BR7, BR8, BR9, BR10, BR11, BR12, BR13, BR14, BR15, BR16, BR17, BR18, BR19, BR20, BR21, BR22, BR23, BR24, BR25, BR26, BR27, BR28, BR29, BR30, BR31, BR32, BR33, BR34, BR35, BR36, BR37, BR38, BR39, BR40, BR41	/	+
<i>P. s. pv. syringae</i> (KFB 0103)	+	/
<i>X. a. pv. pruni</i> (KFB 0104)	/	+



Slika 12. Izgled bakterijskih kolonija na HA i YDC podlogama: (a, b) izgled kolonija na HA nakon 48 h, rod *Pseudomonas*, B8 i B7 - proučavani sojevi izolovani iz badema; (c, d) izgled kolonija na YDC podlozi nakon 72 h, rod *Xanthomonas*, T2 i BR18 - proučavani sojevi izolovani iz trešnje i breskve. (Foto: T. Popović)

5.3 Patogene odlike sojeva

Odabir izolovanih sojeva za dalja proučavanja izvršen je na osnovu hipersenzitivne reakcije biljaka duvana i muškatile, kao i patogenosti na biljci domačinu.

5.3.1 Hipersenzitivna reakcija

Svi proučavani sojevi prouzrokovali su hipersenzitivnu reakciju (HR) listova duvana i muškatile. Pojava nekroze na mjestima inokulacije listova duvana i muškatile zabilježena je nakon 24-48 h (Slika 13 i 14). Listovi muškatile su se pokazali kao praktični za izvođenje HR testa, iz razloga što su dostupni tokom cijele godine i pogodni za infiltraciju. Sojevi bijelih kolonija prouzrokovali su hipersenzitivnu reakciju nakon 24 h, dok su sojevi žutih kolonija prouzrokovali hipersenzitivnu reakciju nakon 48 h. Pozitivne kontrole Pss (KFB 0103) i Xap (KFB 0104) su takođe prouzrokovale pojavu nekroze na mjestima inokulacije, nakon 24 h odnosno 48 h. Na mjestu infiltracije listova sterilnom destilovanom vodom nije došlo do pojave nekroze biljnog tkiva ni nakon 48 h.



Slika 13. Hipersenzitivna reakcija listova duvana: lice i naličje lista duvana sa pojavom nekrotične zone na mjestima infiltracije suspenzije bakterija. (Foto: T. Popović)

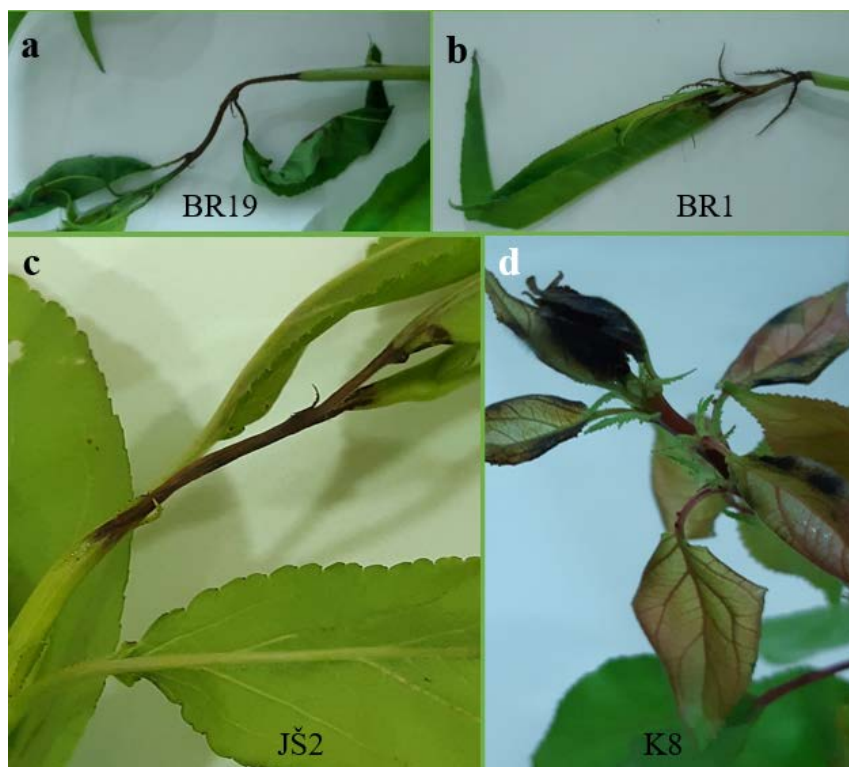


Slika 14. Hipersenzitivna reakcija listova muškatile: lice i naličje listova muškatile sa pojavom nekrotične zone na mjestima infiltracije suspenzije bakterija. (Foto: T. Popović)

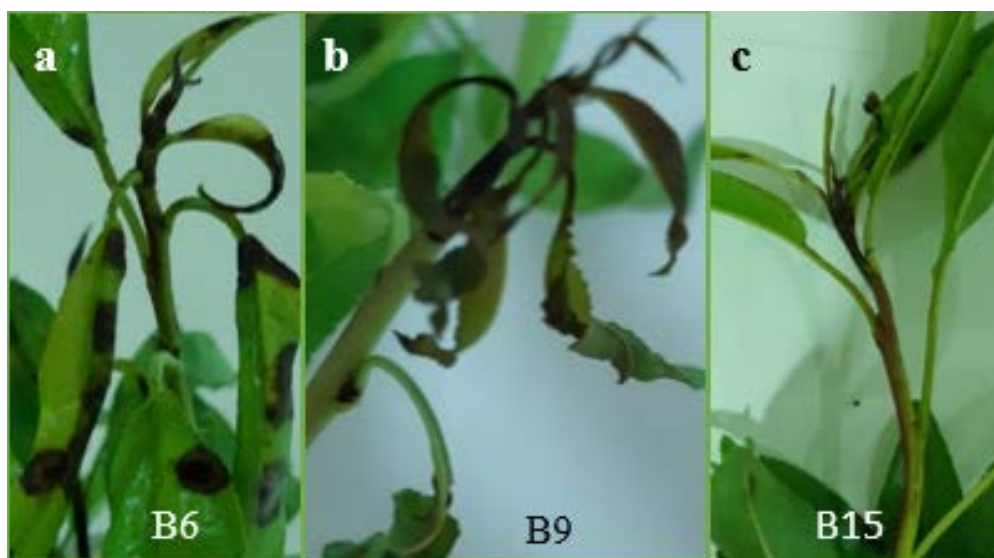
5.3.2 Test patogenosti na biljci domaćinu

Patogenost sojeva prema biljci domaćinu potvrđena je reprodukcijom simptoma bolesti vještačkom inokulacijom ubranih mladara, listova i nezrelih plodova. Primjenjene su različite metode inokulacije pri čemu su uočene razlike u dinamici ispoljenih simptoma.

Provjera patogenosti sojeva prskanjem mladara suspenzijom bakterija koncentracije oko 10^8 cfu/ml pomoću ručne prskalice pokazala se efikasnom. Mladari su održavani u vlažnoj komori pri temperaturi oko 25°C i prvih dana nakon inokulacije su bili u dobroj kondiciji, bez vidljivih simptoma. Nakon sedam dana od inokulacije uočena je pojava uvelosti mladara i povijanje vrhova. Pojava nekroze vršnog djela mladara, kao i nekrotičnih pjega na listovima, koji su takođe bili inokulisani metodom prskanja, uočavala se do 12 dana nakon inokulacije (Slike 15 i 16). Takođe uočeno je i masovno odbacivanje listova, naročito inokuliranih mladara breskve.

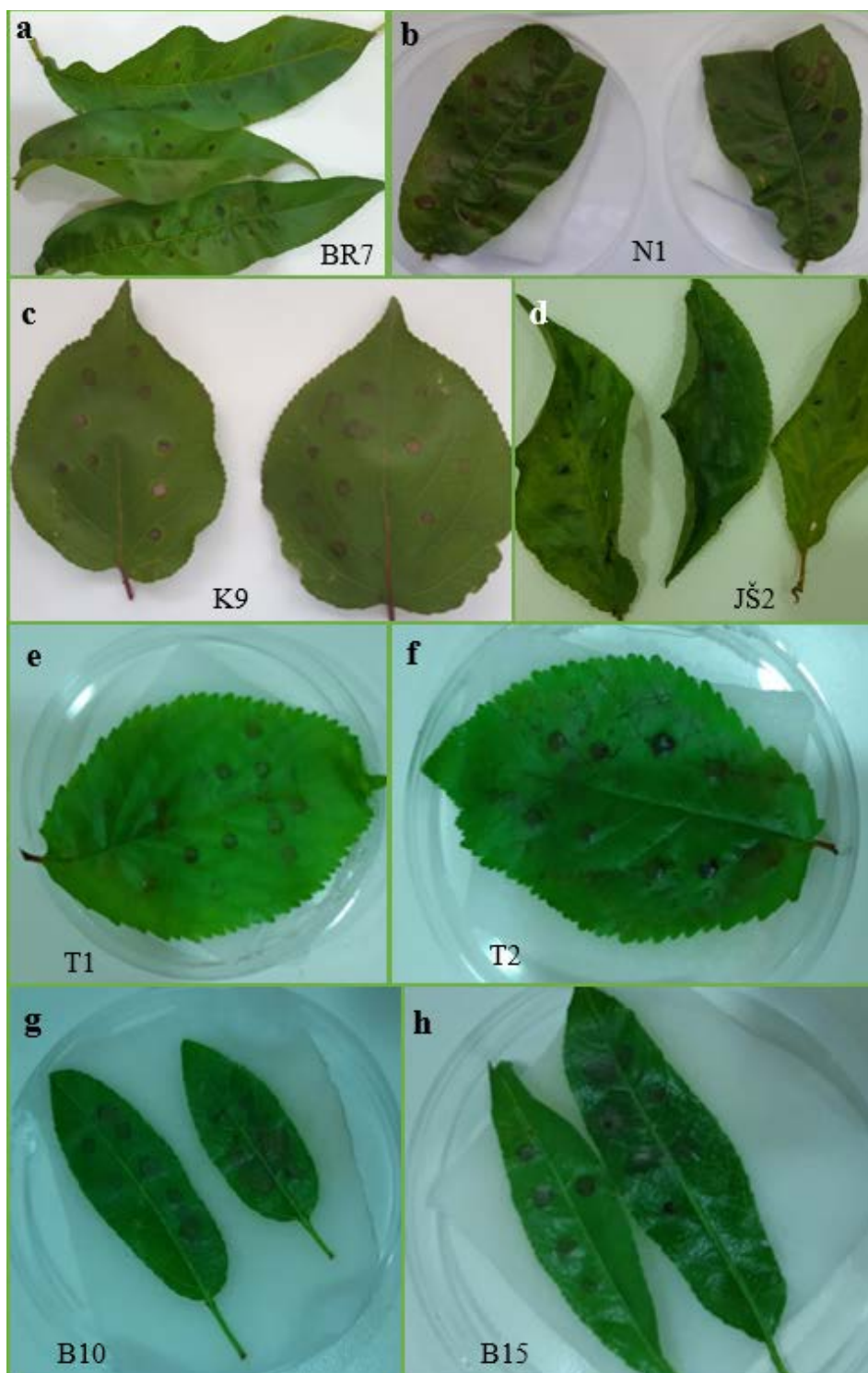


Slika 15. Simptomi na inokuliranim mladima: (a, b) nekroze vršnog djela mladara breskve; (c) nekroze mladara japanske šljive; d) nekroze vršnog djela mladara kajsije i nekrotične pjege na listovima kajsije. Vještačka inokulacija. (Foto: T. Popović)



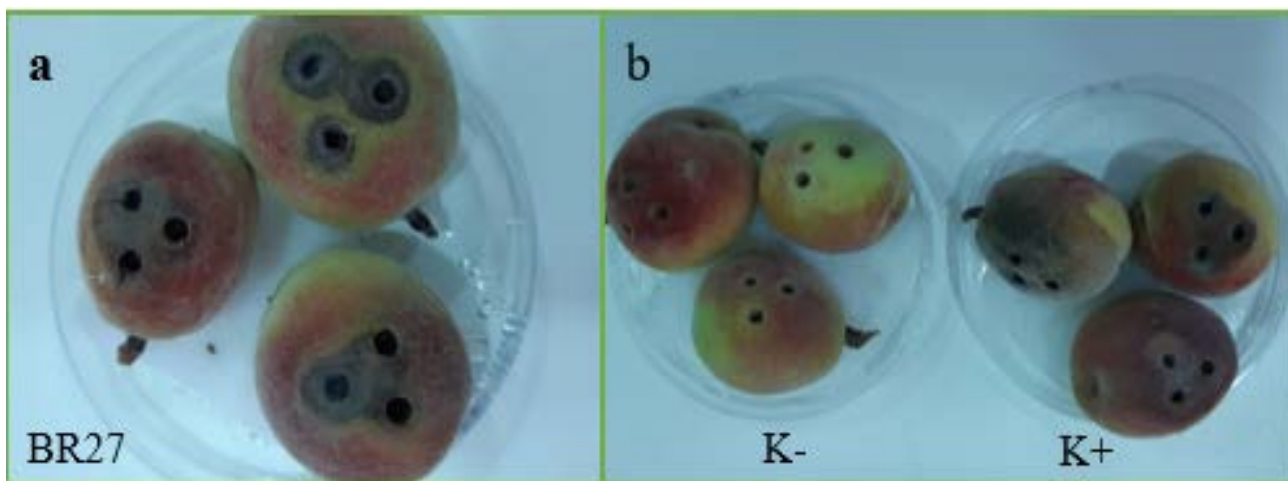
Slika 16. Simptomi na inokuliranim mladima badema: (a, b, c) nekroze vršnog djela mladara badema i nekrotične pjege na listovima badema. Vještačka inokulacija. (Foto: T. Popović)

Na listovima, trećeg dana nakon inokulacije infiltracijom suspenzije bakterija koncentracije oko 10^8 cfu/ml pomoću medicinskog šprica bez igle, uočavale su se vodenaste pjegice, koje su nakon par dana postajale nekrotične (Slika 17). Metoda inokulacije listova pokazala se jednostavnom za izvođenje i uspješnom u reprodukciji simptoma bolesti u kratkom vremenskom periodu.



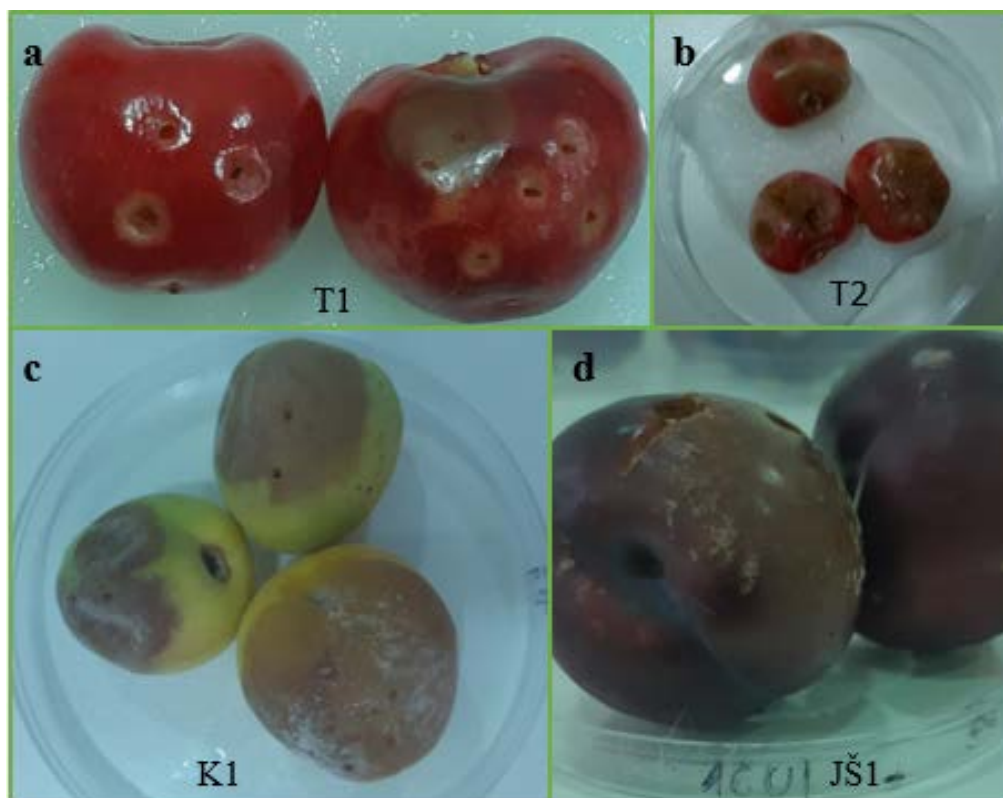
Slika 17. Simptomi nekrotičnih pjega na inokuliranim listovima: (a) breskve; (b) nektarine; (c) kajsije; (d) japanske šljive; (e, f) trešnje; (g, h) badema. Vještačka inokulacija. (Foto: T. Popović)

Na nezrelim plodovima breskve, 2-3 dana od inokulacije, tkivo oko „bunarčića“ je postalo vodenasto, a zatim nekrotično. Nakon 7 dana od inokulacije, došlo je do širenja nekroze i spajanja sa susjednim mjestom inokulacije (Slika 18).



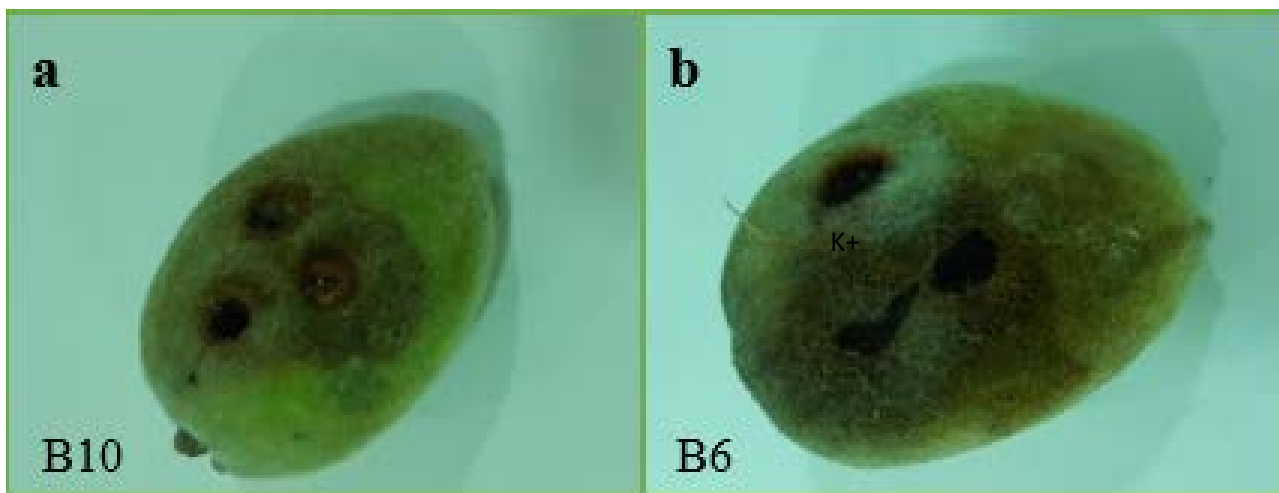
Slika 18. Simptomi na inokuliranim plodovima breskve (a) nekroza tkiva na mjestima inokulacije ; (b) K+ Xap, pozitivna kontrola, K- negativna kontrola. Vještačka inokulacija. (Foto: T. Popović)

Na plodovima trešnje, kajsije i japanske šljive nekroza tkiva se ispoljavala 2-4 dana od inokulacije. Međutim, u uslovima povećane vlažnosti i toplote, ovi plodovi su brzo dozrijevali i trulili usled pojave drugih mikroorganizama (Slika 19).



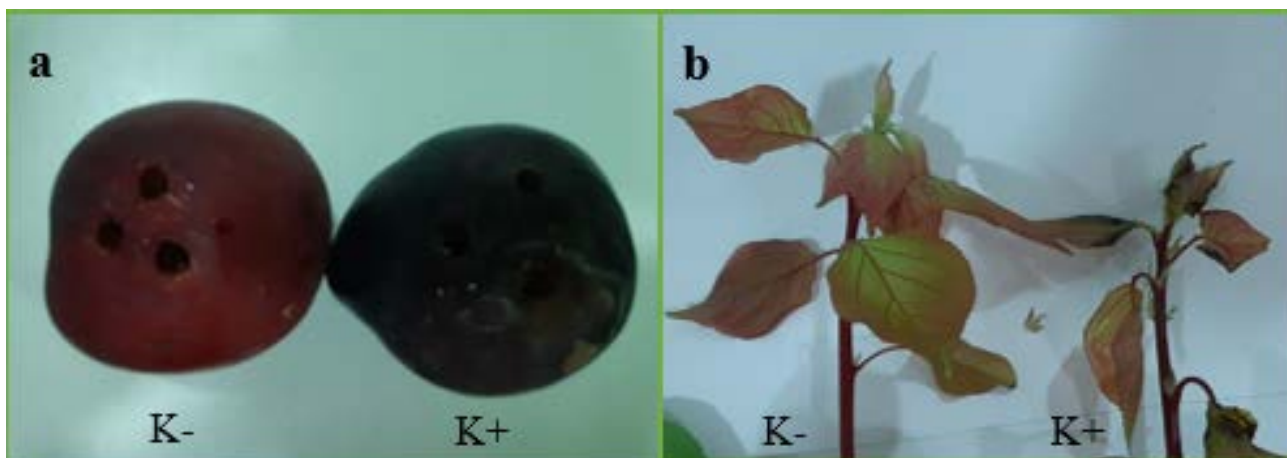
Slika 19. Simptomi na inokuliranim plodovima: (a, b) nekroza tkiva na plodovima trešnje; (c) nekroza i razvoj drugih mikroorganizama na plodovima kajsije; (d) nekroza i razvoj drugih mikroorganizama na plodovima japanske šljive. Vještačka inokulacija. (Foto: T. Popović)

Na inokuliranim plodovima badema ispoljavala se nekroza slabijeg intenziteta. Tkivo oko mjesta inokulacije - „bunarčića“, postalo je vodenasto, a zatim nekrotično. Na pojedinim plodovima badema uočavalo se nekrotično ulegnuto tkivo na mjestu inokulacije nakon 7-10 dana (Slika 20).



Slika 20. Simptomi na inokuliranim plodovima badema: (a) vlažna nekroza tkiva oko mjesta inokulacije; (b) ulegnuto nekrotično tkivo oko mjesta inokulacije. Vještačka inokulacija. (Foto: T. Popović)

Iz inokuliranih listova i plodova, izvršena je uspješna reizolacija bakterija čiji je identitet potvrđen korišćenjem diferencijalnih testova. Na mladima, listovima i plodovima inokuliranim poznatim sojevima kao pozitivnim kontrolama (Pss KFB 0103 - za sojeve potencijalne predstavnike roda *Pseudomonas* i Xap KFB 0104 - za sojeve potencijalne predstavnike roda *Xanthomonas*), došlo je do razvoja simptoma u vidu nekroze tkiva. Na mjestu inokulacije sterilnom destilovanom vodom nije bilo nikakvih promjena (Slika 21).



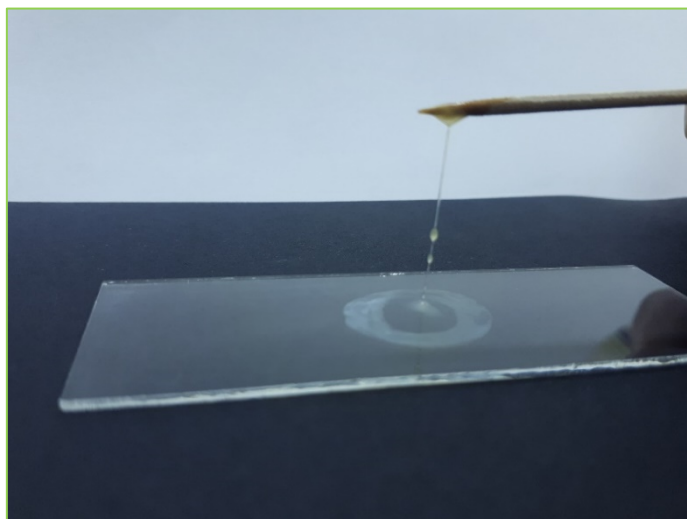
Slika 21. Pss: (a) simptomi na inokuliranim plodovima japanske šljive, K- negativna kontrola, K+ pozitivna kontrola; (b) simptomi na inokuliranim mladima kajsije, K- negativna kontrola, K+ pozitivna kontrola. Vještačka inokulacija. (Foto: T. Popović)

5.4 Opšti testovi za identifikaciju sojeva bakterija

U cilju određivanja pripadnosti rodu, sojevi bakterija su proučeni primjenom nekoliko opštih testova: razlikovanje bakterija po Gramu, izgled i razvoj kolonija na HA i YDC podlogama, aktivnost oksidaze i katalaze i oksidativno-fermentativni metabolizam glukoze (O/F test).

5.4.1 Razlikovanje bakterija po Gramu

Svi proučavani sojevi su Gram-negativni jer formiraju elastičnu nit usled lizisa ćelijskog zida i oslobađanja DNK, što predstavlja pozitivnu reakciju (Slika 22).



