

UNIVERZITET U BEOGRADU  
POLJOPRIVREDNI FAKULTET

Nemanja S. Kuzmanović

IDENTIFIKACIJA, KARAKTERIZACIJA I GENETIČKI  
DIVERZITET SOJEVA *Agrobacterium* spp.,  
PROUZROKOVAČA BAKTERIOZNOG RAKA  
VINOVE LOZE

doktorska disertacija

Beograd, 2013

UNIVERZITET U BEOGRADU  
POLJOPRIVREDNI FAKULTET

Nemanja S. Kuzmanović

IDENTIFIKACIJA, KARAKTERIZACIJA I GENETIČKI  
DIVERZITET SOJEVA *Agrobacterium* spp.,  
PROUZROKOVAČA BAKTERIOZNOG RAKA  
VINOVE LOZE

doktorska disertacija

Beograd, 2013

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF AGRICULTURE

Nemanja S. Kuzmanović

IDENTIFICATION, CHARACTERIZATION AND  
GENETIC DIVERSITY OF STRAINS OF  
*Agrobacterium* spp., GRAPEVINE CROWN GALL  
CAUSAL AGENT

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2013

## **Komisija za ocenu i odbranu:**

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

Članovi komisije: dr Jelica Balaž, redovni profesor  
Univerzitet u Novom Sadu - Poljoprivredni fakultet

dr Veljko Gavrilović, viši naučni saradnik  
Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Beograd

dr Nebojša Marković, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu - Poljoprivredni fakultet

dr Milan Ivanović, docent  
Univerzitet u Beogradu - Poljoprivredni fakultet

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

## Zahvalnica

*Ova doktorska disertacija urađena je u Laboratoriji za fitobakteriologiju Poljoprivrednog fakulteta u Beogradu, i finansirana je iz projekta III46008: "Razvoj integrisanih sistema upravljanja štetnim organizmima u biljnoj proizvodnji sa ciljem prevazilaženja rezistentnosti i unapređenja kvaliteta i bezbednosti hrane". Deo eksperimenata realizovan je u Laboratoriji za fitobakteriologiju, Poljoprivrednog fakulteta u Bolonji, kao i u Laboratoriji za bakteriologiju, Instituta za hortikulturu u Skjernevicama, Poljska.*

*Zahvaljujem se mentoru, prof. dr Aleksi Obradoviću, na predloženoj temi disertacije, nesebičnom angažovanju na izradi, na savetima koji su doprineli kvalitetu ovog rada, kao i na bezrezervnoj podršci i razumevanju.*

*Takođe se zahvaljujem prof. dr Jelici Balaž na korisnim savetima i sugestijama, kao i na pomoći pri prikupljanju literature.*

*Zahvalnost dugujem dr Veljku Gavriloviću na stručnoj pomoći, posebno pri obilasku terena i prikupljanju uzoraka, kao i na konsultacijama tokom rada na disertaciji.*

*Zahvaljujem se prof. dr Nebojši Markoviću na saradnji i savetima tokom izrade doktorske disertacije.*

*Posebno se zahvaljujem kolegama iz Laboratorije za fitobakteriologiju, dr Milanu Ivanoviću, dr Katarini Gašić, Anđelki Prokić i Neveni Blagojević, na pomoći koju su mi pružili u radu.*

*Veliku zahvalnost dugujem prof. dr Asunti Bertaćini i dr Enriku Bjondiju, sa Poljoprivrednog fakulteta u Bolonji, na prenetom znanju i iskustvu, konstruktivnim sugestijama i svesrdnoj pomoći oko realizacije pojedinih faza rada.*

*Zahvaljujem se dr Joani Pulavskoj na saradnji, znanju koje mi je pružila, korisnim predlozima i ustupljenoj literaturi.*

*Takođe se zahvaljujem Ministarstvu prosvete, nauke i tehnološkog razvoja za stipendiranje mojih doktorskih studija.*

*Zahvaljujem se porodici, Ani i prijateljima na razumevanju i podršci da istrajem u ostvarenju programa istraživanja ove disertacije.*

# IDENTIFIKACIJA, KARAKTERIZACIJA I GENETIČKI DIVERZITET SOJEVA *Agrobacterium* spp., PROUZROKOVAČA BAKTERIOZNOG RAKA VINOVE LOZE

**Rezime.** Bakteriozni rak smatra se jednim od najznačajnijih i najrasprostranjenijih bakterioznih oboljenja vinove loze u svetu. Glavni prouzrokovač ovog oboljenja je vrsta *Agrobacterium vitis*. Tokom poslednjih nekoliko godina primećena je izražena pojava bolesti u većini vinogradarskih rejona u Srbiji. Stoga je u ovom radu proučena etiologija bakterioznog raka vinove loze u našoj zemlji. Takođe, izvršena je karakterizacija i proučen genetički diverzitet prouzrokovača bolesti. Primenjene su kako klasične bakteriološke, tako i molekularne metode. U radu su takođe korišćeni i brojni referentni sojevi *A. vitis* poreklom iz međunarodnih kolekcija.

Simptomatični uzorci vinove loze prikupljeni su u 22 lokaliteta, raspoređena u gotovo svim vinogradarskim rejonima u našoj zemlji. Izolacija bakterija vršena je na neselektivne podloge sa manitolom i kvašćevim ekstraktom (YMA). Preliminarna identifikacija izolovanih sojeva, izvedena je primenom PCR metode, korišćenjem prajmera specifičnih za plazmidne (*virC*, *virF*, *virD2*, *ipt*, *tms2*) i hromozomske (*pehA*, 23S rRNK) gene. Među izolovanim sojevima identifikovan je tumorogeni *A. vitis*, a za dalji rad izdvojeno je ukupno 36 reprezentativnih sojeva. Rezultati dobijeni primenom PCR metode potkrepljeni su filogenetskom analizom zasnovanoj na parcijalnoj sekvenci 16S rRNK gena.

Taksonomska pripadnost proučavanih sojeva dalje je potvrđena primenom klasičnih bakterioloških metoda. Svi proučavani sojevi ispoljili su morfološke, odgajivačke i biohemijско-fiziološke odlike karakteristične za vrstu *A. vitis*. Jedini izuzetak bio je soj KFB 243, koji je i pri ponavljanju testa stvaranja kiseline iz eritritola kao izvora ugljenika ispoljio odlike svojstvene vrsti *A. rhizogenes*/biovar 2.

U cilju provere patogenosti proučavanih sojeva, vršena je inokulacija biljaka vinove loze, suncokreta i paradajza. Od ukupno 36 proučavanih sojeva, 34 su prouzrokovala razvoj tipičnih tumora na inokulisanim biljkama vinove loze. U testu patogenosti na biljkama suncokreta i paradajza, zabeležene su značajne varijacije u intenzitetu simptoma, kako unutar pojedinačnog oglada, tako i među različitim

ponavljanjima. Stoga se korišćenje paradajza i suncokreta kao test biljaka, i pored bržeg razvoja simptoma, ne može preporučiti kao pouzdan test.

Među proučavanim sojevima *A. vitis* poreklom iz Srbije ustanovljene su genetičke razlike, vezane kako za hromozomsku, tako i plazmidnu DNK. Od ukupno 36 proučavanih sojeva, Ti plazmid 35 sojeva klasifikovan je kao oktopin/kukumopin (O/C) tip, jedan kao vitopin (V) tip, dok nopalina (N) tip Ti plazmida nije utvrđen. Genetički diverzitet proučavanih sojeva dalje je proučen primenom metoda kojima se vrši analiza sekvenci raspoređenih unutar kompletnog genoma (RAPD, Rep-PCR), a analiziran je i diverzitet pojedinačnih fragmenata prisutnih na hromozomskoj DNK (16S-23S rRNK ITS region, konstitutivni geni) primenom RFLP metode i sekvenciranjem. Na ovaj način ustanovljen je visok stepen genetičke različitosti među sojevima i definisano je više genetičkih grupa. Genotipska srodnost sojeva poreklom iz naše zemlje sa proučavanim sojevima iz inostranstva ukazivala je na njihovo zajedničko poreklo. Pored toga, utvrđeno je postojanje klonalnih grupa unutar proučavane populacije, a postojale su i snažne indicije o prisustvu klonalnih kompleksa unutar vrste *A. vitis*. Takođe, ustanovljena je povezanost između hromozomske i plazmidne DNK kod pojedinih genetičkih grupa.

Prema 10 reprezentativnih sojeva poreklom iz Srbije, testiran je antagonistički efekat soja KFB 0207 (F2/5). Među proučavanim sojevima ustanovljene su razlike u reakciji na uticaj antagonističkog soja, od inhibicije do potpune neosetljivosti.

**Ključne reči:** bakteriozni rak, vinova loza, *Agrobacterium vitis*, Ti plazmid, opin tip, PCR, RAPD, rep-PCR, konstitutivni geni, 16S-23S rRNK ITS region

**Naučna oblast:** Biotehničke nauke

**Uža naučna oblast:** Fitopatologija

**UDK:** 632.35:634.8(043.3)

## **IDENTIFICATION, CHARACTERIZATION AND GENETIC DIVERSITY OF STRAINS OF *Agrobacterium* spp., GRAPEVINE CROWN GALL CAUSAL AGENT**

**Abstract.** Crown gall is one of the most important and widespread bacterial diseases of grapevine throughout the world. It is predominantly caused by *Agrobacterium vitis*. During the last few years, serious outbreaks of the disease were observed in major viticultural regions in Serbia. Therefore, the objective of this research was to study etiology of the grapevine crown gall in this country. Characterization and study of genetic diversity of the pathogen were also performed, using conventional bacteriological and molecular methods. Various reference strains of *A. vitis* originating from international collections were also included.

Symptomatic samples of grapevine were collected from 22 localities distributed in almost all viticultural regions in the country. Isolation of bacteria was performed on non-selective media with mannitol and yeast extract (YMA ). Preliminary identification of the isolated strains was performed using PCR method with primers specific for the plasmid (*virC*, *virF*, *virD2*, *ipt*, *tms2*) and chromosomal (*pehA*, 23S rRNA) genes. Among isolated strains, 36 representative tumorigenic *A. vitis* strains were selected for further study. Results obtained by PCR method were supported by phylogenetic analysis based on partial sequence of 16S rRNA gene.

Taxonomic position of studied strains was further confirmed using conventional bacteriological methods. All the strains showed morphological, biochemical and physiological characteristics of *A. vitis*. The only exception was strain KFB 243, which showed characteristic of *A. rhizogenes*/biovar 2 in test of acid production from erythritol.

Pathogenicity of the strains was studied by inoculation of grapevine, sunflower, and tomato plants. Out of 36 strains studied, 34 caused development of typical tumors on inoculated grapevine. In pathogenicity assay on tomato and sunflower plants, considerable variations in the intensity of symptoms were recorded, both within a single experiment, and among different repetitions. Therefore, use of tomato and sunflower as



test plants, despite the rapid symptom development, cannot be recommended as a reliable test.

Among studied strains of *A. vitis* originating from Serbia, genetic differences related to chromosomal and plasmid DNA were observed. Out of 36 strains studied, Ti plasmid of 35 strains was classified as octopine/cucumopine (O/C) type, one as vitopine (V) type, while nopaline (N) type of Ti plasmid was not detected. Genetic diversity of strains was further studied by the methods targeting sequences distributed throughout the entire genome (RAPD, Rep-PCR) and particular fragments present on chromosomal DNA (16S-23S rRNA ITS region, housekeeping genes) using RFLP and sequencing. Thus, high level of genetic diversity among strains was determined. Genotypic relatedness of Serbian strains to the strains originating from other countries suggests their common origin. In addition, the existence of clonal groups within the studied population was detected and there were strong indications of the presence of clonal complexes within the species *A. vitis*. Also, association between the chromosomal and plasmid DNA of particular genetic groups were found.

Antagonistic effect of strain KFB 0207 (F2/5) to 10 representative strains originating from Serbia was tested. Differences in the response to the effect of antagonistic strain were determined, from inhibition to complete insensitivity.

**Key words:** crown gall, grapevine, *Agrobacterium vitis*, Ti plasmid, opine type, PCR, RAPD, rep-PCR, housekeeping genes, 16S-23S rRNA ITS region

**Scientific field:** Biotechnical Science

**Scientific discipline:** Phytopathology

**UDC:** 632.35:634.8(043.3)

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1 Istorijat proučavanja bakterioznog raka vinove loze .....	1
1.2 Rasprostranjenost i ekonomski značaj bakterioznog raka vinove loze.....	2
1.3 Spektar domaćina <i>Agrobacterium</i> spp. ....	3
1.4 Infekcioni proces i epidemiologija bakterioznog raka vinove loze .....	3
1.5 Simptomi bakterioznog raka vinove loze .....	5
2. PREGLED LITERATURE .....	7
2.1 Taksonomija roda <i>Agrobacterium</i> .....	7
2.1.1 Taksonomski položaj roda <i>Agrobacterium</i> .....	8
2.1.2 Klasifikacija na osnovu patogenih odlika sojeva .....	8
2.1.3 Prirodna klasifikacija.....	9
2.1.4 Predlozi revizije taksonomije i pripajanje rodu <i>Rhizobium</i> .....	12
2.1.5 Genomske i novoopisane vrste.....	12
2.2 Detekcija i identifikacija <i>Agrobacterium</i> vrsta .....	16
2.2.1 Izolacija patogena.....	16
2.2.2 Određivanje patogenosti.....	18
2.2.2.1 Test patogenosti .....	18
2.2.2.2 PCR.....	18
2.2.3 Diferencijacija do nivoa vrste/biovara .....	21
2.2.3.1 Biohemijsko-fiziološki testovi.....	21
2.2.3.2 Serološke metode.....	23
2.2.3.3 Molekularne metode .....	23
2.2.3.4 Automatizovane metode .....	24
2.2.3.5 Ostale metode .....	25
2.2.4 Detekcija <i>Agrobacterium</i> spp. u biljnom tkivu i zemljištu .....	26
2.3 Diverzitet <i>Agrobacterium</i> spp.....	27
2.3.1 Struktura populacija fitopatogenih <i>Agrobacterium</i> spp. ....	28
2.3.2 Organizacija genetičkog materijala <i>Agrobacterium</i> spp. ....	29
2.3.3 pTi/pRi .....	30
2.3.3.1 Opin tip.....	31

2.3.3.2 T-DNK.....	32
2.3.3.3 <i>Vir</i> region.....	34
2.3.4 Genetički diverzitet <i>Agrobacterium</i> spp. ....	34
2.3.4.1 Sojevi poreklom iz vinove loze .....	38
2.3.4.2 Sojevi poreklom iz voćaka, ukrasnih i šumskih vrsta .....	39
2.3.4.3 Sojevi poreklom iz zemljišnih ekosistema .....	40
2.4 Proučavanje <i>Agrobacterium</i> spp. u Srbiji.....	41
3. RADNA HIPOTEZA .....	43
4. MATERIJAL I METODE.....	44
4.1 Obilazak terena i uzorkovanje biljnog materijala .....	44
4.2 Izolacija patogena i sojevi korišćeni u radu.....	44
4.3 Molekularna detekcija pTi i identifikacija sojeva.....	45
4.3.1 Priprema uzoraka DNK.....	50
4.3.2 PCR analiza.....	50
4.3.3 Sekvenciona analiza 16S rRNK gena.....	55
4.4 Patogene odlike sojeva.....	56
4.5 Morfološke, odgajivačke i biohemijsko-fiziološke odlike.....	57
4.5.1 Reakcija po Gramu.....	57
4.5.2 Razvoj pri 35°C.....	58
4.5.3 Razvoj u podlozi sa 2% NaCl .....	58
4.5.4 Aktivnost oksidaze .....	58
4.5.5 Stvaranje 3-ketolaktoze .....	59
4.5.6 Formiranje prosvetljenih zona na KDA-CaCO <sub>3</sub> podlozi .....	59
4.5.7 Pokretljivost pri pH 7,0 .....	60
4.5.8 Razvoj i pigmentacija u podlozi sa feri-amonijum-citratom.....	60
4.5.9 Korišćenje citrata.....	61
4.5.10 Stvaranje kiseline iz saharoze, eritritola i melezitaze .....	61
4.5.11 Stvaranje baze iz tartarata .....	61
4.6 Karakterizacija Ti plazmida.....	62
4.7 Genetički diverzitet sojeva.....	63
4.7.1 Ekstrakcija DNK .....	63
4.7.2 RAPD .....	65

4.7.3 Rep-PCR.....	66
4.7.4 Analiza konstitutivnih gena.....	66
4.7.5 Analiza 16S-23S rRNK ITS regiona.....	69
4.8 Osetljivost prema antagonističkom soju KFB 0207 (F2/5) .....	72
5. REZULTATI.....	73
5.1 Rasprostranjenost i simptomi bakterioznog raka vinove loze u Srbiji .....	73
5.2 Izolacija patogena .....	73
5.3 Molekularna analiza sojeva.....	75
5.3.1 Detekcija pTi/pRi i identifikacija sojeva.....	75
5.3.2 Sekvenciona analiza 16S rRNK gena.....	81
5.3.4 Specifičnost prajmera korišćenih u identifikaciji patogenih <i>A. vitis</i> .....	82
5.4 Patogene odlike sojeva.....	82
5.5 Morfološke, odgajivačke i biohemijsko-fiziološke odlike.....	85
5.6 Karakterizacija Ti plazmida.....	86
5.7 Genetički diverzitet sojeva.....	87
5.7.1 RAPD i Rep-PCR.....	87
5.7.2 Analiza konstitutivnih gena.....	94
5.7.3 Analiza 16S-23S rRNK ITS regiona.....	101
5.8 Osetljivost prema antagonističkom soju KFB 0207 (F2/5) .....	106
6. DISKUSIJA.....	108
7. ZAKLJUČAK .....	122
8. LITERATURA.....	123

# 1. UVOD

Vinogradarstvo predstavlja važnu granu poljoprivrede u svetu. Ekonomski značaj gajenja vinove loze zasniva se, pre svega, na visokom intenzitetu proizvodnje i mogućnosti korišćenja zemljišta na kojima se osim vinove loze ne može gajiti većina drugih biljaka. Površine pod vinovom lozom u svetu, u 2011. godini, iznosile su 7 585 000 hektara, a zabeležen je trend smanjenja površina od 2003. godine (OIV, 2012). U Srbiji, gajenje vinove loze i proizvodnja vina imaju viševjekovnu tradiciju. Vinova loza se u 2011. godini gajila na 56 434 ha (RZS, 2012). Imajući u vidu da je 1995. godine pod vinogradima zabeleženo 140 000 ha, evidentno je značajno smanjenje površina pod ovom kulturom u našoj zemlji. Poslednjih godina uloženi su naponi, koji su sa manje ili više uspeha, doprineli obnavljanju vinogradarske proizvodnje u Srbiji. Ipak, gajenje vinove loze u određenoj meri mogu ograničiti različita oboljenja prouzrokovana fitopatogenim gljivama, bakterijama, virusima i fitoplazmama.

Bakteriozni rak smatra se jednim od najznačajnijih i najrasprostranjenijih bakterioznih oboljenja vinove loze (*Vitis vinifera* L.) u svetu, a prouzrokuje ga vrsta *Agrobacterium vitis* (Burr i sar., 1998; Burr i Otten, 1999). Međutim, u ređim slučajevima, iz obolelih biljaka vinove loze izolovani su tumorogeni sojevi *Agrobacterium tumefaciens*/biovar 1 i *Agrobacterium rhizogenes*/biovar 2 (Panagopoulos i Psallidas, 1973; Panagopoulos i sar., 1978; Burr i Katz, 1983; 1984; Süle, 1978; Al-Momani i Abussaud, 1990; Thies i sar., 1991; Ridé i sar., 2000; Argun i sar., 2002; Genov i sar., 2006a; Bini i sar., 2008b; López i sar., 2008; Kawaguchi i Inoue, 2009; Palacio-Bielsa i sar., 2009; Rouhrazi i Rahimian, 2012a; Abdellatif i sar., 2013), kao i novoopisana vrsta *Rhizobium nepotum* (Puławska i sar., 2012a).

## 1.1 Istorijat proučavanja bakterioznog raka vinove loze

Prvi pisani podatak o raku vinove loze potiče iz XIX veka, kada su Fabre i Dunal (1853) opisali ovo oboljenje u Francuskoj. Bakteriozna priroda raka vinove loze utvrđena je u Italiji, krajem XIX veka (Cavara, 1897). Iz biljaka vinove loze sa simptomima raka, izolovana je bakterija, koja je nazvana *Bacillus ampelopsorae*, i

dokazana je njena patogenost. Ovo je ujedno i prvi podatak o bakterijama kao prouzročivačima oboljenja raka na biljkama. Deset godina kasnije, u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD), Smith i Townsend (1907) identifikovali su bakteriju, koju su nazvali *Bacterium tumefaciens*, kao prouzročivača bakterioznog raka ukrasne vrste *Argyranthemum frutescens*. U narednim godinama sprovodila su se istraživanja u cilju otkrivanja mehanizma razvoja tumora. Kao uzrok tumorogeneze naveden je tzv. tumor-indukujući princip (eng. tumor-inducing principle, TIP) koji potiče iz *Agrobacterium* sp. i prenosi se u ćeliju domaćina (Braun, 1947). Kasnije, tokom 70-ih godina 20. veka, utvrđeno je da je TIP zapravo transferna DNK (T-DNK; eng. transfer DNA), koja je sastavni deo tumorogenog (eng. tumor-inducing, Ti) plazmida bakterije (Zaenen i sar., 1974; Chilton i sar., 1977).

## **1.2 Rasprostranjenost i ekonomski značaj bakterioznog raka vinove loze**

Bakteriozni rak vinove loze, prouzrokovan bakterijom *A. vitis*, ustanovljen je u gotovo svim evropskim zemljama gde se gaji vinova loza (Panagopoulos i Psallidas, 1973; Süle, 1978; Bazzi i Burr, 1986; López i sar., 1988; Bien i sar., 1989; Ridé i sar., 2000; Genov i sar., 2006a; Zidarič, 2009), u Severnoj i Južnoj Americi (Burr i Hurwitz, 1981; Dhanvantari, 1983; De Oliveira i sar., 1994), Kini (Ma i sar., 1987), Japanu (Sawada i sar., 1990), Jugozapadnoj Aziji (Al-Momani i Abussaud, 1990; Haas i sar., 1991; Mohammadi i Fatehi-Paykani, 1999; Argun i sar., 2002; Al-Momani i sar., 2006; Al-Karablieh, 2006), Australiji (Ophel i sar., 1988), kao i u Severnoj i Južnoj Africi (Loubser, 1978; Tolba i Zaki, 2011; Chebil i sar., 2013). U Srbiji, bakteriozni rak vinove loze je prvi put uočen 1962. godine na području trsteničkog vinogorja, na sorti Kardinal uveženoj iz Italije (Panić, 1973).

Štetni efekti bakterioznog raka vinove loze ogledaju se u smanjenju bujnosti i prinosa zaraženih biljaka i do 40% (Schroth i sar., 1988). U težim slučajevima, ovo oboljenje može prouzrokovati izumiranje pojedinih organa ili čitavih čokota. Izumiranje je posebno izraženo kod mladih biljaka, kada oboljenje zahvati spojno mesto podloge i plemke. Bolest je izuzetno destruktivna u rasadnicima, gde negativno utiče na srastanje i prijem kalemova, dok biljke sa vidljivim simptomima gube tržišnu vrednost i moraju biti odbačene. U ekonomskom smislu, štete od *Agrobacterium* spp. na voćnim vrstama i

vinovoj lozi na nivou SAD su procenjene na višemilionske iznose na godišnjem nivou (Kennedy i Alcorn, 1980).

### **1.3 Spektar domaćina *Agrobacterium* spp.**

Bakteriozni rak se pojavljuje na mnogim ekonomski značajnim gajenim vrstama, pretežno na voćkama, vinovoj lozi i ukrasnim biljkama. U *in vitro* ogledima, od ukupno 1193 testirane biljne vrste (pretežno golosemenice i dikotiledone skrivenosemenice), 643 bilo je osetljivo prema oboljenju (De Cleene i De Ley, 1976). Sa druge strane, oboljenju su podložne i monokotiledone vrste (De Cleene, 1985; Conner i Dommissie, 1992).

Patogene vrste roda *Agrobacterium* mogu imati širok spektar domaćina, ali postoje i usko specijalizovani sojevi (Anderson i Moore, 1979). *A. tumefaciens*/biovar 1 i *A. rhizogenes*/biovar 2 označavaju se kao vrste koje imaju širok spektar domaćina, dok su *A. vitis*, *Agrobacterium rubi* i *Agrobacterium larrymoorei* nešto specijalizovanije prema domaćinu. Tako je *A. vitis* izolovan isključivo iz biljaka vinove loze, ako se izuzme nalaz na kiviju u Japanu (Sawada i Ieki, 1992a). Međutim, inokulacijom različitih test biljaka utvrđeno je da kod vrste *A. vitis* postoje sojevi koji imaju širi ili uži spektar domaćina (Burr i Otten, 1999). *A. rubi* je izolovan uglavnom iz biljaka *Rubus* spp. i *Vaccinium corymbosum* (Hildebrand, 1940; Alippi i sar., 2009), dok je u *in vitro* ogledima ova vrsta ispoljila infektivnost prema širokom spektru biljaka (Anderson i Moore, 1979; Sawada i sar., 1992a).

### **1.4 Infekcioni proces i epidemiologija bakterioznog raka vinove loze**

Infekcioni proces tumorogenih vrsta roda *Agrobacterium* je veoma kompleksan i predstavlja svojevrsan prenos genetičkog materijala iz bakterije u biljku (Zhu i sar, 2000; Zupan i sar., 2000; McCullen i Binns, 2006). Patogenost je prvenstveno uslovljena prisustvom Ti plazmida (pTi) u genomu bakterije (Van Larebeke i sar., 1974; Watson i sar., 1975). Uopšteno, glavne komponente pTi uključuju T-DNK, gene virulentnosti (*vir* region) i gene odgovorne za katabolizam opina i konjugaciju plazmida.

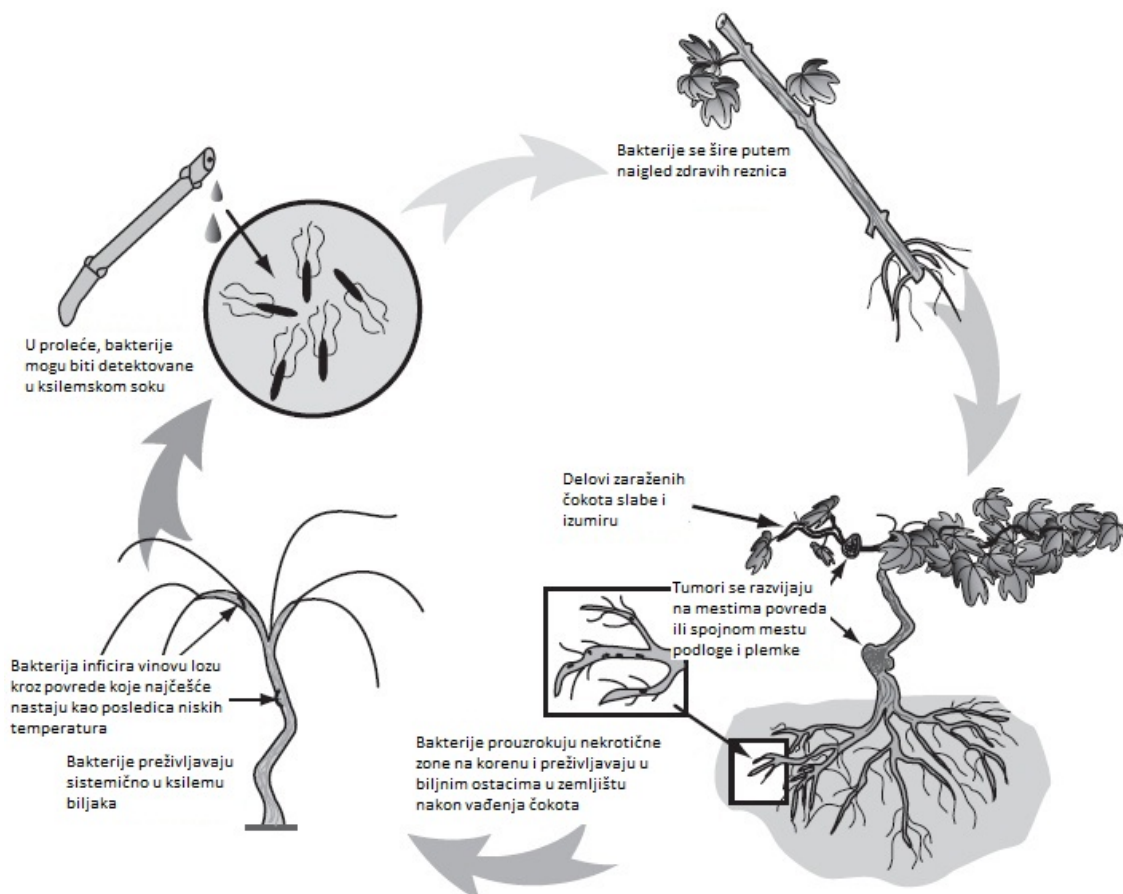
Infekcija se odigrava kroz povrede, koje najčešće nastaju dejstvom niskih temperatura tokom zime ili kao posledica kalemljenja. U toplijim regionima, kao što su Južna Afrika i Izrael, visoke temperature i vlažnost su od podjednakog značaja u nastajanju povreda (Burr i sar., 1998). Bakterije bivaju privučene signalnim molekulima koje oslobađa povređena biljka i pričvršćuju se neposredno uz rane. Zatim dolazi do prenosa i ugradnje fragmenta pTi (T-DNK) u biljni genom, što je proces koji je prvenstveno kontrolisan aktivnošću *vir* gena. Ekspresijom gena prisutnih na T-DNK dolazi do nekontrolisane proizvodnje biljnih hormona auksina i citokinina, što dovodi do proliferacije biljnog tkiva i razvoja tumora. Nakon ostvarene infekcije tumori se mogu razvijati i bez prisustva patogena (White i Braun, 1942). T-DNK takođe sadrži gene odgovorne za sintezu posebne grupe jedinjenja, tzv. opina. Opini su derivati L-amino kiselina i prostih karbonilnih jedinjenja primarnog metabolizma, koje kao izvor hranljivih materija koriste *Agrobacterium* spp., a stimulatивно deluju i na konjugaciju pTi (Chilton i sar., 2001; Kerr i sar., 1977; Ellis i sar., 1982; Dessaux i sar., 1998; Otten i sar., 2008).

*A. vitis* sistemično zaražava vinovu lozu, prisutan je u ksilemu i može se kretati provodnim tkivom domaćina (Lehoczky, 1968; Tarbah i Goodman, 1987; Slika 1). Patogen može biti neravnomerno rasprostranjen u biljci i populaciona dinamika u pojedinim biljnim delovima može varirati u zavisnosti od sorte i doba godine (Lehoczky, 1968; Bauer i sar., 1994; Burr i sar., 1998). Prisustvo *A. vitis* nije utvrđeno u zelenim lastarima i pupoljcima vinove loze (Burr i sar., 1988), što može biti posledica niske osetljivosti korišćenih metoda detekcije. Tako je utvrđeno da se *A. vitis* može održati u latentnom obliku u vinovoj lozi dobijenoj iz zelenih pupoljaka, u laboratorijskim uslovima (Poppenberger i sar., 2002). Ukoliko se pri proizvodnji loznih kalemova koriste vioke iz zaraženih matičnih vinograda, patogen može biti raširen na velike udaljenosti putem naizgled zdravog sadnog materijala (Lehoczky i sar., 1971; Burr i Katz, 1984; Burr i sar., 1998; Slika 1). Dakle, patogen može biti latentno prisutan u asimptomatičnom materijalu, sve dok se ne uspostave povoljni uslovi za razvoj bolesti.

