

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Sanja S. Marković

**MONITORING, IDENTIFIKACIJA I  
MOLEKULARNO-GENETIČKA  
KARAKTERIZACIJA FITOPATOGENIH  
BAKTERIJA KROMPIRA (*SOLANUM  
TUBEROSUM* L.)**

doktorska disertacija

Beograd, 2023.

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF BIOLOGY

Sanja S. Marković

**MONITORING, IDENTIFICATION, AND  
MOLECULAR-GENETIC  
CHARACTERIZATION OF  
PHYTOPATHOGENIC POTATO BACTERIA  
(*SOLANUM TUBEROSUM* L.)**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2023

## MENTORI I ČLANOVI KOMISIJE

### Mentori:

**dr Tatjana Popović Milovanović**, naučni savetnik  
Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu

**dr Slaviša Stanković**, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

### Članovi komisije:

**dr Tanja Berić**, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

**dr Olja Medić**, naučni saradnik  
Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

**dr Renata Ilić**, viši naučni saradnik  
Univerzitet u Novom Sadu - Poljoprivredni fakultet

**Datum odbrane:** \_\_\_\_\_

## Zahvalnica

*Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije je urađen na Institutu za zaštitu bilja i životnu sredinu, Odseku za bolesti bilja i laboratoriji Katedre za mikrobiologiju, Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Istraživanja su finansirana sa projekata Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije III 43010 „Modifikacije antioksidativnog metabolizma biljaka sa ciljem povećanja tolerancije na abiotički stres i identifikacija novih biomarkera sa primenom u remedijaciji i monitoringu degradiranih staništa“ i OI 173026 „Molekularna karakterizacija bakterija iz rodova Bacillus i Pseudomonas kao potencijalnih agenasa za biološku kontrolu“.*

*Ogromnu zahvalnost dugujem mentorki dr Tatjani Popović Milovanović, naučnom savetniku Instituta za zaštitu bilja i životnu sredinu za pruženu priliku za bavljenje naučno-istraživačkim radom, ukazano poverenje i nesebično preneto teorijsko i praktično znanje. Zahvaljujem se na bezuslovnoj pomoći, uloženom vremenu i svakodnevnom trudu da se naučni radovi i ova disertacija realizuju.*

*Duboku zahvalnost dugujem mentoru prof. dr Slaviši Stankoviću, redovnom profesoru Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu za ukazano poverenje i preneto znanje, sve korisne savete i sugestije tokom izvođenja eksperimenata, pisanja naučnih radova i same disertacije. Zahvaljujem se na izdvojenom vremenu i besprekornoj saradnji.*

*Veliku zahvalnost dugujem prof. dr Tanji Berić, redovnom profesoru Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu na prenetom znanju, izdvojenom vremenu, prijatnoj i stručnoj saradnji, kao i kritičkoj oceni doktorske disertacije.*

*Zahvaljujem se dr Olji Medić, naučnom saradniku Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu na stručnoj saradnji, podeljenom znanju, izdvojenom vremenu i kritičkoj oceni doktorske disertacije.*

*Veliku zahvalnost dugujem dr Renati Ilić, višem naučnom saradniku Poljoprivrednog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu za pomoć u eksperimentima, tumačenju rezultata i kritičkoj oceni doktorske disertacije, kao i za stručne savete i širenje znanja uključivanjem u svoja istraživanja.*

*Duboku zahvalnost dugujem dr Sonji Veljović Jovanović sa Univerziteta u Beogradu, Instituta za multidisciplinarna istraživanja na ukazanom poverenju i pružanju mogućnosti za bavljenje naučno-istraživačkim radom, za preneto znanje, kao i za sve savete, ideje i sugestije koji su doprineli kvalitetu mog naučnog rada.*

*Posebnu zahvalnost dugujem dr Aleksandri Jelušić sa Univerziteta u Beogradu, Instituta za multidisciplinarna istraživanja za nesebičnu pomoć prilikom izvođenja eksperimenata i tumačenja rezultata, podeljeno znanje i stručne savete, kao i za svakodnevnu podršku i prijateljstvo.*

*Veliku zahvalnost dugujem dr Sonji Milić Komić sa Univerziteta u Beogradu, Instituta za multidisciplinarna istraživanja za pomoć pri izradi eksperimenata, preneto znanje i prijateljsko nahodjenje.*

*Posebnu zahvalnost dugujem dr Andrei Kosovac sa Instituta za pesticide i zaštitu životne sredine za tumačenje rezultata, stručne savete i izdvojeno vreme.*

*Zahvalnost dugujem dr Ivici Dimkiću sa Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu za pomoć i sugestije prilikom izvođenja eksperimenata, tumačenje rezultata i izdvojeno vreme.*

*Zahvaljujem se dr Dobrivoju Poštiću sa Instituta za zaštitu bilja i životnu sredinu na pomoći prilikom izvođenja eksperimenata.*

*Zahvaljujem se kolegama sa Univerziteta u Beogradu, Instituta za multidisciplinarna istraživanja, Nikoli Šušiću, dr Bojani Živanović i Ani Sedlarević Zorić na korisnim savetima, podsticajima i prijateljskoj atmosferi.*

*Zahvaljujem se svim profesorima i članovima Katedre za mikrobiologiju Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, na kolegijalnosti i prijatnoj atmosferi za rad.*

*Posebnu zahvalnost dugujem Živojinu Bijeliću, Zlatku Zduniću, Vladimiru Čizmaru, Valentini Jovanović i ostalim članovima firmi, „Deka inženjering“ i PD „Maglić“ na uvođenju u profesionalni svet, prenetom terenskom znanju i podršci za bavljenje naučno-istraživačkim radom. Zahvaljujem se Gorani Matijević na nesebičnoj pomoći i izdvojenom vremenu tokom sakupljanja uzoraka.*

*Neizmernu zahvalnost za podršku i razumevanje dugujem svojoj majci, bratu i suprugu.*

***Ovaj rad posvećujem svom ocu.***

# Monitoring, identifikacija i molekularno-genetička karakterizacija fitopatogenih bakterija krompira (*Solanum tuberosum* L.)

## Sažetak

U Srbiji krompir ima veliki privredni značaj i pripada vodećim ratarsko-povrtnarskim kulturama. Tokom monitoringa sprovedenog od 2015 do 2019. godine, obuhvaćeno je preko 2000 ha useva krompira sa 16 lokaliteta. Rezultati monitoringa su ukazali na prisustvo dve bakteriozne bolesti. Mrka trulež krtola krompira utvrđena je u 2015, 2016. i 2018. godini i kao uzročnik je identifikovana karantinska bakterija *Ralstonia solanacearum*. „Crna noga“ i vlažna trulež krtola krompira, koju su prouzrokovale bakterije *Pectobacterium carotovorum*, *Pectobacterium brasiliense* i *Dickeya dianthicola*, detektovana je u 2016, 2018. i 2019. godini. U ovom istraživanju, prisustvo *P. brasiliense* i *D. dianthicola* prvi put je zabeleženo na krompiru u Srbiji. Izolati *R. solanacearum* dobijeni iz 229 uzoraka sa mrkom truleži krtola bili su fenotipski homogeni, a na osnovu molekularno-genetičke karakterizacije svrstani su u filotip II. Rezultati ispitivanja fenotipskih karakteristika izolata iz 50 uzoraka sa crnom nogom i vlažnom truleži krtola ukazali su na postojanje uzročnika iz dva roda, *Pectobacterium* i *Dickeya*. Međutim, molekularno-genetička karakterizacija ovih izolata ukazala je na prisustvo tri vrste, pri čemu su *P. brasiliense* izolati bili heterogeni, dok su *P. carotovorum* i *D. dianthicola* izolati uglavnom bili homogeni. Metabarkoding analiza omogućila je uvid u sastav bakterijske mikrobijalne zajednice krtola krompira sa i bez simptoma vlažne truleži, kao i odgovarajućih zemljišta ukazujući da razvoj vlažne truleži nastaje zbog složenih interakcija između biljnih patogena i drugih endofitnih bakterija. Biokontrolna aktivnost *Bacillus amyloliquefaciens* sojeva SS-12.6 i SS-38.4 prema izolovanim fitopatogenim bakterijama je dokazana u *in vitro*, *in situ* i *in planta* uslovima.

**Ključne reči:** *Ralstonia solanacearum*, *Pectobacterium* spp, *Dickeya dianthicola*, genetički diverzitet, metabarkoding, biološka kontrola

**Naučna oblast:** Biologija

**Uža naučna oblast:** Mikrobiologija, Fitopatologija

# Monitoring, identification, and molecular-genetic characterization of phytopathogenic potato bacteria (*Solanum tuberosum* L.)

## Abstract

In Serbia, the potato has great economic importance and belongs to the leading crops. During the five-year monitoring (2015-2019), over 2000 ha of potato crops from 16 locations were observed. Monitoring results indicated the presence of two bacterial diseases. Brown rot of tubers was observed in 2015, 2016, and 2018, caused by the quarantine bacterium *Ralstonia solanacearum*. Blackleg and soft rot caused by the *Pectobacterium carotovorum*, *P. brasiliense*, and *Dickeya dianthicola* was observed in 2016, 2018, and 2019. In this study, *P. brasiliense* and *D. dianthicola* was recorded for the first time on the potato in Serbia. Isolates of *R. solanacearum* obtained from 229 samples with brown rot were phenotypically homogeneous, and based on molecular-genetic characterization they were classified into phylotype II. The results of testing the phenotypic characteristics of isolates from 50 samples with blackleg and soft rot indicated the presence of pathogens from two genera, *Pectobacterium* and *Dickeya*. However, molecular-genetic characterization of these isolates revealed the presence of three species, whereby *P. brasiliense* isolates were heterogeneous, while *P. carotovorum* and *D. dianthicola* isolates were mainly homogeneous. The metabarcoding analysis provided insight into the bacterial microbial community composition of potato tubers with and without soft rot symptoms, as well as the corresponding soils, indicating that the development of soft rot process arises due to complex interactions between plant pathogens and other endophytic bacteria. The biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* strains SS-12.6 and SS-38.4 against isolated bacteria was proven *in vitro*, *in situ*, and *in planta*.

**Keywords:** *Ralstonia solanacearum*, *Pectobacterium* spp, *Dickeya dianthicola*, genetic diversity, metabarcoding, biological control

**Scientific field:** Biology

**Scientific subfield:** Microbiology, Plant pathology

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. KROMPIR ( <i>Solanum tuberosum</i> L.).....	1
1.2. BOLESTI KROMPIRA IZAZVANE BAKTERIJAMA .....	2
1.2.1. Uvelost i mrka trulež krtola krompira prouzrokovana <i>R. solanacearum</i> .....	3
1.2.2. Trulež prizemnog dela stabljike i vlažna trulež krtola krompira prouzrokovane <i>Pectobacterium</i> spp. i <i>Dickeya</i> spp.....	5
1.2.3. Ostale bolesti krompira.....	9
1.3. METODE ZA DETEKCIJU, IDENTIFIKACIJU I KARAKTERIZACIJU FITOPATOGENIH BAKTERIJA KROMPIRA .....	9
1.4. BIOLOŠKA KONTROLA .....	10
2. CILJEVI RADA .....	12
3. MATERIJAL I METODE.....	13
3.1. MATERIJAL.....	13
3.1.1. Kolekcija fitopatogenih bakterijskih izolata.....	13
3.1.2. Kontrolni sojevi.....	13
3.1.3. Antagonistički sojevi .....	13
3.1.4. Hranljive podloge .....	13
3.1.5. Pufri i rastvori.....	17
3.2. METODE .....	19
3.2.1. Monitoring useva krompira i sakupljanje uzoraka sa simptomima bakterioza.....	19
3.2.2. Izolacija fitopatogenih bakterija .....	20
3.2.2.1. Izolacija bakterija iz krtola krompira sa simptomima promena u provodnom tkivu .....	20
3.2.2.2. Izolacija bakterija iz biljaka sa simptomima crne noge i vlažne truleži krtola krompira .....	20
3.2.3. Fenotipske karakteristike.....	20
3.2.3.1. Biohemijsko-fiziološke karakteristike izolata .....	20
3.2.3.2. Provera patogenosti <i>R. solanacearum</i> izolata.....	22
3.2.3.3. Provera patogenosti <i>Pectobacterium</i> spp. i <i>Dickeya</i> spp. izolata .....	22
3.2.3.4. Test imunofluorescencije.....	22
3.2.4. Genotipske karakteristike izolata.....	23
3.2.4.1. Izolacija DNK.....	23
3.2.4.2. Priprema PCR smeše .....	23
3.2.4.3. Identifikacija izolata <i>R. solanacearum</i> .....	23
3.2.4.4. Identifikacija izolata <i>Pectobacterium</i> spp. i <i>Dickeya</i> spp.....	24
3.2.4.5. Karakterizacija izolata primenom rep-PCR metode .....	24
3.2.4.6. Horizontalna elektroforeza .....	24
3.2.4.7. Genotipizacija i analiza sekvenci više genskih lokusa (MLST/MLSA).....	24
3.2.4.8. Genealoška analiza haplotipova .....	25
3.2.5. Metabarkoding analiza bakterijskog diverziteta krtola krompira i zemljišta.....	25

3.2.6. Određivanje antagonističkog potencijala <i>B. amyloliquefaciens</i> sojeva SS-12.6 i SS-38.4 .....	26
3.2.6.1. <i>In vitro</i> ogledi .....	27
3.2.6.2. <i>In situ</i> ogledi .....	28
3.2.6.3. <i>In planta</i> ogledi .....	29
3.2.6.4. Statistička analiza .....	30
4. REZULTATI .....	31
4.1. DETEKTOVANE BAKTERIOZE KROMPIRA .....	31
4.1.1. Mrka trulež krtola krompira .....	31
4.1.2. Crna noga i vlažna trulež krtola krompira .....	32
4.2. IZOLACIJA BAKTERIJA .....	35
4.2.1. Izolacija bakterija iz krtola sa simptomima mrke truleži .....	35
4.2.2. Izolacija bakterija iz biljaka i krtola sa simptomima crne noge i vlažne truleži .....	36
4.3. FENOTIPSKE KARAKTERISTIKE .....	36
4.3.1. Biohemijsko-fiziološke karakteristike izolata .....	36
4.3.2. Dokazivanje patogenosti .....	40
4.3.2.1. Patogenost <i>R. solanacearum</i> izolata .....	40
4.3.2.2. Patogenost <i>Pectobacterium</i> spp. i <i>Dickeya</i> spp. izolata .....	41
4.3.3. Test imunofluorescencije .....	43
4.4. MOLEKULARNO-GENETIČKE KARAKTERISTIKE .....	43
4.4.1. Identifikacija i karakterizacija <i>R. solanacearum</i> izolata .....	43
4.4.2. Identifikacija i karakterizacija <i>Pectobacterium</i> spp. i <i>Dickeya</i> spp. izolata .....	48
4.5. ANALIZA DIVERZITETA ZAJEDNICA MIKROORGANIZAMA KRTOLA KROMPIRA .....	57
4.6. BIOLOŠKA KONTROLA .....	63
4.6.1. <i>In vitro</i> antagonistički potencijal <i>B. amyloliquefaciens</i> sojeva SS-12.6 i SS-38.4 .....	63
4.6.2. <i>In situ</i> antagonistički potencijal <i>B. amyloliquefaciens</i> sojeva SS-12.6 i SS-38.4 .....	69
4.6.3. <i>In planta</i> antagonistički potencijal <i>B. amyloliquefaciens</i> sojeva SS-12.6 i SS-38.4 .....	73
5. DISKUSIJA .....	75
5.1. UVELOST I MRKA TRULEŽ KRTOLA KROMPIRA – MONITORING, FENOTIPSKE I MOLEKULARNO-GENETIČKE KARAKTERISTIKE PROUZROKOVAČA BOLESTI .....	75
5.2. CRNA NOGA I VLAŽNA TRULEŽ KRTOLA KROMPIRA – MONITORING, FENOTIPSKE I MOLEKULARNO-GENETIČKE KARAKTERISTIKE PROUZROKOVAČA BOLESTI .....	77
5.3. DIVERZITET ZAJEDNICE MIKROORGANIZAMA KRTOLA KROMPIRA .....	80
5.4. BIOLOŠKA KONTROLA PROUZROKOVAČA MRKE TRULEŽI I CRNE NOGE I VLAŽNE TRULEŽI KROMPIRA .....	81
6. ZAKLJUČCI .....	84
7. LITERATURA .....	86
8. PRILOZI .....	106



# 1. UVOD

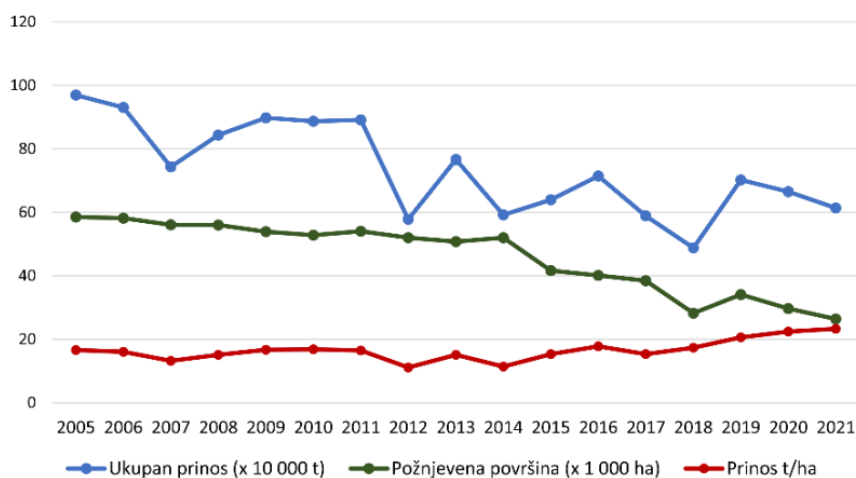
## 1.1. KROMPIR (*Solanum tuberosum* L.)

Krompir pripada familiji *Solanaceae* i predstavlja treći najznačajniji poljoprivredno-prehrambeni usev posle pšenice i pirinča (Visser *et al.*, 2009; FAOSTAT, 2013; Jansky *et al.*, 2019; Oyesola *et al.*, 2021). Kao namirnica bogata hranljivim materijama (skrobom, proteinima, vlaknima i masnim kiselinama), mineralima (kalijumom, fosforom, magnezijumom, gvožđem i dr.) i vitaminima (C, B6, niacinom, tiaminom i dr.), krompir je u XVIII i XIX veku bio glavni faktor u ishrani rastućeg stanovništva, a danas doprinosi globalnoj bezbednosti hrane (FAO, 2008; de Jong, 2016; Tian *et al.*, 2016a; Navarre *et al.*, 2019; Wijesinha-Bettoni & Mouillé, 2019).

Domestifikacija krompira je počela pre više od 8000 godina na području južnoameričkih Anda na 3800 m nadmorske visine na teritoriji između današnjeg Perua i Bolivije (Spooner *et al.*, 2005; FAO, 2008; de Jong, 2016). Na evropski kontinent, ova biljna kultura je doneta u drugoj polovini XVI veka u Španiju, a zatim je prenet u Italiju, Belgiju, Austriju, Veliku Britaniju, Francusku, Holandiju i ostale zemlje Evrope (FAO, 2008; Goffart *et al.*, 2022). Početkom XVII veka krompir je prenet u Indiju, Kinu i Japan (FAO, 2008), a sredinom XVIII je donet u Srbiju na područje Bačke i Banata, odakle se proširio u druge delove zemlje (Kostic *et al.*, 2016).

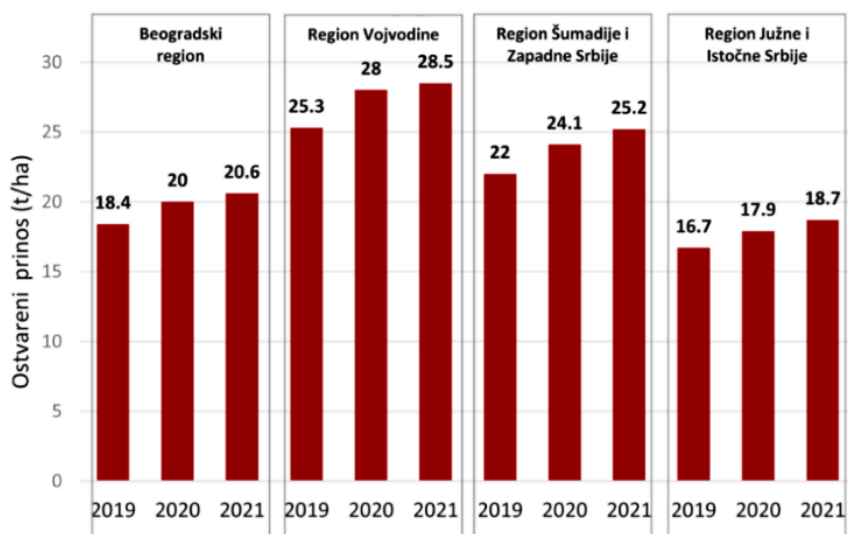
Krompir je u savremenim komercijalnim usevima heterozigot, autotetraploid i odlikuje se velikom fenotipskom plastičnošću, te se može gajiti i dati visoke prinose u različitim agroekološkim uslovima (Devaux *et al.*, 2020). U svetu postoji preko 5000 aktuelnih sorti (Zaheer & Akhtar, 2016). Iako je zastupljena na svim kontinentima, proizvodnja krompira je uglavnom koncentrisana u umerenom pojasu severne hemisfere (Devaux *et al.*, 2020). Krompir se uzgaja u preko 125 zemalja na 16 miliona ha sa obimom proizvodnje od 359 miliona t i prosečnim prinosom od 22 t/ha (FAOSTAT, 2020). U Evropskoj uniji (EU) se gajio na 1,5 miliona ha, sa obimom proizvodnje od 5,4 miliona t i ostvarenim prinosom od 35 t/ha (FAOSTAT, 2020). Trenutno, najveći svetski proizvođači krompira su Kina (78 miliona t) i Indija (51 milion t) koje zajedno pokrivaju više od trećine globalne proizvodnje (FAOSTAT, 2020).

U Srbiji krompir ima velik privredni značaj i pripada vodećim povrtarskim kulturama (Matović *et al.*, 2016). U poslednje dve decenije zabeleženi su različiti trendovi u proizvodnji, sa jedne strane drastično smanjenje površina, a sa druge, povećanje prinosa. Prema poslednjim podacima Republičkog zavoda za statistiku Republike Srbije (R. Srbije) (RSZ, 2022) površine pod krompirom su u 2021. godini iznosile 26388 ha sa obimom proizvodnje od 613785 t i prosečnim prinosom od 23,3 t/ha, dok je u 2005. godini sa 58529 ha ostvareni prinos bio 16,6 t/ha (Slika 1) (RSZ, 2022).



**Slika 1.** Trendovi kretanja u proizvodnji krompira u R. Srbiji za period od 2005. do 2021. godine (RSZ, 2022)

Postoje velike razlike i oscilacije u obimu proizvodnje i prinosu između regiona i okruga, kao i između profesionalnih i malih proizvođača (Bročić *et al.*, 2016; RSZ, 2022). Prema podacima RSZ (2022) od četiri regiona u Srbiji (Beogradskog regiona, Regiona Vojvodine, Regiona Šumadije i Zapadne Srbije i Regiona Južne i Istočne Srbije), najveći prinosi u periodu od 2019. do 2021. godine su ostvareni u Regionu Vojvodine (25,3 t/ha, 28 t/ha i 28,5 t/ha), dok su najniži prinosi zabeleženi u Regionu Južne i Istočne Srbije (16,7 t/ha, 17,9 t/ha i 18,7 t/ha) (Slika 2). Na nizak prinos krompira u Srbiji utiču: korišćenje nekvalitetnog sadnog materijala, neadekvatna ili neblagovremena primena agrotehničkih mera, uticaj meteoroloških faktora, usitnjenost parcela i prisustvo štetočina i bolesti (Jovanović *et al.*, 2012; Matović *et al.*, 2016). Korišćenje nedeklarisanog semena, čiji je potencijal za 30-50% ispod genetičkog potencijala sertifikovanog semena je jedan od najznačajnijih razloga niskog prinosa krompira u našoj zemlji (Puškarić, 2007). Za potrebe industrijske proizvodnje krompira u Srbiji, semenski krompir se većinom uvozi iz Holandije, Belgije i Nemačke.



**Slika 2.** Ostvareni prinosi krompira (t/ha) u četiri regiona R. Srbije za period od 2019. do 2021. godine (RSZ, 2022)

Krompir je podložan napadu velikog broja patogenih mikroorganizama koji mogu prouzrokovati gubitke u prinosu i kvalitetu (Fiers *et al.*, 2012; Guchi, 2015; Vilvert *et al.*, 2022). Vegetativni način razmnožavanja dodatno povećava rizik od pojave bolesti (Thomas-Sharma *et al.*, 2016). Prema Oerke (2006) početkom XXI veka ustanovljeno je da su bolesti prouzrokovane fitopatogenim bakterijama (bakterioze) i gljivama (mikoze i pseudomikoze) redukovale prinos krompira za oko 14%.

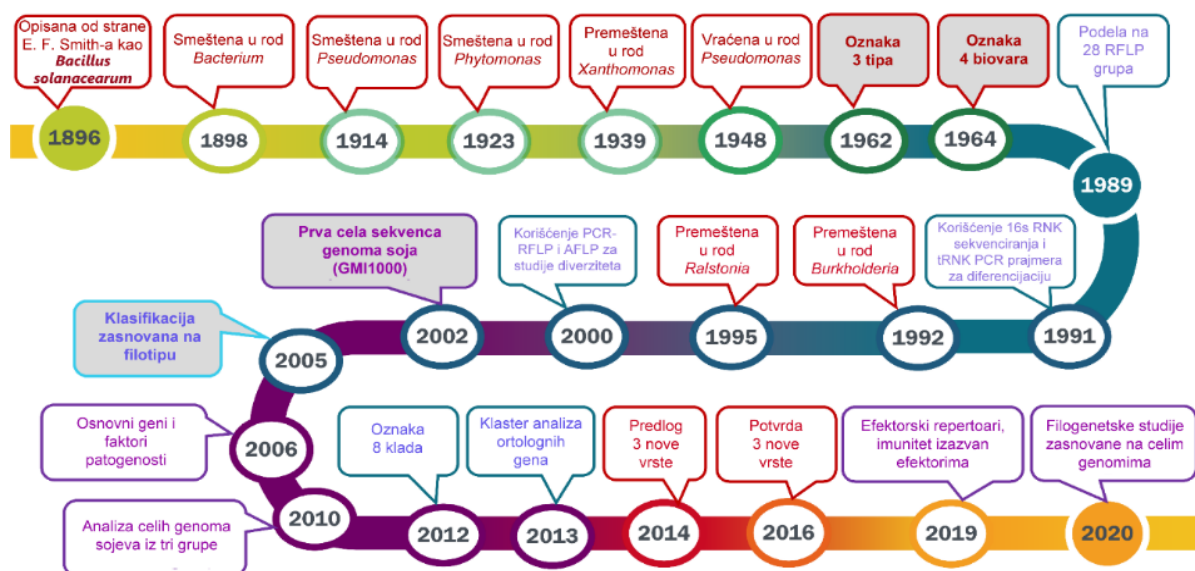
## 1.2. BOLESTI KROMPIRA IZAZVANE BAKTERIJAMA

Bolesti biljaka izazvane bakterijama (bakterioze) predstavljaju najvažnije biotičke faktore u ograničenjima proizvodnje krompira (Charkowski *et al.*, 2020; Oyesola *et al.*, 2021). Gubici usled prisustva fitopatogenih bakterija mogu biti direktni i indirektni. Direktnim se smatraju gubici koji se javljaju u toku vegetacije biljaka i zavise od faze rasta u kojoj su biljke zaražene, koncentracije bakterijskog inokuluma u zemljištu, širenja zaraze sa bolesnih na zdrave biljke, kao i oni koji se dešavaju u toku skladištenja i transporta krtola. Obim gubitka zavisi od faktora spoljašnje sredine (temperature, statusa vode, tipa zemljišta i dr.), gajene sorte i sojeva bakterija koji su prisutni. Indirektni gubici podrazumevaju one gubitke koji se javljaju usled nemogućnosti gajenja biljaka u zemljištu za koje je utvrđeno da je zaraženo fitopatogenim bakterijama pa su proizvođači prinuđeni da uzgajaju alternativne useve, stvarajući na taj način prezasićenost tržišta ili manje profitabilne useve (Charkowski *et al.*, 2020; Oyesola *et al.*, 2021).

Naročito značaj u proizvodnji krompira imaju bakterije sa karantinskim statusom (*Ralstonia solanacearum* i *Clavibacter sepedonicus*), jer njihova pojava za posledicu ima sprovođenje posebnih fitosanitarnih mera. Prema evropskim uredbama (Commission Implementing Regulation-CIR EU, 2019/2072; CIR EU, 2019) i Pravilniku R. Srbije (Službeni glasnik RS, 2008) određena je tzv. „nulta tolerancija“ za prisustvo karantinskih bakterija u biljnom materijalu. Pored karantinskih, postoje i bakterije sa statusom organizama nad kojima se vrši nadzor kao što su vrste roda *Dickeya* i ‘*Candidatus Liberibacter solanacearum*’ (CIR EU, 2019; Službeni glasnik RS, 2019). Ovaj koncept ima za cilj da spreči negativne ekonomske posledice prouzrokovane prisustvom štetnih organizama u biljnom materijalu koji se koristi za sadnju. Sa naučnog i ekonomskog aspekta neke od bakterija koje su patogeni krompira se svrstavaju među 10 najznačajnijih fitopatogenih bakterija (Mansfield *et al.*, 2012).

### 1.2.1. Uvelost i mrka trulež krtola krompira prouzrokovana *R. solanacearum*

Bakteriozna uvelost i mrka trulež krtola krompira koju prouzrokuje *R. solanacearum* je jedna od najznačajnijih bakterioza krompira (Yabuuchi *et al.*, 1995; Safni *et al.*, 2014; Prior *et al.*, 2016). *Ralstonia solanacearum* pripada rodu *Ralstonia*, familiji *Ralstoniaceae*, redu Burkholderiales i klasi Betaproteobacteria (Charkowski *et al.*, 2020). Ova bakterija je prošla brojne taksonomske promene od 1896. godine kada je prvi put opisana kao *Bacillus solanacearum* (Slika 3).



**Slika 3.** Vremenski sled glavnih taksonomskih i filogenetskih promena za bakteriju *R. solanacearum* (preuzeto i modifikovano iz Paudel *et al.*, 2020)

*Ralstonia solanacearum* se smatrala tzv. „kompleksom vrsta“, što podrazumeva više sojeva iste bakterije koji mogu da imaju nizak stepen srodnosti (Fegan & Prior, 2005; Prior & Fegan, 2005), a da sa druge strane dele isto specijalizovano stanište, imaju isti način prodiranja i kretanja kroz provodno tkivo biljke domaćina, kao i isti proces patogeneze sa karakterističnim simptomima bolesti uvelosti (Lowe-Power *et al.*, 2018). Generalno, istom vrstom se smatraju oni bakterijski sojevi čiji je prosečni nukleotidni identitet (*engl.* average nucleotide identity, ANI) preko 95% i koji dele osnovni skup fenotipova (Sharma *et al.*, 2022). Između nekih blisko srodnih sojeva *R. solanacearum* za koje je ANI>95%, krug domaćina je velik i drastično varira, dok je sa druge strane, kod nekih filogenetski udaljenih sojeva (ANI<95%) krug domaćina znatno manji (Ailloud *et al.*, 2015; Sharma *et al.*, 2022).

S obzirom na kompleksnost vrste, sojevi *R. solanacearum* su istorijski bili podeljeni na pet tipova (*engl.* race, r) na osnovu patogenosti prema domaćinu i šest biovara (b) na osnovu fenotipskih karakteristika, odnosno sposobnosti da oksiduju disaharide (saharozu, maltozu i laktozu) i heksozne alkohole (manitol, sorbitol i dulcitol) (Elphinstone, 2005; Paudel *et al.*, 2020). Sojevi koji pripadaju

*R. solanacearum* tip 1 (r1) imaju najširi krug domaćina, dok sojevi koji pripadaju tipovima 2 (r2), 3 (r3), 4 (r4) i 5 (r5) imaju užu krug domaćina (Elphinstone, 2005; Álvarez *et al.*, 2010; Pan *et al.*, 2013; Osdaghi, 2020). Sojevi r1 i r3 su prisutni na svim kontinentima, dok su sojevi r2 ograničeni na tropske oblasti Južne Amerike, a r4 i r5 na Aziju. Između tipova i biovara nisu pronađene direktne veze, osim da većina sojeva koji pripadaju tipu r3, pripadaju i biovaru 2 (Elphinstone, 2005).

Pomenuti sistem klasifikacije *R. solanacearum* sojeva, iako neformalan, bio je veoma koristan, ali nije uspeo da otkrije detalje o poreklu i evoluciji ove bakterije (Paudel *et al.*, 2020). Korišćenjem analize polimorfizama dužine restrikcionih fragmenata (*engl.* restriction fragment length polymorphism, RFLP) Cook (1989) je podelio *R. solanacearum* sojeve na dve divizije. Divizija I obuhvatala je sojeve koji su okarakterisani kao r1b3/b4/b5, dok je divizija II obuhvatala sojeve r1b1, kao i sojeve r2 i r3. Autori Fegan & Prior (2005) su podelili *R. solanacearum* kompleks na četiri filotipa prema analizi ITS (*engl.* internal transcribed spacer) regiona. Filotipu I odgovarali su sojevi poreklom iz Azije, filotipu II iz Amerike, filotipu III iz Afrike, a filotipu IV iz Indonezije. Nedavno, *R. solanacearum* kompleks vrsta je reklasifikovan na osnovu poređenja celih genoma u tri zasebne vrste: *R. solanacearum* (filotip II), *R. pseudosolanacearum* (filotip I i III) i *R. sizigii* (Filotip IV) sa podvrstama: *R. sizigii* subsp. *sizigii*, *R. sizigii* subsp. *indonesiensis* i *R. sizigii* subsp. *celebesensis* (Safni *et al.*, 2014; Prior *et al.*, 2016).

Sojevi u okviru svakog od četiri filotipa mogu izazvati bakterioznu uvelost i mrku trulež krtola krompira. Međutim, sojevi *R. solanacearum* filotip II, ranije poznati kao r3b2 su najšire povezani sa krompirom kao domaćinom (EFSA *et al.*, 2019a). Ovaj filotip je adaptiran na niži temperaturni optimum, tzv. „hladna forma“ (Janse, 1996; Wicker *et al.*, 2012; Parkinson *et al.*, 2013) i predstavlja glavni ograničavajući faktor u proizvodnji krompira (Fegan & Hayward, 2014). Na području Evrope su zabeležene sporadične pojave mrke truleži krompira izazvane *R. solanacearum* r3b2 (Janse, 2012; Fegan & Hayward, 2014), dok je u jednom slučaju beležen i b1 (Cruz *et al.*, 2008; Cruz *et al.*, 2012). Poslednjih godina, prisustvo *R. solanacearum* je utvrđeno u većini evropskih zemalja (EFSA *et al.*, 2019a; EPPO, 2022). U Srbiji je prisustvo ove bakterije prvi put zabeleženo u 2010. godini (Službeni glasnik RS, 2011), a tokom 2011. i 2012. godine utvrđeno je njeno prisustvo u Bačkoj i Banatu (Milijašević-Marčić *et al.*, 2013).

Generalno, *R. solanacearum* je aerobna, nefluorescentna, Gram-negativna bakterija, štapićastog oblika, veličine  $0,5-0,7 \times 1,5-2,5 \mu\text{m}$  (Denny & Hayward, 2001) sa polarno pozicioniranim flagelama (Liu *et al.*, 2001). Ova bakterija privučena eksudatima korena biljke domaćina (aminokiselinama i organskim kiselinama) je sposobna da se kreće pomoću flagela (Yao & Allen, 2007). Prva faza u interakciji između bakterije i biljke domaćina je kolonizacija korena, a zatim sledi zauzimanje međucelijskog prostora i prodiranje u provodno tkivo biljke (Vasse *et al.*, 2005). Prilikom procesa kolonizacije biljke domaćina, aktiviraju se geni koji kodiraju hidrolitičke enzime, egzopolisaharide, kao i geni koji kodiraju proteine za sekretorni sistem tip III i faktore koji učestvuju u procesu pričvršćivanja bakterijske ćelije za domaćina (*hrp* geni) (Genin & Boucher, 2004; Álvarez *et al.*, 2010). Unutar provodnog tkiva, bakterija se kreće do nadzemnih delova biljke, umnožava i formira biofilm. Umnožavanje bakterije i proizvodnja egzopolisaharida u provodnom tkivu dovode do njegovog začepjenja, što za posledicu ima uvelost biljke (Tans-Kersten *et al.*, 2001; Álvarez *et al.*, 2010). Propadanjem zaražene biljke, *R. solanacearum* dospeva u spoljašnju sredinu, gde se održava u zemljištu, vodi, biljkama (*Solanum dulcamara* i *S. nigrum*) i biljnim ostacima (Caruso *et al.*, 2005; van Elsas *et al.*, 2005; Álvarez *et al.*, 2008). Prema Elphinstone (1996) *R. solanacearum* u zemljištu može da preživi i do 2-3 godine. U nepovoljnim uslovima sredine bakterija najčešće preživljava u vijabilnoj, ali nekultivabilnoj formi, kao i u formi biofilma (Oliver, 2005; Yao & Allen, 2007; Álvarez *et al.*, 2008). Sojevi *R. solanacearum* poreklom iz tropskih područja imaju visok temperaturni optimum (35 °C), dok sojevi koji su poreklom sa većih nadmorskih visina tropskih i subtropskih područja, kao i iz umerenih klimatskih područja imaju niži temperaturni optimum (27 °C) (EPPO, 2004).

Početni simptomi koje izaziva bakterija *R. solanacearum* na biljkama krompira se javljaju u vidu uvelosti koja je najuočljivija u najtoplijem delu dana. U početnoj fazi bolesti biljke se mogu oporaviti tokom noći (Fegan & Hayward, 2014; Gutarra *et al.*, 2017; Charkowski *et al.*, 2020). U kasnijoj fazi

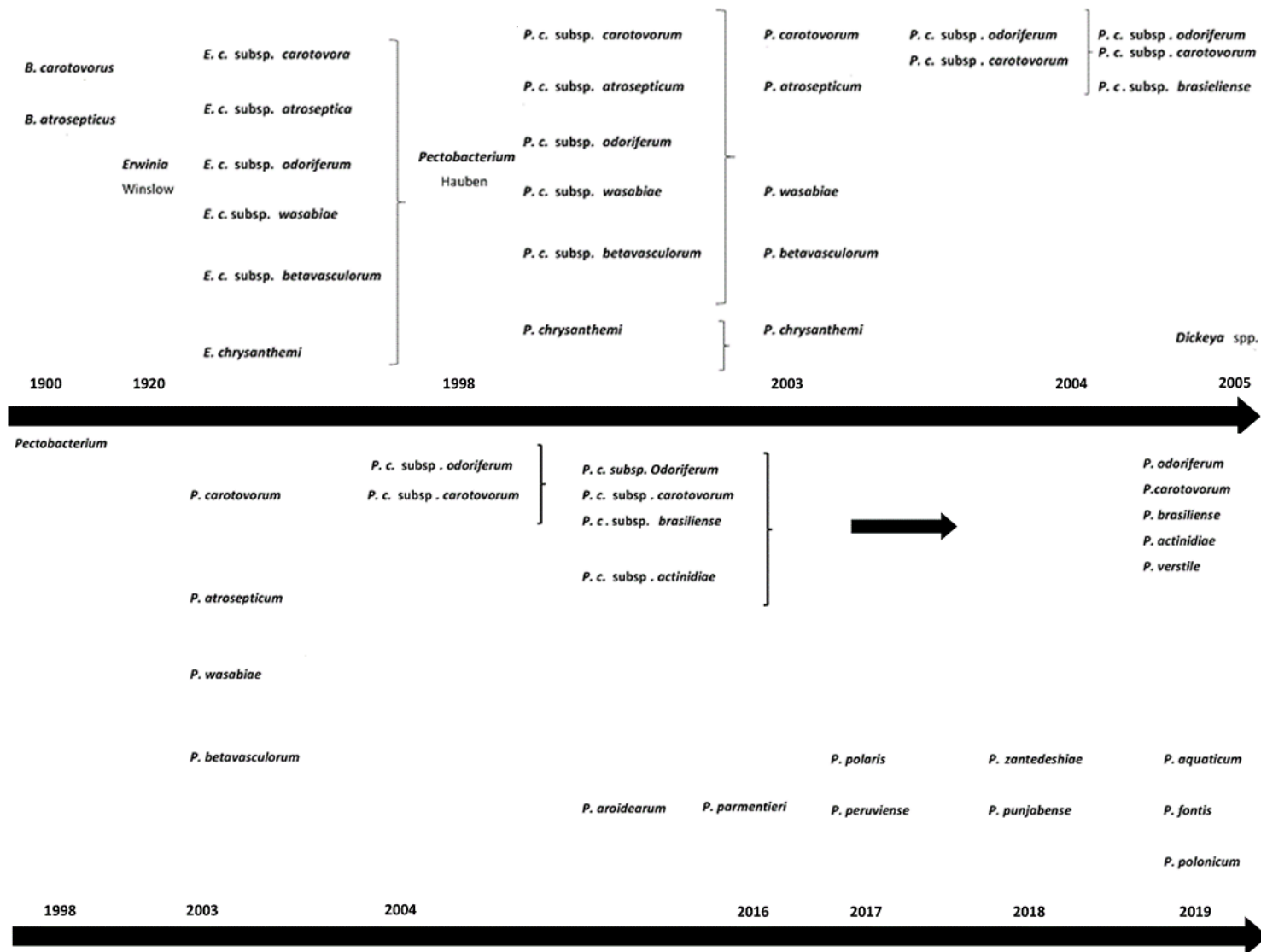
bolesti dolazi do promene boje stabljika u žutu ili braon/mrku, a može doći i do epinastije najmlađih listova. U poslednjoj fazi bolesti dolazi do nekroze nadzemnog dela biljaka i potpunog propadanja. Na poprečnom preseku stabljika i krtola može se uočiti mrka promena boje u zoni provodnog tkiva, iz kojih je u nekim slučajevima vidljivo i oslobađanje bakterijskog eksudata u vidu kapi (Allen *et al.*, 2001; EFSA *et al.*, 2019a; Charkowski *et al.*, 2020). Krtole kod kojih se na poprečnom preseku u zoni provodnih tkiva uočava nekroza, sa spoljne strane mogu da budu bez ikakvih simptoma (Fegan & Hayward, 2014; Charkowski *et al.*, 2020; Osdaghi, 2020).

Gubitke nastale usled zaraze sa *R. solanacearum* je teško proceniti jer direktni gubici prinosa uveliko variraju u zavisnosti od domaćina, sorte, klime, tipa zemljišta, agrotehničkih mera i soja patogena (Nion & Toyota, 2015; Jiang *et al.*, 2017). U slučaju krompira, Elphinstone (2005) navodi da štete mogu da dostignu i do 90%. Gubici od 90-100% su zabeleženi u Boliviji, Bangladešu, Kini i Indiji (Jiang *et al.*, 2017; Karim & Hossain, 2018). Značajni indirektni gubici nastaju kao rezultat regulatornih mera eradikacije i uvedenih ograničenja dalje proizvodnje krompira u zemljištu kontaminiranom bakterijom (Charkowski *et al.*, 2020).

### **1.2.2. Trulež prizemnog dela stabljike i vlažna trulež krtola krompira prouzrokovane *Pectobacterium* spp. i *Dickeya* spp.**

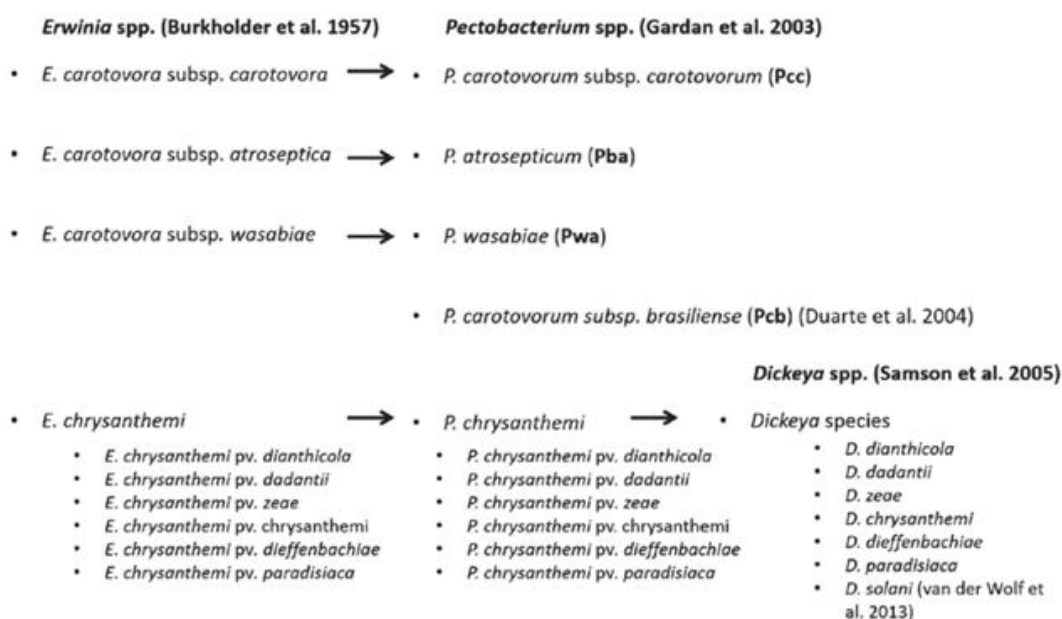
Veliki ekonomski značaj u gajenju krompira imaju bakterije iz rodova *Pectobacterium* i *Dickeya* koje prouzrokuju trulež prizemnog dela stabljike odnosno „crnu nogu“ i vlažnu trulež krtola (Charkowski *et al.*, 2020). Oba roda pripadaju familiji *Enterobacteriaceae*, redu *Enterobacteriales* i klasi *Gammaproteobacteria* (Adeolu *et al.*, 2016).

Rod *Pectobacterium* je prvobitno opisan kao rod *Erwinia* i uključivao je vrste *E. carotovora* (opisana 1901. godine od strane Jones-a kao *Bacillus carotovorus*) i *E. chrysanthemi* (Toth *et al.*, 2011; Oulghazi *et al.*, 2021). Naziv *Pectobacterium* je predložio Waldee (1942), ali se naziv *Erwinia* zadržao sve dok autori Hauben *et al.* nisu 1998. godine ponovo predložili naziv *Pectobacterium* na osnovu analiza sekvenci gena za 16S rDNK (Oulghazi *et al.*, 2021). Na slici 4. su prikazane nomenklaturne i taksonomske promene u okviru roda *Pectobacterium*. Autori Portier *et al.* su 2019. godine predložili da podvrste *Pectobacterium carotovorum* subsp. *actinidae*, *P. c.* subsp. *brasiliense*, *P. c.* subsp. *carotovorum* i *P. c.* subsp. *odoriferum* dobiju status vrste. Vrstama *P. atrosepticum*, *P. aroidearum*, *P. aquaticum*, *P. betavasculorum*, *P. fontis*, *P. parmentieri*, *P. peruviense*, *P. polaris*, *P. polonicum*, *P. punjabense*, *P. versatile*, *P. wasabiae* i *P. zantedeschiae* je od početka dodeljen status vrsta i kod njih nije bilo taksonomskih promena (Oulghazi *et al.*, 2021). Od svih navedenih, na krompiru je do sada zabeleženo 12 vrsta i to: *P. aroidearum*, *P. atrosepticum*, *P. brasiliense*, *P. carotovorum*, *P. odoriferum*, *P. parmentieri*, *P. parvum*, *P. peruviense*, *P. polaris*, *P. punjabense*, *P. versatile* i *P. wasabiae* (Waleron *et al.*, 2013; Moretti *et al.*, 2016; Portier *et al.*, 2019; Oulghazi *et al.*, 2020; Pasanen *et al.*, 2020).



Slika 4. Taksonomske promene u okviru roda *Pectobacterium* (preuzeto i modifikovano iz Oulghazi *et al.*, 2021)

Neki sojevi roda *Dickeya* prvobitno su pripadali rodu *Erwinia* u okviru vrste *E. chrysanthemi* koja je opisana kao patogen hrizanteme. Ova vrsta je kasnije preimenovana u *P. chrysanthemi* (Hauben *et al.*, 1998) i pripadala je rodu *Pectobacterium*, sve dok Samson *et al.* (2005) nisu utvrdili da prouzrokuje bolest i drugih domaćina i izdvojili sve *P. chrysanthemi* sojeve u poseban rod *Dickeya*. Na slici 5. su prikazane nomenklaturne i taksonomske promene koje su dovele do izdvajanja vrsta u roda *Dickeya* (Czajkowski *et al.*, 2015). Pored vrsta prikazanih na slici 5, danas ovom rodu pripadaju i vrste: *D. aquatica*, *D. fangzhongdai*, *D. lacustris*, *D. oryzae*, *D. poaceiphila* i *D. undicola* (Parkinson *et al.*, 2014; Tian *et al.*, 2016b; Oulghazi *et al.*, 2019; Hugouvieux-Cotte-Pattat *et al.*, 2019; Hugouvieux-Cotte-Pattat *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2020). Vrsti *D. dadantii* pripadaju dve podvrste, *D. dadantii* subsp. *dadantii* i *D. dadantii* subsp. *dieffenbachiae* (Brady *et al.*, 2012). Među navedenim, *D. chrysanthemi*, *D. dadantii* subsp. *dadantii*, *D. dianthicola*, *D. solani* i *D. zea* mogu da prouzrokuju bolesti krompira (Tsrer *et al.*, 2009; Oulghazi *et al.*, 2020; Boluk *et al.*, 2021).



**Slika 5.** Taksonomske promene koje su dovele do izdvajanja vrsta u rod *Dickeya* (preuzeto i modifikovano iz Czajkowski *et al.*, 2015)

Vrste roda *Pectobacterium* su identifikovane kao prouzrokovaci oboljenja kod vrsta iz najmanje 20 familija dikotila iz 13 redova i 12 familija monokotila iz šest redova (Ma *et al.*, 2007; Czajkowski *et al.*, 2015). Međutim, neke *Pectobacterium* vrste kao što su *P. atrosepticum* i *P. betavascularum* imaju veoma ograničen krug domaćina (Ma *et al.*, 2007). Rod *Dickeya* ima nešto manji krug domaćina i može zaraziti biljne vrste iz najmanje 12 familija dikotila iz 10 redova i 10 familija monokotila iz pet redova (Samson *et al.*, 2005; Ma *et al.*, 2007). Za *Dickeya* spp. ekonomski najvažniji domaćin je krompir (Charkowski *et al.*, 2020). Vrste iz rodova *Pectobacterium* i *Dickeya* imaju trećinu zajedničkih domaćina (Ma *et al.*, 2007; Charkowski, 2018).

Vrste *Pectobacterium* su široko rasprostranjene i javljaju se na svim kontinentima na kojima se gaji krompir. Iako postoje regionalne razlike u distribuciji, neke vrste kao što su *P. atrosepticum*, *P. brasiliense*, *P. parmentieri* i *P. carotovorum* su sveprisutne (Duarte *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2009; van der Merwe *et al.*, 2010; de Boer *et al.*, 2012; Mansfield *et al.*, 2012; van der Wolf *et al.*, 2017; Charkowski *et al.*, 2020). U Evropi, vrsta *P. atrosepticum* je bila dominantna i smatrala se glavnim prouzrokovacem crne noge krompira u poljskim uslovima, dok je vrsta *P. carotovorum* češće povezivana sa vlažnom truleži u uslovima skladišta (Charkowski *et al.*, 2020; Oulghazi *et al.*, 2020). Nedavne taksonomske promene unutar *Pectobacterium* roda, kao i reklasifikacija identifikovanih sojeva dovele su do novijih saznanja o distribuciji *Pectobacterium* vrsta. Neki *P. carotovorum* sojevi su prvo reklasifikovani u *P. wasabiae*, a zatim u *P. parmentieri* (Khayri *et al.*, 2016; Nykyri *et al.*,

2012). Vrsta *P. brasiliense* je prvobitno identifikovana u Brazilu 2004. godine (Duarte *et al.*, 2004), a kasnije u SAD-u, Evropi i Africi (Kim *et al.*, 2009; van der Merwe *et al.*, 2010; Charkowski *et al.*, 2020). Većina *Dickeya* vrsta je takođe rasprostranjena širom sveta. Izuzetak je *D. paradisiaca* koja je do sad identifikovana samo u Kolumbiji (Samson *et al.*, 2005; Toth *et al.*, 2011; Mansfield *et al.*, 2012; Charkowski *et al.*, 2020). Sławiak *et al.* (2009) navode da su gotovo svi evropski sojevi poreklom sa krompira izolovani pre 2004. godine identifikovani kao *D. dianthicola*. Ova vrsta je prvi put identifikovana u Holandiji sedamdesetih godina prošlog veka (Toth *et al.*, 2011). Sojevi sa krompira izolovani i identifikovani posle 2004. i 2005. godine u Evropi su uglavnom pripadali vrsti *D. solani* (Sławiak *et al.*, 2009; Toth *et al.*, 2011; Oulghazi *et al.*, 2020). U Srbiji su u ranijim istraživanjima izvedenim tokom 1990-ih dve *Pectobacterium* vrste identifikovane kao prouzrokovajući truleži prizemnog dela stabla i vlažne truleži krtola krompira (Arsenijević *et al.*, 1994; Obradović, 1996). Pored navedenih vrsta na krompiru, u Srbiji su identifikovane i *P. versatile* i *P. punjabense* (Loc *et al.*, 2022; Marković *et al.*, 2022a).

*Pectobacterium* i *Dickeya* vrste su fakultativno anaerobne, Gram-negativne bakterije, štapićastog oblika (Czajkowski *et al.*, 2015; Charkowski *et al.*, 2020), veličine  $0,5-1,0 \times 1,0-3,0 \mu\text{m}$ . Kod vrsta *P. carotovorum*, *P. brasiliense* i *D. dadantii* je zabeleženo da na površini ćelija imaju flagele (Kubheka *et al.*, 2013; Aizawa, 2014; Reverchon *et al.*, 2016). Virulentnost i patogenost *Pectobacterium* i *Dickeya* vrsta se bazira na njihovoj sposobnosti da proizvode i luče velike količine ekstracelularnih enzima (pektat lijaze, poligalakturonaze, proteaze i celulaze) koji razgrađuju zidove biljnih ćelija uzrokujući maceraciju tkiva, vlažnu trulež i odumiranje celih biljaka (Toth *et al.*, 2003; Charkowski *et al.*, 2012; Reverchon *et al.*, 2016; Oulghazi *et al.*, 2020). Ove bakterije takođe proizvode i više vrsta malih molekula koji učestvuju u procesu patogeneze, modifikovanju biljnog odgovora, kao i u napadu na konkurentske mikroorganizme (Charkowski *et al.*, 2012). Kod vrste *P. brasiliense* u toku patogeneze je zabeleženo i formiranje biofilma (Moleleki *et al.*, 2017). Iako *Pectobacterium* i *Dickeya* vrste izazivaju slične simptome postoje razlike u proteinima virulencije koje proizvode, kao i u mehanizmima regulacije proizvodnje ovih proteina (Charkowski *et al.*, 2012; Charkowski *et al.*, 2020).

Glavni izvor zaraze bolesti crna noga i vlažna trulež krtola krompira predstavljaju latentno zaražene semenske krtole (Pérombelon, 2002). Tokom proleća, bakterije se iz zaraženih krtola šire u mlade stabljike i koren. Nakon raspada obolelih biljaka one se oslobađaju u spoljašnju sredinu, prenose vodom i tako kontaminiraju krtole susednih biljaka (Reverchon *et al.*, 2016; Charkowski *et al.*, 2020). Kod sekundarno zaraženih biljaka prva faza razvoja bolesti se odvija u zoni lenticela, na krajevima stolona i/ili u zoni povreda ukoliko su uslovi spoljašnje sredine vlažni. Autori Czajkowski *et al.* (2010) su dokazali da *Dickeya* spp. u zemljištu mogu kolonizovati i koren krompira dospevajući putem provodnog tkiva do krtola naredne generacije. *Pectobacterium* i *Dickeya* vrste se mogu naći u zemljištu, vodi i na korovskim biljkama koje služe kao rezervoari ovih bakterija (Toth *et al.*, 2003; Czajkowski *et al.*, 2010; Charkowski, 2015; Reverchon *et al.*, 2016; Charkowski *et al.*, 2020). Za vrstu *P. brasiliense* navedeno je slabo preživljavanje u zemljištu (Skelsey *et al.*, 2018). Kada ne izazivaju bolest, *Pectobacterium* i *Dickeya* vrste odlikuju endofitski, epifitski i saprofitski način života (Toth *et al.*, 2003).

Intenzitet i pojava bolesti koju izazivaju bakterije iz rodova *Pectobacterium* i *Dickeya* zavise od temperature (Charkowski *et al.*, 2020), koncentracije kiseonika (niska koncentracija pogoduje razvoju bolesti) (Toth *et al.*, 2003), drenaže zemljišta i navodnjavanja (Toth *et al.*, 2011). *Pectobacterium* vrste se javljaju u umerenim i tropskim regionima, dok se ranije smatralo da su populacije *Dickeya* vrsta ograničene samo na tropske i suptropske biljke i područja (Reverchon *et al.*, 2016). Međutim, sojevi *D. dianthicola* izolovani iz biljaka krompira u zapadnoj Evropi dokazuju da postoje sojevi koji su otporni na hladniji klimat (Reverchon *et al.*, 2016). Vrste *D. solani* i *D. dianthicola* mogu prouzrokovati simptome na krtolama krompira pri temperaturama od 21-27 °C. *Pectobacterium* spp. se razlikuju po optimalnim i maksimalnim temperaturama rasta, pa tako *P. atrosepticum* i *P. parmentieri* ne preživljavaju temperaturu iznad 33 °C, dok *P. carotovorum* i *P. brasiliense* mogu da se razvijaju na temperaturama i do 39 °C (Charkowski *et al.*, 2020).



Simptomi koje prouzrokuju bakterije iz rodova *Pectobacterium* i *Dickeya* su veoma slični (Toth *et al.*, 2011; Charkowski *et al.*, 2012; Charkowski *et al.*, 2020; Toth *et al.*, 2021). Prvi simptomi se javljaju u usevima krompira u vidu potpunog odsustva rasta biljaka, usled propadanja matične krtole. Na biljkama koje su nikle i razvile se, prvi simptomi se ispoljavaju na listovima, odnosno dolazi do njihovog uvijanja ka licu, a kasnije i do žućenja i venjenja. Osnova stabljike postaje crna (simptom crne noge) i ova promena boje doseže do nekoliko centimetara iznad površine zemljišta. Na stabljikama se na poprečnom preseku uočava propadanje srži i nekroza provodnog tkiva. Simptomi bolesti se mogu razviti samo na jednoj, ili na par stabljika biljke (u proseku, biljke imaju 6-8 stabljika). Zaražene biljke formiraju manji broj krtola ili ih uopšte ne zameću. Kada patogeni dospeju do krtola naredne generacije, izazivaju maceraciju tkiva i njihovo propadanje (de Boer *et al.*, 2012; Charkowski *et al.*, 2020).

Bakterije iz rodova *Pectobacterium* i *Dickeya* na usevima krompira prouzrokuju ekonomski veoma značajne štete (Charkowski *et al.*, 2020; Oulghazi *et al.*, 2020). Prema Malko *et al.* (2019) štete koje prouzrokuju *P. atrosepticum*, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* i *Dickeya* spp. dostižu do 25% gubitka prinosa u usevu i 30% u skladištu. Tsror *et al.* (2009) navode da intenzitet bolesti izazvan *Dickeya* spp. procenjen na više od 15%, dovodi do gubitaka u prinosu od 20-25%. Pored direktnih šteta, indirektni gubici nastaju usled odbijanja semenskih krtola prilikom njihove sertifikacije (Toth *et al.*, 2011).

### 1.2.3. Ostale bolesti krompira

Među prouzrokovateljima bakterioznih oboljenja krompira veliki značaj ima bakterija *Clavibacter sepedonicus* koja izaziva prstenastu trulež krtola (Osdaghi *et al.*, 2022). Ovom patogenu odgovara nešto niži temperaturni optimum (20-23 °C) (Davis *et al.*, 1984) pa je i njegovo prisustvo u Evropi većinom zabeleženo u zemljama umerenog klimata. Međutim, *C. sepedonicus* je zabeležen i u zemljama toplijeg klimata kao što su Španija, Turska i Grčka (EFSA *et al.*, 2019b), pa bi se stoga pojava ove bakterije mogla očekivati i u našoj zemlji. Detekcija *C. sepedonicus* u Srbiji beležena je samo u uzorcima merkantilnog krompira iz uvoza, čime je sprečena njena introdukcija i širenje u zemlju (Popović & Marković, 2020). Na krtolama krompira simptomi su uglavnom vidljivi nakon vađenja i tokom skladištenja. Sa spoljne strane uočavaju se površinske pukotine i tamne mrlje neposredno ispod periderma, a sa unutrašnje strane pri poprečnom preseku uočava se promena boje provodnog tkiva iz koga se u nekim slučajevima može uočiti i isticanje eksudata (van der Wolf *et al.*, 2005; EFSA *et al.*, 2019b).

Vrste iz roda *Streptomyces* izazivaju bolest pod nazivom obična krastavost krtola krompira. Ova bolest ne utiče na smanjenje prinosa već na izgled krtola krompira smanjujući njihov kvalitet, pa se kao takva svrstava u ekonomski značajne (Charkowski *et al.*, 2020).

Bolest krompira „zebra chip“ koju prouzrokuje bakterija ‘*Candidatus Liberibacter solanacearum*’ haplotipa A i B je autohtona za područje Severne i Centralne Amerike (Nelson *et al.*, 2011; Mora *et al.*, 2021). Ova bakterija se širi pomoću vektora, insekta *Bactericera (Paratrioza) cockerelli* (Šulc) (Hemiptera: *Triozidae*), koji je pored autohtonog područja, trenutno zabeležen i na području Novog Zelanda (Teulon *et al.*, 2009; Yao *et al.*, 2016; Borges *et al.*, 2017). U Srbiji ‘*Ca. Liberibacter solanacearum*’ nije detektovan na krompiru, ali je utvrđen na šargarepi 2020. godine (Trkulja *et al.*, 2021).

## 1.3. METODE ZA DETEKCIJU, IDENTIFIKACIJU I KARAKTERIZACIJU FITOPATOGENIH BAKTERIJA KROMPIRA

Dijagnoza bakterioza kod biljaka može biti relativno jednostavna kada su u pitanju očigledni tj. tipični simptomi, ali oni vrlo često nisu specifični i mogu biti pomešani sa drugim faktorima biotičke ili abiotičke prirode (Palacio-Bielsa *et al.*, 2009). Mogućnost otkrivanja bolesti u ranim fazama ima ključnu ulogu u sprečavanju daljeg razvoja bolesti (Donoso & Valenzuela, 2018). S druge strane, detekcija bakterija u sadnom biljnom materijalu bez simptoma (latentne infekcije) je neophodna za

prevenciju bolesti, što u slučaju niske koncentracije patogena može biti izuzetno teško i zahteva primenu visoko osetljivih metoda detekcije (Palacio-Bielsa *et al.*, 2009). Generalno, tačna detekcija i identifikacija biljnih patogena omogućuje dalju primenu adekvatnih tretmana i prakse eradikacije patogena, naročito karantinskih (Kannan *et al.*, 2022).

Savremeni dijagnostički protokoli podrazumevaju integrisane metode koje uključuju primenu tehnika baziranih na različitim biološkim principima (Kannan *et al.*, 2022). Konvencionalno, većina dijagnostičkih tehnika koristi morfološke pristupe zasnovane na proučavanju kulture (Capote *et al.*, 2012), što podrazumeva izolaciju patogena na odgovarajuće hranljive podloge. Na osnovu patogenih, biohemijsko-fizioloških i odgajivačkih osobina sojeva mogu da se izvedu pretpostavke o pripadnosti određenim rodovima, odnosno vrstama bakterija. Korišćenjem tipizacije sekvenci genskih lokusa (*engl.* multilocus sequence typing, MLST) i analize sekvenci više genskih lokusa (*engl.* multilocus sequence analysis, MLSA) obezbeđuju se relevantne informacije za precizniju identifikaciju vrsta, a samim tim i predlaganje odgovarajućih razgraničenja između taksona (Hanage *et al.*, 2006; Nabhan *et al.*, 2013). U cilju pouzdane MLST/MLSA neophodno je koristiti najmanje četiri, dok je uobičajeno sekvenciranje sedam ili osam gena koji kodiraju osnovne metaboličke funkcije (Maiden, 2006). Za ispitivanje genetičkog diverziteta, MLST/MLSA se često koristi u kombinaciji sa nekom od rep-PCR (*engl.* repetitive extragenic palindromic sequence-rep; polymerase chain reaction-PCR) tehnika zasnovanih na repetitivnim ekstragenim palindromskim elementima za ispitivanje polimorfizma kod bakterija.

#### 1.4. BIOLOŠKA KONTROLA

Zaštita krompira od bolesti, štetočina i korova predstavlja najznačajniji i najosetljiviji segment u proizvodnji ove kulture. Trenutno, integrisano upravljanje štetnim organizmima zahteva kombinaciju nekoliko različitih pristupa: preventivne mere (biljni karantin, upotrebu zdravog i sertifikovanog semena, gajenje otpornih ili tolerantnih sorti i hibrida, pravilan izbor parcele, prostornu i vremensku izolaciju useva, poštovanje plodoreda i dr.), dobru agronomsku praksu (primenom optimalnih rokova i gustine setve, optimalnom obradom zemljišta, suzbijanjem korova, uništavanjem biljnih ostataka nakon žetve i dr.), kao i primenu pesticida (naročito biopesticida) prema potrebi koja je utvrđena praćenjem bolesti upotrebom dijagnostičkih alata (Berlin *et al.*, 2018; Helepciuc & Todor, 2022).

Za suzbijanje fitopatogenih bakterija obično se koriste baktericidi. Međutim, upotreba hemijskih tretmana sa bakar-sulfatom, bakar-oksihloridom, bakar-hidroksidom, dimetilamonijum-hloridom, natrijum-hipohloritom, formaldehidom, 3-(3-indolil) butanskom kiselinom, metam natrijumom, 1,3-dihloropropenom, hloropikrinom i antibioticima (streptomycinom i derivatima) koji se trenutno koriste za suzbijanje bakterija krompira (Gracia-Garza *et al.*, 2002; Nion & Toyota, 2015) se ne preporučuje zbog njihovog velikog negativnog uticaja na životnu sredinu i zdravlje ljudi, kao i zbog rizika od pojave rezistentnih sojeva bakterija (Jess *et al.*, 2014). Hemikalije kao što su praškovi za izbeljivanje, dezinficijensi, ili slabo kisela elektrolizovana voda, kao i tretmani toplom vodom su pokazali delimičnu efikasnost u suzbijanju bakterija (Czajkowski *et al.*, 2011; Nion & Toyota, 2015), te ni njihova upotreba nije sasvim opravdana.

Biološka kontrola podrazumeva primenu korisnih mikroorganizama i/ili proizvoda njihovog metabolizma, kao i primenu biljnih ekstrakata i eteričnih ulja u zaštiti biljaka i alternativa su hemijskim merama suzbijanja bolesti biljaka (Vasinauskiene *et al.*, 2006; Ongena & Jacques, 2008; Jiang *et al.*, 2017; Etminani & Harighi, 2018; Helepciuc & Todor, 2022). Biološka kontrola patogena ima dva vida suzbijanja, pasivni i aktivni. Prvi se sastoji u podsticaju većeg delovanja činilaca u okviru prirodnih kapaciteta agrocenoza, dok drugi predstavlja korišćenje bioloških sredstava, odnosno preparata. Kao biološki kontrolni agensi-preparati, bakterije dominiraju sa 90% zastupljenosti (Nion & Toyota, 2015), a među njima preovlađuju sojevi iz rodova *Bacillus*, *Agrobacterium* i *Pseudomonas* (Fravel, 2005).

Poslednjih godina značajno je porasla komercijalizacija proizvoda na bazi *Bacillus* vrsta (*B. thuringiensis*, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. pumilus*, *B. licheniformis*, *B. velezensis*, *B.*

*megaterium* i *B. cereus*) (Ongena & Jacques, 2008; Mazzola & Freilich, 2017; Helepciuc & Todor, 2022). Velika zainteresovanost za rod *Bacillus* proizilazi iz sposobnosti ovih vrsta da proizvode širok spektar biološki aktivnih molekula koji su potencijalno inhibitorni za rast fitopatogena i imaju različite mehanizme delovanja (Ongena & Jacques, 2008; Cawoy *et al.*, 2011; Helepciuc & Todor, 2022). Ovi mehanizmi podrazumevaju konkurenciju za hranljive materije i prostor, proizvodnju antibiotika, hidrolitičkih enzima, siderofora i/ili izazivanje sistemske otpornosti (Beneduzi *et al.*, 2012). Takođe, *Bacillus* vrste deluju kao i biofertilizatori i/ili biostimulatori (Borriss, 2011).

Antagonističke aktivnosti *Bacillus* vrsta su često povezane sa proizvodnjom sekundarnih metabolita koji poseduju antibiotska svojstva. Ova jedinjenja uglavnom uključuju peptide niske molekulske mase koji se stvaraju ribozomalno (bakteriocini) ili neribozomalno (lipopeptidi, peptidi, poliketidi). Ciklični lipopeptidi iz familija surfaktina, iturina i fengicina imaju velik potencijal za primenu u biotehnologiji i biofarmaceutskoj industriji u svojstvu surfaktanata (Ongena & Jacques, 2008). Antimikrobna aktivnost *Bacillus* vrsta takođe može biti posledica proizvodnje hidrolitičkih enzima (hitinaze, hitosanaze, glukanaze, celulaze, lipaze i proteaze), koje hidrolizuju glavne komponente ćelijskih zidova, kao i siderofora koje heliraju gvožđe (Rathore & Gupta, 2015; Khan *et al.*, 2018).

Brojne studije ukazuju na velik potencijal vrste *B. amyloliquefaciens* u suzbijanju *R. solanacearum*, kao i nekih vrsta iz roda *Pectobacterium* (Ding *et al.*, 2013; Tan *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2013; Krimi *et al.*, 2016; Akarapisan & Kumvinit, 2018; Azaiez *et al.*, 2018; Gerayeli *et al.*, 2018; Chen *et al.*, 2019; Cui *et al.*, 2019; Ho *et al.*, 2020; Osei *et al.*, 2021).

## 2. CILJEVI RADA

S obzirom na značaj krompira, kao i ograničen broj istraživanja diverziteta bakterija uzročnika bolesti, ciljevi ovog rada bili su:

1. Monitoring useva krompira u petogodišnjem periodu (2015-2019. godine) u severnom delu Srbije, simptomatologija i mapiranje prisustva potencijalnih fitopatogenih bakterija;
2. Izolacija fitopatogenih bakterija iz obolelih biljaka krompira i formiranje kolekcije izolata;
3. Identifikacija fitopatogenih bakterija poreklom sa krompira korišćenjem konvencionalnih i savremenih metoda;
4. Određivanje filogenetskog statusa i ispitivanje genetičkog diverziteta fitopatogenih bakterijskih izolata poreklom sa krompira, kao i genealoška analiza identifikovanih haplotipova;
5. Analiza ukupnog diverziteta bakterija krtola krompira i zemljišta;
6. Ispitivanje antagonističkog potencijala *Bacillus amyloliquefaciens* sojeva SS-12.6 i SS-38.4 prema fitopatogenim bakterijama sa krompira u *in vitro*, *in situ* i *in planta* uslovima.

### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1. MATERIJAL

##### 3.1.1. Kolekcija fitopatogenih bakterijskih izolata

U toku petogodišnjeg monitoringa (2015-2019. godine) formirana je kolekcija fitopatogenih bakterijskih izolata dobijenih iz biljaka krompira. Od ukupno 120 izolata korišćenih u ovom radu, 70 izolata je dobijeno iz krtola sa simptomima mrke truleži (Prilog 1), 13 izolata iz krtola sa simptomima vlažne truleži, a 37 izolata je dobijeno iz nadzemnih delova biljaka krompira sa simptomima crne noge (Prilog 2).

##### 3.1.2. Kontrolni sojevi

Za uporedne testove pri identifikaciji 120 izolata dobijenih iz biljnog materijala korišćeni su kontrolni sojevi čiji je pregled dat u Tabeli 1.

**Tabela 1.** Kontrolni sojevi

Vrsta	Šifra soja	Tip soja	Kolekcija
Sojevi korišćeni za identifikaciju izolata iz uzoraka krtola krompira sa promenama u provodnom tkivu			
<i>R. solanacearum</i>	PD 2762	Referentni	Nederlandse Algemene Keuringsdienst (NAK), Holandija
<i>R. solanacearum</i>	Rs0813	Uporedni	Kolekcija fitopatogenih bakterija dr Tatjane Popović Milovanović, Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu
<i>R. solanacearum</i>	Rs1213	Uporedni	Kolekcija fitopatogenih bakterija dr Tatjane Popović Milovanović, Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu
<i>R. solanacearum</i>	Rs1613	Uporedni	Kolekcija fitopatogenih bakterija dr Tatjane Popović Milovanović, Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu
<i>C. sepedonicus</i>	PD 406	Referentni	Nederlandse Algemene Keuringsdienst(NAK), Holandija
Sojevi korišćeni za identifikaciju izolata iz uzoraka krompira sa simptomima crne noge i vlažne truleži			
<i>D. solani</i>	MK10	Referentni	Science and Advice for Scottish Agriculture (SASA), Velika Britanija
<i>P. carotovorum</i>	Pcc10	Uporedni	Kolekcija fitopatogenih bakterija dr Tatjane Popović Milovanović, Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu
Sojevi korišćeni za ispitivanje biohemijsko-fizioloških karakteristika izolata			
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	KBNS201	Uporedni	Kolekcija fitopatogenih bakterija, Poljoprivredni fakultet Novi Sad
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>phaseoli</i>	KBNS204	Uporedni	Kolekcija fitopatogenih bakterija, Poljoprivredni fakultet Novi Sad
<i>Escherichia coli</i>	KBNS205	Uporedni	Kolekcija fitopatogenih bakterija, Poljoprivredni fakultet Novi Sad
<i>X. c.</i> pv. <i>vesicatoria</i>	KBNS206	Uporedni	Kolekcija fitopatogenih bakterija, Poljoprivredni fakultet Novi Sad

##### 3.1.3. Antagonistički sojevi

Sojevi *Bacillus amyloliquefaciens* SS-12.6 i SS-38.4 potiču iz kolekcije Katedre za mikrobiologiju, Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu i korišćeni su da bi se ispitala mogućnost njihovog antagonističkog delovanja na fitopatogene izolate poreklom sa krompira.

##### 3.1.4. Hranljive podloge

Hranljivi agar (NA)

Hranljivi agar 23 g  
Destilovana voda 1000 ml

Hranljivi agar sa dekstrozom (NDA)

Hranljivi agar 23 g  
D (+) glukoza (monohidrat) 12 g  
Destilovana voda 1000 ml

Agar sa saharozom i peptonom (SPA)

Saharoza	20 g
Bacto pepton	5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 g
MgSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O	0,25 g
Agar Bacto	15 g
Destilovana voda	1000 ml

Luria Broth (LB)

Trypton	10 g
Ekstrakt kvasca	5 g
NaCl	5 g
Destilovana voda	1000 ml

Luria Agar (LA)

Trypton	10 g
Ekstrakt kvasca	5 g
NaCl	5 g
Agar	15 g
Destilovana voda	1000 ml

LA *engl.* soft

Trypton	10 g
Ekstrakt kvasca	5 g
NaCl	5 g
Agar	7,5 g
Destilovana voda	1000 ml

CVP podloga

Podloga sa pektinom

NaOH (5M)	2 ml
Pektin	18 g
Destilovana voda	500 ml
Kristal violet rastvor	
CaCl <sub>2</sub> × 2 H <sub>2</sub> O	1,02 g
Trypton	1 g
Tri-natrijum citrat	5 g
NaNO <sub>3</sub>	2 g
Agar	4 g
Kristal violet (1% vodeni rastvor)	1,5 ml
Destilovana voda	500 ml

Podloga sa pektinom i kristal violet rastvor su autoklavirani odvojeno na 121 °C u trajanju od 30 minuta (min) i ohlađeni na 50 °C, a potom je kristal violet rastvor dodat u podlogu sa pektinom.

### SMSA podloga

#### Osnovna podloga:

Casamino kiseline	1 g
Bacto pepton	10 g
Glicerol	5 ml
Agar bacto	15 g
Destilovana voda	1000 ml

Osnovna podloga je autoklavirana na 121 °C u trajanju od 30 minuta (min), ohlađena na 50 °C i u nju je dodat profiltrirani vodeni rastvor.

#### Vodeni rastvor:

Kristal violet (Sigma)	5 mg/l
Polimiksin - B - sulfat (Sigma P-1004)	600 000 U (oko 100 mg/l)
Bacitracin (Sigma B - 0125)	1250 U (oko 25 mg/l)
Hloramfenikol (Sigma C - 3175)	5 mg/l
Penicilin - G (Sigma P - 3032)	825 U (oko 0,5 mg/l)
2,3,5-trifenil-tetrazolijum- hlorid (Sigma)	50 mg/l

### MTNA podloga

#### Osnovna podloga:

Ekstrakt kvasca	2 g
Manitol	2,5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,25 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,25 g
NaCl	0,05 g
MgCO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O	0,1 g
MnCO <sub>4</sub> × H <sub>2</sub> O	0,15 g
FeSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O	0,005 g
Agar	16 g
Destilovana voda	1000 ml

Osnovna podloga je autoklavirana na 121 °C u trajanju od 30 min, ohlađena na 50 °C i u nju je dodat profiltrirani vodeni rastvor.

#### Vodeni rastvor:

Trimetoprim	0,06 g
Nalidiksilna kiselina	0,002 g
Amfotericin B	0,01 g

### Tečna podloga sa kvašćevim ekstraktom i neorganskim solima (*engl.* Yeast salts, YS)

Kvašćev ekstrakt	5 g
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 g
MgSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O	0,2 g
NaCl	5 g

### Hugh-Leifson podloga

Pepton	2 g
NaCl	5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,3 g
Glukoza	10 g
Agar	3 g
BTB (bromtimolplava)	0,03 g
Destilovana voda	1000 ml
10% rastvor glukoze	finalne koncentracije 1%

Podloga za produkciju indola	
Tripton	10 g
Destilovana voda	1000 ml
Kovačev indol reagens:	
P-dimetilaminobenzaldehid	5 g
Amil-alkohol	75 ml
Koncentrovana HCl	25 ml

Podloga za produkciju vodonik-sulfida	
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 g
MgSO <sub>4</sub> × H <sub>2</sub> O	0,2 g
NaCl	5 g
Kvašček ekstrakt	5 g
Pepton	0,5 g
Destilovana voda	1000 ml

Podloga za produkciju tirozinaze	
Kazein	10 g
Tirozin	1 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 g
MgSO <sub>4</sub> × H <sub>2</sub> O	0,125 g
Agar	20 g
Glicerin	5 ml

Podloga za redukciju nitrata	
Pepton	5 g
NaCl	10 g
KNO <sub>3</sub>	1 g
Destilovana voda	1000 ml
Reagens:	
0,5% rastvor skroba	1 ml
0,4% kalijum-jodid	1 ml
50% sumporna kiselina	5 ml

Podloga za produkciju arginin-dehidrolaze	
Pepton	1 g
NaCl	5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,3 g
L-arginin HCl	10 g
<i>engl.</i> Phenol red	0,01 g
Agar	3 g
Destilovana voda	1000 ml

Podloga za hidrolizu želatina	
Želatin	5 g
Hranljivi bujon	24 g
Agar	20 g
Destilovana voda	1000 ml



Frejzerov reagens:	
Živa hlorid	125 g
Hlorovodonična kiselina	168 ml
Destilovana voda	832 ml

Podloga za hidrolizu skroba	
Mesni ekstrakt	3 g
Pepton	5 g
Rastvorljivi skrob	2 g
Agar	15 g
Destilovana voda	1000 ml

Lugolov reagens:	
Jod	5 g
Kalijum-jodid	10 g
Destilovana voda	100 ml

Podloga za hidrolizu eskulina	
Pepton	10 g
NaCl	5 g
Eskulin	1 g
Feriamonijum citrat	0,5 g
Destilovana voda	1000 ml

Podloga za stvaranje tartarata	
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1 g
$\text{MgSO}_4$	0,2 g
$\text{NaNH}_4\text{HPO}_4$	1,5 g
Tartarat	1,5 g
BTB	0,05 g
Destilovana voda	1000 ml

Podloga za utvrđivanje biovara *R. solanacearum*

Osnovna podloga:	
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	1 g
KCl	0,2 g
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	0,2 g
Pepton	1 g
BTB	0,03 g
Agar	3 g
Destilovana voda	1000 ml

Osnovna podloga je autoklavirana na 121 °C u trajanju od 30 min, ohlađena na 50 °C i u nju je dodat profiltrirani vodeni rastvor.

Vodeni rastvor:	
10% rastvor disaharida ili alkohola	10 ml

### 3.1.5. Pufri i rastvori

Fosfatni puffer pH 7	
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (anhidrovani)	4,26 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	2,72 g
Destilovana voda	1000 ml

Pelet pufer	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> × 12 H <sub>2</sub> O	2,7 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> × 2 H <sub>2</sub> O	0,4 g
Destilovana voda	1000 ml
IF pufer (pH 7,2)	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> × 12 H <sub>2</sub> O	2,7 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> × 2 H <sub>2</sub> O	0,4 g
NaCl	8 g
Destilovana voda	1000 ml
IF pufer - Tween	
IF puferu je dodato 0,1% Tween 20	
Fosfatni pufer sa glicerolom pH 7,6	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> × 12 H <sub>2</sub> O	3,2 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> × 2 H <sub>2</sub> O	0,15 g
Glicerol	50 ml
Destilovana voda	100 ml
5 × TBE pufer (pH 8,0)	
TRIS 50 mM	54,48 g
Borna kiselina	27 g
EDTA 0,5 M	10 ml
Destilovana voda	1000 ml
0,5 mM EDTA rastvor (pH 8,0)	
EDTA	93,05 g
Dejonizovana voda	500 ml
3% CTAB (pH 8,0)	
TRIS 1 M	121,14 g
NaCl 1,4 M	81,82 g
CTAB	30 g
EDTA 0,5 mM	40 ml
Destilovana voda	1000 ml
TE pufer (pH 7,6)	
EDTA 0,5 mM	60 µl
TRIS 10 mM	0,036 g
Destilovana voda	30 ml
Kristal violet 2%	
Kristal violet	2 g
Etanol 96%	20 ml
Amonijum-oksalat	0,8 g
Destilovana voda	80 ml

## 3.2. METODE

### 3.2.1. Monitoring useva krompira i sakupljanje uzoraka sa simptomima bakterioza

U petogodišnjem periodu (2015-2019. godine) vršen je monitoring useva krompira i sakupljani su uzorci sa simptomima bakterioza. Praćeni su usevi na kojima je sađen sertifikovani semenski krompir iz uvoza, uglavnom namenjen industrijskoj preradi.

Monitoring useva krompira na prisustvo simptoma bolesti koje prouzrokuju karantinske bakterije *R. solanacearum* i *C. sepedonicus* je vršen u periodu vegetacije (od početka maja do sredine avgusta) na 16 različitih lokaliteta u severnom delu Srbije (Slika 6). Ukupna pregledana površina useva iznosila je preko 2000 ha (Prilog 3). Pored monitoringa useva, vršen je i pregled krtola krompira prilikom skladištenja (od sredine avgusta do kraja oktobra). Ukupno je sakupljeno i pregledano 2463 uzorka krompira (Prilog 3). Uzorkovanje je vršeno na prijemnim linijama za skladištenje krompira, nasumičnim odabirom krtola i njihovim sakupljanjem u plastične džakove sa karticama koje su sadržale podatke o lokalitetu i sorti gajenog useva. Svaki uzorak se sastojao od 100 krtola i predstavljao je površinu od jednog hektara. Sa useva čija je površina bila manja od 1 ha uziman je jedan uzorak. Na sakupljenim krtolama vršen je brzi dijagnostički test koji podrazumeva njihovo transversalno (poprečno) presecanje i potapanje u staklenu čašu sa vodom (EU Commission Directive, 2006). U slučaju pozitivnog rezultata na prisustvo bakterioza, što je podrazumevalo spontano isticanje bakterijskog eksudata iz provodnih tkiva krtola u vodu, vršeno je dalje procesuiranje tih krtola (uzoraka) u cilju detekcije i identifikacije prouzrokovala bolesti.



**Slika 6.** Monitoring useva krompira u petogodišnjem periodu od 2015. do 2019. godine sproveden na lokalitetima: 1) Sombor, 2) Lugovo, 3) Stapar, 4) Srpski Miletić (S. Miletić), 5) Bački Brestovac, 6) Kula, 7) Feketić, 8) Ravno Selo, 9) Bačko Dobro Polje, 10) Nadalj, 11) Kulpin, 12) Zmajevo, 13) Obrovac, 14) Gajdobra, 15) Maglić i 16) Boleč

Monitoring useva krompira na prisustvo simptoma crne noge i vlažne truleži krtola krompira, kao i sakupljanje uzoraka vršeno je na lokalitetima i u godinama u kojima je beležen visok nivo infekcije i to: tokom 2016. godine na lokalitetu Kulpin, tokom 2018. godine na lokalitetima: Feketić, Kula, Obrovac i Maglić, i tokom 2019. godine na lokalitetima Maglić i Kulpin (Slika 6; Prilog 3). Simptomi na nadzemnim delovima biljaka su praćeni od početnih faza razvoja bolesti, svake dve do tri nedelje, do krajnjih faza razvoja bolesti, čime je utvrđena dinamika razvoja bolesti. Ovi usevi su tokom

monitoringa praćeni u dnevnim i kasno-većernjim satima. S obzirom da su posmatrani lokaliteti pod usevima bili u osnovi četvorougaoanog oblika, monitoring je vršen na 10 ustanovljenih taćaka koje su bile rasporećene duć dve dijagonale (pet taćaka po dijagonali). Razmak izmeću taćaka je meren kanapom i one su obelećene reflektujućim zastavama. Svaka taćka pokrivala je krug od tri metra u prećniku. Na svakom lokalitetu je tokom vegetacije sakupljano po tri cele biljke krompira (nadzemni deo biljke zajedno sa pripadajućim krtolama) iz taćaka obelećenih reflektujućim zastavama (10 uzoraka, koje su ćinile po tri biljke, po lokalitetu). Ukupno je sakupljeno 70 uzoraka biljnog materijala koji je spakovan u plastićne dćakove i obelećen (lokalitet, godina i sorta).

### **3.2.2. Izolacija fitopatogenih bakterija**

Sakupljeni uzorci su podvrgnuti dijagnostici prema tipu simptoma koji su belećeni na obolelim biljkama i krtolama. Uzorci biljnog materijala su u laboratoriji prvo oprani pod tekućom vodom u cilju otklanjanja nećistoća. Dalje su uzorci dezinfikovani u 70% etanolu u trajanju od 30 sekundi (sek), isprani pod tekućom vodom i ostavljeni na filter papiru da se osuše. Sitni fragmenti biljnog tkiva (3-5 mm) koji su se nalazili na prelazu bolesnog u zdravo tkivo su isećeni i potopljeni u fosfatni pufer ili vodu u trajanju od 30 min tokom kojih su povremeno i macerirani (Klement *et al.*, 1990). Po 100 µl dobijenog biljnog ekstrakta, kao i serije razblaćenja 1:10, 1:100 i 1:1000 su korišćene za izolaciju bakterija na hranljivim podlogama.

#### 3.2.2.1. Izolacija bakterija iz krtola krompira sa simptomima promena u provodnom tkivu

Za izolaciju fitopatogenih bakterija iz krtola krompira korišćene su SMSA i MTNA podloge. Zasejane SMSA podloge su inkubirane u termostatu na temperaturi od 26 °C u trajanju od pet dana, dok su MTNA podloge inkubirane na 21 °C tokom sedam dana. Radi porećenja, na odgovarajuće podloge zasejani su i referentni sojevi bakterija *R. solanaceraum* PD 2762 i *C. sepedonicus* PD 406. Nakon tri do pet dana od zasejavanja vršen je pregled formiranih kolonija na podlogama i porećenje sa odgovarajućim referentnim sojevima. Sa ciljem dobijanja ćistih kultura, sve kolonije koje su lićile na *R. solanaceraum* PD 2762 soj presejavane su na SPA podlogu i inkubirane su u periodu od 3-5 dana na 26 °C. U slućaju sumnje na prisustvo *C. sepedonicus*, kolonije su presejavane na NDA podlogu i inkubirane na temperaturi od 21 °C tokom sedam dana. Na hranljivim podlogama, praćeni su boja, oblik, velićina, 3-D profil i izgled oboda formiranih kolonija. U postupku izolacije iz uzoraka sa simptomima promena u provodnom tkivu krtola dobijen je velik broj bakterijskih izolata od kojih je 70 izabrano za dalji rad (Prilog 1).

#### 3.2.2.2. Izolacija bakterija iz biljaka sa simptomima crne noge i vlaćne truleći krtola krompira

Kod biljnog materijala sa simptomima crne noge i vlaćne truleći krtola krompira izolacija je vršena na CVP podlogu. Nakon inkubacije na temperaturi od 26 °C u trajanju od 48 h, kolonije koje su prouzrokovale udubljenja u CVP podlozi su presejavane na NA podlogu u cilju dobijanja ćistih kultura. Istovremeno je na NA podlogu zasejan je i referentni soj *D. solani* MK10 i uporedni *P. carotovorum* Pcc10 soj. Nakon perioda inkubacije (na 26 °C tokom 48 h) posmatrani su: boja, oblik, velićina, 3-D profil i izgled oboda kolonija. U postupku izolacije dobijen je velik broj izolata bakterija od kojih je 50 odabrano za dalji rad (Prilog 2).

Formirana kolekcija koja se sastojala od ukupno 120 fitopatogenih bakterijskih izolata odrćavana je i ćuvana u LB podlozi sa dodatkom 20% sterilnog glicerola na temperaturi od -20 °C (Schaad *et al.*, 2001) i deo je kolekcije fitopatogenih bakterija dr Tatjane Popović Milovanović sa Instituta za zaštitu bilja i ćivotnu sredinu, Beograd.

### **3.2.3. Fenotipske karakteristike**

#### 3.2.3.1. Biohemijsko-fizioloćke karakteristike izolata

Za odrećivanje minimalnih i maksimalnih temperatura rasta kod ispitivanih izolata praćena je sposobnost razvoja kolonija na temperaturama od 4, odnosno 37 °C u YS podlozi. Ocena rasta vršena je posle sedam dana inkubacije.

Tolerantnost izolata prema NaCl ispitana je njihovim zasejavanjem u YS podlogu sa 5% NaCl. Posmatranje rasta vršeno je tokom 14 dana pri inkubaciji izolata na temperaturi od 25-26 °C.

Za određivanje oksidativno/fermentativnog (O/F) metabolizma glukoze korišćena je Hugh-Leifson podloga (Hugh & Leifson, 1953) u koju je dodat 1% rastvor glukoze, kao i indikator BTB. Za svaki testirani izolat korišćene su četiri epruvete, od kojih je u dve dodato parafinsko ulje (anaerobni uslovi gajenja), dok su druge dve bile bez ulja (aerobni uslovi gajenja). Zasejane epruvete su inkubirane na temperaturi od 25-26 °C, a rezultati su očitani nakon sedam dana. U slučaju pozitivne reakcije uočavala se pojava žute boje.

Produkcija indola praćena je zasejavanjem testiranih izolata u tečnu podlogu sa triptofanom (Klement, 1990). Nakon sedam dana inkubacije na temperaturi 25-26 °C dodat je Kovačev indol reagens i izvršeno je očitavanje. Za pozitivnu reakciju smatrana je pojava crveno-ljubičaste boje.

Produkcija vodonik-sulfida (H<sub>2</sub>S) ispitana je zasejavanjem testiranih izolata u podlogu sa cisteinom (Dye, 1968). Rezultati su očitani posle 14 dana inkubacije (25-26 °C), a pozitivnu reakciju predstavljala je pojava crne boje filter papira uronjenog u epruvetu, 1 cm iznad podloge, fiksiranog čepom.

Produkcija tirozinaze je praćena zasejavanjem testiranih izolata na podlogu sa tirozinom (Crosse & Garrett, 1963). Nakon pet dana inkubacije (25-26 °C) pojava crvenkastog bojenja podloge označavala je pozitivnu reakciju.

Redukcija nitrata (KNO<sub>3</sub>) je ispitana u podlozi sa hranljivim bujonom i nitratom prema metodi koju navodi Shaffer (1975). Nakon 10 dana inkubacije (25-26 °C) u podloge je dodat reagens i izvršeno je očitavanje rezultata (pozitivan rezultat je podrazumevao pojavu tamno-mrke boje).

Produkcija arginin-dehidrolaze ispitana je metodom koji navodi Thornley (1960). Izolati su zasejani u epruvete u koje je dodata podloga sa argininom. Za svaki izolat korišćene su četiri epruvete, od kojih je u dve dodato parafinsko ulje. Nakon dodavanja Phenol red indikatora, praćena je promena boje u ljubičasto-crvenu (pozitivna reakcija). Rezultati testa su očitavani svaki drugi dan tokom 14 dana (izolati su inkubirani na temperaturi 25-26 °C).

Hidroliza želatina praćena je korišćenjem podloga sa hranljivim bujonom i želatinom (Lelliott & Stead, 1987). Testirani izolati su zasejani u podlogu i inkubirani sedam dana (25-26 °C). Nakon perioda inkubacije očitani su rezultati uz dodavanje Frejzerovog reagensa (pozitivnom reakcijom smatrano je razlaganje želatina iz podloge, odnosno zona oko kolonije ostaje prosvetljena).

Za praćenje hidrolize skroba testiranih izolata korišćena je podloga sa skrobom (1%) (Lelliott & Stead, 1987). Pet do sedam dana nakon inkubacije (25-26 °C), u Petri kutije je na mesto rasta bakterija dodato par kapi Lugolovog reagensa i očitani su rezultati. Pojava žute boje oko bakterijske kolonije označavala je pozitivnu reakciju, dok je pojava plave boje označavala da skrob nije hidrolizovan.

Hidroliza eskulina je ispitana po metodi koju navodi Jones (1971). Podloge sa eskulinom su zasejane i rezultati su očitavani nakon inkubacije (25-26 °C) od sedam do 14 dana. Promena boje u tamnomrku ili crnu bila je znak pozitivne reakcije.

Sposobnost ispitivanih izolata da koriste tartarat proverena je na podlozi koja je sadržala tartarat, kao i indikator BTB. Promena boje podloge praćena je tokom tri nedelje inkubacije (25-26 °C) i nakon toga su očitani rezultati testa. Promena boje iz zelene u plavu bila je znak pozitivne reakcije.

Za 70 *R. solanacearum* izolata korišćena je podloga za određivanje biovara (Aley & Elphinstone, 1995). Od disaharida određeno je korišćenje celobioze, laktoze i maltoze, dok je od alkohola određeno korišćenje dulcitol, manitola i sorbitola. Promena boje podloge iz zelene u žutu 72 h nakon zasejavanja je označavala pozitivan rezultat testa.

Pektinolitička aktivnost izolata proverena je na kriškama krompira. Zdrave krtole su dezinfikovane (70% etanolom), isečene na kriške debljine 10-15 mm, a zatim su u središnjem delu izbušena udubljenja. U udubljenja je naneta suspenzija bakterija finalne koncentracije 10<sup>8</sup> ćel/ml (gajene na odgovarajućim podlogama tokom 24-48 h na 26 °C). Ovako pripremljene kriške krompira postavljene su u uslove vlažne sredine i sobne temperature. Očitavanje rezultata izvršeno je nakon 24-48 h. Razmekšavanje tkiva (maceracija) praćeno neprijatnim mirisom smatralo se pozitivnim rezultatom pektinolitičke aktivnosti testiranih izolata.

### 3.2.3.2. Provera patogenosti *R. solanacearum* izolata

Za ispitivanje patogenosti 70 *R. solanacearum* izolata (Prilog 1), korišćene su biljke krompira (sorte L. Claire), kao i osetljive sorte paradajza (sorte Money maker) i plavog patlidžana (sorte Black beauty). Za svaki izolat korišćene su po tri biljke od svake biljne vrste. Krompir, paradajz i plavi patlidžan zasađeni su u Klasmann-Deilmann GmbH supstrat i gajeni su u kontrolisanim uslovima na temperaturi od 22-25 °C sa normalnim režimom zalivanja. U momentu inokulacije biljke krompira su bile starosti šest nedelja (faza 106-108 prema Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt and CHEMICAL industry, BBCH skali; Bleiholder *et al.*, 2001), dok su biljke paradajza i plavog patlidžana bile tri nedelje starosti (faza 102-103 BBCH skale). Sve biljke su inokulisane korišćenjem metode infiltracije bakterijske suspenzije u stabljiku pomoću šprica i igle (Rodrigues *et al.*, 2012). Bakterijske suspenzije pripremljene su rastvaranjem izolata prethodno gajenim na SPA podlozi (tokom 48 h na 26 °C) u sterilnoj destilovanoj vodi (SDV) do finalne koncentracije  $\sim 10^8$  ćel/ml. Referentni soj *R. solanacearum* PD 2762 je korišćen kao pozitivna kontrola, dok je SDV služila kao negativna kontrola. Inokulisane biljke su održavane u kontrolisanim uslovima temperature (25 °C), vlažnosti vazduha (70-80%) i fotoperioda (16 h dan/8 h noć). Razvoj simptoma je praćen svakodnevno.

Postupak reizolacije je vršen iz svih biljaka sa simptomima bolesti na SMSA podlogu.

### 3.2.3.3. Provera patogenosti *Pectobacterium* spp. i *Dickeya* spp. izolata

Patogenost svih dobijenih *Pectobacterium* spp. i *Dickeya* spp. izolata (Prilog 2) proverena je na biljkama krompira sorte L. Claire. Krtole krompira su zasađene u supstrat (Klasmann-Deilmann GmbH) i gajene su u kontrolisanim uslovima na temperaturi od 22-25 °C, sa normalnim režimom zalivanja. Za svaki izolat korišćene su po tri biljke po eksperimentu. Postupak inokulacije izvršen je nakon pet nedelja, kada su biljke imale formirana 3-4 lista i bile u fazi 103-104 prema BBCH skali. Bakterijska suspenzija pripremljena je suspendovanjem izolata prethodno gajenih na NA podlozi (tokom 48 h na temperaturi od 26 °C) u SDV do finalne koncentracije. Za proveru patogenosti korišćene su dve metode: (i) infiltracija bakterijske suspenzije u stabljiku pomoću šprica i igle ( $\sim 10^8$  ćel/ml) i (ii) zalivanjem supstrata sa 20 ml bakterijske suspenzije ( $\sim 10^9$  ćel/ml) (Tsror *et al.*, 2009). Kao pozitivna kontrola korišćeni su referentni soj *D. solani* MK10 i uporedni *P. carotovorum* Pcc10 soj, dok je kao negativna kontrola korišćena SDV. Inokulisane biljke su održavane u kontrolisanim uslovima temperature (25 °C), vlažnosti vazduha (70-80%) i fotoperioda (16 h dan/8 h noć). Pojava simptoma je svakodnevno praćena vizuelnim pregledom.

Reizolacija je vršena iz svih biljaka sa simptomima bolesti na CVP podlogu.

### 3.2.3.4. Test imunofluorescencije

Serološka metoda - imunofluorescentni test (IF) je korišćen kod 70 *R. solanacearum* izolata prema Vreeburg *et al.* (2016) primenom antitela i konjugata (Rabbit-anti-goat (H+L) FITC) proizvedenih od strane LOEWE Biochemica GmbH (Nemačka). Po 20  $\mu$ l bakterijske suspenzije ( $10^7$ - $10^8$  ćel/ml) ispitivanih izolata kao i referentnog soja *R. solanacearum* PD 2762 je u seriji razblaženja (1:10, 1:100 i 1:1000) nanošeno u bunariće IF pločica. Nakon sušenja na sobnoj temperaturi, radi fiksacije preparata pločice su provlačene kroz plamen. Zatim su u bunariće IF pločica dodavana razblaženja antitela pripremljena prema instrukciji proizvođača i pločice su ostavljene na sobnoj temperaturi u trajanju od 30 min. Nakon inkubacije i ispiranja pločica IF puferom, u bunariće pločica je dodavan FITC (fluorescein-izotiocijanat) konjugat, rastvoren prema uputstvu proizvođača. Pločice su zatim još jednom inkubirane na sobnoj temperaturi u trajanju od 30 min. Po završetku inkubacije pločice su ispirane, osušene, u bunariće je dodato po 5-10  $\mu$ l sterilnog pufera sa glicerolom i pločice su prekrivene ljuspicama. Ovako pripremljene pločice su pregledane epifluorescentnim mikroskopom (Olympus BX51, SAD) pod uljnom imerzijom na uvećanju od 500-1000 puta. Pojava jasno fluorescentnih bakterijskih ćelija je smatrana pozitivnom reakcijom.

### 3.2.4. Genotipske karakteristike izolata

#### 3.2.4.1. Izolacija DNK

Izolacija bakterijske DNK je izvršena prema modifikovanoj metodi koju navode Freschi *et al.* (2005). Pun zahvat eze bakterijske kulture je suspendovan u 500  $\mu$ l SDV. Suspenzija je zagrevana na 100 °C u trajanju od 10 min, a zatim je ohlađena na ledu i centrifugirana na 7600 g u trajanju od 5 min.

Bakterijska DNK je izolovana i prema modifikovanoj CTAB (cetil-trimetil-amonijum-bromid) metodi koju navode Ausubel *et al.* (2003). Polovina zahvata eze čiste bakterijske kulture suspendovana je u 500  $\mu$ l SDV ( $10^6$  ćel/ml) i centrifugirana na 10000 g u trajanju od 10 min. Dobijeni talog je rastvoren u 567  $\mu$ l TE pufera i dodato je 30  $\mu$ l 10% natrijum dodecil sulfata, kao i 3  $\mu$ l proteinaze K (koncentracije 20 mg/ml). Smeša je intenzivno promešana u vorteksu i inkubirana u vodenom kupatilu (30 min na 37 °C). Dalje je sledilo dodavanje 100  $\mu$ l 5M NaCl i ponovno mešanje u vorteksu. Zatim je u smešu je dodavano po 300  $\mu$ l 3% CTAB-a, ona je kratko vorteksovana i ponovo inkubirana tokom 20 min na 65 °C. Po završetku inkubacije, u smešu je dodato 750  $\mu$ l hloroforma nakon čega je centrifugirana (10 min na 10000 g). U ovom postupku dobijen je supernatant koji je prebačen u nove tubice, nakon čega je dodato i 750  $\mu$ l izopropanola i smeša je ponovno centrifugirana (15 min na 10000 g). Nastali talog je ispran sa 1 ml 96% etanola, centrifugiran (15 min na 10000 g) i osušen na sobnoj temperaturi u trajanju od 30 min. Nakon sušenja, dobijena DNK je rastvorena u 50  $\mu$ l TE pufera.

#### 3.2.4.2. Priprema PCR smeše

Smeša za PCR pripremljena od pojedinačnih komponenti se sastojala od: 2,5  $\mu$ l 10  $\times$  KAPA Taq pufera koji sadrži 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5  $\mu$ l 10 mM dNTP, po 1  $\mu$ l od svakog prajmera iz para (10 mM), 0,25  $\mu$ l 5U/ $\mu$ l Taq DNK polimeraze, 18,75  $\mu$ l vode bez nukleaza (Gibco, UK) i po 1  $\mu$ l DNK. Svaki pojedinačni uzorak bio je u konačnoj zapremini od 25  $\mu$ l.

Smeša za PCR sa Master Mix-om je bila finalne zapremine od 25  $\mu$ l i sastojala se od sledećih komponenti: 12,5  $\mu$ l DreamTaq Green PCR Master Mix-a (Thermo Fisher Scientific, USA), po 1  $\mu$ l od svakog korišćenog prajmera (10 mM), 9,5  $\mu$ l ultračiste vode bez nukleaza (Gibco, UK) i po 1  $\mu$ l DNK od svakog uzorka.

Za tri rep-PCR para prajmera: BoxA1R, ERIC1R/ERIC2 i REP1R-I/REP2-I smeša za PCR reakciju za svaki pojedinačni uzorak je bila konačne zapremine od 25  $\mu$ l i sastojala se od 2,5  $\mu$ l 10  $\times$  KAPA Taq pufera B, 0,5  $\mu$ l 10 mM dNTP, po 2  $\mu$ l od svakog prajmera iz para (10 mM), 0,20  $\mu$ l 5U/ $\mu$ l Taq DNK polimeraze, 16,8  $\mu$ l vode bez nukleaza (Gibco, UK) i 1  $\mu$ l genomske DNK uzorka.

#### 3.2.4.3. Identifikacija izolata *R. solanacearum*

Za identifikaciju *R. solanacearum* izolata korišćena su dva specifična para prajmera : PS-1/PS-2 (Patrik & Maiss, 2000) i OLI-1/Y-2 (Seal *et al.*, 1993). Sekvence prajmera, PCR protokoli, kao i očekivane veličine umnoženih fragmenata korišćenih za detekciju i identifikaciju *R. solanacearum* prikazani su u Prilogu 4.

Amplifikovani produkti PCR-a dobijeni korišćenjem PS-1/PS-2 para prajmera su dalje analizirani RFLP metodom (Patrik & Maiss, 2000). Za dobijanje karakterističnih polimorfizama korišćen je Taq I enzim (Fermentas, Lithuania) koji je dodat prema uputstvu proizvođača. Nakon dodavanja enzima produkti su inkubirani 30 min na 60 °C.

Za određivanje biovara izolata *R. solanacearum* korišćena su dva para prajmera: Rs-1-F/Rs-1-R-specifičan za biovare 1 i 2 (divizija II) i Rs-1-F/Rs-3-R-specifičan za biovare 3, 4 i 5 (divizija I) (Patrik *et al.*, 2001).

U svim PCR reakcijama referentni soj *R. solanacearum* PD 2762 je služio kao pozitivna kontrola, dok je uzorak bez DNK predstavljao negativnu kontrolu.

#### 3.2.4.4. Identifikacija izolata *Pectobacterium* spp. i *Dickeya* spp.

Za detekciju i identifikaciju izolata koji pripadaju rodovima *Pectobacterium* i *Dickeya* korišćeni su sledeći specifični parovi prajmera:

- F0145/E2477 za detekciju i identifikaciju *P. carotovorum* (Kettani-Halabi *et al.*, 2013);
- BR1f/L1r za detekciju i identifikaciju *P. brasiliense* (Duarte *et al.*, 2004);
- ECA1f/ECA2r za detekciju i identifikaciju *P. atrosepticum* (De Boer & Ward, 1995);
- ADE1/ADE2 za detekciju i identifikaciju *Dickeya* spp. (Nassar *et al.*, 1996).

U svim PCR reakcijama referentni *D. solani* MK10 i uporedni *P. carotovorum* Pcc10 sojevi su korišćeni kao pozitivna kontrola, dok je PCR smeša bez DNK predstavljala negativnu kontrolu. Sekvence specifičnih prajmera, PCR protokoli, kao i očekivane veličine umnoženih fragmenata koji su korišćeni za detekciju i identifikaciju *Pectobacterium* spp. i *Dickeya* spp. prikazani su u Prilogu 5.

#### 3.2.4.5. Karakterizacija izolata primenom rep-PCR metode

Kod svih ispitivanih izolata (120 izolata) vršeno je umnožavanje repetitivnih elemenata DNK korišćenjem tri rep-PCR para prajmera: BoxA1R (*engl.* BOX elements *Streptococcus pneumoniae*, BOX), ERIC1R/ERIC2 (*engl.* enterobacterial repetitive intergenic consensus, ERIC) i REP1R-1/REP2-I (*engl.* repetitive extragenic palindromic, REP) (Versalovic *et al.*, 1994). Program PCR reakcija i sekvence prajmera prikazani su u Prilogu 6. Za poređenja u slučaju *R. solanacearum* izolata korišćeni su referentni soj *R. solanacearum* PD 2762 kao i uporedni sojevi *R. solanacearum* izolovani 2013. godine, Rs0813, Rs1213 i Rs1613 (Marković *et al.*, 2021a). U slučaju analize *Pectobacterium* spp. i *Dickeya* spp. izolata kao kontrolni sojevi su korišćeni: referentni *D. solani* MK10 i uporedni *P. carotovorum* Pcc10 soj. Za procenu položaja dobijenih profila i konstrukciju UPGMA stabla korišćen je PyElph softverski program verzije 1.4 (Pavel & Vasile, 2012).

#### 3.2.4.6. Horizontalna elektroforeza

Dobijeni PCR produkti su pomoću elektroforeze u slučaju specifičnih prajmera i prajmera konzerviranih gena razdvojeni u 1% horizontalnom agaroznom gelu pri naponu struje od 110 V u trajanju od 30 minuta. Agarozni gel je pripremljen otapanjem 1,5 g agaroze (SERVA Electrophoresis GmbH, Nemačka) u 150 ml 0,5 × TBE pufera, u koji je zatim dodat etidijum-bromid (0,5 µg/ml; SERVA Electrophoresis GmbH, Nemačka). Kao pufer za elektroforezu korišćen je 0,5 × TBE pufer. U prvi bunarić agaroznog gela nanošeno je 5 µl DNK markera (100-3000 bp, NIPPON Genetics). Amplifikovani DNK fragmeniti su posmatrani pod UV svetlom korišćenjem UV transiluminatora (Vilber Lourmat, Francuska).

U slučaju rep-PCR metode produkti su vizualizovani u 1,5% agaroznom gelu, napravljenim kao što je prethodno opisano. Elektroforeza je tekla 3 sata pri naponu struje od 95 V. U ovom postupku je takođe korišćen DNK marker od 100-3000 bp.

#### 3.2.4.7. Genotipizacija i analiza sekvenci više genskih lokusa (MLST/MLSA)

Genotipizacija (MLST) i analiza sekvenci više genskih lokusa (MLSA) kod 33 odabrana *R. solanacearum* izolata (Rs0115, Rs0315, Rs0715, Rs1115, Rs1815, Rs1915, Rs2115, Rs2215, Rs2315, Rs0216, Rs0416, Rs0516, Rs0716, Rs0816, Rs0916, Rs2316, Rs2416, Rs2716, Rs3016, Rs3116, Rs3216, Rs4016, Rs4216, Rs4316, Rs5116, Rs5216, Rs5916, Rs6216, Rs6416, Rs6616, Rs8118, Rs8618 i Rs8918) je izvedena analizom sekvenci pet konzerviranih gena: *adk* (kodira adenzin kinazu), *gapA* (kodira gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazu), *gdhA* (kodira NADP-specifičnu glutamat dehidrogenazu), *gyrB* (kodira DNK žirazu, podjedinice B), *ppsA* (kodira fosfoenolpiruvat sintetazu), kao i dva gena povezana sa virulencijom izolata: *hrpB* (kodira regulatorni protein HrpB) i *fliC* (kodira flagelin) (Castillo & Greenberg, 2007). Radi poređenja i utvrđivanja filogenetskog statusa, korišćeni su i referentni soj *R. solanacearum* PD 2762 [sekvence preuzete iz NCBI (*engl.* National Center for Biotechnology Information-NCBI) baze] kao i uporedni *R. solanacearum* sojevi Rs0813, Rs1213 i Rs1613 (Marković *et al.*, 2021a).



Za MLST/MLSA kod 21 *Pectobacterium* i *Dickeya* izolata (Pcc324, Pcc425, Pcc427, Pcb133, Pcb134, Pcb135, Pcb33, Pcb62, Pcb64, Pcb2544, Pcb2562, Pcb2568, Pcb2811, Pcb2815, Pcb2817, Pcb2833, Pcb2842, Pcb2861, Dd31, Dd32 i Dd44) analizirano je sedam konzerviranih gena: *acnA*, *dnaX*, *gapA*, *icdA*, *mdh*, *pgi* i *proA* (Ma *et al.*, 2007; Sławiak *et al.*, 2009; Moleleki *et al.*, 2013). Navedeni geni redom kodiraju sledeće proteine: akonitat hidratazu A, DNK polimerazu III podjedinice  $\tau$ , gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazu A, izocitrat dehidrogenazu (NADP+), malat dehidrogenazu, glukozu-6-fosfat izomerazu i gama-glutamil fosfat reduktazu. Sekvence referentnog soja *D. solani* MK10 preuzete su iz NCBI baze.

Sekvence svih prajmera, PCR protokoli, kao i očekivane veličine umnoženih fragmenata su prikazani u prilogima 7 i 8. Dobijeni PCR produkti su prečišćeni korišćenjem kitova za prečišćavanje (QIAquick/250 Gel Extraction i Purification Kits; Qiagen GmbH). Nakon prečišćavanja PCR produkti su sekvencirani u kompaniji Macrogen (Amsterdam, Holandija).

Korišćenjem NCBI BLASTn alata, dobijene sekvence su upoređene sa deponovanim sekvencama iz NCBI baze. Sekvence su obrađene pomoću softverskog paketa BioEdit (v 7.1.3.) korišćenjem Clustal W alata i skraćene su na iste dužine. Sekvence *R. solanacearum* izolata skraćene su na dužine od 420 bp (za *adk* gen), 760 bp (za *gapA* gen), 568 bp (za *gdhA* gen), 873 bp (za *gyrB* gen), 635 bp (za *ppsA* gen), 466 bp (za *hrpB* gen) i 289 bp (za *fliC* gen). Kod *Pectobacterium* spp. izolata, sekvence su skraćene na dužine od 252 bp (za *acnA* gen), 462 bp (za *dnaX* gen), 368 bp (za *gapA* gen), 451 bp (za *icdA* gen), 283 bp (za *mdh* gen), 538 bp (za *pgi* gen) i 510 bp (za *proA* gen), dok su *Dickeya* spp. izolata sekvence skraćene na dužine od 360 bp (za *acnA* gen), 415 bp (za *dnaX* gen), 479 bp (za *gapA* gen), 549 bp (za *icdA* gen), 404 bp (za *mdh* gen), 552 bp (za *pgi* gen) i 710 bp (za *proA* gen). Sve sekvence su deponovane u NCBI banku gena (prilozi 9 i 10).

Filogenetska stabla ispitivanih izolata su konstruisana korišćenjem pojedinačnih sekvenci gena i konkatamernih sekvenci koje su dobijene spajanjem više pojedinačnih sekvenci gena. Pomoću softverskog programa jModelTest verzije 2.0.2 (Posada, 2008) i Bajesovog kriterijuma odlučivanja izračunat je najpogodniji evolutivni model za određivanje udaljenosti između nukleotidnih sekvenci ispitivanih izolata. Korišćenjem softverskog paketa MEGA-X (Kumar *et al.*, 2018) su na osnovu sugerisanog modela konstruisana filogenetska stabla *engl.* Maximum likelihood metodom sa 1000 replikacija. Za izolate *R. solanacearum* poredak sekvenci pojedinačnih gena za konkatamerne sekvence je bio sledeći: *adk*, *gapA*, *gdhA*, *gyrB*, *ppsA*, *hrpB* i *fliC*, a ukupna dužina je bila 4011 bp. Kod izolata *Pectobacterium* spp. i *Dickeya* spp. poredak sekvenci pojedinačnih gena za konkatamerne sekvence je bio sledeći: *acnA*, *dnaX*, *gapA*, *icdA*, *mdh*, *pgi* i *proA*, a njihova ukupna dužina je bila 2864 bp za *Pectobacterium* izolate, odnosno 3469 bp za *Dickeya* spp. izolate.

U Prilogu 11. prikazani su sojevi čije sekvence su služile kao uporedne tokom MLSA za *R. solanacearum*, dok su u Prilogu 12. prikazani sojevi čije sekvence su služile kao uporedne tokom MLSA za vrste iz rodova *Pectobacterium* i *Dickeya*. Kao autgrupa u slučaju *R. solanacearum* korišćene su sekvence *R. manniolilytica* LMG 6866 soja (NZ\_CAJPVG010000001), dok su u slučaju *Pectobacterium* i *Dickeya* korišćene sekvence *Yersinia pestis* M2029 soja (NZ\_CP064123).

#### 3.2.4.8. Genealoška analiza haplotipova

Genealoška analiza haplotipova urađena je korišćenjem PopArt programskog softvera verzije 1.7 (Leigh & Bryant, 2015). Metod statističke parsimonije je uz limit poverenja od 95% primenjen prilikom konstrukcije TCS mreže (Templeton, Crandall i Sing-TCS; Clement *et al.*, 2002). Mreže su konstruisane na osnovu konkatamernih sekvenci koje su korišćene za filogenetsku analizu za svaku identifikovanu vrstu bakterija. U slučaju vrste *R. solanacearum* u TCS mrežu su uključene konkatamerne sekvence sojeva iz NCBI baze koji pripadaju filotipu II.

#### **3.2.5. Metabarkoding analiza bakterijskog diverziteta krtola krompira i zemljišta**

Za opisivanje mikrobijalnih zajednica krtola sa ispoljenim simptomima vlažne truleži i krtola bez vidljivih simptoma vlažne truleži vršena je metabarkoding analiza korišćenjem NGS (*engl.* next-generation sequencing) tehnike sekvenciranja. Uzorci za analizu su sakupljeni u septembru 2018.

godine u periodu vađenja krompira (sorta L. Claire) na lokaciji Obrovac. U posmatranom usevu krompira su tokom vegetacije bili prisutni simptomi crne noge. Uzorci K1 i K2 su se sastojali od po tri krtole sa ispoljenim simptomima vlažne truleži. Zajedno sa tim krtolama sakupljena je i zemlja iz okruženja, odnosno dva uzorka zemljišta-Z1 i Z2. Uzorak K3 su činile tri krtole krompira bez vidljivih simptoma bolesti, a odgovarajući uzorak zemljišta iz okruženja ovih krtola je obeležen sa Z3.

Sakupljene krtole su oprane pod tekućom vodom i isprane u fosfatnom puferu. Nakon toga su potopljene u novi pufer i mešane su u orbitalnom šejkeru (200 rpm) u trajanju od 10 min. U sledećem koraku, krtole su ponovo isprane novim puferom, tretirane u ultrazvučnom kupatilu (Bandelin Sonorex RK 103H, Nemačka) u trajanju od 2 min i stavljene na šejkiranje (200 rpm, 15 min). Dobijena masa je proceđena kroz 0,22 µm membranski filter (Isopore™, Merck Millipore, Irska). Izolacija DNK iz uzoraka krompira (200 mg) je izvršena pomoću kita Quick-DNA™ Fungal/Bacterial Miniprep Kit (Zymo Research, SAD), dok je za uzorke zemljišta korišćen PowerSoil® DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Inc., Carlsbad, SAD) prema protokolima proizvođača. Koncentracija izolovane DNK svih uzoraka određena je pomoću Qubit 4 fluorometra (Invitrogen™, SAD). Ovako pripremljena DNK uzoraka je sekvencirana u FISABIO Sequencing Service (Valensija, Španija). Za pripremu biblioteke metagenomskih sekvenci korišćen je Illumina protokol (Cod. 15044223 Rev. A) sa 16S rRNK prajmerima koji kodiraju V3 i V4 regione (5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3' i 5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3'; Klindworth *et al.*, 2013).

Za procenu kvaliteta sekvenci korišćen je program *engl.* prinseq-lite (Schmieder & Edwards, 2011) sa podešenim parametrima: minimalna dužina-50 bp, sečenje 3' kraja sa pragom od 30 bp, srednji tip ocene kvaliteta i kvalitet trimovanja-10 bp. Očitavanja dobijena nakon sekvenciranja korišćenjem Illumina platforme spojena su primenom *engl.* fastq-join programa (Aronesty, 2013). Za spajanje uparenih krajeva, označavanje sekvenci, uklanjanje šumova i himera, korišćen je DADA2 *engl.* pipeline program (Callahan *et al.*, 2016). Analiza dobijenih podataka urađena je u *engl.* R statistics R Core Team (2012) softverskom programu, korišćenjem *ad hoc engl.* pipeline metode. Taksonomska klasifikacija je urađena upotrebom RDP klasifikatora na osnovu *engl.* Ribosomal database project baze (Cole *et al.*, 2009).

Raznolikost alfa i beta diverziteta bakterijskih zajednica utvrđena je poređenjem razlika na taksonomskom nivou reda, familije i roda. Alfa diverzitet određen je analizom operativnih taksonomskih jedinica-OTU (*engl.* operational taxonomic unit) i prikazan je korišćenjem indeksa: Shannon, Simpson, invSimpson i Fisher alfa. Uočeno bogatstvo vrsta unutar uzorka prikazano je OBS (*engl.* observed species richness) indeksom, a procenjeno bogatstvo indeksima: Chao1, Chao1standard greška, ACE i ACE standard greška. Na osnovu dobijenih sekvenci izvršena je procena ukupnog diverziteta na nivou razdela, familije i roda korišćenjem rarefakcione analize. Beta diverzitet određen je i vizualizovan pomoću analize glavnih koordinata (*engl.* principal coordinates analysis, PCoA) (Lê *et al.*, 2008) i klaster analize (*engl.* canonical correspondence analysis, CCA) zasnovanih na Legendre algoritmu (Legendre & Anderson, 1999). Za interaktivnu metagenomsku vizualizaciju distribucije bakterijskih taksona korišćen je Krona prikaz (Ondov *et al.*, 2011). Za sve operativne taksonomske jedinice dodatno je određena homologija sa *Pectobacterium* i *Dickeya* vrstama deponovanim u NCBI bazi, korišćenjem BLAST metode.

Podaci dobijeni sekvenciranjem 16S rRNK gena deponovani su u NCBI BioProject bazu podataka pod brojem: PRJNA563799 (SAMN12688067, SAMN12688068, SAMN12688069, SAMN12688070, SAMN12688071 i SAMN12688072).

### 3.2.6. Određivanje antagonističkog potencijala *B. amyloliquefaciens* sojeva SS-12.6 i SS-38.4

Ranije identifikovani i opisani antagonistički sojevi *B. amyloliquefaciens* SS-12.6 i SS-38.4 (Dimkić *et al.*, 2017) korišćeni su da bi se utvrdila njihova antibakterijska aktivnost prema izolatima dobijenim iz krompira u ovom radu (*R. solanacearum* Rs0115, Rs6616 i Rs8118; *P. carotovorum* Pcc324; *P. brasiliense* Pcb133, Pcb62, Pcb2544, Pcb2811 i Pcb2842; i *D. dianthicola* Dd31). Antagonističko delovanje sojeva SS-12.6 i SS-38.4 ispitano je kod svih testiranih izolata u *in vitro*

uslovima, dok su u *in situ* uslovima testirani izolati vrsta *P. carotovorum*, *P. brasiliense* i *D. dianthicola*, a u *in planta* uslovima izolati bakterije *R. solanacearum*.

### 3.2.6.1. In vitro ogledi

Za postavljanje *in vitro* testova sve fitopatogene bakterije su gajene u istim uslovima, na temperaturi od 26 °C tokom 24-48 h, na odgovarajućim podlogama. Nakon inkubacije, bakterijske kulture su zasejane u LB i ponovo su inkubirane preko noći na temperaturi od 26 °C u orbitalnom šejkeru. Nakon inkubacije, tečne kulture su centrifugirane (10 min na 2000 g), dobijeni supernatant je odbačen, a peleti su rastvoreni u sterilnom 10 mM MgSO<sub>4</sub> puferu. Ovako su dobijene suspenzije finalnih koncentracija 10<sup>6-8</sup> ćel/ml koje su korišćene za dalja ispitivanja.

Antagonistički sojevi *B. amyloliquefaciens* SS-12.6 i SS-38.4 su prvo gajeni na LA podlogama (na 30 °C tokom 24 h), a zatim su preko noći gajeni u LB na temperaturi od 30 °C u orbitalnom šejkeru. Nakon inkubacije izmerene su optičke gustine (*engl.* optical density - OD) korišćenjem spektrofotometra (UV-6300/6300PC double beam MRC, Izrael) na talasnoj dužini od 600 nm. Zatim su kulture centrifugirane (10 min na 2000 g) i dobijene su dve frakcije, pelet i supernatant, koje su korišćene za dalja ispitivanja. Dobijeni peleti su rastvoreni u sterilnom 10 mM MgSO<sub>4</sub> do finalne koncentracije 10<sup>8</sup> ćel/ml i služili su kao pune kulture.

Etil-acetatni ekstrakti antagonističkih sojeva SS-12.6 i SS-38.4 su dobijeni prema metodi koju navode Kuiper *et al.* (2004). Po 1 ml prekonocnih kultura je zasejano u 1000 ml LB i one su inkubirane preko noći na temperaturi od 30 °C u orbitalnom šejkeru. Nakon inkubacije, vršeno je centrifugiranje prekonocnih kultura (20 min na 5000 g) kako bi se dobili supernatanti. Supernatanti su prebačeni u nove erlenmajere i dodati su etil-acetat u istoj zapremini i 30g/l NaCl. Nakon ovog postupka smeše su mešane tokom 2 h na magnetnoj mešalici. Za kompletno sušenje etil-acetatnih frakcija korišćen je rotirajući uparivač (Rotavapor R-215; Buchi, Flawil, Switzerland). Osušene frakcije su rastvorene metanolom do finalne koncentracije od 20 mg/ml, profiltrirane kroz 0,45 µm Durapore<sup>TM</sup> filter (Millipore, Billerica, SAD) i korišćene za dalja ispitivanja.

Antagonistička aktivnost SS-12.6 i SS-38.4 sojeva ispitana je nanošenjem kapi (5 µl) punih kultura na površinu LA medijuma razlivenih u Petri kutije prečnika 90 mm. Na LA je razliveno po 5 ml LA soft agara u koji je dodato 50 µl prethodno pripremljene suspenzije ispitivanog fitopatogenog izolata koncentracije 10<sup>8</sup> ćel/ml. Antagonističko delovanje SS-12.6 i SS-38.4 sojeva je ocenjivano 48 h nakon inkubacije na 30 °C, merenjem zone odsustva rasta (inhibicije) oko nanetih kapi punih kultura. Zona inhibicije je izražena u milimetrima, a antagonistička aktivnost sojeva SS-12.6 i SS-38.4 je ocenjena prema skali: 0 mm-bez aktivnosti; ≤5 mm-slabo; 5-10 mm-umereno; ≥10 mm-izražena antagonistička aktivnost. Eksperiment je postavljen u tri nezavisna ponavljanja.

Delovanje supernatanata i etil-acetatnih ekstrakata antagonističkih sojeva SS-12.6 i SS-38.4 je testirano prema modifikovanoj metodi sa bunarićima koju navode Harris *et al.* (1989). Bunarići su pravljani tako što su u Petri kutije (prečnika 90 mm) sa LA postavljeni odsečeni sterilni nastavci od 200 µl (prečnika 6 mm). Nastavci su zatim prelivevani sa 7 ml LA soft agara izmešanog sa 140 µl suspenzije testiranog izolata koncentracije 10<sup>8</sup> ćel/ml. Nakon stezanja podloge, nastavci su izvađeni, a u formirane bunariće je nanošeno po 50 µl supernatanata/etil-acetatnih ekstrakata antagonističkih sojeva. Petri kutije su postavljene na inkubaciju na 30 °C tokom 48 h. Nakon inkubacije mereni su prečnici zona inhibicije (mm). Eksperiment je postavljen u tri nezavisna ponavljanja.

Za određivanje minimalnih inhibitornih koncentracija (MIK) etil-acetatnih ekstrakata antagonističkih sojeva SS-12.6 i SS-38.4 korišćene su mikrotitracione ploče sa zaobljenim dnom i 96 bunarića. Suspenzije fitopatogena (10<sup>8</sup> ćel/ml) i etil-acetatni ekstrakti antagonističkih sojeva su pripremljeni kao što je prethodno opisano. U ploču zajedno sa LB (80 µl) nanosena je serija razblaženja ekstrakata (0,25-0,032 mg/ml) u zapremini od 20 µl. Pored ispitivanih etil-acetatnih ekstrakata, na svakoj mikrotitracionoj ploči postavljena je kontrola sterilnosti medijuma, odnosno LB medijum, metanol koji je služio kao kontrola rastvarača i streptomycin finalne koncentracije 0,8 mg/ml (Sigma-Aldrich, SAD) koji je služio kao kontrola rasta fitopatogena. Svi fitopatogeni su testirani u triplikatu za oba antagonistička soja. U mikrotitracione ploče je nakon postavljene serije razblaženja u svaki bunarić je dodato po 40 µl LB medijuma i 10 µl suspenzije fitopatogena. Nakon

inkubacije od 24 h na 30 °C u svaki bunarić je dodato 22 µl resazurina (TCI, Belgija) koncentracije 0,675 mg/ml. Ploče su zatim ponovo inkubirane na 30 °C. Nakon 2-3 h vršeno je očitavanje promene boje resazurina (ljubičasta boja resazurina je prelazila u ružičastu). Najmanja koncentracija pri kojoj nije dolazilo do promene boje označavala je MIK. Da bi se odredila minimalna baktericidna koncentracija (MBK) na LA je zasejano po 5 µl medijuma iz bunarića u kojima nije dolazilo do promene boje. Nakon inkubacije (24 h na temperaturi od 30 °C) posmatran je porast bakterija, a najniža koncentracija pri kojoj porast nije uočen označena je kao MBK.

Za određivanje sposobnosti produkcije biofilma korišćene su suspenzije fitopatogenih izolata i mikrotitarske ploče sa ravnim dnom (96 bunarića). U bunariće je naliveno po 180 µl LB i 20 µl bakterijske suspenzije testiranog fitopatogenog izolata ( $10^7$  ćel/ml). Bunarići u koje je dodat samo LB (200 µl) služili su kao negativna kontrola. Svi fitopatogeni su testirani u triplikatu za oba antagonistička soja. Nakon inkubacije od 48 h na temperaturi od 30 °C, sadržaj mikrotitarskih ploča je odliven i ploče su ispirane tri puta sa po 300 µl fosfatnog pufera. Zatim je u bunariće dodato po 200 µl metanola i ploče su inkubirane 20 min na sobnoj temperaturi. U sledećem koraku posle inkubacije, metanol je odliven i ploče su osušene na sobnoj temperaturi. U osušene bunariće dodavano je po 150 µl 2% kristal violeta i ploče su inkubirane 15 min, a zatim su isprane tekućom vodom. Nakon 24 h u bunarići su isprani, dodat je apsolutni etanol (200 µl po bunariću) i očitana je OD vrednost na 570 nm korišćenjem čitača za mikrotitarske ploče. Za svaku mikrotitracionu ploču definisana je ODc (*engl.* „cut off”) vrednost kao tri standardne devijacije iznad srednje vrednosti OD negativne kontrole. Za određivanje kategorije produkcije biofilma korišćena je skala: kategorija 0-nema formiranja biofilma ( $OD \leq ODc$ ), kategorija 1-slabá sposobnost formiranja biofilma ( $ODc < OD \leq 2 \times ODc$ ), kategorija 2-umerena sposobnost formiranja biofilma ( $2 \times ODc < OD \leq 4 \times ODc$ ), kategorija 3-izražena sposobnost formiranja biofilma ( $4 \times ODc < OD$ ) (Stepanović *et al.*, 2003).

U eksperimentu uticaja etil-acetatnih ekstrakata antagonističkih SS-12.6 i SS-38.4 sojeva na formiranje biofilma korišćene su mikrotitarske ploče sa ravnim dnom (96 bunarića). U svaki bunarić u ukupnoj zapremini od 200 µl nanošena je suspenzija fitopatogenih izolata ( $10^6$  ćel/ml) zajedno sa LB medijumom koji je obogaćen sa 0,5% glukoze. Svi fitopatogeni su testirani u triplikatu za oba antagonistička soja. Pripremljene ploče inkubirane su 24 h na temperaturi od 30 °C. Nakon inkubacije sadržaj iz bunarića je izvučen i ploče su isprane SDV. U bunariće je zatim dodat novi LB sa etil-acetatnim ekstraktima antagonističkih sojeva SS-12.6 i SS-38.4 u sledećim koncentracijama: MIK,  $\frac{1}{2}$  MIK,  $\frac{1}{4}$  MIK i  $\frac{1}{8}$  MIK, u finalnoj zapremini od 200 µl. Ploče su potom ponovo inkubirane tokom 24 h na temperaturi od 30 °C. Nakon inkubacije bunarići su ponovo isprani SDV i u njih je dodato po 200 µl kristal violeta (0,1%). Ploče su ostavljene na sobnoj temperaturi tokom 15 min, a zatim je iz bunarića izvučena boja, isprani su SDV i dodavano je po 200 µl apsolutnog etanola. Ovako pripremljene ploče su ostavljene da stoje 10 min na sobnoj temperaturi. Rastvoreni kristal violet je potom kvantifikovan merenjem OD na 570 nm korišćenjem čitača za mikrotitarske ploče. Procenat inhibicije formiranja biofilma u odnosu na kontrolu izračunat je prema sledećoj formuli:

$$\text{Inhibicija formiranja biofilma (IFB \%)} = [(OD_{\text{kontrola}} - OD_{\text{uzorak}}) / OD_{\text{kontrola}}] \times 100$$

### 3.2.6.2. In situ ogledi

Antagonistički potencijal *B. amyloliquefaciens* SS-12.6 i SS-38.4 sojeva ispitan je na krtolama krompira kod sedam fitopatogenih *Pectobacetrium* i *Dickeya* izolata i to: Pcc324, Pcb133, Pcb62, Pcb2544, Pcb2811, Pcb2842 i Dd31, prema modifikovanoj metodi koju navode Hadizadeh *et al.* (2019). Krtole krompira su oprane tekućom vodom, površinski su sterilisane 70% etanolom i osušene. Nakon sušenja, na krtolama je iglom napravljeno 60 uboda (dubine oko 5 mm). Ovako pripremljene krtole podeljene su u četiri grupe. Prva grupa krtola (tretman) potopljena je u suspenzije antagonističkih sojeva SS-12.6 i SS-38.4 (sojevi su gajeni na LA tokom 24 h na 30 °C, a zatim su suspendovani u SDV do finalne koncentracije  $2 \times 10^8$  ćel/ml) u trajanju od 30 min. Krtole su zatim osušene na filter papiru tokom 2 h na sobnoj temperaturi. Nakon sušenja krtole su inokulisane sa suspenzijama fitopatogenih izolata (izolati su gajeni na odgovarajućim podlogama tokom 24 h na 26 °C, a zatim su suspendovani u SDV do finalne koncentracije  $10^8$  ćel/ml) korišćenjem ručne prskalice.

Za svaki tretman (SS-12.6+Pcc324, SS-12.6+Pcb133, SS-12.6+Pcb62, SS-12.6+Pcb2544, SS-12.6+Pcb2811, SS-12.6+Pcb2842, SS-12.6+Dd31, SS-38.4+Pcc324, SS-38.4+Pcb133, SS-38.4+Pcb62, SS-38.4+Pcb2544, SS-38.4+Pcb2811, SS-38.4+Pcb2842, SS-38.4+Dd31) je korišćeno po pet krtola, čija je težina izmerena korišćenjem tehničke vage. Krtole potopljene u SDV, a zatim inokulisane suspenzijama fitopatogenih izolata služile su kao pozitivna kontrola (druga grupa krtola), dok su krtole potopljene samo u SDV služile kao negativna kontrola (treća grupa krtola). Da bi se eliminisao uticaj antagonističkih sojeva SS-12.6 i SS-38.4 na vlažnu trulež krtola, one su prvo potopljene u SDV, a zatim u suspenziju ovih sojeva (četvrta grupa krtola). Po pet krtola je korišćeno za svaku kontrolu. Sve krtole su ostavljene da se osuše, a zatim su postavljene u plastične kutije sa navlaženim filter papirom i inkubirane na sobnoj temperaturi.

Ocena ogleada izvršena je prvog, petog i 15. dana nakon inkubacije i to: (i) vizuelno i (ii) merenjem težine svake krtole.

Vizuelna procena zasnivala se na oceni svake krtole prema skali od 0 do 5 koju su definisali Colyer & Mount (1984) (0-krtola bez vlažne truleži i 5-kompletno trula krtola). Intenzitet oboljenja (IO) procenjen vizuelno je izračunat prema formuli:

$$IO (\%) = \frac{\sum (f \times v)}{N \times X} \times 100$$

gde je  $f$ - ocena krtole,  $v$ -krtola u svakoj klasi,  $N$ -broj ocenjivanih krtola i  $X$ -najveća vrednost skale (McKinney, 1923).

Ocena intenziteta oboljenja na bazi razlike u težini krtola vršena je merenjem težine krtola pre tretmana i nakon prvog, petog i 15. dana tretmana (nakon uklonjenog maceriranog tkiva pod mlazom tekuće vode). Intenzitet oboljenja procenjen je i izračunat prema formuli koju navode Hadizadeh *et al.* (2019):

$$IO (\%) = \frac{[\text{težina krtole pre tretmana (g)} - \text{težina krtole posle tretmana (g)}]}{\text{težina krtole pre tretmana (g)}} \times 100$$

Antagonistički efekat *B. amyloliquefaciens* sojeva SS-12.6 i SS-38.4, odnosno njihov uticaj na smanjenje intenziteta oboljenja-efikasnost tretmana (ET) izračunati su prema formuli koju navode Hadizadeh *et al.* (2019):

$$ET (\%) = \frac{[\text{gubitak težine u kontroli (g)} - \text{gubitak težine u tretmanu (g)}]}{\text{gubitak težine u kontroli (g)}} \times 100$$

### 3.2.6.3. *In planta* ogleadi

Potencijal antagonističkih sojeva *B. amyloliquefaciens* SS-12.6 i SS-38.4 ispitan je kod tri *R. solanacearum* izolata (Rs0115, Rs6616, i Rs8118) i izveden je prema modifikovanoj metodi koju navode Kheirandish & Harighi (2015). Plastične saksije sterilisane 70% etanolom, napunjene su sa 2 kg Klasmann-Deilmann GmbH supstrata za gajenje biljaka. Okca krompira su površinski sterilisana (70% etanolom) i potopljena u suspenziju antagonističkih sojeva SS-12.6 i SS-38.4 (sojevi su gajeni na LA tokom 24 h na 30 °C, suspendovani u SDV do finalne koncentracije  $2 \times 10^8$  ćel/ml), u trajanju od 1 h. Zatim su okca ostavljena na filter papir da se osuše, nakon čega su zasađena u saksije. Nakon 24 h, napravljena je suspenzija fitopatogenih izolata koncentracije  $10^8$  ćel/ml (izolati su gajeni na odgovarajućoj podlozi tokom 48 h na 26 °C) i po 10 ml bakterijske suspenzije je sipano u saksije (tretman). Okca potopljena u SDV, osušena i zasađena na isti način, služila su kao negativna kontrola, dok su okca koja su tretirana samo suspenzijom testiranih fitopatogenih izolata služila kao pozitivne kontrole. Okca tretirana samo suspenzijama antagonističkih sojeva SS-12.6 i SS-38.4 služila su da bi se ispitaio njihov uticaj na porast biljaka. Saksije su postavljene u komoru za gajenje biljaka, na temperaturu od 25 °C i uz fotoperiod 16 h dan/8 h noć. Biljke su redovno zalivane. Po pet biljaka je korišćeno za svaki tretman i kontrole.

Ocena biljaka vršena je 60 dana nakon dana sadnje. Biljke su ocenjene vizuelno (određivanjem broja uvelih listova) i merenjem težine. Prvo je izmerena je težina svežih biljaka na tehničkoj vagi, a

nakon toga biljke su postavljene u sušnicu na temperaturu od 75 °C tokom 48 h. Nakon sušenja, ponovo je merena težina biljaka na tehničkoj vagi.

Intenzitet oboljenja i efikasnost tretmana antagonističkih sojeva SS-12.6 i SS-38.4 izračunati su korišćenjem sledećih formula (Kheirandish & Harighi, 2015):

$$\text{IO (\%)} = \frac{\text{broj uvelih listova po tretmanu}}{\text{ukupan broj listova po tretmanu}} \times 100$$

$$\text{ET (\%)} = \frac{(\text{IO u kontrolnim saksijama} - \text{IO u saksijama sa tretmanom})}{\text{IO u kontrolnim saksijama}} \times 100$$

#### 3.2.6.4. Statistička analiza

Za statističku analizu dobijenih rezultata dobijenih u *in vitro*, *in situ* i *in planta* ogledima, korišćen je program Minitab v. 19. Dobijeni podaci su podvrgnuti analizi varijanse (ANOVA) primenom *post hoc* Tukey's HSD testa. U slučaju kada je vrednost  $p < 0,05$  rezultati su smatrani statistički značajnim.

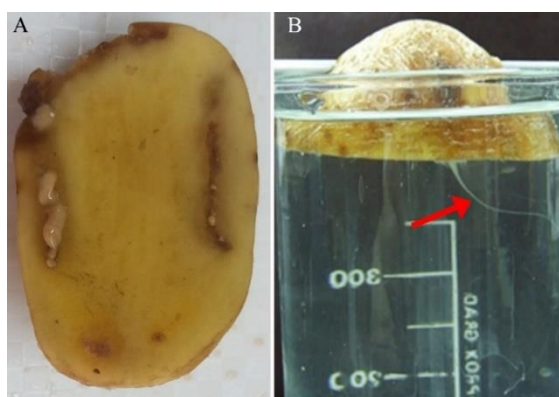
## 4. REZULTATI

### 4.1. DETEKTOVANE BAKTERIOZE KROMPIRA

U periodu monitoringa krompira od 2015. do 2019. godine utvrđeno je prisustvo dve bakteriozne bolesti: mrke truleži krtola krompira i crne noge i vlažne truleži krtola krompira.

#### 4.1.1. Mrka trulež krtola krompira

U petogodišnjem periodu tokom vegetacije u usevima krompira na nadzemnom delu biljaka nisu uočeni simptomi bakteriozne uvelosti. Prilikom skladištenja krompira kod 229 uzoraka uočeni su simptomi mrke truleži krtola krompira (Slika 7A). Bolest se ispoljavala u vidu promene boje i strukture provodnog tkiva krtola, iz kojih je nakon par minuta dolazilo do isticanja beličastog eksudata. Slično je beleženo i prilikom izvođenja brzog dijagnostičkog testa (Slika 7B).