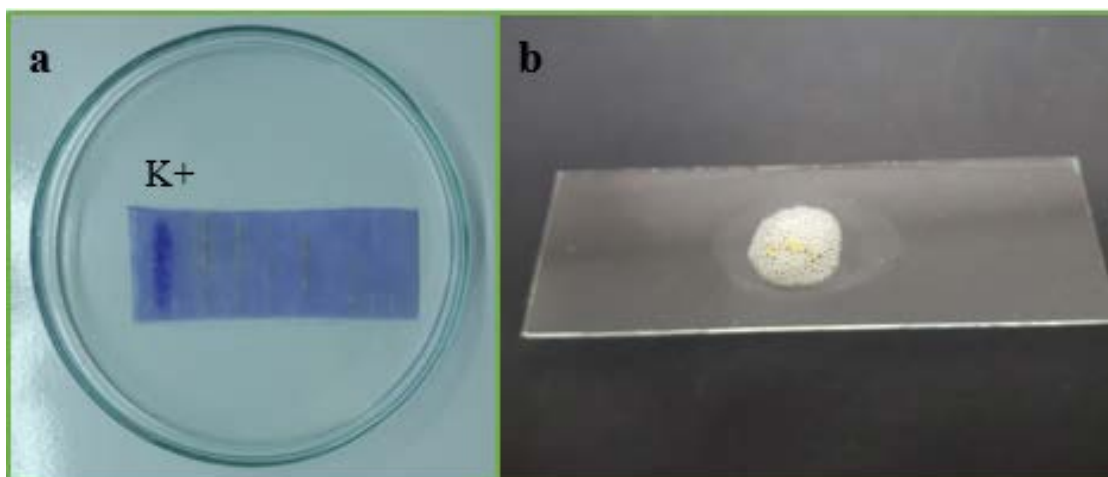
Slika 22. Test po Gramu: Stvaranje sluzastog končića kod Gram-negativnih bakterija (Foto: T. Popović)

5.4.2 Aktivnost oksidaze

Oksidaza testom dokazuje se prisustvo citohrom oksidaze u respiratornom lancu bakterija. Rezultati oksidaza testa ukazuju da proučavani sojevi ne stvaraju oksidazu. Pozitivnu reakciju ispoljio je kontrolni soj bakterije *Pseudomonas fluorescens* (KFB B130), tako što je došlo do pojave ljubičasto-plave boje na filter papiru natopljenom indikatorom, na mjestu razmaza bakterija posle nekoliko sekundi (Slika 23a). Kod negativno kontrolnog soja Pss (KFB 0103), kao i kod referentnih sojeva Psm R2 (KFB 0101), Psm R1 (KFB 0120 i KFB 0121), Psp (KFB 0102) i Xap (KFB 0104) nije došlo do promjene boje na mjestu razmaza bakterijskih kolonija, što znači da oni ne stvaraju oksidazu.

5.4.3 Aktivnost katalaze

Svi proučavani sojevi stvaraju enzim katalazu, što se ispoljilo pojavom mjehurića gasa kao rezultat izdvajanja slobodnog kiseonika (Slika 23 b). Kontrolni sojevi Pss (KFB 0103) i Xap (KFB 0104) takođe posjeduju enzim katalazu.



Slika 23. (a) Aktivnost oksidaze: K⁺ pozitivna reakcija (*Pseudomonas fluorescens*); (b) aktivnost katalaze: pozitivna reakcija pri kojoj dolazi do pojave mjehurića gasa (Foto: T. Popović)

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

Svi ispitivani sojevi razlažu glukozu oksidativnim putem što se ispoljilo promjenom boje podloge u žutu u aerobnim uslovima, na osnovu čega je zaključeno da svi proučavani sojevi pripadaju grupi aerobnih bakterija. Kontrolni soj *Dickeya chrysanthemi* (KFB 206), razlaže glukozu oksidativno i fermentativno, s obzirom da je uočena promjena boje podloge u žutu u aerobnim i anaerobnim uslovima. Kontrolni sojevi Pss (KFB 0103), Psm R2 (KFB 0101), Psp (KFB 0102) i Xap (KFB 0104) razlažu glukozu oksidativno (Slika 24).

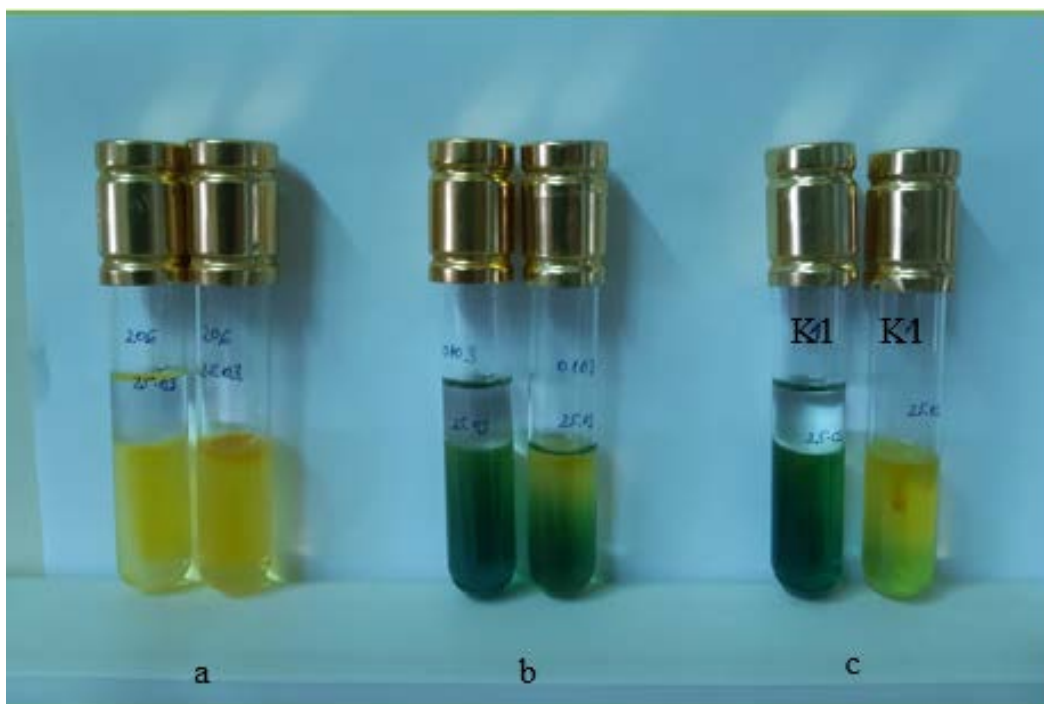
5.5 Identifikacija sojeva bakterija roda *Pseudomonas*

Na osnovu rezultata proučavanja patogenih odlika, razvoja kolonija na HA podlozi, rezultata opštih testova (Gram test, aktivnost oksidaze i katalaze, O/F test), kao i razvoja na KB podlozi, grupa od 29 sojeva bakterija je svrstana u rod *Pseudomonas*, te je stoga dalje proučavana primjenom testova koji se koriste za identifikaciju i diferencijaciju bakterija ovog roda.

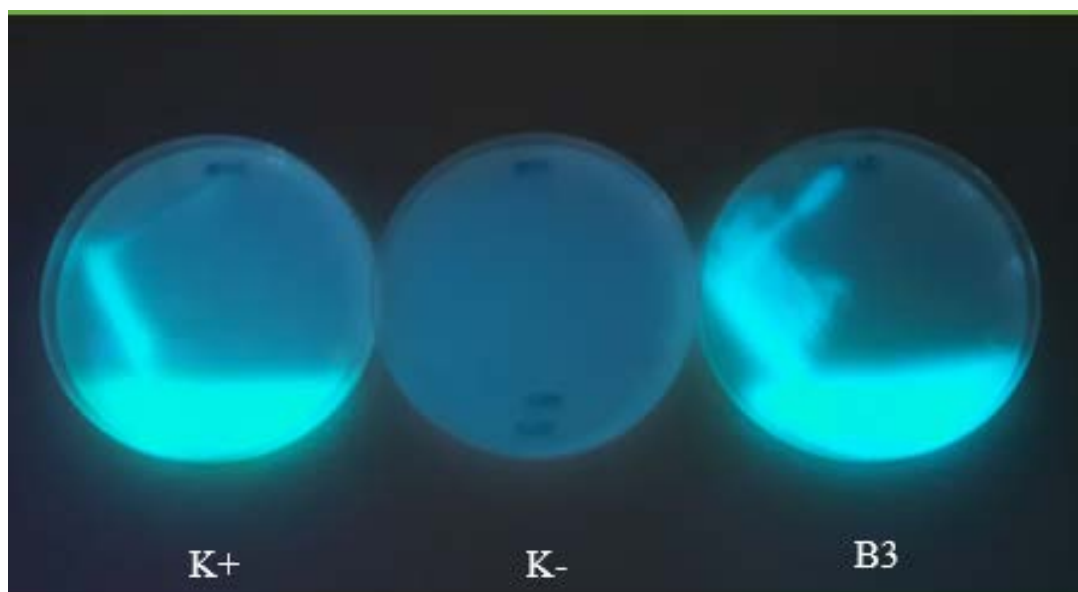
5.5.1 Fluorescentnost sojeva

Na Kingovoj podlozi B proučavani sojevi stvaraju zeleni fluorescentni pigment i obrazuju bijele, sjajne, ispučene kolonije tipične za vrste roda *Pseudomonas* (Tabela 5). Kontrolni sojevi Pss (KFB 0103) i Psm R2 (KFB 0101), takođe stvaraju zeleni fluorescentni pigment, za razliku od kontrolnog soja Psp (KFB 0102) (Slika 25).

Na osnovu dobijenih rezultata, utvrđeno je da grupa od 29 sojeva, porijeklom iz koštičavih voćaka i badema, stvara fluorescentni pigment na Kingovoj podlozi B, pripada gramnegativnim bakterijama, glukozu metabolišu samo u oksidativnim uslovima, pa se može zaključiti da proučavani sojevi ispoljavaju karakteristike svojstvene fluorescentnim bakterijama roda *Pseudomonas*.



Slika 24. OF test (promjena boje indikatora iz tamnoplave u žutu ukazuje na razgradnju glukoze u podlozi): (a) *Dickeya chrysanthemi* (KFB 206), razgradnja glukoze u anaerobnim i aerobnim uslovima; (b) Pss (KFB 0103), razgradnja glukoze samo u aerobnim uslovima; (c) soj K1, razgradnja glukoze samo u aerobnim uslovima. (Foto: T. Popović)



Slika 25. Stvaranje fluorescentnog pigmenta na Kingovoj podlozi B: K+ Pss (KFB 0103); K- Psp (KFB 0102); proučavani soj B3. (Foto: T. Popović)

5.5.2 Vitalnost bakterija na NAS podlozi

U identifikaciji Pss sojeva proučena je njihova vitalnost na NAS podlozi. Ovaj test se u literaturi navodi kao diferencijalni za Pss i Psm (Garrett et al., 1966; Gašić et al., 2012). Svi proučavani sojevi zadržavaju vitalnost nakon trećeg i četvrtog dana proučavanja. Međutim, sedmi dan vitalnost je izgubilo osam sojeva (K1, K2, K3, K5, K6, B9, T1, JŠ1), što se ispoljilo izostajanjem pojave mjehurića gasa u kapi 3% H₂O₂. Kontrolni sojevi Pss (KFB 0103) i Psm R2 (KFB 0101) su izgubili vitalnost sedmi dan, dok je kontrolni soj Psp (KFB 0102) ostao vitalan (Tabela 5).

5.5.3 LOPAT testovi

Stvaranje levana. Stvaranje polisaharida levana je od velikog značaja u identifikaciji fluorescentnih bakterija roda *Pseudomonas* (Lelliott et al., 1966; Arsenijević, 1997). Rezultati ukazuju da levan stvara 15 od 29 proučavanih sojeva. Ovi sojevi su nakon tri dana razvoja na NAS podlozi, formirali krupne, bijele, sjajne, sluzaste, ispupčene kolonije što je znak sinteze levana, dok 14 sojeva nije formiralo tipične levan-tip kolonije, pa je reakcija ostala nejasna tj. zaključeno je da ne stvaraju levan na NAS podlozi (Slika 26a). Kontrolni sojevi Pss (KFB 0103), Psm R2 (KFB 0101), Psm R1 (KFB 0120 i KFB 0121) i Psp (KFB 0102) stvaraju polisaharid levan.

Aktivnost oksidaze. Rezultati oksidaza testa ukazuju da proučavani sojevi ne stvaraju oksidazu što je karakteristika bakterije Pss, a to je navedeno u okviru rezultata opštih testova za identifikaciju sojeva bakterija.

Pektolitička aktivnost na kriškama krompira. Proučavani sojevi ne prouzrokuju trulež kriški krompira, odnosno ne stvaraju pektolitičke enzime (Slika 26 b). Kontrolni soj *P. c. subsp. carotovorum* (KFB 85), je prouzrokovao vlažnu trulež kriški krompira, za razliku od negativne kontrole koju su predstavljali sojevi Pss (KFB 0103), Psm R2 (KFB 0101) i Psp (KFB 0102).

Metabolizam arginina. Proučavani sojevi ne stvaraju enzim arginindehidrolazu odnosno ne razlažu arginin u aerobnim i anaerobnim uslovima (Slika 26c), što ukazuje na njihovu pripadnost bakteriji Pss. Pozitivna kontrola, soj *P. fluorescens* (B 130), ispoljava aktivnost ovog enzima u aerobnim i anaerobnim uslovima, što se uočava u vidu promjene boje podloge u ljubičasto-crvenu.

Hipersenzitivna reakcija (HR) duvana. Svi sojevi prouzrokuju hipersenzitivnu reakciju duvana, što je navedeno u okviru testa patogenosti.

Na osnovu rezultata LOPAT testova, može se zaključiti da 15 sojeva (K3, BR1, B1, B2, B8, JŠ2, K8, BR2, N1, B5, B6, B7, B10, B13, B14) porijeklom iz koštičavih voćaka i badema, pripadaju vrsti *Pseudomonas syringae*, i svrstani su u Ia LOPAT grupu roda *Pseudomonas*, kojoj pripada patogeni varijetet *syringae*. Preostalih 14 sojeva (K7, B12, B3, B4, B9, B11, K4, K1, K2, K6, K5, K9, T1, JŠ1) nisu jasno stvarali levan, dok su im ostale karakteristike odgovarale Ia LOPAT grupu roda *Pseudomonas* (Tabela 5).

5.5.4 GATTa testovi

U cilju diferencijacije patogenih varijeteta *syringae* i *morsprunorum* 29 sojeva je proučeno primjenom GATTa testova (Tabela 5).

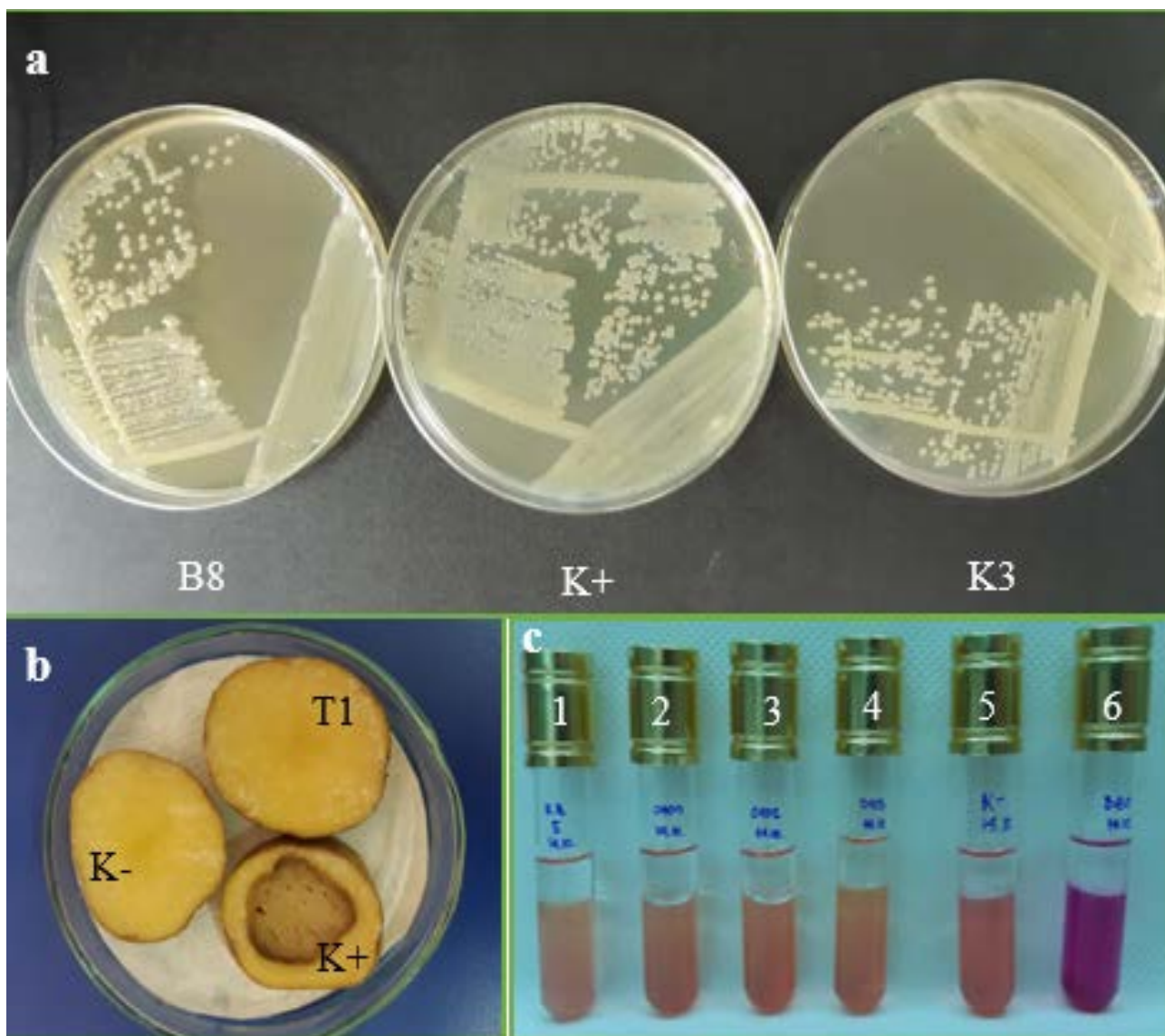
Razlaganje želatina. Od 29 *Pseudomonas* sojeva želatin razlaže 22 soja, kao i pozitivna kontrola soj Pss (KFB 0103). Kao posljedica razgradnje želatina podloga ostaje rastopljena nakon izlaganja nižoj temperaturi. Psm R2 (KFB 0101) i Psp (KFB 0102) nisu hidrolizovali želatin.

Hidroliza eskulina. Svi proučavani sojevi hidrolizuju eskulin, što se ispoljava promjenom boje podloge u tamnomrku ili crnu (Slika 27a). Pozitivna kontrola soj Pss (KFB 0103) hidrolizuje eskulin, dok negativne kontrole sojevi, Psm R2 (KFB 0101) i Psp (KFB 0102), ne hidrolizuju eskulin.

Stvaranje tirozinaze. Stvaranje tirozinaze uočeno je kod 23 soja, što je izazvalo pojavu crvenkasto-mrke boje podloge, dok 6 sojeva ne stvara tirozinazu. Pozitivna kontrola, soj Psm R2 (KFB 0101), stvara tirozinazu, dok je negativne kontrole, sojevi Pss (KFB 0103) i Psp (KFB 0102), ne stvaraju.

Korišćenje tartarata. Korišćenje L-tartarata uočeno je kod devet sojeva, dok 20 sojeva ne koristi tartarate, jer kod njih nije došlo do promjene boje podloge iz zelene u plavu (Slika 27b). Pozitivna kontrola, soj Psm R2 (KFB 0101), koristi tartarate, dok ih negativne kontrole, sojevi Pss (KFB 0103) i Psp (KFB 0102), ne koriste.

Rezultati proučavanja GATTa testova pokazali su da 29 proučavanih sojeva porijeklom iz koštičavih voćaka i badema, ispoljavaju heterogenost u pogledu biohemijsko-fizioloških odlika. Na osnovu rezultata GATTa testova, pet sojeva (K3, BR1, B1, B8, JŠ2) ispoljava sličnost prema patogenom varijetetu *syringae* (G+A+T-Ta-).

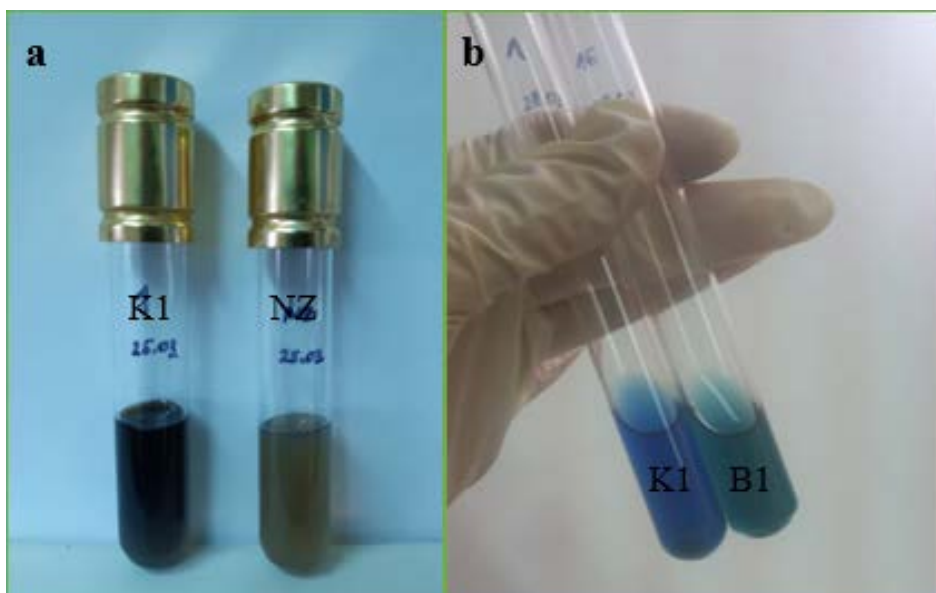


Slika 26. (a) Stvaranje levana: proučavani sojevi B8 , K3 i K+ (Pss (KFB 0103))- stvaraju levan; (b) Pektolitička aktivnost na kriškama krompira: proučavani soj T1 i K- Pss (KFB 0103), ne prouzrokuju trulež kriški krompira K+ *P. c. subsp. carotovorum* (KFB 85), prouzrokuje trulež kriški krompira; (c) Metabolizam arginina: ne stvaraju enzim arginindehidrolazu : 1 - JŠ1, 2 - Psm R2 (KFB 0101); 3 - Psp (KFB 0102), 4 - Pss (KFB 0103), 5 - nezasijana podloga; stvara enzim arginindehidrolazu: 6 - pozitivna kontrola, *P. fluorescens* (B130).(Foto: T. Popović)

5.5.5 Stvaranje čestica leda

Jedna od karakteristika Pss jeste sposobnost stvaranja čestica leda. Sposobnost stvaranja čestica leda posjeduje 25 proučavanih sojeva, dok je kod četiri soja (K1, K2, B12, B14), reakcija bila negativna (Slika 28) (Tabela 5). Kontrolni sojevi su ispoljili očekivanu reakciju. Pozitivne kontrole, sojevi *P. syringae* pv. *glycinea* (KFB 085) i Pss (KFB 0103) su formirale kristale leda, dok kap kulture sojeva Psm R2 (KFB 0101), Psm R1 (KFB 0120 i KFB 0121), Psp (KFB 0102) i *P. syringae* pv. *tomato* (KFB 145), kao negativnih kontrola, nije prešla iz tečnog u čvrsto agregatno stanje pri temperaturi -10°C .

Na osnovu rezultata testa stvaranje čestica leda, može se zaključiti da 25 proučavanih sojeva porijeklom iz koštičavih voćaka i badema, posjeduje ovu karakteristiku, kao i bakterija Pss.



Slika 27. (a) Hidroliza eskulina: proučavani soj K1 - pozitivna reakcija koja se ispoljava promjenom boje podloge u tamnomrku i nezasijana podloga – negativna reakcija gdje ne dolazi do promjene boje podloge; (b) Korišćenje tartarata: proučavani soj K1- pozitivna reakcija u kojoj je došlo do promjene boje podloge iz zelene u plavu i proučavani soj B1- negativna reakcija gdje je boja podloge ostala nepromjenjena. (Foto: T. Popović)



Slika 28. Stvaranje čestica leda: K+ Pss (KFB 0103); K- Psm R1 (KFB 0120); BR2 – proučavani soj, pozitivna reakcija u kojoj dolazi do formiranja čestica leda. (Foto: T. Popović)

5.6 Identifikacija sojeva bakterija roda *Xanthomonas*

Na osnovu rezultata proučavanja patogenih odlika, karakterističnog razvoja kolonija na YDC podlozi, kao i rezultata opštih testova (Gram test, aktivnost oksidaze i katalaze, O/F test) (Tabela 6), grupa od 39 sojeva bakterija ispoljila je sličnost bakterijama roda *Xanthomonas*, stoga je dalje proučavana primjenom testova koji se koriste za identifikaciju bakterija ovog roda.

5.6.1 Hidroliza skroba

Hidroliza skroba je test pomoću kojeg se može izvršiti diferencijacija pojedinih srodnih patogenih varijeteta vrste *Xanthomonas arboricola*. Istraživanja su pokazala da skrob hidrolizuju četiri proučavana soja (T2, BR5, BR14 i B15), usled čega nije došlo do pojave plave boje u zoni njegovog razlaganja u podlozi (Slika 29a). Nerazloženi skrob boji se plavo kod 35 proučavanih sojeva. Pozitivna kontrola soj bakterije *X. arboricola* pv. *corylina* (KFB 0114) hidrolizuje skrob, za razliku od negativne kontrole - sojeva Pss (KFB 0103) i Xap (KFB 0104) (Tabela 6).