*A. vitis* se održava u zemljištu, i to u rizosferi, u blizini zaraženih čokota, kao i nekoliko godina u saprofitnoj fazi, u biljnim ostacima vinove loze (Burr i sar., 1987b; Bishop i sar., 1988; Burr i sar., 1995; Slika 1). S obzirom da se delovi korena vinove



loze mogu održati u zemljištu duži vremenski period nakon vađenja čokota, zajedno sa njima preživljava i *A. vitis* predstavljajući potencijalni izvor infekcije.



Slika 1. Bakteriozni rak vinove loze - ciklus oboljenja (Burr i sar., 1998)

### 1.5 Simptomi bakterioznog raka vinove loze

Simptomi bakterioznog raka ispoljavaju se u vidu tumora na nadzemnim organima vinove loze, pretežno na prizemnom stablu, oko spojnog mesta podloge i plemke, ali i na kracima i lukovima čokota, nekada i do jednog metra iznad površine zemljišta (Arsenijević, 1997; Burr i sar., 1998; Burr i Otten, 1999). Prvi simptomi pojavljuju se početkom proleća i najčešće su neupadljivi, s obzirom da su tumori u početnim fazama prekriveni mrtvom korom stabla. Novoformirani tumori su beličaste do svetlo žute, svetlo zelene ili ružičaste boje. Daljim razvojem bolesti tumori se uvećavaju, mogu biti lokalizovani i pojedinačni, ili dolazi do razvoja dužih kontinuiranih zadebljanja cilindričnog, sferičnog ili kruškastog oblika, koja u najtežim

slučajevima u potpunosti opasavaju stablo. Na ovaj način protok hranljivih materija i vode u biljci je otežan. Tokom jeseni tkivo tumora postaje tamno-mrke boje, hrapavo, uz prisustvo mnogobrojnih pukotina. Kako tumorogeni, tako i netumorogeni sojevi *A. vitis* prouzrokuju nekrozu korena i njegovo propadanje (Burr i sar, 1987a). Propadanje korena je prouzrokovano enzimom poligalakturonazom, čija je sinteza kontrolisana hromozomskim *pehA* genom (McGuire i sar., 1991; Rodriguez-Palenzuela i sar., 1991).

## 2. PREGLED LITERATURE

### 2.1 Taksonomija roda *Agrobacterium*

Taksonomija je naučna disciplina koja se bavi klasifikovanjem živih organizama. Taksonomija bakterija sastoji se iz tri odvojene, ali međusobno povezane oblasti: klasifikacije, nomenklature i identifikacije (Brenner i sar., 2005). Klasifikacija je svrstavanje organizama u grupe (taksoni) na osnovu njihove sličnosti, odnosno povezanosti. Nomenklatura je dodeljivanje imena taksonskim grupama prema međunarodnim pravilima (eng. International Code of Nomenclature of Bacteria; Lapage i sar., 1992), dok identifikacija predstavlja praktičnu primenu klasifikacionih šema u cilju određivanja identiteta soja, kao člana već definisanog taksona ili do sada neidentifikovane vrste. Za klasifikaciju bakterija potrebno je posedovati informacije o njihovim morfološkim, biohemijskim, fiziološkim i genetičkim karakteristikama. U modernoj taksonomiji bakterija, genetičke informacije predstavljaju glavni kriterijum za razdvajanje taksona. Shodno tome, formulisana je filogenetska definicija vrste (genomske vrste), gde mogu biti uključeni sojevi sa DNK-DNK sličnošću od 70% i više, kao i sa razlikom u temperaturi topljenja DNK jednakom ili manjom od 5°C (Wayne i sar., 1987). Novije metode, kao što su sekvencionana analiza 16S rDNK, metode kojima se vrši analiza čitavog genoma gde spadaju: polimorfizam dužine amplifikovanih restrikcionih fragmenata (eng. amplified fragment length polymorphism, AFLP), metoda nasumičnog umnožavanja polimorfne DNK (eng. random amplified polymorphic DNA, RAPD), umnožavanje na osnovu repetitivnih sekvenci (eng. repetitive sequence-based PCR, Rep-PCR) i makrorestrikciona analiza i elektroforeza u pulsirajućem električnom polju (eng. pulsed field gel electrophoresis, PFGE), ali i metode kojima se analiziraju tzv. konstitutivni (eng. housekeeping) geni (analiza multilokusnih sekvenci; eng. multilocus sequence analysis, MLSA) i sekvenciranje čitavog genoma, danas zauzimaju važno mesto u taksonomskim studijama (Stackebrandt i sar., 2002). Među pomenutim metodama, posebno perspektivna je MLSA, kojom bi mogao da se postigne značajan doprinos u različitim taksonomskim studijama (Gevers i sar., 2005).

Taksonomija roda *Agrobacterium* još uvek nije definisana na adekvatan i opšteprihvaćen način i u procesu je revizije. Poslednjih godina, klasifikacija predstavnika ovog roda predmet je brojnih debata, s obzirom da na ovom planu i dalje postoje određeni sporni elementi i otvorena pitanja.

### 2.1.1 Taksonomski položaj roda *Agrobacterium*

Termin *Agrobacterium* (grč. agros - polje; grč. bakterion - sitan štapić) u bukvalnom prevodu znači sitan poljski štapić. U trenutku kada je ustanovljen, rod *Agrobacterium* sastojao se prvenstveno od dve fitopatogene vrste: *A. tumefaciens*, prouzrokovača tumora na različitim biljnim delovima, *A. rhizogenes*, prouzrokovača kosmatosti korena, i jedne nepatogene vrste *Agrobacterium radiobacter* (Conn, 1942). Taksonomski položaj roda *Agrobacterium* predstavljen je u Tabeli 1.

**Tabela 1.** Taksonomski položaj roda *Agrobacterium*

Taksonomska kategorija	Ime
Domen	<i>Bacteria</i>
Razdeo	<i>Proteobacteria</i>
Klasa	<i>Alphaproteobacteria</i>
Red	<i>Rhizobiales</i>
Familija	<i>Rhizobiaceae</i>
Rod	<i>Agrobacterium</i>

### 2.1.2 Klasifikacija na osnovu patogenih odlika sojeva

Kada su imena *A. tumefaciens* (prvobitno *Bacterium tumefaciens*) i *A. rhizogenes* (prvobitno *Phytomonas rhizogenes*) predložena prvi put, odnosila su se na patogene karakteristike sojeva, odnosno na simptome koje su prouzrokovali (Smith i Townsend, 1907; Riker i sar., 1930). Termin “tumefaciens” znači “načiniti tumor” (lat. tumor - otekline, izraslina, tumor; lat. facere - raditi, činiti, načiniti), dok “rhizogenes” znači “načiniti koren” (grč. rhiza - koren; grč. gennao - raditi, činiti, načiniti). Nepatogeni predstavnik roda izolovan je iz zemljišta i nazvan *A. radiobacter* (prvobitno *Bacillus radiobacter*), zbog karakterističnih zvezdastih formacija ćelija bakterija u bojenim preparatima (lat. radius - snop, zrak; nlat. radio - koji se odnosi na zračenje;

Beijerinck i van Velden, 1902). Sojevi koji su imali relativno uzak krug domaćina u prirodi, pretežno ograničen na *Rubus* spp., definisani su kao vrsta *A. rubi*, prvobitno *Phytomonas rubi* (Hildebrand, 1940). Otuda potiče i ime vrste *A. rubi* (lat. rubi - koji pripada *Rubus* sp.). Međutim, patogenost *Agrobacterium* spp. određena je prisustvom Ti ili rizogenog (Ri, root-inducing) plazmida (pRi) u genomu bakterije. S obzirom da su plazmidi mobilni genetički elementi i da u prirodi može doći do njihovog gubitka ili razmene među sojevima (Kerr, 1969; Kerr i sar., 1977), klasifikacija na osnovu patogenih odlika sojeva nije održiva.

### 2.1.3 Prirodna klasifikacija

Keane i sar. (1970) su izrazili kritiku taksonomije bazirane na patogenim odlikama sojeva. Na osnovu određenih biohemijskih i seroloških metoda, i analize protein, podelili su testirane sojeve roda *Agrobacterium* u dve različite grupe ili biotipa (biovara), nezavisno od njihovih patogenih odlika. Oni su predložili da se svi predstavnici roda uključe u jednu vrstu, *A. radiobacter*, gde se posebno navodio biotip, a patogene karakteristike su označene varijetalnim epitetom (Tabela 2). Kasnije studije, koje su uključile numeričku analizu fenotipskih odlika (White, 1972; Kersters i sar., 1973; Holmes i Roberts, 1981), biohemijske i fiziološke testove (Kersters i sar., 1973; Kerr i Panagopoulos, 1977; Süle, 1978; Holmes i Roberts, 1981), analizu DNK:DNK hibrida (De Ley i sar., 1973; De Ley, 1974), rastvorljivih proteina (Kersters i De Ley, 1975) i masnih kiselina (Sawada i sar., 1992e; Jarvis i sar., 1996) potvrdile su rezultate Keane i sar. (1970) i dovele do definisanja bar tri genetički i fenotipski različite grupe koje nisu zavisile od patogenih karakteristika sojeva. Pored glavne dve grupe koje su odgovarale biotipovima 1 i 2, definisan je i biotip 3, u koji su uključeni sojevi iz vinove loze (Panagopoulos i Psallidas, 1973; Kerr i Panagopoulos, 1977; Panagopoulos i sar., 1978; Süle, 1978).

Holmes i Roberts (1981) su predložili prirodnu klasifikaciju nezavisnu od patogenih odlika. Ovi autori su dva biotipa diferencirana na osnovu numeričke taksonomske analize (Keane i sar., 1970), uzdigli na nivo vrste. Predloženo je ime *A. tumefaciens* za biotip 1 i *A. rhizogenes* za biotip 2, dok bi fitopatogene karakteristike

**Tabela 2.** Poređenje različitih nomenklatura korišćenih za *Agrobacterium/Rhizobium* kompleks vrsta

Imena vrsta na osnovu prirodne klasifikacije			Imena vrsta na osnovu patogenih karakteristika	
Nakon Young i sar., (2001)	Nakon Holmes i Roberts (1981); Bradbury (1986); Holmes (1988); Moore i sar. (2001) <sup>c</sup>	Nakon Keane i sar. (1970); Kerr i Panagopoulos (1977); Panagopoulos i sar. (1978) <sup>c</sup>	Nakon Kersters i De Ley (1984) <sup>c</sup>	Nakon Allen i Holding (1974); Skerman i sar. (1980) <sup>c</sup>
<i>R. radiobacter</i> (Ti) <sup>a</sup>	<i>A. tumefaciens</i> (tumorogeni)	<i>A. radiobacter</i> var. <i>tumefaciens</i> (biotip 1)	<i>A. tumefaciens</i> (biovar 1)	<i>A. tumefaciens</i>
<i>R. radiobacter</i> (Ri)	<i>A. tumefaciens</i> (rizogeni)	<i>A. radiobacter</i> var. <i>rhizogenes</i> (biotip 1)	<i>A. rhizogenes</i> (biovar 1)	<i>A. rhizogenes</i>
<i>R. radiobacter</i>	<i>A. tumefaciens</i> (nepatogeni)	<i>A. radiobacter</i> var. <i>radiobacter</i> (biotip 1)	<i>A. radiobacter</i> (biovar 1)	<i>A. radiobacter</i>
<i>R. rhizogenes</i> (Ti)	<i>A. rhizogenes</i> (tumorogeni)	<i>A. radiobacter</i> var. <i>tumefaciens</i> (biotip 2)	<i>A. tumefaciens</i> (biovar 2)	<i>A. tumefaciens</i>
<i>R. rhizogenes</i> (Ri)	<i>A. rhizogenes</i> (rizogeni)	<i>A. radiobacter</i> var. <i>rhizogenes</i> (biotip 2)	<i>A. rhizogenes</i> (biovar 2)	<i>A. rhizogenes</i>
<i>R. rhizogenes</i>	<i>A. rhizogenes</i> (nepatogeni)	<i>A. radiobacter</i> var. <i>radiobacter</i> (biotip 2)	<i>A. radiobacter</i> (biovar 2)	<i>A. radiobacter</i>
<i>R. vitis</i> (Ti)	<i>A. vitis</i> (tumorogeni)	<i>A. radiobacter</i> var. <i>tumefaciens</i> (biotip 3)	<i>A. tumefaciens</i> (biovar 3)	NZ
<i>R. vitis</i>	<i>A. vitis</i> (nepatogeni)	NZ	NZ	NZ
<i>R. rubi</i> <sup>b</sup>	<i>A. rubi</i> <sup>b</sup>	<i>A. radiobacter</i> var. <i>tumefaciens</i> (biotip 2)	<i>A. rubi</i>	<i>A. rubi</i>
<i>R. larrymoorei</i> <sup>b</sup>	<i>A. larrymoorei</i> <sup>b</sup>	NZ	NZ	NZ
<i>R. skierniewicense</i> <sup>b</sup>	NZ	NZ	NZ	NZ
<i>R. nepotum</i> <sup>b</sup>	NZ	NZ	NZ	NZ

<sup>a</sup> patogene karakteristike naznačene su po potrebi u cilju pojašnjenja;

<sup>b</sup> poznata je jedino tumorogena sposobnost ove vrste;

<sup>c</sup> NZ, nije zabeleženo.

bile navedene u zavisnosti da li je soj tumorogen (Ti), rizogen (Ri) ili nepatogen (Tabela 2). Vrsta *A. rubi* diferencirana je na osnovu fenotipskih i genetičkih odlika (Holmes i Roberts, 1981; Kersters i De Ley, 1984; Popoff i sar., 1984; Sawada i Ieki, 1992b). Koncept prirodne klasifikacije je podržan i dopunjen od jednog dela naučne javnosti (Popoff i sar., 1984; Bradbury, 1986; Sawada i sar., 1993; Moore i sar., 2001; Young i sar., 2005).

Uprkos brojnim argumentima protiv, klasifikacija na osnovu patogenih odlika i dalje je ostala snažno podržana (Allen i Holding, 1974; Skerman i sar. 1980; Kersters i De Ley, 1984). Iako su Kersters i De Ley (1984) nastavili da podržavaju klasifikaciju na osnovu patogenih odlika, uvažili su prethodne studije koje su se bavile prirodnom klasifikacijom i prihvatili koncept fenotipske vrste i diferenciranje patogena na biovare (Tabela 2).

Grupa sojeva sa vinove loze diferencirana je i svrstana u biovar 3 na osnovu biohemijskih i fizioloških odlika (Panagopoulos i Psallidas, 1973; Kerr i Panagopoulos, 1977; Panagopoulos i sar., 1978; Süle, 1978), a kasnije i na osnovu serološke analize korišćenjem monoklonalnih antitela (Bishop i sar., 1989). Ophel i Kerr (1990) su na osnovu fenotipskih, seroloških i genetičkih odlika sojeva koji su ranije svrstavani u biovar 3 definisali novu vrstu, pod nazivom *A. vitis* (lat. vitis - od vinove loze).

U diferenciranju *Agrobacterium* vrsta/biovara korišćene su i metode kojima se analizira čitav genom kao što su RAPD (Irelan i Meredith, 1996) i AFLP (Mougel i sar., 2002; Portier i sar., 2006). Jasna diferencijacija između *Agrobacterium* vrsta/biovara postignuta je metodom polimorfizma dužine restrikcionih fragmenata (eng. restriction fragment length polymorphism, RFLP) ili sekvencionom analizom 16S i 23S rRNK gena, kao i regiona između ovih gena (eng. internal transcribed spacer, ITS; Sawada i sar., 1992d; Sawada i sar., 1993; Ponsonnet i Nesme, 1994; Oger i sar., 1998; Puławska i sar., 2000; Young i sar., 2001; Young i sar., 2004; Kwon i sar., 2005; Martens i sar., 2008; Bautista-Zapanta i sar., 2009). Takođe, u ovu svrhu se može koristiti i sekvencionu analiza konstitutivnih gena (Martens i sar., 2007; Martens i sar., 2008; Costechareyre i sar., 2010; Aujoulat i sar., 2011; Puławska i Kałużna, 2011; Puławska i sar., 2012a; Puławska i sar., 2012b; Shams i sar., 2013).

#### 2.1.4 Predlozi revizije taksonomije i pripajanje rodu *Rhizobium*

Različiti pristupi u klasifikaciji vrsta roda *Agrobacterium* doveli su do izvesnih nedoumica u imenovanju nekih vrsta. Pojedini autori smatraju da ime *A. radiobacter* ima prioritet u odnosu na *A. tumefaciens*, o čemu su vođene brojne polemike (Sawada i sar., 1993; Bouzar, 1994; Young i sar., 2001; 2006). Radikalan predlog revizije taksonomije predložili su Young i sar. (2001), koji su se založili da se predstavnici ovog roda pripoje rodu *Rhizobium* (Tabela 2). Naime, sekvencionana analiza 16S rDNK i 23S rDNK ukazivala je na međusobnu isprepletanost predstavnika rodova *Rhizobium* i *Agrobacterium* (Sawada i sar., 1993; Willems i Collins, 1993; Puławska i sar., 2000; Young i sar., 2001; 2004). Ovaj predlog postao je predmet široke diskusije u naučnim krugovima (Farrand i sar., 2003; Young i sar., 2003). Brojni autori smatrali su da grupisanje *Agrobacterium* spp. unutar roda *Rhizobium* nije u dovoljnoj meri potkrepljeno i založili se za zadržavanje roda *Agrobacterium* (Farrand i sar., 2003). Međunarodno telo koje se bavi taksonomijom rodova *Agrobacterium* i *Rhizobium* (The subcommittee on the taxonomy of *Agrobacterium* and *Rhizobium*) prepustilo je naučnoj javnosti da izabere koja imena žele da upotrebljavaju (Lindström i Martinez-Romero, 2002).

#### 2.1.5 Genomske i novoopisane vrste

Prateći savremeni pristup u klasifikaciji bakterija i definiciju genomske vrste, u slučaju roda *Agrobacterium* se kao autentične vrste mogu izdvojiti *A. rubi* i *A. vitis* (Popoff i sar., 1984; Ophel i Kerr, 1990). Nedavno je opisana i izdvojena nova vrsta *A. larrymoorei* (Bouzar i Jones, 2001). Sojevi *A. larrymoorei* izolovani su iz tumora biljaka fikusa na Floridi (Bouzar i sar., 1995a). Ime “larrymoorei” dodeljeno je ovoj vrsti u čast istaknutog fitopatologa Larija Mura, koji je posvetio svoju karijeru proučavanju bakterija roda *Agrobacterium*. *A. rhizogenes*, odnosno biovar 2, takođe je homogena genetička grupa određena na osnovu analize DNK-DNK hibrida i AFLP metodom (Popoff i sar., 1984; Portier i sar., 1996). Međutim, na osnovu sekvencionane analize 16S rRNK gena, utvrđeno je da je različita od ostalih *Agrobacterium* vrsta i filogenetski bliža vrstama iz roda *Rhizobium*, i da se može označiti kao *Rhizobium*



*rhizogenes* (Young i sar., 2001; Portier i sar., 2006; Costechareyre i sar., 2010; Lindström i Young, 2011). *A. tumefaciens*, odnosno biovar 1 predstavlja kompleks od bar 9 genomskih vrsta (genomovara) na osnovu analize DNA-DNA hibrida, AFLP metode i sekvencione analize *recA* gena (De Ley i sar., 1973; De Ley, 1974; Popoff i sar., 1984; Mougél i sar., 2002; Portier i sar., 2006; Costechareyre i sar., 2010). Genomske vrste nazvane su G1-G9, prema nomenklaturi Mougél i sar. (2002). Diferencijacija genomskih vrsta *A. tumefaciens*/biovar 1 može biti izvršena i primenom RFLP analize 16S-23S rRNK ITS regiona (Vogel i sar., 2003), kao i rep-PCR metode korišćenjem BOX prajmera (Rhouma i sar., 2006). Kako bi se izbegla zabuna u terminologiji, za genomsku grupu G4 kojoj pripadaju tipski sojevi prethodno opisanih vrsta *A. tumefaciens* i *A. radiobacter*, predloženo je ime *A. radiobacter* (Costechareyre i sar., 2010). Pri izboru imena uzeta je u obzir i činjenica da ime *A. radiobacter* ima prvenstvo u odnosu na *A. tumefaciens*, s obzirom da je prvo objavljeno u literaturi (Young i sar., 2006). Takođe, predloženo je da se sve genomske grupe privremeno podvedu pod *A. tumefaciens*/biovar 1 kompleks (Costechareyre i sar., 2010). Ovo je prihvatljivo prelazno rešenje dok svaka od genomskih vrsta ne bude formalno dobila ime (Lindström i Young, 2011). Pored imena *A. radiobacter* za genomsku vrstu G4, predloženo je ime *A. fabrum* za genomsku vrstu G8 (Lassalle i sar., 2011; Tabela 3).

Unutar roda *Agrobacterium* takođe postoje neklasifikovane vrste, gde pripada atipični soj NCPPB 1650, koji se označava kao *Agrobacterium* sp. Smatra se i da neke vrste kvržičnih bakterija pripadaju rodu *Agrobacterium*, kao što je azotofiksator *Allorhizobium undicola* (Costechareyre i sar., 2010).

Nedavno su opisane dve nove vrste tumorogenih bakterija, *Rhizobium skierniewicense* i *R. nepotum* koje su izolovane iz biljaka hrizanteme i džanarike u slučaju prve vrste, odnosno biljaka džanarike, vinove loze, maline, podloge "Colt" (*Prunus avium*×*Prunus pseudocerasus*) i trešnje u slučaju druge vrste (Puławska i sar., 2012a; 2012b). Vrsta *R. skierniewicense* dobila je ime po Poljskom gradu Skjernevice (polj. Skierniewice) gde je izolovan tipski soj. S obzirom da su predstavnici *R. nepotum* izolovani u Poljskoj i Mađarskoj, ime ove vrste odražava istorijsku vezu između ove dve zemlje, jer se za Poljake i Mađare kaže se da su sestrići (lat. nepotum - od sestrića). Sekvenciona analiza *recA* gena vrste *R. nepotum*, ukazala je da ova vrsta takođe pripada *Agrobacterium tumefaciens*/biovar 1 kompleksu i da predstavlja novu genomsku vrstu

označenu kao G14 (Puławska i sar., 2012a; Shams i sar., 2013; Tabela 3). Saïdi i sar. (2011) su iz kvržica boba (*Vicia faba*) izolovali sojeve srodne *Agrobacterium* sp., koji nisu pripadali ni jednoj do tada opisanoj vrsti. Filogenetskom analizom *recA* i *atpD* gena utvrđeno je da ovi sojevi takođe pripadaju vrsti *R. nepotum* (Puławska i sar., 2012a).

**Tabela 3.** Genomske vrste *Agrobacterium/Rhizobium* kompleksa vrsta

Genomska vrsta
<i>A. tumefaciens</i> genomska vrsta G1
<i>A. tumefaciens</i> genomska vrsta G2 = <i>R. pusense</i>
<i>A. tumefaciens</i> genomska vrsta G3
<i>A. tumefaciens</i> genomska vrsta G4 = <i>A. radiobacter</i>
<i>A. tumefaciens</i> genomska vrsta G5
<i>A. tumefaciens</i> genomska vrsta G6
<i>A. tumefaciens</i> genomska vrsta G7
<i>A. tumefaciens</i> genomska vrsta G8 = <i>A. fabrum</i>
<i>A. tumefaciens</i> genomska vrsta G9
<i>A. tumefaciens</i> genomska vrsta G13
<i>A. tumefaciens</i> genomska vrsta G14 = <i>R. nepotum</i>
<i>R. rhizogenes</i>
<i>A. vitis</i>
<i>A. rubi</i>
<i>A. larrymoorei</i>
<i>R. skierniewicense</i>
<i>Agrobacterium</i> sp. (soj NCPPB 1650)
<i>Allorhizobium undicola</i>

U poslednjih 20 godina *Agrobacterium* spp. su identifikovani i kao oportunistički patogeni kod čoveka, kao prouzrokovajući bolničkih infekcija kod bolesnika sa kompromitovanim imunim sistemom (Edmond i sar., 1993; Coenye i sar., 2002; Amaya i Edwards, 2003; Paphitou i Rolston, 2003; Chen i sar., 2008). Tako su *Agrobacterium* spp. izolovani iz disajnih puteva pacijenata obolelih od cistične fibroze (Coenye i sar., 2002). Bolnički sojevi pripadali su vrsti *A. tumefaciens*/biovar 1 i raspoređeni unutar tri genomske vrste (Popoff i sar., 1984). Kasnije, sekvencionom analizom konstitutivnih gena kod različitih sojeva *A. tumefaciens*/biovar 1, utvrđeno je da su bolnički sojevi raspoređeni unutar četiri genetičke grupe A2, A3, A4 i A7, od čega

je većina pripadala genetičkoj grupi A7 (Aujoulat i sar., 2011). Genetička grupa A7 koja je za razliku od genetičkih grupa A2, A3 i A4, bila sastavljena isključivo od sojeva humanog porekla mogla bi da predstavlja novu vrstu pretežno povezanu sa infekcijama čoveka (Aujoulat i sar., 2011). Neke fenotipske odlike ove grupe sojeva, kao što je temperatura razvoja pri 42°C doprinose ovoj tvrdnji (Aujoulat i sar., 2011). Genetičkoj grupi A7 pripadao je i reprezentativni soj iz genomske vrste G2 *A. tumefaciens*/biovar 1 kompleksa, što ukazuje da su ove dve grupe analogne jedna drugoj, odnosno da većina bolničkih sojeva zapravo pripada genomskoj vrsti G2. Međutim, podaci iz literature ukazuju da genomskoj grupi G2 pripadaju i pojedini sojevi poreklom iz drugih izvora, kao što je voda iz kanala (Popoff i sar., 1984) ili kvržice na bobu i slanutku (*Cicer arietinum*) u Tunisu (Saïdi i sar., 2011). Nedavno, sojevi *Agrobacterium* sp. izolovani iz rizosfere slanutka u Indiji opisani su kao nova vrsta za koju je predloženo ime *Rhizobium pusense* (Panday i sar., 2011). Filogenetskom analizom zasnovanoj na sekvencama *recA* i *gyrB* konstitutivnih gena, ustanovljeno je da *R. pusense* zapravo pripada genomskoj vrsti G2 *A. tumefaciens*/biovar 1 kompleksa (Shams i sar., 2013). Dakle, genomska vrsta G2, kojoj pripadaju bolnički sojevi i pojedini sojevi iz drugih izvora, može biti imenovana kao *R. pusense* (Shams i sar., 2013; Tabela 3).

Vrste roda *Agrobacterium* izolovane su iz nekih nepristupačnih staništa kao što su sedimenti sa dna Atlantskog okeana. Ovi marinski sojevi klasifikovani su kao nove vrste *Agrobacterium atlanticum*, *Agrobacterium meteori*, *Agrobacterium ferrugineum*, *Agrobacterium gelatinovorum* i *Agrobacterium stellulatum* (Rüger i Höfle, 1992). Takođe, iz vodenih makrofita u Kaliforniji su izolovani sojevi koji su imali sposobnost oksidacije arsenita i koji su opisani kao nova vrsta *Agrobacterium albertimagni* (Salmassi i sar., 2002). S obzirom da nisu ispunjeni osnovni kriterijumi prilikom opisa nove vrste, *A. albertimagni* nije zvanično priznata (prema <http://www.bacterio.cict.fr>). Ipak, rezultati filogenetske analize zasnovane na sekvencama *recA* gena, ukazivali su da je ova nepriznata vrsta jasno različita od svih do sada opisanih *Agrobacterium* spp.

U ovom radu biće zadržan status roda *Agrobacterium* kao izdvojenog predstavnika familije *Rhizobiaceae*. Koristiće se imena *A. tumefaciens* i *A. rhizogenes* prema prirodnoj klasifikaciji, a biće naznačena i oznaka biovara. Takođe, koristiće se i imena *A. vitis*, *A. rubi* i *A. larrymoorei*. S obzirom da su vrste *R. skierniewicense* i *R. nepotum* na ovaj način imenovane u literaturi, u ovom slučaju će se koristiti *Rhizobium*

kao ime roda. Patogeni status, u zavisnosti da li je soj tumorogen, rizogen ili nepatogen, biće naveden po potrebi.

## **2.2 Detekcija i identifikacija *Agrobacterium* vrsta**

Detekcija i identifikacija patogena su preduslov za pravilnu i pouzdanu dijagnozu oboljenja. Identifikacija predstavlja proces dodeljivanja imena nepoznatoj bakteriji koju smo prethodno izolovali. Dakle, početni korak u identifikaciji je dobijanje čiste kulture bakterija. Potvrda dijagnoze dobija se tek ispunjavanjem svih Kohovih postulata, odnosno testom patogenosti na biljci domaćinu, reizolacijom i ponovnom identifikacijom. Sa druge strane, detekcija podrazumeva utvrđivanje prisustva bakterije u testiranom uzorku, na osnovu čega se može doneti preliminarna dijagnoza. Do sada je razvijen čitav niz metoda kojima se može izvršiti identifikacija i detekcija *Agrobacterium* spp.

### **2.2.1 Izolacija patogena**

Vrste roda *Agrobacterium* mogu naseljavati veoma različita staništa. Fitopatogeni predstavnici ovog roda većinom su izolovani iz tkiva tumora zaraženih biljaka. U slučaju vinove loze, bakterije su izolovane i iz soka ksilema simptomatičnih ili asimptomatičnih zaraženih biljaka (Lehoczky, 1968; Burr i Katz, 1983; Tarbah i Goodman, 1986; Bazzi i sar., 1987; Moore i sar., 2001). *A. vitis* takođe može biti izolovan iz ulegnutih nekrotičnih zona koje se pojavljuju na korenu sa simptomima izumiranja (Burr i sar., 1987a). Populacija bakterija nije brojna u starijem tkivu tumora, i nekada je lakše izolovati ih iz okolnog zemljišta. Brojnost *Agrobacterium* spp. u populaciji u zemljištu varira između  $10^3$ - $10^7$  bakterijskih ćelija po gramu zemljišta (Schroth i sar., 1965; 1971; Bouzar i Moore, 1987b; Burr i sar., 1987b; Bouzar i sar., 1993b). Uočene su i sezonske varijacije brojnosti *Agrobacterium* spp. u zemljištu, a populacija je bila brojnija tokom proleća i leta u odnosu na jesen i zimu (Krimi i sar., 2002).

Ako se zanemare zone u blizini zaraženih biljaka, sojevi *Agrobacterium* spp. izolovani iz zemljišta bili su uglavnom nepatogeni (Bouzar i Moore, 1987b; Vogel i

sar., 2003; Sobiczewski i sar., 2005). Nepatogeni sojevi ovog roda izolovani su iz zemljišta koje nije nikada korišćeno u poljoprivredne svrhe, kao što su savane i prerije Severne Amerike (Bouzar i Moore, 1987b). Iz korena američke loze (*Vitis riparia*) koja je rasla u spontanoj flori i koja nije imala simptome bakterioznog raka, takođe su izolovani samo nepatogeni *A. vitis* sojevi (Burr i sar., 1999). Međutim, Genov i sar. (2006a) su iz biljaka divlje loze (*V. vinifera* ssp. *silvestris*), koja je prisutna u šumskim predelima u Bugarskoj, izolovali tumorogene *A. vitis* sojeve. Nepatogeni sojevi *Agrobacterium* spp. izolovani su iz sedimenata poreklom sa dna Atlantskog okeana (Rüger i Höfle, 1992), Pacifika (D'Hondt i sar., 2004) i Sredozemnog mora (Süß i sar., 2006). Kao oportunistički patogeni čoveka, netumorogeni *Agrobacterium* sojevi izolovani su iz različitih delova ljudskog tela (Edmond i sar., 1993; Coenye i sar., 2002; Amaya i Edwards, 2003; Paphitou i Rolston, 2003; Chen i sar., 2008).