**Slika 7.** Poprečni presek krtole sa simptomima mrke truleži: A) isticanje eksudata iz zaražene krtole; B) pozitivan brzi dijagnostički test, isticanje eksudata iz krtole u vodu (crvena strelica)  
(Marković *et al.*, 2021a)

Simptomi koji su zapaženi sa spoljne strane krtola su bili u vidu nekrotičnih površina u zoni okaca i pupčanog dela (Slika 8A, B). Kod pojedinih krtola u okviru tih površina uočene su i sitne pukotine veličine 2-3 mm. Takođe, sa spoljne strane krtola beleženo je isticanje eksudata kroz okca (Slika 8C). U zonama okaca zemlja je bila zalepljena i teško se skidala sa krtola. Kod krtola kod kojih je bolest bila u podmakloj fazi uočavalo se odvajanje kore od srži (Slika 8D). Na poprečnom preseku ovih krtola uočavale su se promene boje provodnog tkiva od svetlo do tamno braon boje (Slika 8E). Kod nekih krtola, pored promene boje, bila je uočljiva i nekroza kako provodnog tako i okolnog tkiva. U nekim slučajevima, iako je boja provodnog tkiva bila nepromenjena, uočeno je isticanje eksudata.

Uzorci krompira (229 uzoraka) sa potencijalno pozitivnim krtolama na prisustvo mrke truleži sakupljeni su u 2015. godini sa lokaliteta S. Miletić (Crisps4all-Cr4all, 48 uzoraka i VR808, 35 uzoraka) i Stapar (VR808, 5 uzoraka); u 2016. godini sa lokaliteta Boleč (Panda, 1 uzorak), Sombor (L. Claire, 29 uzoraka i Piro1, 67 uzoraka), S. Miletić (Brooke, 15 uzoraka i Cr4all, 13 uzoraka) i Stapar (L. Claire, 8 uzoraka i VR808, 7 uzoraka) i u 2018. godini sa lokaliteta Zmajev0 (Rudolph, 1 uzorak). Na ostalim usevima i sakupljenim uzorcima u 2015, 2016. i 2018. godini, kao i u 2017. i 2019. godini nisu detektovani simptomi bolesti bakteriozne uvelosti i mrke truleži krompira.



**Slika 8.** Simptomi mrke truleži krtola krompira. Spoljašnji simptomi: A) mrko obojenje u zoni okaca sa sitnim pukotinama; B) nekroza u pupčanom delu krtole; C) isticanje bakterijskog eksudata kroz okca (crvena strelica); D) odvajanje kore od srži krtole. Unutrašnji simptomi: E) nekroza provodnog tkiva krtola [foto S. Marković (A-C); Marković *et al.*, 2021a (D, E)]

#### 4.1.2. Crna noga i vlažna trulež krtola krompira

Simptomi crne noge i vlažne truleži krtola uočeni su tokom vegetacije u usevima krompira na kojima je vršen monitoring na lokalitetima: Kulpin (2016. i 2019. godine) Feketić, Kula i Obrovac (2018. godine) i Maglić (2018. i 2019. godine). Na ostalim usevima, u 2016, 2018. i 2019. godini, kao i u 2015. i 2017. godini pojava ove bolesti je bila slabog intenziteta ili je odsustvovala, te stoga uzorci za dijagnostiku bolesti nisu sakupljeni. U 2016. i 2019. godini, prvi simptomi bolesti su se javili početkom juna, a u 2018. godini su javili sredinom maja.

Prvi simptomi bolesti zabeleženi su u fazi zatvaranja redova useva (faza 303-309 BBCH skale) u formi uvelosti vršnih delova biljaka (3-4 najmlađa lista i vršni deo stabljike) (Slika 9A). Na nekim listovima bili su vidljivi simptomi uvijanja lišća i to spoljnih ivica ka licu lista, kao i nekroza koja se širila od vršnog dela lista ka lisnoj dršci (Slika 9B). Pregledom useva ustanovljeno je da su obolele biljke sporadično raspoređene u njivi i da pojava uvelosti nije nestajala u kasno-večernjim satima.



**Slika 9.** Simptomi crne noge zabeleženi početkom juna (faza 303-309 BBCH skale): A) venjenje vršnog dela biljke; B) uvijanje spoljnih ivica listova ka licu i nekroza vršnog dela lista (crvena strelica) (foto S. Marković)

U fazi formiranja krtola krompira (faza 407-408 BBCH skale) utvrđeno je da se uvelost sa vršnih delova proširila na 1-2 cele stabljike obolelih biljaka (biljke su u proseku imale po 6 stabljika). Kod pojedinih biljaka je uočeno crnilo prizemnog dela stabljika dužine 5-15 cm (Slika 10A). Kod većine



biljaka beležena je pojava nekrotičnih lezija na stablu dužine 1-10 cm. Lezije su bile svetle do mrke boje, smeštene na korenovima i donjim i srednjim delovima stabala (Slika 10B-E). Kada su lezije nalažene u pazuhu listova uočeno je sušenje tih listova (Slika 10B). U okviru nekih mrkih lezija zabeležene su pukotine veličine 2-3 cm (Slika 10E). Na uzdužnom preseku korenova i stabala obolelih biljaka uočena je nekroza provodnih tkiva (Slika 10F, G).



**Slika 10.** Simptomi crne noge krompira zabeleženi sredinom juna (faza 407-408 BBCH skale): A) crna noga stabljike; B) mrke lezije na prizemnim delu stabljike; C) mrke lezije na korenu; D) svetlo braon lezije smeštene na stabljici; E) pukotine na stabljici u okviru mrke lezije; F) nekroza provodnih tkiva korena; G) nekroza provodnih tkiva stabljike [foto S. Marković (A, C-G); Marković *et al.*, 2021b (B)]

Krajem juna i početkom jula (faza 600-709 BBCH skale), u usevima krompira su bila vidljive površine sa obolelim biljkama (na tim mestima biljke su bile uvele, nekrotične, trule i delimično ili skroz polegnute) (Slika 11A, B). Vađenjem biljaka sa simptomima bolesti zabeležene su delimično ili potpuno trule krtole (Slika 11C-E).



**Slika 11.** Simptomi crne noge krompira zabeleženi krajem juna i početkom jula (faza 600-709 BBCH skale):  
 A) žarišta obolelih biljaka; B) mrka lezija na stabljici sa pukotinom; C i D) delimično trule krtola;  
 E) potpuno trule krtole na obolelim biljkama (foto S. Marković)

Sredinom jula kada je krompir bio u fazi završetka vegetacije (faza 905-907 BBCH skale) broj i dijametar površina koje su činile osušene i trule biljke se povećao i na tim mestima zemlja je bila ogoljena (Slika 12). Nakon vađenja krompira (u periodu od kraja avgusta do kraja oktobra), na zaraženim usevima primećen je velik broj trulih i raspalih krtola karakterističnog neprijatnog mirisa.

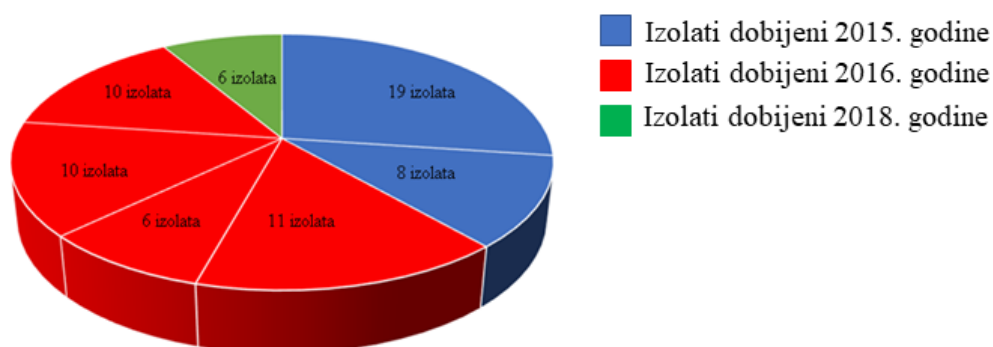


**Slika 12.** Simptomi crne noge krompira zabeleženi sredinom jula (faza 905-907 BBCH skale): površine sa osušenim i trulim biljkama na kojima je zemlja bila ogoljena (foto S. Marković)

## 4.2. IZOLACIJA BAKTERIJA

### 4.2.1. Izolacija bakterija iz krtola sa simptomima mrke truleži

Izolacijama sprovedenim iz uzoraka sa simptomima mrke truleži krtola na SMSA podlozi nakon inkubacije od 72 h dobijene su brojne kolonije, među kojima su dominirale fluidne, slabo mukoidne kolonije veličine oko 2-3 mm, nepravilnog oblika, sa crveno obojenim centrom i provodno-beličastim obručem oko centra. Izgled ovih kolonija je odgovarao kolonijama referentnog soja *R. solanacearum* PD 2762. Kolonije čistih kultura koje su se formirale na SPA posle 72 h inkubacije bile su beličasto krem boje sa bisernim sjajem, nepravilne, fluidne, veličine 3-4 mm, pljosnate, sa ravnim ivicama. Nakon pet dana inkubacije, kod svih ispitivanih izolata kao i kod referentnog soja *R. solanacearum* PD 2762 u SPA podlozi se stvarao mrki pigment. Iz uzoraka sa simptomima mrke truleži krtola ukupno 70 izolata je odabrano za dalji rad (Slika 13; Prilog 1).

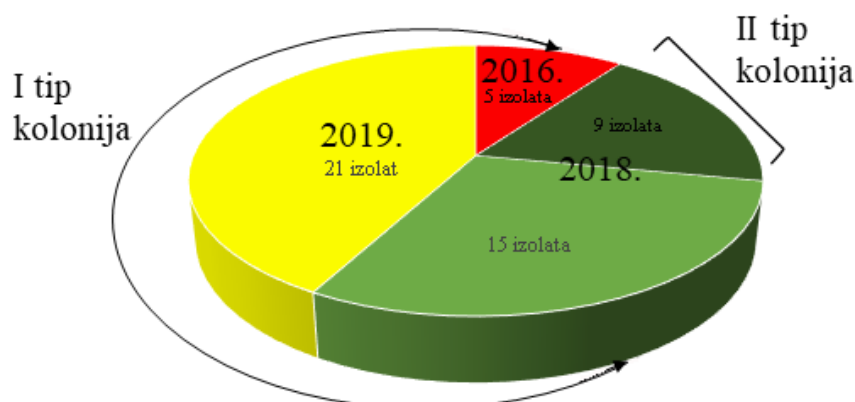


**Slika 13.** Distribucija dobijenih izolata iz krtola sa simptomima mrke truleži prema godini izolacije (obeleženo bojama) i u okviru godina po lokalitetima (Prilog 1)

Pregledom MTNA i NDA podloga nakon pet i sedam dana inkubacije nije zabeležen porast kolonija koje su ličile na kolonije referentnog soja *C. sepedonicus* PD 406.

#### 4.2.2. Izolacija bakterija iz biljaka i krtola sa simptomima crne noge i vlažne truleži

Iz uzoraka sa simptomima crne noge i vlažne truleži krtola krompira nakon izolacije na CVP podlogama je nakon 48 h došlo do obrazovanja brojnih kolonija bakterija među kojima su dominirale beličasto-krem kolonije koje su u podlozi formirale udubljenja. Nakon 48 h inkubacije, na NA podlogama su se obrazovala dva tipa kolonija. Prvi tip je podrazumevao okrugle i sitnije kolonije prečnika 1-2 mm, beličasto krem boje, glatke, blago ispupčene, sa ravnim ivicama, dok je drugi tip podrazumevao nepravilne, krupnije kolonije prečnika 2-3 mm, definisanih ivica i beličasto-krem boje. Iz 50 uzoraka sa simptomima crne noge i vlažne truleži krtola krompira ukupno 50 izolata je odabrano za dalji rad (Slika 14; Prilog 2). Iz 20 uzoraka sakupljenih na lokalitetima Feketić i Kula 2018. godine izolacija nije bila uspešna.



Slika 14. Distribucija dobijenih izolata iz krtola sa simptomima crne noge i vlažne truleži prema godini izolacije i tipu kolonija

### 4.3. FENOTIPSKE KARAKTERISTIKE

#### 4.3.1. Biohemijsko-fiziološke karakteristike izolata

Prema rezultatima biohemijsko-fiziološke karakterizacije izolata iz Tabele 2 mogle su se uočiti tri grupe.

Prvu grupu su činili izolati poreklom sa krtola sa simptomima mrke truleži (Prilog 1). Izolati iz ove grupe su se drastično razlikovali od izolata iz druge i treće grupe. Izolati su bili aerobi, nisu rasli pri temperaturama od 4 °C i 37 °C i nisu bili tolerantni na 5% NaCl. Ova grupa izolata je koristila maltozu, laktozu i celobiozu, a nije oksidovala manitol, sorbitol i dulcitol. Isti rezultati su dobijeni i za referentni soj *R. solanacearum* PD 2762, što je na osnovu biohemijsko-fizioloških karakteristika ukazivalo na pripadnost svih izolata ovoj vrsti i biovaru 2.

Za svih 50 izolata koji su bili poreklom iz uzoraka sa simptomima crne noge i vlažne truleži krtola krompira (Prilog 2) utvrđeno je da su fakultativni anaerobi. Rezultati ispitanih biohemijsko-fizioloških karakteristika izolata su pokazali da među njima postoje dve grupe koje su se poklapale sa referentnim *D. solani* MK10 i uporednim *P. carotovorum* Pcc10 sojevima, a bile su u saglasnosti sa podelom izolata prema tipu kolonija. Između ove dve grupe izolata utvrđena je razlika u produkciji indola, metabolizmu arginin-dehidrolaze i korišćenju tartarata, kao i porastu pri temperaturi od 4 °C (Tabela 2). Prema dobijenim rezultatima izolati su pokazali pripadnost rodovima *Pectobacterium* i *Dickeya*.

**Tabela 2.** Biohemijsko-fiziološke karakteristike izolata

	Metabolizam glukoze	Produkcija indola	Produkcija H <sub>2</sub> S	Produkcija tirozinaze	Redukcija nitrata	Aktivnost arginin- dehidrolaze	Hidroliza želatina	Hidroliza škroba	Hidroliza eskulina	Korišćenje tartarata	Rast pri temperaturi od 4 °C	Rast pri temperaturi od 37 °C	Tolerancija prema NaCl	Određivanje biovara	Pektolička aktivnost
Rs0115	O+/F-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	b2	-
Rs0215	O+/F-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	b2	-
Rs0315	O+/F-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	b2	-
Rs0415	O+/F-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	b2	-
Rs0515	O+/F-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	b2	-
Rs0615	O+/F-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	b2	-
Rs0715	O+/F-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	b2	-
Rs0815	O+/F-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	b2	-
Rs0915	O+/F-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	b2	-
Rs1015	O+/F-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	b2	-
Rs1115	O+/F-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	b2	-
Rs1215	O+/F-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	b2	-
Rs1315	O+/F-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	b2	-
Rs1415	O+/F-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	b2	-
Rs1515	O+/F-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	b2	-
Rs1715	O+/F-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	b2	-
Rs1815	O+/F-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	b2	-
Rs1915	O+/F-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	b2	-
Rs2015	O+/F-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	b2	-
Rs2115	O+/F-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	b2	-
Rs2215	O+/F-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	b2	-
Rs2315	O+/F-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	b2	-
Rs2415	O+/F-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	b2	-
Rs2515	O+/F-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	b2	-
Rs2615	O+/F-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	b2	-
Rs2715	O+/F-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	b2	-
Rs2815	O+/F-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	b2	-
Rs0116	O+/F-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	b2	-
Rs0216	O+/F-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	b2	-
Rs0316	O+/F-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	b2	-
Rs0416	O+/F-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	b2	-
Rs0516	O+/F-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	b2	-
Rs0616	O+/F-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	b2	-
Rs0716	O+/F-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	b2	-
Rs0816	O+/F-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	b2	-
Rs0916	O+/F-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	b2	-
Rs1016	O+/F-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	b2	-
Rs1116	O+/F-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	b2	-
Rs2116	O+/F-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	b2	-

Rs2316	O+/F-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	b2	-
Rs2416	O+/F-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	b2	-
Rs2516	O+/F-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	b2	-
Rs2616	O+/F-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	b2	-
Rs2716	O+/F-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	b2	-
Rs3016	O+/F-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	b2	-
Rs3116	O+/F-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	b2	-
Rs3216	O+/F-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	b2	-
Rs3916	O+/F-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	b2	-
Rs4016	O+/F-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	b2	-
Rs4116	O+/F-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	b2	-
Rs4216	O+/F-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	b2	-
Rs4316	O+/F-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	b2	-
Rs4716	O+/F-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	b2	-
Rs5116	O+/F-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	b2	-
Rs5216	O+/F-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	b2	-
Rs5316	O+/F-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	b2	-
Rs5416	O+/F-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	b2	-
Rs5516	O+/F-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	b2	-
Rs5916	O+/F-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	b2	-
Rs6116	O+/F-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	b2	-
Rs6216	O+/F-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	b2	-
Rs6416	O+/F-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	b2	-
Rs6516	O+/F-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	b2	-
Rs6616	O+/F-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	b2	-
Rs8118	O+/F-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	b2	-
Rs8218	O+/F-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	b2	-
Rs8318	O+/F-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	b2	-
Rs8518	O+/F-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	b2	-
Rs8618	O+/F-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	b2	-
Rs8918	O+/F-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	b2	-
Pcc322	O+/F+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	NT	+
Pcc323	O+/F+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	NT	+
Pcc324	O+/F+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	NT	+
Pcc425	O+/F+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	NT	+
Pcc427	O+/F+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	NT	+
Pcb131	O+/F+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	NT	+
Pcb133	O+/F+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	NT	+
Pcb134	O+/F+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	NT	+
Pcb135	O+/F+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	NT	+
Pcb136	O+/F+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	NT	+
Pcb138	O+/F+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	NT	+
Pcb139	O+/F+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	NT	+
Dd31	O+/F+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	NT	+
Dd32	O+/F+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	NT	+

Dd35	O+/F+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	NT	+
Dd37	O+/F+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	NT	+
Dd41	O+/F+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	NT	+
Dd42	O+/F+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	NT	+
Dd44	O+/F+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	NT	+
Dd46	O+/F+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	NT	+
Dd47	O+/F+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	NT	+
Pcb33	O+/F+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	NT	+
Pcb34	O+/F+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	NT	+
Pcb38	O+/F+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	NT	+
Pcb39	O+/F+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	NT	+
Pcb61	O+/F+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	NT	+
Pcb62	O+/F+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	NT	+
Pcb64	O+/F+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	NT	+
Pcb67	O+/F+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	NT	+
Pcb2531	O+/F+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	NT	+
Pcb2538	O+/F+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	NT	+
Pcb2544	O+/F+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	NT	+
Pcb2549	O+/F+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	NT	+
Pcb2562	O+/F+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	NT	+
Pcb2563	O+/F+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	NT	+
Pcb2568	O+/F+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	NT	+
Pcb2811	O+/F+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	NT	+
Pcb2812	O+/F+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	NT	+
Pcb2813	O+/F+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	NT	+
Pcb2815	O+/F+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	NT	+
Pcb2817	O+/F+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	NT	+
Pcb2819	O+/F+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	NT	+
Pcb2833	O+/F+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	NT	+
Pcb2838	O+/F+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	NT	+
Pcb2839	O+/F+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	NT	+
Pcb2841	O+/F+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	NT	+
Pcb2842	O+/F+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	NT	+
Pcb2844	O+/F+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	NT	+
Pcb2847	O+/F+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	NT	+
Pcb2861	O+/F+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	NT	+
<i>R. solanacearum</i> PD 2762	O+/F-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	b2	-
<i>P. carotovorum</i> Pcc10	O+/F+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	NT	+
<i>D. solani</i> MK10	O+/F+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	NT	+
<i>P. fluorescens</i> KBNS201	O+/F-	NT	NT	NT	NT	+	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
<i>X. c. pv. phaseoli</i> KBNS204	NT	-	-	NT	+	NT	NT	-	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
<i>E. coli</i> KBNS205	O+/F+	+	-	NT	-	NT	-	-	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
<i>X. c. pv. vesicatoria</i> KBNS206	NT	-	-	NT	-	NT	NT	+	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT

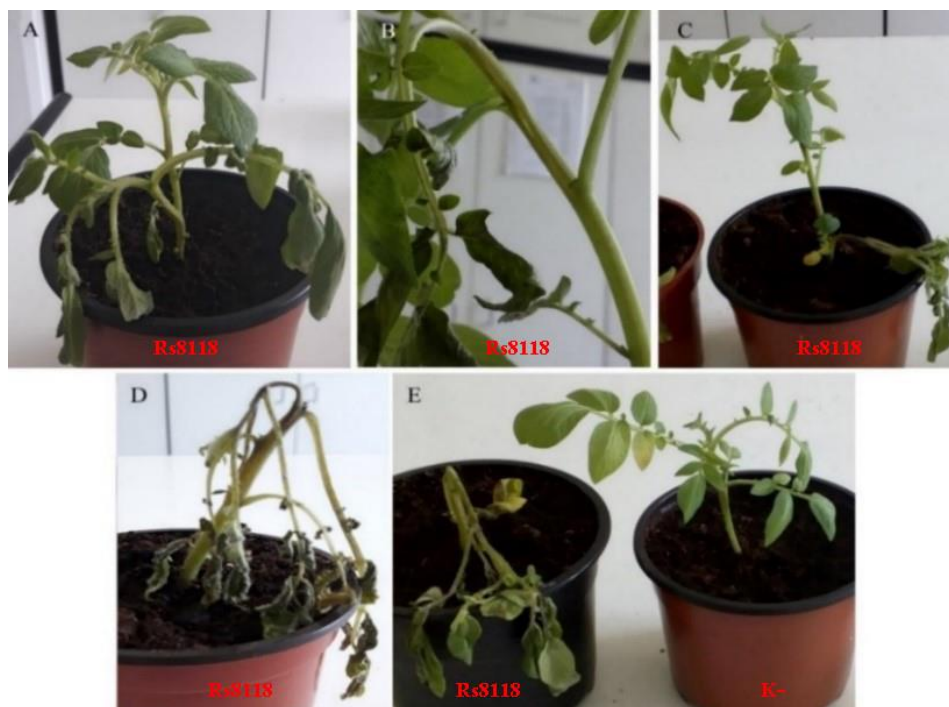
„+“ pozitivna reakcija; „-“ negativna reakcija; „NT“ nije testirano

Izolati poreklom iz krtola sa simptomima mrke truleži nisu izazvali maceraciju tkiva na kriškama krompira. Svi ispitivani izolati dobijeni iz krtola sa simptomima crne noge i vlažne truleži krtola su na kriškama krompira nakon 24-48 h inkubacije prouzrokovali maceraciju tkiva praćenu neprijatnim mirisom (Tabela 2).

### 4.3.2. Dokazivanje patogenosti

#### 4.3.2.1. Patogenost *R. solanacearum* izolata

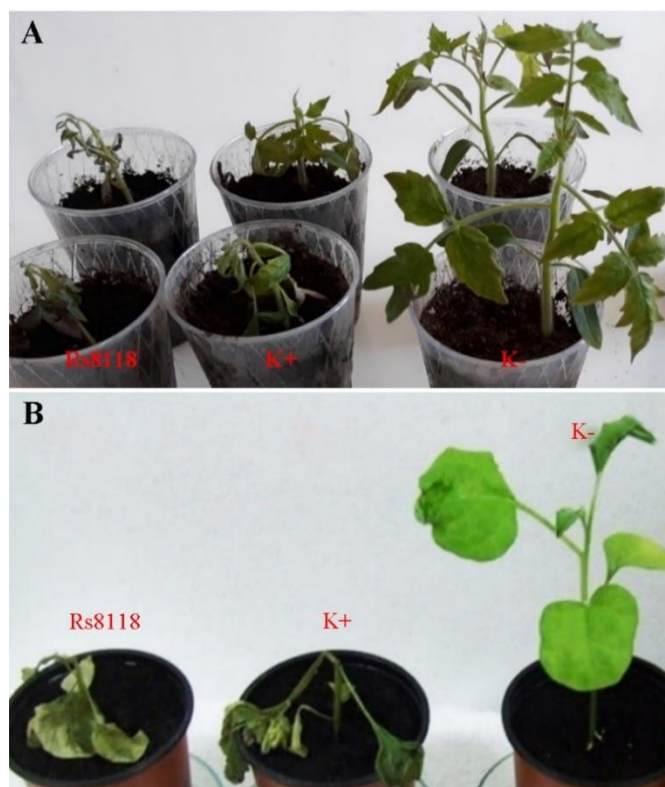
Simptomi na biljkama krompira sorte L. Claire inokulisanih metodom infiltracije sa 70 izolata (Prilog 1) preliminarno identifikovanih kao *R. solanacearum* su se pojavili 6-7 dana posle inokulacije (DPI) u formi blagog venjenja biljaka sa lezijama na mestu uboda u stabljiku (Slika 15A). Kod većine biljaka 7-8 DPI na mestu uboda se javljalo pucanje stabljike sa vodenastom nakupinom (Slika 15B). Sa razvojem bolesti, 10 DPI zabeleženo je intenzivnije venjenje biljaka koje je praćeno širenjem nekrotičnih lezija dužinom i u unutrašnjost stabljika, a pojedine biljke su se i lomile na mestu uboda (Slika 15C). Kod biljaka 12 DPI je zabeležena izrazita uvelost praćena nekrozom (Slika 15D), a dve nedelje posle inokulacije kod svih biljaka krompira je dolazilo do potpunog propadanja (Slika 15E). Slični simptomi su konstatovani kod biljaka inokulisanih referentnim sojem *R. solanacearum* PD 2762 (pozitivna kontrola). Biljke koje su predstavljale negativnu kontrolu bile su zdrave, odnosno kod njih nije zabeležena pojava simptoma bolesti.



**Slika 15.** Efekat izolata poreklom iz krompira sa simptomima mrke truleži na biljkama krompira: A) blaga uvelost; B i C) pucanje i lomljenje stabljike na mestu uboda; D) izrazita uvelost biljke praćeno nekrozom 12 DPI; E) potpuno propadanje biljke 14 DPI (levo-biljka inokulisana sa Rs8118 izolatom i desno-biljka inokulisana SDV) [foto Marković *et al.*, 2021a (A, D); S. Marković (B, C, E)]

Inicijalni simptomi na inokulisanim stabljikama paradajza i plavog patlidžana pojavili su se 2-3 DPI u vidu nekrotičnih lezija na mestu uboda. Već 4 DPI biljke su počele ubrzano da venu i da se zbog nekroze koja se širila sa mesta uboda savijaju i lome. Potpuno propadanje inokulisanih biljaka paradajza i plavog patlidžana je zabeleženo 6-7 DPI (Slika 16). Referentni soj *R. solanacearum* PD 2762 (pozitivna kontrola) je pokazao slične simptome kao i svi testirani izolati. Na biljkama koje su inokulisane SDV (negativna kontrola) nije uočena pojava simptoma bolesti.



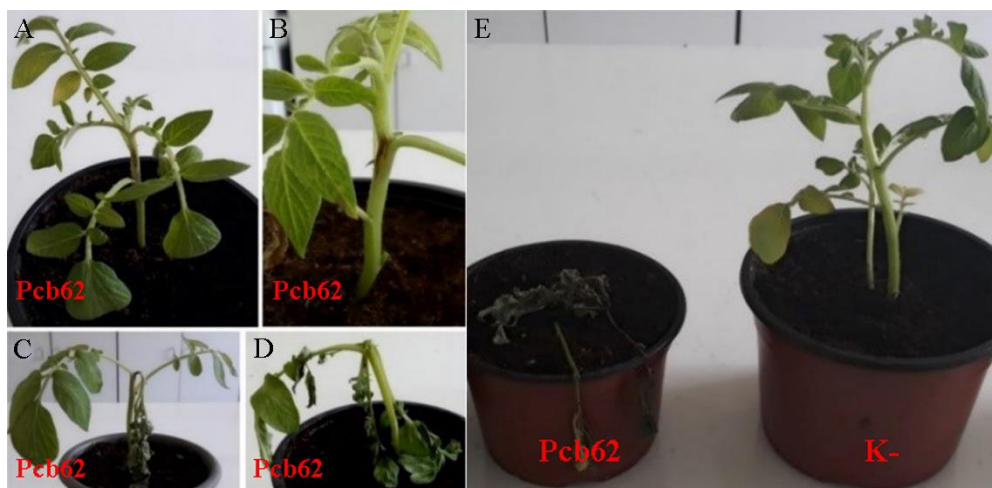


**Slika 16.** Efekat izolata dobijenih iz krompira sa simptomima mrke truleži na biljkama 4 DPI (levo: biljke inokulisane izolatom Rs8118, sredina: biljke inokulisane *R. solanacearum* PD2762 i desno: biljke inokulisane SDV): A) biljke paradajza; B) biljke plavog patlidžana (foto S. Marković)

Iz svih biljaka sa razvijenim simptomima bolesti uspešno je izvršena reizolacija na SMSA, pojavom kolonija koje su po opisu odgovarale kolonijama originalno testiranih izolata kao i referentnom soju *R. solanacearum* PD 2762.

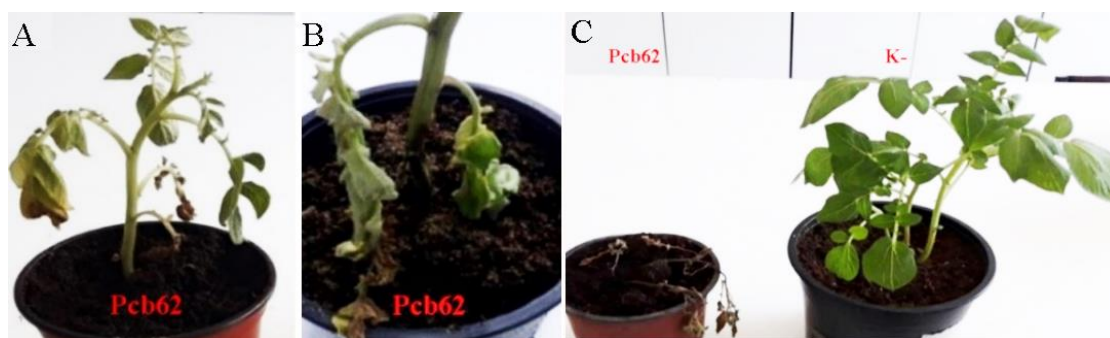
#### 4.3.2.2. Patogenost *Pectobacterium* spp. i *Dickeya* spp. izolata

Biljke krompira inokulisane metodom infiltracije u stabljiku bakterijskom suspenzijom grupe izolata dobijenih iz uzoraka sa simptomima crne noge i vlažne truleži krtola (Prilog 2), su razvile inicijalne simptome 2-3 DPI u vidu mrkih lezija na mestu uboda i blage uvelosti listova (Slika 17A, B). Trećeg DPI pojavili su se izraženiji simptomi uvelosti, a na mestu uboda stabljike su pucale i zapažena je nekroza koja se širila u unutrašnjost zahvatajući provodno tkivo (Slika 17C, D). Biljke su potpuno propale 6-7 DPI (Slika 17E). Kod svih 50 izolata kao i kod referentnog *D. solani* MK10 i kontrolnog *P. carotovorum* Pcc10 soja (pozitivne kontrole) zabeleženi su slični simptomi bolesti, sa sličnom dinamikom razvoja. Na biljkama koje su služile kao negativna kontrola simptomi bolesti nisu uočeni.



**Slika 17.** Efekat izolata dobijenih iz simptoma crne noge i vlažne truleži krtola krompira na biljkama krompira metodom infiltracije bakterijske suspenzije u stabljiku: A) blaga uvelost i mrka lezija na mestu uboda u stabljiku 2 DPI; B) pucanje stabljike na mestu uboda 3 DPI; C) intenzivna uvelost 4 DPI; D) potpuna uvelost 5 DPI; E) propadanje biljaka 6-7 DPI (levo-biljka inokulisana izolatom Pcb62 i desno-negativna kontrola) (foto S. Marković)

U slučaju primene metode koja je podrazumevala zalivanje supstrata bakterijskom suspenzijom izolata, prvi simptomi su se pojavili 10 DPI u formi blage uvelosti biljaka (Slika 18A). Na prizemnom delu stabljike je kod nekih biljaka bilo vidljivo crno obojenje (Slika 18B). Posle 15 DPI na istom mestu se razvila nekroza koja se zajedno sa mrkim obojenjem širila ka vršnom delu biljaka, prouzrokujući intenzivnije venjenje donjih listova. Potpuno propadanje biljaka zabeleženo je 21 DPI (Slika 18C). Kod svih ispitanih izolata kao i kod referentnog soja *D. solani* MK10 i kontrolnog soja *P. carotovorum* Pcc10 (pozitivne kontrole) zabeleženi su slični simptomi sa sličnom dinamikom razvoja simptoma, dok se na biljkama koji su služile kao negativna kontrola simptomi nisu pojavili.

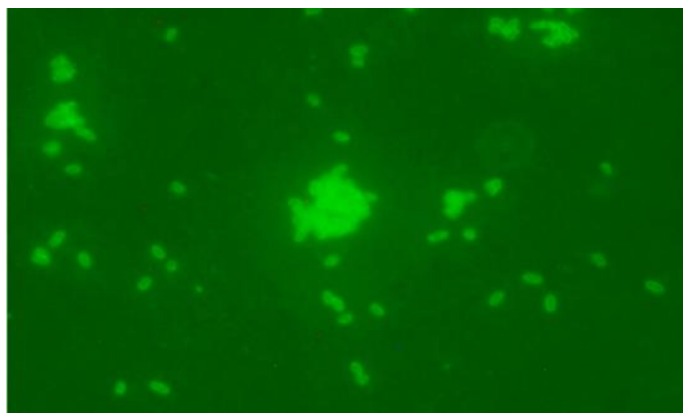


**Slika 18.** Efekat izolata dobijenih iz krompira sa simptomima crne noge i vlažne truleži krtola na biljkama krompira metodom zalivanja: A) blaga uvelost biljaka 10 DPI; B) crno obojenje prizemnog dela stabljike sa nekrozom i intenzivno venjenje donjih listova 15 DPI; C) potpuno propadanje biljaka 21 DPI (levo-biljka inokulisana izolatom Pcb62 i desno-negativna kontrola) [foto S. Marković (A i C) i T. Popović Milovanović (B)]

Reizolacijama vršenim iz inokulisanih biljaka krompira na CVP podlozi su se obrazovale beličaste kolonije koje su formirale udubljenja i koje su po morfologiji odgovarale kolonijama originalnih izolata.

### 4.3.3. Test imunofluorescencije

Korišćenjem poliklonalnog antiseruma i konjugata (Rabbit-anti-goat (H+L) FITC) kod svih izolata dobijenih iz uzoraka sa simptomima mrke truleži krtola krompira je jasno uočeno prisustvo bakterijskih ćelija koje su fluorescirale (Slika 19). Rezultati IF testa su bili pozitivni i za referentni soj *R. solanacearum* PD 2762.



**Slika 19.** Fluorescencija bakterijskih ćelija izolata preliminarno identifikovanih kao *R. solanacearum* (Marković *et al.*, 2021a)

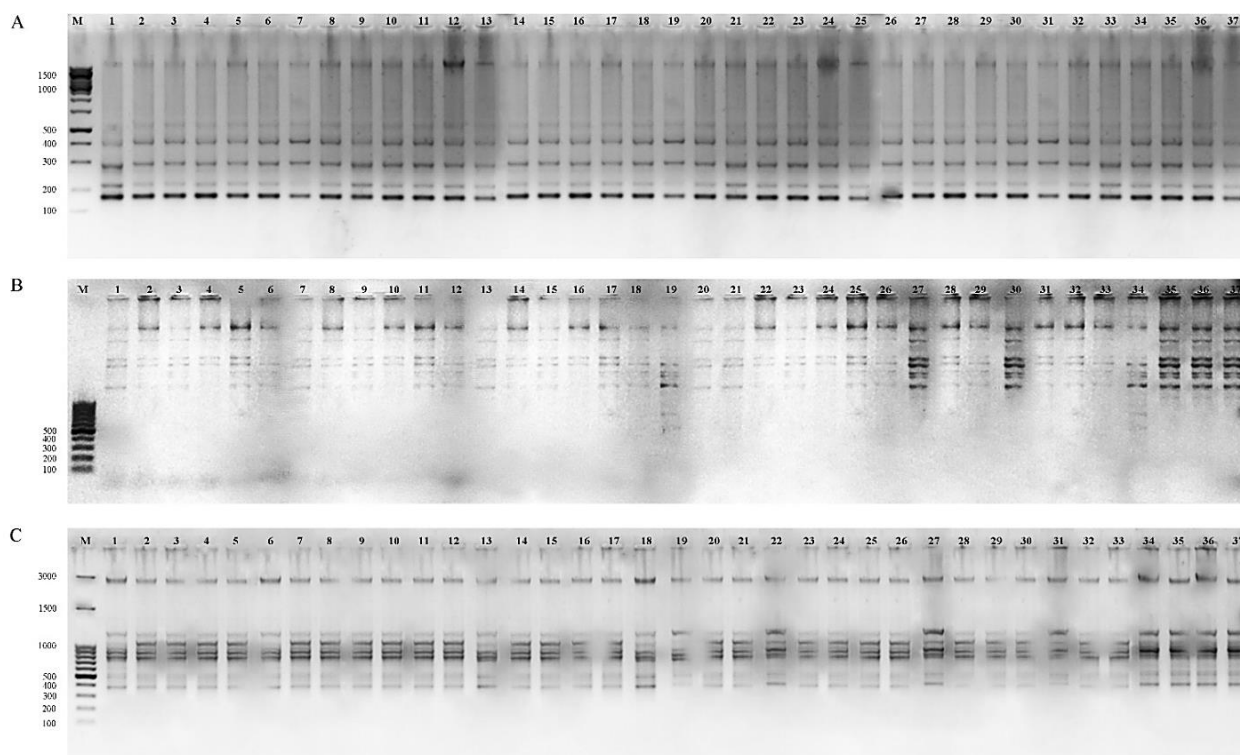
## 4.4. MOLEKULARNO-GENETIČKE KARAKTERISTIKE

### 4.4.1. Identifikacija i karakterizacija *R. solanacearum* izolata

Primenom specifičnog para prajmera PS-1/PS-2 u PCR reakciji sa DNK iz 70 testiranih izolata kao i referentnog soja *R. solanacearum* PD 2762 amplifikovani su fragmenti veličine 553 bp (Prilog 13A). RFLP dobijenih produkata sa *Taq* I enzimom je rezultirala dobijanjem karakterističnih restrikcionih fragmenata dužine 457 i 96 bp kod svih izolata kao i kod referentnog soja *R. solanacearum* PD 2762 (Prilog 13B). Korišćenjem specifičnog para prajmera OLI-1/Y2 u PCR reakciji sa DNK iz svih izolata kao i referentnog soja *R. solanacearum* PD 2762 umnoženi su fragmenti veličine 288 bp (Prilog 13C). Korišćenjem biovar specifičnog Rs-1-F/Rs-1-R prajmerskog para amplifikovali su se fragmenti veličine 718 bp kod svih 70 izolata i referentnog *R. solanacearum* PD 2762 soja (Prilog 13D). Primenom ovog para prajmera, izolati su svrstani u diviziju II (biovar 1 ili 2) vrste *R. solanacearum*. Korišćenjem para prajmera Rs-1-F/Rs-3-R nije došlo do umnožavanja fragmenata, kako za testirane izolate tako ni za referentni soj *R. solanacearum* PD 2762.

Dobijeni rep-PCR profili korišćenjem BOX-, ERIC- i REP-PCR-a izolata *R. solanacearum*, referentnog *R. solanacearum* PD 2762 soja i uporednih sojeva (Rs0813, Rs1213 i Rs1613) su bili ujednačeni, bez velikog genetičkog diverziteta. Kod BOX-PCR-a, svi profili izolata su bili međusobno identični, kao i u poređenju sa referentnim *R. solanacearum* PD2762 sojem i uporednim sojevima. Profili *R. solanacearum* izolata dobijeni primenom ERIC- i REP-PCR pokazali su genetički diverzitet. Primenom ERIC-PCR obrazovale su se tri grupe (grupa I: izolat Rs3016 je obrazovao isti profil kao i referentni soj; grupa II: izolati Rs5916 i Rs6616 su obrazovali međusobno iste profile kao uporedni sojevi, dok je ostalih 67 testiranih izolata imalo međusobno iste profile i činilo je grupu III). Primenom REP-PCR obrazovalo se pet grupa izolata (I grupa: izolati Rs0115 i Rs1915; II grupa: izolati Rs4016, Rs5916 i Rs8118 su obrazovali međusobno iste profile kao i referentni i uporedni sojevi; III grupa: Rs0716 i Rs2716; IV grupa Rs3016; V grupa: preostalih 62 izolata).

Dendrogram je konstruisan na osnovu rezultata ERIC- i REP-PCR metoda (Prilog 14A, B). Na slici 20. su prikazana 33 izolata *R. solanacearum* koja su izabrana kao reprezentativni uzimajući u obzir profile dobijene rep-PCR metodama, kao i godinu, lokalitet i sortu krompira sa kojih su izolovani.



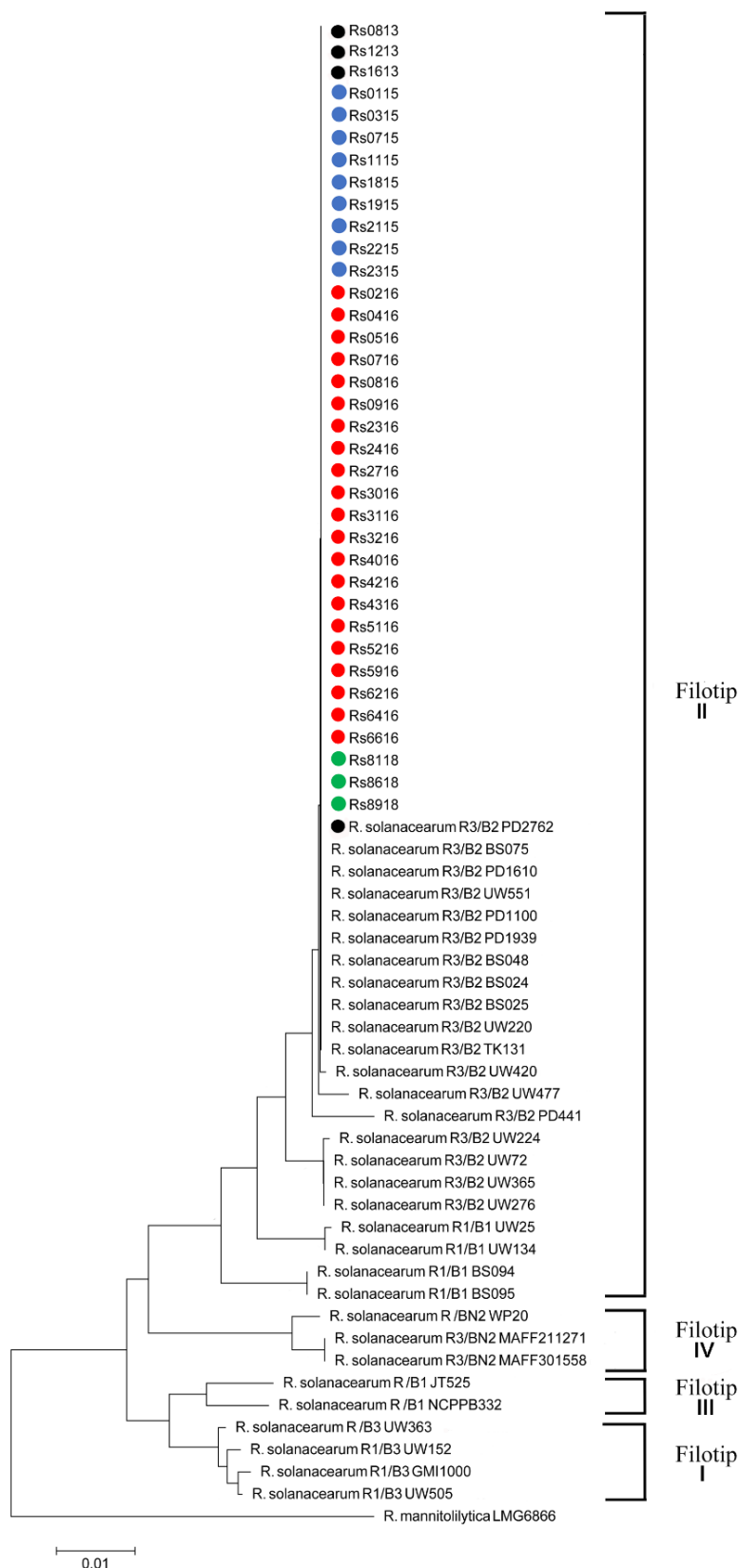
**Slika 20.** Rep-PCR genetički profili 33 reprezentivna izolata *R. solanacearum*, kao i referentnog i uporednih sojeva: A) BOX-PCR; B) ERIC-PCR; C) REP-PCR; M-marker 1. Rs0115, 2. Rs0315, 3. Rs0715, 4. Rs1115, 5. Rs1815, 6. Rs1915, 7. Rs2115, 8. Rs2215, 9. Rs2315, 10. Rs0216, 11. Rs0416, 12. Rs0516, 13. Rs0716, 14. Rs0816, 15. Rs0916, 16. Rs2316, 17. Rs2416, 18. Rs2716, 19. Rs3016, 20. Rs3116, 21. Rs3216, 22. Rs4016, 23. Rs4216, 24. Rs4316, 25. Rs5116, 26. Rs5216, 27. Rs5916, 28. Rs6216, 29. Rs6416, 30. Rs6616, 31. Rs8118, 32. Rs8618, 33. Rs8918, 34. *R. solanacearum* PD 2762, 35. Rs0813, 36. Rs1213 i 37. Rs1613 (foto S. Marković)

BLASTn analiza sekvenci sedam gena (*adk*, *gapA*, *gdhA*, *gyrB*, *ppsA*, *hrpB* i *fliC*) je potvrdila identitet 33 odabrana *R. solanacearum* izolata (Rs0115, Rs0315, Rs0715, Rs1115, Rs1815, Rs1915, Rs2115, Rs2215, Rs2315, Rs0216, Rs0416, Rs0516, Rs0716, Rs0816, Rs0916, Rs2316, Rs2416, Rs2716, Rs3016, Rs3116, Rs3216, Rs4016, Rs4216, Rs4316, Rs5116, Rs5216, Rs5916, Rs6216, Rs6416, Rs6616, Rs8118, Rs8618 i Rs8918). Reprezentativni izolati su bili 100% identični sa referentnim sojem *R. solanacearum* PD 2762 na osnovu svih proučavanih gena. Takođe, ispitivani sojevi su bili identični sa sojevima Rs0813, Rs1213 i Rs1613, koji su izolovani 2013. godine (Marković *et al.*, 2021a) i koji su u ovoj studiji korišćeni kao uporedni.

Filogenetska analiza je pokazala da 33 ispitivana izolata, kao i uporedni sojevi Rs0813, Rs1213 i Rs1613 poreklom iz krtola krompira iz Srbije pripadaju filotipu II *R. solanacearum*. Prema filogenetskim stablima konstruisanim na osnovu sekvenci pojedinačnih gena (*adk*, *gapA*, *gdhA*, *gyrB*, *ppsA*, *hrpB* i *fliC*), ispitivani izolati i većina sojeva koji su okarakterisani da pripadaju filotipu II su grupisani zajedno u jedan klaster (Prilog 15A-D). Izuzetak su sojevi UW477 (prema filogenetskom stablu konstruisanom na osnovu *adk* gena), PD441 (prema filogenetskom stablu konstruisanom na osnovu *gapA* gena), UW25 (prema filogenetskim stablima konstruisanim na osnovu *gdhA* i *fliC* gena), UW134 (prema filogenetskim stablima konstruisanim na osnovu *gdhA* i *fliC* gena), BS094 i BS094 (prema filogenetskim stablima konstruisanim na osnovu *ppsA* i *fliC* gena), kao i sojevi UW72, UW365, UW224, UW276 (prema filogenetskom stablu konstruisanom na osnovu *ppsA* gena).

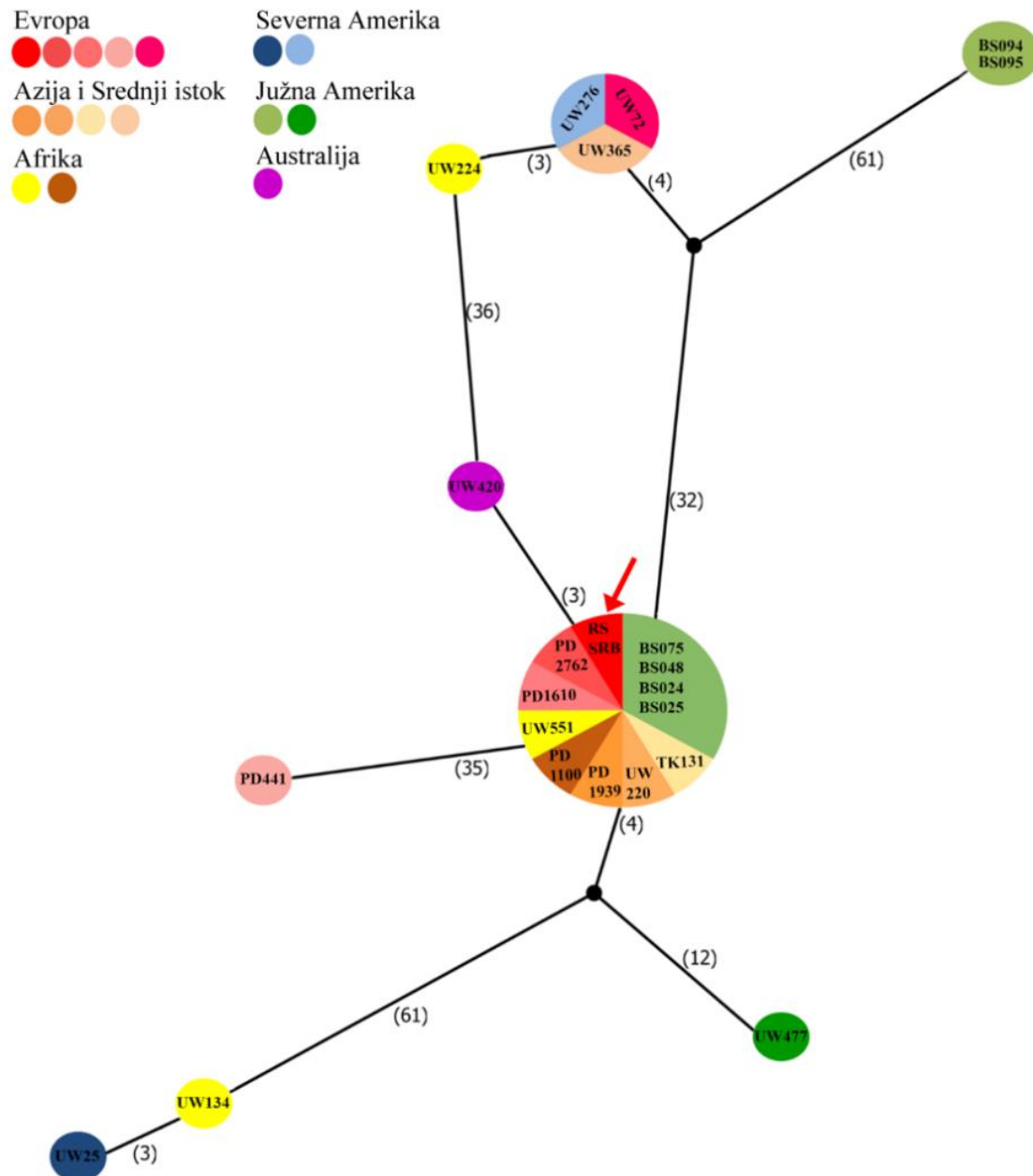
Rezultati filogenetske analize na osnovu konkatamernih sekvenci sedam gena ispitivanih izolata i njihovim poređenjem sa sekvencama sojeva dostupnim u NCBI bazi ukazali su da 33 ispitivana izolata kao i tri uporedna soja (Rs0813, Rs1213 i Rs1613) poreklom iz krtola krompira iz Srbije pripadaju filotipu II bakterije *R. solanacearum* (Slika 21). U okviru klastera koji se odnosi na grupu sojeva koji pripadaju filotipu II, sojevi su se podelili u četiri podklastera. U prvi podklaster grupisali

su se ispitivani izolati *R. solanacearum* iz krompira iz Srbije, zatim sojevi sa kojima su ispitivani izolati identični [sojevi poreklom sa krompira: PD 2762 (Holandija), PD1610 (Belgija), PD1100 (Egipat), PD1939 (Izrael), BS024, BS025, BS048 i BS075 (Bolivija), UW220 (Indija), TK131 (Tajland) i soj poreklom sa geranijuma: UW551 (Kenija)] i sojevi koji su blisko srodni sa ispitivanim *R. solanacearum* izolatima UW420 (Australija), UW477 (Peru) i PD441 (Švedska) poreklom sa krompira. U drugi podklaster filotipa II grupisali su se sojevi UW224 (Kenija), UW72 (Grčka), UW365 (Kina) i UW276 (Meksiko); u treći podklaster sojevi UW25 (SAD) i UW134 (Kenija) i u četvrti podklaster sojevi BS094 i BS095 (Bolivija). Filotipovi I [UW363 (Kina, paradajz), UW152 (Australija, krompir), GMI1000 (Francuska Gvajana, paradajz) i UW505 (Indonezija, krompir)], III [JT525 (Reunion, nepoznat domaćin) i NCPPB332 (Zimbabve, krompir)] i IV [WP20 (Filipini, nepoznat domaćin) MAFF211271 i MAF301558 (Japan, krompir)] su bili jasno odvojeni od filotipa II, kao i međusobno.



**Slika 21.** Filogenetsko stablo konstruisano na osnovu konkatamernih sekvenci *adk*, *gapA*, *gdhA*, *gyrB*, *ppsA*, *hrpB* i *fliC* gena za 33 reprezentivna *R. solanacearum* izolata poreklom iz krtola krompira iz Srbije i drugih *R. solanacearum* sojeva iz NCBI baze (Prilog 11). Referentni *R. solanacearum* PD 2762 i uporedni Rs0813, Rs1213 i Rs1613 sojevi su obeleženi crnim krugom, a izolati iz 2015. plavim, iz 2016. crvenim i iz 2018. zelenim krugom

Konstruisana TCS haplotipska mreža pokazala je slične rezultate sa rezultatima filogenetske analize (Slika 22). Izolati poreklom sa krompira iz Srbije (označeni kao RSSRB) perzistiraju kao jedan haplotip, zajedno sa 11 drugih sojeva *R. solanacearum* filotipa II iz NCBI baze (PD 2762 = PD1610 = UW551 = PD1100 = PD1939 = UW220 = TK131 = BS075 = BS048 = BS024 = BS025) (Prilog 11). Ovaj haplotip je centralno pozicioniran i direktno je povezan sa haplotipovima UW420 i PD441 od kojih je odvojen sa 3, odnosno 35 nukleotidnih razlika, a indirektno preko vektora ili pomenutih haplotipova sa ostalim haplotipovima (UW477; UW134; UW25; UW224; UW72 = UW365 = UW276; i BS94 = BS95).



**Slika 22.** TCS mreža konstruisana sa *R. solanacearum* izolatima poreklom sa krompira iz Srbije (crvena strelica) i drugih *R. solanacearum* sojeva iz NCBI baze podataka (Prilog 11). Geografsko poreklo haplotipova je označeno bojama kako je dato u legendi. Veličine krugova su proporcionalne broju izolata/sojeva koji pripadaju određenom haplotipu. Crne međusobno povezane tačke su srednji vektori koji predstavljaju nedostajuće ili neuzorkovane intermedijarne haplotipove, dok brojevi u zagradama predstavljaju nedostajuće ili neuzorkovane intermedijarne haplotipove, dok brojevi u zagradama predstavljaju nukleotidne razlike (Marković *et al.*, 2021a)

#### 4.4.2. Identifikacija i karakterizacija *Pectobacterium* spp. i *Dickeya* spp. izolata

Upotrebom specifičnih prajmera za identifikaciju *Pectobacterium* spp. i *Dickeya* spp. izolovana DNK se umnožila kod:

- pet izolata (Pcc322, Pcc323, Pcc324, Pcc425 i Pcc427) i kontrolnog soja *P. carotovorum* Pcc10 sa parom prajmera F0145/E2477, kod kojih su amplifikovani fragmenti veličine 666 bp i identifikovali ove izolate kao *P. carotovorum* (Prilog 16A);

- 36 izolata (Pcb2531, Pcb2538, Pcb2544, Pcb2549, Pcb2562, Pcb2563, Pcb2568, Pcb2811, Pcb2812, Pcb2813, Pcb2815, Pcb2817, Pcb2819, Pcb2833, Pcb2838, Pcb2839, Pcb2841, Pcb2842, Pcb2844, Pcb2847, Pcb2861, Pcb131, Pcb133, Pcb134, Pcb135, Pcb136, Pcb138, Pcb139, Pcb33, Pcb34, Pcb38, Pcb39, Pcb61, Pcb62, Pcb64 i Pcb67) sa prajmer parom BR1f/L1r, kod kojih su amplifikovani fragmenti veličine 322 bp, što je ukazalo na pripadnost vrsti *P. brasiliense* (Prilog 16B);

- devet izolata (Dd31, Dd32, Dd35, Dd37, Dd41, Dd42, Dd44, Dd46 i Dd47) kao i kod referentnog soja *D. solani* MK10 sa prajmer parom ADE1/ADE2, kod kojih su amplifikovani fragmenti veličine 420 bp, što je ukazalo na pripadnost *Dickeya* vrstama (Prilog 16C);

- nijedan izolat nije umnožio DNK korišćenjem specifičnog prajmer para ECA1f/ECA2r korišćenog za detekciju i identifikaciju *P. atrosepticum*.

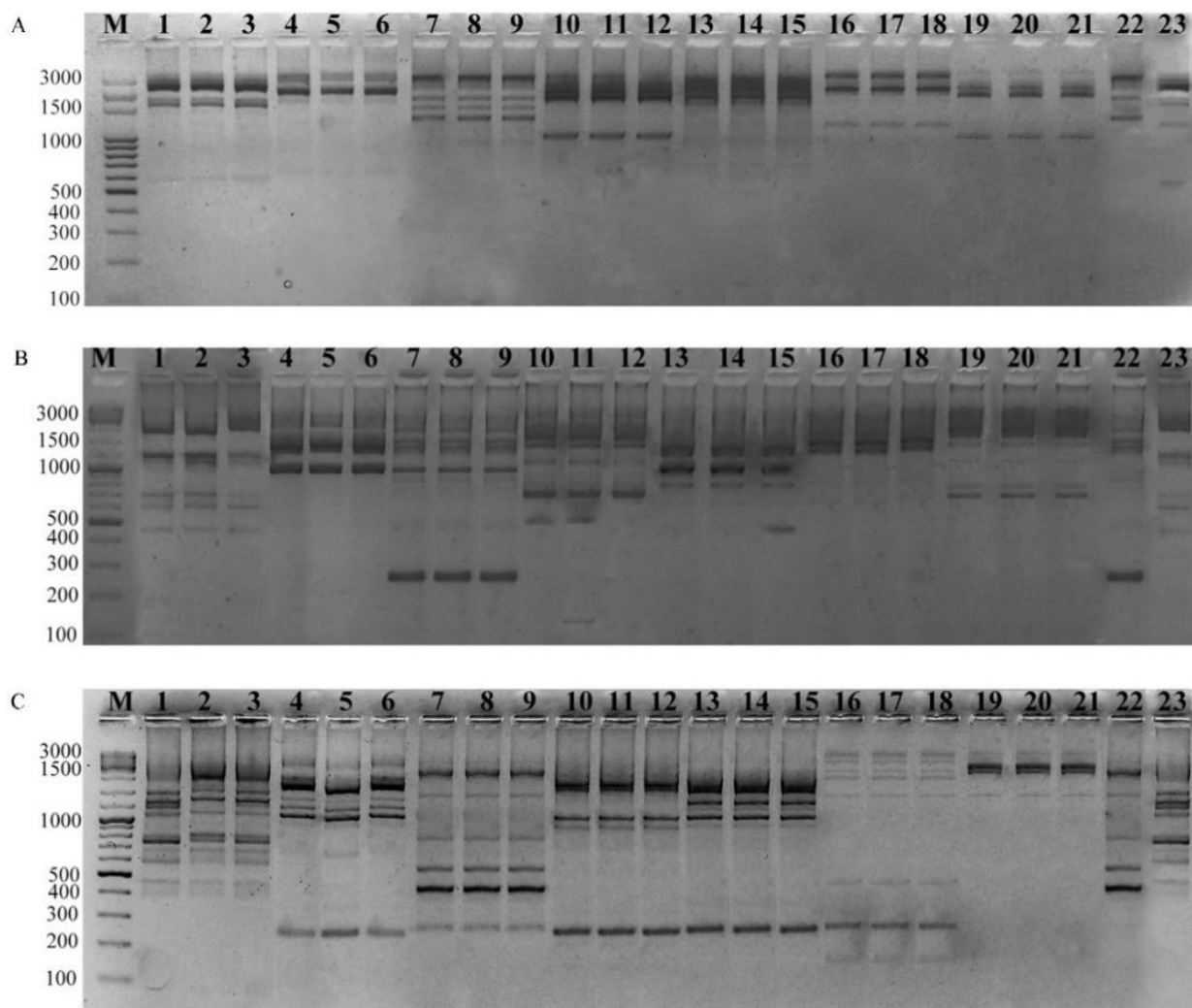
Korišćenjem tri rep-PCR metode, dobijeni su genetički profili za 50 *Pectobacterium* spp. i *Dickeya* spp. izolata koji su ukazali na postojanje genetičkog diverziteta među njima. UPGMA filogenetska stabla konstruisana na osnovu profila dobijenih BOX-, ERIC- i REP-PCR-om i redom su prikazana u priložima 17A-C. Na osnovu sve tri metode utvrđeno je postojanje sedam grupa genetičkih profila. Za svaku utvrđenu grupu profila dodeljen je broj (I-VII). Genetički profili iz grupa: I, II, IV, i VI su bili međusobno identični, dok su profili iz grupa III i V bili veoma slični pa su stoga pripali istoj grupi, a podgrupe su obeležene slovima „a“ i „b“.

Pet *P. carotovorum* izolata, kao i uporedni *P. carotovorum* Pcc10 soj su na konstruisanom UPGMA stablu obeleženi kao grupa V. Na osnovu BOX-PCR-a ovi izolati su obrazovali homogene profile bez genetičkog diverziteta, dok je na osnovu ERIC- i REP-PCR-a utvrđen genetički diverzitet. Korišćenjem ERIC-PCR-a četiri izolata (Pcc427, Pcc425, Pcc323 i Pcc322) i *P. carotovorum* Pcc10 soj su se odvojili u podgrupu Va, dok se Pcc324 izdvojilo samostalno (Vb), a korišćenjem REP-PCR-a tri izolata (Pcc427, Pcc425 i Pcc323) su se izdvojila u podgrupu Va, a dva izolata (Pcc322 i Pcc324), kao i *P. carotovorum* Pcc10 soj u podgrupu Vb.

Genetički profili 36 izolata *P. brasiliense* pokazali su diverzitet i prema UPGMA stablu su podeljeni u pet različitih grupa obeleženih brojevima I-IV i VI. Profili obeleženi sa I, II, IV, i VI obrazovali su međusobno iste profile korišćenjem sve tri rep-PCR metode. Profili označeni kao grupa III su korišćenjem ERIC- i REP-PCR-a obrazovali veoma slične, ali ne identične profile, dok su na osnovu BOX-PCR-a izolati iz grupe III obrazovali identične profile. Podgrupe su u slučaju profila dobijenih ERIC- i REP-PCR prajmerima obeležene su sa IIIa i IIIb oznakama. Na osnovu ERIC-PCR-a pet izolata (Pcb131, Pcb139, Pcb138, Pcb133 i Pcb136) se izdvojilo u podgrupu IIIa, dok su se u podgrupu IIIb izdvojili Pcb135 i Pcb134 izolati; na osnovu REP- četiri izolata (Pcb139, Pcb133, Pcb135 i Pcb131) se izdvojilo u podgrupu IIIa, dok su se u podgrupu IIIb izdvojili Pcb136, Pcb134 i Pcb138 izolati.

Izolati koji su identifikovani kao *Dickeya* spp. su imali iste profile i odvojili se u posebnu grupu (VII), zajedno sa referentnim sojem *D. solani* MK10 koji je imao nešto drugačiji profil. Na osnovu navedenih rezultata iz svake od sedam utvrđenih grupa profila, po tri reprezentativna izolata su odabrana za dalju analizu (Prilog 17A-C). Na slici 23. prikazani su profili dobijeni sa BOX-, ERIC- i REP-PCR-a za 21 reprezentativni izolat.





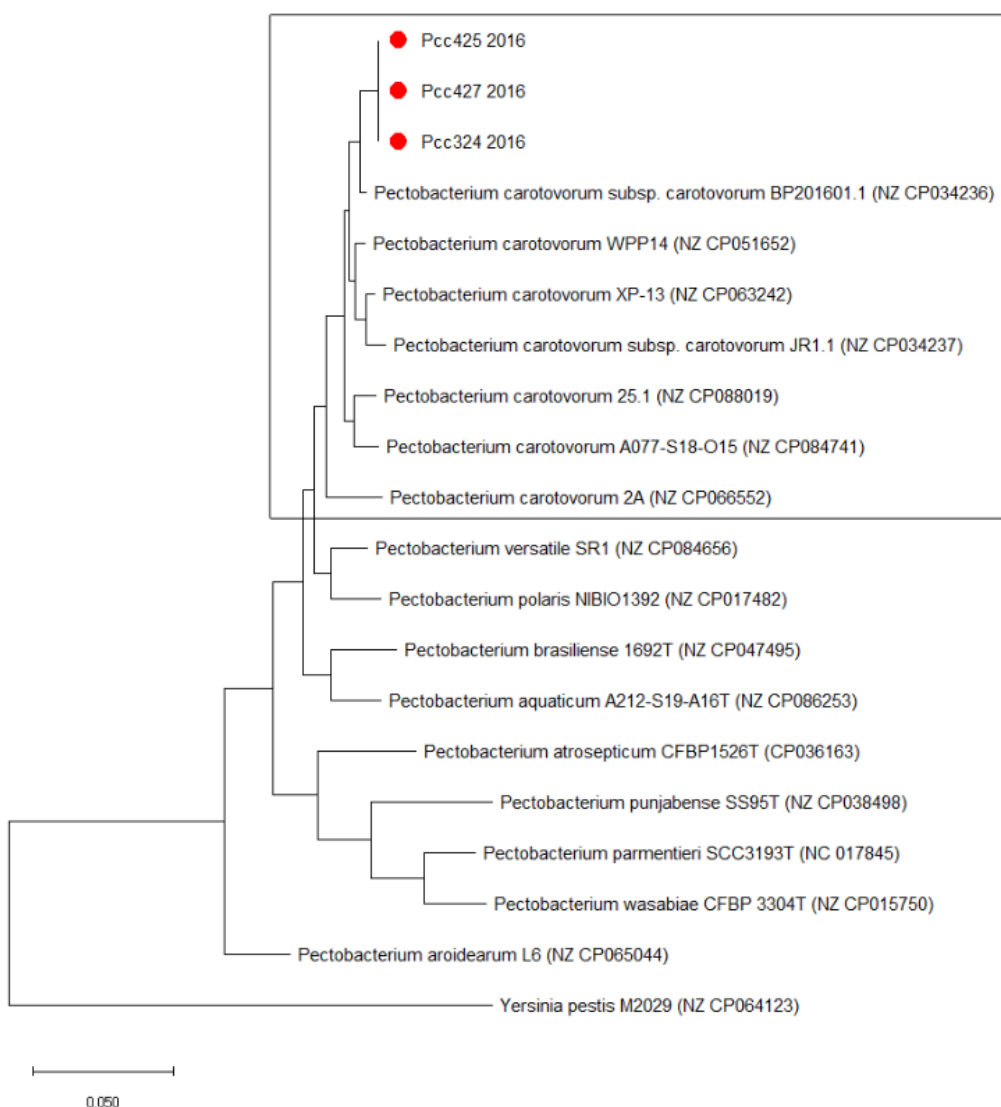
**Slika 23.** Genetički profili reprezentativnih *Pectobacterium* spp. i *Dickeya* spp. izolata, kao i referentnog soja *D. solani* MK10 i uporednog *P. carotovorum* Pcc10 soja dobijenih na osnovu: A) BOX-; B) ERIC-; C) REP-PCR-a; M-marker, 1. Pcc324, 2. Pcc425, 3. Pcc427, 4. Pcb133, 5. Pcb134, 6. Pcb135, 7. Dd31, 8. Dd32, 9. Dd44, 10. Pcb33, 11. Pcb62, 12. Pcb64, 13. Pcb2544, 14. Pcb2562, 15. Pcb2568, 16. Pcb2811, 17. Pcb2815, 18. Pcb2817, 19. Pcb2833, 20. Pcb2842, 21. Pcb2861, 22. *D. solani* MK10 i 23. *P. carotovorum* Pcc10 (Foto S. Marković)

BLASTn analiza sekvenci sedam konzerviranih gena je potvrdila identitet *P. carotovorum* izolata. Tri izolata, Pcc324, Pcc425 i Pcc427, su međusobno identična sa procentom sličnosti od 98,32% do 100% u poređenju sa različitim deponovanim *P. carotovorum* sojevima iz NCBI baze. Na osnovu sekvenci *acnA* gena je utvrđen procenat identiteta od 99,60% sa XP-13 sojem (Kina, krompir, CP063242), *dnaX* gena od 100% sa JB145 sojem (SAD, krompir, MT632666), *gapA* gena od 100% sa BP201601 sojem (Južna Koreja, krompir, CP034236), *icdA* gena od 100% sa XP-13 sojem (Kina, krompir, CP063242), *mdh* gena od 100% sa WPP14 sojem (SAD, krompir, CP051652), *pgi* gena od 98,32 % sa WPP14 (SAD, krompir, CP051652) i 2A sojevima (Rusija, krompir, CP066552) i *proA* gena od 99,80% sa BP201601 sojem (Južna Koreja, krompir, CP034236).