5.6.2 Hidroliza želatina

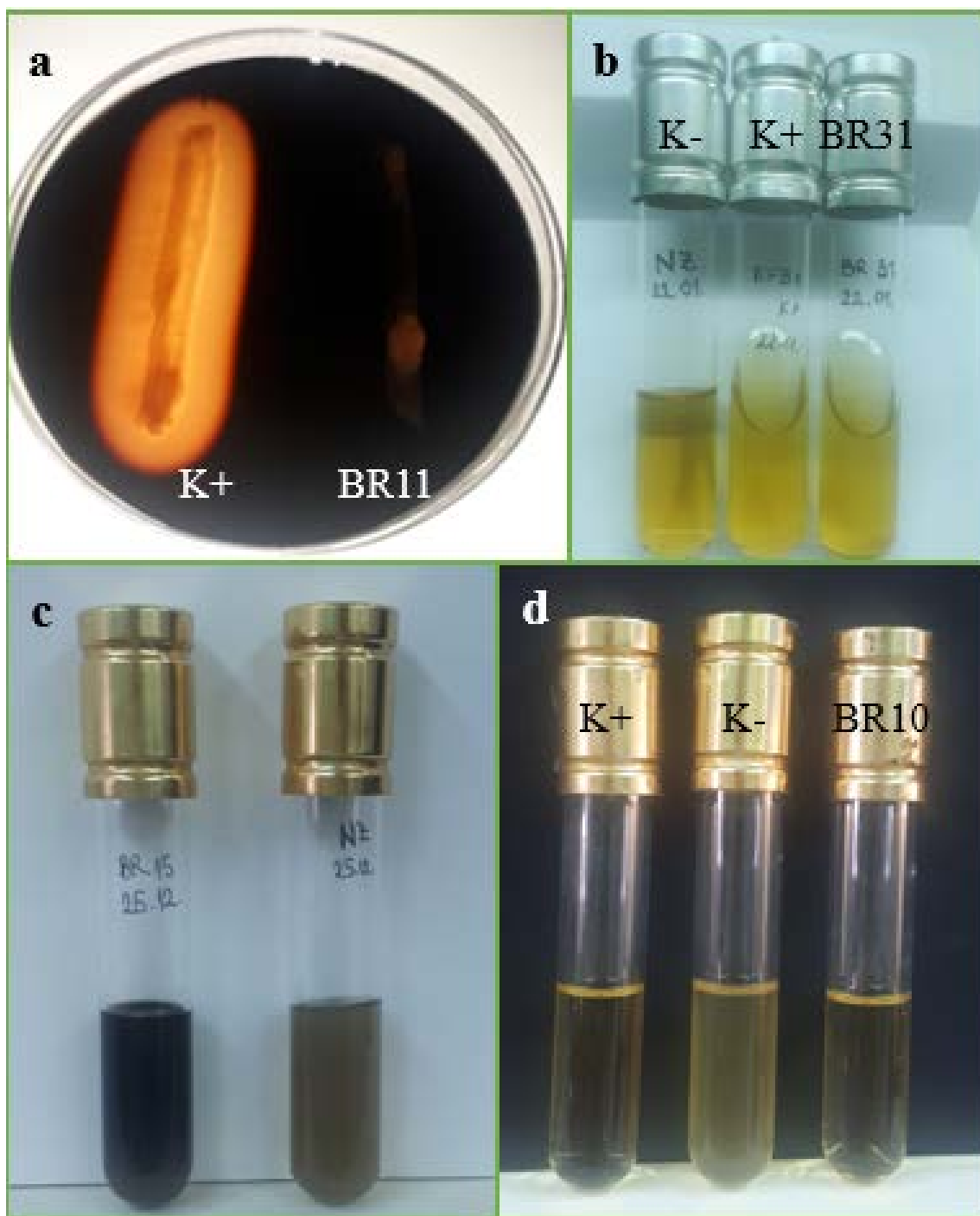
Od 39 *Xanthomonas* sojeva želatin razlaže 37, kao i pozitivna kontrola soj Xap (KFB 0104), dok dva soja (BR13 i BR25) ne posjeduju ovu odliku (Tabela 6). Pozitivan rezultat se očitava tako što, nakon hlađenja podloge, ne dolazi do njenog očvršćavanja a to je znak da bakterija hidrolizuje želatin (Slika 29b).

5.6.3 Hidroliza eskulina

Svi proučavani sojevi hidrolizuju eskulin, kao i pozitivne kontrole sojevi Pss (KFB 0103) i Xap (KFB 0104) (Slika 29 c) (Tabela 6). Negativna kontrola, soj *P. s.* pv. *tomato* (KFB 145), nije izazvao promjenu boje podloge u tamnomrku ili crnu, što je znak da ne hidrolizuje eskulin.

5.6.4 Maksimalna temperatura razvoja

Poznato je da se Xap razvija na temperaturi 35°C (Arsenijević, 1997). Sposobnost razvoja na temperaturi 37°C nije imao nijedan od 39 proučavanih sojeva, kao ni kontrolni soj Xap (KFB 0104) (Slika 29d) (Tabela 6). Negativna kontrola, soj *Dickeya chrysanthemi* (KFB 206), doveo je do zamućenja podloge, što je znak razvoja ovog soja pri 37°C.



Slika 29. (a) Hidroliza skroba: prisustvo prozirne zone oko razvoja bakterije - K+ (*X. a. pv. corylina* (KFB 0114)), nerazloženi skrob boji se plavom bojom – BR11 (proučavani soj); (b) Hidroliza želatina: očvršćavanje podloge - K- (nezasijana podloga), topljenje podloge - K+ (Xap (KFB 0104)) i BR 31 (proučavani soj); (c) Hidroliza eskulina: pozitivna reakcija - promjena boje podloge u tamnomrku - BR15 (proučavani soj), negativna reakcija - NZ (nezasijana podloga); (d) Razvoj pri 37°C: ne dolazi do zamućenja podloge - K+ (Xap (KFB 0104)); dolazi do zamućenja podloge - K- (*Dickeya chrysanthemi* (KFB 206)); BR10 (proučavani soj) - ne dolazi do zamućenja podloge, što je znak da se bakterija ne razvija pri 37°C. (Foto: T. Popović)

Tabela 5. Rezultati biokemijskih i fizioloških testova proučavanih sojeva bakterija roda *Pseudomonas*

Šifra soja	Gram test	Fluorescentnost soja	L O P A T	G A T Ta	O/F	Aktivnost katalaze	Vitalnost (7 dan)	INA (-10°C)	Otpornost na bakar (200 ppm)	Otpornost na streptomycin (25 ppm)	syxB
K3	-	+	+ - - - +	+ + - - -	O	+	-	+	+	-	+
BR1	-	+	+ - - - +	+ + - - -	O	+	+	+	+	-	+
B1	-	+	+ - - - +	+ + - - -	O	+	+	+	+	-	+
B2	-	+	+ - - - +	+ + - - +	O	+	+	+	+	-	-
B8	-	+	+ - - - +	+ + - - -	O	+	+	+	+	-	+
JS2	-	+	+ - - - +	+ + - - -	O	+	+	+	+	-	+
K8	-	+	+ - - - +	+ + - - -	O	+	+	+	+	-	+
BR2	-	+	+ - - - +	+ + - - -	O	+	+	+	+	-	+
NI	-	+	+ - - - +	+ + - - -	O	+	+	+	+	-	+
B5	-	+	+ - - - +	+ + - - -	O	+	+	+	+	-	+
B6	-	+	+ - - - +	+ + - - -	O	+	+	+	+	-	+
B7	-	+	+ - - - +	+ + - - -	O	+	+	+	+	-	+
B10	-	+	+ - - - +	+ + - - +	O	+	+	+	+	-	+
B13	-	+	+ - - - +	+ + - - +	O	+	+	+	+	-	+
B14	-	+	+ - - - +	+ + - - +	O	+	+	+	+	-	+
K7	-	+	+ - - - +	+ + - - +	O	+	+	+	+	-	+
B12	-	+	+ - - - +	+ + - - +	O	+	+	+	+	-	+
B3	-	+	+ - - - +	+ + - - -	O	+	+	+	+	-	+
B4	-	+	+ - - - +	+ + - - -	O	+	+	+	+	-	+
B9	-	+	+ - - - +	+ + - - -	O	+	+	+	+	-	+
B11	-	+	+ - - - +	+ + - - -	O	+	+	+	+	-	+
K4	-	+	+ - - - +	+ + - - -	O	+	+	+	+	-	+
K1	-	+	+ - - - +	+ + - - +	O	+	+	+	+	-	-
K2	-	+	+ - - - +	+ + - - +	O	+	+	+	+	-	-
K6	-	+	+ - - - +	+ + - - +	O	+	+	+	+	-	+
K5	-	+	+ - - - +	+ + - - -	O	+	+	+	+	-	+
K9	-	+	+ - - - +	+ + - - -	O	+	+	+	+	-	+
T1	-	+	+ - - - +	+ + - - -	O	+	+	+	+	-	+
JS1	-	+	+ - - - +	+ + - - -	O	+	+	+	+	-	+
Pss KFB 0103	-	+	+ - - - +	+ + - - -	O	+	+	+	+	-	+
Psm R1 KFB 0120	-	+	+ - - - +	+ + - - +	O	+	+	+	+	-	/
Psm R2 KFB 0101	-	+	+ - - - +	+ + - - +	O	+	+	+	+	-	/
Psp KFB 0102	-	-	+ - - - +	+ + - - -	O	+	+	+	+	-	/

Legenda: + pozitivna reakcija, - negativna reakcija, / nije testirano, O oksidativni metabolizam.

Tabela 6. Rezultati biohemijskih i fizioloških testova proučavanih sojeva bakterija roda *Xanthomonas*

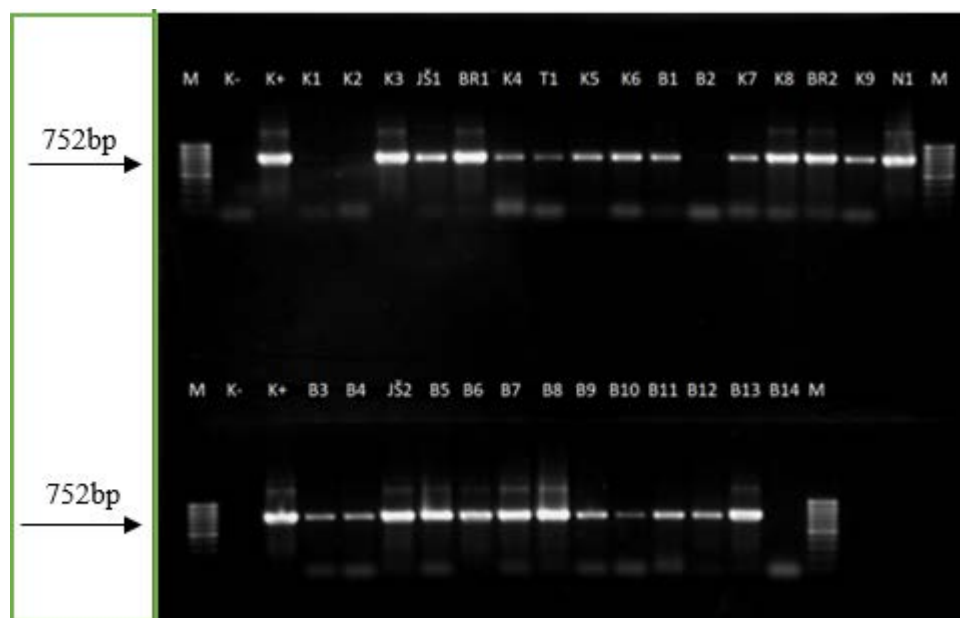
Šifra soja	Gram test	HR	Aktivnost oksidaze	Aktivnost katalaze	O/F metabolizam glukoze		Hidroliza			Porast pri 37°C
					O	F	Skroba	Eskulina	Želatina	
T2	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-
BR5	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-
B15	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-
BR6	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-
BR7	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-
BR8	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-
BR9	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-
BR10	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-
BR11	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-
BR12	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-
BR13	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-
BR14	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-
BR15	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-
BR16	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-
BR17	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-
BR18	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-
BR19	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-
BR20	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-
BR21	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-
BR22	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-
BR23	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-
BR24	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-
BR25	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-
BR26	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-
BR27	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-
BR28	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-
BR29	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-
BR30	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-
BR31	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-
BR32	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-
BR33	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-
BR34	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-
BR35	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-
BR36	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-
BR37	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-
BR38	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-
BR39	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-
BR40	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-
BR41	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-
KFB 0104	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-

Legenda: + pozitivna reakcija, – negativna reakcija.

5.7 Molekularna identifikacija i karakterizacija proučavanih sojeva

5.7.1 Detekcija *syrB* gena

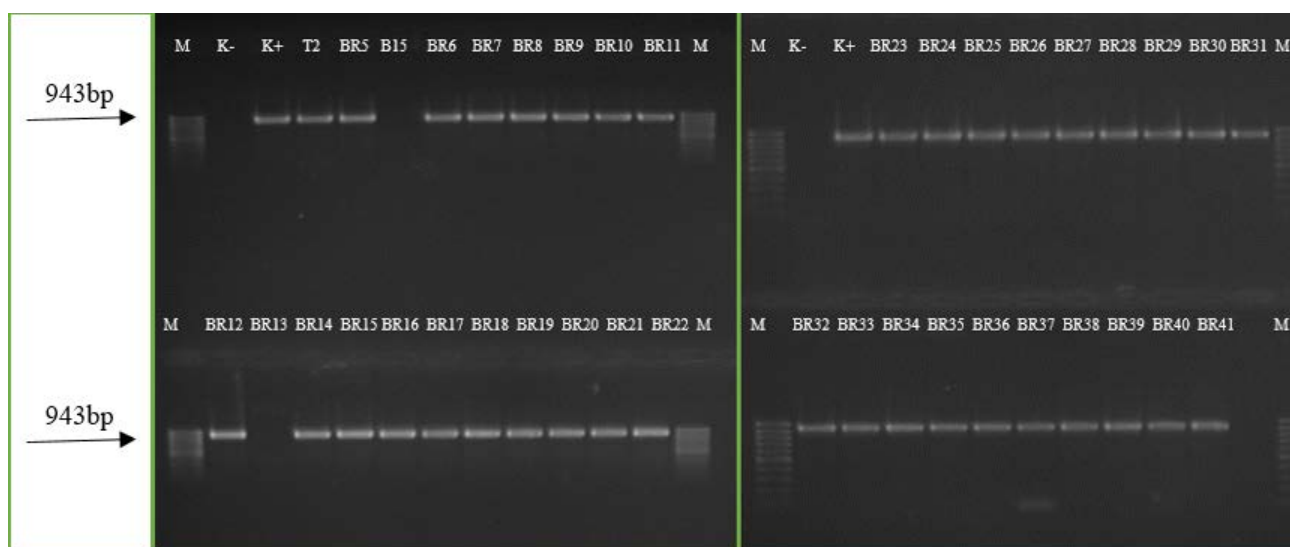
Korišćenjem specifičnih prajmera Syr B1/B2 u reakciji lančanog umnožavanja fragmenata DNK (Sorensen et al., 1998), umnožen je fragment veličine 752 bp kod 25 proučavanih *Pseudomonas* sojeva i kod referentnog soja Pss (KFB 0103), dok do umnožavanja odgovarajućeg DNK fragmenta nije došlo kod četiri proučavana soja (K1, K2, B2, B14) (Slika 30).



Slika 30. PCR detekcija *syrB* gena kod proučavanih sojeva porijeklom iz koštičavih voćaka i badema: K–kajsija, BR–breskva, T–trešnja, N–nektarina, JŠ–japanska šljiva, B–badem. K- - negativna kontrola, K+ - pozitivna kontrola, soj Pss (KFB 0103), M – marker (MassRuler Low Range DNA Ladder, Fermentas, Lithuania)

5.7.2 Detekcija *ftsX* gena

Korišćenjem specifičnih prajmera XapY17-F/XapY17-R u reakciji lančanog umnožavanja fragmenata DNK (Pagani, 2004; Pothier et al., 2011), umnožen je fragment veličine 943 bp kod 37 proučavanih sojeva i kod referentnog soja Xap (KFB 0104), dok do umnožavanja odgovarajućeg DNK fragmenta nije došlo kod dva proučavana soja: B15 i BR13 (Slika 31).



Slika 31. Fragment veličine 943bp, specifičan za Xap umnožen je kod 37 proučavanih sojeva pomoću prajmera XapY17-F/XapY17-R; M – marker (MassRuler Low Range DNA Ladder, Fermentas, Litvanija); K- negativna kontrola; K+ pozitivna kontrola - Xap (KFB 0104).

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

Sekvenciona analiza 16S rRNK gena primjenjena je za četiri soja (K1, K2, B2 i B14) kod kojih nije došlo do umnožavanja fragmenta *syrB* gena karakterističnog za Pss.

Nakon sekvenciranja umnoženog PCR produkta BLAST analizom poređena je sličnost sekvence proučavanih sojeva sa sekvencama dostupnim u NCBI bazi. Rezultati su pokazali da sojevi K1, K2, B14 i B2 ipak pripadaju bakteriji Pss. Stepennukleotidne sličnosti proučavanih sojeva K1 (GenBank pristupni broj: MT355196) i K2 (GenBank pristupni broj: MT355159) iznosio je 100%, odnosno za soj B14 (GenBank pristupni broj: MT355438) iznosio je 99% sa sojem Pss 176 izolovanim iz kajsije (GeneBank pristupni broj KY569214). Soj B2 (GenBank pristupni broj: MT355441) je imao visok stepennukleotidne sličnosti (99,80%), sa sekvencama sojeva Pss SHPS007 i SHPS008 izolovanih iz jabuke (GeneBank pristupni broj KP753380 i KP713782). Na ovaj način potvrđena je pripadnost sojeva K1, K2, B2 i B14 vrsti Pss.

5.7.4 Sekvenciona analiza 16S rRNK gena sojeva roda *Xanthomonas*

Sekvenciona analiza 16S rRNK gena primjenjena je za dva soja (B15 i BR13) kod kojih nije došlo do umnožavanja fragmenta *ftsX* gena karakterističnog za Xap.

Korišćenjem prajmera fD1/rP2 umnožena je parcijalna sekvenca 16S rRNA gena sojeva B15 i BR13. Nakon sekvenciranja umnoženog PCR produkta BLAST analizom utvrđena je sličnost sekvence sa odgovarajućim sekvencama dostupnim u NCBI bazi podataka.

Soj B15 (GenBank pristupni broj: MT355437), izolovan iz badema imao je visok stepennukleotidne sličnosti (99,93%), sa sljedećim sekvencama sojeva Xap, izolovanih iz koštičavih voćaka i badema, dostupnim u NCBI bazi: soj Xap NCPPB416 (GenBank: MK156163.1), soj Disspa Xap 55 (GenBank: MK156162.1), soj Disspa Xap 54 (GenBank: MK156161.1), soj Disspa Xap 53 (GenBank: MK156160.1), izolovani iz badema u Italiji; soj ICMP 611 (GenBank: MK382400.1) i soj ICMP 612 (GenBank: MK382401.1), izolovani iz trešnje u Novom Zelandu; soj ZJ195 (GenBank: MF351923.1), soj SXD90 (GenBank: MF351922.1), soj SD175 (GenBank: MF351921.1), izolovani iz breskve u Kini; soj 16-244 (GenBank: LC507173.1), soj 15-106 (GenBank: LC507169.1), soj Xap1 (GenBank: LC507165.1), izolovani iz breskve u Južnoj Koreji; soj 17-195 (GenBank: LC331099.1), izolovan iz *Prunus* spp. u Južnoj Koreji; osam sojeva počev od soja 17-324 (GenBank: LC388638.1) do soja 17-331 (GenBank: LC388645.1), izolovani iz

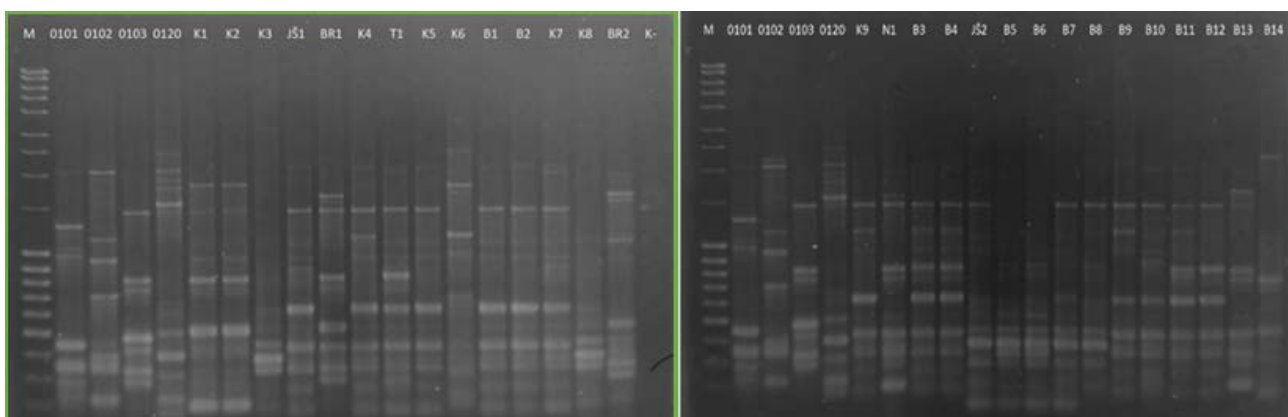
Prunus spp., u Koreji; soj BCRC80478 (GenBank: KJ156334.1), soj BCRC80476 (GenBank: KJ156333.1), BCRC80481 (GenBank: KJ156335.1), izolovani iz japanske šljive u Tajvanu. Na ovaj način potvrđena je pripadnost soja B15 vrsti Xap.

Soj BR13 izolovan iz breskve na osnovu sekvencione analize 16S rRNA, pripada vrsti *Pseudomonas lutea*. Stepenn nukleotidne sličnosti proučavanog soja BR13 iznosila je 99,92%. sa sojem OK2, izolovanim iz rizosfere trave u Španiji (NCBI Reference Sequence: NR 029103.1).

5.7.5 Rep-PCR analiza sojeva roda *Pseudomonas*

U cilju utvrđivanja razlika u populaciji proučavanih sojeva, primjenjena je Rep-PCR analiza. Ponavljajuće sekvence DNK različite veličine kod 29 proučavanih sojeva roda *Pseudomonas*, umnožene su pomoću BOX PCR reakcije, upotrebom BOXA1R prajmera.

Dobijeni genetski profili proučavanih sojeva, ukazali su na značajan genetički diverzitet među proučavanim sojevima (Slika 32). Od svih ispitivanih sojeva moguće je razlikovati 12 profila. Neki od njih predstavljeni su jednim sojem (BR2, B10, B14, K6), dok su kod nekih profila do četiri soja grupisana zajedno (JŠ1, K5, B1, B2; B3, B4, B11, B12; K3, K8, B5, B6). Dobijeni genetski profili nisu bili specifični za domaćina, već su se sastojali od sojeva izolovanih iz različitih vrsta biljaka domaćina. Nijedan genetski profil se u potpunosti nije podudarao sa profilom kontrolnog soja. Međutim, većina njih dijelila je nekoliko zajedničkih fragmenata sa kontrolnim sojem Pss (KFB0103) (Slika 32). Takođe genetski profili nisu odgovalali porijeklu sojeva.



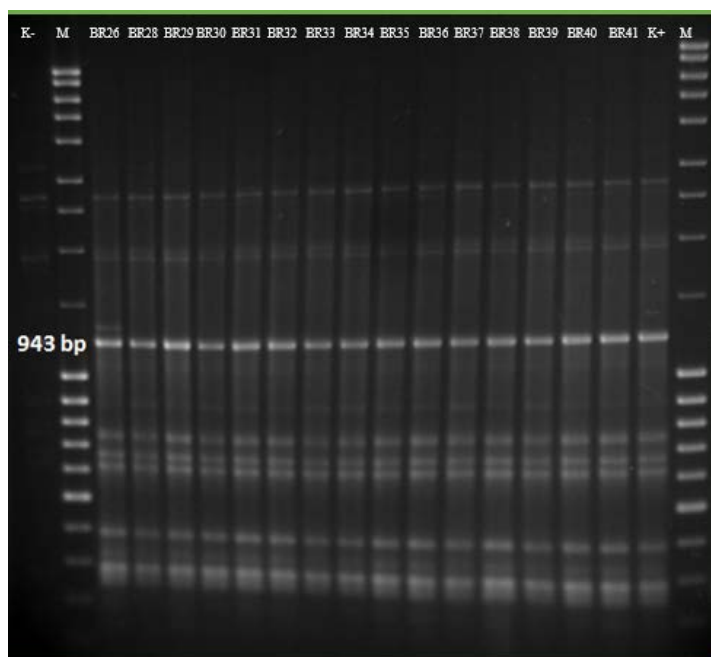
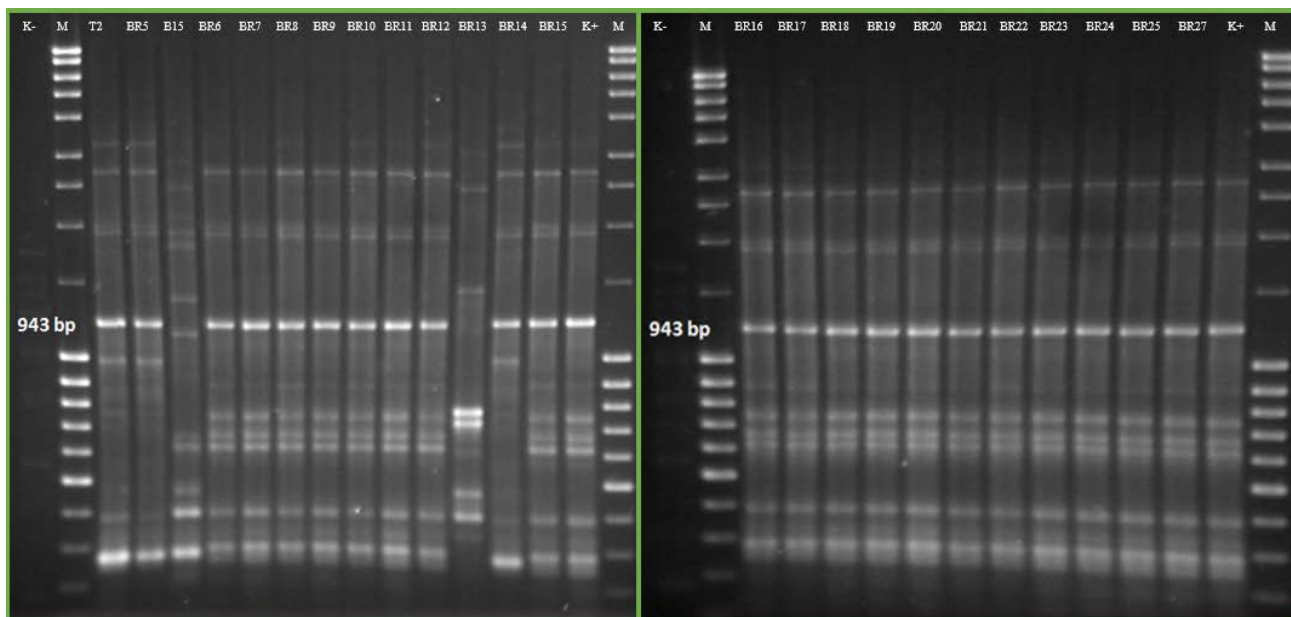
Slika 32. BOX-PCR profili 29 sojeva roda *Pseudomonas*, umnoženi pomoću BOX A1R prajmera: 0101, 0102, 0103, 0120 – referentni sojevi (Psm R2 (KFB 0101), Psp (KFB 0102), Pss (KFB 0103), Psm R1 (KFB 0120)); proučavani sojevi izolovani iz koštičavih voćaka i badema (K-kajsija, BR-breskva, T-trešnja, N-nektarina, JŠ-japanska šljiva, B-badem), K- - negativna kontrola, M – marker (MassRuler DNA Ladder Mix, Fermentas, Lithuania)

5.7.6 Rep-PCR analiza sojeva roda *Xanthomonas*

Razlike u populaciji 39 proučavanih *Xanthomonas* sojeva utvrđene su primjenom Rep-PCR metode i upotrebom BOXA1R prajmera (Schaad et al., 2001).