*Agrobacterium* spp. mogu se nesmetano razvijati na većini hranljivih podloga. Hranljivi agar sa dodatkom kvašćevog ekstrakta (eng. yeast nutrient agar, YNA), podloga sa manitolom i kvašćevim ekstraktom (eng. yeast mannitol agar, YMA) i krompir dekstrozni agar (KDA) pogodne su za gajenje većine sojeva. Ove podloge takođe mogu biti korišćene za izolaciju iz tkiva tumora, pri čemu se posebna pažnja pridaje sterilnim uslovima tokom postupka izolacije. Neki sojevi zahtevaju B vitamin za svoj rast, pre svega biotin, pantotensku i/ili nikotinsku kiselinu (Matthysse, 2006). Uopšteno, na osnovnim podlogama, kolonije *Agrobacterium* spp. su bele, sivo-bele ili svetlo ružičaste boje, i ne stvaraju pigmente. Umereno su ispupčene, sjajne i pravilnog kružnog oblika. Neki sojevi stvaraju velike količine vančelijskih polisaharida, koji im daju vodenastu konzistenciju. Većina sojeva ima umeren porast i za 2-4 dana dolazi do razvoja pojedinačnih kolonija na osnovnim podlogama. Međutim neki sojevi *A. rhizogenes*/biovar 2 imaju slabiji porast i potrebna im je jedna nedelja da bi formirali pojedinačne kolonije (Moore i sar., 2001). Optimalna temperatura razvoja za većinu sojeva iznosi 25-28°C.

Razvijen je veći broj selektivnih i poluselektivnih i/ili diferencijalnih podloga koje se mogu koristiti za izolaciju *Agrobacterium* spp., a njihov pregled dali su Moore i sar. (2001). Ove podloge posebno su korisne pri izolaciji iz kompleksnih sredina kao što je zemljište, gde su prisutni mnogi saprofitni organizmi, a populacija *Agrobacterium* spp. na relativno niskom nivou. Najpogodnijim su se pokazale podloga 1A za *A.*

*tumefaciens*/biovar 1, 2E za *A. rhizogenes*/biovar 2, i Roy i Sasser (RS) podloga za *A. vitis* (Brisbane i Kerr, 1983; Roy i Sasser, 1983). Selektivnost 1A i 2E podloga poboljšana je dodavanjem selektivnog agensa kalijum telurita ( $K_2TeO_3$ ; Mougel i sar., 2001). Isti agens dodavan je i u neselektivnu podlogu sa manitolom i glutaminskom kiselinom (MG) čime je postignuta bolja selektivnost (Mougel i sar., 2001).

## 2.2.2 Određivanje patogenosti

Patogenost *Agrobacterium* spp. može se proveriti testom patogenosti na pogodnim biljkama. S obzirom da izvođenje testa patogenosti iziskuje značajan utrošak vremena, kao alternativa u određivanju patogenosti, poslednjih godina sve više se koriste molekularne metode, pre svega PCR.

### 2.2.2.1 Test patogenosti

Sojevi *Agrobacterium* spp. mogu imati vrlo različit spektar domaćina, te je stoga pri proveri njihove patogenosti korišćeno više različitih test biljaka (Anderson i Moore, 1979; Moore i sar., 2001). Najčešće korišćene biljne vrste su paradajz (*Solanum lycopersicum*), suncokret (*Helianthus annuus*), duvan (*Nicotiana tabacum*), tatula (*Datura stramonium*), briofilum (*Bryophyllum daigremontianum*, syn. *Kalanchoe daigremontiana*), mrkva (*Daucus carota*) i dr. (Moore i sar., 2001).

Test patogenosti podrazumeva inokulaciju test biljaka kroz povrede na tkivu. Kako bi se povećala uspešnost infekcije, preporučuje se korišćenje mladih biljaka u fazi intenzivnog rasta. Povređivanje se može izvršiti korišćenjem sečiva ili igle, dok se za inokulaciju može koristiti kako bakterijska suspenzija, tako i masa bakterijskih ćelija (Moore i sar., 2001). Inokulisane biljke potrebno je gajiti u optimalnim uslovima, koji pogoduju njihovom neometanom rastu i razvoju. Kritičan faktor za ostvarenje infekcije je temperatura, jer iznad 32°C dolazi do inhibicije patogeneze (Banta i sar., 1998).

### 2.2.2.2 PCR

Patogenost *Agrobacterium* spp. uslovljena je prisustvom pTi ili pRi u njihovom genomu (Van Larebeke i sar., 1974; Watson i sar., 1975). Na ovim plazmidima nalazi se

većina gena koji kontrolišu procese patogeneze. U cilju detekcije i karakterizacije pTi i pRi, najviše se primenjuje lančano umnožavanje fragmenata DNK (eng. polymerase chain reaction, PCR), i u ovu svrhu dizajniran je veći broj prajmera specifičnih za pojedine plazmidne gene (Tabela 4.).

**Tabela 4.** Lista prajmera dizajniranih za detekciju i karakterizaciju pTi i/ili pRi

Ciljani region ili gen	Oznaka prajmera <sup>a</sup>	Tip PCR-a	Literatura
T-DNK ( <i>ipt</i> [ <i>tmr</i> ]) Region između <i>virB</i> i <i>virG</i> gena	FGP <i>tmr</i> 530/FGP <i>tmr</i> 701 FGP <i>vir</i> B <sub>11+21</sub> /FGP <i>vir</i> G <sub>15</sub> '	Konvencionalni	Nesme i sar., 1990
T-DNK ( <i>iaaM</i> [ <i>tms1</i> ], <i>iaaH</i> [ <i>tms2</i> ])	ND	Konvencionalni	Dong i sar., 1992
T-DNK ( <i>ipt</i> [ <i>tmr</i> ], insercioni elementi [IS866, IS868, IS869], region između <i>6b</i> i <i>vis</i> gena)	ND	Konvencionalni	Schulz i sar., 1993b
T-DNK ( <i>nos</i> gen <i>A. tumefaciens</i> pTi) <i>virA-virB2</i> region <i>A. tumefaciens</i> pTi	FGP <i>nos</i> 975/FGP <i>nos</i> 1236' FGP <i>vir</i> A2275/FGP <i>vir</i> B <sub>2</sub> 164'	PCR; PCR-RFLP	Ponsonnet i Nesme, 1994
T-DNK ( <i>tms</i> region <i>A. tumefaciens</i> pTi)	FGP <i>tms</i> 2-194'/FGP <i>tms</i> 1-46'	Konvencionalni	Nesme i sar., 1995
<i>virC</i>	VCF/VCR	Konvencionalni	Sawada i sar., 1995
T-DNK ( <i>6b</i> ), <i>virA</i>	ND	Konvencionalni	Eastwell i sar., 1995
<i>virD2</i> T-DNK ( <i>ipt</i> [ <i>tmr</i> ])	A, C', E' CYT/CYT'	Dupleks	Haas i sar., 1995
T-DNK ( <i>6b</i> gen <i>A. vitis</i> oktopin pTi)	4905/4906	Konvencionalni	Kaufman i sar., 1996
T-DNK ( <i>iaaH</i> [ <i>tms2</i> ])	tms2A/tms2B	Konvencionalni	Sachadyn i Kur, 1997
<i>virB</i> region	ANT <i>vir</i> B <sub>11</sub> 887	PCR; PCR-RFLP	Pionnat i sar., 1999
<i>virE2</i> T-DNK ( <i>vis</i> )	VirE2PF/VirE2PR VisF/VisR	Konvencionalni	Szegedi i Bottka, 2002
T-DNA ( <i>rolA</i> gen pRi)	rol-F, rol-R, rol-Pr (proba)	"Real-time (Taqman)"	Weller i Stead, 2002
T-DNK ( <i>vis</i> ) Desni granični deo T-DNK	ocsF/ocsR RBF/RBR	Konvencionalni	Tan i sar., 2003
<i>virC</i>	VCF3/VCR3; VCF5/VCR5	Konvencionalni	Suzaki i sar., 2004
T-DNK ( <i>6b</i> gen <i>A. vitis</i> oktopin pTi) T-DNK ( <i>6b</i> gen <i>A. vitis</i> nopaln pTi)	TF/TR NF/NR	Konvencionalni	Szegedi i sar., 2005

(Nastavak na sledećoj strani)

**Tabela 4.** Nastavak

Ciljani region ili gen	Oznaka prajmera <sup>a</sup>	Tip PCR-a	Literatura
T-DNK ( <i>iaaH</i> [ <i>tms2</i> ])	tms2F1, tms2R2, tms2B	“semi-nested”	Puławska i Sobiczewski, 2005
<i>virF</i> gen <i>A. vitis</i> oktopin i nopalin pTi <i>virD2</i> gen <i>A. vitis</i> (S4) vitopin pTi <i>ocs</i> gen <i>A. vitis</i> (Tm4) pTi <i>nos</i> gen <i>A. vitis</i> (AB4) pTi	VirFF <sub>1</sub> /VirFR <sub>2</sub> VirD2S4F <sub>716</sub> /VirD2S4R <sub>1036</sub> OCTF/OCTR NOPF/NOPR	multipleks  Konvencionalni	Bini i sar., 2008b
<i>virD2</i>	VIRD59F26/VIRD59R122 VIRD62F23/VIRD62R135	Konvencionalni; “Real-time (Sybr Green)”	Bini i sar., 2008a
<i>virA</i>	NVirA fw/NVirA rew	“nested”	Peduto i sar., 2010
T-DNK ( <i>ipt</i> [ <i>tmr</i> ])	Tmr236F/Tmr236R	Konvencionalni	Yang i sar., 2011
T-DNK	Tip6F/ Tip6R	Konvencionalni “Real-time (Sybr Green)”	Yakabe i sar., 2012
<i>virD2</i>	ND	“Real-time”	Johnson i sar., 2013

<sup>a</sup>ND, nije definisano

Međutim, izražen genetički diverzitet među sojevima *Agrobacterium* spp. može ograničiti specifičnost PCR metode, odnosno prajmera. U jednom od pionirskih radova koji se bavio detekcijom *Agrobacterium* pTi primenom PCR metode, prajmeri su dizajnirani na osnovu regiona između *virB* i *virG* gena, kao i *tmr* gena koji se nalazi unutar T-DNK (Nesme i sar., 1990). Prvim prajmerima (*virB-virG*) detektovani su jedino sojevi sa nopalin tipom pTi, dok kod onih sa oktopin ili nekim drugim tipom pTi nije bilo umnožavanja specifičnih fragmenata, a drugi par prajmera (*tmr*) omogućavao je umnožavanje u slučaju nopalin ili oktopin tipa pTi, ali ne i agropin tipa pTi (Nesme i sar., 1990). U kasnijim studijama, takođe je saopšteno da prajmeri *virB-virG* nisu ispoljili specifičnost prema mnogim proučavanim patogenim sojevima *Agrobacterium* spp., prevashodno prema vrsti *A. vitis* (Cubero i sar., 1999; Palacio-Bielsa i sar., 2009). Ipak, *virB-virG* prajmerima umnoženi su specifični fragmenti kod pojedinih *A. vitis* sojeva sa oktopin tipom pTi (Cubero i sar., 1999).

Dong i sar. (1992) su razvili dva para prajmera komplementarna *tms* genu, međutim uspešnost detekcije bila je zavisna od testiranog soja, odnosno od koncentracije ekstrahovane DNK. Sawada i sar. (1995) su dizajnirali potencijalno univerzalne prajmere za detekciju *Agrobacterium* pTi i pRi, ali do umnožavanja odgovarajućih fragmenata nije došlo u slučaju jednog *A. vitis* soja korišćenog u istraživanju. Ovo je potvrđeno i u studijama drugih istraživača, gde korišćenjem ovih



prajmera nije dolazilo do umnožavanja karakterističnih fragmenata pretežno kod tumorogenih sojeva *A. vitis*, ali i pojedinih *A. tumefaciens* poreklom iz vinove loze (Cubero i sar., 1999; Szegedi i Bottka, 2002; Suzaki i sar., 2004; Szegedi i sar., 2005; Palacio-Bielsa i sar., 2009). Pored toga, Eastwell i sar. (1995) su razvili prajmere za detekciju tumorogenih *A. vitis* sojeva na bazi sekvence *virA* gena, koji takođe nisu bili specifični prema svim proučavanim sojevima. Palacio-Bielsa i sar. (2009) naveli su slična opažanja koristeći ove prajmere u analizi većeg broja sojeva *Agrobacterium* spp. poreklom iz vinove loze. Dupleks PCR metodom sa prajmerima specifičnim za *virD2* i *ipt* gene detektovan je širok krug tumorogenih i rizogenih sojeva *Agrobacterium* spp. (Haas i sar., 1995). Međutim, *virD2* prajmerima umnožen je odgovarajući fragment i kod jednog nepatogenog *Agrobacterium* soja, dok jedan *A. vitis* soj nije detektovan *ipt* prajmerima (Haas i sar., 1995). Ovim prajmerima takođe nisu umnoženi specifični fragmenti kod pojedinih *A. vitis* sojeva korišćenih u kasnijim studijama (Bini i sar., 2008b; Kumagai i Fabritius, 2008).

### **2.2.3 Diferencijacija do nivoa vrste/biovara**

Diferencijacija vrsta/biovara roda *Agrobacterium* može se izvesti korišćenjem klasičnih bakterioloških metoda, odnosno biohemijско-fiziološkim testovima, kao i serološkim, molekularnim i automatizovanim metodama.

#### **2.2.3.1 Biohemijско-fiziološki testovi**

Do sada je u literaturi opisan čitav niz biohemijско-fizioloških testova koji se mogu koristiti u diferenciranju vrsta/biovara roda *Agrobacterium/Rhizobium* (Bouzar i sar., 1995a; 1995b; Kerr i Gibb, 1997; Bouzar i Jones, 2001; Moore i sar., 2001; Puławska i sar., 2012a; 2012b; Tabela 5). Bouzar i sar. (1995b) su predložili četiri jednostavna testa kojima se može u roku od 48h izvršiti preliminarna identifikacija *A. tumefaciens*/biovar 1, *A. rhizogenes*/biovar 2 i *A. vitis*. To su: stvaranje 3-ketolaktoze, formiranje prosvetljenih zona na KDA-CaCO<sub>3</sub>, pokretljivost pri pH 7,0 i pektolitička aktivnost pri pH 4,5.

**Tabela 5.** Biohemijsko-fiziološke karakteristike fitopatogenih vrsta roda *Agrobacterium*

Test	Vrsta <sup>a</sup>						
	At/B1 <sup>b</sup>	Ar/B2 <sup>b</sup>	Av <sup>b</sup>	Aru <sup>b</sup>	Al <sup>b</sup>	Rs <sup>b</sup>	Rn <sup>b</sup>
Reakcija po Gramu	-	-	-	-	-	-	-
Aktivnost oksidaze	+	V	V	+	+	+	+
Razvoj pri 35°C	+	V	V	V	-	NP	NP
Razvoj pri 37°C	+	-	-	-	NP	NP	NP
Razvoj u podlozi sa 2% NaCl	+	-	+	+	+	+	+
Stvaranje 3-ketolaktoze	+	-	-	-	-	-	+
Reakcija u lakmus mleku	ALK	KIS	ALK	ALK	ALK	ALK	ALK
Formiranje prosvetljenih zona na KDA-CaCO <sub>3</sub>	-	+	-	-	V	NP	NP
Pokretljivost pri pH 7,0	+	+	-	NP	NP	NP	NP
Pektolitička aktivnost pri pH 4,5	-	-	+	NP	NP	NP	NP
Razvoj i pigmentacija u podlozi sa feri-amonijum-citratom	+	-	-	-	-	+	-
Korišćenje citrata	-/V	+	+	-	-	-	-
Stvaranje kiseline iz:							
saharoze	+	-	V	NP	+	+	+
eritritola	-	+	-	-	-	-	-
melezitoze	+	-	-	-	NP	-	-
Stvaranje baze iz:							
L-tartarata	V	+	+	-	+	NP	NP
mucinska kiselina	-	+	-	NP	NP	NP	-
malonske kiseline	-	+	+	+	-	+	NP

<sup>a</sup> At/B1, *A. tumefaciens*/biovar 1; Ar/B2, *A. rhizogenes*/biovar 2; Av, *A. vitis*; Aru, *A. rubi*; Al, *A. larrymoorei*; Rs, *R. skierniewicense*; Rn, *R. nepotum*;

<sup>b</sup> +, pozitivna reakcija kod više od 80% sojeva; V, 21-79% sojeva ispoljava pozitivnu reakciju; -, negativna reakcija kod više od 80% sojeva; NP, nema literaturnih podataka; ALK, alkalna reakcija; KIS, kisela reakcija.

Cubero i López (2001) su razvili tzv. mikrotitarski sistem za identifikaciju *Agrobacterium* spp. Autori su pomoću osam odabranih biohemijskih testova, koji se izvode istovremeno u mikropločama, vršili identifikaciju *A. tumefaciens*/biovar 1, *A. rhizogenes*/biovar 2 i *A. vitis*. Primenjen je test korišćenja citrata, razvoj i pigmentacija u podlozi sa feri-amonijum-citratom, proizvodnja baze iz malonske, L-tartarske i mucinske kiseline, proizvodnja kiseline iz saharoze i melezitoze i stvaranje 3-ketolaktoze. Na ovaj način čine se značajne uštede u pogledu vremena, materijala i prostora, u odnosu na tradicionalno izvođenje ovih testova.

### 2.2.3.2 Serološke metode

Više različitih seroloških metoda je opisano u literaturi u cilju detekcije i identifikacije *Agrobacterium* spp. (Keane i sar., 1970; Miller i Vruggink, 1981; Alarcon i sar., 1987; Bazzi i sar., 1987; Bouzar i Moore, 1987a; Bazzi i sar., 1988; Bishop i sar., 1989; Michel i sar., 1990; Sawada i sar., 1992b; Sawada i sar., 1992c). Pretežno su korišćene test aglutinacije, difuzija u gelu, enzimski imunoadsorpcioni test (eng. enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) i test imunofluorescencije (eng. immunofluorescence, IF). Keane i sar. (1970) su korišćenjem specifičnih antiseruma diferencirali većinu proučavanih sojeva koji su pripadali biovarima 1 i 2, dok sojevi *A. rubi* nisu reagovali niti sa antiserumom specifičnim za biovar 1, kao ni sa antiserumom specifičnim za biovar 2. Kasnije studije koje su za cilj imale proizvodnju antitela specifičnih za pojedine biovare, uključujući i vrstu *A. vitis*, bile su delimično uspešne, s obzirom da su se pojavili problemi sa specifičnošću antiseruma (Miller i Vruggink, 1981; Alarcon i sar., 1987; Bazzi i sar., 1987; Bazzi i sar., 1988; Michel i sar., 1990). Sa druge strane, Bishop i sar. (1989) su proizveli monoklonalna antitela specifična za *A. vitis*, koja su se pokazala pouzdanim u determinaciji ove vrste iz čistih kultura. Sawada i sar. (1992b; 1992c) su korišćenjem pet različitih antiseruma diferencirali sojeve *A. vitis* u četiri grupe, što je ukazivalo na njihovu serološku heterogenost.

### 2.2.3.3 Molekularne metode

Pojedine vrste roda *Agrobacterium* mogu biti diferencirane do nivoa vrste/biovara PCR metodom, korišćenjem prajmera specifičnih za određene hromozomske gene (Tabela 6). Većina studija odnosi se na diferencijaciju i identifikaciju vrste *A. vitis* putem detekcije *pehA* gena za poligalakturonazu (Eastwell i sar., 1995; Szegedi i Bottka, 2002; Peduto i sar., 2010) ili 16S rRNK gena (Kawaguchi i sar., 2005). Puławska i sar. (2006) su razvili multipleks PCR kojim se istovremeno mogu diferencirati četiri biovara/vrste analizom 23S rRNK gena (Tabela 6). Iako su 23S rRNK prajmerima uspešno identifikovani *A. tumefaciens*/biovar1, *A. vitis* i *A. rubi*, prajmerima specifičnim za *A. rhizogenes*/biovar 2 umnožen je odgovarajući fragment i kod nekih *Rhizobium* sojeva, te je bio potreban dodatni korak restrikcione analize PCR

produkta kako bi se identifikovala ova vrsta (Puławska i sar., 2006). Fragmenti specifični, kako za *A. tumefaciens*/biovar 1, tako i za *A. rhizogenes*/biovar 2, umnoženi su kod nekoliko atipičnih sojeva (Puławska i sar., 2006), koji su kasnije opisani kao nova vrsta *R. nepotum* (Puławska i sar., 2012a). U svom istraživanju, Lim i sar. (2009) su koristili određenu hromozomsku sekvencu za PCR detekciju *A. vitis*.

Pored PCR metode, u cilju identifikacije i diferencijacije *Agrobacterium* spp. do nivoa vrste mogu se koristiti PCR-RFLP ili sekvencionu analiza ribozomalnih gena, ali i njihovih ITS regiona (Sawada i sar., 1992d; Sawada i sar., 1993; Ponsonnet i Nesme, 1994; Oger i sar., 1998; Puławska i sar., 2000; Young i sar., 2001; Young i sar., 2004; Kwon i sar., 2005; Martens i sar., 2008; Bautista-Zapanta i sar., 2009). Poslednjih godina, sve više se koristi i sekvencionu analiza konstitutivnih gena, koji poseduju još veću diskriminacionu moć u odnosu na ribozomalne gene (Martens i sar., 2007; Martens i sar., 2008; Costechareyre i sar., 2010; Aujoulat i sar., 2011; Puławska i Kałużna, 2011; Puławska i sar., 2012a; Puławska i sar., 2012b; Shams i sar., 2013).

**Tabela 6.** Lista prajmera specifičnih za pojedine vrste/biovare roda *Agrobacterium*

Ciljani organizam	Ciljani gen	Oznaka prajmera <sup>a</sup>	Tip PCR-a	Literatura
<i>A. vitis</i>	<i>pehA</i>	ND	Konvencionalni	Eastwell i sar., 1995
<i>A. vitis</i>	<i>pehA</i>	PGF/PGR	Konvencionalni	Szegedi i Bottka, 2002
<i>A. tumefaciens</i> / biovar 1, <i>A. rhizogenes</i> / biovar 2, <i>A. vitis</i> , <i>A. rubi</i>	23S rRNA	UF,B1R, B2R, AvR, ArR	Multipleks	Puławska i sar., 2006
<i>A. vitis</i>	16S rRNA	Ab3-F3/Ab3-R4	Dupleks	Kawaguchi i sar., 2005
<i>A. vitis</i>	neidentifikovana sekvencu	AVSP3-1F/AVSP3-1R AVSNP-3F/ AVSNP-3R	Konvencionalni "nested"	Lim i sar., 2009
<i>A. vitis</i>	<i>pehA</i>	pehA1, pehA2, pehA3	"nested"	Peduto i sar., 2010

<sup>a</sup> ND, nije definisano

#### 2.2.3.4 Automatizovane metode

Mnoge fitopatogene bakterije proučavane su automatizovanim metodama i vrste roda *Agrobacterium* nisu izuzetak. Bouzar i sar. (1993a) su analizirali sadržaj masnih

kiselina korišćenjem MIDI sistema za gasno-tečnu hromatografiju (MIDI, Microbial ID, Inc., Newark, DE, USA) i sposobnost sojeva da koriste različite izvore ugljenika primenom Biolog sistema (Biolog, Inc., Hayward CA, USA). Na ovaj način diferencirani su *A. tumefaciens*/biovar 1, *A. rhizogenes*/biovar 2, *A. vitis* i *A. rubi*. Saglasne rezultate dobili su i drugi autori proučavajući ukupan sadržaj masnih kiselina kod *Agrobacterium* sojeva (Jarvis i sar., 1996; Tighe i sar., 2000; Süle i sar., 2012). Korišćenjem Biolog metode i analize masnih kiselina diferencirana je i vrsta *A. larrymoorei* (Bouzar i sar., 1995a; Bouzar i Jones, 2001), kao i vrste *R. skierniewicense* (Puławska i sar., 2012b) i *R. nepotum* (Puławska i sar., 2012a).

### 2.2.3.5 Ostale metode

U literaturi su opisane i novije metode, koje mogu predstavljati alternativu konvencionalnim metodama široko primenjivanim u laboratorijskoj praksi. Brza i osetljiva identifikacija vrsta roda *Agrobacterium* izvođena je razdvajanjem RNK molekula niske molekulske mase metodom stepenaste elektroforeze (Velázquez i sar., 2001). Ovom metodom dobijaju se genetički profili sa tri jasne zone: 5S rRNK, klasa 1 transportne RNK (tRNK) i klasa 2 tRNK. 5S rRNK zona je svojstvena svakom rodu, dok su profili tRNK karakteristični za svaku vrstu.

MALDI-TOF MS (eng. matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry) je relativno nova metoda kojom se na brz i pouzdan način može izvršiti identifikacija i klasifikacija mikroorganizama (Maier i sar., 2006). Ova metoda primenjuje u kliničkoj dijagnostici, ekološkim i taksonomskim studijama, ili kontroli kvaliteta hrane. MALDI-TOF MS metoda korišćena je prvi put u fitopatologiji u cilju brze identifikacije i grupisanja *Pantoea* vrsta (Rezzonico i sar., 2010). Nedavno je ova metoda primenjena u identifikaciji i filogenetskoj analizi nekoliko rodova fitopatogenih bakterija uključujući i *Agrobacterium* (Pothier i sar., 2011). Na ovaj način diferencirani su i genomovari *A. tumefaciens*/biovar 1 kompleksa (J. Pothier, neobjavljen podatak).

Süle i sar. (2012) su opisali metod kapilarnog izoelektričnog fokusiranja u diferencijaciji sojeva *A. tumefaciens*/biovar 1, *A. rhizogenes*/biovar 2, *A. vitis* i *A. rubi*. Izelektrično fokusiranje je elektroforetska metoda razdvajanja u gradijentu pH. Prednost ove metode predstavlja brzina izvođenja, jednostavnost i niska cena koštanja.

#### 2.2.4 Detekcija *Agrobacterium* spp. u biljnom tkivu i zemljištu

Metode detekcije *Agrobacterium* spp. u biljnom tkivu, opisane u literaturi, pretežno se zasnivaju na primeni molekularnih metoda. Od seroloških metoda, korišćen je imunofluorescentni test u analizi soka ksilema iz reznica vinove loze i ovaj metod bio je osetljiviji u odnosu na izolaciju bakterija na selektivne podloge (Bazzi i sar., 1987). Međutim, serološkim metodama se ne mogu diferencirati patogeni sojevi *Agrobacterium* sp. od nepatogenih.

PCR metoda omogućila je detekciju patogenih *Agrobacterium* sojeva, odnosno njihovog pTi. Eastwell i sar. (1995) su vršili izolaciju i prečišćavanje DNK bakterije iz reznica vinove loze, a zatim PCR umnožavanje ciljanog gena. Ovim je postignuta značajna osetljivost i veća pouzdanost detekcije *A. vitis* u odnosu na izolaciju na hranljive podloge. Slično, metod ekstrakcije DNK bakterije iz tkiva tumora, nakon čega je izvođen PCR, bio je osetljiviji u detekciji fitopatogenih *Agrobacterium* spp. u odnosu na izolaciju bakterija na selektivne hranljive podloge (Cubero i sar., 1999). PCR metoda pokazala se efikasnijom i u detekciji patogena kod veštački inokulisanih biljaka hrizanteme i breskve u odnosu na izolaciju (Puopolo i sar., 2007). Međutim, Szegedi i Bottka (2002), analizirajući uzorke soka ksilema vinove loze PCR metodom, nisu detektovali prisustvo *A. vitis*, koji je zatim izolovan na hranljive podloge korišćenjem istih uzoraka. Kaufmann i sar. (1996) su u cilju povećanja osetljivosti i pouzdanosti detekcije *A. vitis* u sadnom materijalu vinove loze razvili metodu imunokultivacije patogena, nakon čega je izvođen PCR. Bini i sar. (2008b) su koristili real-time PCR u detekciji *A. vitis* u uzorcima tkiva tumora, iz kojih je prethodno ekstrahovana DNK. Na ovaj način *A. vitis* je detektovan uz visoku osetljivost čiji je prag bio 1-10 bakterijskih ćelija po reakciji. Real-time PCR metodu za detekciju *A. vitis* su razvili i Johnson i sar. (2013), pri čemu su poredili različite metode ekstrakcije DNK bakterije iz čistih kultura i obogaćenih uzoraka veštački inokulisane vinove loze. Peduto i sar. (2010) su razvili PCR metodu sa umetnutim prajmerima koja je pokazala značajnu osetljivost i specifičnost u detekciji *A. vitis* u asimptomatičnom biljnom materijalu, gde je DNK bakterije prethodno ekstrahovana iz uzoraka.

Pored navedenih protokola, gde su kao predmet PCR analize služili ekstrakti DNK iz biljnog tkiva, u literaturi je opisan i tzv. BIO-PCR gde je analiziran kompletan

sadržaj Petri kutija na kojima je izolovan *A. vitis* iz uzoraka, gde pored patogena mogu biti prisutni saprofiti i drugi mikroorganizmi (Bini i sar., 2008a; 2008b; Kumagai i Fabritius, 2008).

*Agrobacterium* spp. nastanjuje i zemljišne ekosisteme, te je analiza uzoraka zemljišta značajna u otkrivanju potencijalnih izvora infekcije. U ovu svrhu razvijeno je više protokola koji se zasnivaju na PCR metodi. Najčešće je ekstrakcija DNK bakterije izvođena direktno iz uzoraka zemljišta (Picard i sar., 1992; Sachadyn i Kur, 1997; Benjama i sar., 2004; Yang i sar., 2011), ili je ekstrakciji prethodila izolacija na hranljive podloge (Puławska i Sobiczewski, 2005; Sobiczewski i sar., 2005). Takođe, moguće je ekstrakte zemljišta koristiti direktno u “nested” PCR reakciji (Lim i sar., 2009). Osetljivost detekcije je varirala je od  $10^2$ - $10^4$  bakterijskih ćelija po gramu zemljišta (Picard i sar., 1992; Sachadyn i Kur, 1997), do samo 1-2 bakterijske ćelije po gramu zemljišta, korišćenjem protokola gde je izvršena inkubacija suspenzije zemljišta na hranljivim podlogama i ekstrakcija DNK, praćena “semi-nested” PCR metodom (Puławska i Sobiczewski, 2005).

Pored navedenih konvencionalnih, u detekciji *Agrobacterium* spp. u biljnom tkivu primenjene su i neke inovativne metode. Korišćen je tzv. elektronski nos (eng. electronic nose, E-nose) u analizi uzoraka vinove loze na prisustvo *A. vitis* (Blasioli i sar., 2010). Elektronski nos je instrument namenjen analizi različitih isparljivih organskih materija, u stanju je da ih detektuje i izvrši njihovu diskriminaciju pomoću specifičnih senzora. Primenjivan je u industriji hrane, kozmetici, farmaceutskoj industriji, ali i u ekološkim studijama. Pomoću ovog instrumenta bilo je moguće diferencirati zdrave od zaraženih reznica vinove loze, koje su veštački inokulisane tumorogenim sojevima *A. vitis* (Blasioli i sar., 2010).

### **2.3 Diverzitet *Agrobacterium* spp.**

*Agrobacterium* spp. su kosmopolitski rasprostranjeni biljni patogeni, koji mogu parazitirati veoma širok krug gajenih, šumskih i ukrasnih biljaka. Stoga je među fitopatogenim *Agrobacterium* spp. zabeležena visoka stopa diverziteta.