Filogenetska analiza testiranih *Pectobacterium* izolata i sojeva urađena na osnovu pojedinačnih sekvenci za svaki gen (Prilog 18A, B) ukazuje, da geni *acnA* i *dnaX* razdvajaju *Pectobacterium* vrste koje su korišćene za konstruisanje stabla, kao i da su se svi ispitivani *P. carotovorum* izolati iz Srbije i *P. carotovorum* sojevi iz NCBI baze grupisali u jedan odvojen klaster prema ovim genima. Prema ostalim genima (*gapA*, *icdA*, *mdh*, *pgi* i *proA*), *P. carotovorum* ispitivani izolati i *P. carotovorum* sojevi iz NCBI baze su se grupisali zajedno, ali sa još nekim sojevima iz baze. Na stablu konstruisanom prema *gapA* genu soj *P. polaris* NIBIO1392 grupisan je zajedno sa *P. carotovorum*

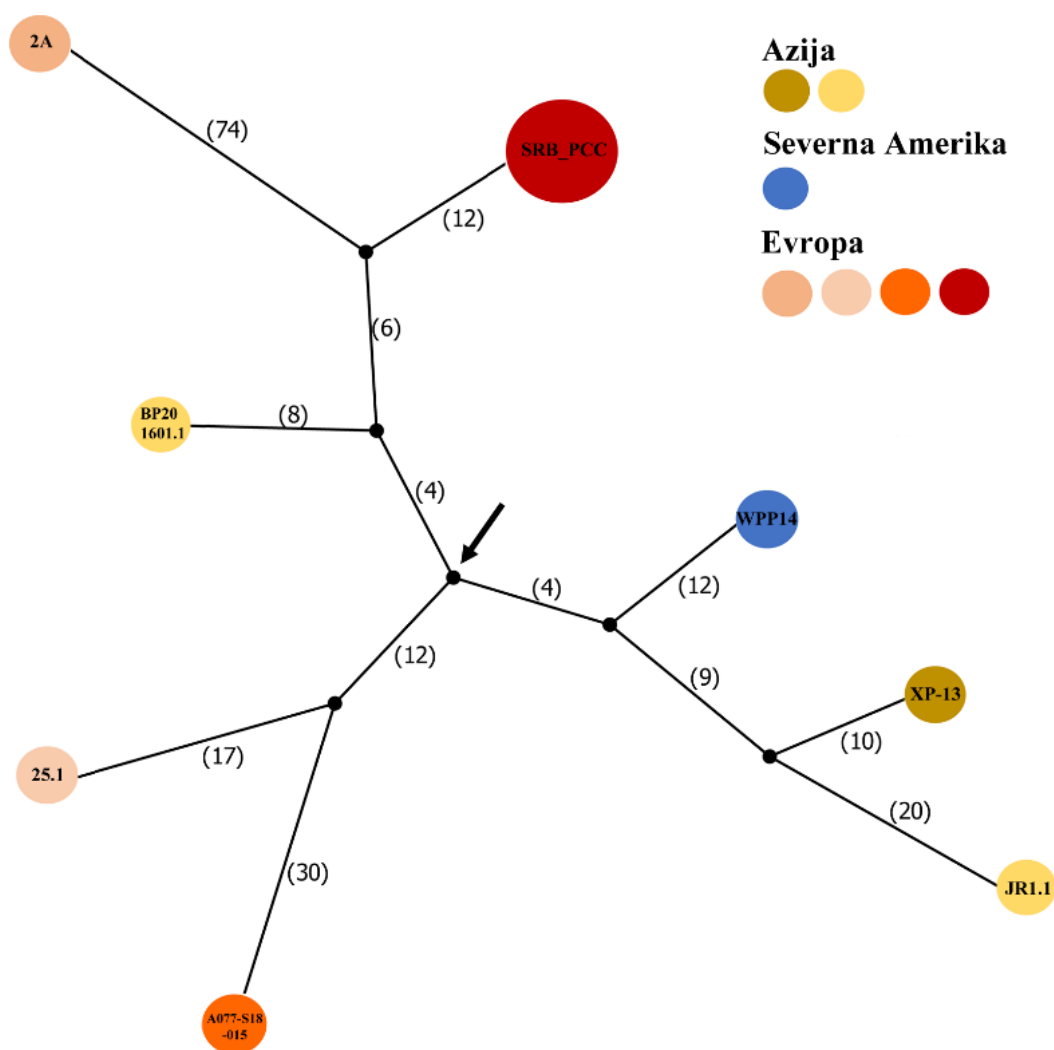
izolatima i sojevima u isti klaster; prema *icdA* genu grupisani su sojevi *P. polaris* NIBIO1392 i *P. versatile* SR1; prema *mdh* genu grupisani su sojevi *P. polaris* NIBIO1392, *P. versatile* SR1, *P. brasiliense* 1692T i *P. aquaticum* A212-S19-A16T. Korišćenjem pojedinačnih sekvenci *pgi* gena u klaster sa *P. carotovorum* izolatima i sojevima grupisao se i *P. versatile* SR1 soj, a korišćenjem sekvence *proA* gena u klaster su se grupisali i *P. polaris* NIBIO1392, *P. versatile* SR1, *P. aquaticum* A212-S19-A16T i *P. aroidearum* L6 sojevi.

Na filogenetskom stablu konstruisanom na bazi konkatamernih sekvenci (Slika 24) ispitivani *P. carotovorum* izolati iz Srbije (Pcc324, Pcc425 i Pcc427) su se zajedno sa drugim *P. carotovorum* sojevima iz NCBI baze izdvojili u poseban klaster. U okviru ovog klastera tri ispitivana izolata iz Srbije su bila srodnija sa sojevima BP201601.1, WPP14, XP-13 i JR1.1 nego sa 25.1, A077-S18-O15 i 2A sojevima. Od ostalih *Pectobacterium* spp., vrste *P. versatile* (SR1) i *P. polaris* (NIBIO1392); *P. parmentieri* (SCC3193T) i *P. wasabiae* (CFBP 3304T); kao i *P. brasiliense* (1692T) i *P. aquaticum* (A212-S19-A16T), su bile međusobno srodnije, u odnosu na sojeve vrsta *P. aroidearum* (L6), *P. punjabense* (SS95T) i *P. atrorepticum* (CFBP 1526T), koje su na filogenetskom stablu bile pozicionirane pojedinačno.



**Slika 24.** Filogenetsko stablo konstruisano na osnovu konkatamernih sekvenci *acnA*, *dnaX*, *gapA*, *icdA*, *mdh*, *pgi* i *proA* konzerviranih gena za tri reprezentativna *P. carotovorum* izolata poreklom sa krompira iz Srbije i drugih *Pectobacterium* spp. sojeva deponovanih u NCBI bazi (Prilog 12). Crvenim krugom označeni su *P. carotovorum* izolati iz uzoraka sakupljenih 2016. godine (Prilog 2)

TCS mreža konstruisana na osnovu konkatomernih sekvenci primenom metode statističke parsimonije je prikazala tri testirana *P. carotovorum* izolata, Pcc324, Pcc425 i Pcc427, kao jedan haplotip obeležen sa SRB\_PCC (Slika 25). Ovaj haplotip je pozicioniran na kraju TCS mreže i indirektno je povezan sa haplotipom BP201601.1 koji je izolovan sa krompira i poreklom je iz Južne Koreje i sa haplotipom 2A izolovanim sa krompira, poreklom iz Rusije. Haplotip SRB\_PCC od haplotipa 2A deli ukupno 86 nukleotidnih promena (12 i 74) i jedan intermedijarni haplotip (vektor) koji predstavlja nedostajući ili neuzorkovani haplotip, dok ga od haplotipa BP201601.1 deli ukupno 26 nukleotidnih promena (12, 6 i 8) i dva vektora. Konstruisana TSC mreža pokazala je drugačiji raspored među *P. carotovorum* haplotipovima nego filogenetsko stablo dobijeno Maximum likelihood metodom, ali ipak nije pokazala korelaciju između geografskog porekla izolata i utvrđenih haplotipova. Primećena je podela haplotipova u tri grupe oko centralnog intermedijarnog vektora (mesto grananja haplotipova na slici 25, obeleženo je crnom strelicom). Prvu grupu čine haplotipovi SRB\_PCC, 2A i BP201601.1, drugu 25.1 i A077-S18-O15, i treću WPP14, XP-13 i JR1.1 haplotipovi.



**Slika 25.** TCS mreža sa haplotipom *P. carotovorum* iz Srbije i drugim *P. carotovorum* sojevima iz NCBI baze (Prilog 12). Geografsko poreklo haplotipova je označeno bojama kako je dato u legendi. Veličine krugova su proporcionalne broju izolata/sojeva koji pripadaju određenom haplotipu. Crne međusobno povezane tačke su srednji vektori koji predstavljaju nedostajuće ili neuzorkovane intermedijarne haplotipove, dok brojevi u zagradama predstavljaju nukleotidne razlike. Crna strelica ukazuje na mesto grananja TCS mreže

BLASTn analiza sekvenci sedam konzerviranih gena je potvrdila da 15 testiranih izolata pripadaju vrsti *P. brasiliense*, ali da među njima postoje razlike. Utvrđeno je pet različitih haplotipova koji su označeni od 1SRB\_PCB do 5SRB\_PCB. Dobijeni haplotipovi odgovaraju podeli izolata na grupe (I, II, III, IV i VI) koje su dobijene korišćenjem tri rep-PCR metode.

Izolati Pcb133, Pcb134 i Pcb135 (haplotip 1SRB\_PCB) su međusobno identični sa procentom sličnosti od 98,92% do 100% u poređenju sa različitim *P. brasiliense* sojevima iz baze. Na osnovu sekvenci *acnA* gena kod izolata je utvrđen procenat identiteta od 100% sa Ec46 sojem (Izrael, *Capsicum anuum*, EF550644), *dnaX* gena od 98,92% sa SX309 sojem (Kina, krastavac, CP020350), *gapA*, *icdA* i *pgi* gena od 100% sa 99/39-31-1 sojem (Švajcarska, krompir, KP404143), i *mdh* i *proA* gena od 100%, odnosno 99,80% sa C18 sojem (Sirija, krompir, HM156950).

Izolati Pcb33, Pcb62 i Pcb64 (haplotip 2SRB\_PCB) su međusobno identični sa procentom sličnosti od 98,63% do 100% u poređenju sa deponovanim *P. brasiliense* sojevima iz baze. Na osnovu sekvenci *acnA* gena utvrđen je procenat identiteta od 99,42%, a *proA* gena od 98,63% sa SX309 sojem (Kina, krastavac, CP020350), *dnaX* i *pgi* gena od 100% sa IPO:4057 NAK:249 sojem (Holandija, krompir, CP059961), *gapA* gena od 99,79% i *icdA* gena od 99,82% sa sojem BZA12 (Kina, krastavac, CP024780), i *mdh* gena od 99% sa BC1 sojem (Kina, kineski kupus, CP009769).

Izolati Pcb2544, Pcb2562 i Pcb2568 (haplotip 3SRB\_PCB) su međusobno identični sa procentom sličnosti od 98,82% do 100% u poređenju sa *P. brasiliense* sojevima iz baze. Na osnovu sekvenci *acnA* gena utvrđen je procenat identiteta od 100% sa Ec46 sojem (Izrael, *Capsicum anuum*, EF550644), *dnaX* gena od 99,35% sa SX309 sojem (Kina, krastavac, CP020350), *gapA* i *icdA* gena od 99,74%, odnosno 99,78% sa sojem A45 (Sirija, krompir, HM156948), *mdh* gena od 100% sa sojem HNP201719 (Južna Koreja, krompir, CP046380), *pgi* gena od 99,07% i *proA* gena od 98,82% sa BZA12 sojem (Kina, krastavac, CP024780).

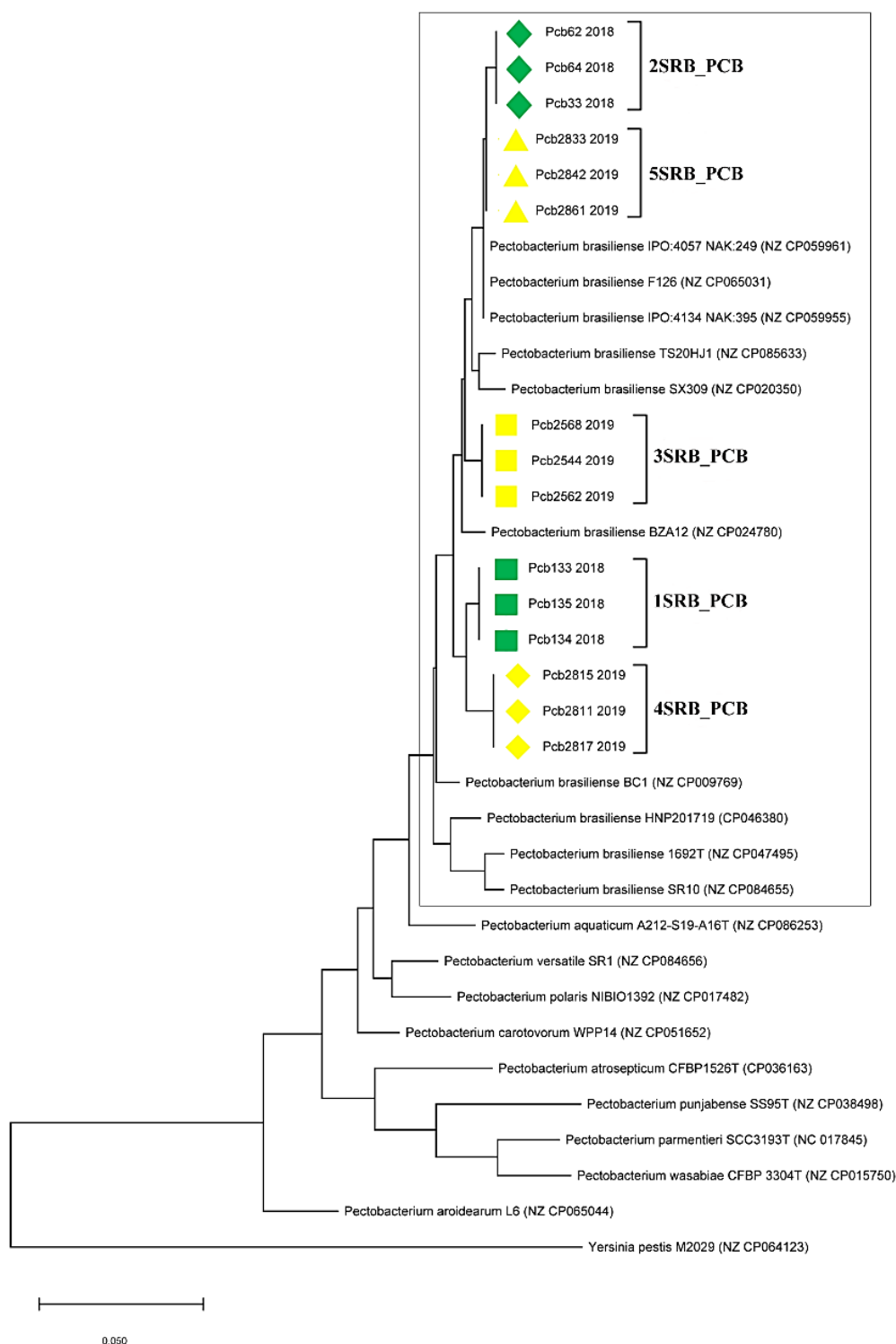
Izolati Pcb2811, Pcb2815 i Pcb2817 (haplotip 4SRB\_PCB) su međusobno identični sa procentom sličnosti od 98,70% do 100% u poređenju sa *P. brasiliense* sojevima iz baze. Na osnovu sekvenci *acnA* i *dnaX* gena utvrđen je procenat identiteta od 100%, odnosno 98,70% sa SX309 sojem (Kina, krastavac, CP020350), *gapA* i *pgi* gena od 99,48%, odnosno 99,07%, redom sa sojem BZA12 (Kina, krastavac, CP024780), *icdA* gena od 99,78% sa sojem A45 (Sirija, krompir, HM156948), *mdh* gena od 100% sa HNP201719 sojem (Južna Koreja, krompir, CP046380) i *proA* gena 99,41% sa IPO:4062 NAK:237 sojem (Holandija, krompir, CP059959).

Izolati Pcb2833, Pcb2842 i Pcb2861 (haplotip 5SRB\_PCB) su međusobno identični sa procentom sličnosti od 99,78% do 100% u poređenju sa *P. brasiliense* sojevima iz baze. Na osnovu sekvenci izolata *acnA*, *gapA*, *icdA*, *mdh* i *proA* gena utvrđen je procenat identiteta od 100% sa IPO:4057 NAK:249 sojem (Holandija, krompir, CP059961), *dnaX* gena od 99,78% sa F126 sojem (Rusija, krompir, CP065031) i *pgi* gena od 100% sa HAFL05 sojem (Švajcarska, krompir, KP027695).

Filogenetska analiza ispitivanih *P. brasiliense* izolata urađena na osnovu pojedinačnih sekvenci za svaki gen ukazuju da svi geni grupišu ispitivane *P. brasiliense* izolate iz Srbije sa *P. brasiliense* sojevima iz NCBI baze (prema *acnA*, *dnaX*, *gapA* i *proA* genima *P. aquaticum* se grupiše zajedno sa *P. brasiliense* izolatima i sojevima iz baze) (Prilog 18C, D). Prema pojedinačnim sekvencama *pgi* gena 15 ispitivanih *P. brasiliense* izolata se razdvojilo na pet haplotipova. Geni *dnaX*, *gapA* i *icdA*, razdvojili su izolate u četiri različita klastera (geni nisu razdvojili haplotipove 2SRB\_PCB i 5SRB\_PCB), dok su *acnA*, *mdh* i *proA* geni razdvojili izolate u tri klastera.

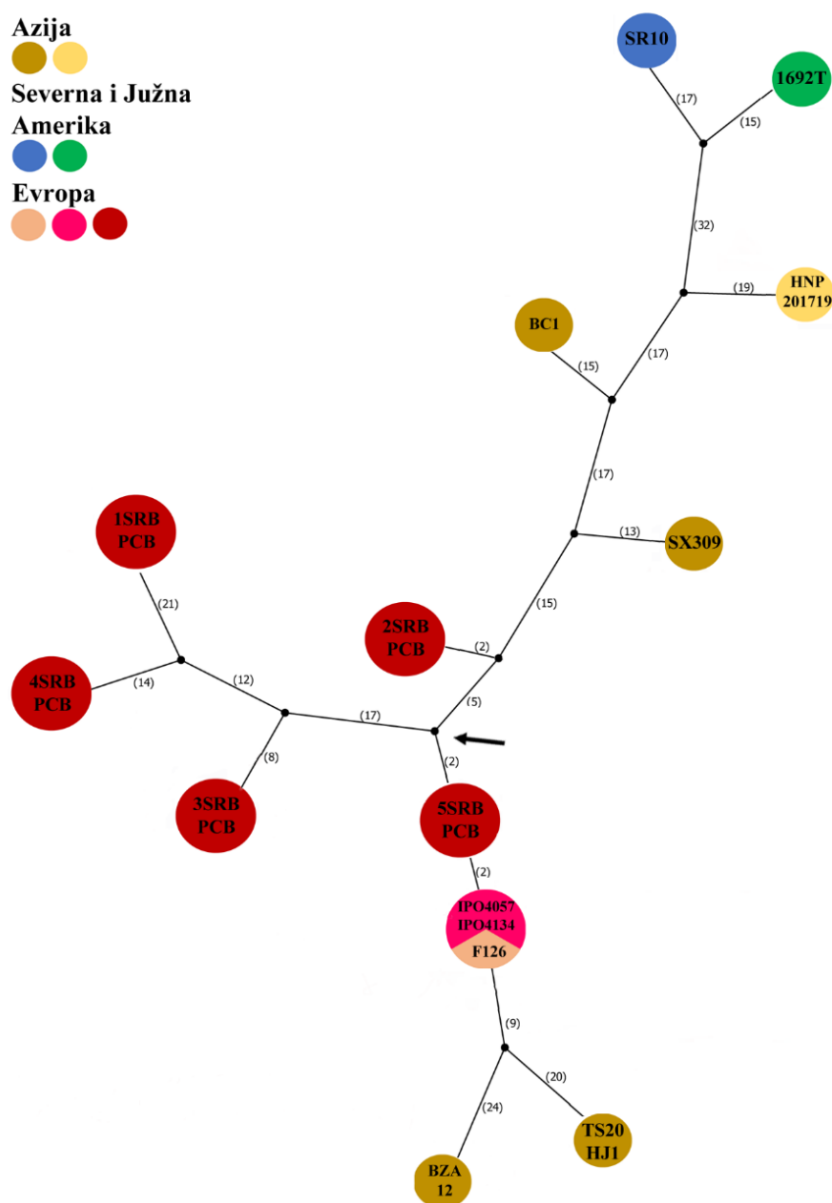
Na filogenetskom stablu konstruisanom na osnovu konkatamernih sekvenci svi ispitivani *P. brasiliense* izolati su se zajedno sa drugim *P. brasiliense* sojevima iz NCBI baze grupisali u poseban klaster (Slika 26). U okviru tog klastera na stablu je jasno odvojeno svih pet haplotipova. Svi haplotipovi su se zajedno sa IPO:4057 NAK:249, F126, IPO:4134 NAK:395, TS20HJ1, SX309 i BZA12 sojevima izdvojili u jedan podklaster, dok su se sojevi BC1, HNP201719, 1692T, SR10 odvojili u drugi podklaster. U okviru prvog podklastera nalaze se haplotipovi 2SRB\_PCB i 5SRB\_PCB koji su međusobno veoma srodni, kao i IPO:4057 NAK:249, F126, IPO:4134 NAK:395, TS20HJ1 i SX309 sojevi. Haplotip 3SRB\_PCB zauzima centralnu poziciju u okviru podklastera i srodniji je sa BZA12 sojem nego se haplotipovima 1SRB\_PCB i 4SRB\_PCB, koji se takođe nalaze u okviru prvog podklastera. *P. aquaticum* (A212-S19-A16T), *P. versatile* (SR1), *P. polaris*

(NIBIO1392), *P. carotovorum* (WPP14), *P. atrosepticum* (CFBP 1526T) i *P. aroidearum* (L6) su se na filogenetskom stablu pozicionirale pojedinačno, dok su vrste *P. punjabense* (SS95T), *P. parmentieri* (SCC3193T) i *P. wasabiae* (CFBP 3304T) međusobno srodnije i grupisane su u jedan klaster.



**Slika 26.** Filogenetsko stablo konstruisano na osnovu konkatomernih sekvenci *acnA*, *dnaX*, *gapA*, *icdA*, *mdh*, *pgi* i *proA* gena za 15 reprezentativnih *P. brasiliense* izolata poreklom sa krompira iz Srbije i drugih *Pectobacterium* spp. sojeva deponovanih u NCBI bazi (Prilog 12). Zelenom bojom označeni su izolati dobijeni iz uzoraka sakupljenih 2018. godine, a žutom bojom izolati iz 2019. godine. Različiti simboli (romb, trougao, kvadrat) se odnose na iste ili različite lokalitete sa kojih su sakupljeni uzorci (Prilog 2)

Genealoška TCS haplotipska mreža konstruisana na osnovu konkatamernih sekvenci 15 reprezentativnih izolata i sojeva iz NCBI baze korišćenjem statističke parsimonije je pokazala nešto drugačiji raspored među *P. brasiliense* haplotipovima nego filogenetsko stablo dobijeno korišćenjem Maximum likelihood metode (Slika 27). Svi haplotipovi su podeljeni u tri grupe koje su spojene preko haplotipa - vektora koji predstavlja nedostajući ili neuzorkovani intermedijarni haplotip. Haplotipovi iz Srbije pozicionirani su oko mesta račvanja TCS mreže. U prvoj grupi se nalaze tri haplotipa izolovana u Srbiji (1SRB\_PCB, 3SRB\_PCB i 4SRB\_PCB), dok se haplotipovi 2SRB\_PCB i 5SRB\_PCB nalaze u druge dve grupe i na različitim kracima TCS mreže. Haplotip 2SRB\_PCB se nalazi na kraku zajedno sa haplotipovima SX309 i BC1 izolovanim u Kini, HNP201719 u Južnoj Koreji, kao i haplotipovima SR10 (SAD) i 1692T (Brazilu). Haplotip 5SRB\_PCB se nalazi u trećoj grupi kao i haplotipovi izolavani u Holandiji (IPO:4057 NAK:249 i IPO:4134 NAK:395), Rusiji (F126) i Kini (BZA12, TS20HJ1).

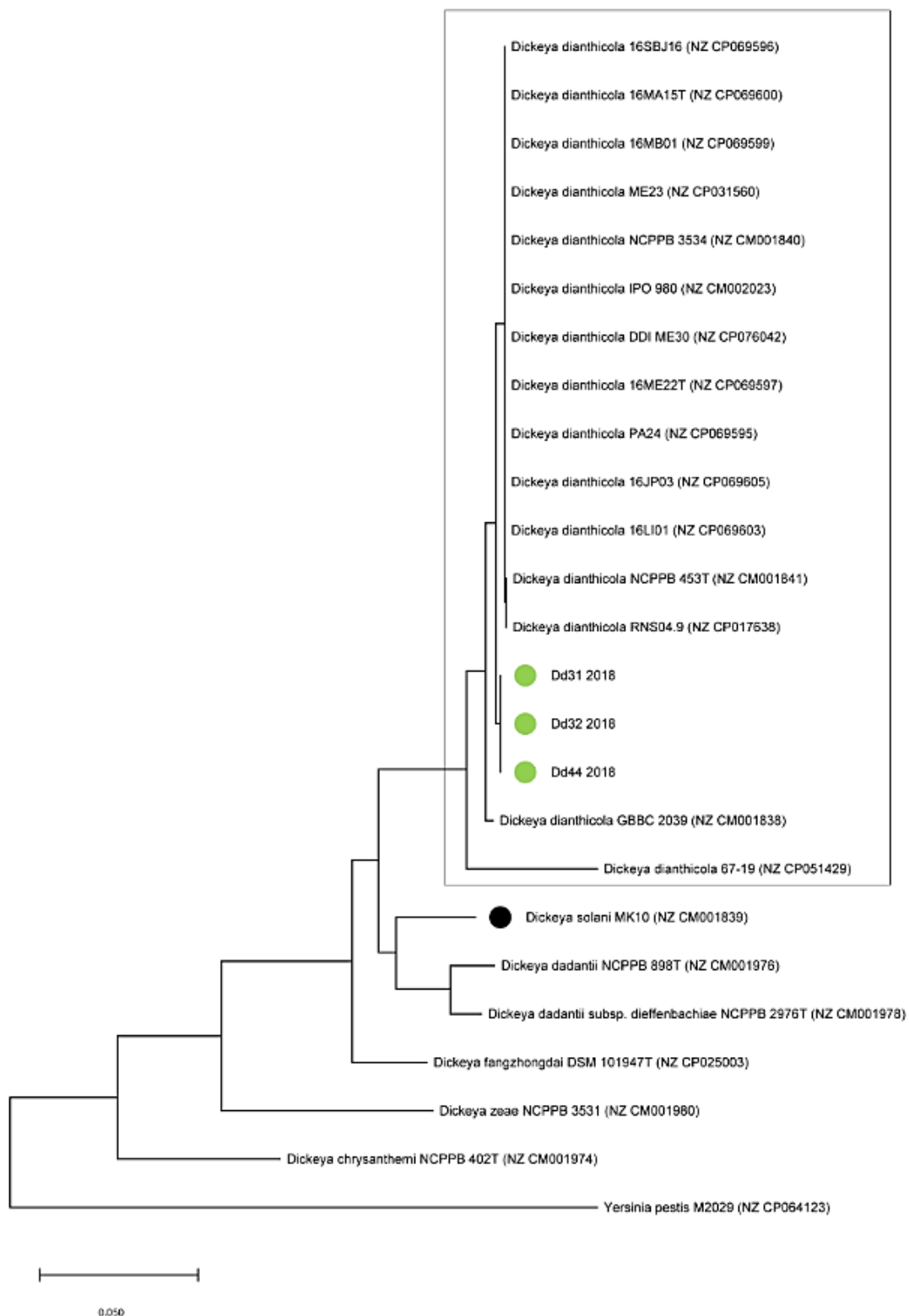


**Slika 27.** TCS mreža sa pet različitih *P. brasiliense* haplotipova iz Srbije i drugih *P. brasiliense* sojeva iz NCBI baze (Prilog 12). Haplotipovi iz Srbije su označeni od 1SRB\_PCB do 5SRB\_PCB. Geografsko poreklo haplotipova je označeno bojama kako je dato u legendi. Veličine krugova su proporcionalne broju izolata/sojeva koji pripadaju određenom haplotipu. Crne međusobno povezane tačke su srednji vektori koji predstavljaju nedostajuće ili neuzorkovane intermedijarne haplotipove, dok brojevi u zagradama predstavljaju nukleotidne razlike. Crna strelica ukazuje na mesto grananja TCS mreže

BLASTn analiza sekvenci sedam konzerviranih gena (*acnA*, *dnaX*, *gapA*, *icdA*, *mdh*, *pgi* i *proA*) je potvrdila identitet *D. dianthicola* izolata. Tri izolata, Dd31, Dd32 i Dd44, su međusobno identična sa procentom sličnosti od 97,50% do 100% u poređenju sa različitim *D. dianthicola* sojevima iz NCBI baze. Na osnovu sekvenci *acnA* gena utvrđen je procenat identiteta izolata od 97,50% sa 2820 sojem (SAD, krompir, KT932317), *dnaX* gena od 100% sa DRN sojem (SAD, krompir, MH233575), *gapA*, *icdA*, *mdh* i *pgi* gena od 100%, i *proA* gena od 99,86% sa RNS04.9 sojem (Francuska, krompir, CP017638).

Filogenetska stabla konstruisana na osnovu pojedinačnih sekvenci *acnA*, *dnaX*, *gapA*, *icdA*, *mdh* i *pgi* gena pokazala su da se svi *D. dianthicola* izolati i sojevi iz NCBI baze grupišu u jedan klaster (Prilog 18E-G). Izuzetak je *D. dianthicola* 67-19 soj koji se prema *proA* genu potpuno odvojio od ostalih *D. dianthicola* sojeva i grupisao se sa *D. chrysanthemi* NCPPB 402T sojem. Korišćenjem pojedinačnih sekvenci *acnA*, *dnaX* i *gapA* gena *D. dianthicola* izolati i sojevi se razdvajaju u tri podklastera, dok se prema pojedinačnim sekvencama *icdA*, *mdh* i *pgi* gena razdvajaju u dva klastera. Ispitivani *D. dianthicola* izolati (Dd31, Dd32 i Dd44) se samo prema *acnA* genu razlikuju od ostalih sojeva iz baze i grupišu se samostalno.

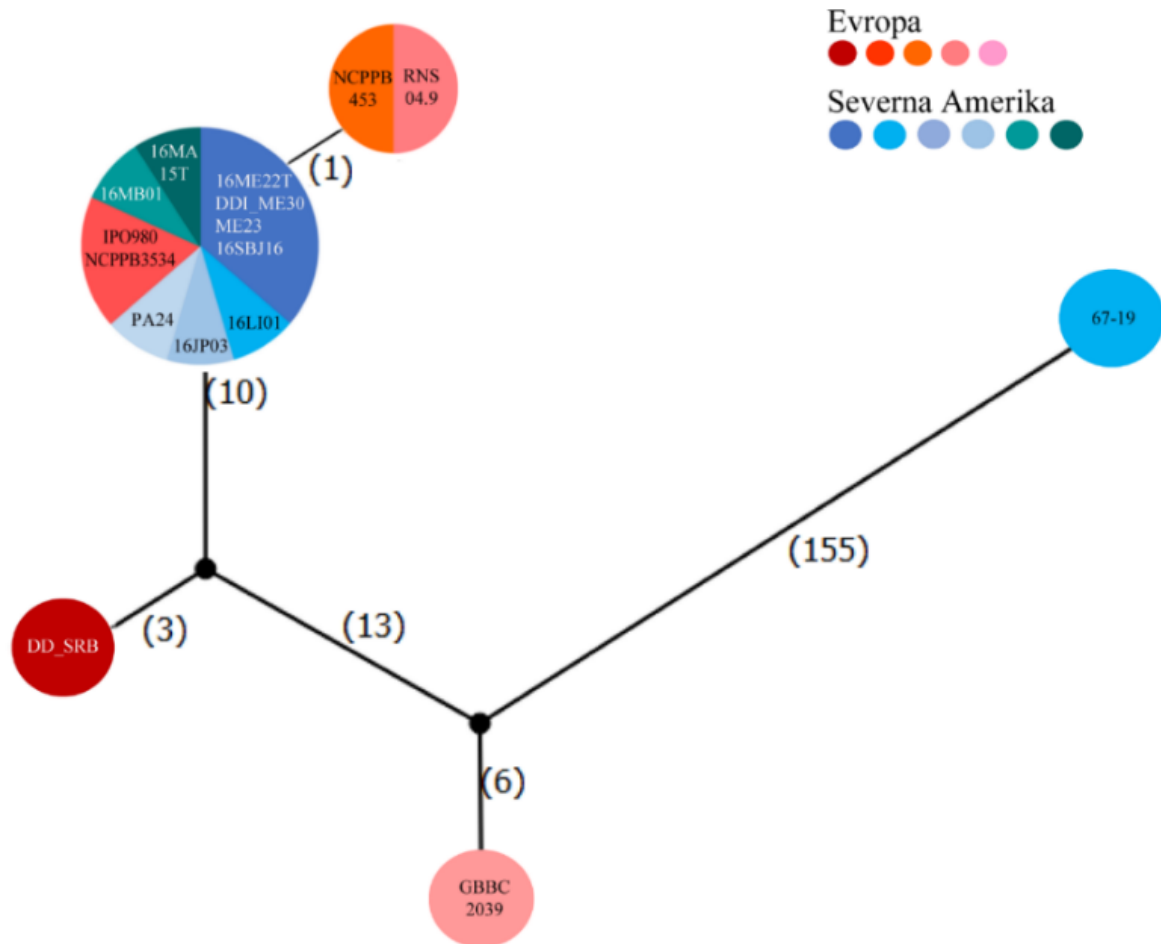
Na filogenetskom stablu konstruisanom na bazi konkatamernih sekvenci svi ispitivani *D. dianthicola* izolati su se zajedno sa drugim *D. dianthicola* sojevima iz NCBI baze grupisali u jedan klaster (Slika 28). U okviru tog klastera *D. dianthicola* izolati (Dd31, Dd32 i Dd44) su se izdvojili u poseban podklaster zajedno sa 16SBJ16, 16MA15T, 16MB01, ME23, NCPPB 3534, IPO980, DDI ME30, 16ME22T, PA24, 16JP03, 16LI01, NCPPB 453T, RNS04.9 i GBBC2039 sojevima iz NCBI baze. U okviru ovog podklastera, ispitivani izolati su bili srodniji sa 16SBJ16, 16MA15T, 16MB01, ME23, NCPPB 3534, IPO980, DDI ME30, 16ME22T, PA24, 16JP03, 16LI01, NCPPB 453T i RNS04.9 sojevima nego sa GBBC2039 sojem. Soj 67-19 se jedini izdvojio u drugi podklaster. Od ostalih *Dickeya* spp. vrste *D. dadantii* (NCPPB 898T) i *D. dadantii* subsp. *dieffenbachiae* (NCPPB 2976T), su bile srodnije međusobno nego sa *D. solani* (MK10), *D. fangzhongdai* DSM 101947T, *D. zaeae* (NCPPB 3531) i *D. chrysanthemi* (NCPPB 402T) vrstama koje su se na filogenetskom stablu pozicionirale pojedinačno.



**Slika 28.** Filogenetsko stablo konstruisano na osnovu konkatamernih sekvenci *acnA*, *dnaX*, *gapA*, *icdA*, *mdh*, *pgi* i *proA* gena za tri reprezentativna *D. dianthicola* izolata poreklom sa krompira iz Srbije i drugih *Dickeya* spp. sojeva iz NCBI baze (Prilog 12). Zelenim krugom su obeleženi *D. dianthicola* izolati dobijeni iz uzoraka sakupljenih 2018. godine (Prilog 2), a crnim krugom referentni *D solani* MK10 soj



Konstruisana TCS mreža na bazi statističke parsimonije je pokazala slične rezultate sa rezultatima filogenetske analize dobijene korišćenjem Maximum likelihood metode (Slika 29). Tri reprezentativna *D. dianthicola* izolata poreklom sa krompira iz Srbije perzistiraju kao jedan haplotip koji je označen sa DD\_SRB. Ovaj haplotip je pozicioniran u sredini haplotipske mreže i indirektno je preko vektora je povezan sa haplotipom koga čine 11 sojeva iz NCBI baze. Ovi sojevi su poreklom iz SAD-a iz Mejna (16ME22T, DDI ME30, ME23 i 16SBJ16), Njujorka (16LI01), Virdžinije (16JP03), Pensilvanije (PA24); Holandije (NCPB 3534 i IPO980); SAD-a iz Nju Džerzija (16MB01) i SAD-a iz Masačusetsa (16MA15T).



**Slika 29.** TCS mreža sa *D. dianthicola* haplotipom iz Srbije i drugim *D. dianthicola* sojevima iz NCBI baze (Prilog 12). Haplotip iz Srbije je označen sa DD\_SRB i predstavljen je tamno crvenim krugom. Geografsko poreklo haplotipova je označeno bojama kako je dato u legendi. Veličine krugova su proporcionalne broju izolata/sojeva koji pripadaju određenom haplotipu. Crne međusobno povezane tačke su srednji vektori koji predstavljaju nedostajuće ili neuzorkovane intermedijarne haplotipove, dok brojevi u zagradama predstavljaju nukleotidne razlike

#### 4.5. ANALIZA DIVERZITETA ZAJEDNICA MIKROORGANIZAMA KRTOLA KROMPIRA

Prosečna dužina 16S rRNK sekvenci V3 i V4 regiona kod šest ispitivanih uzoraka krtola (K1, K2, K3) i zemljišta (Z1, Z2 i Z3) se kretala između 455 i 465 bp. Nakon skraćivanja i kvalitativnog filtriranja sekvenci zadržane su 537192 sekvence. Nakon grupisanja dobijenih OTU-a, dobijeno je 257843 OTU-a za uzorke krompira i 279349 za uzorke zemljišta. Bakterijske zajednice su bile bogate

i raznolike u svim uzorcima na svim taksonomskim nivoima. Najveći alfa diverzitet (prikazan kroz FisherAlpha indeks) je utvrđen u uzorku krtola krompira bez simptoma vlažne truleži (K3), kao i u zemljištu koje je okruživalo te krtole (Z3). Isti uzorci (K3 i Z3) imali su najveće vrednosti za sve procenitelje alfa diverziteta osim za Shannon i Simpson indeks. Ovi indeksi nisu otkrili značajnu razliku između uzoraka krtola sa i bez simptoma vlažne truleži krompira i odgovarajućih uzoraka zemljišta (Tabela 3). Za sve uzorke OBS vrednosti, kao indikatori diverziteta vrsta, bili su najveći na nivou roda. Razlike između posmatranog i procenjenog diverziteta bile su u pozitivnoj korelaciji prema Chao1 i ACE indeksima na svim taksonomskim nivoima.

**Tabela 3.** Indeksi alfa diverziteta bakterijskih zajednica na različitim taksonomskim nivoima

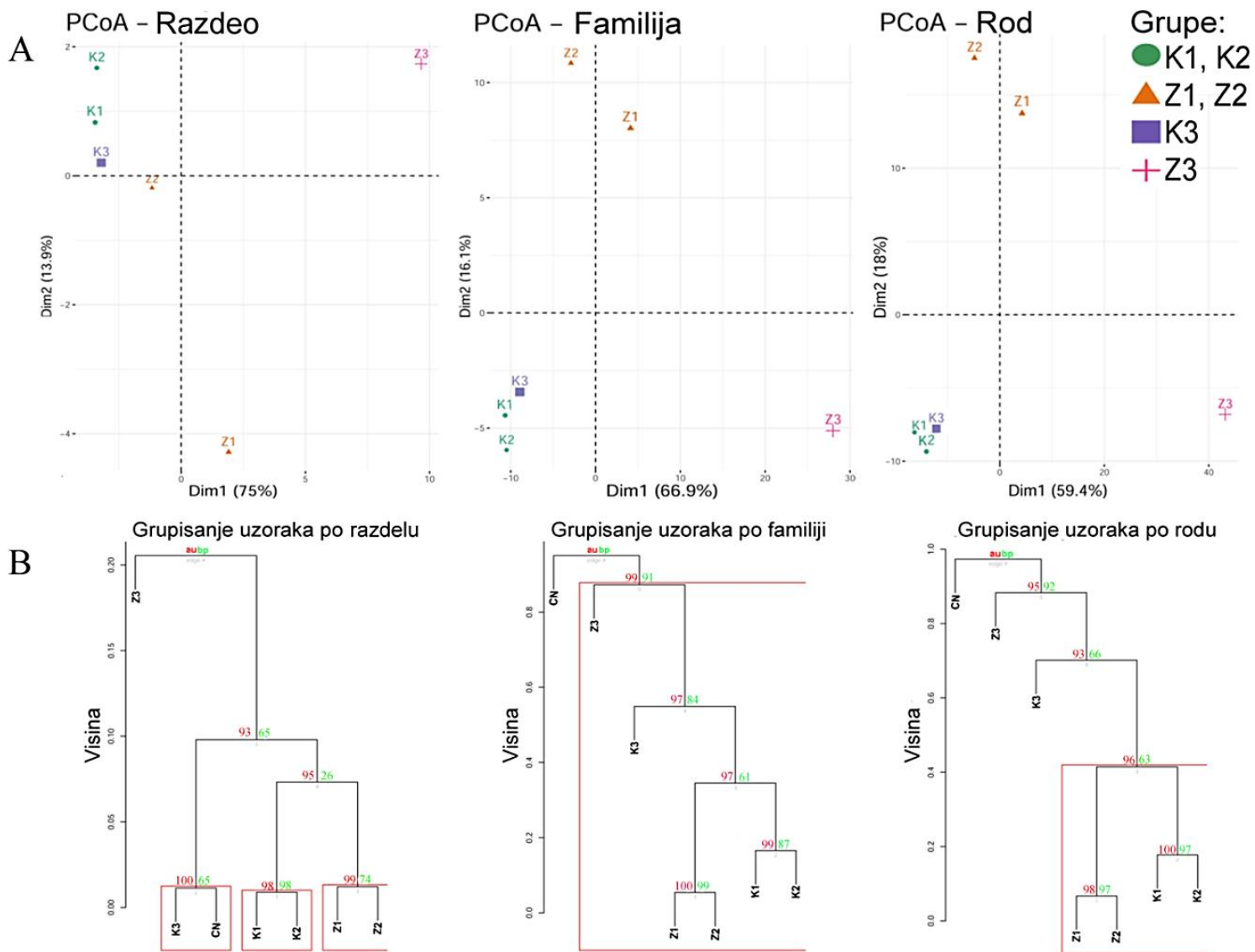
	Shannon	Simpson	invSimpson	FisherAlpha	OBS	CHAO1	CHAO1.SE	ACE	ACE.SE
<b>K1</b>	1.07*	0.63	2.69	1.17	13	19.00	7.19	21.08	2.09
	2.62**	0.90	9.88	10.25	92	116.43	15.17	110.46	5.28
	3.09***	0.92	12.35	23.71	193	234.00	16.77	233.37	7.55
<b>K2</b>	1.05	0.62	2.65	1.15	13	13.00	0.12	13.89	1.89
	2.26	0.84	6.10	10.61	96	117.11	12.61	117.86	5.52
	2.71	0.86	7.34	23.1	191	234.75	16.31	250.78	8.07
<b>K3</b>	0.65	0.35	1.54	1.66	18	23.00	6.00	25.30	1.97
	1.86	0.75	4.07	15.94	137	200.07	26.09	197.9	7.27
	2.55	0.87	7.62	32.46	256	347.00	27.65	343.15	9.48
<b>Z1</b>	1.73	0.73	3.73	2.04	22	22.00	0.24	22.53	1.66
	3.69	0.95	18.61	27.81	227	236.10	6.49	234.54	6.62
	4.20	0.96	23.65	68.11	495	551.45	18.28	549.07	11.35
<b>Z2</b>	1.44	0.67	3.02	2.05	22	22.50	1.29	23.89	1.89
	3.21	0.91	11.55	27.58	224	240.87	9.29	238.39	7.24
	3.77	0.93	13.95	63.68	464	514.73	16.52	509.17	11.01
<b>Z3</b>	2.05	0.82	5.58	2.80	29	31.00	2.88	32.29	2.42
	4.13	0.97	30.04	33.06	261	294.07	15.56	289.37	7.24
	4.54	0.97	34.69	86.55	600	685.85	22.33	693.23	12.83

\* vrednosti indeksa date u prvom redu se odnose na vrednosti dobijene za razdele

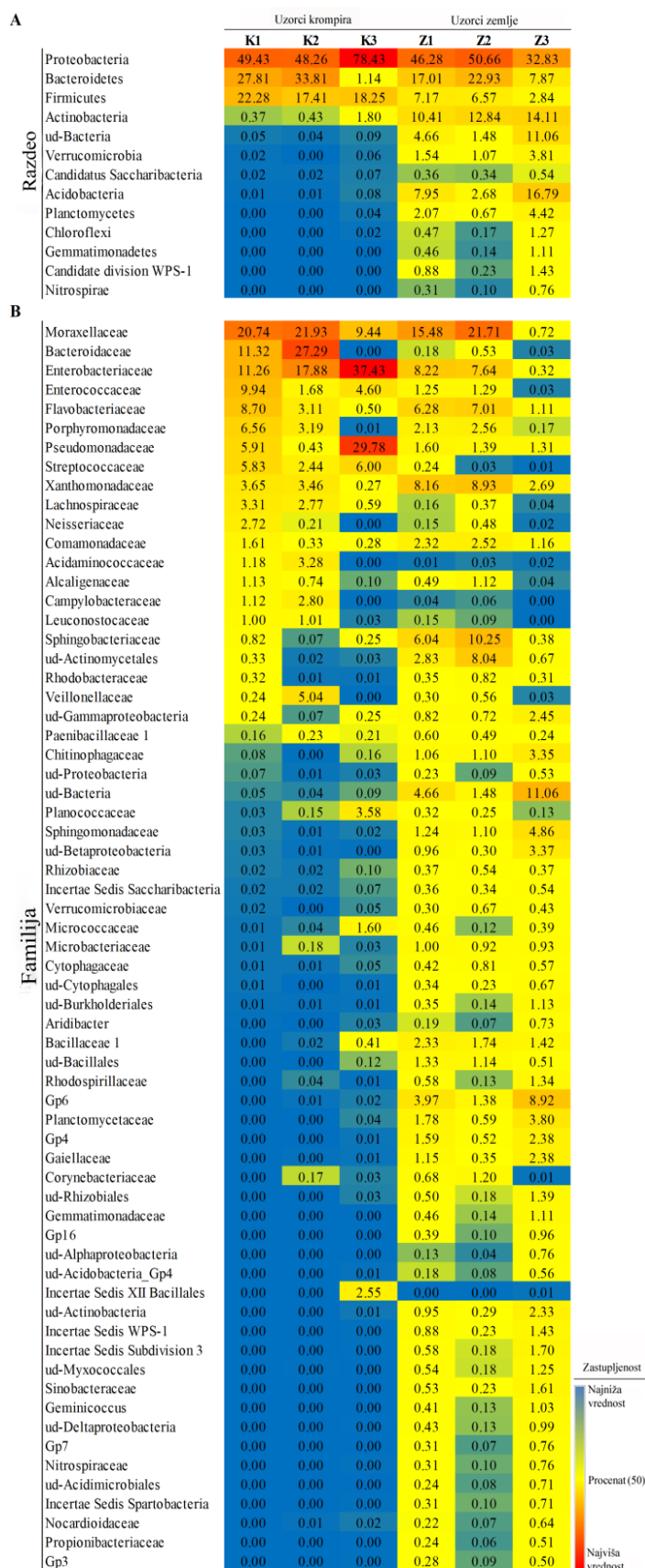
\*\* vrednosti indeksa date u drugom redu se odnose na vrednosti dobijene za familije

\*\*\* vrednosti indeksa date u trećem redu se odnose na vrednosti dobijene za rodove

Beta diverzitet procenjen PCoA analizom utvrdio je blisku povezanost između uzoraka krtola krompira odnosno, da je sastav bakterijske zajednice kod uzoraka K1, K2 i K3 sličniji međusobno nego sa uzorcima zemljišta (Z1, Z2 i Z3) na šta su ukazale vrlo visoke vrednosti prve dimenzije (Dim1 u rasponu od 59,4-75%) na svim taksonomskim nivoima (Slika 30A). Prema glavnoj osi disjunkcije, uzorci Z1 i Z2, bili su sličniji jedan drugome u odnosu na Z3 uzorak. Analiza PCoA je jasno pokazala odvajanje uzorka Z3 od svih ostalih uzoraka. Prema drugoj dimenziji (Dim2), svi uzorci krtola krompira (K1, K2 i K3) su bili bliži uzorku zemljišta Z3. Klaster analiza (CCA) zasnovana na specifičnoj zastupljenosti bakterijskih taksona je pokazala da su uzorci krtola krompira K1 i K2 najbliži i da su grupisani sa odgovarajućim uzorcima zemljišta Z1 i Z2 (Slika 30B).



**Slika 30.** Beta diverzitet bakterijskih zajednica na različitim taksonimskim nivoima: A) PCoA analiza bakterijskih sastava; B) CCA analiza bakterijskih sastava za šest uzoraka. Dendrogrami ukazuju na AU (*engl.* approximately unbiased) i BP (*engl.* bootstrap probability) vrednosti (p-vrednosti  $\geq 95\%$ ). AU vrednosti su obeležene crvenom bojom, BP zelenom bojom, dok crveni okviri pokazuju približno nepristrasne p-vrednosti ( $\geq 95\%$ ) (Marković *et al.*, 2022b)



**Slika 31.** Relativna zastupljenost predstavnika bakterijskih: A) razdela; B) familija. Uključeni su samo taksoni sa ukupnom procentualnom zastupljenošću iznad 0,5% za sve uzorke (Marković *et al.*, 2022b)

Raznovrsnost bakterija na nivou razdela i familija, sa ukupnom procentualnom zastupljenošću taksona iznad 0,5% za sve uzorke prikazana je na slici 31. Relativna zastupljenost različitih razdela ukazuje na veći diverzitet uzoraka zemljišta (Z1, Z2 i Z3) u poređenju sa uzorcima krompira (K1, K2 i K3) (Slika 31A). Proteobakterije su bile prisutne u svih šest uzoraka u rasponu od 32,83 % do 78,43%. Njihova zastupljenost je skoro dva puta veća u uzorku krompira K3 u poređenju sa uzorcima K1 i K2. U svim uzorcima bile su prisutne bakterije iz razdela: Bacteroidetes, Firmicutes i Actinobacteria. Razdela Planctomycetes, Verrucomicrobia, Candidatus Saccharibacteria, Chloroflexi, Gemmatimonadetes, Nitrospirae i Candidatus Saccharibacteria bili su najzastupljeniji u uzorku Z3.

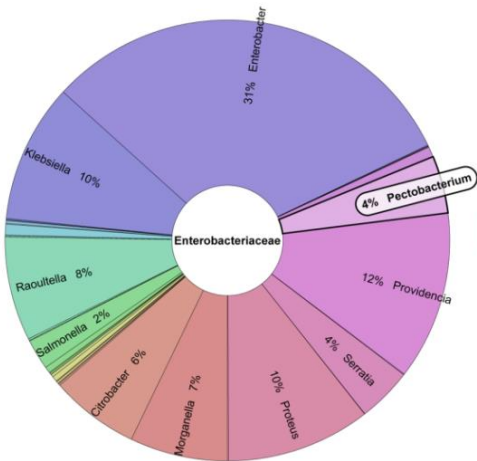
Slika 31B ukazuje na veći diverzitet familija u uzorcima zemljišta nego u uzorcima krtola krompira. U uzorcima krtola sa simptomima vlažne truleži krompira (K1 i K2) i njihovom zemljištu (Z1 i Z2) najzastupljenije su bile familije Moraxellaceae, Bacteroidaceae, Flavobacteriaceae, Porphyromonadaceae, Xanthomonadaceae, Lachnospiraceae, Neisseriaceae, Comamonadaceae, Alcaligenaceae, Leuconostocaceae i Veillonellaceae. U uzorku krtola krompira bez simptoma (K3) preovladavale su Enterobacteriaceae i Pseudomonadaceae. Iako prisutne u manjoj meri, familije Planococcaceae, Micrococcaceae, Incertae Sedis XII, Bacillales i Bacillaceae 1 su bile zastupljene u uzorku K3. Ostale familije kao što su Gp6 (Acidobacteria), Sphingomonadaceae, Planctomycetaceae, Betaproteobacteria, Gp4 (Acidobacteria), Sinobacteriaceae, Gaiellaceae i Gammaproteobacteria, bile su najzastupljenije u uzorku Z3.

Rod	Uzorci krompira			Uzorci zemlje		
	K1	K2	K3	Z1	Z2	Z3
<i>Acinetobacter</i>	20.45	21.66	9.39	15.44	21.64	0.72
<i>Bacteroides</i>	11.32	27.29	0.00	0.18	0.53	0.03
<i>Vagococcus</i>	8.34	1.04	3.14	0.76	1.12	0.02
<i>Lactococcus</i>	5.82	2.44	6.00	0.24	0.03	0.00
<i>Dysgonomonas</i>	5.34	2.57	0.01	1.81	2.15	0.12
<i>Empedobacter</i>	5.27	0.97	0.02	2.49	4.08	0.05
<i>Wohlfahrtiimonas</i>	3.31	3.01	0.00	0.00	0.01	0.00
<i>Clostridium XIVa</i>	2.99	2.21	0.58	0.08	0.20	0.01
<i>Myroides</i>	2.77	0.76	0.01	0.52	0.52	0.01
<i>Enterobacter</i>	1.51	1.82	10.67	1.07	1.45	0.07
<i>Enterococcus</i>	1.41	0.57	1.38	0.47	0.17	0.01
<i>Providencia</i>	1.37	0.80	0.01	0.01	0.03	0.01
<i>Proteus</i>	1.16	5.41	0.01	0.00	0.01	0.00
<i>Arcobacter</i>	1.12	2.80	0.00	0.04	0.06	0.00
<i>Kerstersia</i>	1.08	0.33	0.00	0.03	0.07	0.00
<i>Leuconostoc</i>	0.89	0.10	0.01	0.12	0.02	0.00
<i>Sphingobacterium</i>	0.81	0.07	0.21	5.70	9.10	0.25
<i>Morganella</i>	0.77	2.08	0.01	1.26	2.29	0.00
<i>Pseudomonas</i>	0.66	0.03	28.03	0.97	0.71	0.88
<i>Pectobacterium</i>	0.42	1.03	5.75	1.71	1.44	0.06
<i>Stenotrophomonas</i>	0.31	0.44	0.24	7.34	6.49	0.20
<i>Flavobacterium</i>	0.19	1.20	0.19	0.99	1.26	0.66
<i>Propionispira</i>	0.16	4.94	0.00	0.26	0.55	0.00
<i>Paenibacillus</i>	0.15	0.18	0.21	0.55	0.43	0.19
<i>Raoultella</i>	0.15	0.16	6.80	1.65	0.17	0.02
<i>Weissella</i>	0.11	0.90	0.02	0.03	0.08	0.00
<i>Comamonas</i>	0.09	0.08	0.01	0.99	0.89	0.07
<i>Citrobacter</i>	0.04	0.77	0.18	0.10	0.02	0.00
<i>Kurthia</i>	0.02	0.14	3.42	0.18	0.13	0.00
<i>Achromobacter</i>	0.02	0.03	0.09	0.21	0.52	0.02
<i>Sphingobium</i>	0.01	0.01	0.02	0.28	0.37	1.58
<i>Arthrobacter</i>	0.01	0.04	1.53	0.36	0.10	0.33
<i>Leadbetterella</i>	0.01	0.01	0.00	0.29	0.59	0.10
<i>Chryseobacterium</i>	0.01	0.00	0.26	1.63	0.37	0.32
<i>Aridibacter</i>	0.00	0.00	0.03	0.19	0.07	0.73
<i>Microbacterium</i>	0.00	0.00	0.02	0.66	0.48	0.25
<i>Sphingomonas</i>	0.00	0.00	0.00	0.42	0.21	1.71
<i>Lysobacter</i>	0.00	0.00	0.00	0.12	0.14	0.68
<i>Corynebacterium</i>	0.00	0.17	0.03	0.67	1.19	0.01
<i>Gaiella</i>	0.00	0.00	0.01	1.15	0.35	2.38
<i>Bacillus</i>	0.00	0.02	0.36	1.95	1.49	1.18
<i>Gemmatimonas</i>	0.00	0.00	0.00	0.46	0.14	1.11
<i>Microtholunatus</i>	0.00	0.00	0.00	0.23	0.06	0.50
<i>Exiguobacterium</i>	0.00	0.00	2.55	0.00	0.00	0.01
<i>Nitrospira</i>	0.00	0.00	0.00	0.31	0.10	0.76
<i>Pirellula</i>	0.00	0.00	0.00	0.39	0.12	0.71
<i>Geminicoccus</i>	0.00	0.00	0.00	0.41	0.13	1.03
<i>Skermanella</i>	0.00	0.00	0.00	0.32	0.07	0.62
<i>Pseudofulvimonas</i>	0.00	0.00	0.00	0.12	0.97	0.02
<i>Pseudoxanthomonas</i>	0.00	0.01	0.02	0.10	0.26	0.54

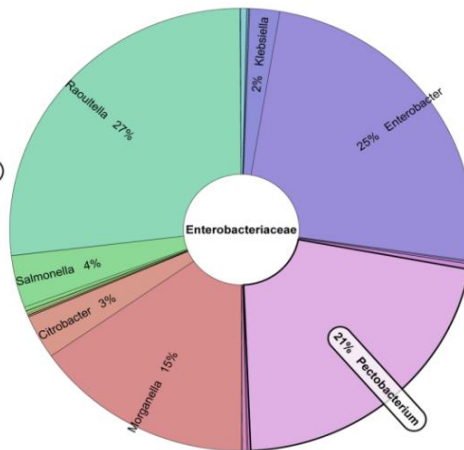
**Slika 32.** Relativna zastupljenost bakterijskih rodova u uzorcima krtola krompira sa simptomima vlažne truleži (K1 i K2) i bez simptoma (K3) kao i odgovarajućih uzoraka zemljišta (Z1 i Z2 zemljište koje je okruživalo krtole sa simptomima vlažne truleži, Z3 zemljište koje je okruživalo krtole bez simptoma). Uključeni su samo rodovi sa ukupnom procentualnom zastupljenošću iznad 0,5% za sve uzorke (Marković *et al.*, 2022b)

Na nivou roda uočen je veći diverzitet u uzorcima zemljišta nego u uzorcima krtola krompira (Slika 32). *Acinetobacter* je bio najdominantniji rod u uzorcima K1 i K2 sa relativnom zastupljenošću većom od 20%. Ovaj rod je takođe bio najdominantniji u uzorcima zemljišta Z1 i Z2, sa relativnom zastupljenošću od 15 odnosno 21%. Rodovi kao što su *Bacteroides*, *Dysgonomonas*, *Empedobacter*, *Myroides*, *Morganella* i *Propionispira* su bili skoro isključivo prisutni u uzorcima krtola sa simptomima vlažne truleži i njihovom zemljištu (K1, K2, Z1 i Z2). Pored navedenih, rodovi *Wohlfahrtiimonas*, *Clostridium XIVa*, *Providencia*, *Proteus*, *Arcobacter*, *Kerstersia* i *Weissella* su dominirali samo u krtolama sa simptomima vlažne truleži (K1 i K2), dok su rodovi *Sphingobacterium*, *Stenotrophomonas*, *Comamonas*, *Achromobacter* i *Corynebacterium* bili zastupljeni u uzorcima Z1 i Z2. Najzastupljeniji rodovi u uzorku K3 su bili *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Raoultella*, *Pectobacterium*, *Kurthia*, *Exiguobacterium* i *Arthrobacter*, dok su u uzorku Z3 bili *Gaiella*, *Sphingomonas*, *Sphingobium*, *Gemmatimonas* i *Geminicoccus*.

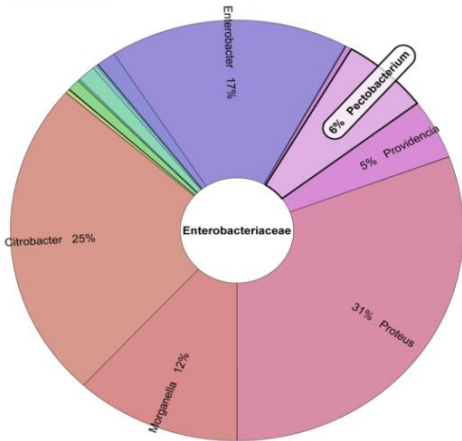
Uzorak K1



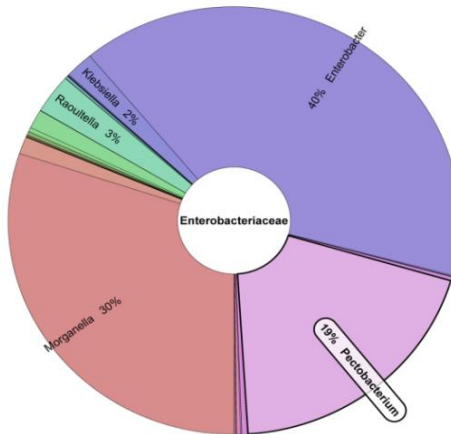
Uzorak Z1



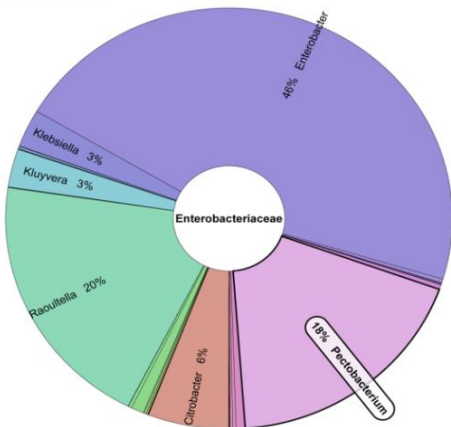
Uzorak K2



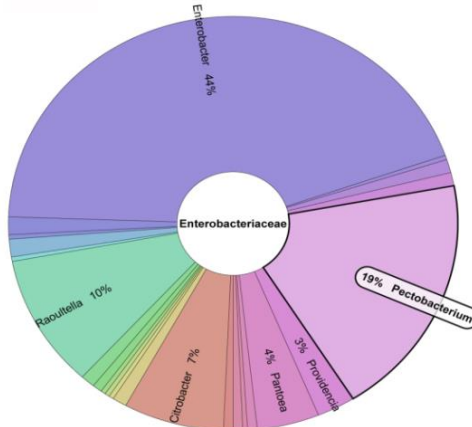
Uzorak Z2



Uzorak K3



Uzorak Z3



Diverzitet i brojnost rodova iz familije Enterobacteriaceae u svim uzorcima prikazani su na slici 33. *Pectobacterium* spp. su bili najzastupljeniji u uzorcima krompira K3 (krtole bez simptoma vlažne truleži) sa 18%, kao i u sva tri uzorka zemljišta Z1-Z3 (19-21%). U skupu baze podataka rod *Dickeya* nije pronađen.

**Slika 33.** Relativna brojnost rodova u familiji Enterobacteriaceae u svim uzorcima (Marković *et al.*, 2022b)

Rezultati dobijeni posebnom manuelnom BLAST analizom za *Pectobacterium* spp. i *Dickeya* spp. prikazani su u Tabeli 4. Sekvence identifikovane kao *Dickeya* spp. bile su na granici detekcije, dok su *Pectobacterium* spp. bile prisutne u svim uzorcima do 7% (uzorak K3). Među utvrđenim sekvencama vrsta koje su mogući prouzrokovaci vlažne truleži krompira pronađene su sekvence *P. aroidearum*, *P. atrosepticum*, *P. carotovorum* i *P. polaris*. Vrsta *P. aroidearum* je bila najzastupljenija u sva tri uzorka krtola, naročito u K3, dok je *P. carotovorum* dominirala u tri uzorka zemljišta (Z1, Z2 i Z3).

**Tabela 4.** Zastupljenost sekvenci *Pectobacterium* spp. i *Dickeya* spp. u uzorcima krtola i zemljišta

	Uzorak K1	Uzorak K2	Uzorak K3	Uzorak Z1	Uzorak Z2	Uzorak Z3
<i>D. aquatica</i>	–	–	0.001	–	–	–
<i>D. chrysanthemi</i>	0.001	–	0.008	–	0.001	0.001
<i>D. dadantii</i>	–	–	–	0.001	–	0.002
<i>D. fangzhongdai</i>	–	–	0.002	–	–	–
<i>D. zeae</i>	–	–	–	0.001	–	–
<b>Σ <i>Dickeya</i> spp.</b>	<b>0.001</b>	<b>–</b>	<b>0.012</b>	<b>0.002</b>	<b>0.001</b>	<b>0.003</b>
<i>P. aroidearum</i>	0.337	1.000	6.029	0.065	0.550	0.008
<i>P. atrosepticum</i>	0.009	0.002	0.015	–	0.002	–
<i>P. betavasculatorum</i>	0.005	–	0.006	–	0.001	0.001
<i>P. cacticida</i>	0.001	–	–	–	–	0.003
<i>P. carotovorum</i>	0.138	0.119	0.739	1.714	0.938	0.062
<i>P. polaris</i>	0.020	0.012	0.306	0.016	0.015	–
<b>Σ <i>Pectobacterium</i> spp.</b>	<b>0.509</b>	<b>1.133</b>	<b>7.094</b>	<b>1.795</b>	<b>1.506</b>	<b>0.074</b>
<b>Σ Ostali</b>	<b>99.490</b>	<b>98.867</b>	<b>92.894</b>	<b>98.203</b>	<b>98.493</b>	<b>99.922</b>

## 4.6. BIOLOŠKA KONTROLA

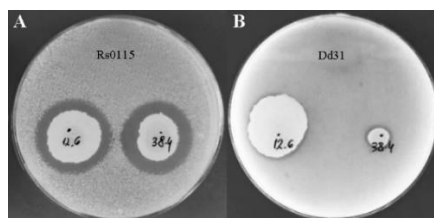
### 4.6.1. *In vitro* antagonistički potencijal *B. amyloliquefaciens* sojeva SS-12.6 i SS-38.4

Izolati *R. solanacearum* su pokazali osetljivost prema punim kulturama antagonističkih sojeva SS-12.6 i SS-38.4 (Slika 34A). Prema skali, ocena delovanja aktivnosti pune kulture antagonističkog soja SS-12.6 je bila na granici između slabe i umerene. Slaba antagonistička aktivnost je utvrđena za izolat Rs0115, dok je umerena aktivnost utvrđena za izolate Rs6616 i Rs8118. Puna kultura soja SS-38.4 pokazala je umerenu antagonističku aktivnost prema sva tri ispitivana fitopatogena izolata. Između *R. solanacearum* izolata nije bilo statistički značajnih razlika u delovanju punih kultura sojeva SS-12.6 i SS-38.4, odnosno oba antagonistička soja su na izolate delovala ujednačeno. Između dva antagonistička soja utvrđena je statistički značajna razlika kod svih *R. solanacearum* izolata, odnosno puna kultura soja SS-38.4 je pokazala jače inhibitorno dejstvo u odnosu na SS-12.6 soj (Tabela 5).

Izolati vrsta *P. carotovorum* (Pcc324) i *P. brasiliense* (Pcb133, Pcb62, Pcb2544, Pcb2811 i Pcb2842), nisu pokazali osetljivost na pune kulture antagonističkih sojeva SS-12.6 i SS-38.4. Kod ispitivanih izolata zone inhibicije se nisu obrazovale, a ocena prema skali je bila 0, odnosno bez aktivnosti.

Delovanjem punih kultura antagonističkih sojeva na izolat *D. dianthicola* (Dd31), došlo je do obrazovanja inhibicionih zona koje su bile manje od 5 mm, čime je utvrđena slaba antagonistička aktivnost testiranih punih kultura (Slika 34B). Između punih kultura dva antagonistička soja nije utvrđena statistički značajna razlika u delovanju prema Dd31 izolatu (SS-12.6 i SS-38.4 sojevi su pokazali slično dejstvo).

Statistički značajne razlike su utvrđene između *R. solanacearum* i *D. dianthicola* izolata u slučaju delovanja punih kultura oba antagonistička soja. Pune kulture antagonističkih sojeva su pokazale jače inhibitorno delovanje prema *R. solanacearum* u odnosu na *D. dianthicola* (Tabela 5).



**Slika 34.** Zone inhibicije rasta izolata: A) *R. solanacearum*; B) *D. dianthicola* nastale delovanjem punih kultura *B. amyloliquefaciens* SS-12.6 (levo) i SS-38.4 (desno) sojeva (foto S. Marković)

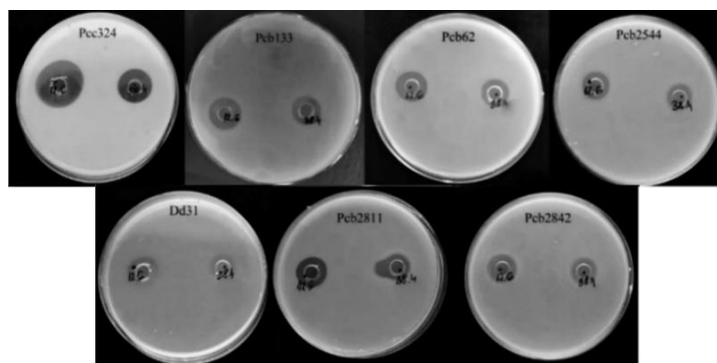
Svi *R. solanacearum* izolati su pokazali osetljivost prema supernatantima antagonističkih sojeva *B. amyloliquefaciens* SS-12.6 i SS-38.4 (Slika 35). Delovanjem supernatanta sojeva SS-12.6 i SS-38.4 najveće inhibicione zone od 17,33 i 15,67 mm (redom) su zabeležene kod izolata Rs8118, dok su najmanje zone od 15,00 i 12,33 mm (redom) zabeležene kod Rs6616 izolata. Između *R. solanacearum* izolata nije bilo statistički značajnih razlika u delovanju supernatanta antagonističkih sojeva, kao ni između samih supernatanta antagonističkih sojeva (supernatanti su pokazali slično dejstvo) (Tabela 5).



**Slika 35.** Zone inhibicije rasta izolata *R. solanacearum* nastale delovanjem supernatanta antagonističkih *B. amyloliquefaciens* SS-12.6 (levo) i SS-38.4 (desno) sojeva (foto S. Marković)

Ispitivani *Pectobacterium* i *Dickeya* izolati su pokazali osetljivost prema supernatantima antagonističkih sojeva (Slika 36). Delovanjem supernatanta SS-12.6 i SS-38.4 kod *P. carotovorum* izolata su izmerene najveće zone inhibicije od 15,67 i 13,67 mm, redom. Najmanje zone inhibicije od 11,00 i 10,33 mm su izmerene kod Dd31 izolata delovanjem SS-12.6 i SS-38.4 supernatanta, redom. Između *P. brasiliense* izolata nije bilo statistički značajnih razlika u delovanju supernatanta oba antagonistička soja. Između dva antagonistička soja statistički značajne razlike nisu utvrđene kod gotovo nijednog *Pectobacterium* i *Dickeya* izolata. Izuzetak je bio izolat Pcb62, gdje je soj SS-12.6 pokazao jaču inhibiciju u odnosu na soj SS-38.4.

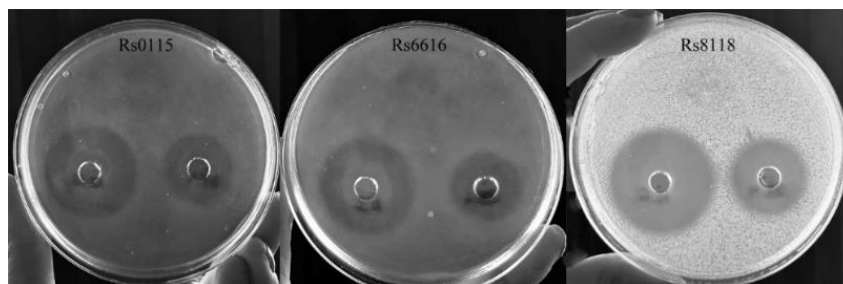
Prema supernatantima antagonističkih sojeva izolati nisu pokazali statistički značajnu razliku. Supernatanti su pokazali ujednačeno dejstvo, iako su za *D. dianthicola* izolat izmerene najniže, za *Pectobacterium* izolate prosečne, a za *R. solanacearum* izolate najveće vrednosti zona (Tabela 5).