BOX-PCR profili proučavanih sojeva generalno su ukazali na homogenu strukturu i mali diverzitet *Xanthomonas* sojeva (Slika 33). BOX-PCR profili sojeva B15 i BR13 su se razlikovali od ostalih, čime su potvrđeni rezultati PCR analize za detekciju *ftsX* gdje kod ovih sojeva nije došlo do umnožavanja fragmenta veličine 943 bp (Slika 31). Kod sojeva T2, BR5, BR14 i BR26 došlo je do umnožavanja DNK fragmenata koji nisu umnoženi kod drugih proučavanih sojeva. Prema rezultatima, BOX-PCR genetski profili 33 proučavana soja, podudarali su se sa genetskim profilom referentnog soja Xap (KFB 0104).

Na osnovu BOX-PCR analize i utvrđene razlike u populaciji proučavanih sojeva, odabrano je 10 reprezentativnih sojeva za sekvencionu analizu *gyrB* gena.



Slika 33. BOX-PCR profili 39 sojeva roda *Xanthomonas* umnoženi pomoću BOX A1R prajmera. K+ referentni soj Xap (KFB 0104); K- negativna kontrola; M – marker (MassRuler DNA Ladder Mix, Fermentas, Lithuania)

5.7.7 MLSA analiza

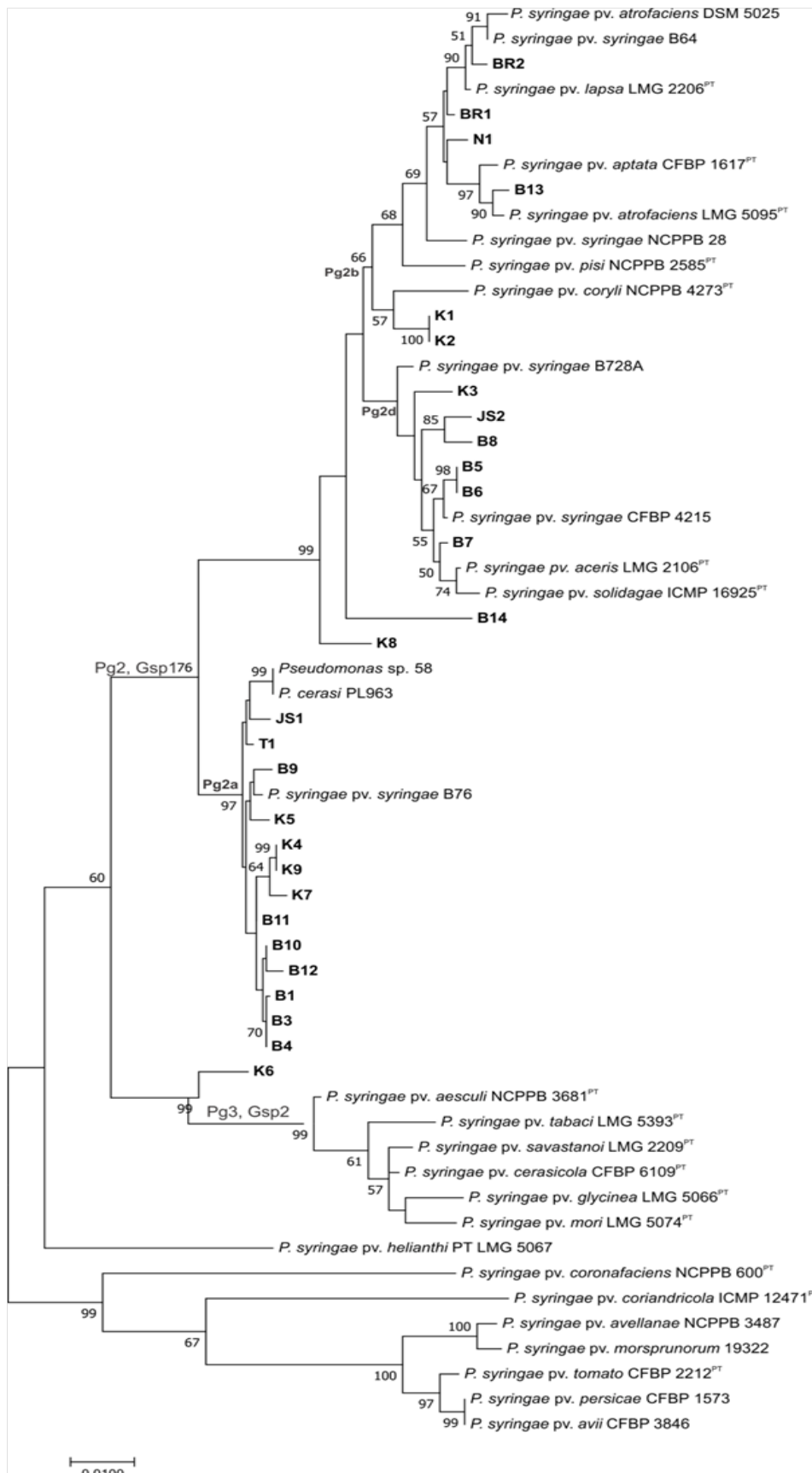
Kako bi se analizirala genetska varijabilnost između 28 proučavanih sojeva roda *Pseudomonas* i njihovi filogenetski odnosi sa sekvencama dostupnim u NCBI i PAMDB bazama podataka, umnožene su nukleotidne sekvence četiri konstitutivna gena: *gapA*, *gltA*, *gyrB* i *rpoD* za izvođenje MLSA analize. Dobijeno stablo je generisano na osnovu spajanja i poravnanja nukleotida četiri konstitutivna gena, 28 proučavanih sojeva i tipskih i patotipških sojeva roda *Pseudomonas*, ukupne dužine 2001 nukleotida (Slika 34).

Filogenetsko stablo pokazalo je da većina proučavanih sojeva, sa izuzetkom soja K6, pripada genomskoj vrsti 1, *P. s. sensu stricto*, raspoređenih u filogrupu 2 (PG2), u okviru koje su proučavani sojevi raspoređeni u tri odvojena klastera koji pripadaju podgrupama 2a, 2b i 2d (Berge et al., 2014). Šest sojeva (BR1, BR2, N1, B13, K1 i K2) je bilo filogenetski slično podgrupi 2b gdje

se nalaze i referentni sojevi Pss B64 i Pss NCPPB 28. Proučavani sojevi K3, JŠ2, B5, B6, B7 i B8 formirali podklaster unutar podgrupe 2d zajedno sa referentnim sojevima Pss CFBP 4215 i Pss B728A. Filogenetske grupe 2b i 2d su usko povezane. Proučavani sojevi B14 i K8 su se razlikovali od ostalih sojeva koji pripadaju podgrupi 2d i smjestili su se u poseban podklaster, najbliži podgrupi 2d. Proučavani sojevi B1, B3, B4, B9, B10, B11, B12, K4, K5, K7, K9, T1, JŠ1 formirali su podklaster zajedno sa dva referentna soja *Pseudomonas cerasi* i Pss soj B76, koji pripadaju podgrupi 2a. Sojevi izolovani iz kajsije, badema i japanske šljive raspoređeni su kroz tri različite podgrupe 2a, 2b i 2d PG2, dok su sojevi izolovani iz breskve i nektarine raspoređeni u podgrupu 2b PG2. Jedan soj izolovan iz japanske šljive i soj iz trešnje grupisani su zajedno sa nedavno opisanom vrstom *P. cerasi* (Kalužna et al., 2016).

Nijedan od proučavanih sojeva nije bio povezan sa karantinskim patogenom breskve Psp ili Psm R2, koji pripadaju PG1 (Ruinelli et al., 2019). Soj K6 bio je poseban i najviše blizak sojevima koji pripadaju PG3, genomvrsti 2.

Činjenica da su proučavani sojevi porijeklom iz koštičavih voćaka i badema, grupisani u tri podgrupe PG2, sa izuzetkom soja K6, ukazuje na visoki diverzitet među proučavanim sojevima.



Slika 34. Filogenetsko stablo za 28 proučanih sojeva, konstruisano na osnovu MLSA analize sekvenci četiri konstitutivna gena (*gapA*, *gltA*, *gyrB*, *rpoD*), primjenom „Maximum Likelihood“ metode, sa genetičkom udaljenošću izračunatom prema Kimura-2 modelu. Dužina grana odgovara stopi supstitucija baznih parova. Uz čvorišta su naznačene “bootstrap” vrijednosti (1000 ponavljanja) čija je vrijednost >50. Filogrupe su obilježene sa PG2 i PG3, dok su proučavani sojevi podebljani.

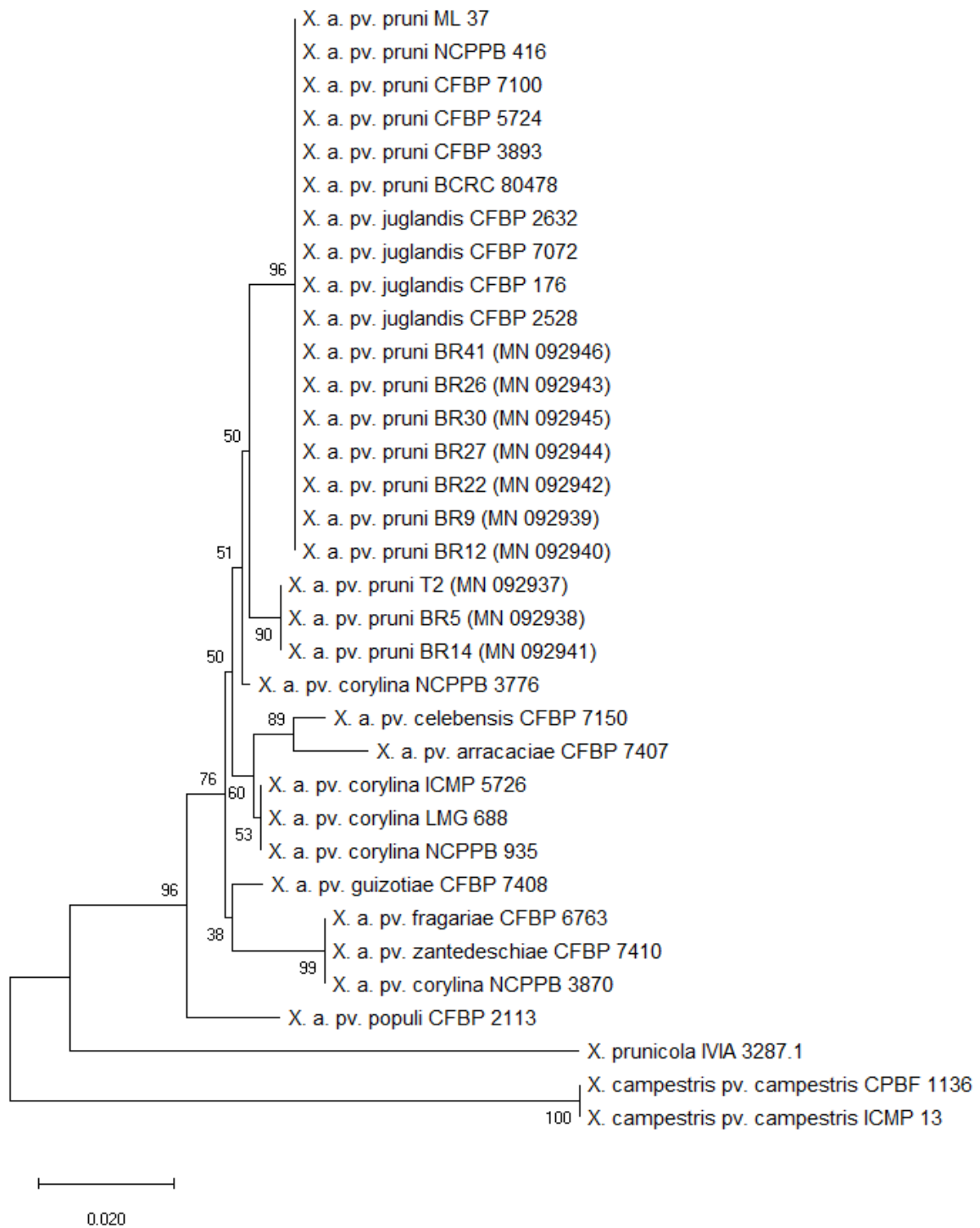
5.7.8 Analiza *gyrB* gena

Na osnovu BOX-PCR profila i utvrđene razlike u populaciji proučavanih sojeva roda *Xanthomonas*, odabrano je ukupno 10 reprezentativnih sojeva za sekvencionu analizu *gyrB* gena korišćenjem specifičnih prajmera XgyrPCR2F i X.gyr.rsp (Parkinson et al., 2007), kojim se umnožava fragment veličine 729 bp.

Nakon sekvenciranja umnoženog PCR produkta BLAST analizom utvrđena je sličnost sekvence sa odgovarajućim sekvencama dostupnim u NCBI bazi podataka. Dobijene parcijalne DNK sekvence pokazale su da osam proučavanih sojeva (T2: GenBank br. MN 092937, BR5: MN092938, BR12: MN092940, BR14: MN092941, BR22: MN092942, BR27: MN092944, BR30: MN092945 i BR41: MN092946) ima stepen identičnosti 98,97 do 99,71% sa sekvencom *gyrB* gena Xap patotip soj ICMP51. Sekvence dva proučavana soja (BR9: GenBank br. MN092939 i BR26: MN092943) pokazale su 100% identičnost sa sekvencama *gyrB* gena Xap sojeva izolovanih iz breskve (MG049922.1) i kajsije (KX950802.1) u Mađarskoj i breskve (FN808372.1) u Italiji.

Filogenetska analiza za odabrane sojeve izvedena je primjenom “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. Genske sekvence proučavanih sojeva korišćene su za filogenetsku analizu i poređene sa sekvencama *X. arboricola* patovara *pruni*, *corylina*, *juglandis*, *celebensis*, *arracaciae*, *guizotiae*, *fragariae*, *zantedeschiae* i *populi*, kao i sekvencom *X. prunicola*, novog patogena nektarine (López et al., 2018). Filogenetsko stablo ukorijenjeno je korišćenjem sekvence *gyrB* gena sojeva *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (CPBF 1136 i ICMP 13).

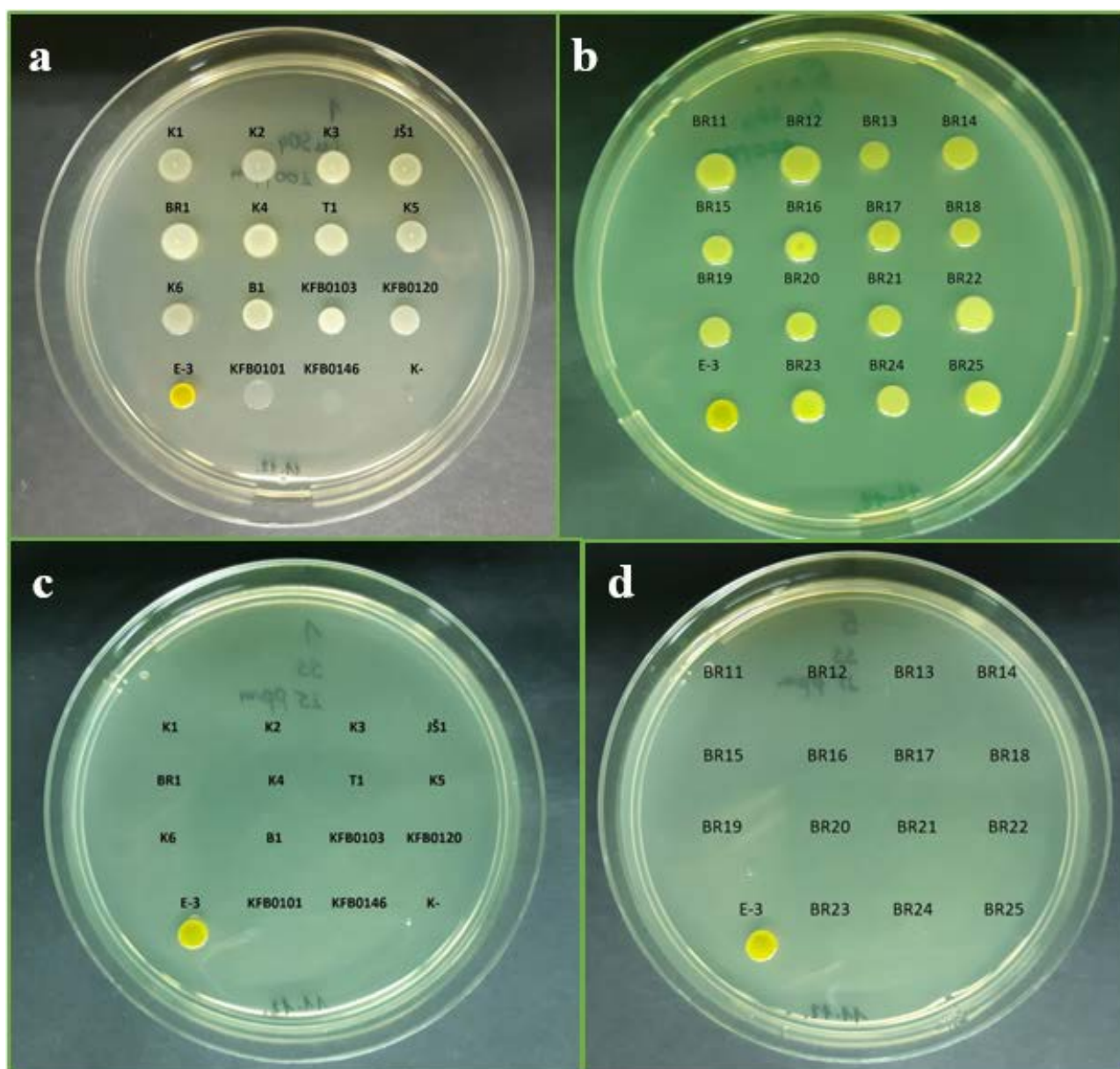
Filogenetska analiza izvedena na osnovu sekvenci *gyrB* gena ukazala je na blisku filogenetsku srodnost unutar vrste *X. arboricola*. Na filogenetskom stablu uočena je diferencijacija i grupisanje sojeva koje je uglavnom bilo u saglasnosti sa podjelom vrste na patogene varijetete. Izdvojeno je ukupno osam grupa, pri čemu su šest referentnih Xap sojeva i četiri referentna *X. a.* pv. *juglandis* soja formirali jedinstvenu grupu. Proučavani sojevi su formirali jasno izdvojenu grupu. U okviru ove grupe formirane su dvije podgrupe. U jednoj se nalazi sedam proučavanih sojeva (BR41, BR26, BR30, BR27, BR22, BR29 i BR12), zajedno sa šest referentnih Xap sojeva i četiri referentna soja *X. a.* pv. *juglandis*. Drugu podgrupu čine tri proučavana soja (T2, BR5 i BR14). Referentni soj *X. prunicola* IVIA 3287.1 je na filogenetskom stablu jasno izdvojen u odnosu na ostale patovare *X. arboricola*. Najveća sličnost utvrđena je između *gyrB* sekvenci Xap i *X. a.* pv. *juglandis* sojeva (Slika 35).



Slika 35. Dendrogram konstruisan na osnovu analize sekvence *gyrB* gena korišćenjem NJ metode sa genetičkom udaljenošću izračunatom prema Kimura-2 modelu. Dužina grana odgovara stopi supstitucija baznih parova. Uz čvorišta su naznačene “bootstrap” vrijednosti (1000 ponavljanja). Pristupni brojevi (GenBank) navedeni su u zagradi. Filogenetsko stablo ukorijenjeno je korišćenjem sekvenci sojeva *X. campestris* pv. *campestris* CPBF 1136 i ICMP 13.

5.8 Proučavanje osjetljivosti sojeva prema baktericidima

Proučavani sojevi ispoljili su razlike u pogledu osjetljivosti prema proučavanim baktericidima. U pogledu osjetljivosti prema bakar-sulfatu, svi proučavani sojevi kao i kontrolni sojevi (Pss (KFB 0103), Psm R2 (KFB 0101), Psm R1 (KFB 0120), Xap (KFB 0104)) razvijali su se na SPA podlozi sa 100 i 200 ppm bakar-sulfata, što ukazuje na njihovu rezistentnost prema navedenim koncentracijama ovog preparata. Na podlozi sa streptomycin-sulfatom svi proučavani sojevi, kao i kontrolni sojevi, ispoljili su osjetljivost prema 25 ppm i 50 ppm streptomycin-sulfata. Pozitivna kontrola, soj *X. euvesicatoria* (E-3, KFB 062), je rezistentan na proučavane koncentracije baktericida i razvijao se na SPA podlozi sa bakar-sulfatom i streptomycin-sulfatom (Slika 36).



Slika 36. Razvoj proučavanih sojeva na podlozi sa baktericidima. (a) sojevi *Pseudomonas* sp. na podlozi sa 200 ppm bakar- sulfata; (b) sojevi *Xanthomonas* sp. na podlozi sa 200 ppm bakar- sulfata; (c) sojevi *Pseudomonas* sp. na podlozi sa 25 ppm streptomycin- sulfata; (d) sojevi *Xanthomonas* sp. na podlozi sa 25 ppm streptomycin- sulfata. Pozitivna kontrola soj E-3, razvijao se na svim podlogama što ukazuje na njegovu rezistentnost na proučavane koncentracije baktericida.

6. DISKUSIJA

Proizvodni zasadi koštičavih voćaka i badema su među ekonomski najvažnijim zasadima širom svijeta. U voćarstvu Crne Gore, značajno mjesto zauzimaju zasadi naročito šljive u sjevernom i breskve u centralnom dijelu zemlje. Plodovi koštičavih voćaka u Crnoj Gori se uglavnom koriste za svježnu potrošnju, dok se tek posljednjih godina intenzivno razvijaju prerađivački kapaciteti.

Zbog veoma velike biološke vrijednosti, plodovi koštičavih voćaka i badema imaju značajnu ulogu u ljudskoj ishrani, a u novije vrijeme postaju veoma važan faktor u prevenciji mnogih bolesti.

U svim područjima gajenja koštičavih voćaka i badema, fitopatogene bakterije mogu, pri povoljnim klimatskim uslovima, prouzrokovati velike ekonomske gubitke u proizvodnji.

Zasnivanje proizvodnih zasada koštičavih voćaka i badema u Crnoj Gori sa sadnim materijalom, porijeklom iz uvoza, povećava rizik od unošenja karantinskih vrsta bakterija i pojave bakterioza jačeg intenziteta.

Iako u posljednjem periodu nisu zabilježene štete većeg obima, imajući u vidu da bakterioze koštičavih voćaka i badema nisu bile predmet intenzivnih proučavanja u Crnoj Gori duži niz godina, pristupilo se sveobuhvatnom proučavanju ovog problema.

U cilju utvrđivanja prisustva bakterioznih oboljenja tokom 2017. i 2018. godine, izvršen je obilazak najznačajnijih regiona po gajenju koštičavih voćaka i badema u Crnoj Gori.

Iz prikupljenog simptomatičnog biljnog materijala sa više od 50 lokaliteta, izolacija fitopatogenih bakterija je bila uspješna iz uzoraka prikupljenih iz 20 lokaliteta, što ukazuje da simptomi često nisu pouzdan dijagnostički kriterijum i da slične simptome mogu prouzrokovati drugi biotski (gljive, fitoplazme, virusi i insekti) ili abiotski faktori (niske i visoke temperature, ozljede nasale mehaničkim putem, prekomjerna upotreba sredstava za zaštitu bilja i dr.).

U okviru ovog istraživanja, ukupno je proučeno 68 sojeva bakterija. Najveći broj sojeva (37) je izolovan sa lokaliteta Ćemovsko polje, gdje je i skoncentrisana najznačajnija proizvodnja breskve i nektarine u Crnoj Gori. Uzorkovanje biljnog materijala vršeno je tokom cijele godine, ali je najuspješniji period za izolaciju sojeva Pss bio tokom kasnog proljeća, a za sojeve Xap kasnog ljeta i rane jeseni. Soj BR5 Xap je izolovan početkom decembra. Takođe, izolacija sojeva Xap bila je uspješna i tokom maja 2019. godine, kada je izolovan veći broj sojeva koji nisu proučavani u ovom radu. Na osnovu ovoga možemo zaključiti da se bakterija Xap može uspješno izolovati tokom cijele sezone tj. tokom proljeća, kasnog ljeta, rane i kasne jeseni. Prema podacima iz literature, proljećni period je najuspješniji period za izolaciju sojeva Pss i Psm (Crosse, 1966; Hattingh and Roos, 1995; Spotts et al., 2010; Balaž et al., 2016). U literaturi se navodi da se Xap može uspješno izolovati iz simptomatičnih uzoraka biljnog materijala (lista, ploda, grane i grančice) breskve, nektarine i šljive od aprila do sredine avgusta, dok je izolacija patogena iz pupoljaka, bila neuspješna krajem zime (Giovanardi et al., 2016). Najuspješnija izolacija sojeva bakterija postignuta je iz listova sa simptomima pjegavosti (oko 66,1%), dok su ostali sojevi izolovani iz plodova, lisne peteljke, pupoljaka, grančica i grana. Takođe, značajno je istaći da su izolacije bakterija iz uzoraka sa simptomima višegodišnjih rak-rana i „crnih vrhova“ grančica često bile neuspješne. Ovo se može objasniti činjenicom da u rak-ranama ostaje mali dio populacije bakterija *Pseudomonas syringae* tokom ljetnjih mjeseci, kao i da prouzrokovajući pomenutih simptoma mogu biti i druge prirode. Simptom pjegavosti lišća koji prouzrokuje Xap, može se lako zamijeniti sa onim koje prouzrokuju gljivični patogeni *Wilsomomyces carpophilus* i *Venturia carpophila* (Roselló et al., 2012).