### 2.3.1 Struktura populacija fitopatogenih *Agrobacterium* spp.

Uvid u strukturu populacija fitopatogenih *Agrobacterium* spp. od velikog je značaja za razumevanje epidemiologije samog oboljenja. Struktura populacije može zavisiti od više faktora, kao što su biljka domaćin i/ili geografsko poreklo. López i sar. (1988) su uočili korelaciju između biljke domaćina i identiteta izolovanih sojeva. Većina sojeva izolovanih iz zaraženih voćaka u Španiji pripadali su vrsti *A. rhizogenes*/biovar 2, a sojevi iz ruže i vrbe vrsti *A. tumefaciens*/biovar 1. U Italiji, većina proučavanih sojeva poreklom iz voćnih vrsta takođe je pripadala vrsti *A. rhizogenes*/biovar 2, dok su sojevi *A. tumefaciens*/biovar 1 izolovani iz hrizanteme (Peluso i sar., 2003). U Poljskoj, među sojevima poreklom iz različitih voćaka, dominirala je vrsta *A. rhizogenes*/biovar 2 (Sobiczewski, 1996; Puławska i Kałużna, 2011). *A. rhizogenes*/biovar 2 je takođe bila jedina ili većinski rasprostranjena vrsta na breskvi u SAD (Alconero, 1980), različitim voćkama u Grčkoj i Mađarskoj (Panagopoulos i Psallidas, 1973; Süle, 1978) i koštičavom voću u Kanadi (Dhanvantari, 1978). Sa druge strane, *A. tumefaciens*/biovar 1 je uglavnom izolovan iz zaraženih biljaka breskve, šljive i badema u Australiji i Novom Zelandu (Keane i sar., 1970), koštičavog voća u Tunisu (Rhouma i sar., 2006; Costechareyre i sar., 2010), a u SAD iz hikori oraha (Bouzar i sar., 1983) i oraha (Gonzalez i sar., 2008). Populacija *Agrobacterium* spp. poreklom iz zaraženih biljaka borovnice u Argentini, sastojala se pretežno iz sojeva *A. tumefaciens*/biovar 1 i *A. rhizogenes*/biovar 2, a u nešto manjem broju bili su prisutni sojevi *A. rubi* (Alippi i sar., 2012).

Bakteriozni rak vinove loze može prouzrokovati više različitih tumorogenih *Agrobacterium* spp., među kojima dominantno mesto zauzima *A. vitis*. U Grčkoj, Mađarskoj, SAD, Francuskoj i Španiji, pored *A. vitis*, detektovani su i *A. tumefaciens*/biovar 1 i *A. rhizogenes*/biovar 2 (Panagopoulos i Psallidas, 1973; Panagopoulos i sar., 1978; Burr i Katz, 1983; 1984; Süle, 1978; Thies i sar., 1991; Ridé i sar., 2000; López i sar., 2008; Palacio-Bielsa i sar., 2009). U Mađarskoj je iz vinove loze izolovana još i vrsta *Rhizobium nepotum* (Puławska i sar., 2012b). U Turskoj, Italiji i Japanu je, pored *A. vitis*, na vinovoj lozi utvrđena još samo *A. tumefaciens*/biovar 1 (Argun i sar., 2002; Bini i sar., 2008b; Kawaguchi i Inoue, 2009).



U literaturi su zabeleženi i primeri gde je iz istog tumora, lokaliteta ili supstrata izolovano više različitih vrsta roda *Agrobacterium*. Tako su *A. tumefaciens*/biovar 1 i *A. rhizogenes*/biovar 2 zajedno izolovani iz zaraženih biljaka poreklom iz istog rasadnika, a u pojedinim slučajevima i iz istog tumora (Nesme i sar., 1987; Michel i sar., 1990). Do sličnih opažanja došli su Kuzmanović i sar. (2012a; 2012b; 2013) analizirajući zaražene biljke kajsije poreklom iz istog rasadnika iz kojih su izolovali kako *A. tumefaciens*/biovar 1, tako i *A. rhizogenes*/biovar 2. Bouzar i sar. (1993b) su proučavali populaciju *Agrobacterium* sp. u zemljištu koje nije obrađivano 5 godina. Od ukupnog broja proučavanih sojeva 56% je pripadalo vrsti *A. tumefaciens*/biovar 1, a 44% vrsti *A. rhizogenes*/biovar 2; 33% je bilo patogeno i svi su pripadali vrsti *A. tumefaciens*/biovar 1.

### **2.3.2 Organizacija genetičkog materijala *Agrobacterium* spp.**

Predstavnici roda *Agrobacterium* odlikuju se kompleksnom organizacijom genoma. *A. tumefaciens*/biovar 1 i *A. rubi* poseduju jedan cirkularni i jedan linearni hromozom, što je utvrđeno PFGE analizom genoma nekoliko sojeva ovih vrsta (Allardet-Servent i sar., 1993; Jumas-Bilak i sar., 1998; Urbanczyk i sar., 2003). *A. rhizogenes*/biovar 2 poseduje cirkularni hromozom i veliki cirkularni replikon, dok *A. vitis* poseduje dva cirkularna hromozoma (Jumas-Bilak i sar., 1998; Urbanczyk i sar., 2003; Slater i sar., 2009). Pored hromozoma, *Agrobacterium* sojevi mogu posedovati jedan ili više plazmida, a patogeni sojevi poseduju pTi ili pRi.

Mnogi autori utvrdili su značajnu varijabilnost u pogledu broja i veličine plazmida unutar genoma *Agrobacterium* spp. (Sheikholeslam i sar., 1979; Albiach i López, 1992; Puławska i sar., 1998; Burr i sar., 1999; Raio i sar., 2004). Albiach i López (1992) su analizirali plazmidne profile 80 sojeva *A. tumefaciens*/biovar 1, *A. rhizogenes*/biovar 2 i *A. vitis*, poreklom iz 13 domaćina u Španiji. Broj plazmida je varirao 1-5, a njihova veličina 5-1000 MDa. U Poljskoj je utvrđena slična heterogenost plazmidnih profila, broj plazmida je iznosio 1-4, a veličina 27-315 kbp (Puławska i sar., 1998). U obe studije, u Španiji i Poljskoj, nije uočena korelacija između plazmidnog profila i osetljivosti na agrocin 84 (bakteriocin proizveden od strane soja K84), biovara/vrste, domaćina i geografskog porekla. U slučaju sojeva poreklom iz Poljske,

takođe nije uočena korelacija između stepena virulentnosti i plazmidnog profila. Burr i sar. (1999) su analizirali nepatogene *A. vitis* sojeve poreklom iz divlje loze i ustanovili da broj plazmida u njihovom genomu može iznositi 0-3. Raio i sar. (2004) su proučavali populaciju tumorogenih *Agrobacterium* sp. poreklom iz fikusa i utvrdili heterogenost u pogledu plazmidnih profila, gde je broj plazmida varirao 1-5. Takođe, nije utvrđena veza između plazmidnog profila i geografskog porekla, virulentnosti, biovara ili RFLP otisaka 16S rRNK gena.

Velázquez i sar. (2005) su otkrili postojanje *A. rhizogenes*/biovar 2 sojeva koji su pored pTi ili pRi posedovali i simbiotski plazmid (pSym), karakterističan za kvržične bakterije. Proučavajući ovaj fenomen, autori su pokazali da ovi sojevi mogu da izazovu razvoj tumora, odnosno kosmatost korena, ali i nodulaciju biljaka pasulja u prirodnim uslovima.

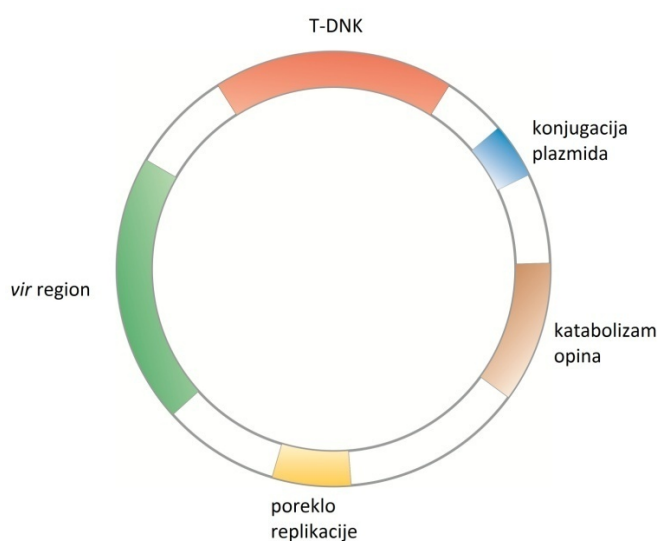
Do sada je sekvenciran i mapiran čitav genom po jednog soja *A. tumefaciens*/biovar 1 (C58), *A. rhizogenes*/biovar 2 (K84) i *A. vitis* (S4) (Goodner i sar., 2001; Wood i sar., 2001; Slater i sar., 2009). Takođe, nedavno je sekvenciran i genom jednog soja *A. tumefaciens*/biovar 1 (F2), tri soja *Agrobacterium* sp. (H13-3, ATCC 31749, UHFBA-218) (Li i sar., 2011; Ruffing i sar., 2011; Wibberg i sar., 2011; Dua i sar., 2013), kao i nepriznate vrste *Agrobacterium albertimagni* (Trimble i sar., 2012). Ove studije doprinele su boljem razumevanju organizacije genoma *Agrobacterium* vrsta, njihovom poreklu i evoluciji.

Imajući u vidu kompleksnost genetičke organizacije *Agrobacterium* vrsta, kod patogenih predstavnika ovog roda, analiza genetičkog diverziteta izvođena je kako na nivou hromozomske, tako i na nivou plazmidne DNK. *A. vitis* je jedina vrsta roda *Agrobacterium* koja je sistematski proučavana iz aspekta T-DNK, Ti-plazmida i hromozomske DNK (Burr i sar., 1998).

### **2.3.3 pTi/pRi**

Patogenost *Agrobacterium* spp. određena je prisustvom pTi ili pRi u genomu bakterije. Geni koji kontrolišu procese vezane za patogenezu takođe se nalaze i na hromozomima (Matthysse, 2006). pTi i pRi se sastoji iz više integrisanih komponenti: T-DNK, *vir* regiona, gena koji kontrolišu katabolizam opina, konjugaciju plazmida i

“quorum sensing” mehanizam, sekvence porekla replikacije i regiona inkompatibilnosti (Matthysse, 2006; Otten i sar., 1992; Slika 2). pTi i pRi poseduju mozaičnu strukturu, što ukazuje na njihovu evoluciju putem horizontalnog transfera gena (Otten i sar., 1992). Do sada je sekvencirana DNK nekoliko pTi i pRi poreklom iz *Agrobacterium* sp.: pTiC58 (Goodner i sar., 2001; Wood i sar., 2001), pTi15955 (GeneBank Acc. No. AF242881), pTi-SAKURA (Suzuki i sar., 2000) i pRi1724 (Moriguchi i sar., 2001).



**Slika 2.** Šematski prikaz glavnih komponenti pTi

### 2.3.3.1 Opin tip

U tumorima koji se razvijaju nakon infekcije *Agrobacterium* spp., aktivnošću gena koji se nalaze na T-DNK, dolazi do stvaranja posebne grupe jedinjenja koji se nazivaju opini. Opini su derivati L-amino kiselina i prostih karbonilnih jedinjenja primarnog metabolizma, i do sada je opisano više od 20 različitih tipova ovih molekula (Chilton i sar., 2001; Dessaux i sar., 1998). Opini predstavljaju izvor hranljivih materija za *Agrobacterium* spp. i stimulatивно deluju na konjugaciju pTi ili pRi (Kerr i sar., 1977; Ellis i sar., 1982; Dessaux i sar., 1998; Otten i sar., 2008), mogu služiti kao atraktanti (Kim i Farrand, 1998), ali mogu delovati i inhibitorno prema pojedinim *Agrobacterium* sojevima (Kim i sar., 2001). Geni za katabolizam opina nalaze se takođe na plazmidu, izvan T-DNK (Montoya i sar., 1977; Slika 2). *Agrobacterium* spp. mogu koristiti više od jednog tipa opina, među kojima i one koje ne sintetišu sami (Moore i

sar., 1997; Ridé i sar., 2000). Međutim, kao izvor hranljivih materija, opine mogu koristiti i određene bakterije iz drugih rodova, kao i pojedine gljive (Tremblay i sar., 1987; Beauchamp i sar., 1990; 1991).

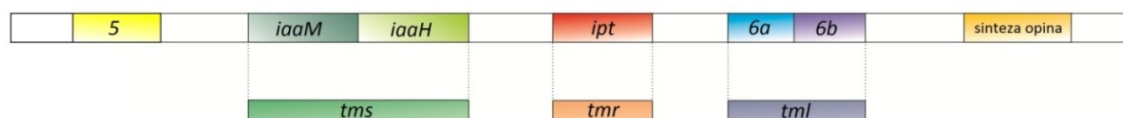
Sojevi *Agrobacterium* sp., odnosno njihovi pTi ili pRi se tradicionalno nazivaju i klasifikuju prema opinima koji se stvaraju u tumoru (Dessaux i sar., 1998; Matthyse, 2006; Otten i sar., 2008). Shodno tome, sojevi *A. vitis* su podeljeni u tri glavne grupe: oktopin/kukumopin (O/C), nopalin (N) i vitopin (V) tip (Szegedi i sar., 1988; Paulus i sar. 1989a). Međutim, ovakav način klasifikacije nije sasvim zadovoljavajući, prvenstveno jer pojedini pTi i pRi indukuju tumore koji ne sadrže nijedan poznat tip opina (Dessaux i sar., 1998; Otten i sar., 2008). Sa druge strane, jedan plazmid može indukovati stvaranje više tipova opina, pri čemu može postojati više različitih kombinacija, što komplikuje ovaj vid klasifikacije. Budući da geni za sintezu i korišćenje opina zauzimaju relativno mali deo Ti-plazmida, moguće je da kod dva plazmida ovi geni budu slični ili identični, a da ostatak njihove plazmidne DNK bude suštinski različit. Ovo pre svega može biti posledica mozaične strukture plazmida nastale horizontalnim transferom gena (Otten i sar., 1992; Dessaux i sar., 1998). Stoga, opin tip ima samo ograničen značaj u klasifikaciji pTi i pRi (Otten i sar., 2008).

Smatra se da unutar populacije *A. vitis* dominiraju sojevi O/C tipa (60%), zatim slede sojevi N tipa (30%), dok su sojevi V tipa malobrojniji (10%) (Burr i sar., 1998). Slični rezultati dobijeni su kada je proučavana populacija *A. vitis* u Mađarskoj (Szegedi, 2003) i Francuskoj (Ridé i sar., 2000). U Bugarskoj su takođe preovladavali sojevi sa O/C tipom pTi, u manjoj meri su bili prisutni oni sa V tipom pTi, dok N tip nije detektovan (Genov i sar., 2006a). Sa druge strane, 38% analiziranih *A. vitis* sojeva, koji su izolovani u Italiji, pripadalo je O/C grupi, 56% V grupi, dok N grupa nije utvrđena (Bini i sar., 2008b). Među proučavanim *A. vitis* sojevima poreklom iz Irana takođe preovladavaju oni sa V tipom pTi (Rouhrazi i Rahimian, 2012a).

### **2.3.3.2 T-DNK**

T-DNK je fragment Ti plazmida koji se tokom patogeneze prenosi i ugrađuje u biljni genom i odgovoran je za razvoj tumora. Na ovom fragmentu nalaze se geni koji kontrolišu proizvodnju biljnih hormona rasta, utiču na izmenu odgovora biljke na uticaj

ovih hormona, kao i geni za sintezu i izlučivanje opina (Matthysse, 2006). Geni koji imaju direktnu ili indirektnu ulogu u tumorogenezi nazivaju se još i onkogeni: gen 5, *iaaM*, *iaaH*, *ipt*, gen 6a i gen 6b (Britton i sar., 2008; Slika 3). Geni *iaaM* (*tms1*) i *iaaH* (*tms2*) čine *tms* (“tumor morphology shooty”) lokus, *ipt* gen čini *tmr* (“tumor morphology rooty”) lokus, a geni 6a i 6b čine *tml* (“tumor morphology large”) lokus (Slika 3). Geni *iaaM* i *iaaH* utiču na pojačanu sintezu auksina, a *ipt* na pojačanu sintezu citokinina. Smatra se da gen 5 i gen 6b regulišu odgovor biljke na dejstvo fitohormona, mada njihov mehanizam delovanja još uvek nije potpuno razjašnjen (Matthysse, 2006; Britton i sar., 2008). Gen 5 ima uticaja na morfologiju tumora, a gen 6b utiče na rast i veličinu tumora. Gen 6a nema direktan uticaj na proces tumorogeneze (Britton i sar., 2008).



**Slika 3.** Šematski prikaz građe T-DNK

T-DNK može imati različitu strukturu, što je detaljnije proučeno na primeru vrste *A. vitis* i njenih pTi (Paulus i sar., 1989a; Burr i sar., 1998). Utvrđena su tri osnovna tipa T-DNK kod ove vrste, a koji odgovaraju opin tipovima pTi. T-DNK tipovi se razlikuju u broju T-DNK komponenti, kao i rasporedu i sastavu onkogeni (Paulus i sar., 1989a; Burr i sar., 1998; Burr i Otten, 1999). O/C tip T-DNK se sastoji iz dve nezavisne T-DNK komponente: TA-DNK i TB-DNK, nopalini tip T-DNK sadrži pojedinačnu T-DNK komponentu, dok se vitopini tip T-DNK sastoji iz tri nezavisne T-DNK komponente: T1, T2 i T3. O/C tip T-DNK se može podeliti na dve podgrupe: jednu sa kompletnim TA-DNK (OL) i drugu sa skraćenim TA-DNK regionom (OS) (Paulus i sar., 1989a). Utvrđen je i još jedan tip T-DNK kod soja CG474, koji je srodan strukturi TA-DNK O/C tipa, ali jasno različit (Otten i sar., 1996; Burr i sar., 1998; Burr i Otten, 1999). Kod OL grupe, region TA-DNK se sastoji iz onkogeni 5, TA-*iaaM*, TA-*iaaH*, *ipt*, 6b, i gena *acs* (sinteza agrocinopina) i *ocs* (sinteza oktopina), dok se TB-DNK sastoji iz TB-*iaaM*, TB-*iaaH*, i gena *cus* (sinteza kukumopina) i *acs* (Paulus i sar., 1989a; Burr i sar., 1998; Burr i Otten, 1999). U slučaju OS grupe, na TA-DNK nisu prisutni TA-*iaaM*, TA-*iaaH* i *ipt*. Ipak, sojevi predstavnici OS grupe i dalje su u stanju

da izazovu tumore, ali kroz aktivnost gena *6b*, TB-*iaaM* i TB-*iaaH*. Nopalina tip T-DNK sastoji se iz onkogena *5*, *iaaM*, *iaaH*, *6b* i *3'*, kao i gena za sintezu opina *nos* (sinteza nopalina) i *acs* (Burr i sar., 1998). T-DNK soja CG474 se odlikuje postojanjem insercionih elemenata unutar *iaaM* gena, koji je stoga inaktiviran, a insercioni element se nalazi i između *6b* i *ocs* gena (Burr i Otten, 1999). I pored ovoga, soj CG474 može izazvati stvaranje tumora na vinovoj lozi. Kod vitopin tipa T-DNK, T1 se sastoji iz gena *6b* i *vis* (sinteza vitopina), T2 iz *iaaH* i *iaaM*, a T3 iz *ipt* i mutiranog, neaktivnog *vis* gena (Canaday i sar., 1992).

### 2.3.3.3 *Vir* region

Prenos i ugradnja T-DNK u biljni genom je proces koji je prvenstveno kontrolisan aktivnošću *vir* gena (Matthysse, 2006). Geni *virA* i *virG* predstavljaju dvokomponentni sistem, koji reaguje na fenolno jedinjenje acetosiringon, koje se oslobađa iz povređenog biljnog tkiva, a zatim reguliše i aktivira ekspresiju ostalih *vir* gena (Gelvin, 2003; Matthysse, 2006; McCullen i Binns, 2006). Geni *virD*, *virC* i *virE* kontrolišu prenos T-DNK i njegovu zaštitu od degradacije u biljnoj ćeliji. Na pojedinim Ti plazmidima prisutni su i još neki geni u *vir* regionu kao što su *virF*, *virH*, *virJ* i *tzs* (Matthysse, 2006). Postoje dokazi da *virA*, *virC*, *virE*, *virF* i *tzs* geni određuju spektar domaćina *Agrobacterium* sp. (Matthysse, 2006). U literaturi postoji malo podataka o *vir* regionu kod različitih grupa *A. vitis* sojeva. Čini se da je *vir* region O/C sojeva sličan onim opisanim kod *A. tumefaciens* sojeva, dok vitopin sojevi poseduju različitu strukturu *vir* regiona (Canaday i sar., 1992; Burr i sar., 1998).

### 2.3.4 Genetički diverzitet *Agrobacterium* spp.

Prvobitne studije koje su se bavile proučavanjima genetičkog diverziteta *Agrobacterium* spp. bazirale su se na metodi hibridizacije, korišćenjem različitih DNK proba (Paulus i sar., 1989a; Michel i sar., 1990; Nesme i sar., 1992; Bouzar i sar., 1993b; Schulz i sar., 1993a, Otten i sar., 1996). Iako se ova metoda pokazala korisnom u karakterizaciji pTi i hromozomske DNK, ovaj pristup je nepogodan za analizu većeg broja sojeva u populacionim studijama (Ponsonnet i Nesme, 1994). Schulz i sar. (1993a)

su, pored metode hibridizacije, u proučavanju genetičkog diverziteta *Agrobacterium* sojeva koristili i PFGE metodu.

Kasnije studije zasnivale su se na RFLP analizi DNK fragmenata pTi i hromozomske DNK, koji su prethodno amplifikovani PCR metodom (PCR-RFLP; Ponsonnet i Nesme, 1994; Otten i sar., 1996; Momol i sar., 1998; Pionnat sar., 1999; Burr i sar., 1999; Argun i sar., 2002; Peluso i sar., 2003; Vogel i sar., 2003; Raio i sar., 2004; Genov i sar., 2006b; Krimi i sar., 2006; Alippi i sar., 2012). Predmet RFLP analize bila je i kompletna DNK ekstrahovana iz sojeva *A. vitis* (Gillings i Ophel-Keller, 1995; Otten i sar., 1996). Tokom RFLP analize, DNK fragment biva isečen u kraće delove aktivnošću restrikcionog enzima (restrikcione endonukleaze), a dobijeni restrikcioni fragmenti se razdvajaju prema veličini elektroforezom u gelu. Restrikcioni enzimi prepoznaju specifične sekvence nukleotida (4-6 nukleotida određenog redosleda), koje se nazivaju sekvence prepoznavanja ili restrikciona mesta, u okviru kojih seku lanac DNK.

PCR-RFLP je primenljiv u slučaju bilo kog umnoženog fragmenta DNK, a postoje i određene specijalizovane forme ove metode, kao što je metoda restrikcione analize umnožene ribozomalne DNK (eng. amplified ribosomal DNA restriction analysis, ARDRA; Vaneechoutte i sar., 1992). Ribozomalna DNK (rDNK) sastoji se iz 16S, 23S i 5S gena, organizovanih u *rrn* operon. Između ovih gena nalaze se ITS regioni, unutar kojih se mogu nalaziti geni koji kodiraju sintezu transportne RNK (tRNK). Operoni gena ribozomalnih proteina (*rrn*) mogu biti prisutni u više kopija u genomu bakterije. Npr. *A. tumefaciens*/biovar 1 (C58) i *A. vitis* (S4) poseduju četiri, a *A. rhizogenes*/biovar 2 (K84) tri *rrn* operona u svom genomu (Goodner i sar., 2001; Wood i sar., 2001; Slater i sar., 2009).

PCR-RFLP analiza 16S rRNK gena pokazala se korisnom u identifikaciji i diferencijaciji *Agrobacterium* spp. do nivoa vrste (Ponsonnet i Nesme, 1994; Oger i sar., 1998). Međutim, usled nedovoljnog polimorfizma ovog gena, razdvajanje srodnih sojeva unutar pojedinih *Agrobacterium* vrsta nije moguće (Ponsonnet i Nesme, 1994). Sa druge strane, ITS region između 16S i 23S rRNK gena značajno je varijabilan u pogledu veličine i nukleotidne sekvence kod mnogih bakterija (Gürtler i Stanisich, 1996). *Agrobacterium* spp. nisu izuzetak, te je u cilju grupisanja sojeva primenljivana PCR-RFLP analiza 16S-23S ITS regiona (Ponsonnet i Nesme, 1994; Otten i sar., 1996;

Burr i sar., 1999; Argun i sar., 2002; Peluso i sar., 2003; Raio i sar., 2004; Genov i sar., 2006b). Pored razlika u veličini i sekvenci ITS regiona između različitih sojeva iste vrste, utvrđeno je i postojanje polimorfizma među *rrn* operonima unutar genoma pojedinačnih sojeva, pripadnika roda *Agrobacterium* (Bautista-Zapanta i sar., 2009).

Genetički diverzitet *Agrobacterium* spp. proučavan je i primenom metoda kojima se vrši analiza kompletnog genoma kao što je RAPD (Irelan i Meredith, 1996; Momol i sar., 1998; Llop i sar., 2003; Puławska i Kałużna, 2011). Uopšteno, RAPD je tip PCR metode gde se fragmenti DNK umnožavaju nasumično (Welsh i McClelland, 1990; Williams i sar., 1990). U ovu svrhu koriste se kratki oligonukleotidni prajmeri, najčešće dužine 10 bp, čija je sekvenca proizvoljna. Ovakvi prajmeri se koriste u parovima ili pojedinačno, pod ne tako strogim uslovima reakcije, što se pre svega odnosi na temperaturu vezivanja prajmera koja iznosi 35-40°C. Tokom reakcije, prajmeri se vezuju za delove DNK koji su delimično ili potpuno komplementarni sekvenci prajmera. Na ovaj način dolazi do amplifikovanja više PCR produkata varijabilne veličine (~200-2000 bp) i dobijanja karakterističnih genetičkih profila.

U proučavanju genetičkog diverziteta *Agrobacterium* sojeva korišćena je i rep-PCR metoda (Rhouma i sar., 2006; Kawaguchi i sar., 2008; Gonzales i sar., 2008; Alippi i sar., 2012). Rep-PCR razvijen je na osnovu specifičnih konzerviranih repetitivnih sekvenci REP (eng. repetitive extragenic palindromic), ERIC (eng. enterobacterial repetitive intergenic consensus) i BOX, koje su raspoređene unutar genoma različitih vrsta bakterija (Versalovic i sar., 1991; 1994). U ovu svrhu najčešće se koristi tri tipa prajmera koji odgovaraju REP, ERIC i BOX sekvencama, dok se pojedinačni protokoli nazivaju REP-PCR, ERIC-PCR i BOX-PCR, ili zbirno rep-PCR (Versalovic i sar., 1991; 1994). Prajmeri su dizajnirani da umnože DNK koja se graniči sa dva susedna repetitivna elementa, mada nije isključeno ni vezivanje prajmera za druge homologe sekvence (Louws i sar., 1999). Broj različitih fragmenata koji se umnože tokom reakcije varira (10-30 ili više), čime se dobija karakterističan genetički otisak. U analizi genetičkog diverziteta *Agrobacterium* spp. korišćena je i PCR metoda sa prajmerima komplementarnim pojedinim insercionim sekvencama (Rouhrazi i Rahimian, 2012b).

Metode novijeg datuma, koje podrazumevaju sekvencionu analizu pojedinih gena ili regiona, kako na plazmidnom, tako i na hromozomskom delu genoma, takođe



su korišćene u proučavanju genetičkog diverziteta *Agrobacterium* spp. (Rhouma i sar., 2006; Kawaguchi i sar., 2008; Bautista-Zapanta i sar., 2009; Palacio-Bielsa i sar., 2009; Kawaguchi i Inoue, 2009; Costechareyre i sar., 2010; Aujoulat i sar., 2011; Puławska i Kałużna, 2011; Alippi i sar., 2012; Shams i sar., 2013). Postupkom sekvenciranja određuje se redosled baznih parova kod analiziranih fragmenata. Na ovaj način, mogu se vrlo precizno utvrditi razlike među njima, odnosno razlike između proučavanih sojeva. Najčešće primenjivan metod sekvenciranja DNK je tzv. Sangerov metod, koji je razvijen sedamdesetih godina prošlog veka, i koji se i dalje koristi kao standardni metod (Sanger i sar., 1977). Međutim, poslednjih godina ova metoda sve više biva zamenjena savremenijim vidovima sekvenciranja, a koje svoju primenu pronalaze i u oblasti biljne patologije (Studholme i sar., 2011).

Poslednjih godina, u proučavanju genetičkog diverziteta *Agrobacterium* spp. korišćeni su konstitutivni geni (Kawaguchi i sar., 2008; Costechareyre i sar., 2010; Aujoulat i sar., 2011; Puławska i Kałużna, 2011; Shams i sar., 2013). Konstitutivni ili “housekeeping” geni od vitalnog su značaja za funkcionisanje ćelije, te su prisutni u genomu svih sojeva jedne vrste. Ovi geni evoluiraju veoma sporo, što ih čini pogodnim za karakterizaciju patogena u studijama koje se bave globalnom epidemiologijom (Maiden i sar., 1998; Enright i Spratt, 1999). Metoda kojom se vrši karakterizacija bakterija korišćenjem DNK sekvenci 7 konstitutivnih gena naziva se tipizacija na osnovu multilokusnih sekvenci (eng. multilocus sequence typing, MLST; Maiden i sar., 1998; Enright i Spratt, 1999). Na ovaj način analiziraju se unutrašnji fragmenti konstitutivnih gena dužine 450-500 bp. MLST metoda je prvenstveno razvijena za proučavanje epidemiologije različitih oboljenja povezanih sa sojevima koji pripadaju jednoj poznatoj vrsti. Sličan princip primenjen je takođe u taksonomskim studijama, gde je definisana posebna metoda, već pomenuta, analiza multilokusnih sekvenci (MLSA). U slučaju MLSA metode, predmet istraživanja su DNK sekvence bakterija koje pripadaju različitim taksonomskim kategorijama, uključujući i čitave rodove (Gevers i sar., 2005).

### 2.3.4.1 Sojevi poreklom iz vinove loze

Proučavajući genetički diverzitet sojeva *A. vitis*, Paulus i sar. (1989a) su izvršili njihovu klasifikaciju na O/C, N i V tip, o čemu je bilo više reči u prethodnim poglavljima. Schulz i sar. (1993a) su PFGE metodom analizirali različite *Agrobacterium* sojeve, gde je utvrđena neznatna različitost među proučavanim sojevima *A. vitis* koji su pripadali jednoj genetičkoj grupi. Sa druge strane, Irelan i Meredith (1996) su koristili RAPD metodu u analizi *Agrobacterium* sojeva, a najveći stepen genetičke raznolikosti ispoljili su upravo *A. vitis* sojevi.