**Slika 36.** Zone inhibicije rasta izolata *P. carotovorum*, *P. brasiliense* i *D. dianthicola* nastale delovanjem supernatanta *B. amyloliquefaciens* SS-12.6 (levo) i SS-38.4 (desno) sojeva (foto S. Marković)



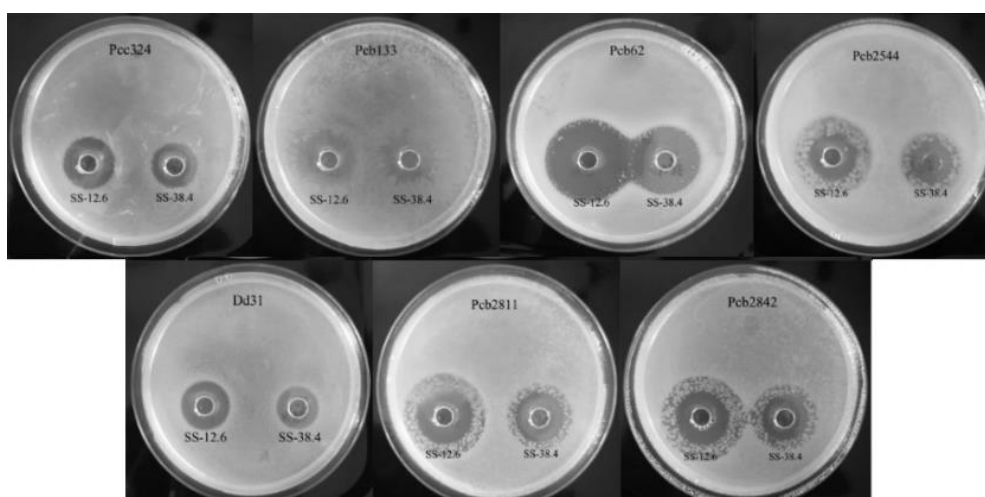
Etil-acetatni ekstrakti sojeva *B. amyloliquefaciens* SS-12.6 i SS-38.4 pokazali su veoma jaku antimikrobnu aktivnost prema svim ispitivanim *R. solanacearum* izolatima (Slika 37). Najveće inhibicione zone su zabeležene kod Rs6616 izolata delovanjem ekstrakta soja SS-12.6, dok su najmanje zone zabeležene kod Rs0115 izolata delovanjem ekstrakta soja SS-38.4. Između tri fitopatogena *R. solanacearum* izolata nije bilo statistički značajnih razlika u delovanju ekstrakata oba antagonistička soja. Između dva antagonistička soja utvrđena je statistički značajna razlika za sva tri *R. solanacearum* izolata, odnosno SS-12.6 ekstrakti su pokazali jače inhibitorno dejstvo u odnosu na SS-38.4 ekstrakte (Tabela 5).



**Slika 37.** Zone inhibicije rasta izolata *R. solanacearum* nastale delovanjem etil-acetatnih ekstrakata antagonističkih *B. amyloliquefaciens* SS-12.6 (levo) i SS-38.4 (desno) sojeva (foto S. Marković)

Etil-acetatni ekstrakti sojeva SS-12.6 i SS-38.4 pokazali su veoma jaku antagonističku aktivnost prema svim ispitivanim *Pectobacterium* spp. i *Dickeya* spp. izolatima (Slika 38). Delovanjem etil-acetatnih ekstrakata antagonističkih sojeva najveće zone inhibicije su dobijene kod izolata Pcb62 (34,67 mm za SS-12.6 i 28,67 mm za SS-38.4), dok su najmanje zone inhibicije izmerene kod Dd31 izolata (17,67 mm za SS-12.6 i 15,67 mm za SS-38.4). Statistički značajne razlike kod *P. brasiliense* izolata utvrđene su za Pcb2544 i Pcb133 izolate delovanjem ekstrakta SS-12.6, kao i za Pcb62 izolat delovanjem ekstrakta SS-38.4. U slučaju svih *Pectobacterium* i *Dickeya* izolata statističke razlike u delovanju ekstrakata antagonističkih sojeva uočene su kod Pcb62, Pcb2544, Pcb2811 i Pcb2842 izolata gdje je ekstrakt SS-12.6 pokazao jače inhibitorno dejstvo u odnosu na ekstrakt SS-38.4.

Ekstrakti oba antagonistička soja su pokazali jaču inhibiciju prema *P. brasiliense* i *R. solanacearum* izolatima, a slabiju prema *D. dianthicola* i *P. carotovorum* izolatima. Između ove dve grupe utvrđene su statistički značajne razlike (Tabela 5).



**Slika 38.** Zone inhibicije rasta izolata *P. carotovorum*, *P. brasiliense* i *D. dianthicola* nastale delovanjem etil-acetatnih ekstrakata *B. amyloliquefaciens* SS-12.6 (levo) i SS-38.4 (desno) sojeva (foto S. Marković)

**Tabela 5.** Inhibicione zone (srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija, SD; n=3) nastale delovanjem punih kultura, supernatanata, etil-acetatnih ekstrakata *B. amyloliquefaciens* sojeva SS-12.6 i SS-38.4 prema ispitivanim fitopatogenim izolatima. Vrednosti sa istim slovom nisu statistički značajno različite prema Tukey's HSD testu ( $p < 0,05$ ).

Fitopatogeni		<i>B. amyloliquefaciens</i> sojevi					
		Pune kulture		Supernatanti		Ekstrakti	
		SS-12.6	SS-38.4	SS-12.6	SS-38.4	SS-12.6	SS-38.4
<i>R. solanacearum</i>	Rs0115	4,67 $\pm$ 0,58 *a **a ***C	7,33 $\pm$ 0,58 a a AB	16,67 $\pm$ 1,53 a ab A	15,33 $\pm$ 1,53 a ab AB	33,67 $\pm$ 2,08 a ab A	26,00 $\pm$ 1,00 a ab B
	Rs6616	5,67 $\pm$ 0,58 a a BC	8,33 $\pm$ 0,58 a a A	15,00 $\pm$ 1,73 a abc AB	12,33 $\pm$ 2,51 a abc B	36,67 $\pm$ 2,52 a a A	27,67 $\pm$ 1,16 a a B
	Rs8118	5,00 $\pm$ 1,00 a a C	7,33 $\pm$ 0,58 a a AB	17,33 $\pm$ 0,58 a a A	15,67 $\pm$ 0,58 a a AB	35,00 $\pm$ 2,00 a a A	26,67 $\pm$ 0,58 a ab B
<i>P. carotovorum</i>	Pcc324	0	0	15,67 $\pm$ 1,15 abc A	13,67 $\pm$ 0,58 abc A	19,00 $\pm$ 1,00 c A	17,33 $\pm$ 1,53 e A
<i>P. brasiliense</i>	Pcb133	0	0	14,00 $\pm$ 1,00 ab bcde AB	12,00 $\pm$ 1,00 a abc ABC	21,67 $\pm$ 0,58 c c D	21,67 $\pm$ 0,58 c d D
	Pcb62	0	0	14,67 $\pm$ 0,58 a abcd A	11,67 $\pm$ 0,58 a bc BC	34,67 $\pm$ 1,15 a a A	28,67 $\pm$ 0,58 a a B
	Pcb2544	0	0	11,67 $\pm$ 0,58 b de BC	11,00 $\pm$ 1,00 a c C	29,67 $\pm$ 1,52 b b B	22,67 $\pm$ 1,15 bc cd CD
	Pcb2811	0	0	12,67 $\pm$ 1,53 ab cde ABC	11,00 $\pm$ 1,00 a c C	33,00 $\pm$ 1,00 a ab A	24,67 $\pm$ 0,58 b bc C
	Pcb2842	0	0	13,33 $\pm$ 0,58 ab cde ABC	11,67 $\pm$ 1,53 a bc BC	32,67 $\pm$ 0,58 a ab A	24,67 $\pm$ 1,53 b bc C
<i>D. dianthicola</i>	Dd31	1,67 $\pm$ 0,58 b A	2,67 $\pm$ 0,58 b A	11,00 $\pm$ 1,00 e A	10,33 $\pm$ 1,15 c A	17,67 $\pm$ 0,58 c A	15,67 $\pm$ 1,53 e A

\*mala slova u istoj koloni označavaju razlike između *R. solanacearum* i *P. brasiliense* izolata za svaki antagonistički soj posebno;  
\*\*mala slova sa crticom u istoj koloni označavaju razlike između svih fitopatogenih izolata za svaki antagonistički soj posebno;  
\*\*\*velika slova u istoj koloni prikazuju razlike u delovanju antagonističkih sojeva SS-12.6 i SS-38.4

S obzirom da su etil-acetatni ekstrakti sojeva SS-12.6 i SS-38.4 pokazali najjaču antimikrobnu aktivnost (u odnosu na pune kulture i supernatante) prema svim ispitivanim izolatima određene su njihove MIK i MBK vrednosti (Tabela 6). Za sve triplicate su konstatovane iste vrednosti.

Za izolate *R. solanacearum*Rs0115, Rs6616 i Rs8118, dobijene su iste MIK i MBK vrednosti za svaki od korišćenih etil-acetatnih ekstrakata antagonističkih sojeva. Definisane MIK i MBK su pokazale da je izraženiji efekat na izolate *R. solanacearum* detektovan za etil-acetatni ekstrakt soja SS-12.6 nego za etil-acetatni ekstrakt soja SS-38.4. MIK i MBK koncentracije za etil-acetatni ekstrakt soja SS-12.6 iznosile su 0,063, odnosno 0,125 mg/ml, dok su za etil-acetatni ekstrakt soja SS-38.4 iznosile 0,125, odnosno 0,25 mg/ml.

Među svim *Pectobacterium* izolatima najizraženiji efekat detektovan je delovanjem etil-acetatnog ekstrakta soja SS-12.6 na *P. brasiliense* Pcb62 izolat, sa zabeleženim MIK/MBK vrednostima od 0,63/1,25 mg/ml. Za sve ostale *P. brasiliense* izolate dobijene su iste MIK i MBK vrednosti za delovanje etil-acetatnih ekstrakta oba antagonistička soja, s tim da je kod svih izolata zabeležena veća osetljivost prema etil-acetatnom ekstraktu soja SS-12.6 u odnosu na etil-acetatni ekstrakt soja SS-38.4. Izolati *P. carotovorum* Pcc324 i *D. dianthicola* Dd31 su pokazali istu osetljivost prema etil-acetatnim ekstraktima oba antagonistička soja.

**Tabela 6.** Minimalne inhibicione i baktericidne koncentracije testiranih etil-acetatnih ekstrakata *B. amyloliquefaciens* sojeva SS-12.6 i SS-38.4 (mg/ml).

Fitopatogeni		<i>B. amyloliquefaciens</i>			
		SS-12.6		SS-38.4	
		MIK	MBK	MIK	MBK
<i>R. solanacearum</i>	Rs0115	0,063	0,125	0,125	0,25
	Rs6616	0,063	0,125	0,125	0,25
	Rs8118	0,063	0,125	0,125	0,25
<i>P. carotovorum</i>	Pcc324	0,25	0,5	0,25	0,5
<i>P. brasiliense</i>	Pcb133	0,125	0,25	0,25	0,5
	Pcb62	0,063	0,125	0,25	0,5
	Pcb2544	0,125	0,25	0,25	0,5
	Pcb2811	0,125	0,25	0,25	0,5
	Pcb2842	0,125	0,25	0,25	0,5
<i>D. dianthicola</i>	Dd31	0,25	0,5	0,25	0,5

Svi ispitivani izolati *R. solanacearum* (Rs0115  $OD_{570} = 0,214$ ; Rs6616  $OD_{570} = 0,164$ ; Rs8118  $OD_{570} = 0,157$ ) su pokazali ujednačene vrednosti dobijene u kvantifikaciji mase biofilma i svi su svrstani u kategoriju 1, odnosno ispoljili su slabu sposobnost formiranja biofilma. Isto je utvrđeno za sve ispitivane *Pectobacterium* spp. izolate (Pcc324  $OD_{570} = 0,229$ ; Pcb133  $OD_{570} = 0,201$ ; Pcb62  $OD_{570} = 0,219$ ; Pcb2544  $OD_{570} = 0,232$ ; Pcb2811  $OD_{570} = 0,218$  i Pcb2842  $OD_{570} = 0,237$ ). Izolat *D. dianthicola* Dd31 ( $OD_{570} = 0,397$ ) pokazao je umerenu sposobnost za formiranje biofilma i svrstan je u kategoriju 2. Za sve triplikate su konstatovane iste vrednosti.

Rezultati delovanja etil-acetatnih ekstrakata sojeva *B. amyloliquefaciens* SS-12.6 i SS-38.4 na formiranje biofilma fitopatogenih izolata pokazali su da je inhibicija formiranja biofilma (IFB%) zavisila od koncentracije ekstrakta koja je primenjena. Procenti inhibicija formiranja biofilma dobijeni za svaku koncentraciju ekstrakata prikazani su u Tabeli 7. Kod fitopatogenih izolata, kod kojih je utvrđena ista vrednost MIK-a, etil-acetatni ekstrakt soja SS-12.6 je jače inhibirao proces formiranja biofilma. Utvrđena je pozitivna korelacija između koncentracije ekstrakta i njegove sposobnosti inhibicije stvaranja biofilma, odnosno utvrđeno je da primena veće koncentracije etil-acetatnih ekstrakata antagonističkih sojeva omogućuje veći postotak inhibicije stvaranja biofilma. Utvrđene su statistički značajne razlike između gotovo svih ispitivanih koncentracija, a izuzetak je izolat Rs8118 za oba antagonistička soja (Tabela 7).

**Tabela 7.** Inhibicija stvaranja biofilma (IFB%) (srednja vrednost  $\pm$  SD, n=3) fitopatogenih sojeva nakon tretmana sa etil-acetatnim ekstraktima sojeva *B. amyloliquefaciens* SS-12.6 i SS-38.4. Vrednosti sa istim slovom nisu statistički značajno različite prema Tukey's HSD testu ( $p < 0,05$ ).

Fitopatogeni		Inhibicija formiranja biofilma [%]							
		SS-12.6				SS-38.4			
		0,25 mg/ml	0,125 mg/ml	0,063 mg/ml	0,032 mg/ml	0,25 mg/ml	0,125 mg/ml	0,063 mg/ml	0,032 mg/ml
<i>R. solanacearum</i>	Rs0115	92,21 $\pm$ 2,58 ab	78,02 $\pm$ 2,44 c	39,09 $\pm$ 2,23 e	27,19 $\pm$ 1,76 f	87,79 $\pm$ 2,45 ab	76,32 $\pm$ 2,16 cd	27,25 $\pm$ 3,19 f	17,38 $\pm$ 3,06 gh
	Rs6616	98,33 $\pm$ 3,15 a	84,67 $\pm$ 2,26 bc	52,95 $\pm$ 2,55 d	26,01 $\pm$ 2,13 f	95,74 $\pm$ 2,58 a	71,53 $\pm$ 2,22 d	41,14 $\pm$ 2,35 e	14,46 $\pm$ 2,67 h
	Rs8118	97,5 $\pm$ 2,47 a	89,94 $\pm$ 2,61 ab	54,43 $\pm$ 1,52 d	23,78 $\pm$ 0,97 f	89,37 $\pm$ 3,11 ab	84,43 $\pm$ 3,24 bc	23,39 $\pm$ 3,14 fg	22,40 $\pm$ 2,27 fgh
<i>P. carotovorum</i>	Pcc324	93,08 $\pm$ 1,89 a	74,15 $\pm$ 1,80 b	38,80 $\pm$ 2,73 c	nu	84,99 $\pm$ 3,15 a	78,44 $\pm$ 3,09 a	61,68 $\pm$ 1,25 b	36,92 $\pm$ 2,67 c
<i>P. brasiliense</i>	Pcb133	*nu	89,61 $\pm$ 2,49 bcd	69,53 $\pm$ 3,23 e	28,04 $\pm$ 3,53 hi	87,13 $\pm$ 2,20 ab	58,79 $\pm$ 2,14 c	33,93 $\pm$ 0,82 fg	11,68 $\pm$ 3,07 j
	Pcb62	nu	*n.e.	97,42 $\pm$ 3,26 ab	87,75 $\pm$ 2,61 cd	95,82 $\pm$ 2,28 a	84,00 $\pm$ 3,63 b	29,93 $\pm$ 1,34 gh	13,35 $\pm$ 2,18 ij
	Pcb2544	nu	86,55 $\pm$ 2,61 d	63,42 $\pm$ 2,88 ef	34,15 $\pm$ 2,47 h	84,07 $\pm$ 2,53 b	58,79 $\pm$ 3,14 c	47,12 $\pm$ 1,14 de	14,75 $\pm$ 1,77 ij
	Pcb2811	nu	95,70 $\pm$ 3,24 abc	55,97 $\pm$ 2,00 fg	28,81 $\pm$ 2,26 hi	84,82 $\pm$ 1,09 b	45,77 $\pm$ 2,82 de	21,31 $\pm$ 1,53 hi	11,54 $\pm$ 3,03 j
	Pcb2842	nu	71,28 $\pm$ 3,39 e	54,25 $\pm$ 1,79 g	21,94 $\pm$ 2,89 i	77,96 $\pm$ 2,32 b	52,68 $\pm$ 1,53 cd	41,01 $\pm$ 2,08 ef	18,65 $\pm$ 1,99 ij
<i>D. dianthicola</i>	Dd31	92,21 $\pm$ 2,26 a	72,15 $\pm$ 2,52 b	46,23 $\pm$ 1,88 c	13,47 $\pm$ 2,44 d	72,65 $\pm$ 3,84 a	61,55 $\pm$ 2,72 b	41,45 $\pm$ 2,71 c	11,06 $\pm$ 1,52 d

\*nu - nije utvrđeno

#### 4.6.2. *In situ* antagonistički potencijal *B. amyloliquefaciens* sojeva SS-12.6 i SS-38.4

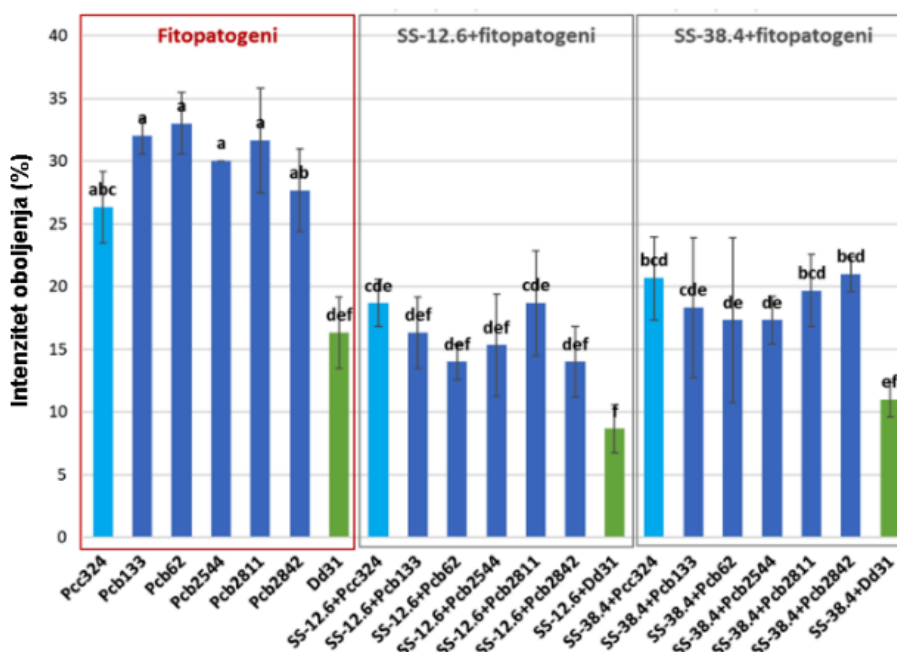
Vizuelnim pregledom svih krtola prvog dana posle tretiranja nije uočena pojava vlažne truleži, a merenjem svake krtole je konstatovano da je njihova težina nepromenjena.

Petog dana nakon postavljanja oglada vizuelnim pregledom na krtolama koje su služile kao pozitivna kontrola, kao i na krtolama u tretmanima uočeni su simptomi vlažne truleži (Slika 39).



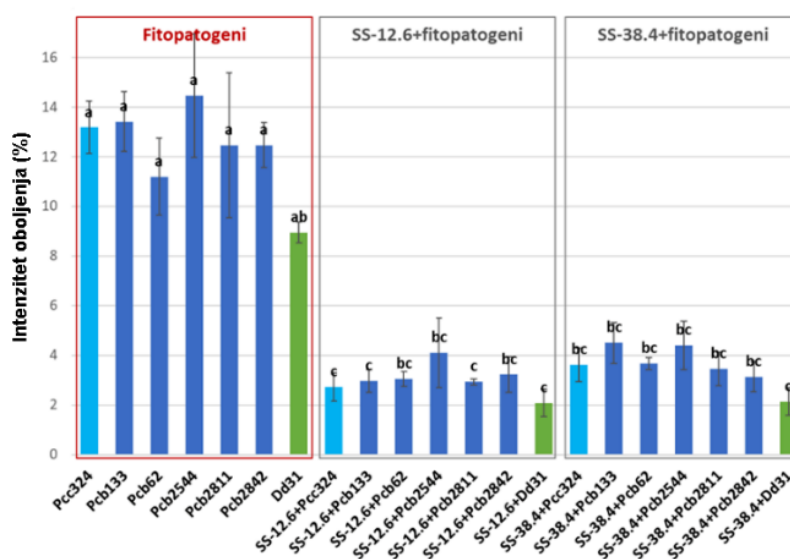
**Slika 39.** Krtola iz tretmana (tretirana antagonističkim sojem *B. amyloliquefaciens* SS-12.6 pa fitopatogenim izolatom *D. dianthicola* Dd31) ocenjena nakon pet dana inkubacije: A) izgled tretirane krtole sa spoljne strane; B) poprečni presek krtole (foto S. Marković)

Krtole koje su inokulisane *Pectobacterium* i *Dickeya* izolatima (pozitivne kontrole) su vizuelnom ocenom pet dana nakon postavljanja oglada u većoj meri su ispoljile simptome vlažne truleži u odnosu na krtole iz tretmana. Između pozitivnih kontrola i tretmana razlika je bila statistički značajna za izolate Pcb133, Pcb62, Pcb2544 i Pcb2811, dok za ostale izolate razlika nije bila statistički značajna (Slika 40). Antagonistički sojevi *B. amyloliquefaciens* SS-12.6 i SS-38.4 su pokazali sličnu efikasnost u redukciji intenziteta oboljenja i među njima nije utvrđena statistički značajna razlika. Utvrđeni intenzitet oboljenja za krtole krompira inokulisane fitopatogenim *Pectobacterium* spp. izolatima je bio od 26,33 do 33%, dok je intenzitet oboljenja kod tretmana bio od 14 do 18,67% za SS-12.6 soj, odnosno od 17,33 do 21% za SS-38.4 soj. Kod *D. dianthicola* izolata zabeležen je procenat intenziteta oboljenja od 16,33%, dok je intenzitet oboljenja kod tretmana bio 8,67% sa sojem SS-12.6, odnosno 11% sa sojem SS-38.4.



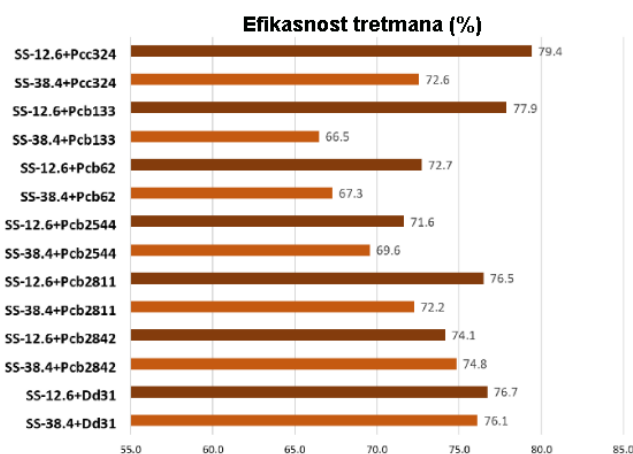
**Slika 40.** Intenzitet oboljenja (%) ocenjen vizuelno nakon pet dana inkubacije. Podaci su prikazani kao srednja vrednost ( $n = 5$ )  $\pm$  standardna greška (SE). Vrednosti sa istim slovom se statistički značajno ne razlikuju prema Tukey's HSD testu ( $p < 0,05$ ).

Nakon što su krtole vizuelno ocenjene, izmerena je njihova težina i izračunat je intenzitet oboljenja (Slika 41). Kod krtola koje su bile tretirane samo *Pectobacterium* i *Dickeya* izolatima (pozitivna kontrola) gubitak u težini je bio daleko veći nego kod krtola iz tretmana sa antagonističkim sojevima SS-12.6 i SS-38.4. Između ove dve grupe krtola zabeležena je statistički značajna razlika za sve fitopatogene izolate. Između samih tretmana antagonističkim sojevima SS-12. i SS-38.4 nije uočena statistički značajna razlika. Intenzitet oboljenja krtola koje su inokulisane *Pectobacterium* izolatima je bio od 11,19 do 14,45%. Za krtole u tretmanima, intenzitet oboljenja je iznosio od 2,71 do 4,10% za soj SS-12.6, odnosno od 3,14 do 4,50% za soj SS-38.4. Gubitak u težini krtola nastao delovanjem *D. dianthicola* izolata iznosio je 8,95%, dok je u tretmanu iznosio 2,08% (SS-12.6), odnosno 2,14% (SS-38.4). Krtole koje su služile kao negativna kontrola, kao i krtole koje su bile tretirane samo *B. amyloliquefaciens* antagonističkim sojevima SS-12.6 i SS-38.4 nisu pokazivale simptome vlažne truleži, niti je došlo do promene u težini krtola.



**Slika 41.** Intenzitet oboljenja (%) ocenjen na osnovu promene u težini utvrđen nakon pet dana inkubacije. Podaci su prikazani kao srednja vrednost ( $n = 5$ )  $\pm$  SE. Vrednosti sa istim slovom se statistički značajno ne razlikuju prema Tukey's HSD testu ( $p < 0,05$ ).

Efikasnost tretmana (%) izračunata na osnovu razlike u težini krtola pet dana posle postavljanja oglada, pokazuje da su oba korišćena antagonistička soja *B. amyloliquefaciens* SS-12.6 i SS-38.4 veoma efikasna (66,5-79,4%) u suzbijanju vlažne truleži krtola krompira (Slika 42).



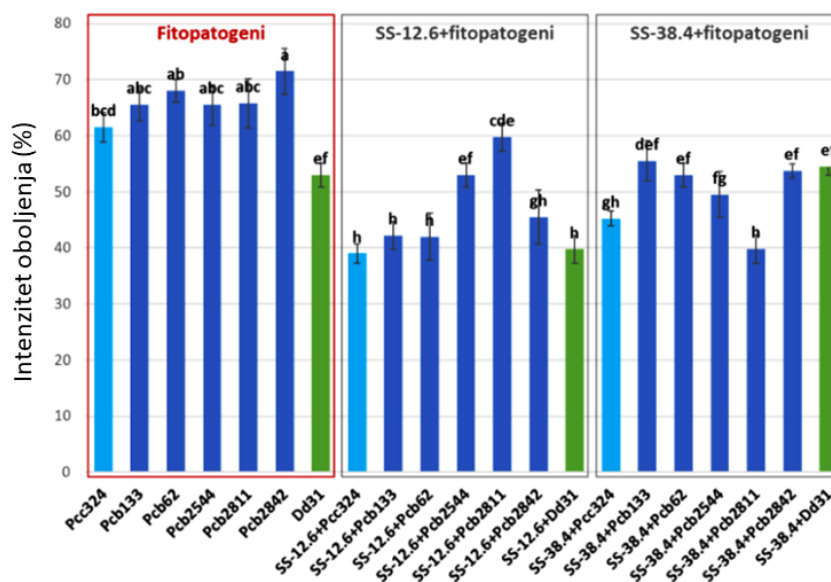
**Slika 42.** Efikasnost tretmana (%) u redukciji vlažne truleži prouzrokovane *Pectobacterium* i *Dickeya* izolatima nakon tretmana sa *B. amyloliquefaciens* antagonističkim sojevima SS-12.6 i SS-38.4 (peti dan)

Petnaest dana nakon postavljanja ogleda, pozitivne kontrole su vizuelno pokazivale simptome vlažne truleži u većoj meri u odnosu na tretmane (Slika 43).



**Slika 43.** Dve krtole iz tretmana (tretirane antagonističkim sojem *B. amyloliquefaciens* SS-12.6 pa fitopatogenim izolatom *D. dianthicola* Dd31), ocenjene 15 dana nakon inkubacije: A) izgled krtole pre pranja; B) izgled krtole posle pranja (foto S. Marković)

Razlike u intenzitetu oboljenja utvrđene vizuelno između grupe krtola koje su inokulisane *Pectobacterium* i *Dickeya* izolatima (pozitivne kontrole) i grupe krtola koje su tretirane antagonističkim sojevima SS-12.6 i SS-38.4 (tretmani) su bile statistički značajne za izolate Pcc324, Pcb133, Pcb62, Pcb2544, Pcb2842 (Slika 44). Izuzetak je utvrđen kod izolata *P. brasiliense* Pcb2811 kod koga nije zabeležena statistički značajna razlika u smanjenju intenziteta oboljenja delovanjem soja SS-12.6, kao i kod *D. dianthicola* Dd31 izolata delovanjem soja SS-38.4. Antagonistički sojevi SS-12.6 i SS-38.4 su pokazali sličnu efikasnost u redukciji intenziteta oboljenja. Intenzitet oboljenja utvrđen vizuelno za krtole koje su inokulisane *Pectobacterium* izolatima se kretao od 61,50 do 71,50%, dok se za krtole iz tretmana sa antagonističkim sojevima kretao od 39,00 do 59,75% za antagonistički soj SS-12.6, odnosno od 39,80 do 55,50% za antagonistički soj SS-38.4. Kod *D. dianthicola* izolata zabeležen je procenat intenziteta oboljenja od 53%, dok je intenzitet oboljenja kod tretmana bio 39,75% sa sojem SS-12.6, odnosno 54,50% sa sojem SS-38.4.

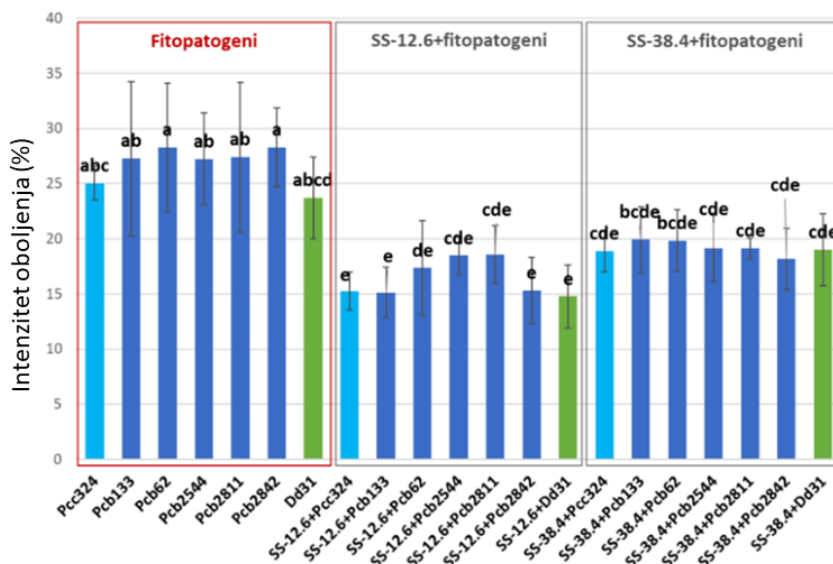


**Slika 44.** Intenzitet oboljenja (%) utvrđen vizuelno 15 dana nakon inkubacije. Podaci su prikazani kao srednja vrednost ( $n = 5$ )  $\pm$  SE. Vrednosti sa istim slovom se statistički značajno ne razlikuju prema Tukey's HSD testu ( $p < 0,05$ ).

Nakon vizuelnog ocenjivanja krtola, izmerena je i njihova težina i izračunat je intenzitet oboljenja (Slika 45). Statistički značajne razlike utvrđene su između krtola koje su tretirane *Pectobacterium* i *Dickeya* izolatima i svih tretmana sa antagonističkim sojem SS-12.6, dok kod soja SS-38.4 samo u

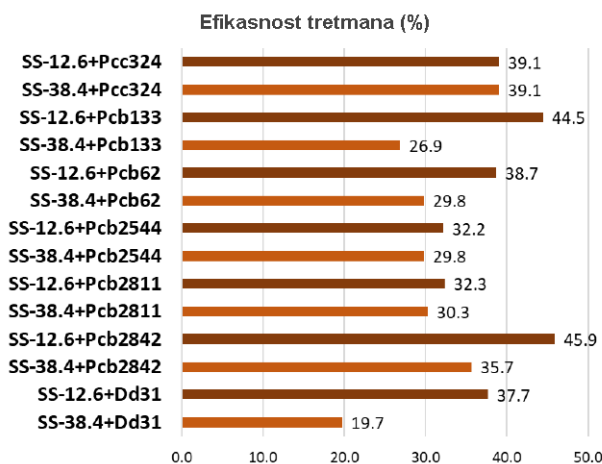
slučaju Pcb62, Pcb2544, Pcb2811 i Pcb2842 izolata. Sojevi *B. amyloliquefaciens* SS-12.6 i SS-38.4 su pokazali sličnu efikasnost u redukciji intenziteta oboljenja. Intenzitet oboljenja za krtole tretirane *Pectobacterium* izolatima bio je između 25,04 i 28,27%, dok je za soj SS-12.6 bio između 14,77 i 18,55%, odnosno za soj SS-38.4 između 18,18 i 19,92%. Kod *D. dianthicola* izolata zabeležen je procenat intenziteta oboljenja od 23,71%, dok je intenzitet oboljenja kod tretmana bio 14,77% sa sojem SS-12.6, odnosno 19,03% sa sojem SS-38.4.

Kod krtola koje su tretirane SDV i antagonističkim sojevima SS-12.6 i SS-38.4 nije konstatovana pojava vlažne truleži, kao ni razlika između njihove početne težine i težine 15 dana nakon inkubacije.



**Slika 45.** Intenzitet oboljenja (%) ocenjen na osnovu promena u težini utvrđen 15 dana nakon inkubacije. Podaci su prikazani kao srednja vrednost ( $n = 5$ )  $\pm$  SE. Vrednosti sa istim slovom se statistički značajno ne razlikuju prema Tukey's HSD testu ( $p < 0,05$ ).

Efikasnost tretmana dobijena na osnovu razlike u težini krtola 15 dana nakon inkubacije, ukazuje da su oba antagonistička soja SS-12.6 i SS-38.4 pokazala efikasnost u suzbijanju vlažne truleži prouzrokovane izolatima *Pectobacterium* i *Dickeya* (Slika 46). Kod *D. dianthicola* izolata zabeležena je razlika i to u većoj efikasnosti soja SS-12.6 (37,7%) u odnosu na SS-38.4 soj (19,7%).

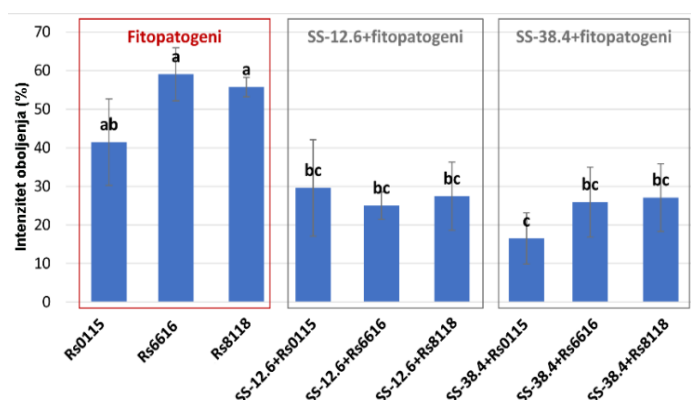


**Slika 46.** Efikasnost tretmana (%) u redukciji vlažne truleži prouzrokovane *Pectobacterium* i *Dickeya* izolatima nakon tretmana sa *B. amyloliquefaciens* antagonističkim sojevima SS-12.6 i SS-38.4 (15. dan)



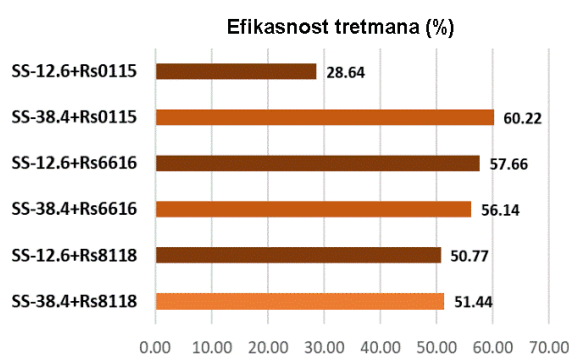
#### 4.6.3. In planta antagonistički potencijal *B. amyloliquifaciens* sojeva SS-12.6 i SS-38.4

Vizuelnom ocenom biljaka krompira, utvrđeno je da antagonistički *B. amyloliquifaciens* sojevi SS-12.6 i SS-38.4 smanjuju intenzitet oboljenja prouzrokovanog testiranim *R. solanacearum* izolatima (Slika 47). Između intenziteta oboljenja utvrđenih kod biljaka tretiranih izolatima Rs6616 i Rs8118 su utvrđene statistički značajne razlike, dok kod biljaka tretiranih sa Rs0115 razlike nisu utvrđene. Poređenjem tretmana sa antagonističkim sojevima SS-12.6 i SS-38.4 nisu utvrđene statistički značajne razlike. Utvrđeni intenzitet oboljenja za biljke krompira inokulisane fitopatogenim izolatima *R. solanacearum* je bio između 41,45 i 59,05%, dok je intenzitet oboljenja kod tretmana bio između 25,00 i 29,58% za SS-12.6 soj, odnosno od 16,49 do 27,07% za SS-38.4 soj. Na biljkama koje su služile kao negativna kontrola (grupa biljaka inokulisana SDV), kao i na biljkama koje su tretirane samo antagonističkim sojevima SS-12.6 i SS-38.4 nisu uočeni simptomi uvelosti listova.



**Slika 47.** Intenzitet oboljenja (%) biljaka krompira inokulisanih *R. solanacearum*. Podaci su prikazani kao srednja vrednost ( $n = 5$ )  $\pm$  SE. Vrednosti sa istim slovom se statistički značajno ne razlikuju prema Tukey's HSD testu ( $p < 0,05$ ).

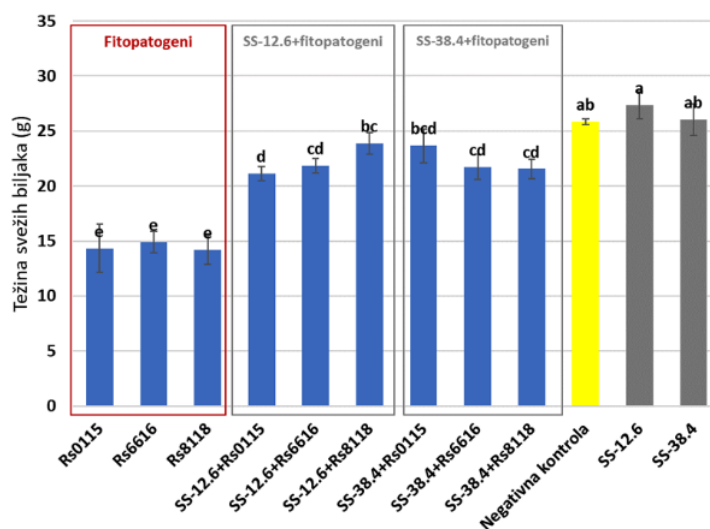
Efikasnost tretmana izračunata na osnovu vizuelne procene broja listova sa simptomima uvelosti, ukazuje da su oba *B. amyloliquifaciens* soja SS-38.4 i SS-12.6 značajno redukovala oboljenje (28,64-60,22%) (Slika 48). Najmanja efikasnost tretmana zabeležena je u slučaju antagonističkog soja SS-12.6 i fitopatogenog izolata Rs0115 (28,64%).



**Slika 48.** Efikasnost tretmana (%) antagonističkim sojevima *B. amyloliquifaciens* SS-12.6 i SS-38.4 kod biljaka inokulisanih izolatima *R. solanacearum*

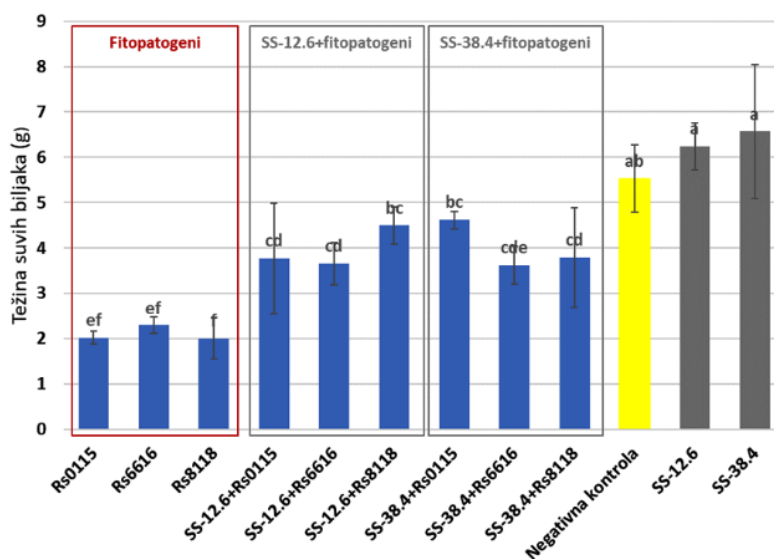
Nakon što su biljke vizuelno ocenjene, merena je njihova težina u svežem i suvom stanju i izračunata je srednja vrednost. Merenjem mase svežih biljaka utvrđene su statistički značajne razlike između biljaka koje su služile kao pozitivna kontrola i biljaka iz tretmana sa antagonističkim *B. amyloliquifaciens* sojevima SS-12.6 i SS-38.4 (Slika 49). Težina svežih biljaka krompira inokulisanih sa fitopatogenim *R. solanacearum* izolatima je bila između 14,18 i 14,9 g, dok je težina

kod tretmana bila između 21,11 i 23,88 g za SS-12.6 soj, odnosno od 21,55 do 23,66 g za SS-38.4 soj. Između tretmana nije bilo statistički značajne razlike u masi svežih biljaka. Biljke koje su tretirane samo antagonističkim sojevima imale su veću masu u odnosu na biljke koje su služile kao negativna kontrola, ali ova razlika nije statistički značajna.



**Slika 49.** Težina svežih biljaka krompira inokuliranih sa *R. solanacearum* izolatima i tretiranih sa *B. amyloliquefaciens* sojevima. Podaci su prikazani kao srednja vrednost ( $n = 5$ )  $\pm$  SE. Vrednosti sa istim slovom se statistički značajno ne razlikuju prema Tukey's HSD testu ( $p < 0,05$ ).

Nakon sušenja i ponovnog merenja težine biljaka dobijeni su slični rezultati (Slika 50). Između pozitivnih kontrola i tretmana zabeležena je statistički značajna razlika. Između tretmana nije bilo značajne razlike u masi suvih biljaka. Težina svežih biljaka krompira inokuliranih sa fitopatogenim *R. solanacearum* izolatima je bila između 2 i 2,3 g, dok je težina kod tretmana bila između 3,65 i 4,5 g za SS-12.6 soj, odnosno od 3,62 do 4,61 g za SS-38.4 soj. Upoređivanjem biljaka koje su tretirane samo antagonističkim sojevima i biljaka koje su služile kao negativna kontrola nije utvrđena statistički značajna razlika, iako su dobijene veće vrednosti mase biljaka koje su tretirane antagonističkim sojevima SS-12.6 i SS-38.4.



**Slika 50.** Težina suvih biljaka krompira inokuliranih sa *R. solanacearum* izolatima i tretiranih sa *B. amyloliquefaciens* sojevima. Podaci su prikazani kao srednja vrednost ( $n = 5$ )  $\pm$  SE. Vrednosti sa istim slovom se statistički značajno ne razlikuju prema Tukey's HSD testu ( $p < 0,05$ ).

## 5. DISKUSIJA

Vrsta *R. solanacearum*, kao i vrste iz rodova *Pectobacterium* su svrstane među najvažnije ekonomske fitopatogene (Mansfield *et al.*, 2012), koje se pored drugih puteva širenja, prenose i semenskim materijalom (Pérombelon, 2002; Czajkowski *et al.*, 2009; Abdurahman *et al.*, 2017). S obzirom da ne postoje noviji i sveobuhvatni literaturni podaci o fitopatogenim bakterijama krompira u Srbiji, u ovom radu se pristupilo proučavanju bakterioza u uslovima intenzivne proizvodnje krompira. Uzimajući u obzir da je sadni materijal na posmatranim lokalitetima poreklom iz uvoza, što povećava rizik od unošenja novih vrsta bakterija, postavlja se pitanje koji je sastav fitopatogene bakterijske populacije zastupljen danas u usevima krompira u agroekološkom području naše zemlje? Kako bi se dobio odgovor, sproveden je petogodišnji monitoring koji je obuhvatio preko 2000 ha useva krompira, koji je gajen na 16 različitih lokaliteta. Rezultati ovog rada su ukazali na prisustvo dve bolesti bakteriozne prirode: mrke truleži krtola koju je prouzrokovala bakterija *R. solanacearum*, kao i crne noge i vlažne truleži krtola krompira koju su prouzrokovale bakterije *P. carotovorum*, *P. brasiliense* i *D. dianthicola*. Izvršena je detaljna fenotipska i molekularno-genetička karakterizacija izolata identifikovanih vrsta i ispitana je mogućnost primene dva antagonistička *Bacillus amyloliquefaciens* SS-12.6 i SS-38.4 soja u suzbijanju bolesti izazvanih ovim fitopatogenima.

### 5.1. UVELOST I MRKA TRULEŽ KRTOLA KROMPIRA – MONITORING, FENOTIPSE I MOLEKULARNO-GENETIČKE KARAKTERISTIKE PROUZROKOVAČA BOLESTI

Tokom monitoringa useva krompira, nisu zabeleženi simptomi bakteriozne uvelosti koji se zapažaju tokom vegetacije krompira. Ovi simptomi se, posebno u usevima velikih površina, veoma teško zapažaju jer i drugi biotički i/ili abiotički faktori mogu da prouzrokuju slične promene. Od biotičkih faktora patogeni koji mogu da manifestuju uvelost nadzemnog dela biljaka su *C. sepedonicus*, kao i fitopatogene gljive *Verticillium albo atrum*, *Fusarium oxysporum*, *Thanatephorus cucumeris* (Denny, 2007; Sarkar & Chaudhuri, 2016). Od abiotičkih faktora, nedostatak vode, visoka temperatura i starost biljaka mogu da manifestuju simptome uvelosti poput onih prouzrokovanih *R. solanacearum*. Sa druge strane, i sami simptomi koje prouzrokuje *R. solanacearum* su prilično promenljivi i zavise od uslova okoline (Garcia *et al.*, 2019). Na ekspresiju simptoma direktno utiču dostupnost vode i temperatura (temperatura preko 28 °C ubrzava razvoj bolesti) (Denny, 2007). Sve navedeno ukazuje da je simptomatologija ove bakterije veoma kompleksna.

Tokom skladištenja krtola krompira sakupljeno je i pregledano ukupno 2463 uzorka među kojima je 229 okarakterisano kao potencijalno pozitivni na prisustvo mrke truleži. Na poprečnom preseku krtola iz ovih uzoraka zapažala se promena boje i strukture provodnih tkiva, kao i oslobađanje eksudata u čaši vode u vidu niti. Allen *et al.* (2001) navode da je dijagnostički test potapanja presečenih krtola ili stabljika u vodu značajan brzi test za određivanje prisustva bakterija u biljnom materijalu (kao npr. *R. solanacearum*), jer se ova pojava ne primećuje kod bolesti koje su izazvane gljivičnim patogenima.

Tokom ove studije, *R. solanacearum* je izolovana iz krtola krompira tokom 2015, 2016. i 2018. godine na pet različitih lokaliteta (S. Miletić, Stapar, Sombor, Boleč i Zmajevu), od kojih je na lokalitetima S. Miletić i Stapar prisustvo bakterije detektovano u dve uzastopne godine (2015. i 2016.). U okviru ranijih istraživanja sprovedenih 2013. godine prisustvo *R. solanacearum* je utvrđeno na lokalitetu S. Miletić, na sorti krompira L. Claire (Janjatović, 2015; Marković *et al.*, 2021a). Iako se tokom par godina navode isti lokaliteti gajenja useva, S. Miletić i Stapar, krompir koji je obuhvaćen monitoringom je svake godine gajen na novim površinama koje su bile prostorno udaljene od useva gde je *R. solanacearum* prethodno bila utvrđena. Ovim se zemljište kao potencijalni izvor inokuluma *R. solanacearum* moglo isključiti. Međutim, usevi na lokalitetima na kojima je *R. solanacearum* detektovana više puta (S. Miletić i Stapar) su pozicionirani uz kanal za navodnjavanje. Van Elsas *et al.* (2001) navode da voda za navodnjavanje predstavlja jedan od glavnih načina širenja ove bakterije. Sa druge strane, na posmatranim lokalitetima i lokalitetima navedenim u ranijim istraživanjima

većinom je gajen semenski krompir iz uvoza. Uvezeni materijal nosi rizik od introdukcije ili reintrodukcije novih bakterioza u useve, pa tako one bakterioze koja je uzrokovana bakterijom *R. solanacearum* (Priou *et al.*, 1999; Gutarra *et al.*, 2017). Prema Milijašević-Marčić *et al.* (2013) u istraživanjima sprovedenim tokom 2011. i 2012. godine utvrđeno je prisustvo *R. solanacearum* u sedam uzoraka iz Zapadne i Južne Bačke na četiri sorte krompira (Hermes, Pirol, Saturna i Panda) u 2011, a u 2012. kod 10 uzoraka iz Južne Bačke i Centralnog Banata na pet sorti (Red Fantasy, Vineta, L. Claire, Desiree i Panda). Uzevši u obzir sve navedeno, *R. solanacearum* je mogla da bude introdukovana 2011. godine ili ranije, i da se kasnije širila vodom za navodnjavanje. Stoga, poreklo i način širenja *R. solanacearum* na području severnog dela Srbije ostaju i dalje nerazjašnjena pitanja. Poslednjih 30 godina *R. solanacearum* je identifikovana u skoro svim evropskim zemljama (EPPO, 2012; Janse, 2012; Fegan & Hayward, 2014; EFSA *et al.*, 2019a; EPPO, 2019; EPPO, 2021; EPPO, 2022), na biljakama krompira i geranijuma, ali i iz vodotokova (Janse *et al.*, 1998; Caruso *et al.*, 2005).

Svih 70 izolata *R. solanacearum* dobijenih u ovom radu su ispoljili uniformne fenotipske odlike koje su u potpunosti odgovarale karakteristikama referentnog soja *R. solanacearum* PD 2762, a koje navode i drugi autori (Yabuuchi *et al.*, 1995; Pradhanang *et al.*, 2000; EU Commission Directive, 2006; Milijašević-Marčić *et al.*, 2013 EPPO, 2018).

Dobijeni rep-PCR profili kod 70 *R. solanacearum* izolata su korišćenjem BOX-PCR metode pokazali homogenost, dok je korišćenjem ERIC- i REP-PCR metoda utvrđen genetički diverzitet sa malim razlikama. Grupe profila dobijene na osnovu ERIC- i REP-PCR nisu bile u saglasnosti sa lokacijom gajenja krompira, godinom izolacije, kao ni sortama krompira sa kojih su proučavani izolati dobijeni. Homogenost u profilima dobijenim BOX-PCR metodom potvrdili su i Xue *et al.* (2011) koji su pokazali da su profili sojeva izolovani iz krompira iz 10 kineskih provincija kao i 10 uporednih sojeva iz sedam zemalja identični i da su grupisani u jedan klaster. Takođe, homogenost profila *R. solanacearum* dobijenih BOX-PCR metodom je potvrđena i u nekoliko drugih ranijih studija (Cook, 1989; Timms-Wilson *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2009). Nasuprot navedenom, prema van der Wolf *et al.* (1998), kod sojeva iz Francuske i Holandije (r3) utvrđena je veoma mala razlika u profilima dobijenim korišćenjem BOX-PCR metode, dok primenom ERIC-PCR metode nisu utvrđene razlike.

Analiza na bazi sekvenci sedam gena (*adk*, *gapA*, *gdhA*, *gyrB*, *ppsA*, *hrpB* i *fliC*) je potvrdila identifikaciju 33 odabrana izolata kao *R. solanacearum* i pokazala da između njih ne postoje genetičke razlike, kao i da dobijeni izolati pripadaju filotipu II. Ovo istraživanje predstavlja prvu studiju u kojoj su *R. solanacearum* izolati iz Srbije okarakterisani do nivoa filotipa. U Srbiji je tokom ranijih istraživanja identifikacija *R. solanacearum* vršena samo na osnovu PCR/RFLP metoda (specifični par prajmera OLI-1/Y-2, kao i Ps-1/Ps-2 u kombinaciji sa *TaqI* restrikcionim enzimom), nutricionih, enzimskih i biovar determinišućih testova, kao i testova patogenosti (Milijašević-Marčić *et al.* 2013). Castillo & Greenberg (2007) smatraju da su konzervirani geni *adk*, *gapA*, *gdhA*, *gyrB* i *ppsA* manje podložni uticaju horizontalnog transfera gena i da se visok nivo diskriminacije među sojevima može postići njihovim kombinovanjem sa genima koji su više varijabilni, poput onih koji su uključeni u virulentnost (*hrpB*, *fliC* i *egl*). Da bi se dobio što viši nivo diskriminacije u ovu studiju su uključeni *hrpB* i *fliC* geni, mada ispitivani *R. solanacearum* izolati korišćenjem ovih gena nisu pokazali diverzitet. Generalno posmatrano, *R. solanacearum* kao kompleks vrsta je veoma polimorfna, sa nizom jedinstvenih alela u hromozomu (Castillo & Greenberg, 2007; Wicker *et al.*, 2012). Međutim, ukoliko se posmatraju samo sojevi koji pripadaju filotipu II *R. solanacearum*, situacija je značajno drugačija. U ranijim studijama, Xue *et al.* (2011) su potvrdili homogenost sojeva *R. solanacearum* koji pripadaju biovaru 2 i filotipu IIB, i koji su izolovani iz različitih biljaka iz 15 kineskih provincija. Prema Wicker *et al.* (2012) poreklo filotipa II je iz regiona koji odgovara Brazilu i da se ovaj filotip kasnije diferencirao na podfilotipove IIA i IIB. Isti autori ukazuju da su ova dva podfilotipa veoma različita, i da je filotip IIB skoro klonski, dok je filotip IIA genetički veoma raznolik. Janse (2012) je proučavajući sojeve koji su identifikovani u Holandiji i drugim zapadnoevropskim zemljama, potvrdio da su tzv. „hladni“ sojevi *R. solanacearum* koji pripadaju r3b2

genetički veoma homogeni. Na homogenost *R. solanacearum* sojeva upućuju i druga istraživanja (Cellier & Prior, 2010; Cellier *et al.*, 2012).

Konstruisanjem TCS haplotipske mreže mogu se uočiti aspekti konvergentne i retikulacijske evolucije, što filogenetska stabla ne omogućuju (Posada & Crandall, 2001; Huson & Bryant, 2006). U slučaju *R. solanacearum* izolata, konstruisana TCS mreža metodom statističke parsimonije je pokazala rezultate slične onima dobijenim filogenetskom analizom korišćenjem Maximum likelihood metode. *R. solanacearum* izolati poreklom sa krompira iz Srbije su zajedno sa još 11 sojeva iz NCBI baze (PD 2762, PD1610, UW551, PD1100, PD1939, UW220, TK131, BS075, BS048 BS024 i BS025) pozicionirani u centru haplotipske mreže. Ovi rezultati ukazuju da je ovaj haplotip predački, jer se sastoji od većeg broja izolata, odnosno najčešće je zastupljen u populaciji i ima više od jedne mutacijske veze. Na slična saznanja su ukazali i Wicker *et al.* (2012) su došli do zaključka da su podfilotipovi IIA i IIB predački i da su evoluirali zajedno sa biljnim vrstama. Smatra se da je poreklo ovih filotipova Južna Amerika, odnosno basen Amazona u Brazilu (Wicker *et al.*, 2012; Gutarra *et al.*, 2017; Santiago *et al.*, 2017) i da je ovaj patogen distribuiran širom sveta zaraženim biljnom materijalom (Gutarra *et al.*, 2017). Rezultati TCS analize *R. solanacearum* izolata ispitivanih u ovom radu su identični sa sojevima poreklom sa krompira iz Holandije, Belgije, Egipta, Izraela, kao i sa sojevima koji su izolovani u geografski udaljenim zemljama poput Bolivije, Indije i Tajlanda. Na osnovu svega navedenog pretpostavka o geografskom poreklu *R. solanacearum* u Srbiji bi bila vrlo spekulativna.

## **5.2. CRNA NOGA I VLAŽNA TRULEŽ KRTOLA KROMPIRA – MONITORING, FENOTIPISKE I MOLEKULARNO-GENETIČKE KARAKTERISTIKE PROUZROKOVAČA BOLESTI**

Iz sakupljenih uzoraka sa simptomima bolesti crne noge i vlažne truleži krtola krompira izolacijom na specifičnu podlogu dobijeni su brojni pektinolitički izolati bakterija identifikovani kao *P. carotovorum*, *P. brasiliense* i *D. dianthicola*. Bakterije identifikovane iz biljaka sa simptomima pomenute bolesti su ukazale da je u ovom slučaju preliminarna dijagnostika na osnovu simptomatologije dosta pouzdana. Međutim, simptomatologija nije dovoljna za diferencijaciju između vrsta koje su identifikovane kao prouzrokovači bolesti (Toth *et al.*, 2011; Charkowski *et al.*, 2012; Charkowski *et al.*, 2020; Toth *et al.*, 2021). Simptomi koji su praćeni tokom izrade ovog rada su i u slučaju pojedinačnih ali i kombinovane infekcije bili identični i odgovarali onima koji su prethodno opisani od strane drugih autora (Pérombelon, 2002; de Haan *et al.*, 2008; van der Merwe *et al.*, 2010). Prema Arsenijević *et al.* (1994) i Obradović (1996) bolest crna noga se razvija sa početnim simptomima u vidu hlorotičnih, zakržljalih biljaka koje zauzimaju uspravan položaj, sa svetlozelenim ili žučkastim listovima koji se povijaju prema gore, kao i simptomima na prizemnom delu stabljika u vidu braon-crnog obojenja (pege), koje kasnije postaje potpuno crno. Iz biljaka sa navedenim simptomima autori su izolovali i identifikovali *E. c.* subsp. *atroseptica* (današnji *P. atrosepticum*) na bazi odgajivačkih, biohemijsko-fizioloških i seroloških testova (Arsenijević *et al.*, 1994), kao i *E. c.* subsp. *atroseptica* i *E. c.* subsp. *carotovora* (današnji *P. atrosepticum* i *P. carotovorum*, redom) na bazi patogenosti, morfoloških, odgajivačkih i biohemijsko-fizioloških odlika (Obradović, 1996). Pomenuti autori u svojim istraživanjima kao simptom bolesti ne navode nekrotične lezije koje su se uočavale na srednjim i gornjim delovima stabljika krompira prilikom praćenja simptoma bolesti na usevima krompira koji su bili predmet ovog istraživanja. U toku ovog istraživanja zapaženo je da su nekrotične lezija bile prisutne na podjednakom broju biljaka kao i simptom crne noge, kao i to da je iz biljaka sa simptomima nekrotičnih lezija stabljika između ostalih bakterija izolovana i bakterija *P. carotovorum*.

Tokom ovog istraživanja je prvi put utvrđeno prisustvo *P. brasiliense* i *D. dianthicola* kao novih patogena krompira u Srbiji. Bakterija *P. brasiliense* je utvrđena tokom 2018. i 2019. godine i mogla bi da se smatra dominantnom. Sa druge strane, vrsta *P. carotovorum* je izolovana u jednom slučaju tokom 2016. godine, dok je vrsta *D. dianthicola* zabeležena samo 2018. godine i to u kombinovanoj infekciji sa *P. brasiliense*. Autori Kim *et al.* (2009) i Yap *et al.* (2004) navode da nije neuobičajeno

pronaći više od jednog prouzrokovača ove bolesti u usevu krompira ili čak u jednoj biljci krompira. Prema van der Wolf-u (2018) struktura bakterijske populacije koja izaziva bolest crne noge krompira sklona je brzim izmenama. Tako je u skorije vreme u Holandiji uočena smena populacije *P. brasiliense* sa *Dickeya* sp. (van der Wolf *et al.*, 2007; van der Wolf *et al.*, 2017; van der Wolf, 2018).

Naime, dugo vremena se *P. atrosepticum* smatrao glavnim prouzrokovačem crne noge u Evropi, ali se u poslednje dve decenije, iz nepoznatih razloga, rasprostranjenost ove bakterije na evropskom kontinentu smanjila (Toth *et al.*, 2003; van der Wolf *et al.*, 2017). Deo uzroka bi moglo biti globalno zagrevanje i povećanje temperature u toku vegetacije (Moh *et al.*, 2012). Tako, prema Pérombelon (2002), *P. atrosepticum* izaziva simptome uglavnom u hladnijim i vlažnijim uslovima spoljne sredine. Sa druge strane, *P. carotovorum* je sveprisutna u regionima sa umerenom temperaturom i uglavnom je navedena kao prouzrokovač vlažne truleži u skladištu (Toth *et al.*, 2003). De Haan *et al.* (2008) navode da ova bakterija može prouzrokovati simptome crne noge na stabljikama krompira u uslovima visoke temperature. Međutim, pre desetak godina je utvrđeno prisustvo bakterije *P. brasiliense* kao dominantnog prouzrokovača crne noge na teritoriji Evrope (van der Wolf *et al.*, 2017). Od prve izolacije *P. brasiliense* iz krompira u Brazilu (Duarte *et al.*, 2004), zabeležena je pojava ove bakterije širom sveta (Duarte *et al.*, 2004; Ma *et al.*, 2007; Nabhan *et al.*, 2012a, Panda *et al.*, 2012), a u zemljama Evrope detektovana je u Belgiji, Holandiji, Švajcarskoj, Nemačkoj, Poljskoj, Engleskoj i Francuskoj (van der Wolf *et al.*, 2017). Marquez-Villavicencio *et al.* (2011) ističu da su vrste *P. c.* subsp. *carotovorum* i *P. c.* subsp. *brasiliensis* agresivnije od *P. atrosepticum*, dok van der Wolf *et al.* (2017) navode da je visoka prevalencija *P. carotovorum* subsp. *brasiliense* posledica kombinacije visoke virulentnosti i fleksibilnijeg prilagođavanja širokom spektru ekoloških i klimatskih uslova. Sa druge strane, značaj *D. dianthicola* kao patogena krompira u Evropi se smanjuje (Toth *et al.*, 2011).

Proučavanje 14 fenotipskih odlika izolovanih pektinolitičkih bakterija rezultiralo je njihovom podelom u dve grupe. Za obe grupe izolata utvrđene fenotipske osobine su odgovarale karakteristikama koje za *Pectobacterium* spp. i *Dickeya* spp. navode drugi autori (Toth *et al.*, 2003; Duarte *et al.*, 2004; Czajkowski, 2006; Tsrer *et al.*, 2009; van der Merwe *et al.*, 2010; Baghaee-Ravari *et al.*, 2011; Nabhan *et al.*, 2012a). Najbitnije razlike u pogledu biohemijskih karakteristika su zabeležene rezultatom testa za produkciju indola koji predstavlja i osnovni test za diferencijaciju *E. carotovora* (trenutno *Pectobacterium* spp.) od *E. chrysanthemi* (trenutno *Dickeya* spp.). U ovom radu je utvrđeno da izolati iz roda *Pectobacterium* nisu produkovali indol za razliku od izolata iz roda *Dickeya* što se poklapa sa nalazima drugih autora (Schaad *et al.*, 2001; Yap *et al.*, 2003). Prema Nabhan *et al.* (2012b), ustanovljeno je da postoje *Pectobacterium* spp. sojevi sa varijabilnim biohemijskim karakteristikama, pa ova odstupanja mogu da umanje značaj biohemijskih testova u identifikaciji i/ili diferencijaciji izolata. Takođe, u okviru ovih istraživanja na podlogama su zabeležena dva tipa kolonija koje su odgovarale podeli dobijenoj na osnovu biohemijskih karakteristika.

Izolati iz roda *Pectobacterium* su primenom BOX-, ERIC- i REP-PCR metoda ispoljili genetičku heterogenost i na osnovu konstruisanih UPGMA stabala je definisano šest grupa primenom sve tri metode. Primena istih metoda je rezultirala genetičkom homogenošću devet *Dickeya* izolata. Rep-PCR metode korišćene i u drugim studijama su ukazale na postojanje genetičke heterogenosti kod *Pectobacterium* sojeva, odnosno genetičke homogenosti kod *Dickeya* sojeva (Czajkowski *et al.*, 2009; Tsrer *et al.*, 2009; Ngadze *et al.*, 2012; Nakayama *et al.*, 2021), što se poklapa sa dobijenim rezultatima ovog rada.

Razvojem novih strategija sekvenciranja DNK, taksonomija rodova *Pectobacterium* i *Dickeya* je značajno izmenjena u prethodnih deset godina i položaj mnogih sojeva u ovim rodovima je ponovo determinisan (Duarte *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2018; Huang *et al.*, 2019). Klasifikacija i identifikacija poravnanjem multilokusnih sekvenci spojenih u konkatamere, kao i poređenjem sekvenci čitavog genoma, su dodatno razjasnile kompleksnu polifiletsku prirodu ranije opisanih vrsta rodova *Pectobacterium* i *Dickeya* (Curland *et al.*, 2021). U ovom istraživanju, svi ispitivani *Pectobacterium* i *Dickeya* izolati su prvo identifikovani na osnovu sekvenci sedam konzerviranih gena (*acnA*, *dnaX*, *gapA*, *icdA*, *mdh*, *pgi*, i *proA*), a potom je pristupljeno filogenetskoj analizi na bazi pojedinačnih i konkatamernih sekvenci gena, kao i genealoškoj analizi na bazi TCS haplotipskih mreža.

Konzistentnost među topologijama stabala koju generišu pojedinačne, konkatamerne sekvence gena, kao i čitave sekvence genoma omogućavaju pretpostavljenu identifikaciju uzročnika crne noge i vlažne truleži krtola krompira i pruža uvid u raznolikost, ekologiju i epidemiologiju specifičnih taksona (Li *et al.*, 2018; Oulghazi *et al.*, 2020; Oulghazi *et al.*, 2021).

Izolati *P. carotovorum* poreklom sa krompira iz Srbije su se nakon sekvenciranja protein-kodirajućih gena pokazali kao međusobno identični i najrodniji sa sojem BP201601.1 koji je poreklom sa krompira iz Južne Koreje. Na filogenetskom stablu su pored pomenutog soja iz Južne Koreje kao blisko srodni grupisali i sojevi iz: Kine (XP-13, izolovan iz krompira), Južne Koreje (JR1.1, izolovan iz rotkvice), Belorusije (25.1, izolovan iz krastavca) i Francuske (A077-S18-O15, izolovan iz vode), dok se soj iz Rusije (2A, izolovan iz krompira) pokazao kao najmanje srodan. Suprotno, Yap *et al.* (2004) u svojim ispitivanjima navode varijabilnost *E. carotovora* subsp. *carotovora* sojeva dobijenih iz istih uslova sredine i domaćina-krompira. Primenom TCS programa na bazi sekvenci sedam konzerviranih gena, *P. carotovorum* izolati su prikazani kao jedan novi haplotip (SRB\_PCC). Haplotip iz Srbije je smešten na kraju mreže sa jednom vezom, što može da ukaže na to da je nastao kao rezultat nedavne mutacije.

Jonkheer *et al.* (2021) su koristeći pangenomsku analizu ukazali da *P. brasiliense* ima najveći diverzitet od svih *Pectobacterium* vrsta. Toth *et al.* (2003) objašnjavaju da je genetička raznovrsnost *Pectobacterium* vrsta razlog njihovog opstanka u različitim sredinama. U Srbiji je tokom ovog istraživanja utvrđeno pet novih *P. brasiliense* haplotipova, označenih od 1SRB\_PCB do 5SRB\_PCB. Dobijeni haplotipovi odgovaraju podeli izolata na pet grupa koje su dobijene i korišćenjem rep-PCR metoda. Od izolata koji su poreklom sa krompira iz Srbije, izolati koji su označeni kao haplotipovi 2SRB\_PCB i 5SRB\_PCB su se pokazali kao međusobno najrodniji i blisko srodni sa sojevima iz NCBI baze IPO:4057 NAK:249 (izolovan sa krompira iz Holandije), F126 (izolovan sa krompira iz Rusije), IPO:4134 NAK:395 (izolovan sa zumbula sa Holandije), i manje srodni sa sojevima TS20HJ1 (izolovan sa đumbira iz Kine) i SX309 (izolovan sa krastavca iz Kine). Izolati koji su označeni kao haplotip 3SRB\_PCB su najrodniji sa sojem BZA12 koji je poreklom iz Kine i izolovan sa krastavca, dok su izolati označeni kao haplotipovi 1SRB\_PCB i 4SRB\_PCB pokazali najveću međusobnu srodnost. Do sličnih rezultata došli su i Ma *et al.* (2007) koji u svom radu navode da su sojevi izolovani sa istog domaćina (krompira) smešteni u različite klade. Autori Tsrer *et al.* (2021) su na osnovu opsežne studije genetičke varijabilnosti među *P. brasiliense* sojevima, baziranoj na odnosu sekvenci *dnaX* gena i PFGE analize, kao i patogenosti, zaključili da nema dokaza o geografskoj diferencijaciji između sojeva ili populacija. Dalje, isti autori iznose tvrdnju da je semenski krompir uvezen iz Evrope najverovatnije jedan od glavnih izvora introdukcije i širenja bakterije u Izraelu. Sličan zaključak bi mogao da se izvede i na osnovu naših rezultata, jer je utvrđena velika genetička varijabilnost identifikovanih izolata. Ovu tvrdnju potkrepljuje i činjenica je da je sadni materijal useva krompira obuhvaćen monitoringom poreklom iz uvoza. U prilog ovome ide i činjenica da izolati dobijeni 2019. godine sa istog lokaliteta, useva i sorte krompira (Kulpin, T-28, L. Claire) pripadaju haplotipovima 4SRB\_PCB i 5SRB\_PCB, a prema filogenetskom stablu ne pokazuju blisku srodnost. Dalje, haplotip 4SRB\_PCB je najrodniji sa haplotipom 1SRB\_PCB koji je izolovan 2018. sa krompira poreklom sa lokaliteta Maglić, sorte Cr4all, dok je haplotip 5SRB\_PCB najrodniji sa haplotipom 2SRB\_PCB izolovan 2018. sa krompira poreklom sa lokaliteta Obrovac, sorte L. Claire. Međutim, iako se *P. brasiliense* navodi da se ne održava dobro u zemljištu (Skelsey *et al.*, 2018), ovaj patogen je sveprisutan i ima veoma širok spektar biljaka domaćina (Tsrer *et al.*, 2021) pa je do posmatranih useva mogao dospeti sa nekih drugih domaćina. Sve navedeno bi trebalo uzeti u obzir prilikom pretpostavke o poreklu infekcije. Haplotipska TCS mreža ukazuje na grananje haplotipova oko predačkog vektora koji nedostaje ili je neuzorkovan. Haplotip koga čine izolati IPO:4057 NAK:249, F126 i IPO:4134 NAK:395 se u ovom slučaju može smatrati predačkim. Među svim identifikovanim haplotipovima iz Srbije, haplotip 5SRB\_PCB bi se mogao smatrati za haplotip koji je najduže u populaciji, jer je pozicioniran centralno i poseduje dve mutacijske veze, dok su ostali haplotipovi verovatno rezultat nedavne mutacije.