Proučavani sojevi su svrstani u dva roda: *Pseudomonas* i *Xanthomonas*, na osnovu morfoloških, patogenih, biohemijsko-fizioloških i molekularnih odlika.

Izolacija sojeva je vršena na podlozi od hranljivog agara (HA). Sojevi su na osnovu morfoloških odlika kolonija svrstani u dva roda: *Pseudomonas* i *Xanthomonas*. Upotreba HA za izolaciju bakterija nije bila pogodna zbog neselektivnosti i razvoja saprofitnih bakterija sličnih odgajivačkih odlika patogenim. Za dobijanje čistih kultura sojeva roda *Xanthomonas* korišćena je

YDC podloga. Na HA podlozi, 29 *Pseudomonas* sp. sojeva formiralo je ispupčene, sjajne, sivobjeličaste krupne kolonije, dok je na YDC podlozi 39 *Xanthomonas* sp. sojeva formiralo sjajne, ispupčene kolonije krem žute boje, sluzaste konzistencije. Posebnu pažnju privukao je soj B7, izolovan iz badema, koji se razlikovao od ostalih *Pseudomonas* sojeva, stvaranjem smeđeg pigmenta u HA i Kingovoj podlozi B. U literaturi se navodi da šest sojeva izolovanih iz drijena (*Cornus mas*) (Kałużna, 2019) i *Pseudomonas* sojevi izolovani iz borovnice (*Vaccinium corymbosum*) (Kałużna et al., 2013) u Poljskoj, oni stvaraju smeđi pigment u Kingovoj podlozi B, koji mijenja boju podloge nakon 48h.

Odabir sojeva za dalja proučavanja, izvršen je na osnovu patogenih odlika, odnosno sposobnosti da prouzrokuju hipersenzitivnu reakciju listova duvana i muškatile i karakteristične simptome, u vidu nekroza, na biljkama domaćinima.

Pojava hipersenzitivne reakcije proučena je korišćenjem dvije test biljke: duvan i muškata. Listovi muškatile su se pokazali kao praktični za provjeru hipersenzitivnosti sojeva, iz razloga što su dostupni tokom cijele godine i pogodni za inokulaciju. Na listovima duvana i muškatile, svi proučavani sojevi prouzrokovali su hipersenzitivnu reakciju posle 24, odnosno 48 h. Uočeno je da sojevi koji pripadaju rodu *Pseudomonas*, prouzrokuju hipersenzitivnu reakciju posle 24 h, dok sojevi koji pripadaju rodu *Xanthomonas* nakon 48 h. Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima drugih autora. Sojevi Pss i Psm prouzrokuju hipersenzitivnu reakciju posle 24 h (Giovanardi et al., 2018), dok sojevi Xap nakon 24-48 h (Giovanardi et al., 2016).

Uspješna provjera patogenosti prema biljci domaćinu izvršena je vještačkom inokulacijom ubranih mladara, listova i nezrelih plodova. Izvođenje testa patogenosti vještačkom inokulacijom koštčavih biljaka i badema može trajati i više mjeseci i zahtjeva specifične uslove da bi došlo do pojave simptoma. Zato se u cilju provjere patogenosti inokulišu djelovi biljke domaćina, tj. pojedini organi, kako bi se patogene odlike sojeva bakterije proučile u što kraćem roku. U ovom radu, test patogenosti izveden je na mladarima, listovima i plodovima korišćenjem različitih metoda inokulacije pri čemu su uočene razlike u dinamici ispoljavanja simptoma patogenosti, o čemu izvještavaju i drugi autori. Patogenost sojeva *P. siringae* može se provjeriti na biljci domaćinu, njenim mladarima, listovima ili plodovima (Bedford et al., 2003; Kałużna and Sobiczewski, 2009; Hulin et al., 2018; Ruinelli et al., 2019). Patogenost sojeva Xap može se provjeriti na listovima osjetljivih sorti breskve i šljive (Randhawa and Civerolo, 1985), na listovima mladih izdanaka breskve i šljive (Randhawa and Civerolo, 1985; Du Plessis, 1988), na nesazrelim plodovima breskve i šljive (Giovanardi et al., 2016).

Dobijeni rezultati pokazuju da inokulacija odvojenih organa (mladara, lišća i plodova) umjesto cijele biljke domaćina, može dati pouzdane rezultate u ispitivanju patogenosti sojeva. Međutim, test inokulacije odvojenih listova ima neke prednosti u odnosu na inokulaciju mladara i plodova: simptomi patogenosti se brzo ispoljavaju (nakon tri dana od inokulacije), lišće je dostupno duži vremenski period tokom godine u odnosu na mladare i plodove, metoda inokulacije – infiltracija bakterijske suspenzije je brza, ponovljiva i jednostavna za izvođenje (Moragrega et al., 2003; Bedford et al., 2003). Međutim, inokulacija listova japanske šljive (*Prunus salicina*), se nije pokazala pogodnom za izvođenje testa patogenosti. Listovi japanske šljive nisu pogodni za inokulaciju, jer biljno tkivo prilikom inokulacije lako puca i bakterijsku suspenziju je teško infiltrirati (Slika 17d).

Patogenost proučavanih sojeva potvrđena je ispoljavanjem karakterističnih simptoma, u vidu nekroza, koje se na mladarima pojavljuju 7-12 dana, na listovima 3-7 dana i na plodovima 2-10 dana nakon inokulacije. Slične rezultate u proučavanju patogenosti sojeva Xap, navode i drugi autori. Inokulacijom odvojenih listova kajsije sojevima Xap, nakon 3 do 4 dana pojavljuju se vodenaste pjege, koje prelaze u smeđe, nekrotične pjege, ponekad okružene sivkasto-bijelim ili ljubičastim oreolom (Schwarczinger et al., 2017). Inokulacijom odvojenih listova breskve sojevima Xap, nakon sedam dana pojavljuju se tipični simptomi pjegavosti (Schwarczinger et al., 2017). Inokulacijom odvojenih listova badema sa sojevima Xap pojavljuje se karakterističan simptom bakterijske pjegavosti (Palacio-Bielsa et al., 2010). Nakon 12 dana od inokulacije sojevima Xap, na

plodovima breskve i šljive pojavljuju se nekrotične zone na mjestu inokulacije (Giovanardi et al., 2016).

Nakon preliminarnе determinacije proučavanih sojeva na osnovu izgleda i razvoja kolonija na hranjivim podlogama i provjere patogenosti, izvršena je diferencijacija sojeva na dvije grupe, tj. one čije kolonije podsjećaju na *Pseudomonas* spp. i one sa odgajivačkim odlikama *Xanthomonas* spp. Zatim je identifikacija proučavanih sojeva nastavljena primjenom opštih i diferencijalnih testova za identifikaciju vrsta ova dva roda. Svi proučavani sojevi su Gram negativni, stvaraju katalazu, ali ne i oksidazu i imaju oksidativan metabolizam glukoze.

U literaturi se navodi da je stvaranje fluorescentnog pigmenta na Kingovoj podlozi B, koristan diferencijalni test za identifikaciju *Pseudomonas syringae* (Sulikowska and Sobiczewski, 2008; Bultreys and Kałużna, 2010; Giovanardi et al., 2018). Stvaranje fluorescentnog pigmenta značajna je bakteriološka karakteristika pri identifikaciji patogenih varijeteta vrste *P. syringae*, jer patovar *syringae* stvara fluorescentni pigment, dok reakcija patogenog varijeteta *morsprunorum* može biti promjenjiva, a patogeni varijeteti *persicae* i *avii* ne stvaraju fluorescentni pigment na Kingovoj podlozi B (Bultreys and Kałużna, 2010). Stvaranje zelenog fluorescentnog pigmenta, uprkos kasnije ispoljenim razlikama u pogledu pojedinih karakteristika među sojevima, ispostavilo se kao jedna od zajedničkih odlika 29 proučavanih sojeva grupe *Pseudomonas* (Tabela 5).

Svih 29 fluorescentnih sojeva su oksidaza negativni, ne prouzrokuju trulež kriški krompira, niti hidrolizuju arginin i svi prouzrokuju hipersenzitivnu reakciju duvana.

Na osnovu rezultata LOPAT testova, može se zaključiti da 15 sojeva (K3, BR1, B1, B2, B8, JŠ2, K8, BR2, N1, B5, B6, B7, B10, B13, B14) pripadaju vrsti *Pseudomonas syringae*, i svrstani su u Ia LOPAT grupu roda *Pseudomonas*, kojoj pripada i Pss. Preostalih 14 sojeva (K7, B12, B3, B4, B9, B11, K4, K1, K2, K6, K5, K9, T1, JŠ1) nisu jasno stvarali levan, dok su im ostale karakteristike odgovarale Ia LOPAT grupu roda *Pseudomonas* (Tabela 5). Međutim, u literaturi se navode varijacije u izgledu levan tipa kolonija koje su ipak ocijenjene kao levan pozitivne. Tako Pss sojevi izolovani iz džanarike (*Prunus cerasifera*), formiraju manje ispupčene kolonije koje stvaraju više sluzi, ili dva Pss soja iz kajsije po površini kolonija formiraju radijalne pruge što im daje hrapav izgled (Gavrilović, 2006). U literaturi ima podataka o sojevima *P. syringae* koji ne stvaraju levan, ali se oni karakterišu i slabijim stepenom patogenosti (Mansvelt and Hattingh, 1986). Roos i Hattingh (1983) navode da pojedini sojevi izolovani iz koštičavih voćaka formiraju ravne nelevan tipa kolonije, koji su takođe identifikovani kao sojevi Pss.

Rezultati GATTa testova pokazali su da 29 sojeva nisu homogeni u pogledu ovih karakteristika. Na osnovu GATTa testova može se zaključiti da pet sojeva (K3, BR1, B1, B8, JŠ2) posjeduje iste karakteristike kao i potogeni varijetet *syringae* (G+A+T-Ta-). Svi proučavani sojevi hidrolizuju eskulin, većina hidrolizuje želatin (22 proučavana soja) i ne koristi tartarate (20 proučavanih sojeva), dok većina sojeva stvara tirozinazu (23 proučavana soja). Rezultati proučavanja GATTa testova u ovom istraživanju pokazali su, kao i literaturni podaci, da je dijagnostička vrijednost GATTa testova u diferencijaciji sojeva ograničena. Ovi testovi su pouzdani samo za razlikovanje patovara *syringae* i *morsprunorum* rasa 1 (Latorre and Jones, 1979). Sojevi Psm R1 ne hidrolizuju želatin i eskulin, ali proizvode tirozinazu i koriste tartarate (Bultreys and Kałużna, 2010). Vicente i Roberts (2007) pokazali su da neki sojevi Psm R2 mogu dati iste rezultate GATTa testova (+ + - -) kao sojevi patovara *syringae*. Osim toga, rezultati GATTa testova za druge patovare *P. syringae* uglavnom su nepoznati, što dodatno usložnjava njihovu diferencijaciju.

Dvadeset jedan proučavani soj je zadržao vitalnost nakon sedam dana na NAS podlozi, dok je osam sojeva izgubilo vitalnost. U literaturi se navodi da patovar *syringae* zadržava duže vitalnost u odnosu na patovar *morsprunorum*. Gašić i sar. (2012) navode da je patovar *morsprunorum* izgubio vitalnost nakon četiri dana, dok su patovari *syringae* i *persicae* ostali vitalni najmanje sedam dana. Međutim, Gavrilović (2006) navodi da Pss i Psm sojevi porijeklom sa ploda višnje, zadržavaju vitalnost duže od 10 dana na NAS podlozi. Isti autor, kao i Burkowicz i Rudolph (1994) navode da ovo nije dovoljno pouzdan test za razlikovanje patogenih varijeteta *P. syringae*, što je u skladu sa rezultatima u ovom istraživanju.

Stvaranje čestica leda bitna je odlika Pss, jer ova osobina patogena u prirodi doprinosi izmrzavanju biljnih tkiva. Dvadeset pet proučavanih sojeva je ispoljilo sposobnost stvaranja čestica leda, dok je kod četiri soja (K1, K2, B12, B14), reakcija je bila negativna (Tabela 5). Na osnovu rezultata testa, može se zaključiti da 25 proučavanih sojeva porijeklom iz koštičavih voćaka i badema, pripadaju patogenu Pss. Sposobnost stvaranja čestica leda (INA) bitna je odlika sojeva Pss (Roos and Hattingh, 1983; Moore, 1988). Međutim, navedeni autori ističu da pojedini sojevi patovara *syringae*, kao i intermedijarni sojevi ne stvaraju čestice leda. Sposobnost stvaranja čestica leda posjeduje 85% sojeva *P. syringae* filogrupa 2 (Berge et al., 2014)

Jedna od karakteristika Pss je sposobnost sinteze toksina siringomicina, koji igra važnu ulogu u virulentnosti patogena. Primjenom PCR reakcije izvršena je detekcija *syrB* gena za sintezu siringomicina, kod 25 proučavanih sojeva, dok do umnožavanja fragmenta veličine 752 bp nije došlo kod četiri proučavana soja (K1, K2, B2, B14). Detekcija *syrB* gena se pokazala kao korisna i brza metoda u identifikaciji Pss sojeva (Scortichini and Rossi, 2003; Gilbert et al., 2009; Kalužna et al., 2010). Bultreys i Kalužna (2010) izvijestili su da proizvodnja toksina nije konstantna kod patogena Pss. Poznato je da neki sojevi Pss gube sposobnost proizvodnje toksina ako se čuvaju duže vrijeme (Hwang et al., 2005).

Za četiri soja kod kojih nije došlo do umnožavanja fragmenta *syrB* gena primjenjena je sekvenciona analiza 16S rRNK gena. Na osnovu poređenja dobijenih sekvenci sa sekvencama dostupnim u NCBI bazi, utvrđeno je da sojevi K1, K2, B14 i B2 ipak pripadaju bakteriji Pss.

U cilju utvrđivanja genetičkog diverziteta u populaciji proučavanih sojeva, primjenjena je Rep-PCR analiza. Ponavljajuće sekvence kod 29 proučavanih sojeva umnožene su pomoću BOX PCR reakcije, upotrebom BOXA1R prajmera. Dobijeni genetski profili ukazali su na značajan genetički diverzitet među proučavanim sojevima. U literaturi se navodi da je primjenom Rep – PCR analize utvrđena homogena populacija među sojeva patovara *morsprunorum* rasa 1 i 2, i heterogena populacija među sojevima patovara *syringae* (Scortichini and Rossi, 2003; Vicente and Roberts, 2007; Gilbert et al., 2009; Kalužna et al., 2010; Giovanardi et al., 2018). Među proučavanim sojevima moguće je razlikovati 12 profila. Neki od njih predstavljeni su pojedinačnim sojevima (BR2, B10, B14, K6), dok su kod nekih profila do četiri soja grupisana zajedno (JŠ1, K5, B1, B2; B3, B4, B11, B12; K3, K8, B5, B6). Dobijeni genetski profili nisu bili specifični za domaćina, sastojali su se od sojeva izolovanih iz različitih vrsta biljaka domaćina. Nijedan se profil u potpunosti nije podudarao sa profilom kontrolnog soja. Međutim, većina njih dijelila je nekoliko zajedničkih fragmenata sa kontrolnim sojem Pss (KFB0103) (Slika 32). Takođe genetski profili nisu odgovarali porijeklu sojeva. Dobijeni BOX-PCR profili su se razlikovali među sojevima izolovanim iz iste biljne vrste, kao i kod sojeva izolovanih sa istog lokaliteta i iste biljne vrste. Slični rezultati se navode u proučavanju genetičkog diverziteta sojeva izolovanih iz kajsije u Italiji (Gormez et al., 2013).

Analiza genetske varijabilnosti između 28 proučavanih sojeva i njihovi filogenetski odnosi sa sekvencama dostupnim u NCBI i PAMDB bazama podataka, izvedena je MLSA analizom, pri čemu su umnožene nukleotidne sekvence četiri konstitutivna gena: *gapA*, *gltA*, *gyrB* i *rpoD*. Dobijeno filogenetsko stablo pokazalo je da većina sojeva, sa izuzetkom soja K6, pripada genomskoj vrsti 1, *P. s. sensu stricto*, raspoređenih u filogrupi 2 (PG2), u okviru koje su proučavani sojevi raspoređeni u tri odvojena klastera koji pripadaju podgrupama 2a, 2b i 2d (Berge et al., 2014). Nijedan od proučavanih sojeva nije bio povezan sa karantinskim patogenom breskve Psp ili sa Psm R2, koji pripadaju PG1 (Ruinelli et al., 2019). Soj K6 bio je poseban i najviše blizak sojevima koji pripadaju PG3, genomvrsti 2 koji obuhvata Psm R1 i *P. syringae* pv. *cerasicola* (Ruinelli et al., 2019). Ovi rezultati pokazali su da su sojevi izolovani iz koštičavih voćaka i badema raspoređeni kroz PG2, izuzev soja K6 koji je raspoređen u PG3. Čini se da su dobijeni rezultati slični rezultatima koje navode Ruinelli i sar. (2019). Oni su proučavali filogenetske odnose sojeva izolovanih iz *Prunus* spp, koji su bili raspoređeni u PG1, PG2 i PG3. Utvrdili su da sojevi koji pripadaju istoj PG nisu grupisani u jedan monofiletski klaster (Ruinelli et al, 2019). Hulin i sar. (2018) navode da sojevi Pss izolovani iz *Prunus* spp., nisu formirali monofiletski klaster nego su raspoređeni kroz PG2. PG2 pokazuje najveću raznolikost domaćina i uključuje većinu sojeva

patovara *syringae* (Hwang et al., 2005). PG2 predstavlja najraznovrsniju filogrupu *P. syringae* kompleksa, koja je podijeljena u pet podgrupa, dok podgrupi 2b pripada patovar *syringae* (Berge et al., 2014). PG2 uključuje patogene sojeve, ali i sojeve sa slabom patogenošću, kao i sojeve koji naseljavaju veoma raznovrsna staništa i različite ekološke niše (Berge et al., 2014).

Činjenica da su proučavani sojevi grupisani u tri podgrupe PG2, sa izuzetkom soja K6, ukazuje na veliki diverzitet među proučavanim sojevima *Pseudomonas syringae* porijeklom iz koštičavih voćaka i badema. Posebnu pažnju privukao je soj K6, izolovan iz kajsije, koji je MLSA analizom bio najviše blizak sojevima koji pripadaju PG3, genomvrsti 2 koji obuhvata Psm R1 i Psc (Ruinelli et al., 2019). Međutim, na osnovu ostalih rezultata (sinteza siringomicina, stvaranje čestica leda, hidroliza arginina, fluorescencija na Kingovoj B podlozi), ovaj soj je najbliži patogenu Pss.

Na osnovu sveobuhvatnih rezultata, možemo reći da proučavani sojevi izolovani iz koštičavih voćaka i badema, porijeklom iz Crne Gore najverovatnije pripadaju Pss.

Za diferencijaciju grupe od 39 *Xanthomonas* sojeva, na osnovu rezultata proučavanja patogenih odlika, razvoja kolonija na YDC podlozi, kao i rezultata opštih testova (Gram test, aktivnost oksidaze i katalaze, O/F test), dalje su primjenjeni testovi koji se koriste za diferencijaciju bakterija roda *Xanthomonas* (Tabela 6). Proučavanjem biohemijsko-fizioloških odlika sojeva Xap utvrđeno je da proučavani sojevi ispoljavaju visok stepen homogenosti, ali i da među pojedinim sojevima postoje razlike u pogledu nekih odlika. Svi proučavani sojevi hidrolizuju eskulin i ne razvijaju se pri 37°C. Dobijeni rezultati su u skadu sa biohemijsko-fiziološkim karakteristikama sojeva Xap: ne hidrolizuje skrob, hidrolizuje želatin i eskulin i razvija se pri 35°C (Fahy and Persley, 1983; Schaad and Stall, 1988; EPPO Standards PM 7/64 (1)). Razlike u pogledu pojedinih odlika nameću potrebu u standardizaciji izvođenja metoda, ali i ukazuju na moguću heterogenost sojeva u pogledu hidrolize skroba i želatina. Skrob hidrolizuju četiri proučavana soja (T2, BR5, BR14 i B15), dok dva proučavana soja (BR13 i BR25) ne hidrolizuju želatin.

Korišćenjem specifičnih prajmera XapY17-F/XapY17-R u reakciji lančanog umnožavanja fragmenata DNK (Pagani, 2004; Pothier et al., 2011), umnožen je fragment veličine 943 bp kod 37 proučavanih sojeva i kod referentnog soja Xap (KFB 0104), dok do umnožavanja odgovarajućeg DNK fragmenta nije došlo kod dva proučavana soja (B15 i BR13). Negativan rezultat kod ova dva soja može se objasniti odsustvom ciljane sekvence, ili promjenama u redosledu nukleotida DNK bakterije nastalim nekim tipom mutacije, ili nedovoljnom komplementarnošću ovog gena sa primjenjenim prajmerom. Specifični prajmeri za identifikaciju sojeva Xap (Pagani, 2004; Pothier et al., 2011), nalaze široku primjenu u posljednjoj deceniji u identifikaciji Xap izolovanih iz *Prunus* vrsta: prvi nalaz Xap na kajsiji u Mađarskoj (Schwarczinger et al., 2017); prvi nalaz Xap na breskvi u Mađarskoj (Schwarczinger et al., 2018); prvi nalaz Xap na bademu u Evropi (Palacio-Bielsa et al., 2010); prvi nalaz Xap na breskvi u Crnoj Gori (Popović et al., 2020); prvi nalaz Xap na *Prunus laurocerasus* u Holandiji (Tjou-Tam-Sin et al., 2013); Xap na *Prunus laurocerasus* u Centralnoj Italiji (Marchi et al., 2011).

Sekvencionana analiza 16S rRNK gena primjenjena je za dva *Xanthomonas* soja (B15 i BR13) kod kojih nije došlo do umnožavanja fragmenta *ftsX* gena. Nakon sekvenciranja umnoženog PCR produkta BLAST analizom utvrđena je sličnost sekvence sa odgovarajućim sekvencama dostupnim u NCBI bazi podataka. Soj B15 izolovan iz badema imao je visok stepen nukleotidne sličnosti (99,93%), sa velikim brojem sekvenci sojeva Xap, izolovanih iz koštičavih voćaka i badema. Na ovaj način potvrđena je pripadnost soja B15 vrsti Xap. Soj BR13 izolovan iz breskve na osnovu sekvencione analize 16S rRNK gena pripada vrsti *Pseudomonas lutea*. Stepent identičnosti proučavanog soja BR13 iznosila je 99,92% sa sojem OK2, izolovanim iz rizosfere trave u Španiji (NCBI Reference Sequence: NR 029103.1).

Rep-PCR metodom, na osnovu dobijenih BOX-PCR profila, utvrđen je nizak stepen polimorfizma, odnosno homogena populacija proučavanih *Xanthomonas* sojeva. BOX-PCR profili 33 proučavana soja, podudarali su se sa profilom referentnog soja Xap (KFB 0104). BOX-PCR profili sojeva B15 i BR13 su se razlikovali od ostalih, čime su potvrđeni rezultati PCR analize za detekciju *ftsX* gdje kod ovih sojeva nije došlo do umnožavanja fragmenta veličine 943 bp (Slika

31). Kod sojeva T2, BR5, BR14 i BR26 došlo je umnožavanja DNK fragmenata koji nisu umnoženi kod drugih proučavanih sojeva (Slika 29). Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima drugih autora. Proučavanja strukture populacije Xap primjenom ove metode ukazala su na homogenu strukturu i nizak stepen polimorfizma (Zaccardelli et al., 1998; Boudon et al., 2005; Rademaker et al., 2005; Barionovi and Scortichini, 2008; Gašić i Obradović, 2009; Kawaguchi, 2012, 2014; Giovanardi et al., 2016). Barionovi i Scortichini (2008) ističu da primjenom Rep-PCR metode, na osnovu dobijenih BOX-PCR profila, sojevi Xap porijeklom iz Italije, Španije i Australije, ne pokazuju genetički diverzitet. U Japanu, primjenom rep-PCR metode, između sojeva Xap izolovanih iz breskve, utvrđena je gotovo homogena populacija (Kawaguchi, 2012; 2014). Primjenom Rep-PCR metode, koristeći ERIC, REP i BOX prajmere, 23 soja izolovana iz breskve i šljive, u Italiji, pokazala su neznatne genetičke varijacije, pri čemu je zaključeno da su proučavani sojevi i referentni sojevi Xap usko povezani (Giovanardi et al., 2016). Hipoteza da Xap sojevi pripadaju jednoj populaciji sa veoma niskim genetičkim diverzitetom objašnjava se distribucijom istog sortimenta u svim oblastima gajenja, kao i veoma ograničenim genetičkim diverzitetom domaćina (Hajri et al., 2012).

Na osnovu BOX-PCR analize i utvrđene razlike u populaciji proučavanih sojeva, iz *Xanthomonas* grupe odabrano je ukupno 10 reprezentativnih sojeva za sekvencionu analizu *gyrB* gena. Filogenetska analiza zasnovana na parcijalnim sekvencama *gyrB* gena ukazuje na povezanost sojeva iste vrste i pouzdana je metoda u identifikaciji sojeva do nivoa vrste (Parkinson et al., 2007). Gen *gyrB* je korišćen od strane drugih autora u proučavanju odnosa između *X. arboricola* patogena (Young et al., 2008; Parkinson et al., 2007, 2009) i postao je referenca za filogenetsku identifikaciju vrsta unutar roda (Fischer-Le Saux et al., 2015). Filogenetska analiza izvedena na osnovu sekvenci *gyrB* gena ukazala je da 10 reprezentativnih sojeva formira jasno izdvojenu grupu. Najveća sličnost utvrđena je između *gyrB* sekvenci Xap i *X. a. pv. juglandis* sojeva (Slika 35). Filogenetska analiza zasnovana na sekvenciranju *gyrB* gena pokazala je da 23 soja izolovana iz breskve i šljive, na sjeveroistoku Italije, formiraju jedinstvenu grupu, odvojenu od ostalih patovara *X. arboricola* (Giovanardi et al., 2016). Na osnovu sprovedene analize i grupisanja sojeva patovara *pruni* i *juglandis* u jednu homogenu grupu, može se zaključiti da *gyrB* gen ne predstavlja pogodan genetički marker za utvrđivanje filogenetskih odnosa među patovarima *pruni* i *juglandis*. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa istraživanjima Kažužna i sar. (2014), gdje se analizom sekvenci *gyrB* gena sojevi *X. arboricola* *pv. juglandis* grupišu zajedno sa sojem Xap (ICMP 51PT), što pokazuje da analiza *gyrB* gena nije dovoljna za identifikaciju patovara *pruni* i *juglandis*.