Gillings i Ophel-Keller (1995) su proučavali genetički diverzitet populacije *A. vitis* poreklom iz Australije i poredili je sa sojevima izolovanim u SAD. Korišćenjem restrikcione analize kompletnog genoma ustanovili su genetičku heterogenost među sojevima iz Australije. Neki od proučavanih sojeva posedovali su identične genetičke profile kao i pojedini sojevi iz SAD, što je ukazivalo da je patogen otuda introdukovan u Australiju. Restrikcionom analizom kompletnog genoma i 16S-23S rRNK ITS regiona, kao i hibridizacijom sa različitim pTi probama, Otten i sar. (1996) su definisali više hromozomskih i pTi grupa među sojevima *A. vitis*. Svako hromozomskoj grupi određenoj na osnovu analize 16S-23S rRNK ITS regiona odgovarao je određeni tip pTi (O/C, N ili V), ali je utvrđeno i postojanje nekoliko izuzetaka. Na ovo istraživanje nadovezali su se Momol i sar. (1998), koji su analizirali istu kolekciju sojeva primenom RAPD metode i RFLP analize 5'-kraja 23S rRNK gena, pri čemu su dobili saglasne rezultate. Korelaciju između RFLP profila 16S-23S rRNK ITS regiona i opina tipa pTi uočili su i Genov i sar. (2006b), analizirajući populaciju *A. vitis* u Bugarskoj.

Proučavajući nepatogene sojeve *A. vitis* iz divlje loze, Burr i sar. (1999) su na osnovu RFLP analize 16S-23S rRNK ITS regiona utvrdili postojanje 15 različitih genotipova koji nisu posedovali sličnost sa prethodno definisanim 16S-23S rRNK ITS profilima kod vrste *A. vitis* (Otten i sar., 1996). Palacio-Bielsa i sar. (2009) su proučavali populaciju sojeva *A. tumefaciens*/biovar 1, *A. rhizogenes*/biovar 2 i *A. vitis* poreklom iz vinove loze u Španiji. Među sojevima *A. vitis* ustanovljeno je tri grupe na osnovu sekvencione analize 16S rRNK gena i tri tipa pTi na osnovu PCR analize i testa korišćenja opina. Svako od 16S rRNK grupa odgovarala je određena pTi grupa, što je takođe ukazivalo na povezanost hromozomske i plazmidne DNK kod vrste *A. vitis*.

Genetički diverzitet populacija *Agrobacterium* sp. poreklom iz vinove loze proučavana je i u Japanu. Primenom rep-PCR metode (ERIC i BOX prajmeri) i sekvencione analize konstitutivnih gena (*pyrG*, *recA* i *rpoD*) izdvojeno je pet grupa među sojevima *A. vitis* (Kawaguchi i sar., 2008). Kawaguchi i Inoue (2009) su proučavali sojeve *A. tumefaciens*/biovar 1 poreklom iz vinove loze u Japanu. U ovoj studiji su analizirane sekvence *virC* gena gde je uključeno i više sojeva *A. vitis* i neki sojevi poreklom iz drugih domaćina. Na ovaj način utvrđeno je nekoliko genetičkih grupa, jedna sastavljena isključivo od *A. vitis* sojeva, i druga gde su zajedno bili prisutni *A. tumefaciens*/biovar 1 i *A. vitis* sojevi poreklom iz vinove loze, dok su ostale grupe bile sastavljene od *Agrobacterium* spp. poreklom iz drugih domaćina.

Bautista-Zapanta i sar. (2009) su utvrdili razlike u veličini i sekvenci 16S-23S rRNK ITS regiona, među proučavanim *A. vitis* sojevima. Kod dva proučavana soja utvrđen je i polimorfizam među *rrn* operonima unutar njihovog genoma. U proučavanju genetičkog diverziteta sojeva *A. vitis* poreklom iz vinove loze u Iranu primenjena je PCR metoda korišćenjem insercionog elementa IS50 kao genetičkog markera, čime je izdvojeno četiri genetičke grupe (Rouhrazi i Rahimian, 2012b).

#### **2.3.4.2 Sojevi poreklom iz voćaka, ukrasnih i šumskih vrsta**

Michel i sar. (1990) utvrdili su različitost među sojevima *A. tumefaciens*/biovar 1 i *A. rhizogenes*/biovar 2 koje su izolovali iz jednog šumskog rasadnika, a koja se odnosila na pTi regione: T-DNK i poreklo replikacije. Nesme i sar. (1992) su iz pojedinačnih tumora poreklom sa biljaka jasike (*Populus tremula*) iz jednog rasadnika, izolovali *Agrobacterium* sojeve sa više različitih hromozomskih i pTi genotipova. U istom istraživanju utvrđena je stabilnost pTi genotipova unutar određene grupe sojeva sa identičnim hromozomskim genotipom. Ponsonnet i Nesme (1994) vršili su RFLP analizu kako hromozomskog (16S rRNK gen, 16S-23S rRNK ITS region), tako i plazmidnog (*tmr*, *nos*, *virA* i *virB2* geni) dela genoma većeg broja *Agrobacterium* sp. sojeva, pri čemu nije uočena korelacija između hromozomskih i plazmidnih genetičkih otisaka. Genetički diverzitet *Agrobacterium* spp. poreklom iz biljaka ruže, proučen je korišćenjem RFLP analize 16S rRNK i plazmidnih *vir* i *tms* gena (Pionnat i sar., 1999). U ovoj studiji, takođe nije uočena korelacija između karakteristika hromozomske i

plazmidne DNK. RFLP analizom 16S rRNK gena i 16S-23S rRNK ITS regiona ustanovljen je izrazit genetički diverzitet među sojevima *A. tumefaciens*/biovar 1, a genetička homogenost među *A. rhizogenes*/biovar 2 poreklom iz različitih biljnih vrsta u Italiji (Peluso i sar., 2003). Međutim grupa sojeva *A. rhizogenes*/biovar 2 poreklom iz Sardinije bila je dosta varijabilna, i razlikovala se od ostalih sojeva iste vrste poreklom iz drugih regiona u Italiji. Raio i sar. (2004) proučavali su populaciju tumorogenih *Agrobacterium* sp. poreklom iz fikusa i takođe primenili RFLP tehniku u analizi 16S rRNK gena i 16S-23S rRNK ITS regiona, s tim što su analizirani i plazmidni geni (*vir* i *tms* geni). Utvrđena je izrazita varijabilnost među sojevima, dok korelacija između hromozomske i plazmidne DNK nije uočena. U sličnoj studiji, gde su kao predmet proučavanja bili sojevi *A. tumefaciens*/biovar 1 izolovani iz biljaka eukaliptusa u Alžiru, takođe nije uočena korelacija između hromozomske DNK i plazmidnih profila (Krimi i sar., 2006). Značajan genetički diverzitet uočen je i među sojevima *A. tumefaciens*/biovar 1 poreklom iz različitih biljnih vrsta u Tunisu, primenom rep-PCR metode (BOX-PCR) i sekvencionom analizom *recA* konstitutivnog gena (Rhouma i sar., 2006; Costechareyre i sar., 2010). Rep-PCR metoda korišćenjem BOX prajmera primenjena je u proučavanjima genetičkog diverziteta sojeva iste vrste poreklom iz oraha u SAD, i na ovaj način izdvojeno je nekoliko genotipova koji su se podudarali sa geografskim poreklom sojeva (Gonzales i sar., 2008).

U Poljskoj je proučavan genetički diverzitet većeg broja sojeva *Agrobacterium* sp. poreklom iz različitih voćaka, korišćenjem RAPD metode i sekvencionom analizom 16S rRNK i *gyrB* gena (Puławska i Kałużna, 2011). Ustanovljen je značajan genetički diverzitet među sojevima *A. tumefaciens*/biovar 1, grupa sojeva *A. rhizogenes*/biovar 2 bila je homogenija, pri čemu nije bilo korelacije između genetičkih grupa i geografskog porekla sojeva. U studiji gde je proučavana populacija *Agrobacterium* sp. poreklom iz borovnice u Argentini, utvrđeno je više genetičkih grupa primenom RFLP analize 16S rRNK gena i rep-PCR metode korišćenjem ERIC prajmera (Alippi i sar., 2012).

#### **2.3.4.3 Sojevi poreklom iz zemljišnih ekosistema**

Bouzar i sar. (1993b) analizirali su populaciju *Agrobacterium* sp. u zemljištu koje nije obrađivano 5 godina. Iz uzoraka zemljišta izolovali su sojeve koji su pripadali

vrsti *A. tumefaciens*/biovar 1 i *A. rhizogenes*/biovar 2. Sojevi *A. rhizogenes*/biovar 2 činili su homogenu grupu na osnovu analize hromozomske DNK i bili su nepatogeni, dok su sojevi *A. tumefaciens*/biovar 1 bili sastavljeni iz pet različitih grupa, od kojih je jedna posedovala nopalin tip pTi, druga oktopin tip pTi, a ostale su bile nepatogene. Vogel i sar. (2003) su ustanovili veoma značajnu genetičku različitost među sojevima *A. tumefaciens*/biovar 1 koje su izolovali iz 1cm<sup>3</sup> zemljišta. Unutar 55 sojeva utvrđeno je ukupno 42 različita genetička profila na osnovu RFLP analize 16S-23S rRNK ITS regiona.

Shams i sar. (2013) razvili su metodu koja se zasnivala na sekvencionoj analizi *recA* gena i kojom se može proučavati genetički diverzitet *Agrobacterium* sp. kroz direktnu analizu uzoraka zemljišta. Analizom DNK ekstrahovane iz zemljišta poreklom iz rizosfere divljih *Poaceae* vrsta, utvrđeno je prisustvo dva genomovara *A. tumefaciens*/biovar 1 kompleksa, kao i drugih *Agrobacterium* sp.

## **2.4 Proučavanje *Agrobacterium* spp. u Srbiji**

Istraživanja na temu bakterioznog raka izvođena su u našoj zemlji još pedesetih godina prošlog veka. Bolest je tada bila zastupljena, u manjem ili većem stepenu, u skoro svim rasadnicima voćaka u Srbiji (Bošković, 1955). Zbog toga su sprovedena istraživanja u cilju procene pojedinih mera suzbijanja i pronalaska najefikasnijeg načina zaštite voćaka od ove bolesti. Međutim, nijedna proučavana mera nije dala zadovoljavajuće rezultate (Bošković, 1955).

Proučavanje problematike bakterioznog raka, prvenstveno na vinovoj lozi, bilo je posebno intenzivno tokom sedamdesetih godina. U tom periodu bolest je ugrozila gajenje vinove loze u pojedinim delovima Srbije, te je došlo do krčenja mnogih vinograda, pretežno u zapadno-moravskom i subotičko-horgoškom vinogradarskom rejonu (Panić, 1973; Arsenijević i sar., 1974; 1997). Bakteriozni rak vinove loze prvi put je uočen u Srbiji 1962. godine, na području trsteničkog vinogorja, na sorti Kardinal uveženoj iz Italije (Panić, 1973; 1977). Bolest je bila prisutna u zapadno-moravskom rejonu, ali i u nišavsko-južnomoravskom, timočkom, subotičko-horgoškom, banatskom i kosovsko-metohijskom (Panić, 1973; Arsenijević i sar., 1974; Panić, 1977; Arsenijević, 1997). U Hrvatskoj, bolest je uočena u Dalmaciji, a utvrđena je i u

Makedoniji (Arsenijević, 1997; Butrov, 1987; Kišpatić, 1987). Prema tadašnjim zapažanjima, bakteriozni rak najčešće je bio prisutan na sortama Afusali, Kardinal, Kraljica Vinograda, Muskat Hamburg, Beli Burgundac, Merlo i Italijanski Rizling, dok su Game Crni i Crni Burgundac navedene kao nešto otpornije (Panić 1973; 1977).

Iz obolelih biljaka vinove loze sa područja Horgoša izolovani su sojevi bakterija i proučene su njihove morfološke, odgajivačke, biohemijske i patogene odlike (Arsenijević i sar., 1974). Utvrđeno je da izolovani sojevi pripadaju vrsti *A. tumefaciens*. Tada sojevi sa vinove loze još uvek nisu bili izdvojeni kao poseban biovar, odnosno vrsta. Takođe, proučavane su metode dijagnoze bakterioznog raka na loznim kalemovima (Panić, 1976). Preliminarna dijagnoza donošena je na osnovu karakterističnih simptoma, a u cilju dokazivanja prisustva patogena u loznim kalemovima, izvršena je inokulacija test biljaka sojevima koji su izolovani iz obolelog tkiva.

Problematika bakterioznog raka nije proučavana samo na vinovoj lozi kao domaćinu. Proučavane su metode dijagnoze bakterioznog raka voćaka primenom različitih zeljastih biljaka (Panić, 1974). Takođe, proučavane su osobine sojeva *A. tumefaciens* poreklom iz jabuke (Panić i Dinić, 1976). Nešto kasnije, *A. tumefaciens* je utvrđen i kao prouzrokovatelj bakterioznog raka pitome kupine (Arsenijević, 1989) i maline (Milijašević i sar., 2007).

Posebno su proučavane mere kontrole bakterioznog raka i primena različitih mera suzbijanja patogena. Istražena je mogućnost suzbijanja bakterioznog raka jabuke i vinove loze primenom pesticida (Panić, 1981), a primenjene su i alternativne mere suzbijanja patogena, korišćenjem antibiotika ili antagonističkih sojeva gljiva i bakterija (Jovanović, 1990; 1993a; 1993b).

### 3. RADNA HIPOTEZA

Bakteriozni rak je široko rasprostranjeno i veoma ozbiljno oboljenje vinove loze, a prouzrokuje ga fitopatogena bakterija *A. vitis* ili u ređim slučajevima srodne vrste iz roda *Agrobacterium*. Ovo oboljenje je u Srbiji utvrđeno pre više od 50 godina i do sada je bilo sporadično prisutno, ne izazivajući značajnije štete. Međutim, poslednjih nekoliko godina zabeležena je učestala pojava bakterioznog raka na teritoriji naše zemlje.

Osnovna pretpostavka je da bakteriozni rak vinove loze u našoj zemlji prouzrokuju fitopatogene vrste roda *Agrobacterium*. U cilju izolacije, identifikacije i karakterizacije prouzrokovala ovog oboljenja, primeniće se raspoložive metode koje su do sada opisane u literaturi, a po potrebi će se izvršiti njihova modifikacija i optimizacija. Biće korišćene, kako klasične bakteriološke, tako i molekularne metode. Predmet molekularne identifikacije biće i raznovrsni referentni sojevi, čime će se izvršiti procena pouzdanosti ovih metoda.

Jedna od hipoteza u okviru ovog istraživanja jeste da postoje izvesne razlike među sojevima rasprostranjenim u Srbiji, pre svega u njihovom genotipu. Kako bi se proučile ove razlike pristupiće se detaljnoj karakterizaciji i analizi hromozomskog i plazmidnog dela njihovog genoma. Sojevi iz Srbije biće poređeni sa referentnim sojevima različitog geografskog porekla, koji će takođe biti obuhvaćeni istraživanjem.

Rezultatima istraživanja u okviru ove doktorske disertacije upotpuniće se znanje o bakterioznom raku vinove loze u našoj zemlji, što predstavlja preduslov za efikasnu kontrolu oboljenja. Prvenstveno, dobiće se odgovor o tome koje su vrste roda *Agrobacterium* zapravo prisutne na vinovoj lozi u Srbiji. Takođe, procenom postojećih metoda za detekciju i identifikaciju patogena, izvršiće se odabir najpogodnijih, a sve u cilju standardizacije procedure. Analizom genetičkog diverziteta doprineće se boljem razumevanju taksonomije i filogenetskih odnosa među proučavanim sojevima. Pored toga, steći će se uvid u strukturu populacije patogena i odgovoriće se na pojedina pitanja u vezi sa epidemiologijom oboljenja.

## **4. MATERIJAL I METODE**

### **4.1 Obilazak terena i uzorkovanje biljnog materijala**

Tokom obilaska terena u periodu 2010-2011. godine, pregledani su vinogradi raspoređeni u svim vinogradarskim rejonima na teritoriji naše zemlje, izuzev kosovsko-metohijskog. Biljni materijal uzorkovan je na lokalitetima gde su uočeni karakteristični simptomi bakterioznog raka. Uzorkovani su delovi stabla vinove loze sa tumorima ili tumorozno tkivo odstranjeno sa stabla. Birani su još uvek vitalni delovi biljke, uglavnom mlađe tkivo, sa tumorima u početnim fazama razvoja. Nakon uzorkovanja, materijal je čuvan u plastičnim kesama, u ručnom frižideru i dopremljen u laboratoriju. Obrada uzoraka izvedena je neposredno nakon dopremanja ili je vršeno njihovo čuvanje u kraćem periodu, u frižideru, pri temperaturi oko 5°C. U ovom istraživanju, analizirano je ukupno 62 uzorka vinove loze, prikupljena u 22 različita lokaliteta.

### **4.2 Izolacija patogena i sojevi korišćeni u radu**

Izolacija bakterija izvršena je iz fragmenata mladog i aktivnog tkiva tumora. Fragmenti su prvo isprani pod mlazom česmenske vode kako bi se uklonile nečistoće, kao i saprofitni i epifitni organizmi koji mogu biti prisutni na površini biljnog materijala. Zatim je skalpelom uklonjen nekrotični deo tumora do granice sa vitalnim tkivom, nakon čega je ponovo izvedeno ispiranje. Fragmenti su površinski dezinfikovani u ~1% rastvoru NaOCl u trajanju 10-20 minuta, a zatim isprani u 3 serije sterilne destilovane vode (SDV) u aseptičnim uslovima. Pojedinačni fragmenti su preneti u sterilnu Petri kutiju gde su skalpelom izdvojeni manji isečci tkiva, prečnika nekoliko milimetara, iz površinskog dela prvobitnog fragmenta, kao i iz njegove unutrašnjosti. Izdvojeno tkivo je dodatno isečeno skalpelom na sitnije fragmente, koji su preneti u mikroepruvete zapremine 1,5 ml, sa 1 ml SDV. Kako bi se omogućilo oslobađanje bakterija u tečnu fazu, tkivo je inkubirano najmanje 1 h pri sobnoj temperaturi, uz povremeno mešanje vorteks mešalicom. Zasejano je 20 µl tečne faze na čvrste YMA podloge, koje su zatim inkubirane 3-5 dana pri 27°C. Zasejavanje je



izvedeno bakteriološkom petljom, metodom iscrpljivanja u četiri poteza. Takođe, zasejavana su dva razređenja prvobitne suspenzije tkiva ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ). Izolati su prihvaćeni i prečišćeni na YMA ili KDA podlozi sa dodatkom 0,5%  $\text{CaCO}_3$  (KDA- $\text{CaCO}_3$ ).

Osim sojeva izolovanih u našoj zemlji, u pojedinim eksperimentima korišćeni su i različiti sojevi *A. vitis* iz međunarodnih kolekcija, kao i referentni i/ili tipski sojevi *Agrobacterium* sp. i *Rhizobium* sp. Svi *Agrobacterium/Rhizobium* sojevi korišćeni u radu predstavljeni su u Tabeli 7. Bakterijske kulture održavane su periodičnim presejavanjem na YMA podlozi, a čuvane su u mikroepruvetama, suspendovane u SDV pri  $5^\circ\text{C}$ , ili u krioepruvetama u glicerol hranljivom bujonu pri  $-80^\circ\text{C}$  (Schaad i sar. 2001). U testovima gde su proučavane morfološke, odgajivačke, biohemijsko-fiziološke i patogene odlike sojeva, korišćene su sveže kulture bakterija, stare 24-48 h, gajene na YMA podlozi pri  $27^\circ\text{C}$ . U slučaju testova reakcija po Gramu i aktivnost oksidaze, kulture bakterija gajene su pod istim uslovima na Kingovoj podlozi B (King i sar., 1954). Za pripremu uzoraka DNK i izvođenje ekstrakcije i prečišćavanja DNK, sojevi bakterija takođe su gajeni na Kingovoj podlozi B, 24 h pri  $27^\circ\text{C}$ . U pojedinim testovima, kao kontrole su korišćeni i sojevi bakterija iz drugih rodova (Tabela 8), koji su gajeni na mesopeptonskom agaru 24-48 h pri  $27^\circ\text{C}$ .

### **4.3 Molekularna detekcija pTi i identifikacija sojeva**

Sojevi izolovani iz vinove loze analizirani su PCR metodom korišćenjem više različitih prajmera specifičnih za gene prisutne na pTi ili pRi, ali i na hromozomima. Takođe, kod jednog reprezentativnog soja (KFB 239) umnožen je fragment 16S rRNK gena, i izvršeno njegovo sekvenciranje i analiza dobijene sekvence. Podaci o korišćenim prajmerima predstavljeni su u Tabeli 9. Predmet PCR analize takođe su bili i referentni sojevi *Agrobacterium* spp. poreklom iz različitih lokaliteta u svetu, od kojih je 36 sojeva pripadalo vrsti *A. vitis* (Tabela 7).

**Tabela 7.** Sojevi *Agrobacterium/Rhizobium* kompleksa vrsta korišćeni u ovom radu

Broj	Šifra soja	Ostale šifre	Vrsta/ biovar	Biološko poreklo <sup>a,b</sup>	Geografsko poreklo <sup>b</sup>	Godina izolacije <sup>b</sup>	Izvor <sup>c</sup>	Literatura
1.	KFB 239	/	<i>A. vitis</i>	<i>V. vinifera</i> L. cv. Cab Sav	Vršac, Srbija	2010.	Ovaj rad	/
2.	KFB 240	/	<i>A. vitis</i>	<i>V. vinifera</i> L. cv. Cab Sav	Vršac, Srbija	2010.	Ovaj rad	/
3.	KFB 241	/	<i>A. vitis</i>	<i>V. vinifera</i> L. cv. Cab Sav	Vršac, Srbija	2010.	Ovaj rad	/
4.	KFB 242	/	<i>A. vitis</i>	<i>V. vinifera</i> L. cv Cab Sav	Irig, Srbija	2011.	Ovaj rad	/
5.	KFB 243	/	<i>A. vitis</i>	<i>V. vinifera</i> L. cv. Chardonnay	Irig, Srbija	2011.	Ovaj rad	/
6.	KFB 244	/	<i>A. vitis</i>	<i>V. vinifera</i> L. cv. Chardonnay	Irig, Srbija	2011.	Ovaj rad	/
7.	KFB 245	/	<i>A. vitis</i>	<i>V. vinifera</i> L.	Negotin, Srbija	2011.	Ovaj rad	/
8.	KFB 246	/	<i>A. vitis</i>	<i>V. vinifera</i> L.	Negotin, Srbija	2011.	Ovaj rad	/
9.	KFB 247	/	<i>A. vitis</i>	<i>V. vinifera</i> L. cv. Cab Sav	Vršac, Srbija	2011.	Ovaj rad	/
10.	KFB 248	/	<i>A. vitis</i>	<i>V. vinifera</i> L. cv. Cab Sav	Vršac, Srbija	2011.	Ovaj rad	/
11.	KFB 249	/	<i>A. vitis</i>	<i>V. vinifera</i> L. cv. Merlot	Smederevo, Srbija	2011.	Ovaj rad	/
12.	KFB 250	/	<i>A. vitis</i>	<i>V. vinifera</i> L. cv. Merlot	Smederevo, Srbija	2011.	Ovaj rad	/
13.	KFB 251	/	<i>A. vitis</i>	<i>V. vinifera</i> L. cv. Cab Sav	Smederevo, Srbija	2011.	Ovaj rad	/
14.	KFB 252	/	<i>A. vitis</i>	<i>V. vinifera</i> L. cv. Cab Sav	Smederevo, Srbija	2011.	Ovaj rad	/
15.	KFB 253	/	<i>A. vitis</i>	<i>V. vinifera</i> L. cv. Italian Riesling	Smederevo, Srbija	2011.	Ovaj rad	/
16.	KFB 254	/	<i>A. vitis</i>	<i>V. vinifera</i> L. cv. Italian Riesling	Smederevo, Srbija	2011.	Ovaj rad	/
17.	KFB 255	/	<i>A. vitis</i>	<i>V. vinifera</i> L. cv. Demir Kapija	Šabac, Srbija	2011.	Ovaj rad	/
18.	KFB 256	/	<i>A. vitis</i>	<i>V. vinifera</i> L. cv. Plovdina	Šabac, Srbija	2011.	Ovaj rad	/
19.	KFB 257	/	<i>A. vitis</i>	<i>V. vinifera</i> L.	Šabac, Srbija	2011.	Ovaj rad	/
20.	KFB 258	/	<i>A. vitis</i>	<i>V. vinifera</i> L.	Šabac, Srbija	2011.	Ovaj rad	/
21.	KFB 259	/	<i>A. vitis</i>	<i>V. vinifera</i> L. cv. Crveni Drenak	Šabac, Srbija	2011.	Ovaj rad	/
22.	KFB 260	/	<i>A. vitis</i>	<i>V. vinifera</i> L. cv. Muscat Hamburg	Šabac, Srbija	2011.	Ovaj rad	/
23.	KFB 261	/	<i>A. vitis</i>	<i>V. vinifera</i> L.	Šabac, Srbija	2011.	Ovaj rad	/
24.	KFB 262	/	<i>A. vitis</i>	<i>V. vinifera</i> L. cv. Muscat Hamburg	Vladimirci, Srbija	2011.	Ovaj rad	/
25.	KFB 263	/	<i>A. vitis</i>	<i>V. vinifera</i> L. cv. Muscat Italia	Vladimirci, Srbija	2011.	Ovaj rad	/
26.	KFB 264	/	<i>A. vitis</i>	<i>V. vinifera</i> L.	Vranje, Srbija	2011.	Ovaj rad	/
27.	KFB 265	/	<i>A. vitis</i>	<i>V. vinifera</i> L.	Vranje, Srbija	2011.	Ovaj rad	/

(Nastavak na sledećoj strani)

**Tabela 7. Nastavak**

Broj	Šifra soja	Ostale šifre	Vrsta/ biovar	Biološko poreklo <sup>a,b</sup>	Geografsko poreklo <sup>b</sup>	Godina izolacije <sup>b</sup>	Izvor <sup>c</sup>	Literatura
28.	KFB 266	/	<i>A. vitis</i>	<i>V. vinifera</i> L.	Vranje, Srbija	2011.	Ovaj rad	/
29.	KFB 267	/	<i>A. vitis</i>	<i>V. vinifera</i> L.	Bujanovac, Srbija	2011.	Ovaj rad	/
30.	KFB 268	/	<i>A. vitis</i>	<i>V. vinifera</i> L.	Bujanovac, Srbija	2011.	Ovaj rad	/
31.	KFB 269	/	<i>A. vitis</i>	<i>V. vinifera</i> L., cv. Merlot	Vranje, Srbija	2011.	Ovaj rad	/
32.	KFB 270	/	<i>A. vitis</i>	<i>V. vinifera</i> L., cv. Merlot	Vranje, Srbija	2011.	Ovaj rad	/
33.	KFB 271	/	<i>A. vitis</i>	<i>V. vinifera</i> L., cv. Merlot	Vranje, Srbija	2011.	Ovaj rad	/
34.	KFB 272	/	<i>A. vitis</i>	<i>V. vinifera</i> L. cv. Cab Sav	Aleksandrovac, Srbija	2011.	Ovaj rad	/
35.	KFB 273	/	<i>A. vitis</i>	<i>V. vinifera</i> L. cv. Cab Sav	Aleksandrovac, Srbija	2011.	Ovaj rad	/
36.	KFB 274	/	<i>A. vitis</i>	<i>V. vinifera</i> L. cv. Cab Sav	Aleksandrovac, Srbija	2011.	Ovaj rad	/
37.	KFB 0171	WIN 4.2.3	<i>A. vitis</i>	<i>V. vinifera</i> L.	Poljska	2010.	J. Puławska	/
38.	KFB 0172	WIN 4.2.4	<i>A. vitis</i>	<i>V. vinifera</i> L.	Poljska	2010.	J. Puławska	/
39.	KFB 0173	CG47	<i>A. vitis</i>	<i>V. vinifera</i> L. cv. Chancellor	Njujork, SAD	1979.	CU	Otten i sar., 1996
40.	KFB 0203	CG49	<i>A. vitis</i>	<i>V. vinifera</i> L. cv. Riesling	Njujork, SAD	1979.	IPV-BO	Burr i sar., 1987a
41.	KFB 0174	CG56	<i>A. vitis</i>	<i>V. vinifera</i> L. cv. Chelois	Mičigen, SAD	1979.	CU	Burr i sar., 1995
42.	KFB 0175	CG78	<i>A. vitis</i>	<i>V. vinifera</i> L. cv. Merlot	Njujork, SAD	1981.	CU	Otten i sar., 1996
43.	KFB 0176	CG81	<i>A. vitis</i>	<i>V. vinifera</i> L. cv. Chardonnay	Mičigen, SAD	1983.	CU	Otten i sar., 1996
44.	KFB 0204	CG102	<i>A. vitis</i>	<i>V. vinifera</i> L. cv. Chardonnay	Virdžinija, SAD	1984.	IPV-BO	Bazzi i sar., 1988
45.	KFB 0178	CG108	<i>A. vitis</i>	<i>V. vinifera</i> L. cv. Zinfandel	Nju Meksiko, SAD	1985.	CU	Otten i sar., 1996
46.	KFB 0179	CG228	<i>A. vitis</i>	<i>V. vinifera</i> L. cv. Cab Sav	Njujork, SAD	1981.	CU	Otten i sar., 1996
47.	KFB 0180	CG415	<i>A. vitis</i>	<i>V. vinifera</i> L. cv. Chenin Blanc (sok iz ksilema)	Njujork, SAD	1984.	CU	Otten i sar., 1996
48.	KFB 0182	CG475	<i>A. vitis</i>	<i>V. vinifera</i> L. cv. French Colombard	Nju Meksiko, SAD	1986.	CU	Otten i sar., 1996
49.	KFB 0185	IPV-BO 1861-5	<i>A. vitis</i>	<i>V. vinifera</i> L.	Friuli-Venecija Đulija, Italija	1984.	IPV-BO	Bini i sar., 2008a
50.	KFB 0186	IPV-BO 5159	<i>A. vitis</i>	<i>V. vinifera</i> L.	Friuli-Venecija Đulija, Italija	2003.	IPV-BO	Bini i sar., 2008a
51.	KFB 0187	IPV-BO 5162	<i>A. vitis</i>	<i>V. vinifera</i> L.	Friuli-Venecija Đulija, Italija	2003.	IPV-BO	Bini i sar., 2008a
52.	KFB 0188	IPV-BO 5372	<i>A. vitis</i>	<i>V. vinifera</i> L.	Italija	2003.	IPV-BO	Bini i sar., 2008a
53.	KFB 0189	IPV-BO 5761	<i>A. vitis</i>	<i>V. vinifera</i> L.	Moldavija	2004.	IPV-BO	Bini i sar., 2008b

(Nastavak na sledećoj strani)