Potrykus *et al.* (2016) navode da je genetički diverzitet u okviru *Dickeya* vrsta izolovanih sa krompira veoma nizak, na šta upućuju i naši rezultati. Ispitivani *D. dianthicola* izolati iz Srbije su bili

međusobno identični i najsirodniji grupi od 13 sojeva (16SBJ16, 16MA15T, 16MB01, ME23, NCPPB 3534, IPO980, DDI ME30, 16ME22T, PA24, 16JP03, 16LI01, NCPPB 453T i RNS04.9). Sojevi NCPPB 453T i RNS04.9 su međusobno identični, bez obzira što je prvi soj izolovan sa karanfila i poreklom je iz Velike Britanije, a drugi je izolovan sa krompira i poreklom je iz Francuske. Parkinson *et al.* (2015) navode da je upravo pravac prenosa *D. dianthicola* sojeva od ukrasnih biljaka do krompira. TCS mreža je pokazala slične rezultate sa rezultima filogenetske analize. *Dickeya dianthicola* izolati poreklom sa krompira iz Srbije su prikazani kao jedan novi haplotip koji je označen sa DD\_SRB. Ovaj haplotip je smešten na sredini haplotipske mreže sa jednom vezom, što može da ukaže na skorije mutacije izolata. Za razliku od DD\_SRB haplotipa, haplotip kome pripadaju sojevi 16SBJ16, 16MA15T, 16MB01, ME23, NCPPB 3534, IPO980, DDI ME30, 16ME22T, PA24, 16JP03, 16LI01, NCPPB 453T i RNS04.9 se može smatrati predačkim, jer je najčešće zastupljen u populaciji i ima više od jedne mutacijske veze.

### 5.3. DIVERZITET ZAJEDNICE MIKROORGANIZAMA KRTOLA KROMPIRA

Upotreba metabarkoding pristupa u ovoj studiji omogućila je sveobuhvatan uvid u promene u sastavu zajednice bakterija krtola krompira koje su zahvaćene vlažnom truleži (Marković *et al.*, 2022b). Kao što se i očekivalo, analiza bakterijskih zajednica u ispitivanim uzorcima, pokazala je veći diverzitet u uzorcima zemljišta u poređenju sa uzorcima krtola krompira, na svim taksonomskim nivoima. Četiri razdela, Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes i Actinobacteria su bili prisutni u svim ispitivanim uzorcima krompira i zemljišta. Navedeni razdeli su poznati kao osnovni razdeli endosfere i rizosfere biljaka (Reinhold-Hurek & Hurek, 2011; Liu *et al.*, 2017).

U uzorcima krtola sa simptomima vlažne truleži, kao i u zemljištu koje je okruživalo ove krtole, najzastupljeniji rod je bio *Acinetobacter*, dok su rodovi *Pseudomonas* i *Enterobacter* bili najzastupljeniji u uzorku krtola bez simptoma vlažne truleži. Rod *Acinetobacter* je u drugim studijama naveden kao član endosfere krompira (Rasche *et al.*, 2009). Prisustvo vrsta iz ovog roda u krtolama koje su zahvaćene vlažnom truleži i u odgovarajućem zemljištu može se objasniti njihovom sposobnošću da razgrađuju različite dikarboksilne kiseline, aromatična jedinjenja povezana sa produktima degradacije biljaka, kao i jedinjenja koja biljke proizvode kao odgovor na stresne situacije, poput napada fitopatogena i fitofagnih insekata (Repizo *et al.*, 2020). U proučavanju dinamike populacije mikroorganizama kao odgovora na infekciju *P. atrosepticum* u krtolama krompira, Kõiv *et al.* (2015) su objasnili da se rodovi *Pseudomonas* i *Enterobacter* eksponencijalno razmnožavaju kada pektinolitički patogeni iniciraju proces infekcije. Stoga se može pretpostaviti da su uzorkovane krtole bez simptoma vlažne truleži bile ili na početku procesa infekcije ili u fazi latentne zaraze.

U ovoj studiji, rodovi koji su razlikovali mikrobijalnu zajednicu latentno inficiranih krtola, od onih sa aktivnom infekcijom su bili: *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Raoultella*, *Pectobacterium*, *Kurthia*, *Exiguobacterium* i *Arthrobacter*. Neki od pomenutih rodova sadrže i vrste koje poseduju antimikrobne aktivnosti (Földes *et al.*, 2000; Dardanelli *et al.*, 2010; Vacheron *et al.*, 2013; Chauhan *et al.*, 2015; Mashiane *et al.*, 2017; Puri *et al.*, 2019; Yadav, 2020) i njihova povećana brojnost mogla bi biti razlog odsustva simptoma vlažne truleži. Takođe, najzastupljeniji rodovi u zemljištu koje je okruživalo latentno zaražene krtole su bili: *Gaiella*, *Sphingomonas*, *Sphingobium*, *Gemmatimonas* i *Geminicoccus*. Rodovi *Gaiella*, *Gemmatimonas* i *Sphingomonas* su opisani kao taksoni koji smanjuju brojnost patogena *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Ou *et al.*, 2019). Li *et al.* (2017) su ukazali na značaj *Gemmatimonas* u suzbijanju bolesti i promovisanju rasta biljaka. Ranije je navedeno da *Sphingobium* poseduje sposobnost suzbijanja *Pseudomonas syringae* kod *Arabidopsis thaliana* (Innerebner *et al.*, 2011; Peiffer *et al.*, 2013).

Kao mogući prouzrokoivači vlažne truleži zabeležene su *Pectobacterium* vrste koje su bile najzastupljenije u uzorku krtola sa latentnom infekcijom, dok je njihovo prisustvo bilo minimalno u krtolama koje su bile trule. Kõiv *et al.* (2015) navode da su endofitni mikroorganizmi prevalentni u



trulom tkivu kada je *P. atrosepticum* prouzrokovatelj bolesti. Ovo bi svakako moglo objasniti manju zastupljenost *Pectobacterium* vrsta u uzorcima krtola sa simptomima vlažne truleži.

Upotreba metabarkoding pristupa omogućila je sveobuhvatan uvid u interakciju mikrobijalnih zajednica, otkrivajući rodove koji su najverovatnije sprečili umnožavanje patogena i ispoljavanje simptoma vlažne truleži, kao i otkrivanje potencijalno mogućih prouzrokovaca bolesti koji korišćenjem konvencionalnih tehnika izolacije nisu utvrđeni na posmatranom usevu. Na osnovu rezultata ovog istraživanja može se istaći da je proces nastanka vlažne truleži rezultat složenih interakcija između fitopatogena i drugih endofitnih bakterija, a koje čine mikrobijalnu zajednicu krompira i utiču na tok bolesti.

#### 5.4. BIOLOŠKA KONTROLA PROUZROKOVAČA MRKE TRULEŽI I CRNE NOGE I VLAŽNE TRULEŽI KROMPIRA

Ispitivanje mogućnosti upotrebe antagonističkih *B. amyloliquefaciens* sojeva SS-12.6 i SS-38.4 za suzbijanja fitopatogenih bakterijskih izolata poreklom sa krompira izvedeno je u *in vitro*, *in situ* i *in planta* uslovima. Ovi sojevi su odabrani zbog njihovog višestruko dokazanog antagonizma prema različitim fitopatogenim bakterijama i gljivama (Stanković *et al.*, 2012; Dimkić *et al.*, 2017; Nikolić *et al.*, 2019). Antagonistički efekat soja SS-12.6 dokazan je prema *P. carotovorum*, *Alternaria alternata*, *Aspergillus flavus*, *Botryosphaeria obtusa*, *Colletotrichum acutatum*, *C. gloeosporioides*, *F. oxysporum*, *F. solani*, *Monilinia fructigena*, *Mucor* sp. i *Penicillium expansum*, dok je antagonistički efekat oba soja SS-12.6 i SS-38.4 dokazan prema 26 različitih sojeva gljiva (Dimkić *et al.*, 2013; Dimkić *et al.*, 2015). Dimkić *et al.* (2017) su procenili biokontrolnu efikasnost ekstrakata i punih kultura ovih sojeva u *in vitro* i *in planta* uslovima prema *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* (P16) i *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* (301, 311 i 320) vrstama, dok su Nikolić *et al.* (2019) utvrdili antagonističku aktivnost prema *P. syringae* pv. *aptata* (P12, P16 i P53) vrsti.

Rezultati *in vitro* ogleada kao početnog skrininga ukazali su da *B. amyloliquefaciens* sojevi SS-12.6 i SS-38.4 deluju antagonistički na fitopatogene izolate koji su dobijeni u toku ovog istraživanja. Brojna istraživanja ukazuju na značajnu ulogu bakterijskih lipopeptidnih jedinjenja u suzbijanju različitih fitopatogena (Romero *et al.*, 2007; Dimkić *et al.*, 2013; Dimkić *et al.*, 2015; Nikolić *et al.*, 2019; Sahu *et al.*, 2019; Singh *et al.*, 2019). Rezultati ovog istraživanja sugerišu da su samo lipopeptidna jedinjenja bila odgovorna za izraženu antimikrobnu aktivnost antagonističkih sojeva SS-12.6 i SS-38.4 protiv ispitivanih fitopatogenih izolata. Generalno, prečnici inhibicionih zona nastalih nakon primene etil-acetatnih ekstrakata ovih sojeva pokazali su daleko veće vrednosti (17,67-36,67 mm za SS-12.6 i 15,67-28,67 mm za SS-38.4) u poređenju sa dobijenim vrednostima inhibicionih zona nastalih primenom supernatanata (11,00-17,33 mm za SS-12.6 i 10,33-15,67 mm za SS-38.4). U prilog tome govori i činjenica da kod fitopatogenih bakterija *P. carotovorum* i *P. brasiliense* pune kulture antagonističkih sojeva SS-12.6 i SS-38.4 nisu produkovale zone inhibicije, i da je kod *R. solanacearum* i *D. dianthicola* vrsta inhibicija bila slaba. Na bazi utvrđenih vrednosti zona inhibicije se može zaključiti da je najveću otpornost prema oba antagonistička soja pokazala vrsta *D. dianthicola*, prosečnu vrste *P. carotovorum* i *P. brasiliense*, a najmanju otpornost vrsta *R. solanacearum*. Isti zaključak može da se donese na osnovu ustanovljenih MIK i MBK vrednosti.

Chen *et al.* (2019) su utvrdili da su vrednosti prečnika inhibicionih zona kod *R. solanacearum* (FJAT-91) nastale delovanjem lipopeptida *B. amyloliquefaciens* FJAT-2349 soja iznosile 26,60±0,02 mm. U drugom istraživanju, Villegas-Escobar *et al.* (2018) su utvrdili da lipopeptidi *Bacillus* sp. EA-CB0959 soja inhibišu rast *R. solanacearum* (EAP-009) i prouzrokuju zone od 11,7±0,7 mm, odnosno od 11,2±0,2 mm za *Pectobacterium* spp. Vrednosti inhibicionih zona izmerenih kod *R. solanacearum* izolata Rs0115, Rs6616 i Rs8118 iz ove studije su se kretale od 26,00±1,00 do 36,67±2,52 mm pa bi se moglo zaključiti da je antagonistički potencijal *B. amyloliquefaciens* sojeva SS-12.6 i SS-38.4 veći, ali bi se trebalo uzeti u obzir da je *R. solanacearum* soj FJAT-91 izolovan sa paradajza, dok je soj EAP-009 izolovan sa banane. U istraživanju koje su sprovedi Dimkić *et al.* (2013) ispitano je delovanje etil-acetatnog ekstrakta antagonističkog soja SS-12.6 prema *P. carotovorum* izolatima IZB

K5 i IZB K6 dobijenim iz kupusa. U pomenutom istraživanju, izmereni su prečnici zona inhibicije od 4 mm, dok su prečnici zona inhibicije delovanjem etil-acetatnog ekstrakta SS-12.6 prema *P. carotovorum* izolatu Pcc324 iz ovog istraživanja su iznosili  $19,00 \pm 1,00$  mm. Manja vrednost zona inhibicije koju su u dobili pomenuti autori može da ukaže na to da su *P. carotovorum* izolati poreklom sa kupusa manje osetljivi nego *P. carotovorum* poreklom sa krompira.

Sposobnost stvaranja biofilma je jedan od faktora virulencije fitopatogena (Kang *et al.*, 2002; Ham *et al.*, 2004; Álvarez *et al.*, 2010; Mori *et al.*, 2016; Moleleki *et al.*, 2017; Tanui *et al.*, 2017). Rezultati ovog eksperimenta su pokazali da je stvaranje biofilma u pozitivnoj korelaciji sa prethodno navedenim rezultatima *in vitro* testova. Vrsta *D. dianthicola* je pokazala umerenu sposobnost stvaranja biofilma, dok su vrste *P. carotovorum*, *P. brasiliense* i *R. solanacearum* pokazale slabu sposobnost stvaranja biofilma. Shodno ovim rezultatima, pri jednakim koncentracijama etil-acetatnih ekstrakata sojeva SS-12.6 i SS-38.4 za sve ispitivane fitopatogene, antagonistički sojevi su pokazali najbolji antagonistički potencijal za inhibiciju sojeva *R. solanacearum*. Korištenjem istih koncentracija etil-acetatnog ekstrakata dva antagonistička soja, soj SS-12.6 bio je efikasniji u inhibiciji stvaranja biofilma kod gotovo svih fitopatogenih izolata. Neki *Bacillus* sojevi su efikasniji od drugih u suzbijanju biljnih patogena, što se može objasniti raznovrsnošću prirodno sintetizovanih lipopeptida (Ongena & Jacques, 2008). Autori Stanković *et al.* (2012) su ispitali antagonistički potencijal *B. amyloliquefaciens* SS-12.6 i SS-38.4 sojeva i dokazali su da ovi sojevi poseduju više od jednog gena za biosintezu antimikrobnih lipopeptida (iturina, surfaktina, fengicina i bacilomicina D). Isti autori navode da soj SS-12.6 poseduje gene za biosintezu iturina, surfaktina i bacilomicina D, dok soj SS-38.4 poseduje gene za biosintezu sva četiri ispitana lipopeptida. Dimkić *et al.* (2017) su se nadovezali na ovo istraživanje i korišćenjem masene spektrometrije iz ekstrahovanih lipopeptida sojeva SS-12.6 i SS-38.4 su prikazali grupe pikova koji odgovaraju različitim porodicama lipopeptida, odnosno kurstakinima, iturinima, surfaktinima i fengicinima. Autori Guetsky *et al.* (2002) i de Boer *et al.* (2003) navode da je efikasnost biološke kontrole u ispitivanjima sprovedenim u uslovima staklenika i polja poboljšana kombinovanjem mikroorganizama sa različitim načinima delovanja. S obzirom na navedeno, buduća proučavanja bi trebala obuhvatiti iste eksperimente (sa istim fitopatogenima) ali sa kombinacijom dva antagonistička soja koji su u ovoj studiji korišćeni pojedinačno.

Suzbijanje simptoma vlažne truleži sa *B. amyloliquefaciens* SS-12.6 i SS-38.4 sojevima procenjeno je na celim krtolama krompira inokulisanim sa *P. carotovorum*, *P. brasiliense* i *D. dianthicola* vrstama. Efikasnost biokontrole procenjena je vizuelnim pregledom simptoma i utvrđivanjem gubitka težine. Vizuelnim pregledom krtola krompira petog i 15. dana nakon postavljanja ogleada utvrđen je intenzitet oboljenja koji je bio dva do tri puta veći od intenziteta oboljenja procenjenog merenjem težine krtola. Ova zapažanja impliciraju da se vlažna trulež širila površinski. U ovoj studiji, vlažna trulež je pokazala progresiju u razvoju vlažne truleži 15. dana inkubacije u svim grupama, osim u kod negativne kontrole i krtolama koje su tretirane antagonističkim sojevima kod kojih simptomi nisu zabeleženi ni nakon 15 dana. Razlike u intenzitetu oboljenja određene gubitkom težine 15 dana nakon tretiranja između kontrole i tretmana sa *B. amyloliquefaciens* SS-12.6 su bile statistički značajne za sve fitopatogene sojeve. Što se tiče tretmana sa SS-38.4 sojem, statistički značajne razlike su zabeležene su samo za sojeve Pcb62, Pcb2544, Pcb2811 i Pcb2842. Studija autora Azaiez *et al.* (2018) je pokazala da je predtretman krtola sojem *B. amyloliquefaciens* Ar10 smanjio infekciju sa *P. carotovorum* nakon 10 dana inkubacije i da je smanjenje zavisilo od trajanja predtretmana. Najmanje smanjenje gubitka težine (1,43%) je primećeno nakon tretmana od jednog sata, dok je najveća zaštita zabeležena nakon prethodnog tretmana od 72 sata (85%). U ovom istraživanju peti dan je zabeleženo smanjenje gubitka težine (efikasnost tretmana) za 66,5-79,4% a nakon 15 dana 19,7-45,9%. Druga studija je pokazala da dvosatni predtretman krompira supernatantima bakterije *Bacillus pumilus* može osigurati zaštitu od *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* 12 nedelja u uslovima skladišta (Abd-El-Khair *et al.*, 2021). U poređenju sa studijom koja je izvedena od strane Hadizadeh *et al.* (2019), *D. solani* soj Ds0432-1 je prouzrokovano sličan intenzitet oboljenja od 9,4% u odnosu na ispitivani *D. dianthicola* izolat (8,95%) petog dana nakon inokulacije, dok je 15. dana nakon inokulacije utvrđen gotovo isti intenzitet

oboljenja od 23,3% za *D. solani* soj Ds0432-1, odnosno 23,71% za ispitivani *D. dianthicola* izolat Dd31. Ovi rezultati bi mogli da ukažu na sličan razvoj bolesti kod ove dve vrste (*D. solani* i *D. dianthicola*) što bi se moglo objasniti poreklom sa istog domaćina – krompira, jer studija sprovedena od strane Blin *et al.* (2020) zaključuje na osnovu proučavanja pet *D. solani* i pet *D. dianthicola* sojeva koji potiču iz različitih domaćina, da su *D. solani* sojevi bili agresivniji na krtolama krompira, izazivajući teže simptome nego *D. dianthicola* sojevi. U istoj studiji, za antagonistički soj *B. subtilis* P48 je utvrđeno da je efikasnost tretmana iznosila 65,1% 30 dana nakon tretiranja, što je bilo znatno više od efikasnosti tretmana koja je utvrđena za *B. amyloliquefaciens* sojeve SS-12.6 i SS-38.4 15 dana nakon tretiranja (37,7 i 19,7%, redom). Stoga se može zaključiti da oba *B. amyloliquefaciens* soja korišćena u ovom istraživanju pokazuju potencijal za biokontrolu simptoma vlažne truleži krtola krompira, međutim, duži predtretman antagonističkim sojevima bi verovatno poboljšao njihovu efikasnost, pružajući više vremena za uspešnu kolonizaciju krtola antagonistima i sintezu antimikrobnih lipopeptida.

Rezultati *in planta* eksperimenata u kojima su korišćeni sojevi *B. amyloliquefaciens* SS-12.6 i SS-38.4 za suzbijanje *R. solanacearum* su bili u pozitivnoj korelaciji sa rezultatima dobijenim *in vitro*. Vizuelnom procenom intenziteta oboljenja bakteriozne uvelosti i merenjem sveže i suve mase biljaka utvrđeno je da su antagonistički sojevi SS-12.6 i SS-38.4 bili gotovo jednako efikasni. Efikasnost tretmana procenjena 60 dana nakon sadnje pokazala je da *B. amyloliquefaciens* SS-12.6 i SS-38.4 smanjuju simptome bakteriozne uvelosti biljaka krompira za 28,64-57,66% odnosno 51,44-60,22%. Aliye *et al.* (2008) su naveli mnogo veće smanjenje uvelosti (82,7%) delovanjem soja *B. subtilis* 65 dana nakon tretmana. Takođe, ovaj soj je imao efekat na promociju rasta biljaka, što je bilo suprotno nalazima iz ovog istraživanja gdje su biljke koje su tretirane samo sa *B. amyloliquefaciens* SS-12.6 i SS-38.4 sojevima imale istu svežu i suhu težinu kao biljke iz negativne kontrole. Drugo istraživanje pokazalo je da je endofitni soj *Bacillus licheniformis* B117 smanjio uvelost krompira za 41,31% (Bahmani *et al.*, 2021).

Brojne druge studije ukazuju na velik antagonistički potencijal *B. amyloliquefaciens* vrste za suzbijanje *R. solanacearum* (Ding *et al.*, 2013; Tan *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2019; Ho *et al.*, 2020), kao i nekih vrsta iz roda *Pectobacterium* (Zhao *et al.*, 2013; Krimi *et al.*, 2016; Akarapisan & Kumvinit, 2018; Azaiez *et al.*, 2018; Gerayeli *et al.*, 2018; Cui *et al.*, 2019; Osei *et al.*, 2021). Za bakterije *P. brasiliense* i *D. dianthicola* u literaturi nema podataka o biološkoj kontroli sa *B. amyloliquefaciens* sojevima, stoga ova studija predstavlja prvo takvo istraživanje. Međutim, dodatni eksperimenti su neophodni kako bi se otkrilo tačno jedinjenje odgovorno za inhibitorski efekat *B. amyloliquefaciens* sojeva SS-12.6 i SS-38.4 prema ispitivanim fitopatogenima krompira. Može se zaključiti da rezultati prikazani u ovoj studiji ukazuju da su *B. amyloliquefaciens* SS-12.6 i SS-38.4 sojevi pokazali visoku antagonističku aktivnost u *in vitro*, *in situ* i *in planta* uslovima protiv *R. solanacearum*, *P. carotovorum*, *P. brasiliense* i *D. dianthicola* vrsta. Ovi sojevi bi se stoga mogli koristiti kao preparat za biokontrolu širokog spektra za suzbijanje bakteriozne uvelosti i mrke truleži krtola i/ili crne noge i vlažne truleži krtola krompira. Budući rad bi se trebao fokusirati na određivanje preciznih načina delovanja *B. amyloliquefaciens* sojeva i verifikaciju njihove efikasnosti u uslovima terena i skladišta.

Na kraju je potrebno istaći da podaci predstavljeni u ovoj studiji proširuju trenutno znanje o prouzrokovateljima bolesti krompira bakteriozne prirode koji se javljaju u agroekosistemu severnog dela Srbije. Rezultati ovog istraživanja pružaju uvid u geografsku distribuciju bakterioza, raznolikosti bakterijskih populacija prouzrokovaca bolesti kao i njihovog taksonomskog položaja. Dodatno, dokazana je biokontrolna aktivnost *B. amyloliquefaciens* sojeva SS-12.6 i SS-38.4 prema izolovanim fitopatogenim bakterijama.

## 6. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata dobijenih u ovom radu izvedeni su sledeći zaključci:

1. Tokom petogodišnjeg monitoringa (2015-2019. godine) krtola krompira od 2463 ispitanih uzoraka mrka trulež krtola je utvrđena kod ukupno 229 uzoraka, i to kod 88 iz 2015. godine (S. Miletić i Stapar); 140 iz 2016. godine (Boleč, S. Miletić, Stapar i Sombor); i jednog uzorka iz 2018. (Zmajevu).
2. Tokom istog perioda zabeležena je pojava crne noge i vlažne truleži krtola krompira u 2016. godini na lokalitetu Kulpin; 2018. na lokalitetima Feketić, Maglić, Kula i Obrovac; i 2019. godini na lokalitetima Kulpin i Maglić.
3. Svih 70 bakterijskih izolata dobijenih iz krtola sa simptomima mrke truleži ispoljilo je uniformne biohemijsko-fiziološke karakteristike identične sa referentnim sojem *R. solanacearum* PD 2762. Patogenost izolata je dokazana na biljkama krompira, paradajza i plavog patlidžana. Korišćenjem specifičnih prajmera za vrstu i biovar, potvrđena je pripadnost izolata biovaru 2 *R. solanacearum*.
4. Na osnovu biohemijsko-fizioloških karakteristika 50 izolata iz uzoraka sa simptomima crne noge i vlažne truleži krtola krompira izdvojile su se dve grupe izolata. Patogenost svih izolata je dokazana na biljkama krompira. Korišćenjem specifičnih prajmera identifikovano je pet *P. carotovorum*, 36 *P. brasiliense* i devet *Dickeya* spp. izolata.
5. BOX-PCR profili 70 izolata *R. solanacearum* ukazali su na odsustvo genetičke varijabilnosti, dok su se ERIC- i REP-PCR profili razdvojili na tri (ERIC-), odnosno pet (REP-) grupa profila. Analiza sekvenci sedam gena (*adk*, *gapA*, *gdhA*, *gyrB*, *ppsA*, *hrpB* i *fliC*) je potvrdila srodnost sa referentnim i drugim sojevima iz NCBI baze i utvrđeno je da izolati pripadaju filotipu II. TCS mreža je pokazala da izolati sa krompira u Srbiji zajedno sa sojevima iz Evrope i drugih delova sveta pripadaju predačkom haplotipu.
6. Rep-PCR profilisanje pokazalo je postojanje genetičke heterogenosti *Pectobacterium* izolata (šest grupa profila) i genetičke homogenosti *D. dianthicola* izolata. Analiza sekvenci sedam gena (*acnA*, *dnaX*, *gapA*, *icdA*, *mdh*, *pgi* i *proA*) je za tri izolata potvrdila srodnost sa *P. carotovorum* sojevima iz NCBI baze (sa jednim novim haplotipom), a za 15 izolata srodnost sa *P. brasiliense* sojevima iz NCBI baze (sa pet novih haplotipova). Za haplotip 5SRB\_PCB je utvrđeno da je duže u populaciji od ostalih haplotipova iz Srbije. Tri genetički homogena izolata identifikovana su kao *D. dianthicola* na osnovu srodnosti sa sojevima iz NCBI baze i predstavljaju nov haplotip.
7. Na osnovu metabarkoding analize utvrđeno je da su Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes i Actinobacteria prisutni u svim uzorcima. Razdeo Proteobacteria je bio najzastupljeniji, naročito u krtolama bez simptoma vlažne truleži. Najdominantniji rod u krtolama sa simptomima je bio *Acinetobacter*, dok su *Pseudomonas* i *Enterobacter* bili najbrojniji u krtolama bez simptoma. *Bacteroides* i *Dysgonomonas* su isključivo bili prisutni u krtolama sa vlažnom truleži i njihovim zemljištima. Najzastupljeniji rodovi u zemljištu krtola bez simptoma su bili *Gaiella*, *Sphingomonas*, *Sphingobium*, *Gemmatimonas* i *Geminococcus*. U svim uzorcima su detektovane *Pectobacterium* vrste (*P. aroidearum*, *P. atrosepticum*, *P. carotovorum* i *P. polaris*), koje su bile brojnije u krtolama bez simptoma, dok je *Dickeya* bila na granici detekcije ili potpuno odsutna.
8. Za pune kulture, supernatante i etil-acetatne ekstrakte *B. amyloliquefaciens* sojeva SS-12.6 i SS-38.4 utvrđena je antagonistička aktivnost prema izolatima *R. solanacearum*. Pune kulture sojeva SS-12.6 i SS-38.4 su ispoljile slabu antagonističku aktivnost na *D. dianthicola* izolat, dok za izolate *P. carotovorum* i *P. brasiliense* nije utvrđena antagonistička aktivnost. *Pectobacterium* i *Dickeya* izolati su pokazali osetljivost prema supernatantima i etil-acetatnim ekstraktima antagonističkih sojeva.

9. Izolati *R. solanacearum*, *P. carotovorum* i *P. brasiliense* su pokazali slabu sposobnost formiranja biofilma, dok je izolat *D. dianthicola* pokazao umerenu sposobnost formiranja biofilma. Etil-acetatni ekstrakti antagonističkih sojeva SS-12.6 i SS-38.4 su inhibirali formiranje biofilma fitopatogenih izolata.

10. *B. amyloliquefaciens* SS-12.6 i SS-38.4 su statistički značajno smanjili intenzitet vlažne truleži krompira izazvane izolatima *Pectobacterium* i *Dickeya*, a efikasnost tretmana je bila između 66,5 i 79,4% posle 5 dana. Nakon 15 dana utvrđeno je statistički značajno smanjenje intenziteta vlažne truleži kod svih tretmana sojem SS-12.6 i većine tretmana sojem SS-38.4. Efikasnost tretmana je bila između 19,7 i 45,9%.

11. Tretmani sa *B. amyloliquefaciens* SS-12.6 i SS-38.4 su statistički značajno redukovali intenzitet oboljenja izazvanog od strane većine *R. solanacearum* izolata. Efikasnost tretmana je bila između 28,64 i 60,22%. Merenjem težine svežih i suvih biljaka utvrđena je statistički značajna razlika između biljaka koje su zaražene *R. solanacearum* i tretmana sa antagonističkim sojevima SS-12.6 i SS-38.4.

## 7. LITERATURA

- Abd-El-Khair, H., Abdel-Gaied, T.G., Mikhail, M.S., Abdel-Alim, A.I., El-Nasr, H.I.S. (2021). Biological control of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, the causal agent of bacterial soft rot in vegetables, *in vitro* and *in vivo* tests. *Bulletin of the National Research Centre*, 45(1), 1-9.
- Abdurahman, A., Griffin, D., Elphinstone, J., Struik, P.C., Schulz, S., Schulte-Geldermann, E., Sharma, K. (2017). Molecular characterization of *Ralstonia solanacearum* strains from Ethiopia and tracing potential source of bacterial wilt disease outbreak in seed potatoes. *Plant Pathology*, 66(5), 826-834.
- Adeolu, M., Alnajar, S., Naushad, S., Gupta, R.S. (2016). Genome-based phylogeny and taxonomy of the 'Enterobacteriales': proposal for *Enterobacterales* ord. nov. divided into the families *Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae* fam. nov., *Pectobacteriaceae* fam. nov., *Yersiniaceae* fam. nov., *Hafniaceae* fam. nov., *Morganellaceae* fam. nov., and *Budviciaceae* fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(12), 5575-5599.
- Ailloud, F., Lowe, T., Cellier, G., Roche, D., Allen, C., Prior, P. (2015). Comparative genomic analysis of *Ralstonia solanacearum* reveals candidate genes for host specificity. *BMC genomics*, 16(1), 1-11.
- Aizawa, S.I. (2014). *Pectobacterium carotovorum*-Subpolar Hyper-Flagellation. *The Flagellar World*, 58-59.
- Akarapisan, A., Kumvinit, A. (2018). Evaluation of *Bacillus amyloliquefaciens* for control of potato blackleg caused by *Pectobacterium carotovorum*. *The Journal of Applied Science*, 17(Special), 1-8.
- Aley, E., Elphinstone, J. (1995). Culture media for *Ralstonia solanacearum* isolation, identification and maintenance. *Fitopatologia*, 30, 126-130.
- Aliye, N., Fininsa, C., Hiskias, Y. (2008). Evaluation of rhizosphere bacterial antagonists for their potential to bioprotect potato (*Solanum tuberosum*) against bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*). *Biological Control*, 47(3), 282-288.
- Allen, C., Kelman, A., French E.R. (2001). Brown rot. In: *Compendium of Potato Diseases*, Stevenson, W.R., Loria, R., Franc, G.D., Weingartner, D.P. (Eds.), APS Press, St. Paul, Minnesota.
- Álvarez, B., Biosca, E.G., López, M.M. (2010). On the life of *Ralstonia solanacearum*, a destructive bacterial plant pathogen. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, 1, 267-279.
- Álvarez, B., López, M.M., Biosca, E.G. (2008). Survival strategies and pathogenicity of *Ralstonia solanacearum* phylotype II subjected to prolonged starvation in environmental water microcosms. *Microbiology*, 154, 3590-3598.
- Aronesty, E. (2013). Comparison of sequencing utility programs. *The Open Bioinformatics Journal*, 7(1).
- Arsenijević, M., Đurišić, S., Milošević, D. (1994). *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*, potato pathogen in our country. *Zaštita bilja*, 45(3), 169-178.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (Eds.) (2003). *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Hoboken, New York, USA.

- Azaiez, S., Slimene, I.B., Karkouch, I., Essid, R., Jallouli, S., Djebali, N., Elkahouia, S., Limama F., Tabbene, O. (2018). Biological control of the soft rot bacterium *Pectobacterium carotovorum* by *Bacillus amyloliquefaciens* strain Ar10 producing glycolipid-like compounds. *Microbiological Research*, 217, 23-33.
- Baghaee-Ravari, S., Rahimian, H., Shams-Bakhsh, M., Lopez-Solanilla, E., Antunez-Lamas, M., Rodriguez-Palenzuela, P. (2011). Characterization of *Pectobacterium* species from Iran using biochemical and molecular methods. *European Journal of Plant Pathology*, 129, 413-425.
- Bahmani, K., Hasanzadeh, N., Harighi, B., Marefat, A. (2021). Isolation and identification of endophytic bacteria from potato tissues and their effects as biological control agents against bacterial wilt. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 116, 101692.
- Beneduzi, A., Ambrosini, A., Passaglia, L.M.P. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genetics and Molecular Biology*, 4, 1044-1051.
- Berlin, A., Källström, H.N., Lindgren, A., Olson, A. (2018). Scientific evidence for sustainable plant disease protection strategies for the main arable crops in Sweden. *Systematic map protocol-Environmental Evidence*, 7(1), 31.
- Bleiholder, H., Weber, E., Lancashire, P., Feller, C., Buhr, L., Hess, M., Strauss, R. (2001). Growth stages of mono- and dicotyledonous plants. *BBCH monograph*, 158.
- Blin, P., Robic, K., Khayi, S., Cigna, J., Munier, E., Dewaegeneire, P., Faure, D. (2021). Pattern and causes of the establishment of the invasive bacterial potato pathogen *Dickeya solani* and of the maintenance of the resident pathogen *D. dianthicola*. *Molecular Ecology*, 30(2), 608-624.
- Boluk, G., Arizala, D., Dobhal, S., Zhang, J., Hu, J., Alvarez, A.M., Arif, M. (2021). Genomic and Phenotypic Biology of Novel Strains of *Dickeya zea* Isolated From Pineapple and Taro in Hawaii: Insights Into Genome Plasticity, Pathogenicity, and Virulence Determinants. *Frontiers in Plant Science*, 12.
- Borges, K.M., Cooper, W.R., Garczynski, S.F., Thinakaran, J., Jensen, A.S., Horton, D.R., Munyaneza, J.E., Cueva, I., Barcenas, N.M. (2017). “*Candidatus Liberibacter solanacearum*” associated with the psyllid, *Bactericera maculipennis* (Hemiptera: Trioziidae). *Environmental Entomology*, 46(2), 210-216.
- Borriss, R. (2011). Use of Plant-Associated *Bacillus* Strains as Biofertilizers and Biocontrol Agents in Agriculture. In: *Bacteria in Agrobiological Plant Growth Responses*, Maheshwari, D.K. (Ed.), Springer, Berlin, Heidelberg, Germany.
- Brady, C.L., Cleenwerck, I., Denman, S., Venter, S.N., Rodríguez-Palenzuela Coutinho, T.A., De Vos, P. (2012). Proposal to reclassify *Brenneria quercina* (Hildebrand and Schroth 1967) Hauben *et al.* 1999 into a new genus, *Lonsdalea* gen. nov., as *Lonsdalea quercina* comb. nov., descriptions of *Lonsdalea quercina* subsp. *quercina* comb. nov., *Lonsdalea quercina* subsp. *iberica* subsp. nov. and *Lonsdalea quercina* subsp. *britannica* subsp. nov., emendation of the description of the genus *Brenneria*, reclassification of *Dickeya dieffenbachiae* as *Dickeya dadantii* subsp. *dieffenbachiae* comb. nov., and emendation of the description of *Dickeya dadantii*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62, 1592-1602.
- Bročić, Z., Stefanović, R., Momirović, N., Kovačević, D., Poštić, D., Dolijanović, Ž. (2016). Development trends and characteristics of potato production in the Republic of Serbia. In 9th

- International Scientific/Professional Conference, Agriculture in Nature and Environment Protection, 20-28.
- Callahan, B.J., McMurdie, P.J., Rosen, M.J., Han, A.W., Johnson, A.J.A., Holmes, S.P. (2016). DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13, 581.
- Capote, N., Pastrana, A.M., Aguado, A., Sánchez-Torres, P. (2012). Molecular tools for detection of plant pathogenic fungi and fungicide resistance. *Plant pathology*, 374.
- Caruso, P., Palomo, J.L., Bertolini, E., Álvarez, B., López, M.M., Biosca, E.G. (2005). Seasonal variation of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 populations in a Spanish river: recovery of stressed cells at low temperatures. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 140-148.
- Castillo, J.A., Greenberg, J.T. (2007). Evolutionary dynamics of *Ralstonia solanacearum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 1225-1238.
- Cawoy, H., Bettioli, W., Fickers, P., Ongena, M. (2011). *Bacillus*-based biological control of plant diseases. In: Pesticides in the modern world-pesticides use and management, Stoytcheva, M. (Ed.). In Tech, Rijeka, Croatia.
- Cellier, G., Prior, P. (2010). Deciphering phenotypic diversity of *Ralstonia solanacearum* strains pathogenic to potato. *Phytopathology*, 100(11), 1250-1261.
- Cellier, G., Remenant, B., Chiroleu, F., Lefeuvre, P., Prior, P. (2012). Phylogeny and population structure of brown rot-and Moko disease-causing strains of *Ralstonia solanacearum* phylotype II. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(7), 2367-2375.
- Charkowski, A., Blanco, C., Condemine, G., Expert, D., Franza, T., Hayes, C., Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Solanilla, E.L., Low, D., Moleleki, L., Pirhonen, M., Pitman, A., Perna, N., Reverchon, R., Palenzuela, P.R., San Francisco, M., Toth, J., Tsuyumu, S., van der Waals, J., van der Wolf, J., Van Gijsegem, F., Yang, C.H., Yedidia, I. (2012). The role of secretion systems and small molecules in soft-rot *Enterobacteriaceae* pathogenicity. *Annual Review of Phytopathology*, 50, 425-449.
- Charkowski, A., Sharma, K., Parker, M.L., Secor, G.A., Elphinstone, J. (2020). Bacterial diseases of potato. In: *The Potato Crop*, Campos, H., Ortiz, O. (Eds.), Springer, Cham, Switzerland.
- Charkowski, A.O. (2015). Biology and control of *Pectobacterium* in potato. *American Journal of Potato Research*, 92(2), 223-229.
- Charkowski, A.O. (2018). The changing face of bacterial soft-rot diseases. *Annual Review of Phytopathology*, 56(1), 269-288.
- Chauhan, H., Bagyaraj, D.J., Selvakumar, G., Sundaram, S.P. (2015). Novel plant growth promoting rhizobacteria-Prospects and potential. *Applied Soil Ecology*, 95, 38-53.
- Chen, M.C., Wang, J.P., Zhu, Y.J., Liu, B., Yang, W.J., Ruan, C.Q. (2019). Antibacterial activity against *Ralstonia solanacearum* of the lipopeptides secreted from the *Bacillus amyloliquefaciens* strain FJAT-2349. *Journal of Applied Microbiology*, 126(5), 1519-1529.
- CIR (Commission Implementing Regulation) EU (2019). Commission Implementing Regulation EU 2019/2072. [https://eur-lex.europa.eu/eli/reg\\_impl/2019/2072/oj](https://eur-lex.europa.eu/eli/reg_impl/2019/2072/oj)
- Clement, M., Snell, Q., Walker, P., Posada, D., Crandall, K. (2002). TCS: estimating gene genealogies. In: *Proceedings of the 16th Parallel and Distributed Processing Symposium, International*, 3, 184.



- Cole, J.R., Wang, Q., Cardenas, E., Fish, J., Chai, B., Farris, R.J., Tiedje, J.M. (2009). The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Research* 37(suppl\_1), D141-D145.
- Colyer, P.D., Mount, M.S. (1984). Bacterization of Potatoes with *Pseudomonas putida* and Its Influence on Postharvest Soft Rot Diseases. *Plant Disease*, 68, 703-706.
- Cook, D. (1989). Genetic Diversity of *Pseudomonas solanacearum*: Detection of restriction fragment length polymorphisms with DNA probes that specify virulence and the hypersensitive response. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2, 113.
- Crosse, J.E., Garrett, C.M.E. (1963). Studies on the bacteriophagy of *Pseudomonas morsprunorum*, *Ps. syringae* and related organisms. *Journal of Applied Bacteriology*, 26, 159-177.
- Cruz, L., Eloy, M., Quirino, F., Carrinho, H. (2008). *Ralstonia solanacearum* biovar 1 associated with a new outbreak of potato brown rot in Portugal. *Phytopathologia Mediterranea*, 47(2), 87-91.
- Cruz, L., Eloy, M., Quirino, F., Oliveira, H., Tenreiro, R. (2012). Molecular epidemiology of *Ralstonia solanacearum* strains from plants and environmental sources in Portugal. *European Journal of Plant Pathology*, 133(3), 687-706.
- Cui, W., He, P., Munir, S., He, P., He, Y., Li, X., Yang, L., Wang, B., Wu, Y., He, P. (2019). Biocontrol of soft rot of Chinese cabbage using an endophytic bacterial strain. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1471.
- Curland, R.D., Mainello, A., Perry, K.L., Hao, J., Charkowski, A.O., Bull, C.T., Ishimaru, C.A. (2021). Species of *Dickeya* and *Pectobacterium* isolated during an outbreak of blackleg and soft rot of potato in northeastern and north Central United States. *Microorganisms*, 9(8), 1733.
- Czajkowski, A.O. (2006). The soft rot *Erwinia*. In: *Plant Associated Bacteria*, Gnanamanickam, S.S. (Ed.), Springer, Dordrecht, Netherlands.
- Czajkowski, R., De Boer, W.J., Velvis, H., Van Der Wolf, J.M. (2010). Systemic colonization of potato plants by a soilborne, green fluorescent protein-tagged strain of *Dickeya* sp. biovar 3. *Phytopathology*, 100(2), 134-142.
- Czajkowski, R., Grabe, G.J., van der Wolf, J.M. (2009). Distribution of *Dickeya* spp. and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* in naturally infected seed potatoes. *European Journal of Plant Pathology*, 125(2), 263-275.
- Czajkowski, R., Pérombelon, M.C.M., Jafra, S., Lojkowska, E., Potrykus, M., Van Der Wolf, J.M., Sledz, W. (2015). Detection, identification and differentiation of *Pectobacterium* and *Dickeya* species causing potato blackleg and tuber soft rot: a review. *Annals of Applied Biology*, 166(1), 18-38.
- Czajkowski, R., Pérombelon, M.C.M., van Veen, J.A. van der Wolf, J.M. (2011). Control of blackleg and tuber soft rot of potato caused by *Pectobacterium* and *Dickeya* species: a review. *Plant Pathology*, 60, 999-1013.
- Dardanelli, M.S., Manyani, H., González-Barroso, S., Rodríguez-Carvajal, M.A., Gil-Serrano, A.M., Espuny, M.R., Ollero, F.J. (2010). Effect of the presence of the plant growth promoting rhizobacterium (PGPR) *Chryseobacterium balustinum* Aur9 and salt stress in the pattern of flavonoids exuded by soybean roots. *Plant and Soil*, 328(1), 483-493.
- Davis, M.J., Gillaspie, A.G., Vidaver, A.K., Harris, R.W. (1984). *Clavibacter*: a new genus containing some phytopathogenic coryneform bacteria, including *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* sp. nov., subsp. nov. and *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* subsp. nov., pathogens that cause ratoon stunting disease

of sugarcane and Bermudagrass stunting disease. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 34, 107-117.

de Boer, M., Bom, P., Kindt, F., Keurentjes, J.J., van der Sluis, I., Van Loon, L.C., Bakker, P.A. (2003). Control of *Fusarium* wilt of radish by combining *Pseudomonas putida* strains that have different disease-suppressive mechanisms. *Phytopathology*, 93(5), 626-632.

de Boer, S.H., Li, X., Ward, L.J. (2012). *Pectobacterium* spp. associated with bacterial stem rot syndrome of potato in Canada. *Phytopathology*, 102(10), 937-947.

de Boer, S.H., Ward, L.J. (1995). PCR detection of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* associated with potato tissue. *Phytopathology*, 85(8), 854-858.

de Haan, E.G., Dekker-Nooren, T.C., van den Bovenkamp, G.W., Speksnijder, A.G., van der Zouwen, P.S., van der Wolf, J.M. (2008). *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* can cause potato blackleg in temperate climates. *European Journal of Plant Pathology*, 122(4), 561-569.

de Jong, H. (2016). Impact of the potato on society. *American Journal of Potato Research*, 93(5), 415-29.

Denny, T. (2007). Plant pathogenic *Ralstonia* species. In: Plant-associated bacteria Gnanamanickam, S.S. (Ed.), Springer, Dordrecht, Netherland.

Denny, T.P., Hayward, A.C. (2001). *Ralstonia solanacearum*. In: Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria, Schaad, N.W., Jones, J.B., Chun, W. (Eds.), APS Press, St. Paul, USA.

Devaux, A., Goffart, J.P., Petsakos, A., Kromann, P., Gatto, M., Okello, J., Suarez, V., Hareau, G. (2020). Global food security, contributions from sustainable potato agri-food systems. In: The Potato Crop, Campos, H., Ortiz, O. (Eds.), Springer, Cham, Switzerland.

Dimkić, I., Berić, T., Stević, T., Pavlović, S., Šavikin, K., Fira, D., Stanković, S. (2015). Additive and synergistic effects of *Bacillus* spp. isolates and essential oils on the control of phytopathogenic and saprophytic fungi from medicinal plants and marigold seeds. *Biological Control*, 87, 6-13.

Dimkić, I., Stanković, S., Nišavić, M., Petković, M., Ristivojević, P., Fira, D., Berić, T. (2017). The profile and antimicrobial activity of *Bacillus lipopeptide* extracts of five potential biocontrol strains. *Frontiers in Microbiology*, 8, 925.

Dimkić, I., Živković, S., Berić, T., Ivanović, Ž., Gavrilović, V., Stanković, S., Fira, D. (2013). Characterization and evaluation of two *Bacillus* strains, SS-12.6 and SS-13.1, as potential agents for the control of phytopathogenic bacteria and fungi. *Biological Control*, 65(3), 312-321.

Ding, C., Shen, Q., Zhang, R., Chen, W. (2013). Evaluation of rhizosphere bacteria and derived bio-organic fertilizers as potential biocontrol agents against bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*) of potato. *Plant and Soil*, 366(1), 453-466.

Donoso, A., Valenzuela, S. (2018). In-field molecular diagnosis of plant pathogens: recent trends and future perspectives. *Plant Pathology*, 67(7), 1451-1461.

Duarte, V., De Boer, S.H., Ward, L.D., De Oliveira, A.M.R. (2004). Characterization of atypical *Erwinia carotovora* strains causing blackleg of potato in Brazil. *Journal of Applied Microbiology*, 96(3), 535-545.

Dye, D.W. (1968). A taxonomic study of the genus *Erwinia*. 1. The „*Amylovora*“ group. *New Zealand Journal of Science*, 11, 590-607.

- EFSA (European Food Safety Authority) Panel on Plant Health, Bragard, C., Dehnen-Schmutz, K., Di Serio, F., Gonthier, P., Jaques Miret, J.A., Jacques, M.A. (2019a). Pest categorisation of the *Ralstonia solanacearum* species complex. EFSA Journal, 17(2), e05618.
- EFSA, Schenk, M., Camilleri, M., Diakaki, M., Vos, S. (2019b). Pest survey card on *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. EFSA Supporting Publication, EN1569.
- Elphinstone, J.G. (1996). Survival and possibilities for extinction of *Pseudomonas solanacearum* (Smith) in cool climates. Potato Research, 39, 403-410.
- Elphinstone, J.G. (2005). The current bacterial wilt situation: a global overview. In: Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex, Allen, C., Prior, P., Hayward, A.C. (Eds.), APS Press, St. Paul, USA.
- EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization) (2004). EPPO Standards PM 7/21. Diagnostic protocols for regulated pests: *Ralstonia solanacearum*. EPPO Bulletin, 34, 173-178.
- EPPO (2012). EPPO Global Data base. <https://gd.eppo.int/taxon/RALSSO/distribution/DE>.
- EPPO (2018). PM 7/21 (2) *Ralstonia solanacearum*, *R. pseudosolanacearum* and *R. syzygii* (*Ralstonia solanacearum* species complex). EPPO Bulletin, 48 (1), 32–63.
- EPPO (2019). EPPO Global Data base. <https://gd.eppo.int/taxon/RALSSO/distribution/NL>.
- EPPO (2021). EPPO Global Data base. <https://gd.eppo.int/taxon/RALSSO/distribution/BE>.
- EPPO (2022). EPPO Global Data base. <https://gd.eppo.int/taxon/RALSSO/distribution>.
- Etminani, F., Harighi, B. (2018). Isolation and identification of endophytic bacteria with plant growth promoting activity and biocontrol potential from wild pistachio trees. The Plant Pathology Journal, 34(3), 208.
- EU Commission Directive (2006). Commission Directive 2006/63/CE of 14 July 2006 amending Annexes II to VII to Council Directive 98/57/EC on the control of *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.* Official Journal of the European Communities, 50, 1-106.
- FAO (Food and Agriculture Organization) (2008). International year of the potato 2008. <http://www.fao.org/potato-2008/en/index.html>.
- FAOSTAT (2013). Food balance sheet. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/FBS>.
- FAOSTAT (2020). Crops and livestock products sheet. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>.
- Fegan, M., Hayward, A.C. (2014). *Ralstonia solanacearum* Race 3, Biovar 2. In: Manual of security sensitive microbes and toxins, Liu, D. (Ed.), CRC Press, Boca Raton, USA.
- Fegan, M., Prior, P. (2005). How complex is the *Ralstonia solanacearum* species complex. In: Bacterial Wilt Disease and the *Ralstonia solanacearum* Species Complex, Allen, C., Prior, P., Hayward, A.C. (Eds.), APS Press, St. Paul, USA.
- Fiers, M., Edel-Hermann, V., Chatot, C., Le Hingrat, Y., Alabouvette, C., Steinberg, C. (2012). Potato soil-borne diseases. A review. Agronomy for Sustainable Development, 32(1), 93-132.
- Földes, T., Banhegyi, I., Herpai, Z., Varga, L., Szigeti, J. (2000). Isolation of *Bacillus* strains from the rhizosphere of cereals and in vitro screening for antagonism against phytopathogenic, food-borne pathogenic and spoilage micro-organisms. Journal of Applied Microbiology, 89(5), 840-846.
- Fravel, D.R. (2005). Commercialization and implementation of biocontrol. Annual Review of Phytopathology, 43, 337-359.

- Freschi, C.R., Carvalho, L.F.D.O., Oliveira, C.J.B.D. (2005). Comparison of DNA-extraction methods and selective enrichment broths on the detection of *Salmonella Typhimurium* in swine feces by polymerase chain reaction (PCR). *Brazilian Journal of Microbiology*, 36, 363-367.
- Garcia, R.O., Kerns, J.P., Thiessen, L. (2019). *Ralstonia solanacearum* species complex: a quick diagnostic guide. *Plant Health Progress*, 20(1), 7-13.
- Genin, S., Boucher, C. (2004). Lessons learned from the genome analysis of *Ralstonia solanacearum*. *Annual Review of Phytopathology*, 42, 107-134.
- Gerayeli, N., Baghaee-Ravari, S., Tarighi, S. (2018). Evaluation of the antagonistic potential of *Bacillus* strains against *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* and their role in the induction of resistance to potato soft rot infection. *European Journal of Plant Pathology*, 150(4), 1049-1063.
- Goffart, J.P., Haverkort, A., Storey, M., Haase, N., Martin, M., Lebrun, P., Ryckmans, D., Florins, D., Demeulemeester, K. (2022). Potato Production in Northwestern Europe (Germany, France, the Netherlands, United Kingdom, Belgium). Characteristics, Issues, Challenges and Opportunities. *Potato Research*, 1-45.
- Gracia-Garza, J.A., Allen, W., Blom, T.J., Brown, W. (2002). Pre-and post-plant applications of copper-based compounds to control *Erwinia* soft rot of calla lilies. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 24(3), 274-280.
- Guchi, E. (2015). Disease management practice on potato (*Solanum tuberosum* L.) in Ethiopia. *World Journal of Agricultural Research*, 3(1), 34-42.
- Guetsky, R., Shtienberg, D., Elad, Y., Fischer, E., Dinooor, A. (2002). Improving biological control by combining biocontrol agents each with several mechanisms of disease suppression. *Phytopathology*, 92(9), 976-985.
- Gutarra, L., Herrera, J., Fernandez, E., Kreuze, J., Lindqvist-Kreuze, H. (2017). Diversity, pathogenicity, and current occurrence of bacterial wilt bacterium *Ralstonia solanacearum* in Peru. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1221.
- Hadizadeh, I., Peivastegan, B., Hannukkala, A., Van der Wolf, J.M., Nissinen, R., Pirhonen, M. (2019). Biological control of potato soft rot caused by *Dickeya solani* and the survival of bacterial antagonists under cold storage conditions. *Plant Pathology*, 68(2), 297-311.
- Ham, J.H., Cui, Y., Alfano, J.R., Rodriguez-Palenzuela, P., Rojas, C.M., Chatterjee, A.K., Collmer, A. (2004). Analysis of *Erwinia chrysanthemi* EC16 *peIE* :: *uidA*, *peII* :: *uidA*, and *hrpN* :: *uidA* mutants reveals strain-specific atypical regulation of the Hrp type III secretion system. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 17, 184-194.
- Hanage, W.P., Spratt, B.G., Turner, K.M.E., Fraser, C. (2006). Modelling bacterial speciation, *Philosophical Transactions of the Royal Society B. Biological Sciences*, 361, 2039-2044.
- Harris, L.J., Daeschel, M.A., Stiles, M.E., Klaenhammer, T.R. (1989). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 52(6), 384-387.
- Hauben, L., Moore, E.R.B., Vauterin, L., Steenackers, M., Mergaert, J., Verdonck, L., Swings, J. (1998). Phylogenetic position of phytopathogens within the *Enterobacteriaceae*. *Systematic and Applied Microbiology*, 21(3), 384-397.
- Helepciuc, F.E., Todor, A. (2022). EU microbial pest control: A revolution in waiting. *Pest Management Science*, 78(4), 1314-1325.

- Ho, T.H., Chuang, C.Y., Zheng, J.L., Chen, H.H., Liang, Y.S., Huang, T.P., Lin, Y.H. (2020). *Bacillus amyloliquefaciens* strain PMB05 intensifies plant immune responses to confer resistance against bacterial wilt of tomato. *Phytopathology*, 110(12), 1877-1885.
- Huang, Y., Liu, C., Wang, H., Guan, T., Liu, L., Yu, S. (2019). Bioinformatic analysis of the complete genome sequence of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* BZA12 and candidate effector screening. *Journal of Plant Pathology*, 101(1), 39-49.
- Hugh, R., Leifson, E. (1953). The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram-negative rods. *Journal of Bacteriology*, 66, 24-26.
- Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Brochier-Armanet, C., Flandrois, J.P., Reverchon, S. (2020). *Dickeya poaceiphila* sp. nov., a plant-pathogenic bacterium isolated from sugar cane (*Saccharum officinarum*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70, 4508-4514.
- Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Jacot-des-Combes, C., Briolay, J. (2019). *Dickeya lacustris* sp. nov., a water-living pectinolytic bacterium isolated from lakes in France. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 69, 721-726.
- Huson, D.H., Bryant, D. (2006). Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Molecular Biology and Evolution*, 23, 254-267.
- Innerebner, G., Knief, C., Vorholt, J.A. (2011). Protection of *Arabidopsis thaliana* against leaf-pathogenic *Pseudomonas syringae* by *Sphingomonas* strains in a controlled model system. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(10), 3202-3210.
- Janse, J.D. (1996). Potato brown rot in western Europe-history, present occurrence and some remarks on possible origin, epidemiology and control strategies. *Bulletin OEPP*, 26(3/4), 679-695, 109.
- Janse, J.D. (2012). Review on brown rot (*Ralstonia solanacearum* race 3, biovar 2, phylotype IIB) epidemiology and control in the Netherlands since 1995: a success story of integrated pest management. *Journal of Plant Pathology*, 257-272.
- Janse, J.D., Araluppan, F.A.X., Schans, J., Wenneker, M., Westerhuis, W. (1998). Experiences with bacterial brown rot *Ralstonia solanacearum* biovar 2, race 3 in the Netherlands. In: *Bacterial Wilt Disease*, Prior, P., Allen, C., Elphinstone, J. (Eds.), Springer, Berlin, Heidelberg.
- Jansky, S., Navarre, R., Bamberg, J. (2019). Introduction to the special issue on the nutritional value of potato. *American Journal of Potato Research*, 96, 95-97.
- Janjatović, S. (2015). Bakteriološke karakteristike *Ralstonia solanacearum* prouzrokača uvelosti i mrke truleži krompira, Master rad, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.
- Jess, S., Kildea, S., Moody, A., Rennick, G., Murchie, A.K., Cooke, L.R. (2014). European Union policy on pesticides: implications for agriculture in Ireland. *Pest Management Science*, 70(11), 1646-1654.
- Jiang, G., Wei, Z., Xu, J., Chen, H., Zhang, Y., She, X., Macho, A.P., Ding, W., Liao, B. (2017). Bacterial wilt in China: History, current status, and future perspectives. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1549.
- Jones, A.L. (1971). Bacterial canker of sweet cherry in Michigan. *Plant Disease Reporter*, 55 (11), 961-965.
- Jonkheer, E.M., Brankovics, B., Houwers, I.M., van der Wolf, J.M., Bonants, P.J., Vreeburg, R.A., van der Lee, T.A. (2021). The *Pectobacterium* pangenome, with a focus on *Pectobacterium*

- brasilense*, shows a robust core and extensive exchange of genes from a shared gene pool. BMC genomics, 22(1), 1-18.
- Jovanović, Z., Stikić, R., Bročić, Z., Oljača, J. (2012). Climate change: challenge for potato production in South-East Europe. Potatoes: production, consumption and health benefits. Claudio Caprara, Nova Science, University of Bologna, Italy, 37-66.
- Kang, Y., Liu, H., Genin, S., Schell, M.A., Denny, T.P. (2002). *Ralstonia solanacearum* requires type 4 pili to adhere to multiple surfaces and for natural transformation and virulence. Molecular Microbiology, 46, 427-437.
- Kannan, R., Solaimalai, A., Jayakumar, M., Surendran, U. (2022). Advance molecular tools to detect plant pathogens. In: Biopesticides, Rakshit, A., Meena, S.V., Kumar S. (Eds.), Woodhead Publishing, Cambridge, UK.
- Karim, Z., Hossain, M.S. (2018). Management of bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*) of potato: focus on natural bioactive compounds. Journal of Biodiversity Conservation and Bioresource Management, 4(1), 73-92.
- Kettani-Halabi, M., Terta, M., Amdan, M., El Fahime, E.M., Bouteau, F., Ennaji, M.M. (2013). An easy, simple inexpensive test for the specific detection of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* based on sequence analysis of the *pmrA* gene. BMC microbiology, 13(1), 1-8.
- Khan, A., Singh, P., Srivastava, A. (2018). Synthesis, nature and utility of universal iron chelator-siderophore: A review. Microbiological Research, 212, 103-111.
- Khayri, S., Cigna, J., Chong, T.M., Quêtu-Laurent, A., Chan, K.G., Hélias, V., Faure, D. (2016). Transfer of the potato plant isolates of *Pectobacterium wasabiae* to *Pectobacterium parmentieri* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 66(12), 5379-5383.
- Kheirandish, Z., Harighi, B. (2015). Evaluation of bacterial antagonists of *Ralstonia solanacearum*, causal agent of bacterial wilt of potato. Biological Control, 86, 14-19.
- Kim, H.S., Ma, B., Perna, N.T., Charkowski, A.O. (2009). Prevalence and virulence of natural type III secretion system deficient *Pectobacterium* strains. Applied and Environmental Microbiology, 75, 4539-4549.
- Klement, Z., Rudolph, K., Sands, D.C. (1990). Methods in Phytobacteriology, Academiai Kiado, Budapest, Hungary.
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., Glöckner, F.O. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. Nucleic Acids Research, 41, e1.
- Kõiv, V., Roosaare, M., Vedler, E., Ann Kivistik, P., Toppi, K., Schryer, D.W., Mäe, A. (2015). Microbial population dynamics in response to *Pectobacterium atrosepticum* infection in potato tubers. Scientific Reports, 5(1), 1-18.
- Kostic, M., Stankovic, S., Kuzevski, J. (2016). Role of AChE in Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say) resistance to carbamates and organophosphates. Insecticides Resistance, 19-40.
- Krimi, Z., Alim, D., Djellout, H., Tafifet, L., Mohamed-Mahmoud, F., Raio, A. (2016). Bacterial endophytes of weeds are effective biocontrol agents of *Agrobacterium* spp., *Pectobacterium* spp., and promote growth of tomato plants. Phytopathologia Mediterranea, 184-196.

- Kubheka, G.C., Coutinho, T.A., Moleleki, N., Moleleki, L.N. (2013). Colonization patterns of an mCherry-tagged *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* strain in potato plants. *Phytopathology*, 103(12), 1268-1279.
- Kuiper, I., Legendijk, E.L., Pickford, R., Derrick, J.P., Lamers, G.E., Thomas-Oates, J.E., Lugtenberg, B.J.J., Bloemberg, G.V. (2004). Characterization of two *Pseudomonas putida* lipopeptide biosurfactants, putisolvin I and II, which inhibit biofilm formation and break down existing biofilms. *Molecular Microbiology*, 51(1), 97-113.
- 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(6), 1547.
- Lê, S., Josse, J., Husson, F. (2008). FactoMineR: an R package for multivariate analysis. *Journal of Statistical Software*, 25, 1-18.
- Legendre, P., Anderson, M.J. (1999). Distance-based redundancy analysis: testing multispecies responses in multifactorial ecological experiments. *Ecological Monographs*, 69, 1-24.
- Leigh, J.W., Bryant, D. (2015). POPART: full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution*, 6(9), 1110-1116.
- Lelliott, R.A., Stead, D.E. (1987). *Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants*, Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK.
- Li, F., Chen, L., Zhang, J., Yin, J., Huang, S. (2017). Bacterial community structure after long-term organic and inorganic fertilization reveals important associations between soil nutrients and specific taxa involved in nutrient transformations. *Frontiers in Microbiology*, 8, 187.
- Li, X., Ma, Y., Liang, S., Tian, Y., Yin, S., Xie, S., Xie, H. (2018). Comparative genomics of 84 *Pectobacterium* genomes reveals the variations related to a pathogenic lifestyle. *BMC genomics*, 19(1), 1-22.
- Liu, H., Carvalhais, L.C., Crawford, M., Singh, E., Dennis, P.G., Pieterse, C.M., Schenk, P.M. (2017). Inner plant values: diversity, colonization and benefits from endophytic bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2552.
- Liu, H.L., Kang, Y.W., Genin, S., Schell, M.A., Denny, T.P. (2001). Twitching motility of *Ralstonia solanacearum* requires a type IV pilus system. *Microbiology*, 147, 3215-3229.
- Loc, M., Milošević, D., Ivanović, Ž., Ignjatov, M., Budakov, D., Grahovac, J., Grahovac, M. (2022). Genetic Diversity of *Pectobacterium* spp. on Potato in Serbia. *Microorganisms*, 10(9), 1840.
- Lowe-Power, T.M., Khokhani, D., Allen, C. (2018). How *Ralstonia solanacearum* Exploits and Thrives in the Flowing Plant Xylem Environment. *Trends in Microbiology*, 26, 929-942.
- Ma, B., Hibbing, M.E., Kim, H.S., Reedy, R.M., Yedidia, I., Breuer, J., Breuer, J., Glasner, J., Perna, N., Kelman, A., Charkowski, A.O. (2007). Host range and molecular phylogenies of the soft rot enterobacterial genera *Pectobacterium* and *Dickeya*. *Phytopathology*, 97(9), 1150-1163.
- Maiden, M.C. (2006). Multilocus sequence typing of bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 60, 561-588.
- Malko, A., Frantsuzov, P., Nikitin, M., Statsyuk, N., Dzhavakhiya, V., Golikov, A. (2019). Potato pathogens in Russia's regions: an instrumental survey with the use of real-time PCR/RT-PCR in matrix format. *Pathogens*, 8(1), 18.

- Mansfield, J., Genin, S., Magori, S., Citovsky, V., Sriariyanum, M., Ronald, P., Dow, M., Verdier, V., Beer, S., Machado M., Toth, J., Salmond G., Gary, F. (2012). Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13, 614-629.
- Marković, S., Milić Komić, S., Jelušić, A., Iličić, R., Bagi, F., Stanković, S., Popović, T. (2022a). First report of *Pectobacterium versatile* causing blackleg of potato in Serbia. *Plant Disease*, 106(1), 312.
- Marković, S., Popović, T., Berić, T., Dimkić, I., Jelušić, A., Iličić, R., Stanković, S. (2022b). Metabarcoding approach for evaluation of bacterial diversity in soft rotting potato tubers and corresponding geocaulospheres. *Potato Research*, doi.org/10.1007/s11540-022-09601-9.
- Marković, S., Stanković, S., Iličić, R., Veljović Jovanović, S., Milić Komić, S., Jelušić, A., Popović, T. (2021a). *Ralstonia solanacearum* as a potato pathogen in Serbia: Characterization of strains and influence on peroxidase activity in tubers. *Plant Pathology*, 70(8), 1945-1959.
- Marković, S., Stanković, S., Jelušić, A., Iličić, R., Kosovac, A., Poštić, D., Popović, T. (2021b). Occurrence and identification of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* and *Dickeya dianthicola* causing blackleg in some potato fields in Serbia. *Plant Disease*, 105(4), 1080-1090.
- Marquez-Villavicencio, M.D.P., Groves, R.L., Charkowski, A.O. (2011). Soft rot disease severity is affected by potato physiology and *Pectobacterium* taxa. *Plant Disease*, 95(3), 232-241.
- Mashiane, R.A., Ezeokoli, O.T., Adeleke, R.A., Bezuidenhout, C.C. (2017). Metagenomic analyses of bacterial endophytes associated with the phyllosphere of a Bt maize cultivar and its isogenic parental line from South Africa. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33, 80.
- Matović, G., Bročić, Z., Djuričin, S., Gregorić, E., Bodroža, D. (2016). Profitability assessment of potato production applying different irrigation methods. *Irrigation and drainage*, 65(4), 502-513.
- Mazzola, M., Freilich, S. (2017). Prospects for biological soilborne disease control: Application of indigenous versus synthetic microbiomes. *Phytopathology*, 107, 256-263.
- McKinney, H.H. (1923). Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. *Journal of Agricultural Research*, 26, 195.
- Milijašević-Marčić, S., Todorović, B., Potočnik, I., Rekanović, E., Stepanović, M., Mitrović, J., Duduk, B. (2013). *Ralstonia solanacearum*-a New Threat to Potato Production in Serbia. *Pesticides and Phytomedicine*, 28(4), 229-237.
- Moh, A.A., Massart, S., Jijakli, M.H., Lepoivre, P. (2012). Models to predict the combined effects of temperature and relative humidity on *Pectobacterium atrosepticum* and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* population density and soft rot disease development at the surface of wounded potato tubers. *Journal of Plant Pathology*, 181-191.
- Moleleki, L.N., Onkendi, E.M., Mongae, A., Kubheka, G.C. (2013). Characterisation of *Pectobacterium wasabiae* causing blackleg and soft rot diseases in South Africa. *European Journal of Plant Pathology*, 135(2), 279-288.
- Moleleki, L.N., Pretorius, R.G., Tanui, C.K., Mosina, G., Theron, J. (2017). A quorum sensing-defective mutant of *Pectobacterium carotovorum* ssp. *brasiliense* 1692 is attenuated in virulence and unable to occlude xylem tissue of susceptible potato plant stems. *Molecular Plant Pathology*, 18(1), 32-44.