Dugogodišnja primjena bakarnih preparata i antibiotika i veliki broj njihovih aplikacija tokom vegetacionih sezona, povezana je sa razvojem otpornih populacija patogena (Sundin et al., 2016). Primjena antibiotika u zaštiti bilja zabranjena je u većini evropskih država, kao i u Crnoj Gori, stoga ne iznenađuje visoka osjetljivost proučavanih sojeva prema streptomycinu. Primjena raznih antibiotika uglavnom daje pozitivne rezultate, ali i pored njihove ograničene dozvole za primjenu, utvrđena je i rezistentnost fitopatogenih bakterija prema većini antibiotika (McManus et al., 2002).

Stepen osjetljivosti sojeva prema baktericidima može se utvrditi u laboratorijskim uslovima merenjem koncentracije jedinjenja potrebnog za inhibiciju rasta. Koncentracija bakar sulfata od 300 ppm ihibira rast sojeva Xap izolovanih iz breskve i šljive, u Italiji (Giovanardi et al., 2016). Sojevi *P. syringae* izolovani iz kajsije u Italiji, ispoljili su umjerenu (200 ppm) do visoku otpornost (500 ppm) na bakar (Giovanardi et al., 2018).

U ovom radu proučena je *in vitro*, osjetljivost proučavanih sojeva na bakar-sulfat i na antibiotik streptomycin-sulfat. Rezultati proučavanja u ovom radu ukazuju da su svi proučavani sojevi bili otporni na 100 i 200 ppm bakar-sulfata. Takođe svi proučavani sojevi su bili osjetljivi na 25 ppm i 50 ppm streptomycin-sulfata. Dobijeni rezultati ukazuju na mogućnost razvoja otpornosti Xap i Pss sojeva na bakar-sulfat, što može biti posljedica intenzivne upotrebe ovog jedinjenja u zaštiti bilja. Mnogi autori navode da bi tretiranje bakarnim preparatima moglo dovesti do razvoja otpornih sojeva bakterija (Sulikowska and Sobiczewski, 2008; Giovanardi et al., 2016, 2018). S druge strane, upotreba streptomycin-sulfata može doprinijeti kontroli bolesti, ali antibiotici nisu

registrovani za primjenu u zaštiti biljaka u Crnoj Gori. Prethodno opisani rezultati pokazali su da su sojevi Pss izolovani iz koštičavih voćaka osjetljivi na antibiotik streptomycin (Mohammadi et al., 2001; Khodaygan et al., 2012; Vasebi et al., 2019). U cilju očuvanja efikasnosti baktericida i spriječavanja pojave rezistentnosti neophodna je njihova kontrolisana i racionalna primjena u praksi.

7. ZAKLJUČAK

Na osnovu rezultata dobijenih u okviru ove disertacije, može se zaključiti sljedeće:

- Pregledom zasada koštičavih voćaka i badema na teritoriji Crne Gore, u periodu od 2017-2018. godine, utvrđeno je prisustvo patogenih bakterija u prikupljenim uzorcima.
- Iz uzoraka oboljelih koštičavih voćaka i badema, korišćenjem standardnih hranljivih podloga, izolovano je i proučeno 68 sojeva bakterija.
- Na osnovu proučavanja morfoloških, odgajivačkih i biohemijsko-fizioloških odlika utvrđeno je da izolovani sojevi pripadaju rodovima fitopatogenih bakterija *Xanthomonas* i *Pseudomonas*.
- Kao prouzrokovatelj bakterioznog raka koštičavih voćaka i badema identifikovana je bakterija *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (Pss).
- Karantinska vrsta *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* (Xap) po prvi put je identifikovana kao patogen breskve i trešnje na teritoriji Crne Gore.
- Prema intenzitetu pojave, Xap značajno ugrožava proizvodnju breskve u najznačajnijem proizvodnom području u Crnoj Gori.
- Među proučavanim sojevima Pss i Xap bilo je odstupanja u pogledu fenotipskih karakteristika.
- Rep-PCR metodom utvrđeno je prisustvo genetičkog diverziteta ili heterogenosti populacije proučavanih sojeva Pss, odnosno homogene strukture i niskog diverziteta proučavanih sojeva Xap.
- Primjenom MLST analize, izvedene umnožavanjem nukleotidne sekvence četiri konstitutivna gena: *gapA*, *gltA*, *gyrB* i *rpoD* također je potvrđeno postojanje genetskog diverziteta populacije 28 proučavanih sojeva Pss.
- Filogenetska analiza zasnovana na parcijalnim sekvencama *gyrB* gena pouzdana je metoda u identifikaciji sojeva Xap.
- *gyrB* gen ne predstavlja pogodan genetički marker za utvrđivanje filogenetskih odnosa među patovarima *pruni* i *juglandis*.
- Svi proučavani sojevi ispoljili su rezistentnost prema bakar-sulfatu što ukazuje na mogućnost razvoja smanjene osjetljivosti populacija Pss i Xap na jedinjenja bakra.
- Osjetljivost sojeva na antibiotik streptomycin-sulfat je očekivana, s obzirom da antibiotici nisu registrovani za primjenu u zaštiti bilja u Crnoj Gori.

8. LITERATURA

- Almeida, N. F., Yan, S., Cai, R., Clarke, C. R., Morris, C. E., Schaad, N. W., Schuenzel, E.L., Lacy, G.H., Sun, X., Jones, J.B., Castillo, J.A., Bull, C.T., Leman, S., Guttman, D.S., Setubal, J.C., Vinatzer, B.A. (2010). PAMDB, a multilocus sequence typing and analysis database and website for plant associated microbes. *Phytopathology*, 100(3), 208–215. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-100-3-0208>.
- 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(17), 3389–3402. <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>.
- Amanifar, N., Taghavi, M., Izadpanah, K., Babaei, G. (2014). Isolation and pathogenicity of *Xylella fastidiosa* from grapevine and almond in Iran. *Phytopathologia Mediterranea*, 53, 318–327. https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-12647.
- Anonymous (2013). Maladie des taches bactériennes des arbres fruitiers à noyau – *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*. Fiche Sud Arbo No. 4. Published by the Chambre d’Agriculture Languedoc-Roussillon, France, 4 pp.
- Arsenijević, M. (1968). *Pseudomonas syringae* van Hall (*P. morsprunorum* Wormald) kao parazit kajsije u Jugoslaviji. IV Međunarodni simpozijum za kajsiju Subotica, 8-13 jul. Technical Communications International Society for Horticultural Science, 11, 394–402.
- Arsenijević, M. (1976). Uloga bakterija u genezi „apopleksije“ kajsije. *Zaštita bilja*, 27 (3-4), 137-138, 237–244.
- Arsenijević, M., Balaž, J. (1978). Istraživanje prouzrokovala „apopleksije“ kajsije u Jugoslaviji. *Jugoslovensko voćarstvo*, 44-45, 17–24.
- Arsenijević, M. (1982). Parazit kajsije *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* van Hall i mogućnost suzbijanja. *Jugoslovensko voćarstvo*, 16(61-62), 43–50.
- Arsenijević, M. (1997). Bakterioze biljaka. S-Print, Novi Sad, (treće izmenjeno i dopunjeno izdanje).
- Balaž, J., Arsenijević, M., Vojvodić, Đ. (1988). Etiološka proučavanja bakterijske nekroze plodova i lišća višnje i mogućnost suzbijanja parazita. *Zaštita bilja*, 39(3), 185, 311–321.
- Balaž, J., Arsenijević, M. (1989). Further investigations on *Pseudomonas syringae* pathovar as pathogen of sour cherry fruits in Yugoslavia. 7th International Conference of Plant Pathogenic Bacteriology, Budapest, Hungary, Proceedings, pp. 515–520.
- Balaž, J., Ilić, R., Ognjanov, V., Ivanović, Ž., Popović, T. (2016). Etiology of bacterial canker on young sweet cherry trees in Serbia. *Journal of Plant Pathology*, 98(2), 285–294. <https://doi.org/10.4454/JPP.V98I2.020>.
- Balestra, G. M., Varvaro, L. (1997). Presenza di *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* su susino nell’Alto Lazio (*Prunus domestica* - *Prunus salicina*). *Informatore Fitopatologico*, 47, 55–57.

- Ballard, E. L., Dietzgen, R. G., Sly, L. I., Gouk, C., Horlock, C., Fegan, M. (2011). Development of a Bio-PCR protocol for the detection of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*. *Plant Disease*, 95(9), 1109–1115. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-10-0650>.
- Barionovi, D., Scortichini, M. (2008). Integron variability in *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* and *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* strains. *FEMS microbiology letters*, 288, 19–24. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01315.x>.
- Battilani, P., Rossi, V., Saccardi, A. (1999). Development of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* epidemics on peaches. *Journal of Plant Pathology*. 81, 161–171. <http://dx.doi.org/10.4454/jpp.v81i3.1072>.
- Bazzi, C., Mazzucchi, U. (1980). Epidemia di *Xanthomonas pruni* su susino. *Informatore - Fitopatologico* 30(5), 11–17.
- Bazzi, C., Stefani, E., Mazzucchi, U. (1990). Plum susceptibility to *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* in the Po Valley. *Proceedings of the 7th Conference on Plant Pathogenic Bacteria*, Budapest, Hungary, pp. 985–990.
- Bedford, K. E., Sholberg, P. L., Kappel, F. (2003). Use of a detached leaf bioassay for screening sweet cherry cultivars for bacterial canker resistance. *Acta Horticulturae*, 622, 365–368. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2003.622.37>.
- Berge, O., Monteil, C. L., Bartoli, C., Chandeysson, C., Guilbaud, C., Sands, D. C., Morris, C. E. (2014). A user's guide to a data base of the diversity of *Pseudomonas syringae* and its application to classifying strains in this phylogenetic complex. *PLoS One*, 9(9), e105547. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105547>.
- Bernadette, L., Caffier, D., Gardan, L. (1997). Informations sur une nouvelle bactériose des Prunus identifiée en France (*Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*). *Proceedings of the ANPP 5e Conférence Internationale sur les Maladies des Plantes*, Tours, France, pp. 579–584.
- Biondi E., Dallai D., Brunelli A., Bazzi C., Stefani E. (2009). Use of a bacterial antagonist for the biological control of bacterial leaf/fruit spot of stone fruits. *IOBC Bulletin*, 43, 277–281. <http://www.iobc-wprs.org/pub/bulletin>.
- Blaauw, B., Brannen, P., Bellinger, B., Lockwood, D., Ritchie, D. (2017). *Southeastern peach, nectarine and plum pest management and culture guide*. Athens, GA, University of Georgia.
- Boudon, S., Manceau, C., Nottéghem, J. L. (2005). Structure and origin of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* populations causing bacterial spot of stone fruit trees in Europe. *Phytopathology*, 95(9), 1081–1089. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-95-1081>.
- Brzezinski J. (1902). Etiologie du chancre et de la gomme des arbres fruitiers. *Comptes rendus de l'Académie des Sciences*, Paris 134, 1170–1173.
- Bühlmann, A., Pothier, J. F., Tomlinson, J. A., Frey, J. E., Boonham, N., Smits, T. H. M., Duffy, B. (2013). Genomics informed design of loop-mediated isothermal amplification for detection of phytopathogenic *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* at the intraspecific level. *Plant Pathology*, 62, 475–484. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2012.02654.x>.

Bull, C. T., De Boer, S. H., Denny, T. P., Firrao, G., Fischer-Le Saux, M., Saddler, G. S., Scortichini, M., Stead, D.E., Takikawa, Y. (2010). Comprehensive list of names of plant pathogenic bacteria, 1980-2007. *Journal of Plant Pathology*, 92, 551–592. <http://dx.doi.org/10.4454/jpp.v92i3.302>.

Bull, C. T., Clarke, C. R., Cai, R., Vinatzer, B. A., Jardini, T. M., Koike, S. T. (2011). Multilocus sequence typing of *Pseudomonas syringae sensu lato* confirms previously described genomospecies and permits rapid identification of *P. syringae* pv. *coriandricola* and *P. syringae* pv. *apii* causing bacterial leaf spot on parsley. *Phytopathology*, 101, 847–858. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-11-10-0318>.

Bull, C. T., De Boer, S. H., Denny, T. P., Firrao, G., Fischer-Le Saux, M., Saddler, G. S., Scortichini, M., Stead, D. E., Takikawa, Y. (2012). List of new names of plant pathogenic bacteria (2008-2010). *Journal of Plant Pathology*, 94, 21–27. <https://doi.org/10.4454/jpp.fa.2011.003>.

Bultreys, A., Kalużna, M. (2010). Bacterial cankers caused by *Pseudomonas syringae* on stone fruit species with special emphasis on the pathovars *syringae* and *morsprunorum* race 1 and race 2. *Journal of Plant Pathology*, 92, 21–33. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-11-10-0318>.

Burkowicz, A., Rudolph, K. (1994). Evaluation of pathogenicity and of cultural and biochemical tests for identification of *Pseudomonas syringae* pathovars *syringae*, *morsprunorum* and *persicae* from fruit trees. *Journal of Phytopathology*, 141(1), 59–76. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.1994.tb01446.x>.

Cambra, M. A. (2014). La mancha bacteriana de los frutales de hueso y del almendro. Available online at: <http://www.agrocistus.com/jornadas/2014>.

Camele, I., Lo Cantore, P., Lasco, R., Iacobellis, N. S. (2001). *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* su susino in Basilicata. *L'Informatore Agrario*, 27, 55–57.

Cameron, H. R. (1960). Death of dormant buds in sweet cherry. *Plant Disease Reporter*, 44 (2), 139–143.

Cameron, H. R. (1962). Disease of deciduous fruit trees incited by *Pseudomonas syringae* van Hall. *Technical Bulletin*, 66, 1–64.

Cavaliere, V., Dongiovanni, C., Tauro, D., Altamura, G., Di Carolo, M., Fumarola, G., Saponari, M., Bosco, D. (2018). Transmission of the CODIRO strain of *Xylella fastidiosa* by different insect species. *Proceedings of the XI European Congress of Entomology*, Naples, Italy, 2–6 July, pp. 144–145.

Chitambar, J. (2015). Pest rating proposals and final ratings: California pest Rating *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* (Smith) Vauterin, Hoste, Kersters and Swings. Available online at: <https://blogs.cdfa.ca.gov/Section3162/?p=1002>.

Ciccarone, A. (1958). Note sulla patologia del mandorlo con particolare riguardo alla Sicilia. *Tecnica Agricola*, 10, 371–408.

Civerolo E. L., Keil H. L. (1969). Inhibition of bacterial spot of peach foliage by *Xanthomonas pruni* bacteriophage. *Phytopathology*, 59, 1966–1967.

Civerolo, E. L. (1975). Quantitative aspects of pathogenesis of *Xanthomonas pruni* in peach leaves. *Phytopathology*, 65, 258–264.

Civerolo, E. L., Sasser, M., Helkie, C., Burbage, D. (1982). Selective medium for *Xanthomonas campestris* pv. *pruni*. *Plant Disease*, 66, 39–43.

Conn, H. J. (1942). Validity of the genus *Alcaligenes*. *Journal of Bacteriology*, 44, 353–60.

Cornara, D., Cavalieri, V., Dongiovanni, C., Altamura, G., Palmisano, F., Bosco, D., Porcelli, F., Almeida, R. P. P., Saponari, M. (2016). Transmission of *Xylella fastidiosa* by naturally infected *Philaenus spumarius* (Hemiptera, Aphrophoridae) to different host plants. *Journal of Applied Entomology*, 141, 80–87. <https://doi.org/10.1111/jen.12365>.

Costechareyre, D., Rhouma, A., Lavire, C., Portier, P., Chapulliot, D., Bertolla, F., Boubaker, A., Dessaux, Y., Nesme, X. (2010). Rapid and efficient identification of *Agrobacterium* species by recA allele analysis. *Microbial Ecology*, 60, 862–872. <https://doi.org/10.1007/s00248-010-9685-7>.

Crosse, J. E., Garrett, C. M. E. (1963). Studies on the bacteriophagy of *Pseudomonas morsprunorum*, *Pseudomonas syringae* and related organisms. *Journal of Applied Bacteriology*, 26(2), 159–177. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1963.tb04764.x>.

Crosse, J. E. (1966). Epidemiological relations of the *Pseudomonas* pathogens of deciduous fruit trees. *Annual Review of Phytopathology*, 4, 291–310. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.04.090166.001451>.

Cruaud, A., Gonzalez, A. A., Godefroid, M., Nidelet, S., Streito, J. C., Thuillier, J. M., Rossi, J. P., Santoni, S., Rasplus, J. Y. (2018). Using insects to detect, monitor and predict the distribution of *Xylella fastidiosa*: a case study in Corsica. *Scientific Reports*, 8(1), 15628. <http://dx.doi.org/10.1101/241513>.

Denancé, N., Legendre, B., Briand, M., Olivier, V., de Boisseson, C., Poliakoff, M., Jacques, A. (2017). Several subspecies and sequence types are associated with the emergence of *Xylella fastidiosa* in natural settings in France. *Plant Pathology*, 66, 1054–1064. <https://doi.org/10.1111/ppa.12695>.

Daranas, N, Roselló, G, Cabrefiga, J, Donati, I, Francés, J., Badosa, E., Spinelli, F., Montesinos, E., Bonaterra, A. (2019). Biological control of bacterial plant diseases with *Lactobacillus plantarum* strains selected for their broad-spectrum activity. *The Annals of applied biology*, 174(1), 92–105. <https://doi.org/10.1111/aab.12476>.

Davis, M. J., Purcell, A. H., Thompson, S. V. (1978). Pierce's disease of grapevines: isolation of the causal bacterium. *Science*, 199, 75–77. <https://doi.org/10.1126/science.199.4324.75>.

Davis, M., Thomson, S., Purcell, A. (1980). Etiological role of a xylem-limited bacterium causing Pierce's disease in almond leaf scorch. *Phytopathology*, 70, 472–475. <https://doi.org/10.1094/phyto-70-472>.

Dhavantari, B. N. (1973). Population dynamics of *Xanthomonas pruni* on peach bud and leaf surface and its relation to other microflora. Abstract. 0812. In: Proceedings of the 2nd International Congress on Plant Pathology, Minneapolis, MN, USA, Abstract 0812.

Dhanvantari, B. N., Dirks, V. A., Brown, R. J. (1978). Effectiveness of antibiotics for control of bacterial spot of peach in southwestern Ontario. *Canadian journal of plant science*, 58(4), 953–959. <http://dx.doi.org/10.4141/cjps78-147>.

Dirlwanger, E., Claverie, J., Wünsch, A., Iezzoni, A. F. (2007). 3. Cherry. In: Kole, C. (ed.) *Fruits and nuts (Genome mapping and molecular breeding in plants 4)*. Springer, Berlin, pp. 103–118.

Donmez, M. F., Karlidag, H., Esitken, A. (2010). Identification of resistance to bacterial canker (*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*) disease on apricot genotypes grown in Turkey. *European Journal of Plant Pathology*, 126(2), 241–247. <https://doi.org/10.1007/s10658-009-9536-x>.

Dunegan, J. C. (1932). The bacterial spot of peach and other stone fruits. United States Department of agriculture, Technical bulletin 273, 53.

Du Plessis, H. J. (1987). Canker development on plum shoots following systemic movement of *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* from inoculated leaves. *Plant Disease*, 71, 1078–1080. <https://doi.org/10.1094/PD-71-1078>.

Du Plessis, H. J. (1988). Bacterial spot disease of stone fruits: overview of findings. *Deciduous Fruit Grower*, 38, 128–132.

Dye, DW., Lelliott, R. A. (1974). Genus II. *Xanthomonas*. In: Buchanan, R.E., Gibbons, N.E. (eds.). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed. Baltimore, MD: Williams and Wilkins, pp. 243–249.

Dye, D. W., Bradbury, J. F., Goto, M., Hayward, A. C., Lelliott, R. A., Schroth, M. N. (1980). International standards for naming pathovars of phytopathogenic bacteria and a list of pathovar names and pathotypes. *Review of Plant Pathology*, 59, 153–168.

EFSA PLH Panel (EFSA Panel on Plant Health) (2014). Scientific opinion on pest categorisation of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* (Smith, 1903). *EFSA Journal*, 12(10), 3857. <https://doi.org/10.2093/j.efsa.2014.3857>.

EFSA (2018a). Scientific report on the update of the *Xylella* spp. host plant database. *EFSA Journal*, 16(9), 5408. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5408>.

EPPO/CABI (1997). *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*. In: *Quarantine Pests for Europe*, 2nd edn, CAB International, Wallingford (GB), pp. 1096–1100.

EPPO Standards PM 7/64 (1) (2006). *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*. Diagnostic protocols for regulated pests. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 36, 129–133.

EPPO Standards PM 7/43(1) (2005). *Pseudomonas syringae* pv. *persicae*. Diagnostic protocols for regulated pests. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 35, 285–287.

EPPO Standards PM 7/24 (4) *Xylella fastidiosa*. EPPO Bulletin, 49, 175–227. <https://doi.org/10.1111/epp.12575>.

EPPO-PQR (Plant Quarantine Data Retrieval system). www.eppo.int/DATABASES/pqr/pqr.htm

Ercolani, G. L. (1970). Individuazione di *Xanthomonas pruni* (E.F. Smith) Dowson quale agente della maculatura batterica del susino in Emilia. *Phytopathologia Mediterranea*, 9, 62–64.

EUROPHYT, online. The European network of plant health information system. https://ec.europa.eu/food/plant/plant_health_biosecurity/europhyt (Accessed: March 2019).

Fahy, P. C., Persley, G. J. (1983). *Plant Bacterial Diseases. A Diagnostic Guide*. Academic Press, New York (US).

FAOSTAT (Food and Agriculture Organization of the United Nations) (2018). Statistics Division of the Food and Agriculture Organization of the United Nations. Available online: <http://faostat.fao.org>. (Accessed: April, 2020).

Faust, M., Timon, B., Surányi, D., Nyujtó, F., Gradziel, T. M. (2011). Origin and dissemination of *Prunus* crops: peach, cherry, apricot, plum and almond. International Society for Horticultural Science (ISHS), Leuven, Belgium.

Fischer-Le Saux, M., Bonneau, S., Essakhi, S., Manceau, C., Jacques, M. A. (2015). Aggressive emerging pathovars of *Xanthomonas arboricola* represent widespread epidemic clones distinct from poorly pathogenic strains, as revealed by multilocus sequence typing. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(14), 4651–4668. <https://doi.org/10.1128/AEM.00050-15>.

Flint, M. L. (2002). *Integrated Pest Management for Almonds*. 2nd Ed. University of California, Statewide Integrated Pest Management Project, Division of Agriculture and Natural Resources, Oakland, CA, USA.

Freigoun, S. O., Crosse, J. E. (1975). Host relation and distribution of a physiological and pathological variant of *Pseudomonas morsprunorum*. *Annals of Applied Biology*, 81(3), 317–330. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1975.tb01647.x>.

Garcin, A. (2000). Maladie des taches bactériennes des arbres à noyau. Un nouveau pathogène en France. *Infos CTIFL*, 165, 45–47.

Garcin, A., Rouzet, J., Notteghem, J. L. (2005). *Xanthomonas* des arbres fruitiers à noyau. Edition CTFL, Paris, France, 95 pp.

Garcin, A., Bresson, J. (2009). Sensibilité des arbres à noyau au *Xanthomonas* - Bilan de 8 ans d'expérimentation. *Infos CTIFL*, 254, 30–35.

- Garcin, A., Vibert, J., Cellier, M. (2011b). *Xanthomonas* sur pêcher: Études des conditions d'infection. Fonctionnement du modèle et résultats d'essais. Infos CTIFL, 272, 30–39.
- Garita-Cambronero, J., Palacio-Bielsa, A., Cubero, J. (2018). *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*, causal agent of bacterial spot of stone fruits and almond: its genomic and phenotypic characteristics in the *X. arboricola* species context. *Molecular Plant Pathology*, 19(9): 2053–2065. <https://doi.org/10.1111/mpp.12679>.
- Gardan, L., Shafik, H., Belouin, S., Broch, R., Grimont, F., Grimont, P. A. D. (1999). DNA relatedness among the pathovars of *Pseudomonas syringae* and description of *Pseudomonas tremae* sp. nov. and *Pseudomonas cannabina* sp. nov. (ex Sutic and Dowson 1959). *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49, 469–478. <https://doi.org/10.1099/00207713-49-2-469>.
- Garrett, C. M. E., Panagopoulus, C. G., Crosse, J. E. (1966). Comparison of plant pathogenic *Pseudomonads* from fruit tree. *Journal of Applied Bacteriology*, 29(2), 342–356. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1966.tb03483.x>.
- Garrett, C. M. E. (1987). The effect of crown gall on growth of cherry trees. *Plant Pathology*, 36(3), 339–345. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1987.tb02241.x>.
- Garrity, G. M., Bell, J. A., Liburn, T. G. (2004). Taxonomic Outline of the Procaryotes. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd Edition. Springer – Verlag, New York, pp. 1–399.
- Gasperini, C., Bazzi, C. Mazzucchi, U. (1984). Autumn inoculation of *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* through leaf scars in plum trees in the Po valley. *Phytopathologia Mediterranea*, 23(1), 60–62. <http://www.jstor.org/stable/42684686>.
- Gašić, K., Obradović, A. (2009). Primena REP-PCR i nekih klasičnih metoda u detekciji *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*. *Zaštita bilja* 60(1), 19–36.
- Gašić, K., Prokić, A., Ivanović, M., Kuzmanović, N., Obradović, A. (2012). Differentiation of *Pseudomonas syringae* pathovars originating from stone fruits. *Journal of Pesticides and Phytomedicine*, 27(3), 219–229. <https://doi.org/10.2298/PIF1203219G>.
- Gavrilović, V., Milijašević, S. (2004). Etiological study of cherry and plum bud necrosis. *Book of Abstracts V Kongres on Plant Protection, Zlatibor, Serbia*, p. 144.
- Gavrilović, V., Milijašević, S. Arsenijević, M. (2005). Bakteriozno sušenje pupoljaka trešnje. *Biljni lekar*, 33(4), 418–421.
- Gavrilović, V. (2006). Patogene i biohemijsko fiziološke karakteristike bakterija roda *Pseudomonas* parazita voćaka, *Zaštita bilja*, 57(1-4), 255-258, 5–55.
- Gavrilović, V., Ivanović, Ž., Živković, S., Milijašević, S. (2009). Characteristics of *Pseudomonas syringae* strains isolated from necrotic peach buds in Serbia. *7th International Peach Symposium, Leiida, Spain, Abstracts Book*, p. 92.
- Gavrilović, V. (2009). *Pseudomonas syringae* – patogen voćaka u Srbiji. *Pesticidi i fitomedicina*, 24(3), 153–163.