**Tabela 7. Nastavak**

Broj	Šifra soja	Ostale šifre	Vrsta/ biovar	Biološko poreklo <sup>a,b</sup>	Geografsko poreklo <sup>b</sup>	Godina izolacije <sup>b</sup>	Izvor <sup>c</sup>	Literatura
54.	KFB 0190	IPV-BO 5881	<i>A. vitis</i>	<i>V. vinifera</i> L.	Pulja, Italija	2005.	IPV-BO	Bini i sar., 2008b
55.	KFB 0191	IPV-BO 6048A1	<i>A. vitis</i>	<i>V. vinifera</i> L.	Crna Gora	2005.	IPV-BO	Bini i sar., 2008b
56.	KFB 0192	IPV-BO 6186	<i>A. vitis</i>	<i>V. vinifera</i> L.	Toskana, Italija	2006.	IPV-BO	Bini i sar., 2008b
57.	KFB 0193	IPV-BO 6207	<i>A. vitis</i>	<i>V. vinifera</i> L.	Vršac, Srbija	2006.	IPV-BO	Bini i sar., 2008b
58.	KFB 0194	IPV-BO 6209	<i>A. vitis</i>	<i>V. vinifera</i> L.	Vršac, Srbija	2006.	IPV-BO	Bini i sar., 2008b
59.	KFB 0195	IPV-BO 6570	<i>A. vitis</i>	<i>V. vinifera</i> L.	Bugarska <sup>d</sup>	2006.	IPV-BO	Bini i sar., 2008b
60.	KFB 0196	IPV-BO 6571	<i>A. vitis</i>	<i>V. vinifera</i> L.	Bugarska	2006.	IPV-BO	/
61.	KFB 0197	IPV-BO 7104	<i>A. vitis</i>	<i>V. vinifera</i> L.	Friuli-Venecija Đulija, Italija	2007.	IPV-BO	/
62.	KFB 0198	IPV-BO 7105	<i>A. vitis</i>	<i>V. vinifera</i> L.	Friuli-Venecija Đulija, Italija	2007.	IPV-BO	/
63.	KFB 0199	IPV-BO 8812	<i>A. vitis</i>	<i>V. vinifera</i> L.	Emilija-Romanja, Italija	2011.	IPV-BO	/
64.	KFB 0200	IPV-BO 8816	<i>A. vitis</i>	<i>V. vinifera</i> L.	Emilija-Romanja, Italija	2011.	IPV-BO	/
65.	KFB 0201	IPV-BO 8463	<i>A. vitis</i>	<i>V. vinifera</i> L.	Maroko	2011.	IPV-BO	/
66.	KFB 0202	Av2	<i>A. vitis</i>	<i>V. vinifera</i> L.	Hrvatska	2006.	IPV-BO	/
67.	KFB 0100	AB3	<i>A. vitis</i>	<i>V. vinifera</i> L. cv. Alicanthe Bouchet	Balatonboglár, Mađarska	1982.	S. Süle	Szegedi i sar., 1988
68.	KFB 0205	AB4	<i>A. vitis</i>	<i>V. vinifera</i> L. cv. Alicanthe Bouchet	Balatonboglár, Mađarska	1982.	IPV-BO	Szegedi i sar., 1988
70.	KFB 099	S4	<i>A. vitis</i>	<i>V. vinifera</i> L. cv. Sárfehér	Orgovány, Mađarska	1981.	S. Süle	Szegedi i sar., 1988
71.	KFB 0206 <sup>T</sup>	K309 <sup>T</sup> ; NCPFB 3554 <sup>T</sup>	<i>A. vitis</i>	<i>V. vinifera</i> L.	Barmera, Australija	1977.	IPV-BO	Ophel i Kerr, 1990
72.	KFB 0207	F2/5	<i>A. vitis</i>	<i>V. vinifera</i> L.	Pretorija, Južna Afrika	NP	IPV-BO	Burr i sar., 1997
73.	KFB 096	C58	<i>A. tumefaciens</i> / biovar 1	<i>Prunus cerasus</i> L.	Njujork, SAD	1958.	S. Süle	Hooykaas i sar., 1980
74.	KFB 0209 <sup>T</sup>	B6 <sup>T</sup> ; ATCC 23308 <sup>T</sup>	<i>A. tumefaciens</i> / biovar 1	<i>Malus</i> sp.	NP	1935.	IPV-BO	Petit i Tempé, 1985
75.	KFB 0210	Ach5	<i>A. tumefaciens</i> / biovar 1	NP	Belgija	NP	IPV-BO	Petit i Tempé, 1985

(Nastavak na sledećoj strani)

**Tabela 7.** Nastavak

Broj	Šifra soja	Ostale šifre	Vrsta/ biovar	Biološko poreklo <sup>a,b</sup>	Geografsko poreklo <sup>b</sup>	Godina izolacije <sup>b</sup>	Izvor <sup>c</sup>	Literatura
76.	KFB 0231 <sup>T</sup>	AR13 <sup>T</sup> ; ATCC 11325 <sup>T</sup>	<i>A. rhizogenes</i> / biovar 2	<i>Malus domestica</i> L.	NP	NP	UF	Lippincott i Lippincott, 1969
77.	KFB 0159	K84	<i>A. rhizogenes</i> / biovar 2	Zemljište iz voćnjaka	Australija	NP	KFB	New i Kerr, 1972
78.	KFB 098	A4	<i>A. rhizogenes</i> / biovar 2	<i>Malus domestica</i> L.	NP	NP	S. Süle	Moore i sar., 1979
79.	KFB 0233 <sup>T</sup>	Aru2 <sup>T</sup> ; ATCC 13335 <sup>T</sup>	<i>A. rubi</i>	<i>Rubus ursinus</i> var. <i>loganobaccus</i>	SAD	1942.	UF	Lippincott i Lippincott, 1969
80.	KFB 0234 <sup>T</sup>	AF 3.10 <sup>T</sup> ; ATCC 51759 <sup>T</sup>	<i>A. larrymoorei</i>	<i>Ficus benjamina</i>	Florida, SAD	1991.	UF	Bouzar i sar., 1995a
81.	KFB 0160 <sup>T</sup>	Ch 11 <sup>T</sup>	<i>R. skierniewicense</i>	<i>Chrysanthemum</i> sp. L.	Poljska	NP	J. Puławska	Puławska i sar., 2012b
82.	KFB 0165	C 3.4.1	<i>R. nepotum</i>	“Colt” podloga	Poljska	2008.	J. Puławska	Puławska i sar., 2012a

<sup>a</sup> Cab Sav, Cabernet Sauvignon;

<sup>b</sup> NP, nije poznato;

<sup>c</sup> CU, Cornell University, Geneva, USA (T.J. Burr, D. Zheng); IPV-BO, Plant Pathology Department, University of Bologna, Bologna, Italy (E. Biondi); S. Süle, Plant Protection Institute, Hungarian Academy of Sciences, Budapest, Hungary; UF, University of Florida, Gainesville, USA (J.B. Jones, G.V. Minsavage); KFB, Kolekcija fitopatogenih bakterija, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija; J. Puławska, Research Institute of Horticulture, Skierniewice, Poland;

<sup>d</sup> U radu Bini i sar. (2008b), kao zemlja porekla ovog soja greškom je navedena Italija.

**Tabela 8.** Kontrolni sojevi korišćeni u pojedinim testovima

Broj	Šifra soja	Vrsta	Test	Izvor
1.	B56	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Aktivnost oksidaze	KFB
2.	B130	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Reakcija po Gramu	KFB
3.	B122	<i>Bacillus pumilus</i>	Reakcija po Gramu	KFB
4.	OMP-BO 395.1/91	<i>Pseudomonas viridiflava</i>	rep-PCR, RAPD	IPV-BO

### 4.3.1 Priprema uzoraka DNK

Priprema uzoraka DNK izvršena je inkubiranjem suspenzije bakterija ( $\sim 10^8$  CFU/ml) pri temperaturi  $100^\circ\text{C}$ , u trajanju 10 min. Lizirane bakterijske ćelije su zatim inkubirane 5 min na ledu i centrifugirane pri 8000 rpm tokom 5 min. Supernatant je korišćen direktno za PCR ili je čuvan pri  $-20^\circ\text{C}$  za kasnija istraživanja.

### 4.3.2 PCR analiza

U ovom istraživanju, preliminarna identifikacija sojeva, izolovanih u okviru ovog istraživanja, izvršena je primenom dupleks PCR metode korišćenjem VCF3/VCR3 i PGF/PGR prajmera. Prajmeri VCF3/VCR3 specifični su za *virC* gen koji se nalazi na pTi ili pRi, dok su prajmeri PGF/PGR komplementarni sekvenci hromozomskog gena *pehA*, karakterističnog za vrstu *A. vitis* (Szegedi i Bottka, 2002; Suzaki i sar., 2004). Kombinovanjem ova dva para prajmera, istovremeno se vrši diferencijacija patogenih sojeva *Agrobacterium* sp., odnosno patogenih sojeva *A. vitis* (Kumagai i Fabritius, 2008).

Potvrda preliminarne identifikacije sojeva izvedena je daljom molekularnom analizom, korišćenjem prajmera specifičnih za druge gene (Tabela 9). A/C' prajmeri specifični su za *virD2* gen, koji je prisutan na pTi ili pRi kod širokog kruga *Agrobacterium* spp., dok se parom prajmera CYT/CYT' umnožava sekvenca unutar *ipt* gena, koji je prisutan samo kod pTi. Kombinovanjem ova dva para prajmera u dupleks PCR reakciji, omogućava se istovremena detekcija oba gena i diferencijacija tumorogenih (sadrže Ti plazmid) i rizogenih (sadrže Ri plazmid) *Agrobacterium* vrsta (Haas i sar., 1995).

VirFF<sub>1</sub>/VirFR<sub>2</sub> par prajmera specifičan je za *virF* gen, prisutan na *A. vitis* O/C i N tipu pTi, a VirD2S4F<sub>716</sub>/VirD2S4R<sub>1036</sub> za *virD2* gen *A. vitis* (S4) V tip pTi. Kada se ova dva para prajmera koriste zajedno sa PGF/PGR prajmerima u multipleks PCR reakciji, može se izvršiti diferencijacija *A. vitis* sojeva koji poseduju O/C ili N tip pTi, ali i *A. vitis* sojeva sa V tipom pTi (Bini i sar., 2008b). Prajmerima specifičnim za *virF* gen takođe se mogu detektovati pojedini sojevi *A. tumefaciens* sa oktopin i leucinopin tipom pTi (Bini i sar., 2008b).

Parom prajmera tms2F1/tms2R2 karakterističnim za *iaaH* (*tms2*) gen, koji se nalazi na T-DNK, može se detektovati pTi kod širokog kruga tumorogenih sojeva *Agrobacterium* sp. uključujući i pojedine *A. vitis* (Puławska i Sobiczewski, 2005).

Sojevi su diferencirani do nivoa vrste/biovara korišćenjem prajmera specifičnih za 23S rRNK gen (Puławska i sar., 2006). U istoj reakciji korišćeni su univerzalni prednji (UF) i četiri reverzna prajmera (B1R, B2R, AvR, ArR), specifična za pojedine *Agrobacterium* sp. vrste/biovare (Tabela 9).

U reakciji sa VCF3/VCR3 i PGF/PGR prajmerima primenjen je protokol prema Kumagai i Fabritius (2008), uz manje modifikacije u pogledu sastava reakcione smeše. Reakciona smeša konačne zapremine 25  $\mu$ l sadržala je: 1 $\times$  *Taq* pufer sa KCl (Fermentas, Vilnius, Lithuania), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTPs, 0,5  $\mu$ M prajmera, 0,5 U *Taq* DNK polimeraze (Fermentas, Vilnius, Lithuania) i 2  $\mu$ l uzorka DNK. Reakcija se odvijala prema sledećem programu: početna denaturacija pri temperaturi 94°C u trajanju 5 min; 35 ciklusa denaturacije pri 94°C u trajanju 1 min, vezivanja prajmera pri 56°C u trajanju 1 min i ekstenzije pri 72°C u trajanju 1 min. Završna ekstenzija odvijala se pri temperaturi 72°C u trajanju 5 minuta.

Dupleks PCR sa A/C' i CYT/CYT' prajmerima izveden je prema originalnom protokolu (Haas i sar., 1995), uz modifikacije u pogledu sastava i zapremine reakcione smeše. Reakciona smeša krajnje zapremine 25  $\mu$ l sadržala je: 1 $\times$  DreamTaq zeleni pufer koji sadrži 20mM MgCl<sub>2</sub> (Fermentas, Vilnius, Lithuania), 0,2 mM dNTPs, 0,4  $\mu$ M prajmera, 0,5 U DreamTaq DNK polimeraze (Fermentas, Vilnius, Lithuania) i 2,5  $\mu$ l uzorka DNK. PCR reakcija se odvijala prema sledećem programu: početna denaturacija pri temperaturi 94°C u trajanju 1 min, 40 ciklusa denaturacije pri 94°C u trajanju 1 min, vezivanja prajmera pri 50°C u trajanju 1 min i ekstenzije pri 72°C u trajanju 1 min. Završna ekstenzija odvijala se pri temperaturi 72°C tokom 5 minuta.

Multipleks PCR sa prajmerima VirFF<sub>1</sub>/VirFR<sub>2</sub>, VirD2S4F<sub>716</sub>/VirD2S4R<sub>1036</sub> i PGF/PGR izveden je prema prethodno saopštenom protokolu (Bini i sar., 2008b). Reakciona smeša konačne zapremine 25  $\mu$ l sadržala je: 1 $\times$  GoTaq bezbojni pufer (Promega, Madison, WI, USA), 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTPs, 0,3  $\mu$ M prajmera VIRFF<sub>1</sub>/VIRFR<sub>2</sub> i VIRD2S4F<sub>716</sub>/VIRD2S4R<sub>1036</sub>, 0,4  $\mu$ M prajmera PGF/PGR, 5% DMSO, 0,5 U GoTaq Flexi DNK polimeraze (Promega, Madison, WI, USA) i 5  $\mu$ l uzorka DNK. Reakcija se odvijala prema sledećem programu: početna denaturacija pri

**Tabela 9.** Prajmeri korišćeni u detekciji i karakterizaciji pTi i identifikaciji sojeva

Oznaka prajmera	Sekvenca prajmera	Ciljani region	Veličina fragmenta	Literatura
VCF3/ VCR3	5'-GGCGGGCGYGCYGAAAGRAARACYT-3' 5'-AAGAACGYGGNATGTTGCATCTYAC-3'	<i>virC</i> gen <i>Agrobacterium</i> sp. na pTi ili pRi	414 bp	Suzaki i sar., 2004
A/ C'	5'-ATGCCCCGATCGAGCTCAAGT-3' 5'-TCGTCTGGCTGACTTTTCGTCATAA-3'	<i>virD2</i> gen <i>Agrobacterium</i> sp. na pTi ili pRi	224 bp	Haas i sar., 1995
CYT/ CYT'	5'-GATCG(G/C)GTCCAATG(C/T)TGT-3' 5'-GATATCCATCGATC(T/C)CTT-3'	<i>ipt</i> gen <i>Agrobacterium</i> sp. na pTi	427 bp	Haas i sar., 1995
VirFF <sub>1</sub> / VirFR <sub>2</sub>	5'-ATGAGAAATTCGAGTTTGCATGATG-3' 5'-TCGTGATGGGTATACGCTACG-3'	<i>virF</i> gen <i>A. vitis</i> oktopin i nopalina pTi	382 bp	Bini i sar., 2008b
VirD2S4F <sub>716</sub> / VirD2S4R <sub>1036</sub>	5'-GACCGCAAAACCTGCCAG-3' 5'-GAGCCTGTATTGACGATGTC-3'	<i>virD2</i> gen <i>A. vitis</i> (S4) vitopin pTi	320 bp	Bini i sar., 2008b
tms2F1/ tms2R2	5'-TTTCAGCTGCTAGGGCCACATCAG-3' 5'-TCGCCATGGAAACGCCGAGTAGG-3'	T-DNK ( <i>iaaH</i> [ <i>tms2</i> ])	617 bp	Puławska i Sobiczewski, 2005
PGF/ PGR	5'-GGGGCAGGATGCGTTTTTGTAG-3' 5'-GACGGCACTGGGGCTAAGGAT-3'	hromozomski <i>pehA</i> gen vrste <i>A. vitis</i>	466 bp	Szegedi i Bottka, 2002
UF/ B1R	5'-GTAAGAAGCGAACGCAGGGAAC-3' 5'-GACAATGACTGTTCTACGCGTAA-3'	hromozomski 23S rRNK gen vrste <i>A. tumefaciens</i> /biovar 1	184 bp	Puławska i sar., 2006
UF/ B2R	/ 5'-TCCGATACCTCCAGGGCCCCTCACA-3'	hromozomski 23S rRNK gen vrste <i>A. rhizogenes</i> /biovar 2	1066 bp	Puławska i sar., 2006
UF/ AvR	/ 5'-AACTAACTCAATCGCGCTATTAAC-3'	hromozomski 23S rRNK gen vrste <i>A. vitis</i>	478 bp	Puławska i sar., 2006
UF/ ArR	/ 5'-AAAACAGCCACTACGACTGTCTT-3'	hromozomski 23S rRNK gen vrste <i>A. rubi</i>	1006 bp	Puławska i sar., 2006

(Nastavak na sledećoj strani)



**Tabela 9.** Nastavak

Oznaka prajmera	Sekvenca prajmera	Ciljani region	Veličina fragmenta	Literatura
fD1/ rP2	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' 5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'	16S rRNK gen većine Eubacteria	~1450 bp	Weisburg i sar., 1991
TF/ TR	5'-TGGCCGAAATTGTTTACTTCCACCC-3' 5'-CTATGCCGAAAGACGGCTTGACCCT-3'	<i>6b</i> gen <i>A. vitis</i> oktopin tip pTi	520 bp	Szegedi i sar., 2005
NF/ NR	5'-TTAACCCAAATGAGTACGATGACGA-3' 5'-TTATTTCCGGTACTGGATGATATTAG-3'	<i>6b</i> gen <i>A. vitis</i> nopalín tip pTi	570 bp	Szegedi i sar., 2005
visF/ visR	5'-CCGGCCACTTCTGCTATCTGA-3' 5'-CCATTCACCCGTTGCTGTTATT-3'	gen za sintezu vitopina ( <i>vis</i> ) <i>A. vitis</i> vitopin tip pTi	561 bp	Szegedi i Bottka, 2002

temperaturi 94°C u trajanju 1 min; 40 ciklusa denaturacije pri 94°C u trajanju 1 min, vezivanja prajmera pri 60°C u trajanju 1 min i ekstenzije pri 72°C u trajanju 1 min. Završna ekstenzija odvijala se pri temperaturi 72°C u trajanju 5 minuta.

PCR sa prajmerima tms2F1/tms2F2 izveden je prema već definisanom protokolu (Puławska i Sobiczewski, 2005), s tim da su načinjene modifikacije u pogledu koncentracije pojedinih komponenti i zapremine reakcione smeše. Reakciona smeša krajnje zapremine 15 µl sadržala je: 1× DreamTaq zeleni pufer koji sadrži 20mM MgCl<sub>2</sub> (Fermentas, Vilnius, Lithuania), 0,2 mM dNTPs, 0,5 µM prajmera, 0,3 U DreamTaq DNK polimeraze (Fermentas, Vilnius, Lithuania) i 1,5 µl uzorka DNK. Reakcija se odvijala prema sledećem programu: početna denaturacija pri temperaturi 94°C u trajanju 1 min; 35 ciklusa denaturacije pri 94°C u trajanju 1 min, vezivanja prajmera pri 63°C u trajanju 1 min i ekstenzije pri 72°C u trajanju 1,5 min. Završna ekstenzija odvijala se pri temperaturi 72°C u trajanju 10 minuta.

Multipleks PCR sa prajmerima UF/B1R/B2R/AvR/ArR izveden je prema ranije saopštenom protokolu (Puławska i sar., 2006), uz određene modifikacije u pogledu sastava i koncentracije pojedinih komponenti u reakcionoj smeši. Reakciona smeša konačne zapremine 15 µl sadržala je: 1× DreamTaq zeleni pufer koji sadrži 20 mM MgCl<sub>2</sub> (Fermentas, Vilnius, Lithuania), 0,2 mM dNTPs, 0,5 µM prajmera, 0,3 U DreamTaq DNK polimeraze (Fermentas, Vilnius, Lithuania) i 1,5 µl uzorka DNK. Reakcija se odvijala prema sledećem programu: početna denaturacija pri temperaturi 94°C u trajanju 1 min; 35 ciklusa denaturacije pri 94°C u trajanju 1 min, vezivanja prajmera pri 67°C u trajanju 1 min i ekstenzije pri 72°C u trajanju 1,5 min. Završna ekstenzija odvijala se pri temperaturi 72°C u trajanju 10 minuta.

Reakcije umnožavanja DNK su izvedene u aparatu Thermo Cycler 2240 (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA). Umnoženi DNK produkti razdvojeni su elektroforezom u 1,5% agaroznom gelu prilikom korišćenja A/C', ipt1/ipt2, VirFF<sub>1</sub>/VirFR<sub>2</sub>, VirD2S4F<sub>716</sub>/VirD2S4R<sub>1036</sub>, PGF/PGR, tms2F1/tms2R1 i UF/B1R/B2R/AvR/ArR prajmera, ili u 2% agaroznom gelu kada su korišćeni VCF3/VCR3 i PGF/PGR prajmeri. Gelovi su potom obojeni u rastvoru etidijum bromida (1 µg/ml) i posmatrani pod UV svetlom na transiluminatoru (Vilber Lourmat, Marne la Vallée Cedex, France).

### 4.3.3 Sekvenciona analiza 16S rRNK gena

Soj KFB 239 je dalje analiziran sekvenciranjem 16S rRNK gena. Fragment rRNK gena je umnožen korišćenjem fD1/rP2 prajmera (Weisburg i sar., 1991). Reakciona smeša konačne zapremine 50 µl sadržala je: 1× *Taq* pufer sa KCl i 15 mM MgCl<sub>2</sub> (Fermentas, Vilnius, Lithuania), 0,3 mM dNTPs, 0,16 µM prajmera, 1,1 U DreamTaq DNK polimeraze (Fermentas, Vilnius, Lithuania) i 3 µl uzorka DNK. Reakcija se odvijala prema sledećem programu: početna denaturacija pri temperaturi 95°C u trajanju 5 min; 35 ciklusa denaturacije pri 94°C u trajanju 1 min, vezivanja prajmera pri 55°C u trajanju 1 min i ekstenzije pri 72°C u trajanju 1,5 min. Završna ekstenzija odvijala se pri temperaturi 72°C u trajanju 5 minuta. Uspešnost umnožavanja 16S rRNK gena i kvantifikacija DNK koja je poslata na sekvenciranje određena je vizuelnim poređenjem PCR produkata sa markerom MassRuler DNA Ladder Mix (Fermentas, Vilnius, Lithuania).

Fragment DNK sekvenciran je u oba smera istim prajmerima koji su korišćeni pri umnožavanju (Genomed S.A., Warsaw, Poland). Dobijeni hromatogrami su vizuelizovani korišćenjem softvera FinchTV 1.4.0 (Geospiza, Inc., Seattle, WA, USA; <http://www.geospiza.com>). Sekvence (“forward” i “reverse”) su obrađene korišćenjem softverskog paketa MEGA 5.1 (Tamura i sar., 2011), i određena je konsenzus sekvenca ukupne dužine 1290 bp. Konsenzus nukleotidna sekvenca je dostavljena banci gena (eng. GenBank) Nacionalnog centra za biotehnoške informacije (eng. National Center for Biotechnology Information, NCBI), nakon čega joj je dodeljen pristupni broj (eng. GenBank accession number). BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) program korišćen je kako bi se dobijena sekvenca uporedila sa sekvencama dostupnim u bazi podataka NCBI banke gena.

Filogenetska analiza izvedena je korišćenjem dobijene sekvence soja KFB 239 i sekvenci 16S rRNK gena srodnih *Agrobacterium* i *Rhizobium* sojeva. Sojevi *A. tumefaciens*/biovar 1 su klasifikovani i imenovani prema studiji Mougél i sar. (2002), i predlozima Costechareyre i sar. (2010) i Lasalle i sar. (2011). Sekvence su poravnate korišćenjem CLUSTAL W algoritma integrisanog u MEGA 5.1 softverski paket i dalje analizirane korišćenjem istog softvera. Genetička udaljenost analiziranih sekvenci određena je korišćenjem Kimura-2 modela (Kimura, 1980). Filogenetsko stablo

konstruisano je primenom “neighbor-joining“ (NJ) metode (Saitou i Nei, 1987), sa genetičkom udaljenošću izračunatom prema Kimura-2 modelu. Statistička značajnost testirana je “bootstrap” analizom sa 1000 ponavljanja. Filogenetsko stablo ukorenjeno je korišćenjem sekvence 16S rRNK gena tipskog soja vrste *Bradyrhizobium japonicum*.

#### 4.4 Patogene odlike sojeva

Patogenost sojeva testirana je na više biljnih vrsta: vinovoj lozi (cv. Cabernet Sauvignon), suncokretu i paradajzu (cv. Novosadski jabučar). Test biljke gajene su u stakleniku, u odgovarajućim plastičnim saksijama i tresetnom supstratu, pri temperaturi od  $24\pm 3^{\circ}\text{C}$ . Kao pozitivne kontrole korišćene su biljke inokulisane kontrolnim sojevima *A. tumefaciens*/biovar 1 (KFB 096) i *A. vitis* (KFB 099, KFB 0206), a biljke inokulisane sterilnom destilovanom vodom i nepatogenim sojem *A. rhizogenes*/biovar 2 (KFB 0159), kao negativne kontrole. Test patogenosti na paradajzu i suncokretu izveden je u tri ponavljanja. Pozitivnom reakcijom su smatrani jasno formirani tumori na mestu inokulacije, a negativna je bila odsustvo bilo kakvih simptoma. Prisustvo promena različitog intenziteta na mestu uboda u tkivo, unutar pojedinačnog ogleada i/ili među različitim ponavljanjima, ocenjeno je kao varijabilna reakcija.

Inokulacija jednogodišnjih ili dvogodišnjih sadnica vinove loze izvedena je tokom maja, u internodije zelenih ili zrelih lastara. Svakim sojem ponaosob inokulisane su po dve biljke, povređivanjem pomoću igle ili skalpela i nanošenjem mase bakterijskih ćelija drvenom čačkalicom. Mesto inokulacije obloženo je vlažnom pamučnom vatom koja je obavijena aluminijskom folijom, u cilju zaštite od isušivanja i održanja povoljnih uslova za infekciju. Pamučna vata i aluminijska folija uklonjeni su nakon 48 h. Biljke vinove loze su tokom letnjih meseci gajene na otvorenom prostoru. Rezultati testa očitani su tri meseca nakon inokulacije.

U cilju ispunjenja Kohovih postulata, iz jedne biljke vinove loze izvršena je reizolacija i ponovna identifikacija bakterija. Izolacija je izvršena na identičan način kao i u slučaju prirodno zaraženih biljaka. U identifikaciji izolovanih sojeva primenjena je dupleks PCR metoda, korišćenjem VCF3/VCR3 i PGF/PGR prajmera (Kumagai i Fabritius, 2008).

Sejanci suncokreta inokulisani su tokom pikiranja. Skalpelom je načinjen rez u predelu hipokotila, dubine nekoliko milimetara i dužine oko 1 cm. Potom je drvenom čačalicom nanesa masa bakterijskih ćelija i raspoređena unutar povrede. Sejanci su zatim zasađeni, tako da mesto inokulacije bude u zemljišnom supstratu. Tri biljke su inokulisane svakim proučavanim sojem bakterija ponaosob. Rezultati testa očitani su 3-4 nedelje posle inokulacije.

Biljke paradajza gajene su iz semena i inokulisane u predelu stabla, 2-3 nedelje od trenutka pikiranja klijanaca. Biljke su inokulisane preko povreda načinjenih skalpelom, u vidu rezova dubine nekoliko milimetara i dužine oko 1 cm. Test biljke inokulisane su u internodije, a korišćeno je po tri biljke za svaki proučavani soj bakterija. Rezultati testa očitani su 3-4 nedelje nakon inokulacije.

#### **4.5 Morfološke, odgajivačke i biohemijsko-fiziološke odlike**

Morfološke, odgajivačke i biohemijsko-fiziološke odlike sojeva izolovanih iz vinove loze u Srbiji, proučene su korišćenjem standardnih i diferencijalnih bakterioloških testova (Bouzar i sar., 1995b; Kerr i Gibb, 1997; Moore i sar., 2001). Određena je reakcija po Gramu i aktivnost oksidaze, a od odgajivačkih odlika proučen je razvoj bakterija pri 35°C i podlozi sa 2% NaCl. Dalje, proučeno je stvaranje 3-ketolaktoze, formiranje prosvetljenih zona na KDA-CaCO<sub>3</sub> podlozi, pokretljivost bakterija pri pH 7,0, razvoj i pigmentacija u podlozi sa feri-amonijum-citratom, korišćenje citrata i proizvodnja kiseline iz saharoze, melezitose i eritritola, i baze iz tartarata.

##### **4.5.1 Reakcija po Gramu**

Reakcija po Gramu određena je posrednom metodom sa 3% KOH (Suslow i sar., 1982). Masa bakterijskih ćelija, iz kulture gajene 24 h na Kingovoj podlozi B, prenesena je drvenom čačalicom na mikroskopsku pločicu i izmešana u jednoj kapi 3% rastvora KOH. Kod Gram-negativnih bakterija dolazi do pucanja zida i oslobađanja nukleinske kiseline pod uticajem jake baze, što za posledicu ima pojavu sluzaste konzistencije kapi na pločici. To se potvrđuje podizanjem čačalice od površine pločice pri čemu se

obrazuje elastična nit, što izostaje u slučaju Gram-pozitivnih bakterija. Kao pozitivna kontrola korišćen je soj Gram-pozitivne bakterije *Bacillus pumilus* (B122), a kao negativne kontrole *Pseudomonas fluorescens* (B130), *A. tumefaciens*/biovar 1 (KFB 096), *A. rhizogenes*/biovar 2 (KFB 0159) i *A. vitis* (KFB 099).

#### **4.5.2 Razvoj pri 35°C**

U testu razvoja bakterija pri temperaturi 35°C korišćena je tečna podloga od kvašćevog ekstrakta i neorganskih soli (YS; Dye, 1962, *loc. cit.* Schaad i sar., 2001). Po 5 ml podloge je razliveno u epruvete i nakon autoklaviranja postavljeno u vodeno kupatilo radi postizanja temperature 35°C pre zasejavanja. Podloga je zasejana pipetiranjem 100 µl suspenzije bakterija ( $\sim 10^8$  CFU/ml) i zatim ponovo vraćena u vodeno kupatilo. Kao pozitivne kontrole korišćeni su sojevi *A. tumefaciens*/biovar 1 (KFB 096) i *A. vitis* (KFB 099), a kao negativne kontrole nezasejana podloga i soj *A. rhizogenes*/biovar 2 (KFB 0159). Razvoj bakterija praćen zamućenjem podloge, ocenjen je tri do sedam dana (optimalno 5 dana) nakon zasejavanja.

#### **4.5.3 Razvoj u podlozi sa 2% NaCl**

U testu razvoja bakterija u podlozi sa 2% NaCl korišćena je tečna YS podloga uz dodatak 2% NaCl (Fahy i Hayward, 1983, *loc. cit.* Arsenijević, 1997). Podloga je zasejana pipetiranjem po 100 µl suspenzije bakterija ( $\sim 10^8$  CFU/ml) i inkubirana pri 27°C. Razvoj bakterija praćen je u periodu 5-7 dana. Kao pozitivne kontrole korišćeni su sojevi *A. tumefaciens*/biovar 1 (KFB 096) i *A. vitis* (KFB 099), a kao dodatna pozitivna KFB 096 zasejan na standardnu YS podlogu. Kao negativne kontrole korišćeni su nezasejana podloga i soj *A. rhizogenes*/biovar 2 (KFB 0159).

#### **4.5.4 Aktivnost oksidaze**

Aktivnost oksidaze određena je prema metodi koju je opisao Kovacs (1956). Korišćene su bakterijske kulture gajene 24 h na čvrstoj Kingovoj podlozi B i sveže pripremljen 1% rastvor *N,N,N',N'*-Tetrametil-*p*-fenilenediamin dihidrohlorida

(TMPPD). Manja količina bakterija preneti je drvenom čačkalicom na filter papir, prethodno natopljen ovim rastvorom. TMPPD deluje kao veštački donor elektrona za enzim oksidazu, na ovaj način se oksidiše i menja boju u ljubičastu. Pozitivnom reakcijom smatra se pojava ljubičaste boje u roku od 10 sekundi, odloženoj reakcijom ukoliko do pojave boje dođe u periodu 10-60 sekundi, dok je reakcija negativna ukoliko do pojave boje ne dođe ni nakon 60 sekundi. Za manipulaciju bakterijama preporučuje se platinasta ili plastična petlja, ili drvena čačkalica, s obzirom da tragovi gvožđa mogu katalizovati oksidaciju fenilenediamina. Kao pozitivne kontrole korišćeni su sojevi *A. tumefaciens*/biovar 1 (KFB 096), *P. fluorescens* (B-56) i *A. vitis* (KFB 099), a kao negativna *A. rhizogenes*/biovar 2 (KFB 0159).