- Mora, V., Ramasamy, M., Damaj, M.B., Irigoyen, S., Ancona, V., Ibanez, F., Avila, C., Mandadi, K.K. (2021). Potato Zebra Chip: An Overview of the Disease. Control Strategies, and Prospects. *Frontiers in Microbiology*, 2064.
- Moretti, C., Fakhr, R., Cortese, C., De Vos, P., Cerri, M., Geagea, L., Cleenwerck, I., Buonauro, R. (2016). *Pectobacterium aroidearum* and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* as causal agents of potato soft rot in Lebanon. *European Journal of Plant Pathology*, 144(1), 205-211.
- Mori, Y., Inoue, K., Ikeda, K., Nakayashiki, H., Higashimoto, C., Ohnishi, K., Hikichi, Y. (2016). The vascular plant-pathogenic bacterium *Ralstonia solanacearum* produces biofilms required for its virulence on the surfaces of tomato cells adjacent to intercellular spaces. *Molecular Plant Pathology*, 17(6), 890-902.
- Nabhan, S., De Boer, S.H., Maiss, E., Wydra, K. (2012a). Taxonomic relatedness between *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *odoriferum* and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* subsp. nov. *Journal of Applied Microbiology*, 113, 904-913.
- Nabhan, S., de Boer, S.H., Maiss, E., Wydra, K. (2013). *Pectobacterium aroidearum* sp. nov., a soft rot pathogen with preference for monocotyledonous plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63, 2520-2525.
- Nabhan, S., Wydra, K., Linde, M., Debener, T. (2012b). The use of two complementary DNA assays, AFLP and MLSA, for epidemic and phylogenetic studies of pectolytic enterobacterial strains with focus on the heterogeneous species *Pectobacterium carotovorum*. *Plant pathology*, 61(3), 498-508.
- Nakayama, T., Yasuoka, S., Ozawa, T., Aono, Y., Ushio, Y., Fujimoto, T., Maoka, T. (2021). Genetic diversity of potato blackleg pathogens, *Pectobacterium wasabiae*, *P. carotovorum* subsp. *brasiliense* and *Dickeya dianthicola* in Japan by rep-PCR fingerprinting. *European Journal of Plant Pathology*, 159(4), 917-939.
- Nassar, A., Darrasse, A., Lemattre, M., Kotoujansky, A., Dervin, C., Vedel, R., Bertheau, Y. (1996). Characterization of *Erwinia chrysanthemi* by pectinolytic isozyme polymorphism and restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified fragments of pel genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(7), 2228-2235.
- Navarre, D.A., Brown, C.R., Sathuvalli, V.R. (2019). Potato vitamins, minerals and phytonutrients from a plant biology perspective. *American Journal of Potato Research*, 96, 111-126.
- Nelson, W.R., Fisher, T.W., Munyaneza, J.E. (2011). Haplotypes of ‘*Candidatus* Liberibacter solanacearum’ suggest long-standing separation. *European Journal of Plant Pathology*, 130(1), 5-12.
- Ngadze, E., Brady, C.L., Coutinho, T.A., van der Waals, J.E. (2012). Pectinolytic bacteria associated with potato soft rot and blackleg in South Africa and Zimbabwe. *European Journal of Plant Pathology*, 134(3), 533-549.
- Nikolić, I., Berić, T., Dimkić, I., Popović, T., Lozo, J., Fira, D., Stanković, S. (2019). Biological control of *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* on sugar beet with *Bacillus pumilus* SS-10.7 and *Bacillus amyloliquefaciens* (SS-12.6 and SS-38.4) strains. *Journal of Applied Microbiology*, 126(1), 165-176.
- Nion, Y.A., Toyota, K. (2015). Recent trends in control methods for bacterial wilt diseases caused by *Ralstonia solanacearum*. *Microbes and Environments*, ME14144.
- Nykyri, J., Niemi, O., Koskinen, P., Nokso-Koivisto, J., Pasanen, M., Broberg, M., Plyusnin, I., Toronen, P., Holm, L., Pirhonen, M., Palva E.T. (2012). Revised phylogeny and novel horizontally

- acquired virulence determinants of the model soft rot phytopathogen *Pectobacterium wasabiae* SCC3193. PLoS Pathogens, 8, e1003013.
- Obradović, A. (1996). Pathogenic and biochemical-physiological characteristics bacteria “*Erwinia carotovora*” group pathogen of potato. Zaštita bilja, 215, 57-70.
- Oerke, E.C. (2006). Crop losses to pests. The Journal of Agricultural Science, 144(1), 31-43.
- Oliver, J.D. (2005). The viable but nonculturable state in bacteria. Journal of Microbiology, 43, 93-100.
- Ondov, B.D., Bergman, N.H., Phillippy, A.M. (2011). Interactive metagenomic visualization in a Web browser. BMC bioinformatics, 12(1), 1-10.
- Ongena, M., Jacques, P. (2008). *Bacillus lipopeptides*: versatile weapons for plant disease biocontrol. Trends in Microbiology, 16(3), 115-125.
- Osdaghi, E. (2020). *Ralstonia solanacearum* (bacterial wilt of potato): Invasive Species Compendium. CABI, Wallingford, UK.
- Osdaghi, E., van der Wolf, J.M., Abachi, H., Li, X., De Boer, S.H., Ishimaru, C.A. (2022). Bacterial ring rot of potato caused by *Clavibacter sepedonicus*: A successful example of defeating the enemy under international regulations. Molecular Plant Pathology, 1-22.
- Osei, R., Yang, C., Cui, L., Wei, L., Jin, M., Wei, X. (2021). Antagonistic bioagent mechanisms of controlling potato soft rot. Plant Protection Science, 58(1), 18-30.
- Ou, Y., Penton, C.R., Geisen, S., Shen, Z., Sun, Y., Lv, N., Shen, Q. (2019). Deciphering underlying drivers of disease suppressiveness against pathogenic *Fusarium oxysporum*. Frontiers in Microbiology, 2535.
- Oulghazi, S., Moumni, M., Khayi, S., Robic, K., Sarfraz, S., Lopez-Roques, C., Vandecasteele, C., Faure, D. (2020). Diversity of *Pectobacteriaceae* Species in Potato Growing Regions in Northern Morocco. Microorganisms, 8, 895.
- Oulghazi, S., Pédrón, J., Cigna, J., Lau, Y.Y., Moumni, M., Van Gijsegem, F., Chan, K.G., Faure, D. (2019). *Dickeya undicola* sp. nov., a novel species for pectinolytic isolates from surface waters in Europe and Asia. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 69, 2440-2444.
- Oulghazi, S., Sarfraz, S., Zaczek-Moczydłowska, M.A., Khayi, S., Ed-Dra, A., Lekbach, Y., Faure, D. (2021). *Pectobacterium brasiliense*: Genomics, host range and disease management. Microorganisms, 9(1), 106.
- Oyesola, O.L., Aworunse, O.S., Oniha, M.I., Obiazikwor, O.H., Bello, O., Atolagbe, O.M., Obembe, O.O. (2021). Impact and Management of Diseases of *Solanum tuberosum*. In: *Solanum tuberosum*-a Promising Crop for Starvation Problem, Yildiz, M., Ozgen, Y. (Eds.), Intech Open, Rijeka, Croatia.
- Palacio-Bielsa, A., Cambra, M.A., López, M.M. (2009). PCR detection and identification of plant-pathogenic bacteria: updated review of protocols (1989-2007). Journal of Plant Pathology, 249-297.
- Pan, Z.C., Xu, J.S., Prior, P., Zhang, H., Chen, K.Y., Tian, Q., Zhang, L.Q., Liu, L., He, L.Y., Feng, J. (2013). Development of a specific molecular tool for the detection of epidemiologically active mulberry causing-disease strains of *Ralstonia solanacearum* phylotype I (historically race 5-biovar 5) in China. European Journal of Plant Pathology, 137, 377-391.
- Panda, P., Fiers, M.A.W.J., Armstrong, K., Pitman, A.R. (2012). First report of blackleg and soft rot of potato caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* in New Zealand. New Disease Report, 26, 2044-0588.

- Parkinson, N., Bryant, R., Bew, J., Conyers, C., Stones, R., Alcock, M., Elphinstone, J. (2013). Application of variable-number tandem-repeat typing to discriminate *Ralstonia solanacearum* strains associated with english watercourses and disease outbreaks. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(19), 6016-6022.
- Parkinson, N., De Vos, P., Pirhonen, M., Elphinstone, J. (2014). *Dickeya aquatica* sp. nov., isolated from waterways. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64, 2264-2266.
- Parkinson, N., Pritchard, L., Bryant, R., Toth, I., Elphinstone, J. (2015). Epidemiology of *Dickeya dianthicola* and *Dickeya solani* in ornamental hosts and potato studied using variable number tandem repeat analysis. *European Journal of Plant Pathology*, 141(1), 63-70.
- Pasanen, M., Waleron, M., Schott, T., Cleenwerck, I., Misztak, A., Waleron, K., Pritchard, L., Bakr, R., Degefu, Y., van der Wolf, J., Vandamme, P., Pirhonen, M. (2020). *Pectobacterium parvum* sp. nov., having a Salmonella SPI-1-like type III secretion system and low virulence. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70, 2440-2448.
- Pastrik, K.H., Elphinstone, J.G., Pukall, R. (2001). Sequence analysis and detection of *Ralstonia solanacearum* by multiplex PCR amplification of 16S-23S ribosomal intergenic spacer region with internal positive control. *European Journal of Plant Pathology*, 108, 831-42.
- Pastrik, K.H., Maiss, E. (2000). Detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tubers by polymerase chain reaction. *Journal of Phytopathology*, 148, 619-626.
- Paudel, S., Dobhal, S., Alvarez, A.M., Arif, M. (2020). Taxonomy and phylogenetic research on *Ralstonia solanacearum* species complex: A complex pathogen with extraordinary economic consequences. *Pathogens*, 9(11), 886.
- Pavel, A.B., Vasile, C.I. (2012). PyElph-a software tool for gel images analysis and phylogenetics. *BMC bioinformatics*, 13(1), 1-6.
- Peiffer, J.A., Spor, A., Koren, O., Jin, Z., Tringe, S.G., Dangl, J.L., Ley, R.E. (2013). Diversity and heritability of the maize rhizosphere microbiome under field conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(16), 6548-6553.
- Pérombelon, M.C.M. (2002). Potato diseases caused by soft rot erwinias: An overview of pathogenesis. *Plant Pathology*, 51, 1-12.
- Popović, T., Marković, S. (2020). Risk of introduction of quarantine organisms: case *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. *Proceedings of the XI International Scientific Agricultural Symposium "Agrosym 2020"*, 541-546.
- Portier, P., Pédrón, J., Taghouti, G., Fischer-Le Saux, M., Caullireau, E., Bertrand, C., Laurent, A., Chawki, K., Oulgazi, S., Moumni, M., Andrivon, D., Dutrieux, C., Faure, D., Hélias, V., Barny, M.A. (2019). Elevation of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *odoriferum* to species level as *Pectobacterium odoriferum* sp. nov., proposal of *Pectobacterium brasiliense* sp. nov. and *Pectobacterium actinidiae* sp. nov., emended description of *Pectobacterium carotovorum*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 69, 3207-3216.
- Posada, D. (2008). jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution*, 25, 1253-1256.
- Posada, D., Crandall, K.A. (2001). Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. *Trends in Ecology and Evolution* 16(1), 37-45.
- Potrykus, M., Golanowska, M., Sledz, W., Zoledowska, S., Motyka, A., Kolodziejska, A., Lojkowska, E. (2016). Biodiversity of *Dickeya* spp. isolated from potato plants and water sources in temperate climate. *Plant Disease*, 100(2), 408-417.

Pradhanang, P.M., Elphinstone, J.G., Fox, R.T.V. (2000). Sensitive detection of *Ralstonia solanacearum* in soil: a comparison of different detection techniques. *Plant Pathology*, 49(4), 414-422.

Prior, P., Ailloud, F., Dalsing, B.L., Remenant, B., Sanchez, B., Allen, C. (2016). Genomic and proteomic evidences supporting the division of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* into three species. *BMC Genomics*, 17, 90.

Prior, P., Fegan, M. (2005). Recent developments in the phylogeny and classification of *Ralstonia solanacearum*. *Acta Horticulturae*, 127-136.

Priou, S., Aley, P., Chujoy, E., Lemaga, B.A., French, E.R., French, E. (1999). Integrated control of bacterial wilt of potato. In CIP Slide Training Series IV-3. International Potato Center, Lima, Peru.

Puri, R.R., Adachi, F., Omichi, M., Saeki, Y., Yamamoto, A., Hayashi, S., Itoh, K. (2019). Metagenomic study of endophytic bacterial community of sweet potato (*Ipomoea batatas*) cultivated in different soil and climatic conditions. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35(11), 1-8.

Puškarić, A. (2007). Stanje i tendencije tržišta krompira u Republici Srbiji. Institut za ekonomiku poljoprivrede, Monografija, Institut za ekonomiku poljoprivrede, Beograd.

Rasche, F., Lueders, T., Schloter, M., Schaefer, S., Buegger, F., Gattinger, A., Sessitsch, A. (2009). DNA-based stable isotope probing enables the identification of active bacterial endophytes in potatoes. *New Phytologist*, 181(4), 802-807.

Rathore, A.S., Gupta, R.D. (2015). Chitinases from bacteria to human: Properties, applications, and future perspectives. *Enzyme Research*, 791907(1-8).

Reinhold-Hurek, B., Hurek, T. (2011). Living inside plants: bacterial endophytes. *Current Opinion in Plant Biology*, 14(4), 435-443.

Repizo, G.D., Espariz, M., Seravalle, J.L., Díaz Miloslavich, J.I., Steimbrüch, B.A., Shuman, H.A., Viale, A.M. (2020). *Acinetobacter baumannii* NCIMB8209: a rare environmental strain displaying extensive insertion sequence-mediated genome remodeling resulting in the loss of exposed cell structures and defensive mechanisms. *Mosphere*, 5(4), e00404-20.

Reverchon, S.G.W.M., Muskhelishvili, G., Nasser, W. (2016). Virulence program of a bacterial plant pathogen: the *Dickeya* model. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 142, 51-92.

Rodrigues, L.M.R., Destefano, S.A.L., Da Silva, M.J., Costa, G.G.L., Maringoni, A.C. (2012). Characterization of *Ralstonia solanacearum* strains from Brazil using molecular methods and pathogenicity tests. *Journal of Plant Pathology*, 94, 505-516.

Romero, D., de Vicente, A., Rakotoaly, R.H., Dufour, S.E., Veening, J.W., Arrebola, E., Pérez-García, A. (2007). The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podosphaera fusca*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20, 430-440.

RSZ (2022). Republički zavod za statistiku. <https://data.stat.gov.rs/Home/Result/130102?languageCode=sr-Cyrl#>

Safni, I., Cleenwerck, I., De Vos, P., Fegan, M., Sly, L., Kappler, U. (2014). Polyphasic taxonomic revision of the *Ralstonia solanacearum* species complex: proposal to emend the descriptions of *Ralstonia solanacearum* and *Ralstonia syzygii* and reclassify current *R. syzygii* strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *syzygii* subsp. nov., *R. solanacearum* phylotype IV strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *indonesiensis* subsp. nov., banana blood disease bacterium strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *celebesensis* subsp. nov. and *R. solanacearum* phylotype I and III strains as *Ralstonia*

- pseudosolanacearum* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 64(Pt\_9), 3087-3103.
- Sahu, P.K., Singh, S., Gupta, A., Singh, U.B., BrahmaPrakash, G.P., Saxena, A.K. (2019). Antagonistic potential of bacterial endophytes and induction of systemic resistance against collar rot pathogen *Sclerotium Rolfsii* in tomato. Biological Control, 137, 104014.
- Samson, R., Legendre, J.B., Christen, R., Fischer-Le Saux, M., Achouak, W., Gardan, L. (2005). Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder, *et al.* 1953) Brenner, *et al.* 1973 and *Brenneria paradisiaca* to the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* comb. nov. and *Dickeya paradisiaca* comb. nov. and delineation of four novel species, *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov., *Dickeya dieffenbachiae* sp. nov. and *Dickeya zea* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 55, 1415-1427.
- Santiago, T.R., Lopes, C.A., Caetano-Anollés, G., Mizubuti, E.S.G. (2017). Phylotype and sequevar variability of *Ralstonia solanacearum* in Brazil, an ancient centre of diversity of the pathogen. Plant Pathology, 66(3), 383-392.
- Sarkar, S., Chaudhuri, S. (2016). Bacterial wilt and its management. Current Science, 1439-1445.
- Schaad, N.W., Jones, J.B., Chun, W. (2001). Laboratory Guide for the Identification of Plant Pathogenic Bacteria, 3rd edition. APS Press, St Paul, MN, USA.
- Schmieder, R., Edwards, R. (2011). Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. Bioinformatics, 27(6), 863-864.
- Seal, S.E., Jackson, L.A., Young, J.P.W., Daniels, M.J. (1993). Differentiation of *Pseudomonas solanacearum*, *Pseudomonas syzygii*, *Pseudomonas pickettii* and the blood disease bacterium by partial 16S rRNA sequencing: construction of oligonucleotide primers for sensitive detection by polymerase chain reaction. Microbiology, 139, 1587-1594.
- Shaffer, W.H. (1975). Procedures for the identifications of bacterial plant pathogens. In: Phytobacteriology, Goodman, R.N. (Ed.), Proceedings of the first workshop on Phytobacteriology (University of Missouri, Columbia, USA), 68-73.
- Sharma, P., Johnson, M.A., Mazloom, R., Allen, C., Heath, L.S., Lowe-Power, T. M., Vinatzer, B. A. (2022). Meta-analysis of the *Ralstonia solanacearum* species complex (RSSC) based on comparative evolutionary genomics and reverse ecology. Microbial Genomics, 8(3).
- Singh, U.B., Malviya, D., Singh, S., Kumar, M., Sahu, P.K., Singh, H.V., Kumar, S., Roy, M., Imran, M., Rai, J.P. (2019). Trichoderma harzianum-and methyl jasmonate-induced resistance to Bipolaris sorokiniana through enhanced phenylpropanoid activities in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). Frontiers in Microbiology, 10, 1697.
- Skelsey, P., Humphris, S.N., Campbell, E.J., Toth, I.K. (2018). Threat of establishment of non-indigenous potato blackleg and tuber soft rot pathogens in Great Britain under climate change. PLoS One, 13, e0205711.
- Sławiak, M., van Beckhoven, J.R., Speksnijder, A.G., Czajkowski, R., Grabe, G., van der Wolf, J.M. (2009). Biochemical and genetical analysis reveal a new clade of biovar 3 *Dickeya* spp. strains isolated from potato in Europe. European Journal of Plant Pathology, 125(2), 245-261.
- Službeni glasnik RS (2008). Pravilnik o utvrđivanju lista karantinski štetnih organizama, Službeni glasnik Republike Srbije br. 11/2008. [http://demo.paragraf.rs/demo/combined/Old/t/t2008\\_02/t02\\_0003.htm](http://demo.paragraf.rs/demo/combined/Old/t/t2008_02/t02_0003.htm)

Službeni glasnik RS (2011). Naredba o određivanju granica zaraženog i ugroženog područja štetnim organizmom *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.* i merama koje se preduzimaju u slučaju njegove pojave: 32/2011-23. <https://www.pravno-informacioni-sistem.rs/SlGlasnikPortal/eli/rep/sgrs/ministarstva/naredba/2011/32/1>

Službeni glasnik RS (2019) Pravilnik o utvrđivanju programa mera zaštite zdravlja bilja za 2019. godinu, Službeni glasnik Republike Srbije br. 32/2019 [http://demo.paragraf.rs/demo/combined/Old/t/2019\\_05/t05\\_0041.htm](http://demo.paragraf.rs/demo/combined/Old/t/2019_05/t05_0041.htm)

Spooner, D.M., Nunez, J., Rodriguez, F., Naik, P.S., Ghislain, M. (2005). Nuclear and chloroplast DNA reassessment of the origin of Indian potato varieties and its implications for the origin of the early European potato. *Theoretical and Applied Genetics*, 110(6), 1020-1026.

Stanković, S., Mihajlović, S., Draganić, V., Dimkić, I., Vukotić, G., Berić, T., Fira, Đ. (2012). Screening for the presence of biosynthetic genes for antimicrobial lipopeptides in natural isolates of *Bacillus* sp. *Archives of Biological Sciences*, 64(4), 1425-1432.

Stepanović, S., Ćirković, I., Mijač, V., Švabić-Vlahović, M. (2003). Influence of the incubation temperature, atmosphere and dynamic conditions on biofilm formation by *Salmonella* spp. *Food Microbiology*, 20(3), 339-343.

Tan, S., Yang, C., Mei, X., Shen, S., Raza, W., Shen, Q., Xu, Y. (2013). The effect of organic acids from tomato root exudates on rhizosphere colonization of *Bacillus amyloliquefaciens* T-5. *Applied Soil Ecology*, 64, 15-22.

Tans-Kersten, J., Huang, H.Y., Allen, C. (2001). *Ralstonia solanacearum* needs motility for invasive virulence on tomato. *Journal of Bacteriology*, 183, 3597-3605.

Tanui, C.K., Shyntum, D.Y., Priem, S.L., Theron, J., Moleleki, L.N. (2017). Influence of the ferric uptake regulator (Fur) protein on pathogenicity in *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense*. *PloS one*, 12(5), e0177647.

Teulon, D.A.J., Workman, P.J., Nielsen, M.C., Thomas, K.L., Anderson, D.P. (2009). *Bactericera cockerelli*: incursion, dispersal and current distribution on vegetable crops in New Zealand. *New Zealand Plant Protection*, 62, 136-144.

Thomas-Sharma, S., Abdurahman, A., Ali, S., Andrade-Piedra, J.L., Bao, S., Charkowski, A.O., Forbes, G.A. (2016). Seed degeneration in potato: the need for an integrated seed health strategy to mitigate the problem in developing countries. *Plant Pathology*, 65(1), 3-16.

Thornley, M.J. (1960). The differentiation of *Pseudomonas* from other gram negative bacteria on the basis of arginine metabolism. *Journal of Applied Bacteriology*, 1, 37-52.

Tian, J., Chen, J., Ye, X., Chen, S. (2016a). Health benefits of the potato affected by domestic cooking: A review. *Food Chemistry*, 202, 165-175.

Tian, Y., Zhao, Y., Yuan, X., Yi, J., Fan, J., Xu, Z., Hu, B., De Boer, S.H., Li, X. (2016b). *Dickeya fangzhongdai* sp. nov., a plant-pathogenic bacterium isolated from pear trees (*Pyrus pyrifolia*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66, 2831-2835.

Timms-Wilson, T.M., Bryant, K., Bailey, M.J. (2001). Strain characterization and 16S-23S probe development for differentiating geographically dispersed isolates of the phytopathogen *Ralstonia solanacearum*. *Environmental Microbiology* 3, 785-797.

Toth, I.K., Barny, M.A., Brurberg, M.B., Condemine, G., Czajkowski, R., Elphinstone, J.G., Yedidia, I. (2021). *Pectobacterium* and *Dickeya*: environment to disease development. In: *Plant Diseases*

- Caused by *Dickeya* and *Pectobacterium* Species, Gijsegem, F.V., van der Wolf, J.M., Toth J.K. (Eds.), Springer, Cham, Switzerland.
- Toth, I.K., Bell, K.S., Holeva, M.C., Birch, P.R. (2003) Soft rot *erwiniae*: From genes to genomes. *Molecular Plant Pathology*, 4, 17-30.
- Toth, I.K., van der Wolf, J.M., Saddler, G., Lojkowska, E., Hélias, V., Pirhonen, M., Tsror (Lahkim), L., Elphinstone, J.G. (2011). *Dickeya* species: an emerging problem for potato production in Europe. *Plant Pathology*, 60(3),385-399.
- Trkulja, V., Mitrović, P., Mihić Salapura, J., Iličić, R., Čurković, B., Đalović, I., Popović, T. (2021). First report of ‘*Candidatus* *Liberibacter solanacearum*’ on carrot in Serbia. *Plant Disease*, 105(4), 1188.
- Tsror, L., Erlich, O., Lebiush, S., Hazanovsky, M., Zig, U., Slawiak, M., Grabe, G., van der Wolf J.M., van de Haar, J.J. (2009). Assessment of recent outbreaks of *Dickeya* sp.(syn. *Erwinia chrysanthemi*) slow wilt in potato crops in Israel. *European Journal of Plant Pathology*, 123(3), 311-320.
- Tsror, L., Hélias, V., Mordechai-Lebiush, S., Erlich, O., Hazanovsky, M., Chalupowicz, L., Manulis-Sasson, S. (2021). Characterization of *Pectobacterium brasiliense* strains from potato and vegetables in Israel. *Plant Pathology*, 70(9), 2179-2187.
- Vacheron, J., Desbrosses, G., Bouffaud, M.L., Touraine, B., Moëgne-Loccoz, Y., Muller, D., Legendre, L., Wisniewski-Dyé, F., Prigent-Combaret, C. (2013). Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Frontiers in Plant Science*, 4, 356.
- van der Merwe, J.J., Coutinho, T.A., Korsten, L., van der Waals, J.E. (2010). *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* causing blackleg on potatoes in South Africa. *European Journal of Plant Pathology*, 126(2), 175-185.
- van der Wolf, J.M., Elphinstone, J.G., Stead, D.E., Metzler, M., Müller, P., Hukkanen, A., Karjalainen, R. (2005). Epidemiology of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in relation to control of bacterial ring rot. *PRI Bioscience*, 95.
- van der Wolf, J.M. (2018). Shifting populations of blackleg causing organisms: Significance and possible control strategies. *Phytopathology*, 108, 281-281.
- van der Wolf, J.M., Bonants, P.J.M., Smith, J.J., Hagenaar, M., Nijhuis, E., Van Beckhoven, J.R.C.M., Feuillade, R. (1998). Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* race 3 in Western Europe determined by AFLP, RC-PFGE and Rep-PCR. In *Bacterial Wilt Disease: Molecular and Ecological Aspects*, Prior, P., Allen, C., Elphinstone J. (Eds.), Springer, Berlin, Heidelberg.
- van der Wolf, J.M., de Haan, E.G., Kastelein, P., Krijger, M., de Haas, B.H., Velvis, H., Mendes, O., Kooman Gersmann, M., van der Zouwen, P.S. (2017). Virulence of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* on potato compared with that of other *Pectobacterium* and *Dickeya* species under climatic conditions prevailing in the Netherlands. *Plant Pathology*, 66(4), 571-583.
- van der Wolf, J.V., Speksnijder, A., Velvis, H., Haar, J.V., Doorn, J.V. (2007). Why is *Erwinia chrysanthemi* (*Dickeya* sp.) taking over? The ecology of a blackleg pathogen. In *New and old pathogens of potato in changing climate: Proceedings of the EAPR Pathology Section seminar*, 142:32.
- van Elsas, J.D., Kastelein, P., de Vries, P.M., van Overbeek, L.S. (2001). Effects of ecological factors on the survival and physiology of *Ralstonia solanacearum* bv. 2 in irrigation water. *Canadian Journal of Microbiology*, 47, 842-854.

- van Elsas, J.D., van Overbeek, L.S., Bailey, M.J., Schönfeld, J., Smalla, K. (2005). Fate of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 as affected by conditions and soil treatments in temperate climate zones. In: Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex, Allen, C., Prior, P., Hayward, A.C. (Eds.), APS Press, St. Paul, USA.
- Vasinauskiene, M., Radusiene, J., Zitikaite, I., Surviliene, E. (2006). Antibacterial activities of essential oils from aromatic and medicinal plants against growth of phytopathogenic bacteria. *Agronomy Research*, 4, 437-440.
- Vasse, J., Danoun, S., Trigalet, A. (2005). Microscopic studies of root infection in resistant tomato cultivar Hawaii 7996. In: Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex, Allen, C., Prior, P., Hayward, A.C. (Eds.), APS Press, St. Paul, USA.
- 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, 25-40.
- Villegas-Escobar, V., González-Jaramillo, L.M., Ramirez, M., Moncada, R.N., Sierra-Zapata, L., Orduz, S., Romero-Tabarez, M. (2018). Lipopeptides from *Bacillus* sp. EA-CB0959: active metabolites responsible for in vitro and in vivo control of *Ralstonia solanacearum*. *Biological Control*, 125, 20-28.
- Vilvert, E., Stridh, L., Andersson, B., Olson, A., Aldén, L., Berlin, A. (2022). Evidence based disease control methods in potato production: a systematic map protocol. *Environmental Evidence*, 11, 6.
- Visser, R.G., Bachem, C.W., de Boer, J.M., Bryan, G.J., Chakrabati, S.K., Feingold, S., Gromadka, R., van Ham, R., Huang, S., Jacobs, J., Kuznetsov, B., de Melo, P.E., Milbourne, D., Orjeda, G., Sagredo, B., Tang, X. (2009). Sequencing the potato genome: outline and first results to come from the elucidation of the sequence of the world's third most important food crop. *American Journal of Potato Research*, 86(6), 417-429.
- Vreeburg, R.A.M., Bergsma-Vlami, M., Bollema, R.M., de Haan, E.G., Kooman-Gersmann, M., Smits-Mastebroek, L., Tameling, W.I.L., Tjou-Tam-Sin N.N.A., van de Vossen, B.T.L.H.J., Janse, D. (2016). Performance of real-time PCR and immunofluorescence for the detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* and *Ralstonia solanacearum* in potato tubers in routine testing. *EPPO Bulletin*, 46, 112-121.
- Waldee, E.L. (1942). Comparative studies of some peritrichous phytopathogenic bacteria. *Retrospective Theses and Dissertations*. <https://lib.dr.iastate.edu/rtd/14150>
- Waleron, M., Waleron, K., Lojkowska, E. (2013). Occurrence of *Pectobacterium wasabiae* in potato field samples. *European Journal of Plant Pathology*, 137(1), 149-158.
- Wang, X., He, S.W., Guo, H.B., Han, J.G., Thin, K.K., Gao, J.S., Yao Wang, Y., Zhang, X.X. (2020). *Dickeya oryzae* sp. nov., isolated from the roots of rice. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70, 4171-4178.
- Wicker, E., Lefeuvre, P., Cambiaire, J.C., de Lemaire, C., Poussier, S., Prior, P. (2012). Contrasting recombination patterns and demographic histories of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* inferred from MLSA. *Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology*, 6(5), 961-974.
- Wijesinha-Bettoni, R., Mouillé, B. (2019). The contribution of potatoes to global food security, nutrition and healthy diets. *American Journal of Potato Research*, 96(2), 139-49.
- Xu, J., Pan, Z.C., Prior, P., Xu, J.S., Zhang, Z., Zhang, H., Feng, J. (2009). Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* strains from China. *European Journal of Plant Pathology*, 125(4), 641-653.



- Xue, Q.Y., Yin, Y.N., Yang, W., Heuer, H., Prior, P., Guo, J.H., Smalla, K. (2011). Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* strains from China assessed by PCR-based fingerprints to unravel host plant-and site-dependent distribution patterns. *FEMS Microbiology Ecology*, 75(3), 507-519.
- Yabuuchi, E., Kosako, Y., Yano, I., Hotta, H., Nishiuchi, Y. (1995). Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. Nov.: Proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) comb. Nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. Nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. *Microbiology and Immunology*, 39, 897-904.
- Yadav, A.N. (2020). Plant Microbiomes for Sustainable Agriculture: Current Research and Future Challenges. In: *Plant Microbiomes for Sustainable Agriculture*, Yadav, A.N., Singh, J., Rastegari, A.A., Yadav, N. (Eds.), Springer, Cham, Switzerland.
- Yao, J., Allen, C. (2007). The plant pathogen *Ralstonia solanacearum* needs aerotaxis for normal biofilm formation and interactions with its tomato host. *Journal of Bacteriology*, 189, 6415-6424.
- Yao, Y., Li, Y., Chen, Z., Zheng, B., Zhang, L., Niu, B., Meng, J., Li, A., Zhang, J., Wang, Q. (2016) Biological control of potato late blight using isolates of *Trichoderma*. *American Journal of Potato Research*, 93, 33-42.
- Yap, M.N., Barak, J.D., Charkowski, A.O. (2004). Genomic diversity of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* and its correlation with virulence. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 3013-3023.
- Zaheer, K., Akhtar, M.H. (2016). Potato production, usage, and nutrition-a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(5), 711-721.
- Zhao, Y., Li, P., Huang, K., Wang, Y., Hu, H., Sun, Y. (2013). Control of postharvest soft rot caused by *Erwinia carotovora* of vegetables by a strain of *Bacillus amyloliquefaciens* and its potential modes of action. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(3), 411-420.

## 8. PRILOZI

**Prilog 1.** Izolati poreklom iz krtola krompira sa simptomima mrke truleži

Šifra izolata	Sorta	Godina izolacije	Okrug	Lokalitet
Rs0115	Cr4all	2015	Zapadnobački	S. Miletić
Rs0215	Cr4all	2015	Zapadnobački	S. Miletić
Rs0315	Cr4all	2015	Zapadnobački	S. Miletić
Rs0415	Cr4all	2015	Zapadnobački	S. Miletić
Rs0515	Cr4all	2015	Zapadnobački	S. Miletić
Rs0615	Cr4all	2015	Zapadnobački	S. Miletić
Rs0715	Cr4all	2015	Zapadnobački	S. Miletić
Rs0815	Cr4all	2015	Zapadnobački	S. Miletić
Rs0915	Cr4all	2015	Zapadnobački	S. Miletić
Rs1015	Cr4all	2015	Zapadnobački	S. Miletić
Rs1115	VR808	2015	Zapadnobački	S. Miletić
Rs1215	VR808	2015	Zapadnobački	S. Miletić
Rs1315	VR808	2015	Zapadnobački	S. Miletić
Rs1415	VR808	2015	Zapadnobački	S. Miletić
Rs1515	VR808	2015	Zapadnobački	S. Miletić
Rs1715	VR808	2015	Zapadnobački	S. Miletić
Rs1815	VR808	2015	Zapadnobački	S. Miletić
Rs1915	VR808	2015	Zapadnobački	S. Miletić
Rs2015	VR808	2015	Zapadnobački	S. Miletić
Rs2115	VR808	2015	Zapadnobački	Stapar
Rs2215	VR808	2015	Zapadnobački	Stapar
Rs2315	VR808	2015	Zapadnobački	Stapar
Rs2415	VR808	2015	Zapadnobački	Stapar
Rs2515	VR808	2015	Zapadnobački	Stapar
Rs2615	VR808	2015	Zapadnobački	Stapar
Rs2715	VR808	2015	Zapadnobački	Stapar
Rs2815	VR808	2015	Zapadnobački	Stapar
Rs0116	L. Claire	2016	Zapadnobački	Stapar
Rs0216	L. Claire	2016	Zapadnobački	Stapar
Rs0316	L. Claire	2016	Zapadnobački	Stapar
Rs0416	L. Claire	2016	Zapadnobački	Stapar
Rs0516	L. Claire	2016	Zapadnobački	Stapar
Rs0616	Panda	2016	Podunavski	Boleč
Rs0716	Panda	2016	Podunavski	Boleč
Rs0816	Panda	2016	Podunavski	Boleč
Rs0916	Panda	2016	Podunavski	Boleč
Rs1016	Panda	2016	Podunavski	Boleč
Rs1116	Panda	2016	Podunavski	Boleč
Rs2116	VR808	2016	Zapadnobački	Stapar
Rs2316	VR808	2016	Zapadnobački	Stapar
Rs2416	VR808	2016	Zapadnobački	Stapar
Rs2516	VR808	2016	Zapadnobački	Stapar
Rs2616	VR808	2016	Zapadnobački	Stapar
Rs2716	VR808	2016	Zapadnobački	Stapar
Rs3016	Cr4all	2016	Zapadnobački	S. Miletić
Rs3116	Cr4all	2016	Zapadnobački	S. Miletić
Rs3216	Cr4all	2016	Zapadnobački	S. Miletić
Rs3916	Cr4all	2016	Zapadnobački	S. Miletić
Rs4016	Pirol	2016	Zapadnobački	Sombor
Rs4116	Pirol	2016	Zapadnobački	Sombor
Rs4216	Pirol	2016	Zapadnobački	Sombor
Rs4316	Pirol	2016	Zapadnobački	Sombor
Rs4716	Pirol	2016	Zapadnobački	Sombor
Rs5116	Brooke	2016	Zapadnobački	S. Miletić
Rs5216	Brooke	2016	Zapadnobački	S. Miletić

Rs5316	Brooke	2016	Zapadnobački	S. Miletić
Rs5416	Brooke	2016	Zapadnobački	S. Miletić
Rs5516	Brooke	2016	Zapadnobački	S. Miletić
Rs5916	Brooke	2016	Zapadnobački	S. Miletić
Rs6116	L. Claire	2016	Zapadnobački	Sombor
Rs6216	L. Claire	2016	Zapadnobački	Sombor
Rs6416	L. Claire	2016	Zapadnobački	Sombor
Rs6516	L. Claire	2016	Zapadnobački	Sombor
Rs6616	L. Claire	2016	Zapadnobački	Sombor
Rs8118	Rudolph	2018	Južnobački	Zmajevo
Rs8218	Rudolph	2018	Južnobački	Zmajevo
Rs8318	Rudolph	2018	Južnobački	Zmajevo
Rs8518	Rudolph	2018	Južnobački	Zmajevo
Rs8618	Rudolph	2018	Južnobački	Zmajevo
Rs8918	Rudolph	2018	Južnobački	Zmajevo

---

**Prilog 2.** Izolati poreklom iz biljaka i krtola krompira sa simptomima crne noge i vlažne truleži krtola

Šifra izolata	Organ iz koga je vršena izolacija	Sorta	Godina izolacije	Okrug	Lokalitet
Pcc322	stabljika	L. Claire	2016	Južnobački	Kulpin
Pcc323	stabljika	L. Claire	2016	Južnobački	Kulpin
Pcc324	stabljika	L. Claire	2016	Južnobački	Kulpin
Pcc425	stabljika	L. Claire	2016	Južnobački	Kulpin
Pcc427	stabljika	L. Claire	2016	Južnobački	Kulpin
Pcb131	krtola	Cr4all	2018	Južnobački	Maglič
Pcb133	krtola	Cr4all	2018	Južnobački	Maglič
Pcb134	krtola	Cr4all	2018	Južnobački	Maglič
Pcb135	krtola	Cr4all	2018	Južnobački	Maglič
Pcb136	krtola	Cr4all	2018	Južnobački	Maglič
Pcb138	krtola	Cr4all	2018	Južnobački	Maglič
Pcb139	krtola	Cr4all	2018	Južnobački	Maglič
Dd31	stabljika	L. Claire	2018	Južnobački	Obrovac
Dd32	stabljika	L. Claire	2018	Južnobački	Obrovac
Dd35	stabljika	L. Claire	2018	Južnobački	Obrovac
Dd37	stabljika	L. Claire	2018	Južnobački	Obrovac
Dd41	stabljika	L. Claire	2018	Južnobački	Obrovac
Dd42	stabljika	L. Claire	2018	Južnobački	Obrovac
Dd44	stabljika	L. Claire	2018	Južnobački	Obrovac
Dd46	stabljika	L. Claire	2018	Južnobački	Obrovac
Dd47	stabljika	L. Claire	2018	Južnobački	Obrovac
Pcb33	stabljika	L. Claire	2018	Južnobački	Obrovac
Pcb34	stabljika	L. Claire	2018	Južnobački	Obrovac
Pcb38	stabljika	L. Claire	2018	Južnobački	Obrovac
Pcb39	stabljika	L. Claire	2018	Južnobački	Obrovac
Pcb61	stabljika	L. Claire	2018	Južnobački	Obrovac
Pcb62	stabljika	L. Claire	2018	Južnobački	Obrovac
Pcb64	stabljika	L. Claire	2018	Južnobački	Obrovac
Pcb67	stabljika	L. Claire	2018	Južnobački	Obrovac
Pcb2531	stabljika	L. Claire	2019	Južnobački	Maglič
Pcb2538	stabljika	L. Claire	2019	Južnobački	Maglič
Pcb2544	stabljika	L. Claire	2019	Južnobački	Maglič
Pcb2549	stabljika	L. Claire	2019	Južnobački	Maglič
Pcb2562	stabljika	L. Claire	2019	Južnobački	Maglič
Pcb2563	stabljika	L. Claire	2019	Južnobački	Maglič
Pcb2568	stabljika	L. Claire	2019	Južnobački	Maglič
Pcb2811	krtola	L. Claire	2019	Južnobački	Kulpin
Pcb2812	krtola	L. Claire	2019	Južnobački	Kulpin
Pcb2813	krtola	L. Claire	2019	Južnobački	Kulpin
Pcb2815	krtola	L. Claire	2019	Južnobački	Kulpin
Pcb2817	krtola	L. Claire	2019	Južnobački	Kulpin
Pcb2819	krtola	L. Claire	2019	Južnobački	Kulpin
Pcb2833	stabljika	L. Claire	2019	Južnobački	Kulpin
Pcb2838	stabljika	L. Claire	2019	Južnobački	Kulpin
Pcb2839	stabljika	L. Claire	2019	Južnobački	Kulpin
Pcb2841	stabljika	L. Claire	2019	Južnobački	Kulpin
Pcb2842	stabljika	L. Claire	2019	Južnobački	Kulpin
Pcb2844	stabljika	L. Claire	2019	Južnobački	Kulpin
Pcb2847	stabljika	L. Claire	2019	Južnobački	Kulpin
Pcb2861	stabljika	L. Claire	2019	Južnobački	Kulpin

**Prilog 3.** Lokaliteti, sorte i površine useva krompira na kojima je praćena pojava bakterioza

<b>Godina</b>	<b>Lokalitet</b>	<b>Sorta</b>	<b>Površina (ha)</b>
2015.	Bački Brestovac	Cr4all	16
	Feketić	Brooke	31
	Feketić	L. Claire	26
	Kula	L. Claire	25
	Kula	VR808	27
	Kulpin	L. Claire	20
	Kulpin	Orwell	5
	Kulpin	VR808	17
	Maglić	Brooke	18
	Maglić	Cr4all	56
	Maglić	L. Claire	33
	Maglić	Newton	9
	Maglić	Orwell	21
	Maglić	Panda	16
	Maglić	Pirol	15
	Maglić	Tivoli	5
	Maglić	VR808	45
	Nadalj	L. Claire	40
	Ravno Selo	L. Claire	18
	Ravno Selo	Pirol	35
	Sombor	L. Claire	43
	Sombor	Panda	16
	Sombor	Pirol	48
	Sombor	VR808	10
	S. Miletić	Cr4all	48
	S. Miletić	VR808	35
Stapar	VR808	5	
2016.	Bačko Dobro Polje	Cr4all	26
	Boleč	Panda	<1
	Kula	L. Claire	49
	Kulpin	Brooke	7
	Kulpin	L. Claire	11
	Kulpin	Orwell	8
	Kulpin	VR808	7
	Lugovo	VR808	23
	Maglić	Brooke	15
	Maglić	Cr4all	47
	Maglić	L. Claire	44
	Maglić	Pirol	32
	Maglić	VR808	12
	Nadalj	L. Claire	47
	Sombor	Cr4all	8
	Sombor	L. Claire	29
	Sombor	Pirol	67
	Sombor	L. Claire	54
	S. Miletić	Brooke	15
	S. Miletić	Cr4all	13
	Stapar	L. Claire	8
Stapar	VR808	7	
2017.	Feketić	L. Claire	72
	Feketić	VR808	30
	Gajdobra	L. Claire	47
	Kula	L. Claire	49
	Kulpin	Brooke	9
	Kulpin	L. Claire	12
	Kulpin	VR808	12

	Maglić	Brooke	42	
	Maglić	Cr4all	25	
	Maglić	L. Claire	36	
	Maglić	VR808	24	
	Nadalj	L. Claire	45	
2018.	Feketić	L. Claire	54	
	Feketić	VR808	54	
	Kula	L. Claire	51	
	Kulpin	Brooke	9	
	Kulpin	VR808	26	
	Maglić	Brooke	17	
	Maglić	Cr4all	10	
	Maglić	L. Claire	9	
	Maglić	Orwell	13	
	Maglić	VR808	100	
	Obrovac	L. Claire	58	
	Zmajevó	Rudolph	<1	
	2019.	Feketić	L. Claire	55
		Kula	L. Claire	60
Kulpin		Brooke	9	
Kulpin		Hermes	14	
Kulpin		Kiebitz	7	
Kulpin		L. Claire	11	
Lugovo		L. Claire	46	
Maglić		Brooke	40	
Maglić		Cr4all	18	
Maglić		Hermes	14	
Maglić		Kiebitz	30	
Maglić		L. Claire	44	
Nadalj		L. Claire	57	
Sombor		L. Claire	40	

**Prilog 4.** Prajmeri i PCR protokoli korišćeni za detekciju i identifikaciju izolata *R. solanacearum*

Redni broj para prajmera	Prajmer	Sekvenca prajmera (5'-3')	PCR protokol						Veličina fragmenta
			Inicijalna denaturacija	Broj ciklusa	Denaturacija	Hibridizacija	Elongacija	Finalna elongacija	
1.	PS-1	AGTCGAACGGC AGCGGGGG	95 °C 5 min	35	95 °C 30 sek	68 °C 30 sek	72 °C 45 sek	72 °C 5 min	553 bp
	PS-2	GGGGATTTACACA TCGGTCTTGCA							
2.	OLI-1	GGGGGTAGCTT GCTACCTGCC	96 °C 2 min	35	94 °C 20 sek	68 °C 20 sek	72 °C 30 sek	72 °C 10 min	288 bp
	Y2	CCCACTGCTGCC TCCCGTAGGAGT							
3.	Rs-1-F	ACTAACGAAGC AGAGATGCATT A	95 °C 5 min	35	95 °C 30 sek	58 °C 30 sek	72 °C 45 sek	72 °C 5 min	718 bp
	Rs-1-R	CCCAGTCACGGC AGAGACT							
4.	Rs-1-F	ACTAACGAAGC AGAGATGCATT A	95 °C 5 min	35	95 °C 30 sek	58 °C 30 sek	72 °C 45 sek	72 °C 5 min	716 bp
	Rs-3-R	TTCACGGCAAG ATCGCTC							

**Prilog 5.** Prajmeri i PCR protokoli korišćeni za detekciju i identifikaciju izolata *Pectobacterium* spp. i *Dickeya* spp.

Bakterija	Prajmer	Sekvenca prajmera (5'-3')	PCR protokol						Veličina fragmenta
			Inicijalna denaturacija	Broj ciklusa	Denaturacija	Hibridizacija	Elongacija	Finalna elongacija	
<i>P. carotovorum</i>	F0145	TACCCTGCAGATGAAATTA TTGATTGTTGAAGAC	94 °C 5 min	35	94 °C 1 min	55 °C 1 min	72 °C 2 min	72 °C 10 min	666 bp
	E2477	TACCAAGCTTTGGTTGTTC CCCTTTGGTCA							
<i>P. brasiliense</i>	BR1f	GCGTGCCGGGTTTATGACC T	94 °C 2 min	25	94 °C 45 sek	62 °C 45 sek	72 °C 90 sek	72 °C 10 min	322 bp
	L1r	CA(A/G)GGCATCCACCGTC AAGGCATCCACCGT							
<i>P. atrosepticum</i>	ECA1f	CGGCATCATAAAAACACG	95 °C 5 min	40	94 °C 30 sek	62 °C 45 sek	72 °C 45 sek	72 °C 8 min	690 bp
	ECA2r	GCACACTTCATCCAGCGA							
<i>Dickeya</i> spp.	ADE1	GATCAGAAAGCCCCGACG CAGAT	94 °C 3 min	25	94 °C 1 min	72 °C 1 min	72 °C 1 min	72 °C 5 min	420 bp
	ADE2	CTGTGGCCGATCAGGATG GTTTTGTCGTGC							

**Prilog 6.** Sekvence prajmera i PCR protokoli korišćeni za rep-PCR

Redni broj prajmer para	Prajmer	Sekvenca prajmera (5'-3')	PCR protokol						Veličina fragmenta
			Inicijalna denaturacija	Broj ciklusa	Denaturacija	Hibridizacija	Elongacija	Finalna elongacija	
1.	BoxA1R	CTACGGCAAGGCGACG CTGACG	95 °C 7 min	30	94 °C 1 min	52 °C 1 min	72 °C 8 min	72 °C 16 min	100-3000 bp
2.	ERIC1R	ATGTAAGCTCCTGGGG ATTCAC	95 °C 7 min	30	94 °C 1 min	52 °C 1 min	65 °C 8 min	65 °C 16 min	100-3000 bp
	ERIC2	AAGTAAGTGAAGTGGGG TGAGCG							
3.	REP1R-I	IIICGICGICATCIGGC	95 °C 7 min	35	94 °C 1 min	40 °C 1 min	65 °C 8 min	65 °C 16 min	100-3000 bp
	REP2-I	ICGICTTATCIGGCCTAC							

**Prilog 7.** Sekvence prajmera i PCR protokoli korišćeni u MLST/MLSA analizi izolata *R. solanacearum*

Gen	Prajmer	Sekvenca prajmera (5'-3')	PCR protokol						Veličina fragmenta
			Inicijalna denaturacija	Broj ciklusa	Denaturacija	Hibridizacija	Elongacija	Finalna elongacija	
<i>adk</i>	adkF	TCTGTTGGGCGCACCCGGC	96 °C 5 min	30	96 °C 5 min	62 °C 45 sek	72 °C 90 sek	72 °C 5 min	420 bp
	adkR	CCCAGCCGGAGTAGTAGTCC							
<i>gapA</i>	gapAF	ATGACCATCAAGATCGGCAT	96 °C 5 min	30	96 °C 5 min	55 °C 45 sek	72 °C 90 sek	72 °C 5 min	774 bp
	gapAR	GGGCCATTTCAGCACCT							
<i>gdhA</i>	gdhAF	GATGGATGACGGCCGCATC	96 °C 5 min	30	96 °C 5 min	63 °C 45 sek	72 °C 90 sek	72 °C 5 min	774 bp
	gdhAR	TGAACGCCGCCGTCCGCAG							
<i>gyrB</i>	gyrBF	AGGGCTTCGTGAGTACATCAA	96 °C 5 min	30	96 °C 5 min	62 °C 45 sek	72 °C 90 sek	72 °C 5 min	873 bp
	gyrBR	GTTCCGCCGAGGCTCCACG							
<i>ppsA</i>	ppsAF	CTGTACAACGACCGCGCTAT	96 °C 5 min	30	96 °C 5 min	55 °C 45 sek	72 °C 90 sek	72 °C 5 min	717 bp
	ppsAR	GTTGGTCAGGCCATCTCTT							
<i>fliC</i>	rsolfliCF	GAACGCCAACGGTGCGAAC	96 °C 5 min	30	96 °C 5 min	63 °C 45 sek	72 °C 90 sek	72 °C 5 min	318 bp
	rsolfliCR	GGCGGCCTCAGGGAGGTC							
<i>hrpB</i>	rshrpBF	TGCCATGCTGGGAAACATCT	96 °C 5 min	30	96 °C 5 min	64 °C 45 sek	72 °C 90 sek	72 °C 3 min	810 bp
	rshrpBR	GGGGGCTTCGTTGAACTGC							



**Prilog 8.** Sekvence prajmera i PCR protokoli korišćeni u MLST/MLSA analizi izolata *Pectobacterium* spp. i *Dickeya* spp.

Gen	Prajmer	Sekvenca prajmera (5'-3')	PCR protokol						Veličina fragmenta
			Inicijalna denaturacija	Broj ciklusa	Denaturacija	Hibridizacija	Elongacija	Finalna elongacija	
<i>acnA</i>	acnA3F	CMAGRGRTRTTRATGCARG AYTTTAC	95 °C 3 min	30	94 °C 30 sek	52 °C 30 sek	72 °C 1 min	72 °C 6 min	300 bp
	acnA3R	GATCATGGTGGTRTGSGAR TCVGT							
<i>dnaX</i>	dnaXf	TATCAGGTYCTTGCCCGTA AGTGG	94 °C 3 min	35	94 °C 1 min	59 °C 1 min	72 °C 2 min	72 °C, 5 min	535 bp
	dnaXr	TCGACATCCARCGCYTTGA GATG							
<i>gapA</i>	gapA326F	ATCTTCCTGACCGACGAAA CTGC	95 °C 3 min	30	94 °C 30 sek	52 °C 30 sek	72 °C 1 min	72 °C 6 min	450 bp
	gapA845R	ACGTCATCTTCGGTGTAAC CCAG							
<i>icdA</i>	icdA400F	GGTGGTATCCGTTCTCTGA ACG	95 °C 3 min	30	94 °C 30 sek	52 °C 30 sek	72 °C 1 min	72 °C 6 min	520 bp
	icdA977R	TAGTCGCCGTTCAAGTTCA TACA							
<i>pgi</i>	pgi815F	TGGGTCGGCGGCCGTTACT C	95 °C 3 min	30	94 °C 30 sek	52 °C 30 sek	72 °C 1 min	72 °C 6 min	520 bp
	pgi1396R	TGCCCTTCGAATACTTTGAA CGGC							
<i>proA</i>	proAF1	CGGYAATGCGGTGATTCT GCG	95 °C 3 min	30	94 °C 30 sek	52 °C 30 sek	72 °C 1 min	72 °C 6 min	630 bp
	proAR	GGGTACTGACCGCCACTTC							
<i>mdh</i>	mdh2	GCGCGTAAGCCGGGTATG GA	94 °C 30 sek	35	94 °C 30 sek	52 °C 30 sek	72 °C 1 min	72 °C 7 min	500 bp
	mdh4	CGCGGCAGCCTGGCCCAT AG							

**Prilog 9.** Pristupni brojevi izolata *R. solanacearum* deponovanih u NCBI bazu podataka

Šifra izolata	Pristupni NCBI brojevi						
	<i>adk</i>	<i>gapA</i>	<i>gdhA</i>	<i>gyrB</i>	<i>ppsA</i>	<i>hrpB</i>	<i>fliC</i>
Rs0115	MT634044	MT634056	MT634068	MT634080	MT634092	MT634104	MT634116
Rs1915	MT634045	MT634057	MT634069	MT634081	MT634093	MT634105	MT634117
Rs2115	MT634046	MT634058	MT634070	MT634082	MT634094	MT634106	MT634118
Rs0516	MT634047	MT634059	MT634071	MT634083	MT634095	MT634107	MT634119
Rs0716	MT634048	MT634060	MT634072	MT634084	MT634096	MT634108	MT634120
Rs2716	MT634049	MT634061	MT634073	MT634085	MT634097	MT634109	MT634121
Rs3016	MT634050	MT634062	MT634074	MT634086	MT634098	MT634110	MT634122
Rs4016	MT634051	MT634063	MT634075	MT634087	MT634099	MT634111	MT634123
Rs5916	MT634052	MT634064	MT634076	MT634088	MT634100	MT634112	MT634124
Rs6616	MT634053	MT634065	MT634077	MT634089	MT634101	MT634113	MT634125
Rs8118	MT634054	MT634066	MT634078	MT634090	MT634102	MT634114	MT634126

**Prilog 10.** Pristupni brojevi izolata *Pectobacterium* spp. i *Dickeya* spp. deponovanih u NCBI bazu podataka

Šifra izolata	Pristupni NCBI brojevi						
	<i>acnA</i>	<i>dnaX</i>	<i>gapA</i>	<i>icdA</i>	<i>mdh</i>	<i>pgi</i>	<i>proA</i>
Pcc324	OP545937	OP545923	OP545941	OP545945	OP545949	OP545953	OP545971
Pcc425	OP545938	OP545924	OP545942	OP545946	OP545950	OP545954	OP545972
Pcb133	OP545939	OP545925	OP545943	OP545947	OP545951	OP545955	OP545963
Pcb134	OP545940	OP545926	OP545944	OP545948	OP545952	OP545956	OP545964
Dd31	MK604559	OP545935	MK604561	MK604563	MK604569	MK604565	MK604567
Dd44	MK604560	OP545936	MK604562	MK604564	MK604570	MK604566	MK604568
Pcb33	MK604547	OP545927	MK604549	MK604551	MK604557	MK604553	MK604555
Pcb62	MK604548	OP545928	MK604550	MK604552	MK604558	MK604554	MK604556
Pcb2544	MT134020	OP545929	MT134026	MT134032	MT134038	OP545957	OP545965
Pcb2562	MT134019	OP545930	MT134025	MT134031	MT134037	OP545958	OP545966
Pcb2811	MT134018	OP545931	MT134024	MT134030	MT134036	OP545959	OP545967
Pcb2817	MT134017	OP545932	MT134023	MT134029	MT134035	OP545960	OP545968
Pcb2842	MT134016	OP545933	MT134022	MT134028	MT134034	OP545961	OP545969
Pcb2861	MT134015	OP545934	MT134021	MT134027	MT134033	OP545962	OP545970

**Prilog 11.** Uporedni sojevi iz NCBI baze korišćeni za MLSA analizu izolata *R. solanacearum*

Šifra soja	Poreklo	Tip/ Biovar/ Filotip	Konzervirani geni i geni virulentnosti						
			<i>adk</i>	<i>gapA</i>	<i>gdhA</i>	<i>gyrB</i>	<i>ppsA</i>	<i>hrpB</i>	<i>fliC</i>
PD2762	Holandija	3/2/II	KF275663	KF275629	KF275613	KF275610	KF275576	KF275594	KF275645
PD1610	Belgija	3/2/II	DQ657579	DQ657750	DQ657809	DQ657402	DQ657520	DQ657461	DQ657692
PD441	Švedska	3/2/II	DQ657578	DQ657749	DQ657808	DQ657401	DQ657519	DQ657460	DQ657691
UW72	Grčka	3/2/II	DQ657549	DQ657720	DQ657779	DQ657372	DQ657490	DQ657431	DQ657665
PD1100	Egipat	3/2/II	DQ657567	DQ657738	DQ657797	DQ657390	DQ657508	DQ657449	DQ657682
PD1939	Izrael	3/2/II	DQ657566	DQ657737	DQ657796	DQ657389	DQ657507	DQ657448	DQ657681
UW551	Kenija	3/2/II	DQ657538	DQ657709	DQ657768	DQ657361	DQ657479	DQ657420	DQ657654
UW224	Kenija	3/2/II	DQ657551	DQ657722	DQ657781	DQ657374	DQ657492	DQ657433	DQ657667
UW134	Kenija	1/1/II	DQ657550	DQ657721	DQ657780	DQ657373	DQ657491	DQ657432	DQ657666
UW276	Meksiko	3/2/II	DQ657552	DQ657723	DQ657782	DQ657375	DQ657493	DQ657434	DQ657668
UW25	SAD	1/1/II	DQ657556	DQ657727	DQ657786	DQ657379	DQ657497	DQ657438	DQ657672
UW477	Peru	3/2/II	DQ657546	DQ657717	DQ657776	DQ657369	DQ657487	DQ657428	DQ657662
BS024	Bolivija	3/2/II	DQ657539	DQ657710	DQ657769	DQ657362	DQ657480	DQ657421	DQ657655
BS025	Bolivija	3/2/II	DQ657540	DQ657711	DQ657770	DQ657363	DQ657481	DQ657422	DQ657656
BS048	Bolivija	3/2/II	DQ657541	DQ657712	DQ657771	DQ657364	DQ657482	DQ657423	DQ657657
BS075	Bolivija	3/2/II	DQ657542	DQ657713	DQ657772	DQ657365	DQ657483	DQ657424	DQ657658
BS094	Bolivija	1/1/II	DQ657543	DQ657714	DQ657773	DQ657366	DQ657484	DQ657425	DQ657659
BS095	Bolivija	1/1/II	DQ657544	DQ657715	DQ657774	DQ657367	DQ657485	DQ657426	DQ657660
UW365	Kina	3/2/II	DQ657564	DQ657735	DQ657794	DQ657387	DQ657505	DQ657446	DQ657679
UW220	Indija	3/2/II	DQ657559	DQ657730	DQ657789	DQ657382	DQ657500	DQ657441	DQ657675
TK131	Tajland	3/2/II	DQ657568	DQ657739	DQ657798	DQ657391	DQ657509	DQ657450	DQ657683
UW420	Australija	3/2/II	DQ657553	DQ657724	DQ657783	DQ657376	DQ657494	DQ657435	DQ657669
WP20	Filipini	Nepoznat/N2/IV	DQ657584	DQ657755	DQ657814	DQ657407	DQ657525	DQ657466	DQ657696
MAF211271	Japan	3/N2/IV	DQ657569	DQ657740	DQ657799	DQ657392	DQ657510	DQ657451	DQ657684
MAF301558	Japan	3/N2/IV	DQ657576	DQ657747	DQ657806	DQ657399	DQ657517	DQ657458	DQ657689
JT525	Reunion	Nepoznat/1/III	DQ657592	DQ657763	DQ657822	DQ657415	DQ657533	DQ657474	DQ657704
NCPPB332	Zimbabve	Nepoznat/1/III	DQ657591	DQ657762	DQ657821	DQ657414	DQ657532	DQ657473	DQ657703
UW363	Kina	Nepoznat/3/I	DQ657563	DQ657734	DQ657793	DQ657386	DQ657504	DQ657445	DQ657678
UW152	Australija	1/3/I	DQ657558	DQ657729	DQ657788	DQ657381	DQ657499	DQ657440	DQ657674
GMI1000	Gvajana	1/3/I	DQ657537	DQ657708	DQ657767	DQ657360	DQ657478	DQ657419	DQ657653
UW505	Indonezija	1/3/I	DQ657545	DQ657716	DQ657775	DQ657368	DQ657486	DQ657427	DQ657661

**Prilog 12.** Uporedni sojevi iz NCBI baze korišćeni za MLSA analizu izolata *Pectobacterium* spp. i *Dickeya* spp.

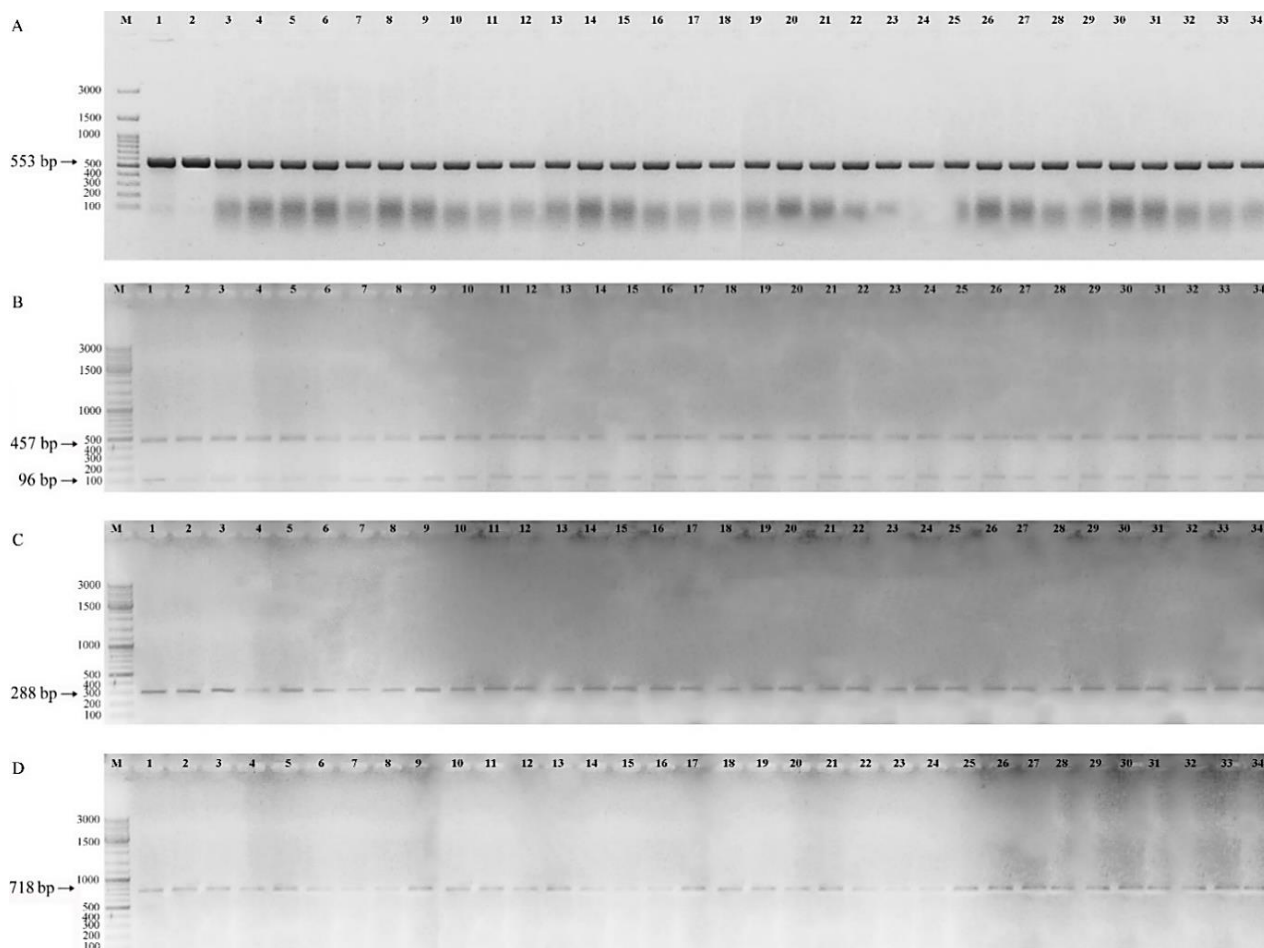
Bakterija	Poreklo	Šifra soja	Konzervirani geni						
			<i>acnA</i>	<i>dnaX</i>	<i>gapA</i>	<i>icdA</i>	<i>mdh</i>	<i>pgi</i>	<i>proA</i>
<i>P. carotovorum</i>	SAD, krompir	WPP14	NZ_CP0516 52	NZ_CP05165 2	NZ_CP0516 52	NZ_CP0516 52	NZ_CP0516 52	NZ_CP0516 52	NZ_CP0516 52
<i>P. carotovorum</i>	Belorusija, krastavac	25.1	NZ_CP0880 19	NZ_CP08801 9	NZ_CP0880 19	NZ_CP0880 19	NZ_CP0880 19	NZ_CP0880 19	NZ_CP0880 19
<i>P. carotovorum</i>	Francuska, voda	A077-S18- O15	NZ_CP0847 41	NZ_CP08474 1	NZ_CP0847 41	NZ_CP0847 41	NZ_CP0847 41	NZ_CP0847 41	NZ_CP0847 41
<i>P. carotovorum</i>	Kina, krompir	XP-13	NZ_CP0632 42	NZ_CP06324 2	NZ_CP0632 42	NZ_CP0632 42	NZ_CP0632 42	NZ_CP0632 42	NZ_CP0632 42
<i>P. carotovorum</i>	Rusija, krompir	2A	NZ_CP0665 52	NZ_CP06655 2	NZ_CP0665 52	NZ_CP0665 52	NZ_CP0665 52	NZ_CP0665 52	NZ_CP0665 52
<i>P. c. subsp. carotovorum</i>	Južna Koreja, rotkvica	JR1.1	NZ_CP0342 37	NZ_CP03423 7	NZ_CP0342 37	NZ_CP0342 37	NZ_CP0342 37	NZ_CP0342 37	NZ_CP0342 37
<i>P. c. subsp. carotovorum</i>	J. Koreja, krompir	BP201601.1	NZ_CP0342 36	NZ_CP03423 6	NZ_CP0342 36	NZ_CP0342 36	NZ_CP0342 36	NZ_CP0342 36	NZ_CP0342 36
<i>P. brasiliense</i>	Brazil, krompir	1692T	NZ_CP0474 95	NZ_CP04749 5	NZ_CP0474 95	NZ_CP0474 95	NZ_CP0474 95	NZ_CP0474 95	NZ_CP0474 95
<i>P. brasiliense</i>	Holandija, krompir	IPO:4057 NAK:249	NZ_CP0599 61	NZ_CP05996 1	NZ_CP0599 61	NZ_CP0599 61	NZ_CP0599 61	NZ_CP0599 61	NZ_CP0599 61
<i>P. brasiliense</i>	Rusija, krompir	F126	NZ_CP0650 31	NZ_CP06503 1	NZ_CP0650 31	NZ_CP0650 31	NZ_CP0650 31	NZ_CP0650 31	NZ_CP0650 31
<i>P. brasiliense</i>	Holandija, zumbul	IPO:4134 NAK:395	NZ_CP0599 55	NZ_CP05995 5	NZ_CP0599 55	NZ_CP0599 55	NZ_CP0599 55	NZ_CP0599 55	NZ_CP0599 55
<i>P. brasiliense</i>	Kina, krastavac	SX309	NZ_CP0203 50	NZ_CP02035 0	NZ_CP0203 50	NZ_CP0203 50	NZ_CP0203 50	NZ_CP0203 50	NZ_CP0203 50
<i>P. brasiliense</i>	Kina, krastavac	BZA12	NZ_CP0247 80	NZ_CP02478 0	NZ_CP0247 80	NZ_CP0247 80	NZ_CP0247 80	NZ_CP0247 80	NZ_CP0247 80
<i>P. brasiliense</i>	Kina, kineski kupus	BC1	NZ_CP0097 69	NZ_CP00976 9	NZ_CP0097 69	NZ_CP0097 69	NZ_CP0097 69	NZ_CP0097 69	NZ_CP0097 69
<i>P. brasiliense</i>	SAD, bundeva	SR10	NZ_CP0846 55	NZ_CP08465 5	NZ_CP0846 55	NZ_CP0846 55	NZ_CP0846 55	NZ_CP0846 55	NZ_CP0846 55
<i>P. brasiliense</i>	Kina, đumbir	TS20HJ1	NZ_CP0856 33	NZ_CP08563 3	NZ_CP0856 33	NZ_CP0856 33	NZ_CP0856 33	NZ_CP0856 33	NZ_CP0856 33
<i>P. brasiliense</i>	J. Koreja, krompir	HNP201719	CP046380	CP046380	CP046380	CP046380	CP046380	CP046380	CP046380
<i>P. atrosepticum</i>	Velika Britanija, krompir	CFBP1526T	CP036163	CP036163	CP036163	CP036163	CP036163	CP036163	CP036163
<i>P. parmentieri</i>	Finska, krompir	SCC3193T	NC_017845	NC_017845	NC_017845	NC_017845	NC_017845	NC_017845	NC_017845

<i>P. wasabiae</i>	Japan, <i>Eutrema japonicum</i>	3304T	NZ_CP0157 50	NZ_CP01575 0	NZ_CP0157 50	NZ_CP0157 50	NZ_CP0157 50	NZ_CP0157 50	NZ_CP0157 50
<i>P. aroidearum</i>	Kina, <i>Syngonium podophyllum</i>	L6	NZ_CP0650 44	NZ_CP06504 4	NZ_CP0650 44	NZ_CP0650 44	NZ_CP0650 44	NZ_CP0650 44	NZ_CP0650 44
<i>P. versatile</i>	SAD, šargarepa	SR1	NZ_CP0846 56	NZ_CP08465 6	NZ_CP0846 56	NZ_CP0846 56	NZ_CP0846 56	NZ_CP0846 56	NZ_CP0846 56
<i>P. punjabense</i>	Pakistan, krompir	SS95T	NZ_CP0384 98	NZ_CP03849 8	NZ_CP0384 98	NZ_CP0384 98	NZ_CP0384 98	NZ_CP0384 98	NZ_CP0384 98
<i>P. polaris</i>	Norveška, krompir	NIBIO1392	NZ_CP0174 82	NZ_CP01748 2	NZ_CP0174 82	NZ_CP0174 82	NZ_CP0174 82	NZ_CP0174 82	NZ_CP0174 82
<i>P. aquaticum</i>	Francuska, voda	A212-S19-A16T	NZ_CP0862 53	NZ_CP08625 3	NZ_CP0862 53	NZ_CP0862 53	NZ_CP0862 53	NZ_CP0862 53	NZ_CP0862 53
<i>D. dianthicola</i>	SAD, krompir	16LI01	NZ_CP0696 03	NZ_CP06960 3	NZ_CP0696 03	NZ_CP0696 03	NZ_CP0696 03	NZ_CP0696 03	NZ_CP0696 03
<i>D. dianthicola</i>	SAD, krompir	16JP03	NZ_CP0696 05	NZ_CP06960 5	NZ_CP0696 05	NZ_CP0696 05	NZ_CP0696 05	NZ_CP0696 05	NZ_CP0696 05
<i>D. dianthicola</i>	SAD, krompir	PA24	NZ_CP0695 95	NZ_CP06959 5	NZ_CP0695 95	NZ_CP0695 95	NZ_CP0695 95	NZ_CP0695 95	NZ_CP0695 95
<i>D. dianthicola</i>	SAD, krompir	16ME22T	NZ_CP0695 97	NZ_CP06959 7	NZ_CP0695 97	NZ_CP0695 97	NZ_CP0695 97	NZ_CP0695 97	NZ_CP0695 97
<i>D. dianthicola</i>	SAD, Gvineja Impatiens	67-19	NZ_CP0514 29	NZ_CP05142 9	NZ_CP0514 29	NZ_CP0514 29	NZ_CP0514 29	NZ_CP0514 29	NZ_CP0514 29
<i>D. dianthicola</i>	SAD, krompir	DDIME30	NZ_CP0760 42	NZ_CP07604 2	NZ_CP0760 42	NZ_CP0760 42	NZ_CP0760 42	NZ_CP0760 42	NZ_CP0760 42
<i>D. dianthicola</i>	Belgija, krompir	GBBC 2039	NZ_CM0018 38	NZ_CM0018 38	NZ_CM001 838	NZ_CM001 838	NZ_CM001 838	NZ_CM001 838	NZ_CM001 838
<i>D. dianthicola</i>	Holandija, krompir	IPO 980	NZ_CM0020 23	NZ_CM0020 23	NZ_CM002 023	NZ_CM002 023	NZ_CM002 023	NZ_CM002 023	NZ_CM002 023
<i>D. dianthicola</i>	Holandija, krompir	NCPPB 3534	NZ_CM0018 40	NZ_CM0018 40	NZ_CM001 840	NZ_CM001 840	NZ_CM001 840	NZ_CM001 840	NZ_CM001 840
<i>D. dianthicola</i>	Velika Britanija, karanfil	NCPPB 453T	NZ_CM0018 41	NZ_CM0018 41	NZ_CM001 841	NZ_CM001 841	NZ_CM001 841	NZ_CM001 841	NZ_CM001 841
<i>D. dianthicola</i>	Francuska, krompir	RNS04.9	NZ_CP0176 38	NZ_CP01763 8	NZ_CP0176 38	NZ_CP0176 38	NZ_CP0176 38	NZ_CP0176 38	NZ_CP0176 38
<i>D. dianthicola</i>	SAD, krompir	ME23	NZ_CP0315 60	NZ_CP03156 0	NZ_CP0315 60	NZ_CP0315 60	NZ_CP0315 60	NZ_CP0315 60	NZ_CP0315 60
<i>D. dianthicola</i>	SAD, krompir	16MB01	NZ_CP0695 99	NZ_CP06959 9	NZ_CP0695 99	NZ_CP0695 99	NZ_CP0695 99	NZ_CP0695 99	NZ_CP0695 99
<i>D. dianthicola</i>	SAD, krompir	16SBJ16	NZ_CP0695 96	NZ_CP06959 6	NZ_CP0695 96	NZ_CP0695 96	NZ_CP0695 96	NZ_CP0695 96	NZ_CP0695 96