- Gilbert, V., Legros, F., Maraite, H., Bultreys, A. (2009). Genetic analyses of *Pseudomonas syringae* isolates from Belgian fruit orchards reveal genetic variability and isolate-host relationships within the pathovar *syringae*, and help identify both races of the pathovar *morsprunorum*. *European Journal of Plant Pathology*, 124, 199–218. <https://doi.org/10.1007/s10658-008-9406-y>.
- Giovanardi, D., Dallai, D., Stefani, E. (2016). Population features of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* from *Prunus* spp. orchards in northern Italy. *European Journal of Plant Pathology*, 147, 761–771. <https://doi.org/10.1007/s10658-016-1040-5>.
- Giovanardi, D., Ferrante P., Scortichini M., Stefani E. (2018). Characterisation of *Pseudomonas syringae* isolates from apricot orchards in north-eastern Italy. *European Journal of Plant Pathology*, 151, 901–917. <https://doi.org/10.1007/s10658-018-1424-9>.
- Gomila, M., Busquets, A., Mulet, M., García-Valdés, E., Lalucat, J. (2017). Clarification of taxonomic status within the *Pseudomonas syringae* species group based on a phylogenomic analysis. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2422. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02422>.
- Gormez, A., Sahin, F., Gulluce, M., Aslan, I. (2013). Identification and characterization of *Pseudomonas syringae* isolated from apricot trees in the Erzurum province of Turkey and evaluation of cultivar reaction. *Journal of Plant Pathology*, 95(3), 525–532. <https://doi.org/10.4454/JPP.V95I3.016>.
- Goodman, C. A., Hattingh, M. J. (1986). Transmission of *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* in plum and apricot nursery trees by budding. *HortScience*, 21(4), 995–996.
- Goodman, C.A., Hattingh, M. J. (1988). Mechanical transmission of *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* in plum nursery trees. *Plant Disease*, 72, 643. <https://doi.org/10.1094/PD-72-0643>.
- Guldur, M. E., Caglar, B. K., Castellano, M. A., Ulnu, L., Guran, S., Yilmaz, M. A., Martelli, G. P. (2005). First report of almond leaf scorch in Turkey. *Journal of Plant Pathology*, 87, 246. <https://www.jstor.org/stable/41998253>.
- Gutiérrez-Barranquero, J. A., Cazorla, F. M., de Vicente, A. (2019). *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* associated with mango trees, a particular pathogen within the "hodgepodge" of the *Pseudomonas syringae* complex. *Frontiers in Plant Science*, 10, 570. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00570>.
- Haas, J. H., Moore, L. W., Ream, W. (1995). Universal PCR primers for detection of phytopathogenic *Agrobacterium* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 61 (8), 2879–2884. <https://doi.org/10.1128/AEM.61.8.2879-2884>.
- Hajri, A., Pothier J., Fischer-Le Saux, M., Bonneau, S., Poussier, S., Boureau, T., Duffy, B., Manceau, C. (2012). Type three effector gene distribution and sequence analysis provide new insights into the pathogenicity of plant-pathogenic *Xanthomonas arboricola*. *Applied and environmental microbiology*, 78(2), 371–384. <https://doi.org/10.1128/AEM.06119-11>.
- Hattingh, M. J. (1988). Effect of plum and apricot bud origin, time cut and time budded on development of bacterial spot of stone fruit. *Phytophylactica*, 20, 133–134. https://hdl.handle.net/10520/AJA03701263_1574.

- Hattingh, M. J., Roos, I. M. M. (1995). Bacterial canker. In: Ogawa, J.M., El Zehr, G.W., Bird, D.F., Ritchie, K., Uriu, J., Uyemoto, K. [eds.] Compendium of Stone Fruit Diseases, APS Press, St Paul, USA.
- Hayward, A. C. (1993). The host of *Xanthomonas*. In: Swings, J.G., Civerolo, E. L. (eds.) *Xanthomonas* Chapman and Hall, London, United Kingdom, pp. 51–54.
- Hedrick, U. P. (1911). The Plums of New York. pp 844 J. B. Lyon Co., State Printers, Albany, USA.
- Hinrichs-Berger, J. (2004). Epidemiology of *Pseudomonas syringae* pathovars associated with decline of plum trees in the southwest of Germany. *Journal of Phytopathology*, 152, 153–160. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2004.00816.x>.
- Holtz, B., Doll, D., Duncan, R., Edstrom, J., Michailides, T., Adaskaveg, J. (2013). Bacterial spot on almond found in the San Joaquin Valley. Available at: <http://ipm.ucanr.edu/PDF/MISC/168605.pdf>. (Accessed: March, 2020).
- Holubowicz, T., Ugolik, M., Weber, Z. (1988). Effect of crown gall on the growth and yield of cherry trees. In: Lipecki J. (ed.) *Proceedings of International Symposium on Intensification of Production of cherries and plum*, Lublin, pp. 97–103 (in Polish).
- Hulin, M. T., Mansfield, J. W., Brain, P., Xu X., Jackson, R. W., Harrison, R. J. (2018). Characterization of the pathogenicity of strains of *Pseudomonas syringae* towards cherry and plum. *Plant Pathology*, 67, 1177–1193. <https://doi.org/10.1111/ppa.12834>.
- Hwang, M. S., Morgan, R. L., Sarkar, S. F., Wang, P. W., Guttman, D. S. (2005). Phylogenetic characterization of virulence and resistance phenotypes of *Pseudomonas syringae*. *Applied and environmental microbiology*, 71, 5182–5191. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.5182-5191>.
- Ivanova, L. (2009). First occurrence of apricot blast disease caused by *Pseudomonas syringae* in the north-eastern part of Bulgaria. *Acta Horticulturae*, 825, 149–152. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2009.825.20>.
- Ivanović, Ž., Živković, S., Starović, M., Jošić, D., Stanković, S., Gavrilović, V. (2009). Diversity among *Pseudomonas syringae* strains originating from fruit trees in Serbia. *Archives of Biological Sciences* 61(4), 863–870. <https://doi.org/10.2298/ABS0904863I>.
- Ivanović, Ž., Stanković, S., Živković, S., Gavrilović, V., Kojić, M., Fira, Đ. (2012). Molecular characterization of *Pseudomonas syringae* isolates from fruit trees and raspberry in Serbia. *European Journal of Plant Pathology*, 134, 191–203. <https://doi.org/10.1007/s10658-012-9978-4>.
- Jacques, M. A., Arlat, M., Boulanger, A., Boureau, T., Carrere, S., Cesbron, S., Chen, N. W., Cociancich, S., Darrasse, A., Denancé, N., Fischer-Le Saux, M., Gagnevin, L., Koebnik, R., Lauber, E., Noël, L. D., Pieretti, I., Portier, P., Pruvost, O., Rieux, A., Robène, I., Royer, M., Szurek, B., Verdier, V., Vernière, C. (2016). Using ecology, physiology, and genomics to understand host specificity in *Xanthomonas*. *Annual review of phytopathology*, 54, 163–187. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080615-100147>.
- Janick, J. (2005). The origins of fruits, fruit growing, and fruit breeding. *Plant Breeding Reviews* 25, 255–321. <https://doi.org/10.1002/9780470650301.ch8>.

- Janse, J. D., Rossi, M. P., Gorkink, R. F. J., Derks, J. H. J., Swings, J., Janssens, D., Scortichini, M. (2001). Bacterial leaf blight of strawberry (*Fragaria (x) ananassa*) caused by a pathovar of *Xanthomonas arboricola*, not similar to *Xanthomonas fragariae* Kennedy & King. Description of the causal organism as *Xanthomonas arboricola* pv. *fragariae* (pv. nov., comb. nov.). *Plant Pathology*, 50, 653–665. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2001.00644.x>.
- Janse, J., Obradovic, A. (2010). *Xylella fastidiosa*: its biology, diagnosis, control and risks. *Journal of Plant Pathology*, 92, 35–48. <http://dx.doi.org/10.4454/jpp.v92i1sup.2504>.
- Jones, A. L. (1971). Bacterial canker of sweet cherry in Michigan. *Plant Disease Reporter*, 55(11), 961–965.
- Jones, J. B., Jackson, L. E., Balogh, B., Obradovic, A., Iriarte, F. B., Momol, M. T. (2007). Bacteriophages for plant disease control. *Annual review of phytopathology*, 45(1), 245–262. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.45.062806.094411>.
- Kałużna, M., Sobiczewski, P. (2009). Virulence of *Pseudomonas syringae* pathovars and races originating from stone fruit trees. *Phytopathologia*, 54, 71–74.
- Kałużna, M., Ferrante, P., Sobiczewski, P., Scortichini, M. (2010). Characterization and genetic diversity of *Pseudomonas syringae* isolates from stone fruits and hazelnut using repetitive-PCR and MLST. *Journal of Plant Pathology*, 92, 781–787. <http://dx.doi.org/10.4454/jpp.v92i3.327>.
- Kałużna, M., Puławska, J., Meszka, B. (2013):. A new bacterial disease on blueberry (*Vaccinium Corymbosum*) caused by *Pseudomonas* spp. *Journal of Plant Protection Research*, 53, 32–36. <https://doi.org/10.2478/jppr-2013-0004>.
- Kałużna, M., Pulawskaa , J., Waleronb, M., Sobiczewska, P. (2014). The genetic characterization of *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*, the causal agent of walnut blight in Poland. *Plant Pathology*, 63, 1404–1416. <https://doi.org/10.1111/ppa.12211>.
- Kałużna, M., Willems, A., Pothier, J. F., Ruinelli, M., Sobiczewski, P., Puławska, J. (2016). *Pseudomonas cerasi* sp. nov. (non Griffin, 1911) isolated from diseased tissue of cherry. *Systematic and applied microbiology*, 39(6), 370–377. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2016.05.005>.
- Kałużna, M. (2019). Characterization and phylogeny of the novel taxon of *Pseudomonas* spp., closely related to *Pseudomonas avellanae* as causal agent of a bacterial leaf blight of cornelian cherry (*Cornus mas* L.) and *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* as a new bacterial pathogen of red dogwood (*Cornus sanguinea* L.). *Journal of Plant Pathology*, 101, 251–261. <https://doi.org/10.1007/s42161-018-0189-5>.
- Kantoci, D. (2008). Koštičavo voće. Pregledni rad. *Glasnik zaštite bilja* 5, 6-13.
- Kamiunten, H., Nakao, T., Oshida, S. (2000). *Pseudomonas syringae* pv. *cerasicola*, pv. nov., the causal agent of bacterial gall of cherry tree. *Journal of General Plant Pathology*, 66(3), 219–224. <https://doi.org/10.1007/PL00012949>.
- Karimi-Kurdistani, G., Harighi, B. (2008). Phenotypic and molecular properties of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* the causal agent of bacterial canker of stone fruit trees in Kurdistan province. *Journal of Plant Pathology*, 90, 81–86. <http://www.jstor.org/stable/41998462>.

- Kawaguchi, A. (2012). Genetic diversity and dominant species of bacterial pathogen isolated from peach showed diseased symptoms of bacterial shot hole in Okayama Prefecture, Japan (in Japanese). Annual Report of the Kansai Plant Protection Society, 54, 105–107. <https://doi.org/10.4165/kapps.54.105>.
- Kawaguchi, A., Inoue, K., Inoue, Y. (2014). Biological control of bacterial spot on peach by non pathogenic *Xanthomonas campestris* strains AZ98101 and AZ98106. Journal of General Plant Pathology, 80, 158–163. <https://doi.org/10.1007/s10327-014-0506-6>.
- Kawaguchi, A. (2014). Genetic diversity of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* strains in Japan revealed by DNA fingerprinting. Journal of General Plant Pathology, 80, 366–369. <https://doi.org/10.1007/s10327-014-0522-6>.
- Kennelly, M. K., Cazorla, F. M., de Vicente, A., Ramos, C., Sundin, G. W. (2007). *Pseudomonas syringae* disease of fruit trees. Progress toward understanding and control. Plant Disease, 91, 4–17. <https://doi.org/10.1094/PD-91-0004>.
- Keserović, Z., Ognjanov, V., Vračević, B., Magazin, N. (2010). Stanje i perspektiva proizvodnje kajsije i šljive u Srbiji. Biljni lekar, 38(4-5), 263–271.
- Keserović, Z., Magazin, N., Milić, B., Dorić, M. (2016). Voćarstvo i vinogradarstvo: (deo Voćarstvo). Poljoprivredni fakultet, Novi Sad. Edicija Osnovni udžbenik.
- Khodaygan, P., Sedaghati, E., Hoseinipoor, A., Baghaei Ravari, S. (2012). Study on canker disease of stone fruits and antibacterial effects of some plant essentials on its causal agent in Kerman province. Iranian Journal of Plant Pathology, 48(3), 303–317.
- 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 (2), 301–307.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. Journal of Molecular Evolution, 16, 111–120. <https://doi.org/10.1007/BF01731581>.
- Klement, Z., Rudolf, K., Sands, D. C. (1990). Methods in Phytobacteriology. Akadémiai Kiadó, Budapest.
- Kotan, R., Sahin, F. (2002). First record of bacterial canker caused by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, on apricot trees in Turkey. Plant Pathology, 51, 798. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2002.00768.x>.
- Krimi, Z., Petit, A., Mougél, C., Dessaux, Y., Nesme, X. (2002). Seasonal fluctuations and long-term persistence of pathogenic populations of *Agrobacterium* spp. in soils. Applied and Environmental Microbiology, 68(7), 3358–3365. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.7.3358-3365.2002>.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K. (2018).: MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. Molecular Biology and Evolution, 35, 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>.
- Kuzmanović, N., Pulawska, J., Prokić, A., Ivanović, M., Zlatković, N., Jones, J. B., Obradović, A. (2015). *Agrobacterium arsenijevicei* sp. nov., isolated from crown gall tumors on raspberry and

cherry plum. *Systematic and Applied Microbiology*, 38, 373–378. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2015.06.001>.

Lalancette, N., McFarland, K. (2007). Phytotoxicity of copper-based bactericides to peach and nectarine. *Plant Disease*, 91(9), 1122–1130. <https://doi.org/10.1094/PDIS-91-9-1122>.

Lamichhane, J. R. (2014). *Xanthomonas arboricola* disease of stone fruit, almond and walnut trees: Progress toward understanding and management. *Plant Disease*, 98(12), 1600–1610. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-14-0831-FE>.

Latorre, B. A., Jones, A. L. (1979). *Pseudomonas morsprunorum*, the cause of bacterial canker of sour cherry in Michigan and its epiphytic association with *P. syringae*. *Phytopathology*, 69, 335–339. <https://doi.org/10.1094/Phyto-69-335>.

Lelliott, R. A., Billing, E., Hayward, A. C. (1966). A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic *Pseudomonads*. *Journal of Applied Bacteriology*, 29, 470–489. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1966.tb03499.x>.

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.

Li, W., Lee, S. Y., Back, C. G., Ten, L. N., Jung, H. Y. (2019). Loop-Mediated isothermal amplification for the detection of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* in peaches. *The Plant Pathology Journal*, 35(6), 635–643. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.07.2019.0197>.

Lin, P., Shi, L. (1990). The discovery and distribution of Ili wild *Prunus domestica* (*P. communis* Fritsch) in Xinjiang, pp. 282–286. *Proceedings of International Symposium on Horticultural Germplasm, Cultivated and Wild*. Chinese Society for Horticultural Science, Beijing, pp. 282–286.

López, M. M., Rosellò, M., Palacio-Bielsa, A. (2010). Diagnosis and detection of the main bacterial pathogens of stone fruit and almond. *Journal of Plant Pathology*, 92(1, Supplement), 57–66.

López, M. M., López -Soriano, P., Garita-Cambronero, J., Beltrán, C., Taghouti, G., Portier, P., Cubero, J., Fischer-Le Saux, M., Marco-Noales, E. (2018). *Xanthomonas prunicola* sp. nov., a novel pathogen that affects nectarine (*Prunus persica* var. *nectarina*) trees. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68(6), 1857–1866. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002743>.

Louws, F. J., Bell, J., Medina-Mora, eM., Smart, C. D., Opgenorth, D., Ishimaru, C. A., Hausbeck, M. K., De Bruijll, F. J., Fulbright, D. W (1998). Rep-PCR-mediated genomic fingerprinting: A rapid and effective method to identify *Clavibacter michiganensis*. *Phytopathology*, 88, 862–868.

Mansvelt, L. E., Hattingh, M. J. (1986). Pear blossom blast in South Africa caused by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Plant Pathology*, 35, 337–343. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1986.tb02024.x>.

Marceletti, S., Scortichini, M. (2016). Genome-wide comparison and taxonomic relatedness of multiple *Xylella fastidiosa* strains reveal the occurrence of three subspecies and a new *Xylella species*. *Archives of Microbiology*, 198, 803–812. <https://doi.org/10.1007/s00203-016-1245-1>.

- Marchi, G., Cinelli, T., Surico, G. (2011). Bacterial leaf spot caused by the quarantine pathogen *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* on cherry laurel in Central Italy. *Plant Disease*, 95(1), 74–74. <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-10-0529>.
- Matthee, F. N., Daines, R. H. (1968). Effects of soil types and substrate aeration on stomatal activity, water diffusion pressure deficit, water congestion, and bacterial infection of peach and pepper foliage. *Phytopathology*, 58, 1298–1301.
- McManus, P. S., Stockwell, V. O., Sundin, G. W., Jones, A. L. (2002). Antibiotic use in plant agriculture. *Annual Review of Phytopathology*, 40, 443–465. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.40.120301.093927>.
- Ménard, M., Sutra, L., Luisetti, J., Prunier, J. P., Gardan, L. (2003). *Pseudomonas syringae* pv. *avii* (pv. Nov.), the causal agent of bacterial canker of wild cherries (*Prunus avium*) in France. *European Journal of Plant Pathology*, 109(6), 565–576. <https://doi.org/10.1023/A:1024786201793>.
- Mijušković, M. (1999). Bolesti i štetočine subtropskih voćaka. Univerzitet Crne Gore, Biotehnički institut – Podgorica.
- Mohammadi, M., Ghasemi, A., Rahimian, H. (2001). Phenotypic characterization of Iranian strains of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* van Hall, the causal agent of bacterial canker disease of stone fruits trees. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 3(1), 51–65. <http://jast.modares.ac.ir/article-23-6870-en.html>.
- MONSTAT (2019). Statistički godišnjak Crne Gore 2019, Poglavlje 11: Poljoprivreda. <http://monstat.org/userfiles/file/publikacije/godisnjak%202019/11.pdf> (Pristupljeno: Mart, 2020).
- Moore, L. W. (1988). *Pseudomonas syringae*: disease and ice nucleation activity. *Ornamentals Northwest Newsletter*, 12, 4–16.
- Moragrega, C., Llorente, I., Manceau, C., Montesinos, E. (2003). Susceptibility of European pear cultivars to *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* using immature fruit and detached leaf assays. *European Journal of Plant Pathology*, 109, 319–326. <https://doi.org/10.1023/A:1023574219069>.
- Morales, G., Llorente, I., Montesinos, E., Moragrega, C. (2017). A model for predicting *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* growth as a function of temperature. *PLoS One*, 12(5), e0177583. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177583>.
- Morales, G., Moragrega, C., Montesinos, E., Llorente, I. (2018). Effects of leaf wetness duration and temperature on infection of *Prunus* by *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*. *PloS one*, 13(3), e0193813. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193813>.
- Mousavi, S. A., Willems, A., Nesme, X., de Lajudie, P., Lindstrom, K. (2015). Revised phylogeny of *Rhizobiaceae*: proposal of the delineation of *Pararhizobium* gen. nov., and 13 new species combinations. *Systematic and Applied Microbiology*, 38(2), 84–90. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2014.12.003>.
- Mulet, M., Lalucat, J., García-Valdés, E. (2010). DNA sequence-based analysis of the *Pseudomonas* species. *Environmental microbiology*, 12(6), 1513–1530. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02181>.

- Obradović, A., Gavrilović, V., Ivanović, M., Gašić, K. (2008). *Pseudomonas* blight of raspberry in Serbia. In: Fatmi, B., Collmer, A., Iacobellis, N.S., Mansfield, J.W, Murill, J., Schaad, N.W. , Ullrich, M. (eds.) *Pseudomonas syringae* Pathovars and Related Pathogens Springer Science + Business Media, New York, Berlin, USA, Germany. pp. 413–417. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6901-7_41.
- Obradović, A., Kuzmanović, N., Čalić, A., Gašić, K., Ivanović, M. (2010). Bakterioze i fitoplazmoze koštičavih voćaka. *Biljni lekar*, 38(4-5), 323–338.
- Odalović, A., Prenkić, R. (2010). Bio-tehnološke karakteristike introdukovanih sorti kajsije u rejonu Podgorice, *Agroznanje* 11(4), 85–91.
- Odalović, P., Prenkić, R. (2011). Tehnološke i organoleptičke osobine ploda introdukovanih sorti trešnje u rejonu Podgorice. 7th Research/Expert Conference with International Participations "QUALITY 2011", Neum, B&H, 701–705.
- Olmo, D., Nieto, A., Adrover, F., Urbano, A., Beidas, O., Juan, A., Marco-Noales, E., López, M. M., Navarro, I., Monterde, A., Montes-Borrego, M., Navas-Cortes, J. A., Landa, B. B. (2017). First detection of *Xylella fastidiosa* infecting cherry (*Prunus avium*) and *Polygala myrtifolia* plants, in Mallorca Island, Spain. *Plant Disease*, 101, 1820. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-17-0590-PDN>.
- Palacio-Bielsa, A., Roselló, M., Cambra, M. A., López, M. M. (2010). First report on almond in Europe of bacterial spot disease of stone fruits caused by *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*. *Plant Disease*, 94(6), 786–786. <https://doi.org/10.1094/PDIS-94-6-0786B>.
- Palacio-Bielsa, A., Cubero, J., Cambra, M., Collados, R., Berruete, I., López, M. (2011). Development of an efficient real-time quantitative PCR protocol for detection of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* in *Prunus* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 77 (1), 89–97. <https://doi.org/10.1128/AEM.01593-10>.
- Palacio-Bielsa, A., Pothier, J., Roselló Pérez , M., Duffy, B., López, M. (2012). Detection and identification methods and new tests as developed and used in the framework of Cost 873 for bacteria pathogenic to stone fruits and nuts. *Journal of Plant Pathology*, 94, 135–146. <https://doi.org/10.4454/jpp.v94i1sup.021>.
- Palacio-Bielsa, A., Cambra, M. A., Cubero, J., Garita-Cambronero, J., Roselló, M., López, M. M. (2014). La mancha bacteriana de los frutales de hueso y del almendro (*Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*), una grave enfermedad emergente en España. *Phytoma España*, 259, 36–42.
- Palacio-Bielsa, A., López-Soriano, P., Bühlmann, A., van Doorn, J., Pham, K., Cambra, M. A., Berruete, I. M., Pothier, J. F., Duffy, B., Olmos, A. and López, M. M. (2015). Evaluation of a real-time PCR and a loop-mediated isothermal amplification for detection of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* in plant tissue samples. *Journal of microbiological methods*, 112, 36–39. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2015.03.005>.
- Palacio-Bielsa, A., Berruete, I. M., López, MM., Peñalver, J., Morente, C., Cubero, J., Garita-Cambronero, J., Sabuquillo, P., Redondo, C., Mitidieri, M., Bauer Gomes, C., Ueno, B., Suita de Castro, L. A., Leoni, C., Silvera, E. (2015). La mancha bacteriana de los frutales de hueso y del almendro (*Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*) en España y Sudamérica. *Phytoma España*, La revista profesional de sanidad vegetal, 271, 21–28.

Pagani, M. C. (2004). An ABC transporter protein and molecular diagnosis of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* causing bacterial spot of stone fruits. Ph.D. thesis. North Carolina State University, Raleigh, NC, USA.

Panić, M., Jovanovic, O., Antonijević, D., Miladinović, Z. (1998). The first appearance of bacterial plant pathogen *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* in Yugoslavia. *Zastita bilja*, 49, 285–294.

Parkinson, N., Aritua, V., Heeney, J., Cowie, C., Bew, J., Stead, D. (2007). Phylogenetic analysis of *Xanthomonas* species by comparison of partial gyrase B gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57, 2881–2887. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65220-0>.

Parkinson, N., Cowie, C., Heeney, J., Stead, D. (2009). Phylogenetic structure of *Xanthomonas* determined by comparison of *gyrB* sequences. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 59, 264–274. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65825-0>.

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. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2010.02366.x>.

Park, S. Y., Lee, Y. S., Koh, Y. J., Hur, J. S., Jung, J. S. (2010). Detection of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* by PCR using primers based on DNA sequences related to the *hrp* genes. *The Journal of Microbiology*, 48, 554–558. <https://doi.org/10.1007/s12275-010-0072-3>.

Pierce, N. B. (1892). The California vine disease. U. S. Department of Agriculture. Division of Vegetable Pathology. Bulletin No. 2.

Pinheiro, L., Pereira, C., Frazão, C., Balcão, V. M., Almeida, A. (2019). Efficiency of phage $\phi 6$ for biocontrol of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*: An in vitro preliminary study. *Microorganisms*, 7(9), 286. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7090286>.