#### 4.5.5 Stvaranje 3-ketolaktoze

*A. tumefaciens*/biovar 1 poseduje sposobnost proizvodnje 3-ketoglikozida iz odgovarajućih disaharida i bionskih kiselina, te je ova osobina iskorišćena za razvoj diferencijalnog testa proizvodnje 3-ketolaktoze iz laktoze (Bernaerts i DeLey, 1963). Sojevi bakterija zasejavani su u vidu kružne zone prečnika 1 cm na podlogu od laktoze i kvašćevog ekstrakta. Četiri do šest sojeva testirano je u istoj Petri kutiji. Zasejane Petri kutije su inkubirane pri 27°C u trajanju 48 h. Zatim je površina podloge prelivena Benediktovim reagensom i inkubirana pri sobnoj temperaturi. Ukoliko je došlo do stvaranja 3-ketolaktoze, žuti prsten bakar-dioksida ( $\text{Cu}_2\text{O}$ ) postaje vidljiv oko mase bakterijskih ćelija nakon 1 h. Kao pozitivna kontrola korišćen je soj *A. tumefaciens*/biovar 1 (KFB 096), a kao negativne *A. rhizogenes*/biovar 2 (KFB 0159) i *A. vitis* (KFB 099).

#### 4.5.6 Formiranje prosvetljenih zona na KDA- $\text{CaCO}_3$ podlozi

*A. rhizogenes*/biovar 2 proizvodi više kiseline iz glukoze u odnosu na *A. tumefaciens*/biovar 1 i *A. vitis*, što je iskorišćeno za razvoj testa za diferencijaciju ovih vrsta (Bouzar i Jones, 1992). Zasejavanje sojeva bakterija izvođeno je u vidu kružne zone prečnika 1 cm na KDA- $\text{CaCO}_3$  podlogu. Četiri do šest sojeva testirano je u istoj Petri kutiji. Petri kutije su inkubirane pri 27°C u trajanju 2-3 dana. Kod vrsta *A.*

*tumefaciens*/biovar 1 i *A. vitis*, podloga ostaje neprovidna (nema promene), dok kod *A. rhizogenes*/biovar 2 oko bakterijske kolonije dolazi do pojave prosvetljenih zona nakon 3-4 dana. Kao pozitivna kontrola korišćen je soj *A. rhizogenes*/biovar 2 (KFB 0159), a kao negativne *A. tumefaciens*/biovar 1 (KFB 096) i *A. vitis* (KFB 099).

#### **4.5.7 Pokretljivost pri pH 7,0**

Pojedine vrste roda *Agrobacterium* mogu se diferencirati na osnovu pokretljivosti u podlozi gde su podešene različite vrednosti pH (Bush i Pueppke, 1991). *A. tumefaciens*/biovar 1 postaje pokretljiviji sa povećanjem pH, pokretljivost *A. rhizogenes*/biovar 2 blago se smanjuje, ali su ćelije i dalje pokretne, dok se pokretljivost *A. vitis* značajno smanjuje i ćelije su nepokretne u podlozi. U ovom testu korišćena je posebna čvrsta podloga gde je pH vrednost podešena na 7,0 (Bush i Pueppke, 1991). Proučavani sojevi bakterija zasejavani su pipetiranjem 10 µl bakterijske suspenzije ( $\sim 10^8$  CFU/ml), a Petri kutije su inkubirane pri 27°C u trajanju 2-3 dana. Testirano je po četiri soja u jednoj Petri kutiji. *A. vitis* gotovo je nepokretljiv u podlozi na pH 7,0 i u ovom slučaju dolazi do rasta kolonije u granicama do 0,5 mm. Biovari 1 i 2 su pokretljivi i formiraju krupne kolonije gde je rast veći od 2 mm. Bakterijski rast se uočava u vidu difuzne zone oko bakterija zasejanih prvog dana. Moguće je na istoj kutiji testirati do 4 soja. Kao pozitivne kontrole korišćeni su sojevi *A. tumefaciens*/biovar 1 (KFB 096) i *A. rhizogenes*/biovar 2 (KFB 0159), a kao negativna *A. vitis* (KFB 099).

#### **4.5.8 Razvoj i pigmentacija u podlozi sa feri-amonijum-citratom**

*A. tumefaciens*/biovar 1 u tečnoj podlozi sa feri-amonijum citratom stvara crveno-smeđu opnu na njenoj površini i boji je u crveno-smeđe, zbog proizvodnje feri hidroksida (Hendrickson i sar., 1934). Podloga je zasejana pipetiranjem po 100 µl suspenzije bakterija ( $\sim 10^8$  CFU/ml) i inkubirana pri 27°C u trajanju 3-5 dana. Kao pozitivna kontrola korišćen je soj *A. tumefaciens*/biovar 1 (KFB 096), a kao negativne *A. rhizogenes*/biovar 2 (KFB 0159) i *A. vitis* (KFB 099).



#### 4.5.9 Korišćenje citrata

Korišćenje citrata kao jedinog izvora ugljenika može se primeniti kao test u diferencijaciji pojedinih *Agrobacterium* spp. (Keane i sar., 1970; Moore i sar., 2001). U testu je korišćena čvrsta podloga sa natrijum citratom, neorganskim solima i brom-timol plavim (Simmons, 1926). Podloga je razlivena u epruvete i zakošena. Zasejavanje je izvedeno bakteriološkom petljom, a epruvete su inkubirane pri 27°C, u trajanju 2-4 dana. Pozitivna reakcija se ispoljava promenom boje podloge u plavu, kao posledica stvaranja baze, što utiče na indikator brom-timol plavo, koji je prisutan u podlozi. Kao pozitivne kontrole korišćeni su sojevi *A. rhizogenes*/biovar 2 (KFB 0159) i *A. vitis* (KFB 099), a kao negativna *A. tumefaciens*/biovar 1 (KFB 096).

#### 4.5.10 Stvaranje kiseline iz saharoze, eritritola i melezitoze

U testovima je korišćena osnovna podloga (Hayward, 1964, *loc. cit.* Schaad i sar., 2001), sa dodatkom šećera (saharozu, eritritol ili melezitozu), razlivena u epruvete. Sojevi bakterija zasejavani su ubodom, a epruvete su inkubirane pri 27°C, u trajanju 14 dana. U slučaju pozitivne reakcije dolazi do promene boje podloge u žutu usled oksidacije šećera, odnosno promene boje indikatora (brom-timol plavo) kao posledica stvaranja kiseline. Kod testa sa saharozom, kao pozitivne kontrole korišćeni su sojevi *A. tumefaciens*/biovar 1 (KFB 096) i *A. vitis* (KFB 099), a kao negativna *A. rhizogenes*/biovar 2 (KFB 0159). Za testiranje stvaranja kiseline iz eritritola kao pozitivna kontrola korišćen je soj *A. rhizogenes*/biovar 2 (KFB 0159), a kao negativne *A. tumefaciens*/biovar 1 (KFB 096) i *A. vitis* (KFB 099). Kod testa sa melezitozom, kao pozitivna kontrola korišćen je soj *A. tumefaciens*/biovar 1 (KFB 096), a kao negativne *A. rhizogenes*/biovar 2 (KFB 0159) i *A. vitis* (KFB 099).

#### 4.5.11 Stvaranje baze iz tartarata

U testu stvaranja baze iz tartarata korišćena je osnovna podloga (Ayers i sar., 1919, *loc. cit.* Kerr i Panagopoulos, 1977), sa dodatkom di-natrijum-tartarat-2-hidrata. Korišćena je čvrsta podloga koja je razlivena u epruvete i zakošena. Zasejavanje je

izvedeno bakteriološkom petljom, a epruvete su inkubirane pri 27°C, u trajanju 3-7 dana. U slučaju razgradnje tartarata, dolazi do promene boje podloge iz zelene u plavu, usled stvaranja baze, što utiče na promenu boje indikatora (brom-timol plavo). Kao pozitivne kontrole korišćeni su sojevi *A. rhizogenes*/biovar 2 (KFB 0159) i *A. vitis* (KFB 099), a kao negativna *A. tumefaciens*/biovar 1 (KFB 096).

#### 4.6 Karakterizacija Ti plazmida

Opin tip pTi određen je PCR metodom, korišćenjem prajmera specifičnih za svaki od opin tipova pTi detektovanih kod *A. vitis* (Tabela 9). Prajmeri TF/TR korišćeni su za detekciju *6b* gena *A. vitis* O/C pTi, NF/NR za detekciju *6b* gena *A. vitis* N pTi, dok su prajmeri visF/visR korišćeni za detekciju gena za sintezu vitopina (*vis*) *A. vitis* V pTi (Szegeđi i Bottka, 2002; Szegeđi i sar., 2005). Korišćeni su isti uzorci DNK koji su prethodno pripremljeni za molekularnu detekciju pTi i identifikaciju sojeva. Analizirani su kako sojevi poreklom iz Srbije, tako i referentni sojevi iz međunarodnih kolekcija.

PCR protokol se zasnivao na prethodnom saopštenju (Szegeđi i Bottka, 2002; Szegeđi i sar., 2005), a načinjene su modifikacije u pogledu koncentracije pojedinih komponenti, sastava i zapremine reakcione smeše. Takođe, načinjene su i manje izmene u termalnom profilu reakcije, u smislu povećanja broja ciklusa amplifikacije.

Reakciona smeša konačne zapremine 15 µl sadržala je: 1× DreamTaq zeleni pufer koji sadrži 20 mM MgCl<sub>2</sub> (Fermentas, Vilnius, Lithuania), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTPs, 0,5 µM prajmera, 0,3 U DreamTaq DNK polimeraze (Fermentas, Vilnius, Lithuania) i 1,5 µl uzorka DNK. Reakcija se odvijala prema sledećem programu: početna denaturacija pri temperaturi 94°C u trajanju 1 min; 35 ciklusa denaturacije pri 92°C u trajanju 1 min, vezivanja prajmera pri 60°C za TF/TR, 58°C za NF/NR ili 54°C za visF/visR prajmere u trajanju 1 min i ekstenzije pri 72°C u trajanju 1,5 min. Završna ekstenzija odvijala se pri temperaturi 72°C u trajanju 3 minuta. Produkti umnožavanja DNK razdvojeni su elektroforezom u 1,5% agaroznom gelu.

## 4.7 Genetički diverzitet sojeva

U analizi genetičkog diverziteta korišćeno je više različitih metoda. Primenjene su metode RAPD i rep-PCR kojima se vrši analiza kompletnog genoma, odnosno sekvenci raspoređenih unutar genomske DNK. Takođe, analiziran je i diverzitet određenih fragmenata prisutnih na hromozomskoj DNK, kao što su konstitutivni geni i 16S-23S rRNK ITS region. Ovi fragmenti umnoženi su korišćenjem specifičnih prajmera i analizirani RFLP metodom i sekvenciranjem.

### 4.7.1 Ekstrakcija DNK

Za ekstrakciju DNK korišćeni su komercijalno dostupni kompleti. Za izvođenje RAPD i rep-PCR metode, kao i za analizu konstitutivnih gena korišćen je QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany; u daljem tekstu QIAamp komplet). Za analizu 16S-23S rRNK regiona korišćena je DNK ekstrahovana kompletom Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA; u daljem tekstu Wizard komplet).

Postupak ekstrakcije DNK korišćenjem QIAamp kompleta izveden je prema uputstvu proizvođača. Bakteriološkom petljom zahvaćena je masa bakterija (~1/3 petlje) i suspendovana u mikroepruvetama (1,5 ml) u 180 µl ATL pufera uz intenzivno mešanje. U suspenziju bakterija pipetirano je 20 µl proteinaze K, sadržaj je izmešan vorteks mešalicom i inkubiran pri 56°C, u trajanju 1-3 h. Tokom inkubacije izvedeno je povremeno mešanje vorteks mešalicom (2-3 puta tokom 1 h inkubacije). Na ovaj način omogućava se lizis bakterijskih ćelija i oslobađanje genetičkog materijala. Zatim je izvedeno kratko centrifugiranje kako bi se uklonila tečnost iz unutrašnjosti zatvarača mikroepruvete. U uzorak je pipetirano 200 µl AL pufera, sadržaj je izmešan vorteks mešalicom u trajanju 15 s i inkubiran 10 min pri 70°C, nakon čega je izvedeno kratko centrifugiranje. Potom je pipetirano 200 µl etanola (96-100%), nakon čega je izvršeno mešanje vorteks mešalicom, u trajanju 15 s, uz korak kratkog centrifugiranja. Celokupan sadržaj, uključujući i precipitat, pipetiran je u QIAamp Mini spin kolonu smeštenu u mikroepruveti (2 ml), izbegavajući kvašenje oboda kolone. Zatim je izvršeno centrifugiranje pri 8000 rpm, u trajanju 1 min. Na ovaj način DNK ostaje

apsorbovana u membrani unutar QIAamp Mini spin kolone, koja je potom prebačena u novu mikroepriuvetu (2 ml), a prethodna mikroepriuveta sa filtratom, gde se nalaze rastvoreni proteini i ostali kontaminanti je odbačena. U QIAamp Mini spin kolonu zatim je pipetirano 500 µl AW1 pufera, i sadržaj centrifugiran pri 8000 rpm, u trajanju 1 min. Mikroepriuveta sa filtratom je odbačena, a kolona je smeštena u novu mikroepriuvetu (2 ml). Zatim je pipetirano 500 µl AW2 pufera, izbegavajući kvašenje oboda kolone, i izvedeno centrifugiranje pri 14000 rpm u trajanju 3 min. Kolona je prebačena u novu mikroepriuvetu (2 ml) i izvedeno je centrifugiranje pri 14000 rpm, u trajanju 1 min, u cilju uklanjanja eventualno preostalog AW2 pufera u koloni. Korišćenjem AW1 i AW2 pufera, DNK koja je vezana za membranu biva prečišćena, odnosno preostali kontaminanti bivaju uklonjeni. Mikroepriuveta sa filtratom je ponovo odbačena, dok je kolona smeštena u novu mikroepriuvetu (1,5 ml). U kolonu je pipetirano 100 µl AE pufera, i nakon 1 min inkubacije izvedeno je centrifugiranje pri 8000 rpm u trajanju 1 min. Na ovaj način prečišćena DNK je u koncentrovanoj formi isprana (eluirana, desorbovana) iz kolone u mikroepriuvetu. Kolona je odbačena, a koncentracija DNK je podešena sa AE puferom na ~10 ng/µl. Rastvor DNK čuvan je pri -20°C.

Ekstrakcija DNK korišćenjem Wizard kompleta, takođe je izvedena prema uputstvu proizvođača. Bakteriološkom petljom je zahvaćena masa bakterija (~1/2 petlje) i suspendovana u mikroepriuvetama (1,5 ml) u 1 ml SDV. Zatim je izvedeno centrifugiranje pri 16000g, u trajanju 2 min, supernatant je odbačen, a bakterijske ćelije su resuspendovane blagim pipetiranjem u 600 µl rastvora za lizis ćelija. Mikroepriuvete su inkubirane pri 80°C, u trajanju 5 min, kako bi se omogućio lizis bakterijskih ćelija, nakon čega je sadržaj ohlađen pri sobnoj temperaturi. U ćelijski lizat je pipetirano 3 µl rastvora Rnaze uz mešanje izvrtnjem mikroepriuvete 3-5 puta. Zatim su mikroepriuvete inkubirane pri 37°C, u trajanju 1 h, i ohlađene pri sobnoj temperaturi. U njih je zatim pipetirano 200 µl rastvora za taloženje proteina, izvedeno je mešanje vrtložnom mešalicom pri maksimalnoj brzini u trajanju 20 s i inkubiranje 5 min na ledu. Zatim je sadržaj centrifugiran pri 16000g, u trajanju 3 min, i supernatant pipetiran u nove mikroepriuvete (1,5 ml), u koje je prethodno pipetirano 600 µl izopropanola, podešenog na sobnu temperaturu. Sadržaj je izmešan laganim izvrtnjem mikroepriuvete do pojave vidljive mase DNK, a zatim centrifugiran pri 16000g, u trajanju 2 min. Pažljivo je odbačen supernatant, a mikroepriuvete su postavljene u vertikalni položaj na ubrus,

kako bi istekao čitav sadržaj. U mikroepruvete je zatim pipetirano 600 µl etanola (70%), podešenog na sobnu temperaturu, a zatim su mikroepruvete lagano izvrtane nekoliko puta, kako bi se isprao talog DNK. Zatim je sadržaj centrifugiran pri 16000g, u trajanju 2 min, etanol je pažljivo odliven, a mikroepruvete su postavljene na čist ubrus u trajanju 20 min kako bi se talog DNK osušio. Nakon sušenja, u mikroepruvete je dodato 75 µl rastvora za rehidraciju DNK i izvršena inkubacija pri 65°C, u trajanju 1 h, tokom koje je rastvor mešan nekoliko puta. Koncentracija ekstrahovane DNK podešena je sa “nuclease free” vodom na ~10-20 ng/µl. Rastvor DNK čuvan je pri -20°C.

#### 4.7.2 RAPD

Za izvođenje RAPD metode, u nezavisnim reakcijama korišćeno je tri različita prajmera: A9, A10 i R13 (Tabela 10), koji su već primenjivani u proučavanju genetičkog diverziteta *Agrobacterium* spp. u studijama drugih autora (Irelan i Meredith, 1996; Momol i sar., 1998). U ovom istraživanju, analizirana su 63 soja *A. vitis* poreklom iz naše zemlje i inostranstva (Tabela 14), kao i *A. tumefaciens*/biovar 1 (KFB 096) i *A. rhizogenes*/biovar 2 (KFB 0159). Korišćen je takođe i jedan soj *Pseudomonas viridiflava*, kao vrsta genetički udaljena od *Agrobacterium* spp.

Reakciona smeša konačne zapremine 25 µl sadržala je: 1× GoTaq bezbojni pufer (Promega, Madison, WI, USA), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTPs, 0,8 µM prajmera, 1,25 U GoTaq Flexi DNK polimeraze (Promega, Madison, WI, USA) i 2 µl ekstrahovane DNK. Reakcija se odvijala prema sledećem programu: početna denaturacija pri temperaturi 95°C u trajanju 5 min; 35 ciklusa denaturacije pri 94°C u trajanju 30 s, vezivanja prajmera pri 36°C u trajanju 30 s i ekstenzije pri 72°C u trajanju 1 min. Završna ekstenzija odvijala se pri temperaturi 72°C u trajanju 7 minuta. Produkti umnožavanja DNK razdvojeni su elektroforezom (80V, 60mA) u 1,5% agaroznom gelu, a dužina hoda bila je 12 cm.

Dobijeni genetički profili su prevedeni u binarnu matricu, gde je beleženo prisustvo (1) ili odsustvo (0) svakog umnoženog fragmenta, pod pretpostavkom da su fragmenti jednake veličine u različitim trakama homologni. Filogenetska analiza izvedena je korišćenjem FreeTree programa (Hampl i sar. 2001), a uključeni su kako podaci za svaki prajmer pojedinačno, tako i kombinovani podaci za sva tri prajmera.

Primenjena je neponderisana metoda za sparivanje grupa na temelju prosečnih vrednosti (eng. Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean, UPGMA), korišćenjem Nei i Lijevog koeficijenta sličnosti (Nei i Li, 1979). Statistička značajnost je testirana sa 1000 “bootstrap” ponavljanja. Konstrukcija dendrograma izvedena je korišćenjem TreeView programa (Page, 1996).

#### 4.7.3 Rep-PCR

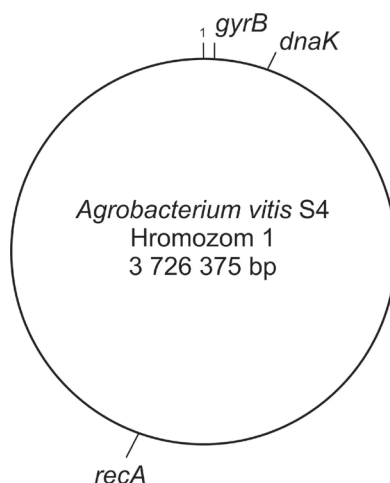
U ovom radu izveden je REP-PCR, ERIC-PCR i BOX-PCR korišćenjem REP1R-I/REP2-I, ERIC1R/ERIC2 i BOXA1R prajmera (Versalovic i sar., 1991; 1994; Tabela 10). U radu su korišćeni isti sojevi koji su analizirani RAPD metodom. Primenjen je protokol koji se zasnivao na prethodnom saopštenju drugih autora (Rademaker i de Bruijn, 1997), uz modifikacije u pogledu sastava reakcione smeše i koncentracije pojedinih komponenti.

Reakciona smeša konačne zapremine 25 µl sadržala je: 1× GoTaq bezbojni pufer (Promega, Madison, WI, USA), 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTPs, 1 µM prajmera, 2 U GoTaq Flexi DNK polimeraze (Promega, Madison, WI, USA) i 2 µl ekstrahovane DNK. Reakcija se odvijala prema sledećem programu: početna denaturacija pri temperaturi 95°C u trajanju 7 min; 35 ciklusa denaturacije pri 94°C u trajanju 1 min, vezivanja prajmera pri 40°C za REP1R-I/REP2-I, 52°C za ERIC1R/ERIC2 ili 53°C za BOXA1R u trajanju 1 min i ekstenzije pri 65°C u trajanju 8 min. Završna ekstenzija odvijala se pri temperaturi 65°C u trajanju 16 min. Produkti umnožavanja DNK razdvojeni su elektroforezom (80 V, 60 mA) u 1,5% agaroznom gelu, a dužina hoda bila je 15 cm. Filogenetska analiza izvedena je na isti način kao i u slučaju RAPD metode. Korišćeni su podaci dobijeni REP-PCR, ERIC-PCR i BOX-PCR metodama ponaosob, kao i kombinovani podaci za sve tri metode.

#### 4.7.4 Analiza konstitutivnih gena

U ovom radu predmet analize bili su unutrašnji fragmenati tri konstitutivna gena: *dnaK*, *gyrB* i *recA* (Slika 4). Gen *dnaK* ima ulogu u regulaciji odgovora na stres i kodira sintezu jednog proteina toplotnog stresa, *gyrB* kodira sintezu B subjedinice DNK

giraze, enzima koji ima funkciju u regulisanju negativno orijentisanih navoja na DNK, te je neophodan za replikaciju bakterija, dok *recA* ima ulogu u reparaciji DNK i kodira sintezu enzima rekombinaze A. Ovi geni su odabrani na bazi uporedne analize sekvenci više konstitutivnih gena kod vrsta *A. tumefaciens*/biovar 1 KFB 096 (pristupni broj: AE007869), *A. rhizogenes*/biovar 2 KFB 0159 (pristupni broj: CP000628), i *A. vitis* KFB 099/S4 (pristupni broj: CP000633), a odabrani su oni kod kojih je uočen najveći stepen genetičkog diverziteta. Ovaj princip primenjen je pod pretpostavkom da veći stepen genetičkog diverziteta odabranih konstitutivnih gena kod ove tri vrste, može ukazivati i na veći stepen diverziteta unutar vrste *A. vitis*. Takođe, uzeta je u obzir i činjenica da su neki od ovih gena već korišćeni u proučavanju *Agrobacterium* i njima srodnih vrsta, što omogućava međusobno poređenje rezultata i uključivanja već dostupnih sekvenci.



**Slika 4.** Šematski prikaz položaja konstitutivnih gena korišćenih u analizi genetičkog diverziteta u ovom radu. Pozicije gena zasnovane su na sekvenci genoma *A. vitis* S4 (pristupni broj: CP000633).

Fragmenti unutar *dnaK*, *gyrB* i *recA* gena umnoženi su primenom PCR metode, korišćenjem prajmera koji su posebno dizajnirani u ovom radu (Tabela 10). Prajmeri su dizajnirani na osnovu poravnatih sekvenci ovih gena kod *A. tumefaciens*/biovar 1 KFB 096, *A. rhizogenes*/biovar 2 KFB 0159, i *A. vitis* KFB 099, pri čemu su odabrani oni regioni koji su bili visoko konzervirani. U odabiru regiona kandidata za prajmere, delimično su korišćeni i programi PrimerSelect (DNASar, Madison, WI, USA) i Primer3 (Untergrasser i sar., 2012; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>).

Osobine prajmera kandidata su određivane pomoću dva već pomenuta programa i programa dostupnog na internetu OligoAnalyzer 3.1 (<http://eu.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/default.aspx>). Specifičnost prajmera proverena je korišćenjem programa Primer-BLAST (Ye i sar., 2012; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>).

U analizu su uključeni sojevi *A. vitis*, predstavnici glavnih grupa definisanih na osnovu rep-PCR i RAPD metode (Tabela 16). Umnožavanje ovih gena izvedeno je prema sledećem protokolu. Reakciona smeša konačne zapremine 50  $\mu$ l sadržala je: 1 $\times$  GoTaq bezbojni pufer (Promega, Madison, WI, USA), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTPs, 0,2  $\mu$ M dnaKF1/dnaKR1 ili recAF1/recAR1, ili 0,16  $\mu$ M gyrBF1/gyrBR1 prajmera, 0,5 U GoTaq Flexi DNK polimeraze (Promega, Madison, WI, USA) za umnožavanja *dnaK* i *recA* gena, odnosno 0,375 U za umnožavanje *gyrB* gena i 2  $\mu$ l ekstrahovane DNK. Reakcija se odvijala prema sledećem programu: početna denaturacija pri temperaturi 95°C u trajanju 5 min; 35 ciklusa denaturacije pri 94°C u trajanju 45 s, vezivanja prajmera pri 60°C (dnaKF1/dnaKR1; gyrBF1/gyrBR1), ili 57°C (recAF1/recAR1), u trajanju 45 s i ekstenzije pri 72°C u trajanju 45 s. Završna ekstenzija odvijala se pri temperaturi 72°C u trajanju 10 minuta.

Uspešnost umnožavanja konstitutivnih gena proverena je elektroforezom u 1,5% agaroznom gelu. Kvantifikacija DNK za sekvenciranje izvedena je vizuelnim poređenjem PCR produkata sa markerom phiX174 DNA/BsuRI (*HaeIII*) (Fermentas, Vilnius, Lithuania).

Fragmenti su sekvencirani istim prajmerima koji su korišćeni za umnožavanje (Macrogen Europe, Amsterdam, The Netherlands). Vizuelizacija hromatograma, obrada i određivanje konsenzus sekvenci izvršeni su korišćenjem istih programa kao i u slučaju analize 16S rRNK regiona. Konsenzus sekvence ukupne dužine 537 bp (*dnaK*), 539 bp (*gyrB*) ili 564 bp (*recA*), dostavljene su banci gena, nakon čega im je dodeljen pristupni broj. Za uporednu analizu dobijenih sekvenci sa sekvencama dostupnim u bazi podataka banke gena, korišćen je BLAST program.

Broj različitih haplotipova, sadržaj baza guanina i citozina, broj polimorfnihi mesta i indeks diverziteta ( $\pi$ ) određeni su korišćenjem DnaSP programa (Rozas i sar., 2003). Indeksom diverziteta označava se genetički diverzitet ili polimorfizam gena u određenoj populaciji, gde vrednost 0 znači da ne postoji polimorfizam, a vrednost 1



označava maksimalan polimorfizam. Vrednosti ovih parametara izračunate su za svaki od proučavanih gena ponaosob, kao i za kombinaciju sekvenci sva tri gena.

Filogenetska analiza izvođena je kako za svaki analizirani gen pojedinačno, tako i za kombinovanu sekvencu sva tri gena, a korišćen je MEGA 5.1 softverski paket (Tamura i sar., 2011). U filogenetsku analizu uključene su i sekvence *dnaK*, *gyrB* i *recA* gena kod srodnih *Agrobacterium* i *Rhizobium* sojeva, preuzete iz banke gena. Sekvence su poravnate korišćenjem CLUSTAL W algoritma, a genetička udaljenost određena je korišćenjem Kimura-2 modela (Kimura, 1980). Konstrukcija filogenetskih stabala izvedena je korišćenjem NJ metode (Saitou i Nei, 1987) u Kimura-2 modelu (Kimura, 1980) primenom bootstrap testa sa 1000 replikacija. Korišćena je i metoda maksimalne verodostojnosti (eng. maximum likelihood, ML), gde su najbolje prilagođeni modeli određeni korišćenjem posebne opcije u MEGA 5.1 programu. Za *dnaK* korišćen je model TN93+G (eng. Tamura-Nei and gamma rate distribution), za *gyrB* i kombinovane sekvence sva tri gena, T92+G (eng. Tamura 3-parameter plus gamma rate distribution), a za *recA*, GTR+G+I (eng. general time reversible with invariant site and a gamma rate distribution). Statistička značajnost ML filogenetskih stabala testirana je "bootstrap" analizom sa 100 ponavljanja. Filogenetska stabla su ukorenjena korišćenjem sekvenci soja *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110.

#### **4.7.5 Analiza 16S-23S rRNK ITS regiona**

Predmet analize u okviru ovog rada bili su i unutrašnji fragmenti 16S-23S rRNK ITS regiona. Proučavano je 36 sojeva *A. vitis* poreklom iz Srbije, a uključeno je i 15 sojeva *A. vitis* poreklom iz SAD, Mađarske i Australije (Tabela 17). U slučaju sojeva *A. vitis* poreklom iz međunarodnih kolekcija, odabran je po bar jedan predstavnik grupa koje su prethodno definisane na osnovu PCR-RFLP analize skoro kompletnog 16S rRNK gena i većeg dela 16S-23S rRNK ITS regiona (Otten i sar., 1996). Kod sojeva KFB 099 i KFB 0206 u banci gena su već dostupne sekvence čitavog genoma ili ribozomalnog regiona, te su ovi sojevi korišćeni kao kontrolni, odnosno za verifikaciju rezultata u pojedinim fazama istraživanja.

Umnožavanje većeg dela 16S-23S rRNK ITS regiona izvršeno je korišćenjem prajmera FGPS1490-72/FGPL132' (Tabela 10). Ovi prajmeri specifični su za veći broj

bakterijskih vrsta iz različitih rodova. Prajmer FGPS1490-72 komplementaran je sekvenci na samom kraju 16S rRNK gena, a FGPL132' sekvenci na 16S-23S rRNK ITS regionu. S obzirom da su sekvence čitavog ribozomalnog regiona dostupne za pojedine sojeve, precizno je utvrđeno da se ovim prajmerima kod njih amplifikuju fragmenti od 1425 bp (KFB 099) ili 1246 bp (KFB 0206).

Reakciona smeša konačne zapremine 50 µl sadržala je: 1× *Taq* pufer sa KCl (Thermo Scientific Fermentas, Vilnius, Lithuania), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTPs, 0,2 µM svakog prajmera, 1,5 U *Taq* DNK polimeraze (Thermo Scientific Fermentas, Vilnius, Lithuania) i 3 µl ekstrahovane DNK. Reakcija se odvijala prema sledećem programu: početna denaturacija pri temperaturi 95°C u trajanju 5 min; 35 ciklusa denaturacije pri 94°C u trajanju 1 min, vezivanja prajmera pri 55°C u trajanju 1 min i ekstenzije pri 72°C u trajanju 1 min 45 s. Završna ekstenzija odvijala se pri temperaturi 72°C u trajanju 5 minuta. Uspešnost umnožavanja proverena je elektroforezom u 1,2% agaroznom gelu.