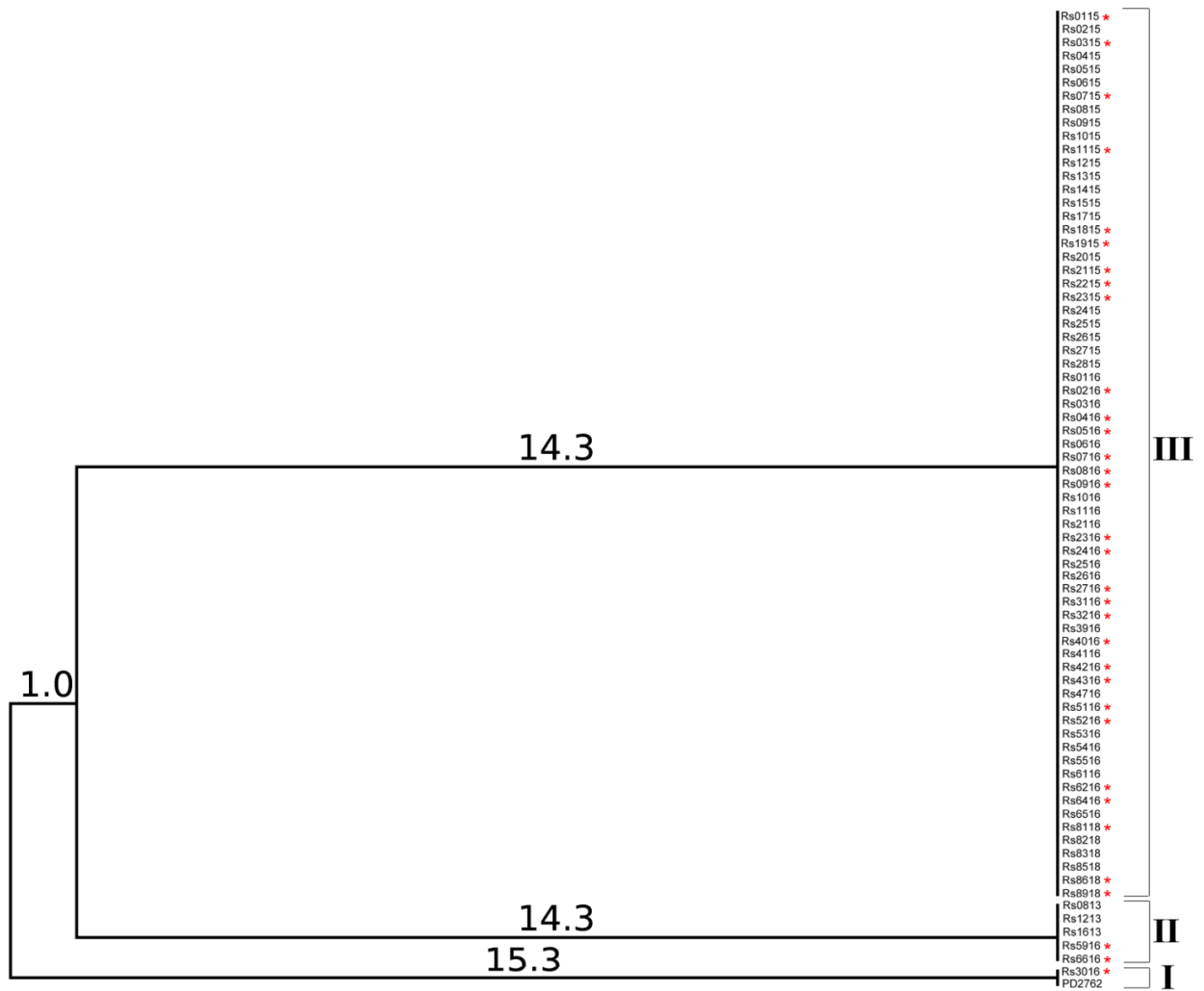
<i>D. dianthicola</i>	SAD, krompir	16MA15T	NZ_CP0696 00	NZ_CP0696 0	NZ_CP0696 00	NZ_CP0696 00	NZ_CP0696 00	NZ_CP0696 00	NZ_CP0696 00
<i>D. solani</i>	Izrael, krompir	MK10	NZ_CM0018 39	NZ_CM0018 39	NZ_CM001 839	NZ_CM001 839	NZ_CM001 839	NZ_CM001 839	NZ_CM001 839
<i>D. dadantii</i>	Comoros, <i>Pelargonium capitatum</i>	NCPPB 898T	NZ_CM0019 76	NZ_CM0019 76	NZ_CM001 976	NZ_CM001 976	NZ_CM001 976	NZ_CM001 976	NZ_CM001 976
<i>D. dadantii</i> subsp. <i>dieffenbachiae</i>	SAD, <i>Dieffenbachia</i> sp.	NCPPB 2976T	NZ_CM0019 78	NZ_CM0019 78	NZ_CM001 978	NZ_CM001 978	NZ_CM001 978	NZ_CM001 978	NZ_CM001 978
<i>D. fangzhongdai</i>	Kina, <i>Pyrus pyrifolia</i>	DSM 101947T	NZ_CP0250 03	NZ_CP0250 3	NZ_CP0250 03	NZ_CP0250 03	NZ_CP0250 03	NZ_CP0250 03	NZ_CP0250 03
<i>D. zea</i>	Australia, krompir	NCPPB 3531	NZ_CM0019 80	NZ_CM0019 80	NZ_CM001 980	NZ_CM001 980	NZ_CM001 980	NZ_CM001 980	NZ_CM001 980
<i>D. chrysanthemi</i>	SAD, <i>Chrysanthemum morifolium</i>	NCPPB 402T	NZ_CM0019 74	NZ_CM0019 74	NZ_CM001 974	NZ_CM001 974	NZ_CM001 974	NZ_CM001 974	NZ_CM001 974

Slovom „T“ označeni su tipski sojevi

**Prilog 13.** Amplifikovani PCR produkti 33 *R. solanacearum* izolata i referentnog soja *R. solanacearum* PD 2762 dobijeni korišćenjem: A) PS-1/PS-2 prajmera (553 bp); B) RFLP sa *Taq* I enzimom (457 i 96 bp); C) OLI-1/Y2 prajmera (288 bp); D) Rs-1-F/Rs-1-R prajmera (718 bp) (M-marker 1. Rs0115, 2. Rs0315, 3. Rs0715, 4. Rs1115, 5. Rs1815, 6. Rs1915, 7. Rs2115, 8. Rs2215, 9. Rs2315, 10. Rs0216, 11. Rs0416, 12. Rs0516, 13. Rs0716, 14. Rs0816, 15. Rs0916, 16. Rs2316, 17. Rs2416, 18. Rs2716, 19. Rs3016, 20. Rs3116, 21. Rs3216, 22. Rs4016, 23. Rs4216, 24. Rs4316, 25. Rs5116, 26. Rs5216, 27. Rs5916, 28. Rs6216, 29. Rs6416, 30. Rs6616, 31. Rs8118, 32. Rs8618, 33. Rs8918 i 34. *R. solanacearum* PD 2762) (foto S. Marković)

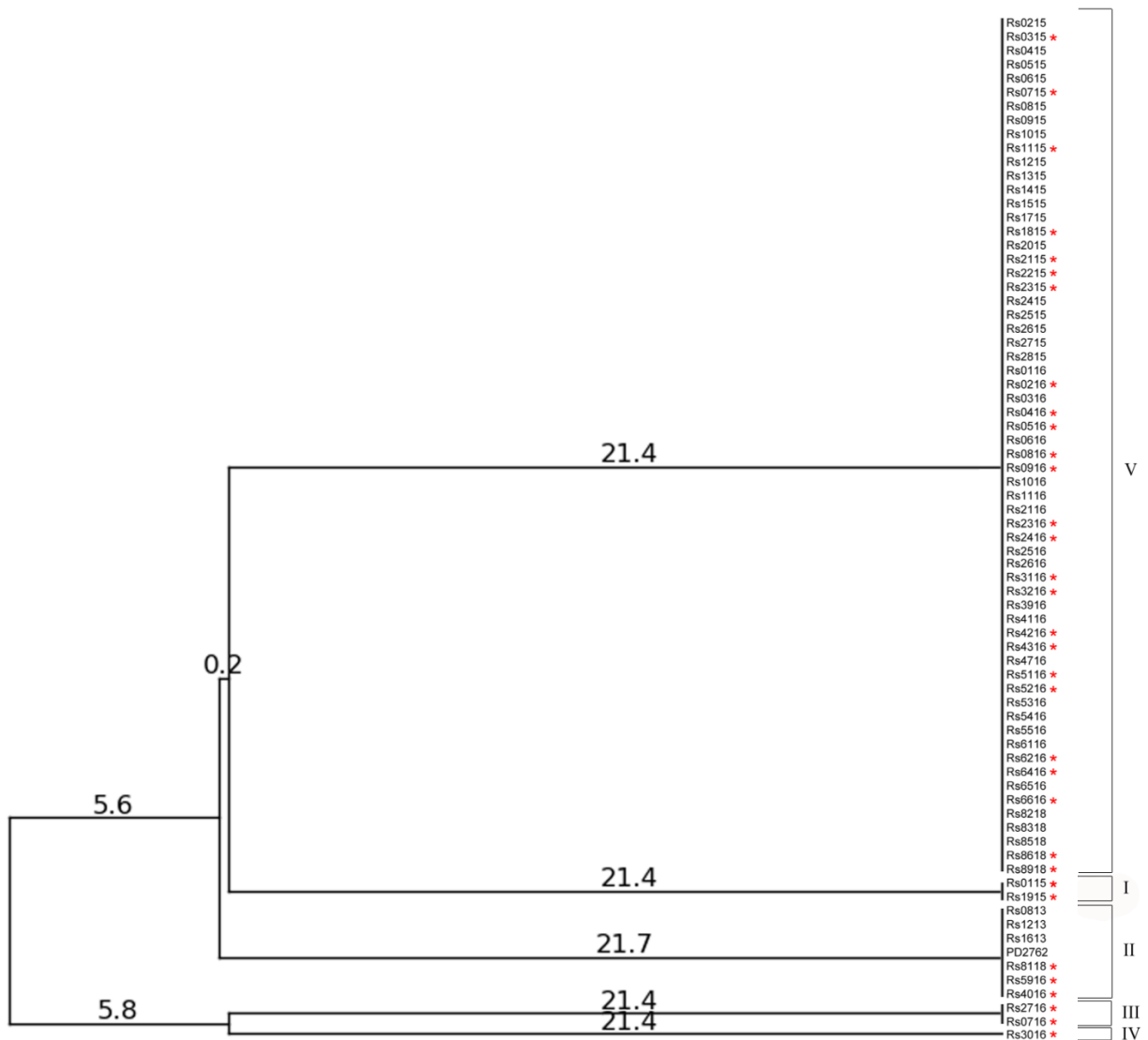


**Prilog 14A.** Stablo UPGMA konstruisano na osnovu ERIC-PCR profila za 70 *R. solanacearum* izolata, kao i referentnog *R. solanacearum* PD2762 i tri uporedna (Rs0813, Rs1213 i Rs1613) *R. solanacearum* soja. Izolati obeleženi crvenim zvezdicama izabrani su za dalja istraživanja

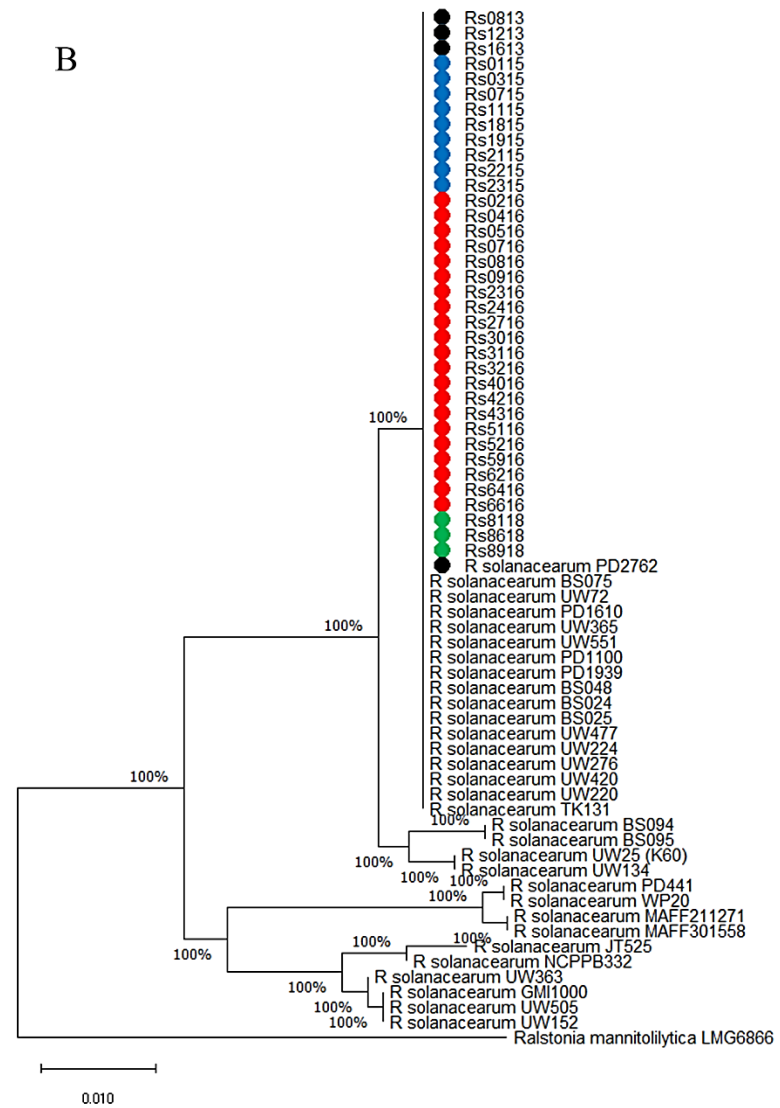
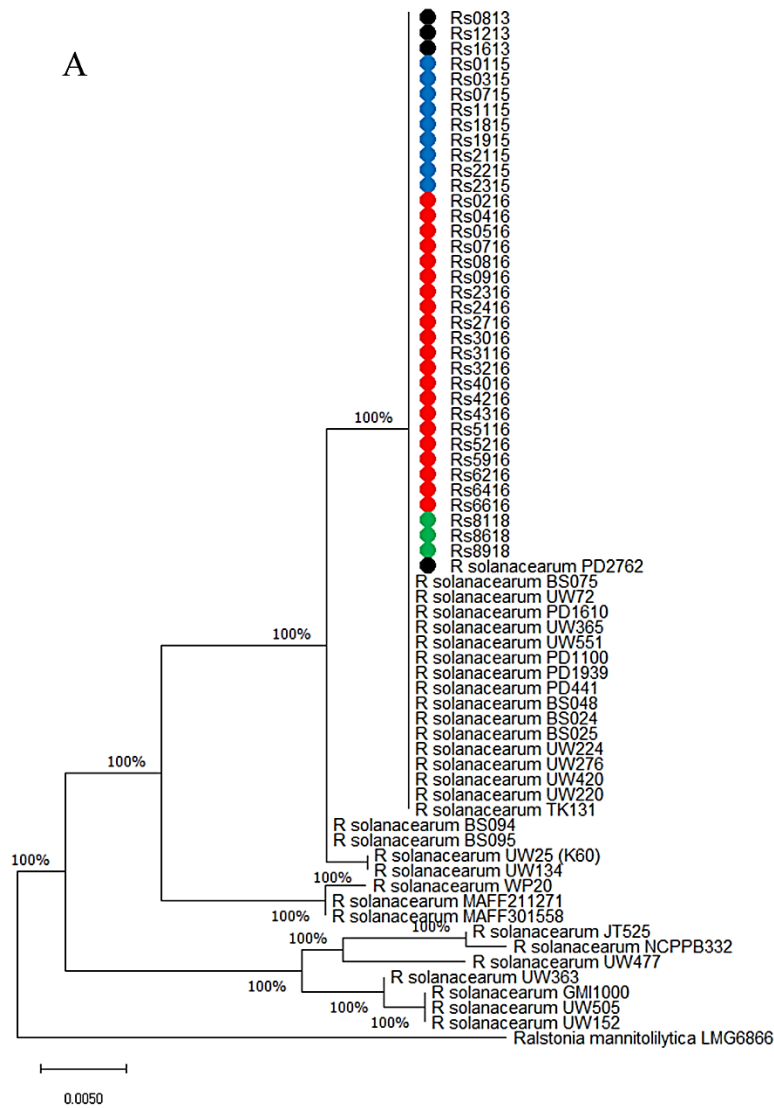




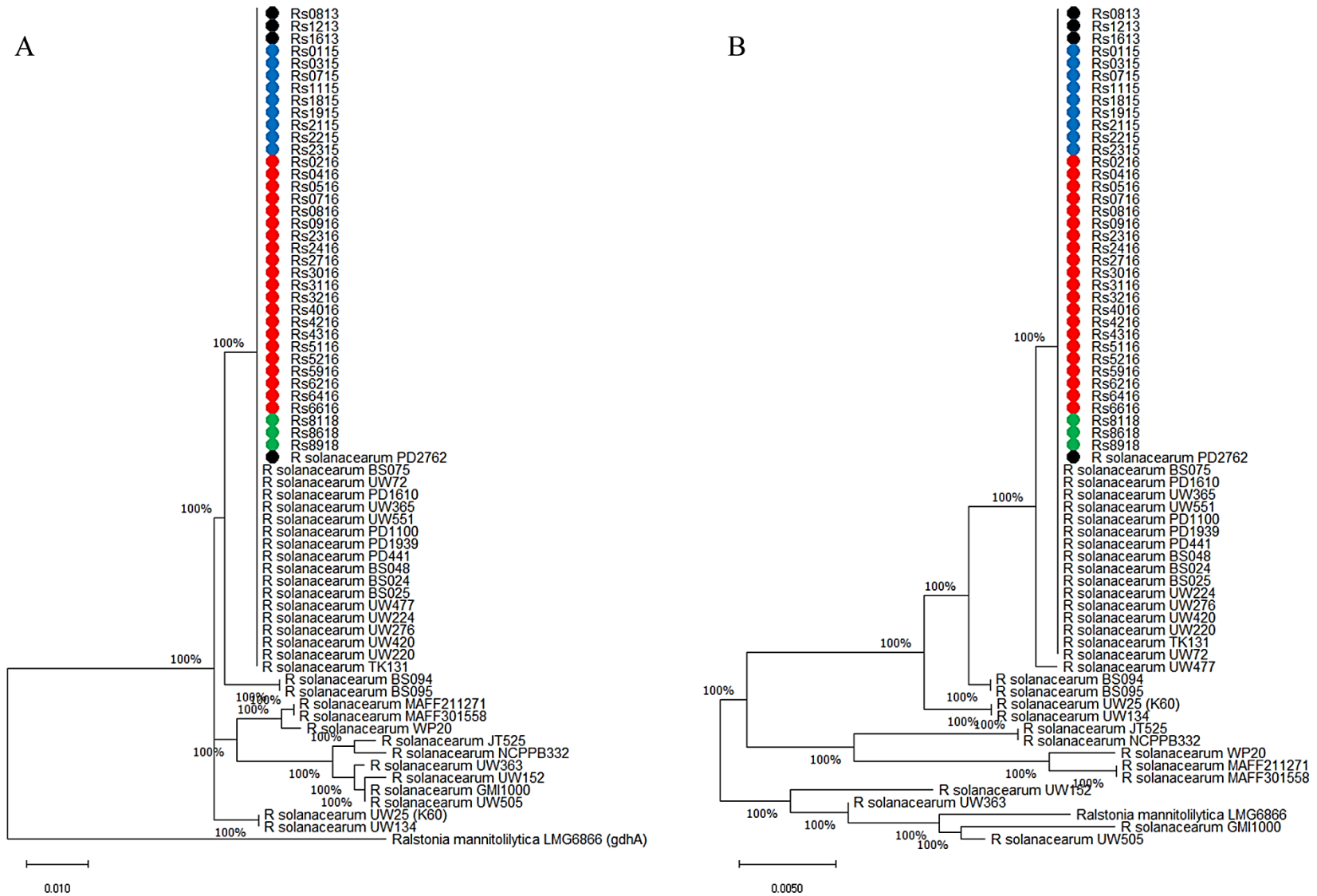
**Prilog 14B.** Stablo UPGMA konstruisano na osnovu REP-PCR profila za 70 *R. solanacearum* izolata, kao i referentnog *R. solanacearum* PD2762 i tri uporedna (Rs0813, Rs1213 i Rs1613) *R. solanacearum* soja. Izolati obeleženi crvenim zvezdicama izabrani su za dalja istraživanja



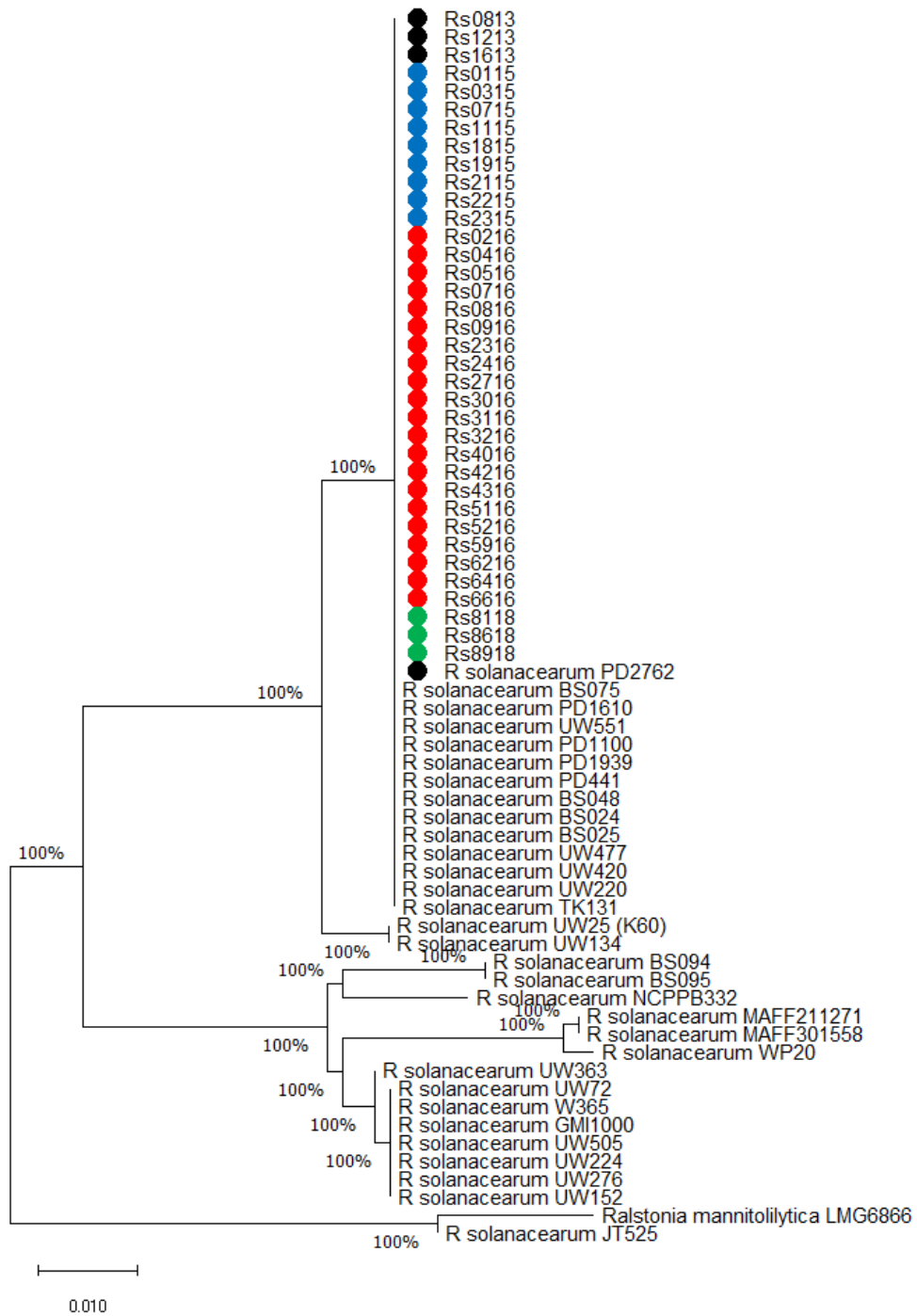
**Prilog 15A.** Filogenetska stabla ispitivanih izolata *R. solanacearum* i *R. solanacearum* sojeva iz NCBI baze, konstruisana na osnovu pojedinačnih sekvenci konzerviranih A) *adk*; B) *gapA* gena



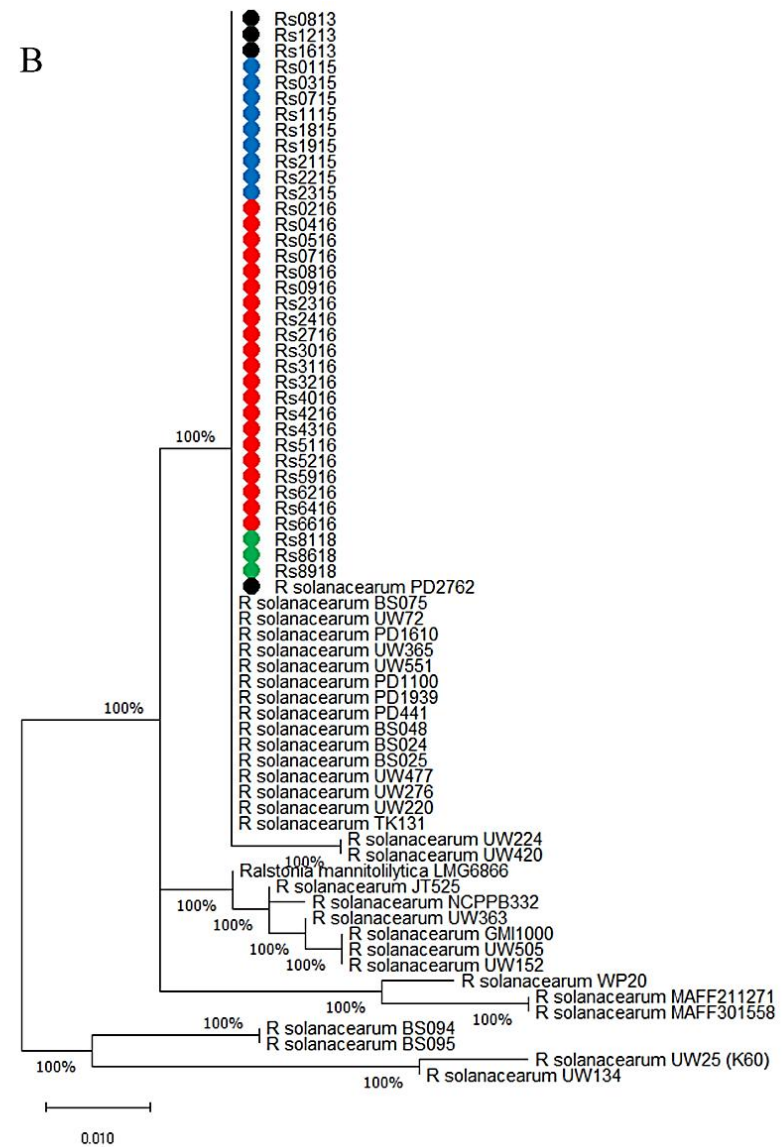
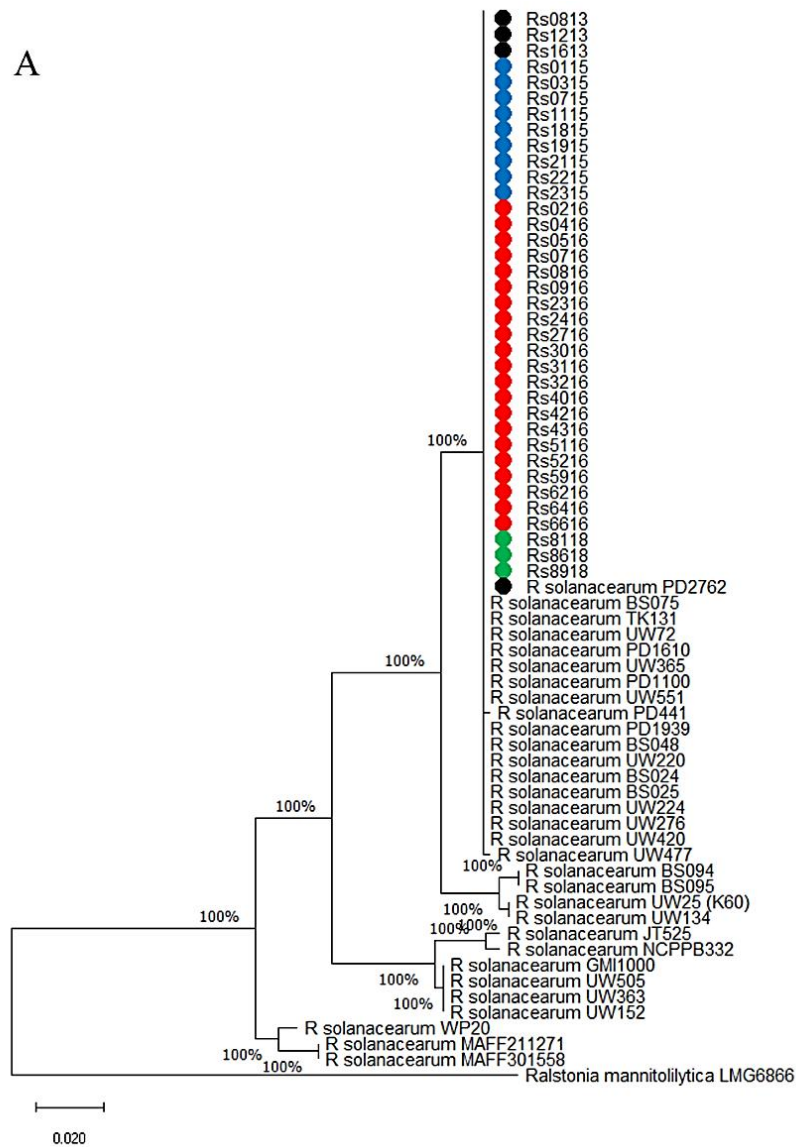
**Prilog 15B.** Filogenetska stabla ispitivanih izolata *R. solanacearum* i *R. solanacearum* sojeva iz NCBI baze, konstruisana na osnovu pojedinačnih sekvenci konzerviranih A) *gdhA*; B) *gyrB* gena



**Prilog 15C.** Filogenetsko stablo ispitivanih izolata *R. solanacearum* i *R. solanacearum* sojeva iz NCBI baze, konstruisano na osnovu pojedinačnih sekvenci konzerviranog *ppsA* gena



**Prilog 15D.** Filogenetska stabla ispitivanih izolata *R. solanacearum* i *R. solanacearum* sojeva iz NCBI baze, konstruisana na osnovu pojedinačnih sekvenci A) *hrpB*; B) *fljC* gena



**Prilog 16.** Amplifikacija PCR fragmenata 50 izolata dobijenih iz simptoma crne noge i vlažne truleži krtola krompira kod: A) pet *P. carotovorum* izolata sa F0145/E2477 prajmerima; B) 36 *P. brasiliense* izolata sa BR1f/L1r prajmerima; C) devet *Dickeya* spp. izolata sa ADE1/ADE2 prajmerima (foto S. Marković)

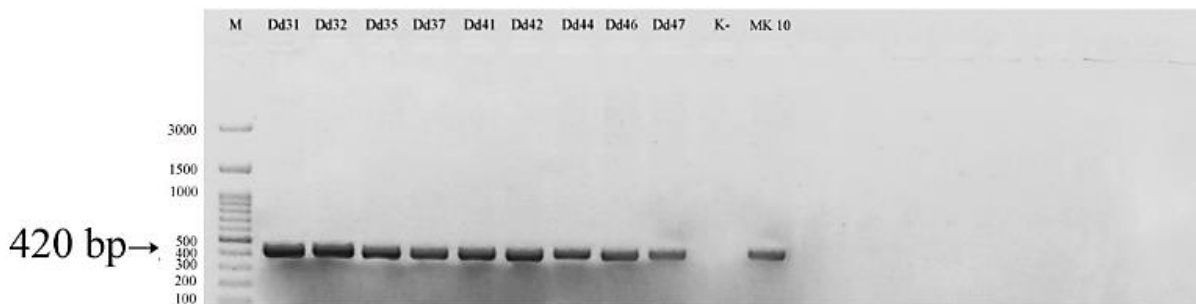
A



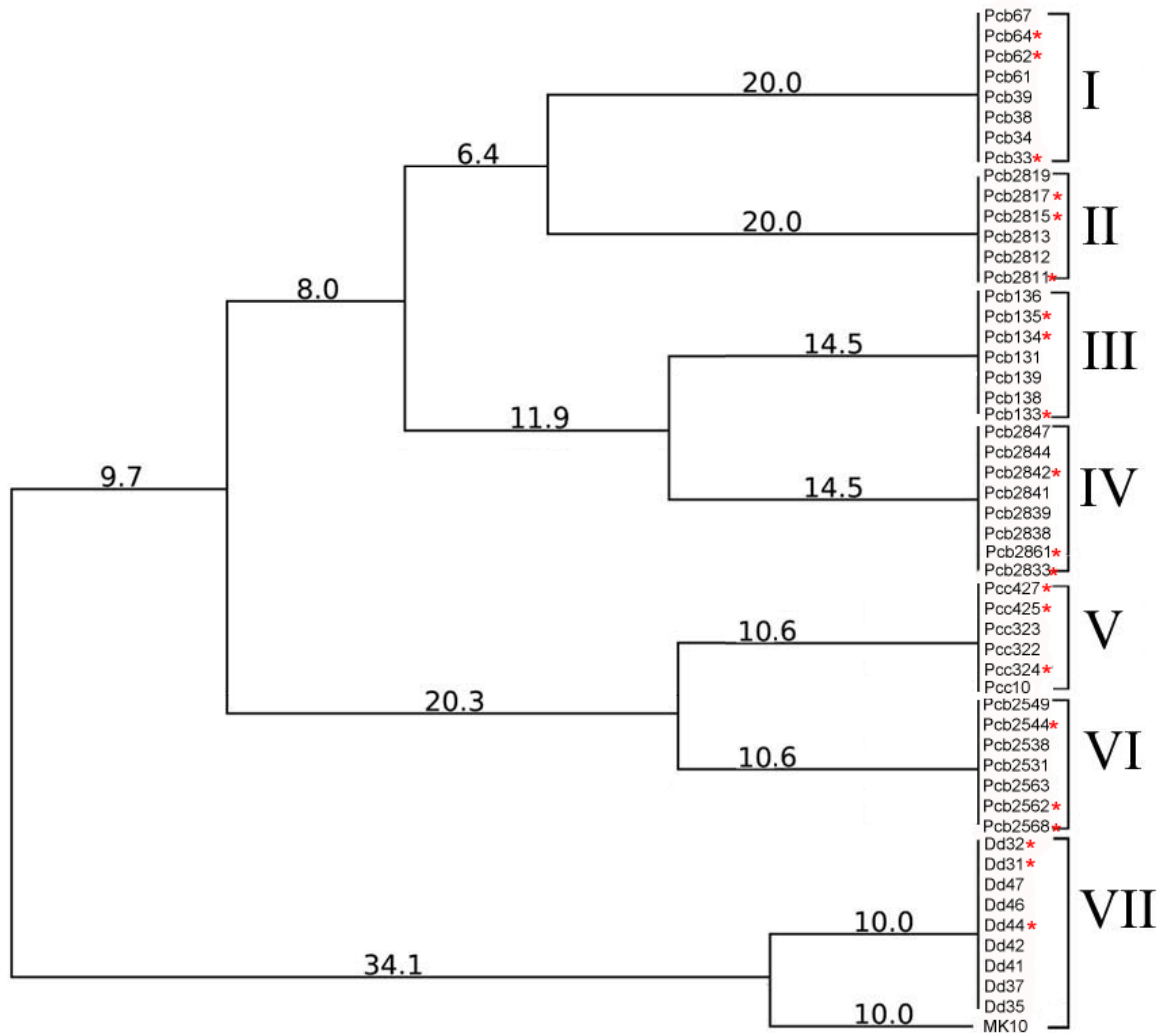
B



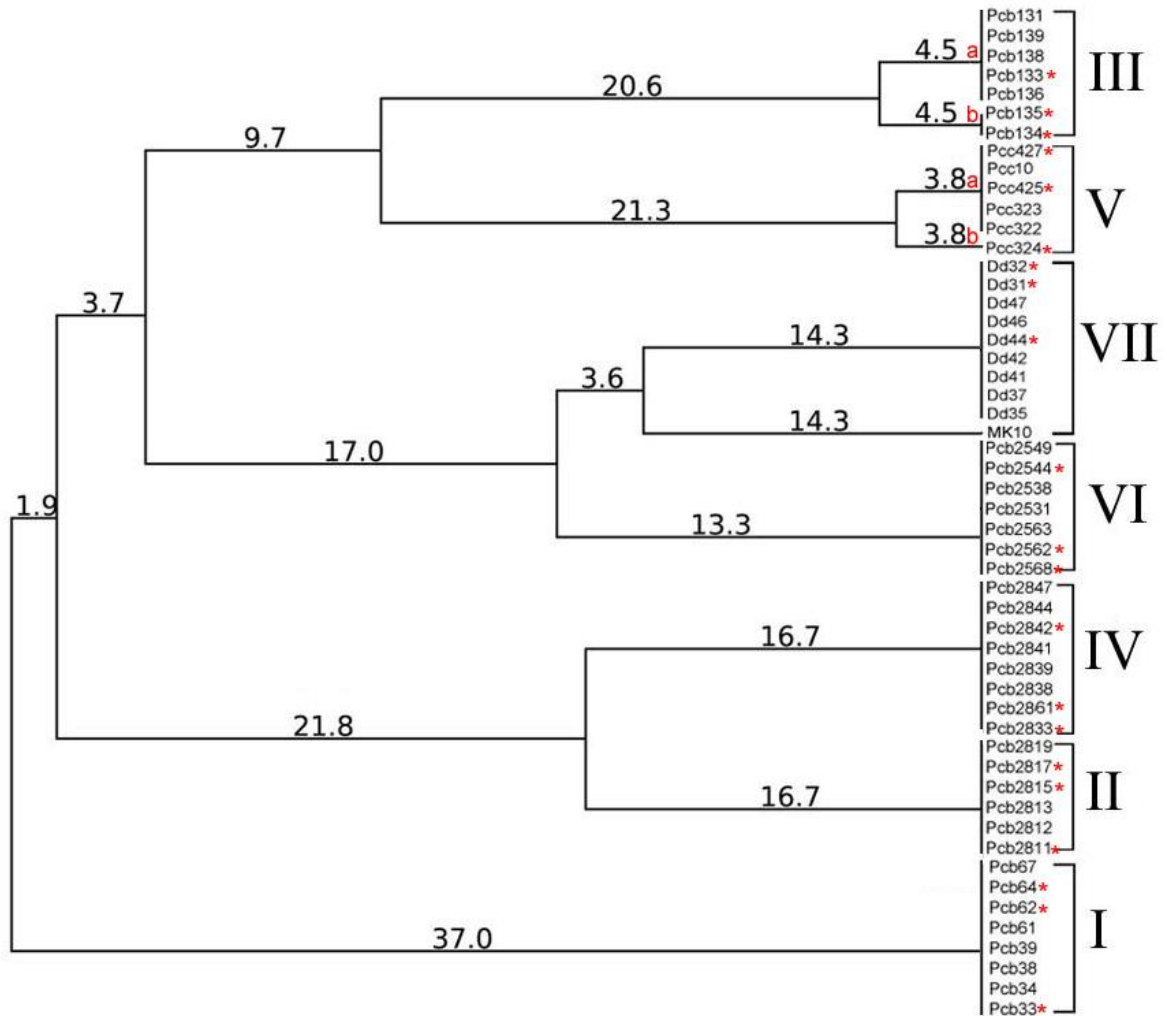
C



**Prilog 17A.** Stablo UPGMA konstruisano na bazi profila dobijenih korišćenjem BOX-PCR prajmera za 50 *Pectobacterium* spp. i *Dickeya* spp. kao i referentnog *D. solani* MK10 soja i uporednog *P. carotovorum* Pcc10 soja. Rimskim brojevima obeležene su grupe sa istim profilima (I, II, III, IV, V, VI, VII) ispitivanih izolata. Izolati obeleženi crvenim zvezdicama izabrani su za dalja istraživanja

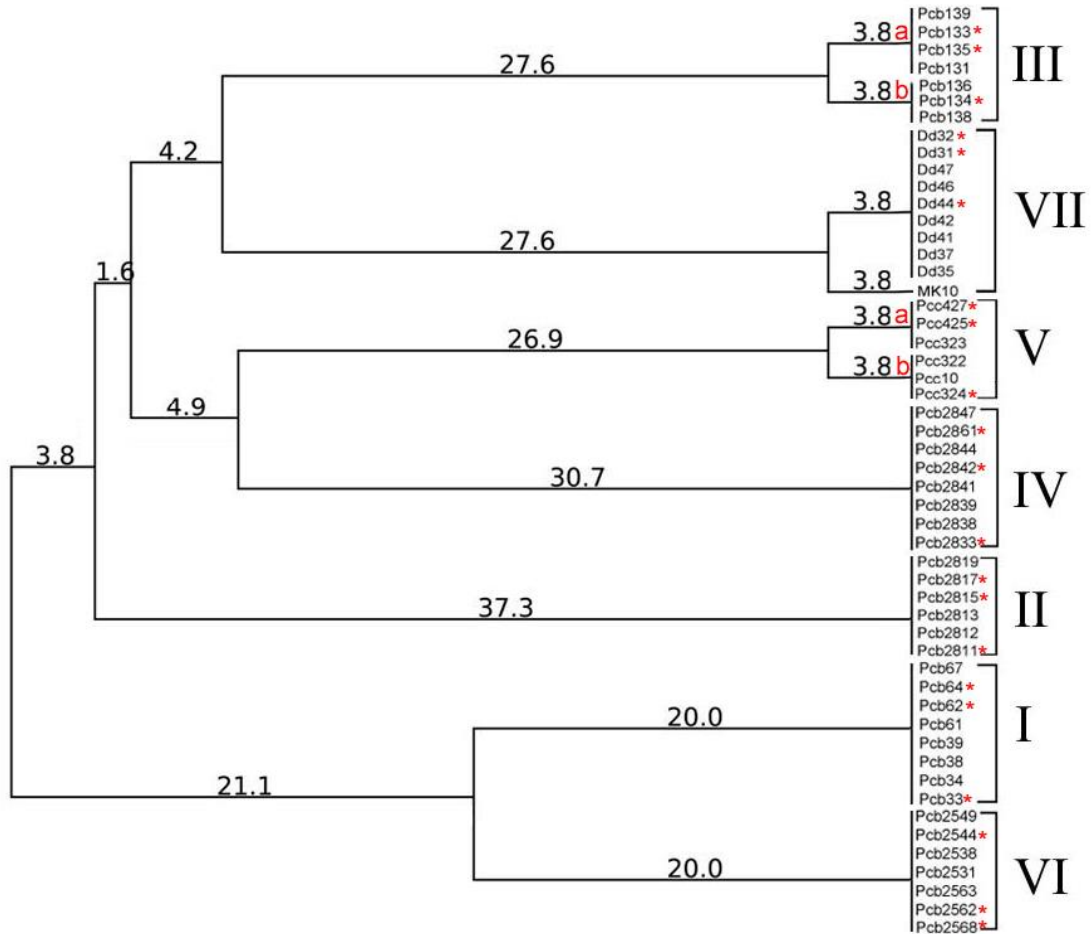


**Prilog 17B.** Stablo UPGMA konstruisano na bazi profila dobijenih korišćenjem ERIC-PCR prajmera za 50 *Pectobacterium* spp. i *Dickeya* spp. izolata, kao i referentnog *D. solani* MK10 soja i uporednog *P. carotovorum* Pcc10 soja. Rimskim brojevima obeležene su grupe međusobno istih (I, II, IV, VI, VII) i sličnih (IIIa/b, Va/b) profila izolata. Izolati obeleženi crvenim zvezdicama su izabrani za dalja istraživanja



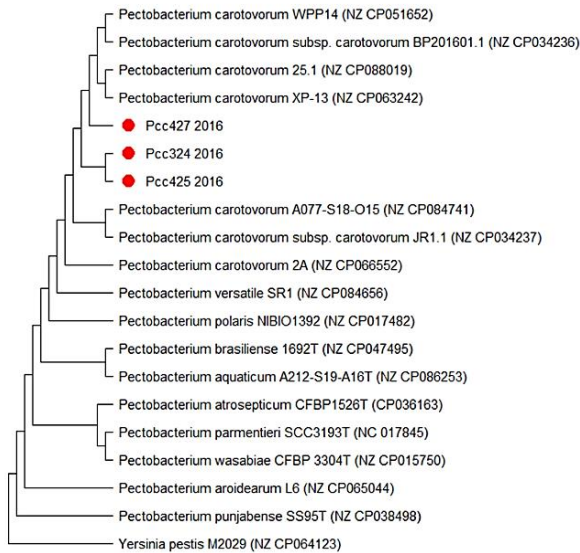


**Prilog 17C.** Stablo UPGMA konstruisano na bazi profila dobijenih korišćenjem REP-PCR prajmera za 50 *Pectobacterium* spp. i *Dickeya* spp. izolata, kao i referentnog *D. solani* MK10 soja i uporednog *P. carotovorum* Pcc10 soja. Rimskim brojevima obeležene su grupe međusobno istih (I, II, IV, VI, VII) i sličnih (IIIa/b, Va/b) profila izolata. Izolati obeleženi crvenim zvezdicama su izabrani za dalja istraživanja

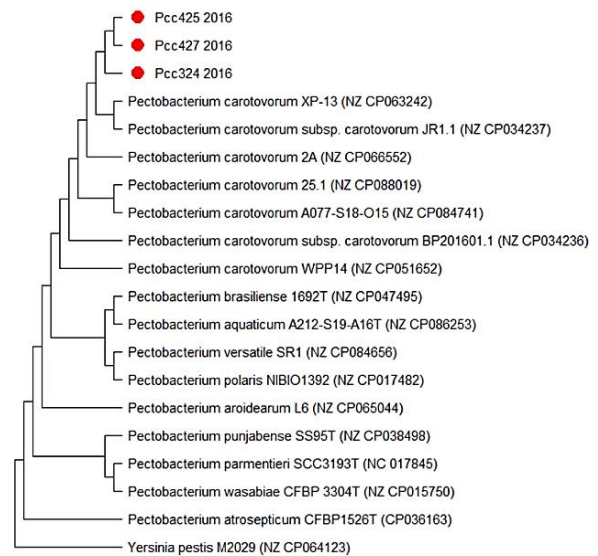


**Prilog 18A.** Filogenetska stabla ispitivanih *P. carotovorum* izolata i drugih *Pectobacterium* spp. sojeva iz NCBI bazi konstruisana na osnovu pojedinačnih sekvenci konzerviranih: A) *acnA*; B) *dnaX*; C) *gapA*; D) *icdA* gena

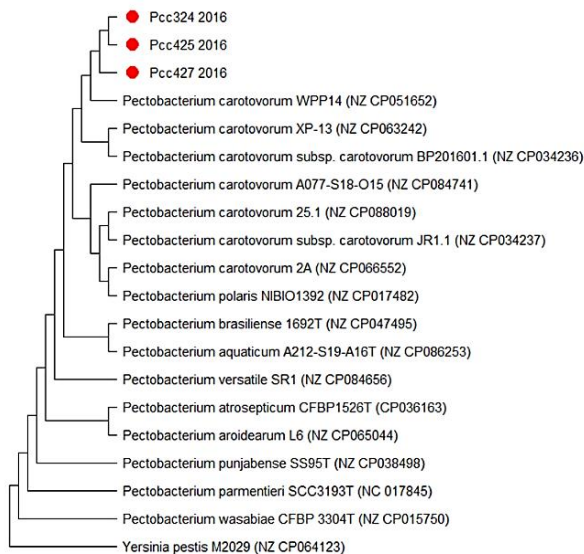
A



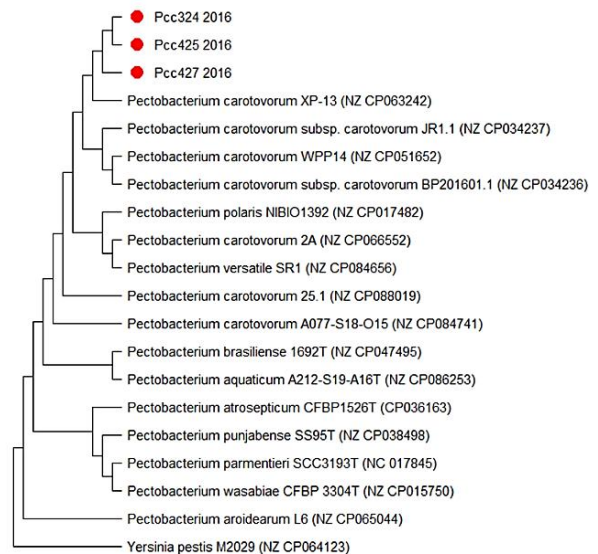
B



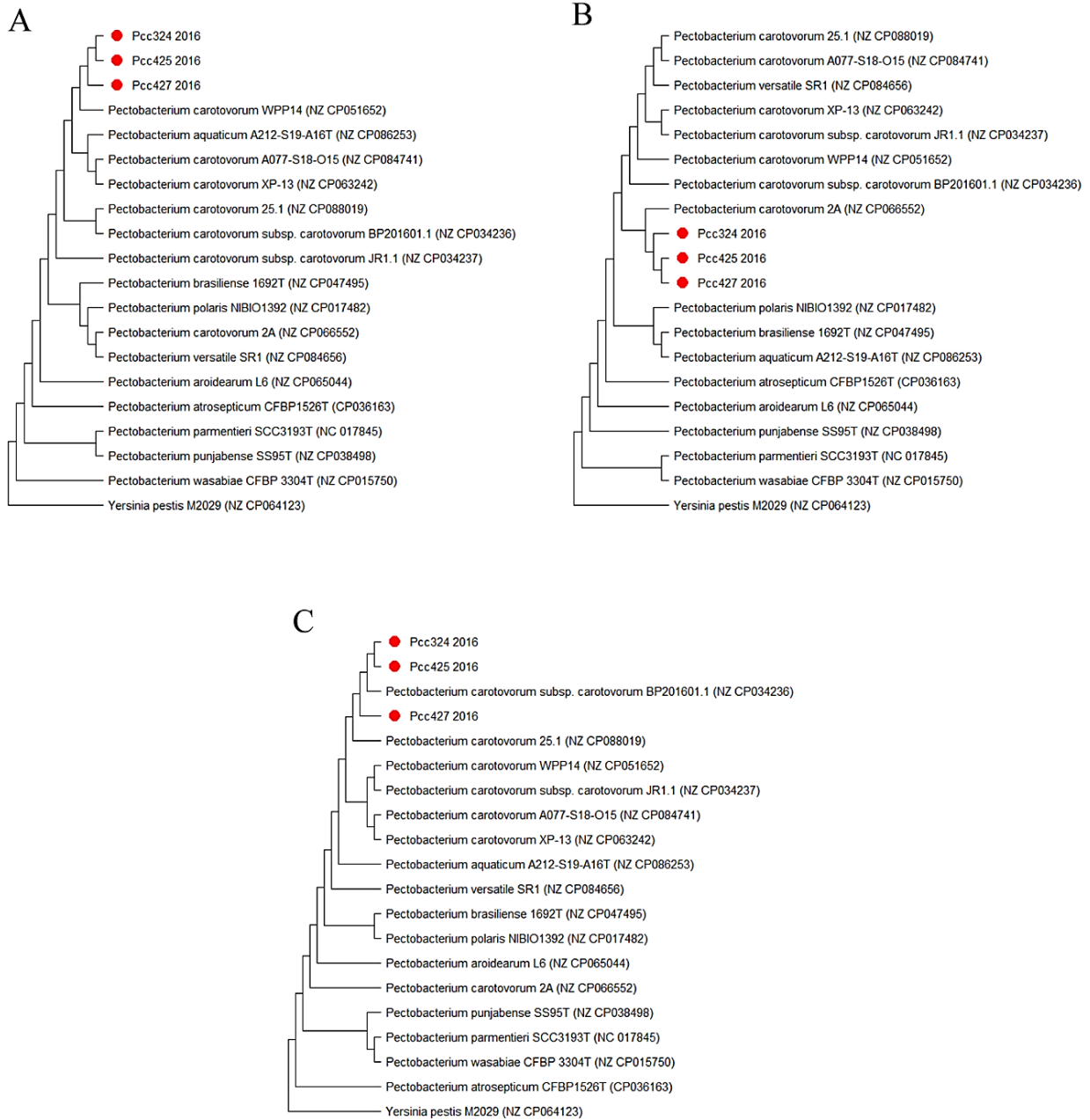
C



D



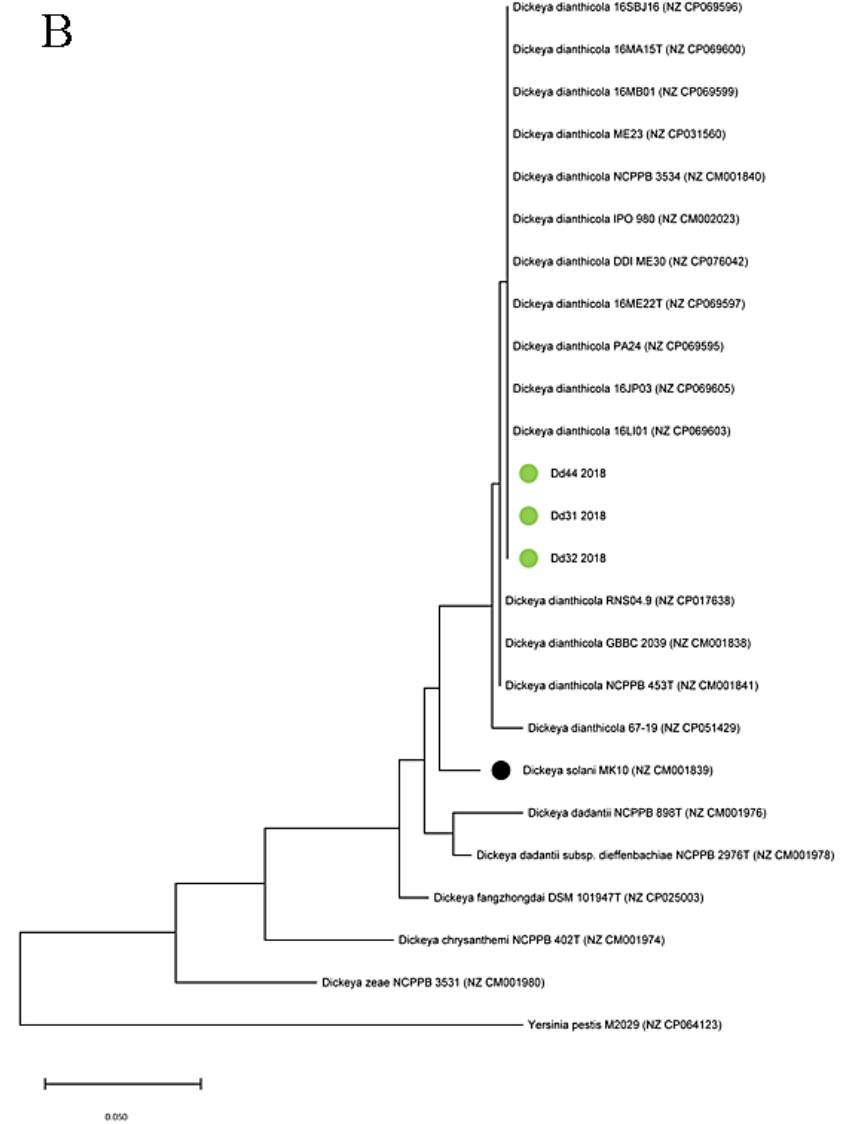
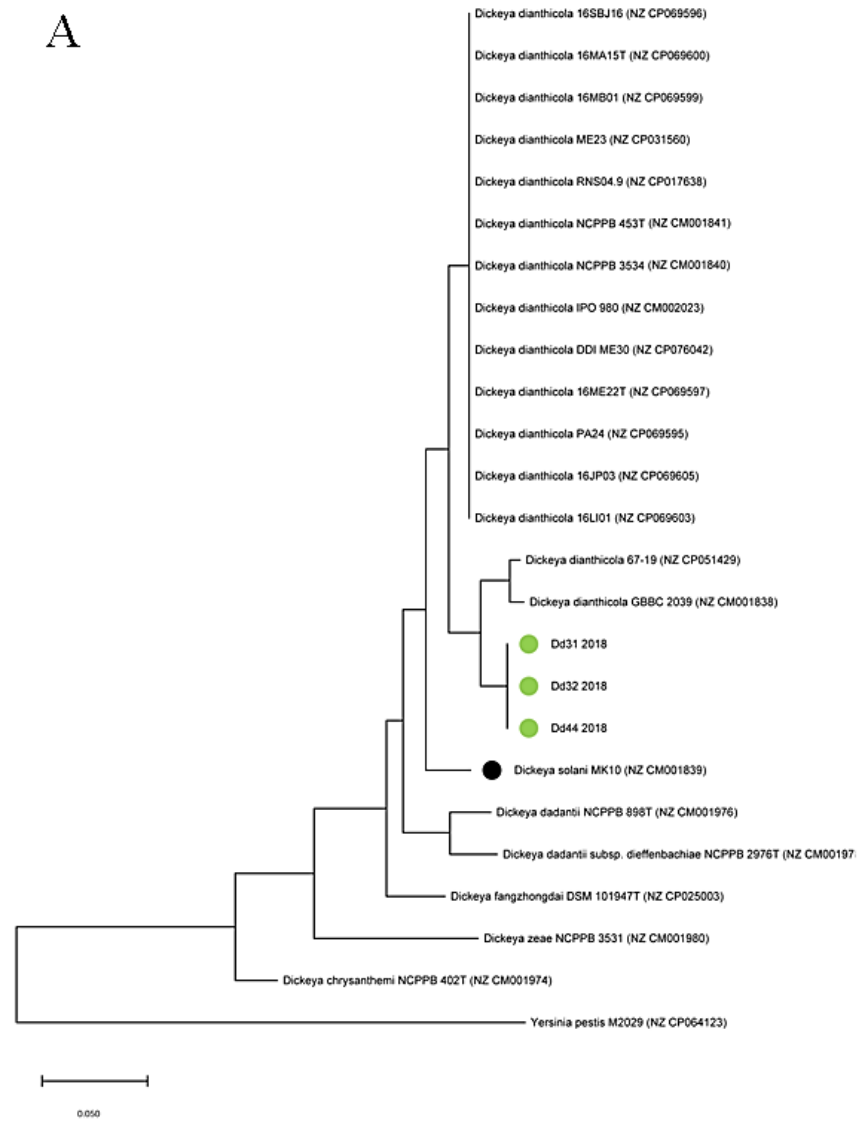
**Prilog 18B.** Filogenetska stabla ispitivanih *P. carotovorum* izolata i drugih *Pectobacterium* spp. sojeva iz NCBI bazi konstruisana na osnovu pojedinačnih sekvenci konzerviranih: A) *mdh*; B) *pgi*; C) *proA* gena



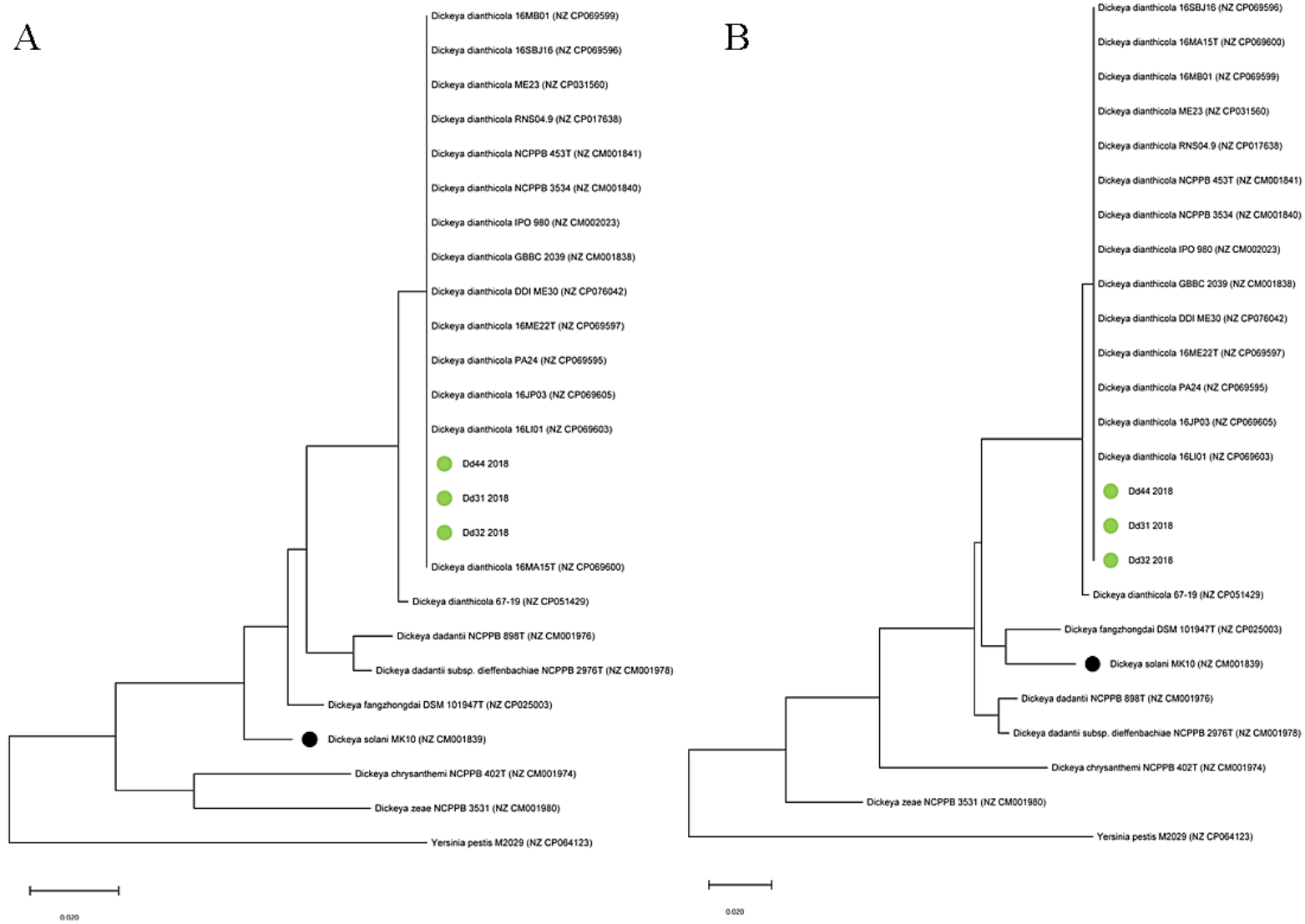




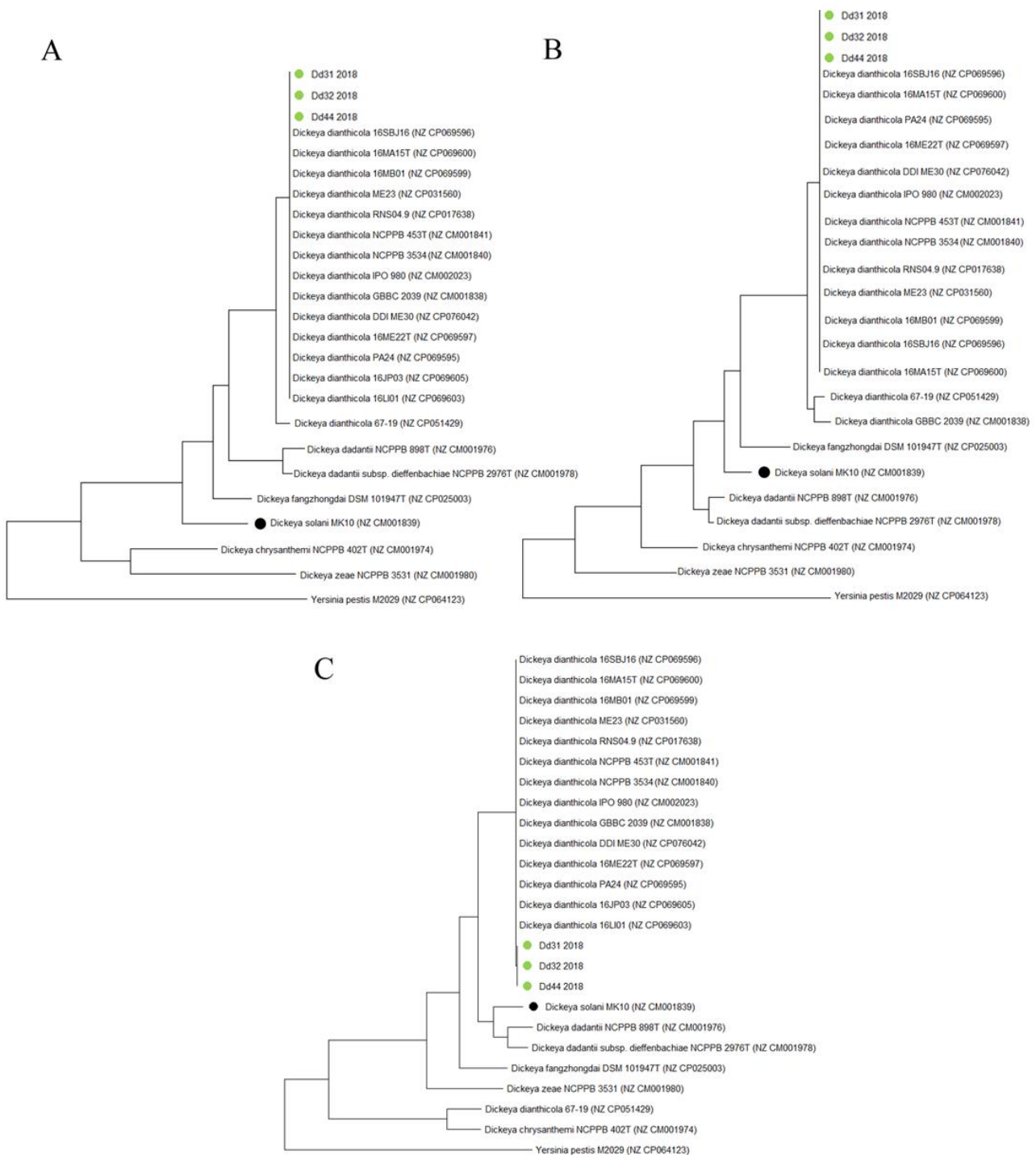
**Prilog 18E.** Filogenetska stabla ispitivanih *D. dianthicola* izolata i drugih *Dickeya* spp. sojeva iz NCBI bazi konstruisana na osnovu pojedinačnih sekvenci konzerviranih a) *acnA*; b) *dnaX* gena



**Prilog 18F.** Filogenetska stabla ispitivanih *D. dianthicola* izolata i drugih *Dickeya* spp. sojeva iz NCBI bazi konstruisana na osnovu pojedinačnih sekvenci konzerviranih A) *gapA*; B) *icdA* gena



**Prilog 18G.** Filogenetska stabla ispitivanih *D. dianthicola* izolata i drugih *Dickeya* spp. sojeva iz NCBI bazi konstruisana na osnovu pojedinačnih sekvenci konzerviranih A) *mdh*; B) *pgi*; C) *proA* gena





## BIOGRAFIJA

Sanja S. Marković (rođ. Janjatović) rođena je 13.09.1986. godine u Glini (Republika Hrvatska). Osnovne akademske studije na Prirodno-matematičkom fakultetu, Univerziteta u Novom Sadu, upisala je 2005. godine na Departmanu za biologiju i ekologiju, smer Diplomirani biolog. Master akademske studije je završila 2015. godine na Poljoprivrednom fakultetu, Univerziteta u Novom Sadu, na studijskom programu Fitomedicina-Fitopatologija. Školske 2015/16. godine upisala je doktorske akademske studije na Biološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, na modulu Mikrobiologija. Od 2011. do 2019. godine bila je zaposlena u „Deka inženjering” DOO na poziciji Rukovodilac kontrole kvaliteta. Od juna 2019. godine, je zaposlena kao istraživač-pripravnik na Univerzitetu u Beogradu, Institutu za multidisciplinarna istraživanja na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije III 43010, pod nazivom „Modifikacije antioksidativnog metabolizma biljaka sa ciljem povećanja tolerancije na abiotski stres i identifikacija novih biomarkera sa primenom u remedijaciji i monitoringu degradiranih staništa“. U septembru 2020. godine izabrana je u zvanje istraživač-saradnik. Član je Udruženja mikrobiologa Srbije i Društva za zaštitu bilja Srbije.

Do sada je objavila 10 radova u međunarodnim naučnim časopisima i dva rada u časopisima od nacionalnog značaja. Na domaćim i inostranim naučnim skupovima učestvovala je sa 27 saopštenja.

## Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Сања С. Марковић

Број индекса Б3020/2015

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Мониторинг, идентификација и молекуларно-генетичка карактеризација фитопатогених бактерија кромпира (*Solanum tuberosum* L.)

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

**Потпис аутора**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског  
рада**

Име и презиме аутора Сања С. Марковић

Број индекса Б3020/2015

Студијски програм Биологија

Наслов рада Мониторинг, идентификација и молекуларно-генетичка карактеризација  
фитопатогених бактерија кромпира (*Solanum tuberosum* L.)

Ментор др Татјана Поповић Миловановић

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

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

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

**Потпис аутора**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

### Изјава о коришћењу

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

Мониторинг, идентификација и молекуларно-генетичка карактеризација фитопатогених бактерија кромпира (*Solanum tuberosum* L.)

која је моје ауторско дело.

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

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

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

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.

Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

**Потпис аутора**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.