Poplawsky, A. R., Urban, S. C., Chun, W. (2000). Biological role of xanthomonadin pigments in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Applied Environmental Microbiology*, 66 (12), 5123–5127. <https://doi.org/10.1128/aem.66.12.5123-5127.2000>.

Popović, T., Menković, J., Prokić, A., Obradović, A. (2020). First report of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* causing leaf spot and twig necrosis on peach (*Prunus persica*) in Montenegro. *Plant Disease*, 104(2), 560. <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-19-1422-PDN>.

Popović, T., Obradović, A. (2019). Pregled proučavanja bakterioza biljaka u Crnoj Gori. *Biljni lekar*, 47(4), 256–268.

Pothier, J. F., Pelludat, C., Bünter, M., Genini, M., Vogelsanger, J., Duffy, B. (2010). First report of the quarantine pathogen *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* on apricot and plum in Switzerland. *Plant Pathology*, 59, 404–404. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2009.02247.x>.

Pagani, M. C., Pelludat, C., Ritchie, D.F., Duffy, B. (2011). A duplex-PCR method for species and pathovar level identification and detection of the quarantine plant pathogen *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*. *Journal of Microbiological Methods*, 86(1), 16–24. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.03.019>.

- Prenkić, R., Odalović, A., Radulović, M., Popović, R., Čizmović, M. (2009). Revitalizacija voćarstva u Crnoj Gori. *Voćarstvo*, 43, 167/168, 121–129.
- Prenkić, R., Odalović, A., Radunović, M. (2011). Rodni potencijal i produktivnost introdukovanih sorti breskve rane epohe sazrijevanja. *Agroznanje*, 12(4), 405–412.
- Prenkić, R., Odalović, A. (2012). Kvalitet ploda sorti trešnje gajenih u podgoričkom regionu. *Agroznanje*, 13(3), 389–395.
- Prenkić, R., Odalović, A., Šebek, G., Radunović, M. (2016). The influence of time and fruitlet interspace thinning on yield and fruit quality of peach and nectarine grown in Montenegro. *Agriculture & Forestry*, 62(3), 93–103.
- Pulawska, J., Sobiczewski, P. (2005). Development of a seminested PCR-based method for sensitive detection of tumorigenic *Agrobacterium* in soil. *Journal of Applied Microbiology*, 98(3), 710–721. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02503.x>.
- Pulawska, J., Willems, A., Sobiczewski, P. (2006). Rapid and specific identification of four *Agrobacterium* species and biovars using multiplex PCR. *Systematic and Applied Microbiology*, 29(6), 470–479. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2005.11.002>.
- Puławska, J. (2010). Crown gall of stone fruits and nuts, economic significance and diversity of its causal agents: Tumorigenic *Agrobacterium* spp. *Journal of Plant Pathology*, 92, 87–98.
- Puławska, J., Warabieda, W., Ismail, E. (2016). Identification and characterization of bacteria isolated from crown galls on stone fruits in Poland. *Plant Pathology*, 65, 1034–1043. <https://doi.org/10.1111/ppa.12482>.
- Rademaker, J. L. W., Louws, F. J., Schultz, M. H., Rossbach, U., Vauterin, L., Swings, J., de Bruijn, F. J. (2005). A comprehensive species to strain taxonomic framework for *Xanthomonas*. *Phytopathology*, 95(9), 1098–1111. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-95-1098>.
- Randhawa, P. S., Civerolo, E. L. (1985). A detached-leaf bioassay for *Xanthomonas campestris* pv. *pruni*. *Phytopathology*, 75, 1060–1063. <https://doi.org/10.1094/Phyto-75-1060>.
- Renick, L. J., Cogal, A. G., Sundin, G. W. (2008). Phenotypic and genetic analysis of epiphytic *Pseudomonas syringae* populations from sweet cherry in Michigan. *Plant Disease*, 92(3), 372–378. <https://doi.org/10.1094/PDIS-92-3-0372>.
- Ritchie, D. F. (1995). Bacterial spot. In: Ogawa, J. M., Zehr, E. I., Bird, G. W., Ritchie, D. F., Uriu, K., Uyemoto, J. K., (eds.) *Compendium of Stone Fruit Diseases*. APS Press, St. Paul, MN, USA, pp. 50-52.
- Roos, I. M. M., Hattingh, M. J. (1983). Fluorescent *pseudomonads* associated with bacterial canker of stone fruits in South Africa. *Plant Disease*, 67, 1267–1269. <https://doi.org/10.1094/PD-67-1267>.
- Roselló, M., Santiago, R., Palacio-Bielsa, A., Garcia-Figueroles, F., Monton, C., Cambra, M., López, M. (2012). Current status of bacterial spot of stone fruits and almond caused by *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* in Spain. *Journal of Plant Pathology*, 94, 15–21. <http://dx.doi.org/10.4454/jpp.v94i1sup.004>.

- Ruinelli, M., Blom, J., Smits, T.H.M. Pothier, J. F. (2019). Comparative genomics and pathogenicity potential of members of the *Pseudomonas syringae* species complex on *Prunus* spp. BMC Genomics, 20, 172. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5555-y>.
- Saccardi, A., Goio, P. (1990). Epidemia di *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* in peschetai del veronese L'Informatore Agrario, 8, 117–120.
- Saccardi, A., Gambin, E., Zaccardelli, M., Barone, G., Mazzucchi, U. (1993). *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* control trials with phage treatments on peaches in the orchard. Phytopathologia Mediterranea, 32, 206–210. <https://www.jstor.org/stable/42685898>.
- Saddler, G. S., Bradbury, J. F., (2005). Genus *Xanthomonas* Dowson 1939. In: Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T., Garrity G. (eds.) The Proteobacteria. Bergey 's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd ed., vol. 2. . Springer, New York, USA, pp. 199–210.
- Samavatian, H. (2006). Identification and distribution of bacterial disease agent of almond tree canker in Isfahan province. Acta Horticulturae, 726, 667–672. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2006.726.115>.
- Santi, F., Russell, K., Menard, M., Dufour, J. (2004). Screening wild cherry (*Prunus avium*) for resistance to bacterial canker by laboratory and field tests. Forest Pathology, 34, 349–362.
- Saponari, M., Boscia, D., Nigro, F., Martelli, G. P. (2013). Identification of DNA sequences related to *Xylella fastidiosa* in oleander, almond and olive trees exhibiting leaf scorch symptoms in Apulia (southern Italy). Journal of Plant Pathology, 95, 668. <http://dx.doi.org/10.4454/JPP.V95I3.035>.
- Saponari, M., Loconsole, G., Cornara, D., Yokomi, R. K., De Stradis, A., Boscia, D., Bosco, D., Martelli, G. P., Krugner, R., Porcelli, F. (2014). Infectivity and transmission of *Xylella fastidiosa* by *Philaenus spumarius* (Hemiptera: Aphrophoridae) in Apulia, Italy. Journal of Economic Entomology, 107, 1316–1319. <https://doi.org/10.1603/EC14142>.
- Saponari, M., D'Attoma, G., Kubaa, R. A., Loconsole, G., Altamura, G., Zicca, S., Rizzo, D., Boscia, D. (2019). A new variant of *Xylella fastidiosa* subspecies *multiplex* detected in different host plants in the recently emerged outbreak in the region of Tuscany, Italy. European Journal of Plant Pathology, 154(4), 1195–1200. <https://doi.org/10.1007/s10658-019-01736-9>.
- Sarkar, S. F., Guttman, D. S. (2004). Evolution of the core genome of *Pseudomonas syringae*, a highly clonal, endemic plant pathogen. Applied and Environmental Microbiology, 70(4), 1999–2012. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.4.1999-2012>.
- Sawada, H., Ieki, H. , Matsuda, I. (1995). PCR detection of Ti and Ri plasmids from phytopathogenic *Agrobacterium* strains. Applied and Environmental Microbiology, 61(2), 828–831. <https://doi.org/10.1128/AEM.61.2.828-831.1995>.
- Scally, M., Schuenzel, E. L., Stouthamer, R., Nunney, L. (2005). Multilocus sequence type system for the plant pathogen *Xylella fastidiosa* and relative contributions of recombination and point mutation to clonal diversity. Applied and Environmental Microbiology, 71, 8491–8499. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.8491-8499.2005>.
- Schaad, N. W., Stall, R. E. (1988). *Xanthomonas*. In: Schaad N.W. (ed.). Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 2nd Ed., APS Press, St. Paul, MN, USA. pp. 81–91.

Schaad, N. W., Jones, J. B., Lacy, G. H. (2001). In: Schaad, N. W., Jones, J. B., Chun, W. (eds.) Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria, 3rd edition. , APS Press, St. Paul, MN, USA.

Schaad, N. W., Postnikova, E., Lacy, G., Fatmi, M., Chang, C. J. (2004). *Xylella fastidiosa* subspecies: *X. fastidiosa* subsp. *piercei*, subsp. nov., *X. fastidiosa* subsp. *multiplex* subsp. nov., and *X. fastidiosa* subsp. *pauca* subsp. nov. Systematic and applied microbiology, 27(3), 290–300. <https://doi.org/10.1078/0723-2020-00263>.

Schwarzinger, I., Bozsó, Z., Szatmári, Á., Süle, S., Szabó, Z., Király, L. (2017). First report of bacterial spot caused by *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* on apricot in Hungary. Plant Disease, 101(6), 1031. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-16-1582-PDN>.

Schwarzinger, I., Bozsó, Z., Szatmári, Á., Süle, S., Szabó, Z., Nagy, G., Király, L. (2018). First report of bacterial leaf spot caused by the quarantine pathogen *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* on peach in Hungary. Plant Disease, 102(8), 1654. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-17-1952-PDN>.

Scortichini, M. (1990). Outbreak of *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* (Smith) Dye in plum orchards of central Italy. Advances in Horticultural Science, 4, 127–128. <http://digital.casalini.it/10.1400/13974>.

Scortichini, M., Pellegrino, S., Berra, L. (1999). Susceptibility of apricot germplasm to natural infection by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* in Piedmont. Rivista di Frutticoltura e di Ortofloricoltura, 61, 83–86.

Scortichini, M., Sbaraglia, M., Di Prospero, P., Angelucci, L., Pet-ricca, P., Tromboni, R., Mazzuca, T., Lucci, E., Moretti, D., Cir-ica, B., Trucca, L. (2001). Moria del nocciolo nel Viterbese eterreni acidi. L'Informatore Agrario, 57(21), 358–363.

Scortichini, M., Rossi, MP. (2003). Genetic diversity of *Xanthomonas arboricola* pv. *fragariae* strains and comparison with some other *X. arboricola* pathovars using repetitive PCR genomic fingerprinting. Journal of Phytopathology, 151(3), 113–119. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1439-0434.2003.00591.x>.

Scortichini, M. (2006). Severe outbreak of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* on new apricot cultivars in central Italy. Journal of Plant Pathology, 88(3, Supplement), 65–70.

Scortichini, M. (2010). Epidemiology and predisposing factors of some major bacterial diseases of stone and nut fruit trees species. Journal of Plant Pathology, 92(1, Supplement), 73–78.

Shen, Y. M., Huang, T. C., Chao, C. H., Liu, H. L. (2013). First report of bacterial spot caused by *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* on Japanese Plum in Taiwan. Plant Disease, 97(6), 835. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-12-1094-PDN>.

Shepard, D. P., Zehr, E. I. (1994). Epiphytic persistence of *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* on peach and plum. Plant Disease, 78, 627–629.

Singh, H. V., Mir, M. S., Wani, M. A. (2005). Effect of host genotypes and age of plant on resistance to gummosis disease in apricot of Kargil. Annals of Plant Protection Sciences, 13, 152–155.

- Smith, E. F. (1903). Observation on a hitherto unreported bacterial disease, the cause of which enters the plant through ordinary stomata. *Science*, 17, 456–457.
- Soleimani, A., Farhadfar, S., Keshavarzi, M., Bouzari, N., Moghadam, L. (2016). Susceptibility of cherries to bacterial canker (*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*) in field and laboratory, 6(1), 20–27. <https://doi.org/10.5923/j.ijaf.20160601.04>.
- Sobiczewski, P., Karczewski, J., Berczynski, S. (1991). Biological control of crown gall *Agrobacterium tumefaciens* in Poland. *Fruit Science Report*, 18, 125–132.
- 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. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.1.226-230.1998>.
- Spotts, R. A., Wallis, K. M., Serdani, M., Azarenko, A. N. (2010). Bacterial canker of sweet cherry in Oregon-infection of horticultural and natural wounds, and resistance of cultivar and rootstock combination. *Plant Disease*, 94(3), 345–350. <https://doi.org/10.1094/PDIS-94-3-0345>.
- Stefani, E., Bazzi, C., Mazzucchi, U., Colussi, A. (1989). *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* in pescheta del Friuli. *Informatore Fitopatologico*, 39, 60–63.
- Stefani, E. (2010). Economic significance and control of bacterial spot/canker of stone fruits caused by *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*. *Journal of Plant Pathology*, 92(Supplement 1), 99–103.
- Su, C. C., Deng, W. L., Jan, F. J., Chang, C. J., Huang, H., Chen, J. (2014). Draft genome sequence of *Xylella fastidiosa* pear leaf scorch strain in Taiwan. *Genome announcements*, 2(2), e00166–14. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00166-14>.
- Sulikowska, M., Sobiczewski, P. (2008). *Pseudomonas* spp. isolated from stone fruit trees in Poland. *Zemdirbyste Agriculture*, 95, 166–170.
- Sundin, G. W., Castiblanco, L. F., Yuan, X., Zeng, Q., Yang, C. H. (2016). Bacterial disease management: challenges, experience, innovation and future prospects: Challenges in bacterial molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 17(9), 1506–1518. <https://doi.org/10.1111/mpp.12436>.
- Šebek, G., Prenkić, R., Odalović, A. (2013). Kompatibilnost i bujnost sadnog materijala autohtonih rakijskih sorti šljive na podlozi crvenolisne šljive ili mirobalane (*Prunus cerasifera* Erhr.). 48. Hrvatski i 8. Međunarodni simpozijum agronoma, Dubrovnik, Hrvatska, pp. 850–854.
- Timmer, L.W., Marois, J. J., Achor, D. (1987). Growth and survival of *Xanthomonads* under conditions non-conducive to disease development. *Phytopathology*, 77, 1341–1345. <https://doi.org/10.1094/Phyto-77-1341>.
- Tjou-Tam-Sin, N. N. A., van de Bilt, J. L. J., Bergsma-Vlami, M., Koenraadt, H., Westerhof Naktuinbouw, J., van Doorn, J., Pham, K. T. K., Martin, W. S. (2013). First report of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* in ornamental *Prunus laurocerasus* in the Netherlands. *Plant Disease*, 96(5), 759. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-11-0265-PDN>.

- Topp, B. L., Heaton, J. B., Russell, D. M., Mayer, R. (1989). Field susceptibility of Japanese-type plums to *Xanthomonas campestris* pv. *pruni*. Australian Journal of Experimental Agriculture, 29, 905–909. <https://doi.org/10.1071/ea9890905>.
- Vandroemme, J., Cottyn, B., Pothier, J. F., Pfluger, V., Duffy, B., Maes, M. (2013). *Xanthomonas arboricola* pv. *fragariae*: what's in a name? Plant Pathology, 62(5), 1123–1131. <https://doi.org/10.1111/ppa.12028>.
- Van Hall, C. J. J. (1902). Bijdragen tot de kennis der bacteriële plantenziekten Ph.D. Thesis, University of Amsterdam, The Netherlands.
- Vasebi, Y., Khakvar, R., Mehdi Faghihi, M., Vinatzer, B. A. (2019). Genomic and pathogenic properties of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains isolated from apricot in East Azerbaijan province, Iran. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 19, 101167. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101167>.
- Vauterin, L., Hoste, B., Kersters, K., Swings, J. (1995). Reclassification of *Xanthomonas*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 45(3), 472–489. <https://doi.org/10.1099/00207713-45-3-472>.
- Vauterin, L., Rademaker, J., Swings, J. (2000). Synopsis on the taxonomy of the genus *Xanthomonas*. Phytopathology, 90, 677–682. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2000.90.7.677>.
- Verneau, R. (1954). La vaiolatura batterica dell'albicocco. Ricerche, Osservazioni e Divulgazioni Fitopatologiche, per la Campania ed il Mezzogiorno, 12, 3–9.
- Versalovic, J., Koeuth, T., Lupski, J.R. (1991). Distribution of repetitive DNA sequence in eubacteria and application fingerprinting of bacterial genome. Nucleic Acids Research, 19(24), 6823–6831. <https://doi.org/10.1093/nar/19.24.6823>.
- Versalovic, J., Schneider, M., De Bruijn, F. J., Lupski, J. R. (1994). Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. Methods in Molecular and Cellular Biology, 5(1), 25–40.
- Vicente, J., Roberts, S. (2007). Discrimination of *Pseudomonas syringae* isolates from sweet and wild cherry using rep – PCR. European Journal of Plant Pathology, 117, 383–392. <https://doi.org/10.1007/s10658-007-9107-y>.
- Vidaver, A. K., Koski, R. K., Van Etten, J. L. (1973). Bacteriophage φ6: A lipid-containing virus of *Pseudomonas phaseolicola*. Journal of virology, 11(5), 799–805. <https://doi.org/10.1128/JVI.11.5.799-805.1973>.
- Vučinić, Z., Todorović, J., Živaljević, S., Vukićević, V. (1992). Proučavanje bakterioza višnje u Crnoj Gori. Poljoprivreda i šumarstvo, 38(1-2), 3–23.
- Watkins, R. (1976). Cherry, plum, peach, apricot and almond. *Prunus* spp. In: Simmonds, N.W. (ed.) Evolution of Crop Plants, Longman, London, UK, pp. 242–247.
- Watkins, R. (1995). Cherry, plum, peach, apricot and almond. *Prunus* spp. (Rosaceae). In: Smartt, J., Simmonds, N. (eds.), Evolution of Crop Plants. Longman, New York, USA, pp 423–428.

- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of bacteriology*, 173(2), 697–703. <https://doi.org/10.1128/jb.173.2.697-703.1991>.
- Wells, J. M., Raju, B. C., Hung, H. Y., Weisburg, W. G., Mandelco-Paul, L., Beemer, D. J. (1987). *Xylella fastidiosa* gen. nov., sp. nov.: gram-negative, xylem-limited, fastidious plant bacteria related to *Xanthomonas*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 37(2), 136–143.
- Wells, J. M., Raju, B., Nyland, G. (1983). Isolation, culture and pathogenicity of the bacterium causing phony disease of peach. *Phytopathology*, 73, 859–862. <https://doi.org/10.1094/Phyto-73-859>.
- Wormald, H. (1932). Bacterial diseases of stone fruit trees in Britain. IV. The organism causing bacterial canker of plum trees. *Transactions of the British Mycological Society*, 17(3), 157–169. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(32\)80011-2](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(32)80011-2).
- Young, J. M. (1977). *Xanthomonas pruni* in almond in New Zealand. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 20(1), 105–107. <https://doi.org/10.1080/00288233.1977.10427311>.
- Young, J. M., Dye, D. W., Bradbury, J. F., Panagopoulos, C. G., Robbs, C. F. (1978). A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 21, 153–177. <https://doi.org/10.1080/00288233.1978.10427397>.
- Young, J. M. (1987). New plant disease record in New Zealand: *Pseudomonas syringae* pv. *persicae* from nectarine, peach, and Japanese plum. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 30, 235–247. <https://doi.org/10.1080/00288233.1987.10430502>.
- Young, J. M. (1988). *Pseudomonas syringae* pv. *persicae* from nectarine and Japanese plum in New Zealand. *EPPO Bulletin*, 18, 141–153. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.1988.tb00359.x>.
- Young, J. M., Takikawa, Y., Gardan, L., Stead, D. E. (1992). Changing concepts in the taxonomy of plant pathogenic bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 30(1), 67–105. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.30.090192.000435>.
- Young, J. M., Jones, D. S., Gillings, M. (1996). Relationships between populations of *Pseudomonas syringae* pv. *persicae* determined by restriction fragment analysis. *Plant Pathology*, 45(2), 350–357. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.1996.d01-117.x>.
- Young, J. M., Kuykendall, L. D., Martinez-Romero, E., Kerr, A., Sawada, H. (2001). A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie et al. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51, 89–103. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-1-89>.
- Young, J. M., Park, D. C., Shearman, H. M., Fargier, E. (2008). A multilocus sequence analysis of the genus *Xanthomonas*. *Systematic and applied microbiology*, 31(5), 366–377. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2008.06.004>.
- Young, J. M. (2010). Taxonomy of *Pseudomonas syringae*. *Journal of Plant Pathology*, 92, 5–14. <http://dx.doi.org/10.4454/jpp.v92i1sup.2501>.

Yuan, X., Morano, L., Bromley, R., Spring-Pearson, S., Stouthamer, R., Nunney, L. (2010). Multilocus sequence typing of *Xylella fastidiosa* causing Pierce's disease and oleander leaf scorch in the United States. *Phytopathology*, 100(6), 601–611. <https://doi.org/10.1094/PHTO-100-6-0601>.

Zaccardelli, M., Saccardi, A., Gambin, E., Mazzucchi, U. (1992). *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* bacteriophages on peach trees and their potential use for biological control. *Phytopathologia mediterranea*, 31, 133–140.

Zaccardelli, M., Malaguti, S., Bazzi, C. (1998). Biological and epidemiological aspects of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* on peach in Italy. *Journal of Plant Pathology*, 80(2), 125–132. <https://www.jstor.org/stable/41997912>.

Zehr, E. I., Shepard, D. P. (1996). Bacterial spot of peach as influenced by water congestion, leaf wetness duration, and temperature. *Plant Disease*, 80(3), 339–341.

Zlatković, N. (2018): Detekcija i identifikacija bakterija parazita biljaka familije *Cucurbitaceae* klasičnim i molekularnim metodama. Doktorska disertacija. Poljoprivredni fakultet, Beograd, Univerzitet u Beogradu.

Zhu, J., Oger, P. M., Schrammeijer, B., Hooykaas, P. J. J., Farrand, S. K., Winans, S. C. (2000). The bases of crown gall tumorigenesis. *Journal of Bacteriology*, 182(14), 3885–3895. <https://doi.org/10.1128/jb.182.14.3885-3895.2000>.

BIOGRAFIJA

Mr Tamara Popović rođena je 15. decembra 1975. godine u Nikšiću. Srednju školu Gimnaziju „Slobodan Škerović“, prirodno-matematički smjer završila je 1994. godine u Podgorici.

Školske 1994/1995. godine upisala je Poljoprivredni fakultet, Univerziteta u Novom Sadu, Odsjek za zaštitu bilja. Diplomirala je 2000. godine, odbranom diplomskog rada „Proučavanje biohemijsko-fizioloških i patogenih odlika *Erwinia carotovora*”.

Poslediplomske studije upisala je školske 2001/2002. godine na grupi Fitopatologija, na Poljoprivrednom fakultetu u Novom Sadu. Sve ispite na poslediplomskim studijama položila je prosečnom ocenom 9,50. Magistarski rad pod nazivom “Bakterijska populacija na sjemenu paprike i razrada metoda za identifikaciju *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*” odbranila je 2006. godine na Poljoprivrednom fakultetu u Novom Sadu.

Doktorske studije na Poljoprivrednom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, upisala je školske 2016/17. godine, na smeru Poljoprivredne nauke, modul: Fitomedicina.

Od 2009. godine zaposlena je u Ministarstvu poljoprivrede i rupalnog razvoja Crne Gore, u Upravi za bezbjednost hrane, veterinu i fitosanitarne poslove kao načelnica Odsjeka za zdravstvenu zaštitu bilja.

Aktivno je učestvovala na brojnim obukama (Better Training for Safer Food - BTSF i Technical Assistance and Information Exchange (TAIEX)) i međunarodnim projektima (IPA 2010 – Jačanje kapaciteta Fitosanitarne uprave; IPA 2012 – Jačanje sektora bezbjednosti hrane, veterine i fitosanitarnog sektora Crne Gore). Aktivan je učesnik u procesu pregovora o pristupanju Crne Gore Evropskoj uniji, kao član radnih grupa Poglavlje 12 - Bezbjednost hrane, veterinarska i fitosanitarna politika i Poglavlje 29 - Carinska unija. U periodu od 2016-2019. godine pohađala je brojne treninge na kojima je usvojila znanja o detekciji fitopatogenih bakterija *Xylella fastidiosa*, *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* i fitoplazme *Candidatus Phytoplasma vitis*. Takođe, učestvovala je u vršenju posebnih nadzora u dijelu dijagnostike fitopatogenih bakterija *Xylella fastidiosa*, *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*, *Pseudomonas syringae* pv. *persicae*, *Xanthomonas citri* pv. *citri* i *Xanthomonas citri* pv. *aurantifolii*.

Član je Odbora za upravljanje (Management Committee) i Radne grupe 1: Dijagnostika i diverzitet - struktura populacije (Working Group 1: Diagnostics & Diversity – Population Structure) COST Akcije CA16107 EuroXanth: Integrating science on Xanthomonadaceae for integrated plant disease management in Europe, od 2018. godine.

Tokom doktorskih studija, kao autor objavila je 3 naučna rada. Učestvovala je na većem broju međunarodnih i domaćih skupova i konferencija.

Govori engleski jezik. Član je Društva za zaštitu bilja Srbije.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a Tamara Popović

Broj indeksa FM 160027

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom:

BAKTERIJE KAO PARAZITI KOŠTIČAVIH VOĆAKA I BADEMA NA PODRUČJU CRNE GORE

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada;
- da disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za sticanje druge 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 AUTORA

U Beogradu, _____

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Tamara Popović

Broj indeksa FM 160027

Studijski program Poljoprivredne nauke

Naslov rada Bakterije kao paraziti koštičavih voćaka i badema na području Crne Gore

Mentor prof. dr Aleksa Obradović, redovni profesor

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la radi podhranjivanja u **Digitalnom repozitorijumu 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 AUTORA

U Beogradu, _____

Izjava o korišćenju

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

BAKTERIJE KAO PARAZITI KOŠTIČAVIH VOĆAKA I BADEMA NA PODRUČJU CRNE GORE

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilogima 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

POTPIS AUTORA

U Beogradu, _____