Nakon umnožavanja, PCR produkti su podvrgnuti restrikcionalnoj analizi sa endonukleazama *TaqI*, *BsuRI* (*HaeIII*) i *HhaI* (*CfoI*) (Thermo Scientific Fermentas, Vilnius, Lithuania) u nezavisnim reakcijama, a prema protokolu preporučenom od strane proizvođača, uz izvesne modifikacije. Reakciona smeša sastojala se iz 8,5 µl „nuclease free“ vode, 1 µl odgovarajućeg pufera (10X *TaqI* pufera za *TaqI*, 10X R pufera za *BsuRI*, i 10X Tango pufera za *HhaI* restrikcioni enzim), 0,5 µl odgovarajućeg enzima i 6 µl PCR produkta. Reakciona smeša inkubirana je pri 65°C u trajanju 16 h (*TaqI*) ili pri 37°C u trajanju 16 h (*BsuRI* i *HhaI*). Restrikcioni fragmenti razdvojeni su elektroforezom u 2,2% agaroznom gelu pri 55 V u trajanju 3 h, a dužina hoda bila je 8 cm. Dobijeni restrikcioni profili su analizirani čime su određene različite RFLP grupe. Bar jedan predstavnik svake od definisanih grupa odabran je za sekvenciranje.

Umnoženi DNK fragmenti odabranih sojeva sekvencirani su u oba smera (Macrogen Europe, Amsterdam, The Netherlands) korišćenjem istih prajmera koji su korišćeni za umnožavanje. DNK fragmenti sojeva KFB 099 i KFB 0206 nisu sekvencirani, s obzirom da je sekvenca njihovog ribozomalnog regiona već dostupna u banci gena. Vizuelizacija hromatograma, obrada i određivanje konsenzus sekvenci izvršeni su korišćenjem istih programa kao i u slučaju analize 16S rRNK regiona.

**Tabela 10.** Prajmeri korišćeni u analizi genetičkog diverziteta

Oznaka prajmera	Sekvenca prajmera	Ciljani region	Veličina fragmenta	Literatura
A9	5'-GGGTAACGCC-3'	-	-	-
A10	5'-GTGATCGCAG-3'	-	-	-
R13	5'-GGACGACAAG-3'	-	-	-
REP1R-I/ REP2-I	5'-IIICGICGICATCIGGC-3' 5'-ICGICTTATCIGGCCTAC-3'	REP sekvence	-	Versalovic i sar., 1991
ERIC1R/ ERIC2	5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3' 5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'	ERIC sekvence	-	Versalovic i sar., 1991
BOXA1R	5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3'	BOX elementi	-	Versalovic i sar., 1994
dnaKF1/ dnaKR1	5'-CGTAAACGGCAATGGTCTT-3' 5'-TGGCAAAAGTAATCGGTATCG-3'	<i>A. vitis</i> (S4) <i>dnaK</i> gen	576 bp	Ovaj rad
gyrBF2/ gyrBR2	5'-AAGATGTTGTCCAGCCAGGA-3' 5'-TCCTTGACACCACGCACC-3'	<i>A. vitis</i> (S4) <i>gyrB</i> gen	626 bp	Ovaj rad
recAF1/ recAR1	5'-AACATCACGCCAATCTTCATAC-3' 5'-AGAGGACAAAACGGTGGATAAAAAG-3'	<i>A. vitis</i> (S4) <i>recA</i> gen	615 bp	Ovaj rad
FGPS1490-72/ FGPL132'	5'- TGCGGCTGGATCCCCTCCTT-3' 5'- CCGGGTTTCCCCATTCGG-3'	16S-23S ITS rRNK region	~1250-1450 bp	Normand i sar., 1996; Ponsonnet i Nesme, 1994

Konsenzus sekvence dostavljene su banci gena, nakon čega im je dodeljen pristupni broj. Za uporednu analizu dobijenih sekvenci sa sekvencama dostupnim u bazi podataka banke gena, korišćen je BLAST program. Filogenetska analiza izvedena je na isti način kao i u slučaju analize 16S rRNK gena, a uključene su i sekvence srodnih sojeva preuzete iz banke gena. Filogenetsko stablo ukorenjeno je korišćenjem sekvence soja *Agrobacterium rhizogenes*/biovar 2 K84 (KFB 0159).

#### **4.8 Osetljivost prema antagonističkom soju KFB 0207 (F2/5)**

U cilju dodatne karakterizacije i diferencijacije sojeva, primenjen je test inhibicije sa antagonističkim sojem *A. vitis*. Korišćen je antagonistički soj KFB 0207 (F2/5) koji inhibitorno deluje na rast sojeva *A. vitis* u *in vitro* ogledima i razvoj bakterioznog raka na inokulisanim biljkama vinove loze (Staphorst i sar., 1985; Burr i Reid, 1994; Burr i sar., 1997). Antagonistički efekat ovog soja testiran je prema 10 reprezentativnih sojeva poreklom iz Srbije, odabranih na osnovu prethodno opisane genetičke analize (Tabela 18). Kao pozitivna kontrola korišćen je tipski soj *A. vitis* (KFB 0206), a kao negativna referentni soj *A. tumefaciens*/biovar 1 (KFB 096).

U ovom radu primenjena je modifikovana metoda koju je prethodno opisao Stonier (1960). Antagonistički soj KFB 0207 zasejan je pipetiranjem 50 µl bakterijske suspenzije ( $\sim 10^8$  CFU/ml) na čvrstu YMA podlogu. Kutije su zatim inkubirane 48 h pri 27°C, nakon čega je zona porasta bakterije obeležena markerom na spoljnoj strani Petri kutije. Masa bakterija uklonjena je ubrus papirom, a kutije su zatim tretirane isparenjima hloroforma u trajanju 45 min. Istovremeno, sojevi čija je osetljivost testirana prema anatagonističkom soju, gajeni su na Kingovoj podlozi B 24-48 h pri 27°C, nakon čega su napravljene suspenzije bakterija ( $10^7$ - $10^8$  CFU/ml). 100 µl suspenzije pipetirano je u epruvete sa 5 ml vodenog agara (0,7 %; 45°C), nakon čega je izvršeno mešanje i razlivanje ovog sadržaja u Petri kutije, gde je gajen antagonistički soj. Svaki soj testiran je u tri ponavljanja. Petri kutije su zatim inkubirane 48 h pri 27°C, nakon čega su očitani rezultati testa.

## 5. REZULTATI

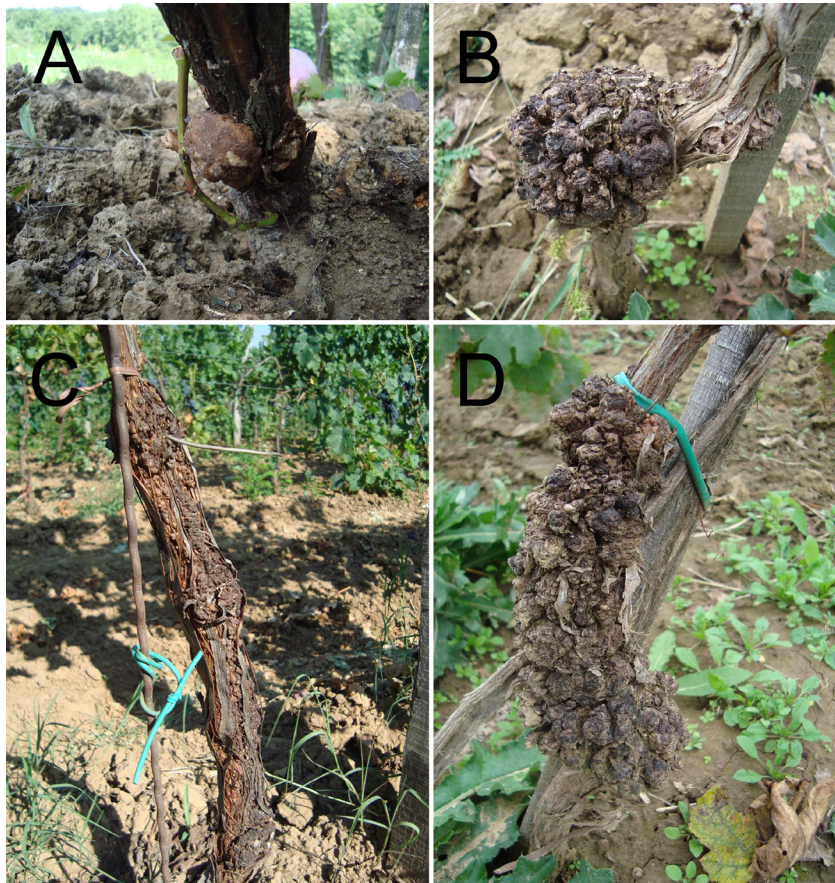
### 5.1 Rasprostranjenost i simptomi bakterioznog raka vinove loze u Srbiji

Obilaskom terena tokom 2010-2011. godine, karakteristični simptomi bakterioznog raka vinove loze uočeni su u timočkom, nišavsko-južnomoravskom, zapadno-moravskom, šumadijsko-velikomoravskom, pocerskom, sremskom i banatskom vinogradarskom rejonu. Stepen zaraze i procenat zaraženih biljaka varirali su u zavisnosti od lokaliteta. Vinogradi su bili pretežno stari 2-4 godine, a dominirale su sorte Merlot, Cabernet Sauvignon, Sauvignon Blanc i Chardonnay. Sadni materijal uglavnom je vodio poreklo iz uvoza.

Simptomi oboljenja uočeni su isključivo na nadzemnom stablu, iznad i/ili oko spojnog mesta podloge i plemke (Slika 5). Tumori su bili lokalizovani na prizemnom delu stabla (Slika 5a), a zabeležena su i krupna sferična zadebljanja na samom spojnom mestu (Slika 5b). Takođe, na terenu su uočena i tumorozna zadebljanja koja su dostizala dužinu i do nekoliko desetina cm (Slika 5c). U podmakloj fazi oboljenja tumorozna zadebljanja su potpuno obavijala stablo, a njihova površina bila je tamno-mrka, nekrotična i hrapava (Slika 5d). Simptomi bakterioznog raka nisu uočeni na podlogama vinove loze.

### 5.2 Izolacija patogena

Tri do pet dana nakon izolacije, na YMA podlogama razvilo se više različitih tipova bakterijskih kolonija (Slika 6). Za dalja istraživanja prihvaćene su beličaste, umereno-ispupčene, sjajne i glatke kolonije, pravilnog kružnog oblika (Slika 6). Fenotipske odlike odabranih kolonija odgovarale su izgledu kontrolnih sojeva *Agrobacterium* spp. na istoj podlozi.



**Slika 5.** Simptomi bakterijskog raka vinove loze. Lokalizovani tumori na prizemnom stablu (A). Sferična zadebljanja na spojnom mestu podloge i plemke (B). Kontinuirana tumorozna zadebljanja na nadzemnom stablu (C). Stablo potpuno obavijeno tumorom (D).



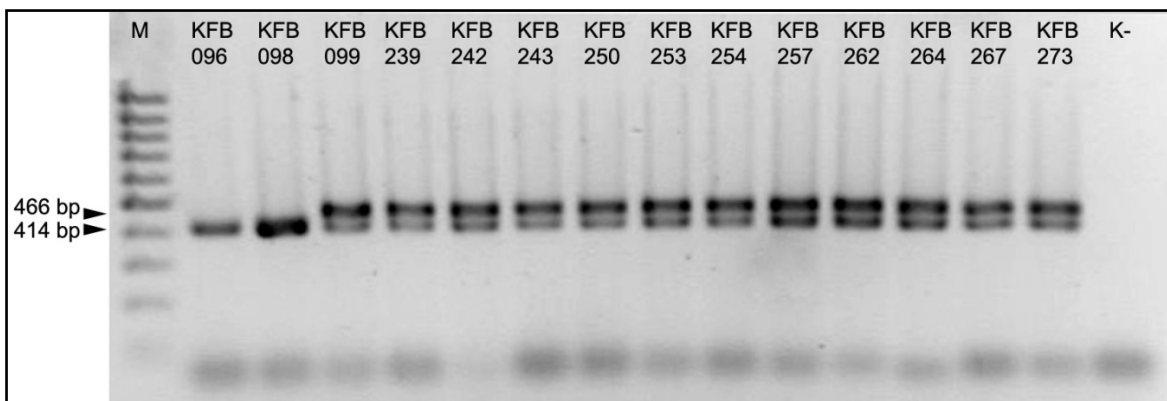
**Slika 6.** YMA podloga posle 3-5 dana inkubacije. Neke od tipičnih kolonija *Agrobacterium* spp. obeležene su crvenim strelicama.

## 5.3 Molekularna analiza sojeva

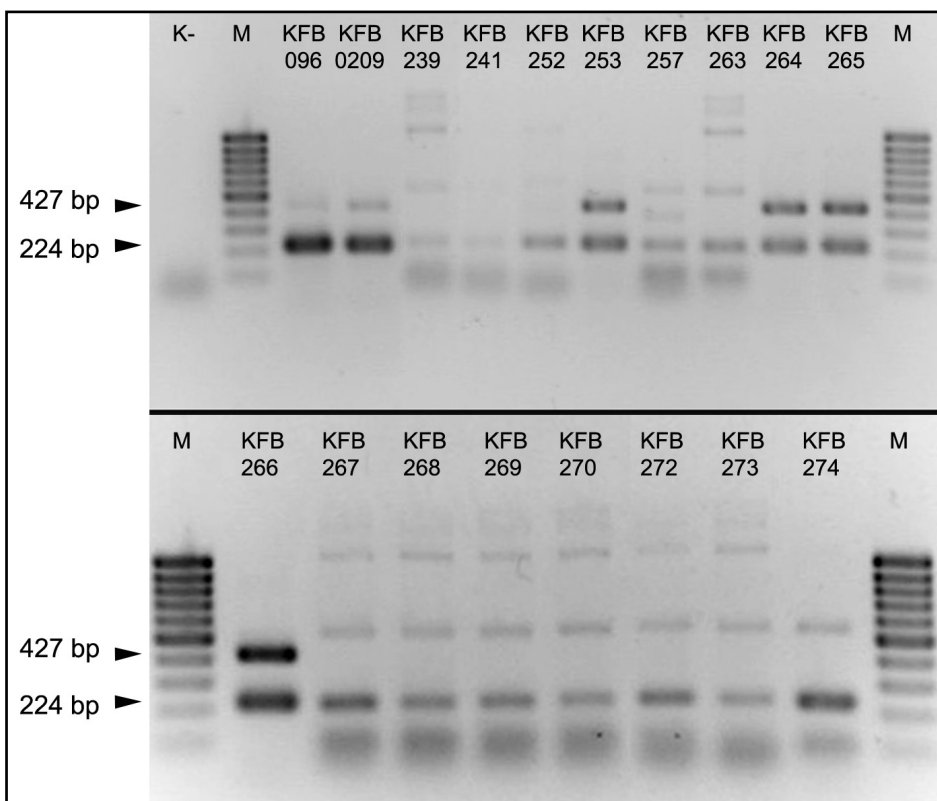
### 5.3.1 Detekcija pTi/pRi i identifikacija sojeva

Primenom dupleks PCR metode sa VCF3/VCR3 (*virC*) i PGF/PGR (*pehA*) prajmerima izvršena je preliminarna determinacija sojeva. Među izolovanim sojevima identifikovan je patogeni *A. vitis*, a za dalji rad izdvojeno je ukupno 36 reprezentativnih sojeva (Tabela 11). Dakle, kod svih 36 sojeva umnoženi su fragmenti odgovarajuće veličine od 414 i 466 bp (Tabela 11; Slika 7). Od ukupno 62 analizirana uzorka, 52 je bilo pozitivno na prisustvo patogena.

U cilju potvrde identifikacije sprovedena je dalja PCR analiza sojeva. Prajmeri A/C' (*virD2*) i CYT/CYT' (*ipt*), korišćeni su u dupleks PCR reakciji. Prajmerima A/C' umnoženi su odgovarajući fragmenti veličine 224 bp kod svih 36 sojeva, međutim kod pojedinih sojeva signal je bio vrlo slab (Tabela 11; Slika 8). Sa druge strane, CYT/CYT' prajmeri nisu bili specifični prema svim proučavanim sojevima i jedino je kod 4 soja došlo do umnožavanja odgovarajućeg fragmenta veličine 427 bp (Tabela 11; Slika 8). U ovoj dupleks PCR reakciji, kod pojedinih sojeva, takođe su umnoženi i brojni nespecifični fragmenti (Slika 8). U multipleks PCR reakciji sa PGF/PGR, VirFF<sub>1</sub>/VirFR<sub>2</sub> (*virF*) i VirD2S4F<sub>716</sub>/VirD2S4R<sub>1036</sub> (*virD2*) prajmerima, kod svih proučavanih sojeva umnoženi su odgovarajući fragmenti veličine 466 i 382 bp, ili 466 i 320 bp (Slika 9). Na ovaj način, proučavani sojevi su identifikovani kao tumorogeni *A. vitis*, a delimično su diferencirani i prema tipu pTi. Utvrđeno je da ukupno 35 sojeva poseduje O/C ili N tip tumorogenog plazmida, a jedan soj V tip pTi (Tabela 11). Prajmerima tms2F1/tms2R2 (*iaaH*) umnoženi su odgovarajući fragmenti veličine 617 bp kod 4 soja, a kod 32 soja nije došlo do umnožavanja (Tabela 11; Slika 10). Sojevi koji su bili pozitivni u ovoj PCR reakciji, poklapaju se sa onima kod kojih je umnožen odgovarajući fragment CYT/CYT' prajmerima. U multipleks PCR reakciji sa UF/B1R/B2R/AvR/ArR (23S rRNK) prajmerima potvrđeni su rezultati dobijeni u gore navedenoj dupleks i multipleks PCR reakciji gde su korišćeni PGF/PGR prajmeri. Kod svih analiziranih sojeva poreklom iz Srbije umnožen je odgovarajući fragment veličine 478 bp, karakterističan za *A. vitis* (Tabela 11; Slika 11).



**Slika 7.** Umnoženi fragmenti primenom dupleks PCR metode sa prajmerima VCF3/VCR3 i PGF/PGR. KFB 096 (*A. tumefaciens*/biovar 1), KFB 098 (*A. rhizogenes*/biovar 2) i KFB 099 (*A. vitis*) korišćeni su kao kontrolni sojevi. M, marker (MassRuler LowRange DNA Ladder, Fermentas, Lithuania); K-, negativna kontrola.



**Slika 8.** Umnoženi fragmenti primenom dupleks PCR metode sa prajmerima A/C' i CYT/CYT'. KFB 096 i KFB 0209 (*A. tumefaciens*/biovar 1) korišćeni su kao kontrolni sojevi. K-, negativna kontrola; M, marker (MassRuler LowRange DNA Ladder, Fermentas, Lithuania).



**Tabela 11.** PCR analiza sojeva

Šifra soja	Vrsta/ biovar <sup>a</sup>	Tip plazmida (Ti/Ri, opin tip) <sup>b</sup>	PCR <sup>d</sup>													
			VCF3/ VCR3	A/ C'	CYT/ CYT'	VirFF1/ VirFR <sub>2</sub>	VirD2S4F <sub>716</sub> / VirD2S4R <sub>1036</sub>	tms2F1/ tms2R2	PGF/ PGR	UF/ B1R	UF/ B2R	UF/ AvR	UF/ ArR	TF/ TR	NF/ NR	visF/ visR
KFB 239	<i>A. vitis</i>	Ti, O/C-1	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-
KFB 240	<i>A. vitis</i>	Ti, O/C-1	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-
KFB 241	<i>A. vitis</i>	Ti, O/C-1	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-
KFB 242	<i>A. vitis</i>	Ti, O/C-1	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-
KFB 243	<i>A. vitis</i>	Ti, V	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+
KFB 244	<i>A. vitis</i>	Ti, O/C-1	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-
KFB 245	<i>A. vitis</i>	Ti, O/C-1	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-
KFB 246	<i>A. vitis</i>	Ti, O/C-1	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-
KFB 247	<i>A. vitis</i>	Ti, O/C-1	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-
KFB 248	<i>A. vitis</i>	Ti, O/C-1	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-
KFB 249	<i>A. vitis</i>	Ti, O/C-1	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-
KFB 250	<i>A. vitis</i>	Ti, O/C-1	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-
KFB 251	<i>A. vitis</i>	Ti, O/C-1	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-
KFB 252	<i>A. vitis</i>	Ti, O/C-1	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-
KFB 253	<i>A. vitis</i>	Ti, O/C-2	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-
KFB 254	<i>A. vitis</i>	Ti, O/C-1	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-
KFB 255	<i>A. vitis</i>	Ti, O/C-1	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-
KFB 256	<i>A. vitis</i>	Ti, O/C-1	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-
KFB 257	<i>A. vitis</i>	Ti, O/C-1	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-
KFB 258	<i>A. vitis</i>	Ti, O/C-1	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-
KFB 259	<i>A. vitis</i>	Ti, O/C-1	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-
KFB 260	<i>A. vitis</i>	Ti, O/C-1	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-
KFB 261	<i>A. vitis</i>	Ti, O/C-1	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-
KFB 262	<i>A. vitis</i>	Ti, O/C-1	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-
KFB 263	<i>A. vitis</i>	Ti, O/C-1	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-
KFB 264	<i>A. vitis</i>	Ti, O/C-2	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-
KFB 265	<i>A. vitis</i>	Ti, O/C-2	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-
KFB 266	<i>A. vitis</i>	Ti, O/C-2	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-
KFB 267	<i>A. vitis</i>	Ti, O/C-1	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-
KFB 268	<i>A. vitis</i>	Ti, O/C-1	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-

(Nastavak na sledećoj strani)

**Tabela 11.** Nastavak

Šifra soja	Vrsta/ biovar <sup>a</sup>	Tip plazmida (Ti/Ri, opin tip) <sup>b</sup>	PCR <sup>d</sup>													
			VCF3/ VCR3	A/ C'	CYT/ CYT'	VirFF1/ VirFR <sub>2</sub>	VirD2S4F <sub>716</sub> / VirD2S4R <sub>1036</sub>	tms2F1/ tms2R2	PGF/ PGR	UF/ B1R	UF/ B2R	UF/ AvR	UF/ ArR	TF/ TR	NF/ NR	visF/ visR
KFB 269	<i>A. vitis</i>	Ti, O/C-1	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-
KFB 270	<i>A. vitis</i>	Ti, O/C-1	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-
KFB 271	<i>A. vitis</i>	Ti, O/C-1	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-
KFB 272	<i>A. vitis</i>	Ti, O/C-1	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-
KFB 273	<i>A. vitis</i>	Ti, O/C-1	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-
KFB 274	<i>A. vitis</i>	Ti, O/C-1	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-
KFB 0171	<i>A. vitis</i>	Ti, O/C-1	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-
KFB 0172	<i>A. vitis</i>	Ti, O/C-1	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-
KFB 0173	<i>A. vitis</i>	Ti, N <sup>c</sup>	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-
KFB 0203	<i>A. vitis</i>	Ti, N <sup>c</sup>	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-
KFB 0174	<i>A. vitis</i>	Ti, N <sup>c</sup>	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-
KFB 0175	<i>A. vitis</i>	Ti, V <sup>c</sup>	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+
KFB 0176	<i>A. vitis</i>	Ti, V <sup>c</sup>	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+
KFB 0204	<i>A. vitis</i>	Ti, OL <sup>c</sup>	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-
KFB 0178	<i>A. vitis</i>	Ti, OL <sup>c</sup>	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-
KFB 0179	<i>A. vitis</i>	Ti, V <sup>c</sup>	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+
KFB 0180	<i>A. vitis</i>	Ti, OS <sup>c</sup>	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-
KFB 0182	<i>A. vitis</i>	Ti, OS <sup>c</sup>	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-
KFB 0185	<i>A. vitis</i>	Ti, V <sup>c</sup>	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+
KFB 0186	<i>A. vitis</i>	Ti, V <sup>c</sup>	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+
KFB 0187	<i>A. vitis</i>	Ti, O/C-1 <sup>c</sup>	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-
KFB 0188	<i>A. vitis</i>	Ti, O/C, V <sup>c</sup>	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+
KFB 0189	<i>A. vitis</i>	Ti, O/C-1 <sup>c</sup>	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-
KFB 0190	<i>A. vitis</i>	Ti, O/C-1 <sup>c</sup>	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-
KFB 0191	<i>A. vitis</i>	Ti, O/C-1 <sup>c</sup>	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-
KFB 0192	<i>A. vitis</i>	Ti, O/C-1 <sup>c</sup>	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-
KFB 0193	<i>A. vitis</i>	Ti, O/C-2 <sup>c</sup>	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-
KFB 0194	<i>A. vitis</i>	Ti, O/C-1 <sup>c</sup>	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-
KFB 0195	<i>A. vitis</i>	Ti, O/C-1 <sup>c</sup>	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-
KFB 0196	<i>A. vitis</i>	Ti, V	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+

(Nastavak na sledećoj strani)

**Tabela 11.** Nastavak

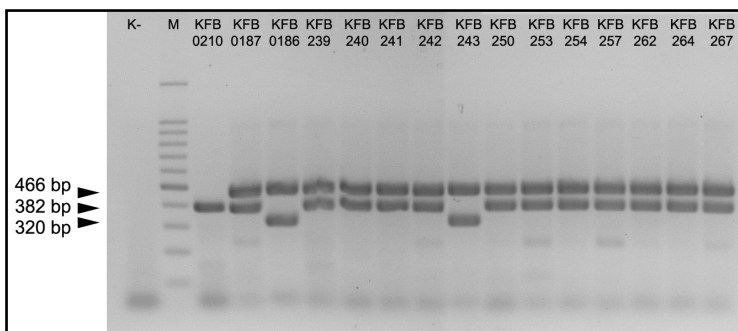
Šifra soja	Vrsta/ biovar <sup>a</sup>	Tip plazmida (Ti/Ri, opin tip) <sup>b</sup>	PCR <sup>d</sup>													
			VCF3/ VCR3	A/ C'	CYT/ CYT'	VirFF1/ VirFR <sub>2</sub>	VirD2S4F <sub>716</sub> / VirD2S4R <sub>1036</sub>	tms2F1/ tms2R2	PGF/ PGR	UF/ B1R	UF/ B2R	UF/ AvR	UF/ ArR	TF/ TR	NF/ NR	visF/ visR
KFB 0197	<i>A. vitis</i>	Ti, O/C-1	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-
KFB 0198	<i>A. vitis</i>	Ti, O/C-1	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-
KFB 0199	<i>A. vitis</i>	Ti, O/C-1	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-
KFB 0200	<i>A. vitis</i>	Ti, V	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+
KFB 0201	<i>A. vitis</i>	Ti, O/C-1	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-
KFB 0202	<i>A. vitis</i>	Ti, O/C-2	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-
KFB 0100	<i>A. vitis</i>	Ti, OS <sup>c</sup>	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-
KFB 0205	<i>A. vitis</i>	Ti, N <sup>c</sup>	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-
KFB 099	<i>A. vitis</i>	Ti, V <sup>c</sup>	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+
KFB 0206	<i>A. vitis</i>	Ti, OL <sup>c</sup>	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-
KFB 0207	<i>A. vitis</i>	NP	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
KFB 096	At/B1	Ti, N <sup>c</sup>	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
KFB 0209	At/B1	Ti, O <sup>c</sup>	+	+	+	/	/	+	-	+	-	-	-	-	-	-
KFB 0210	At/B1	Ti, O <sup>c</sup>	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
KFB 0231	Ar/B2	Ri <sup>c</sup>	+	+	-	/	/	-	-	-	+	-	-	-	-	-
KFB 0159	Ar/B2	NP	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
KFB 098	Ar/B2	Ri <sup>c</sup>	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
KFB 0233	<i>A. rubi</i>	Ti <sup>c</sup>	+	+	+	/	/	+	-	-	-	-	+	-	+	-
KFB 0234	Al	Ti <sup>c</sup>	+	-	-	/	/	-	-	/	/	/	/	-	-	-
KFB 0160	Rs	Ti <sup>c</sup>	+	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
KFB 0165	Rn	NP	-	-	-	/	/	-	-	+	+	-	-	-	-	-

<sup>a</sup> At/B1, *A. tumefaciens*/biovar 1; Ar/B2, *A. rhizogenes*/biovar 2; Al, *A. larrymoorei*; Rs, *R. skieniewicenses*; Rn, *R. nepotum*;

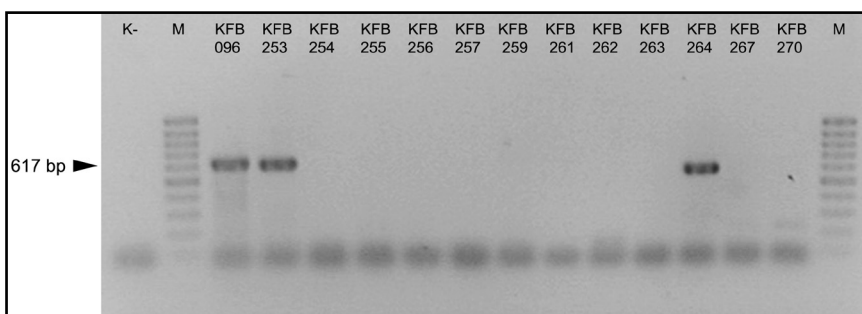
<sup>b</sup> Ti, tumorogeni plazmid; Ri, rizogeni plazmid; O/C-1, oktopin/kukumopin tip pTi kod koga nije došlo do specifičnog umnožavanja sa *ipt* i *tms2* prajmerima; O/C-2, oktopin/kukumopin tip pTi kod koga je došlo do specifičnog umnožavanja sa *ipt* i *tms2* prajmerima; OL, oktopin/kukumopin tip pTi sa kompletnim TA-DNK regionom; OS, oktopin/kukumopin tip pTi sa skraćenim TA-DNK regionom; O, oktopin tip pTi; N, nopalini tip; V, vitopini tip; NP, nepatogeni soj (bez pTi ili pRi);

<sup>c</sup> Tip plazmida i opin tip su određeni u prethodnim studijama;

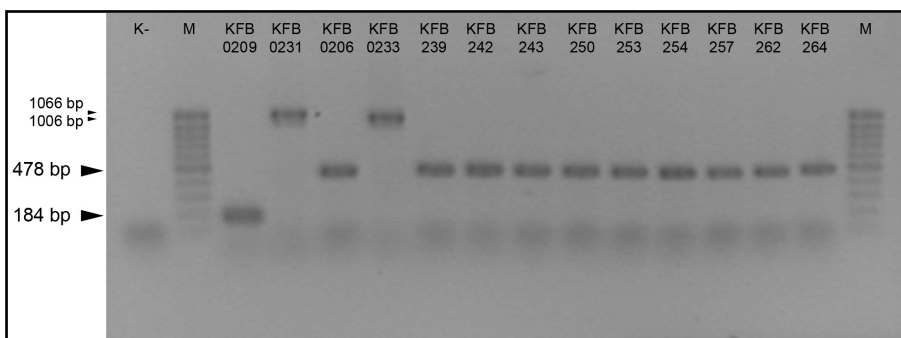
<sup>d</sup> +, pozitivna reakcija; -, negativna reakcija; /, nije testirano.



**Slika 9.** Umnoženi fragmenti primenom multipleks PCR metode sa prajmerima PGF/PGR, VirFF<sub>1</sub>/VirFR<sub>2</sub> i VirD2S4F<sub>716</sub>/VirD2S4R<sub>1036</sub>. KFB 0210 (*A. tumefaciens*/biovar 1, oktopin pTi), KFB 0187 (*A. vitis*; O/C pTi) i KFB 0186 (*A. vitis*, V pTi) korišćeni su kao kontrolni sojevi. K-, negativna kontrola; M, marker (100bp DNA Ladder, Promega, Madison, WI, USA).



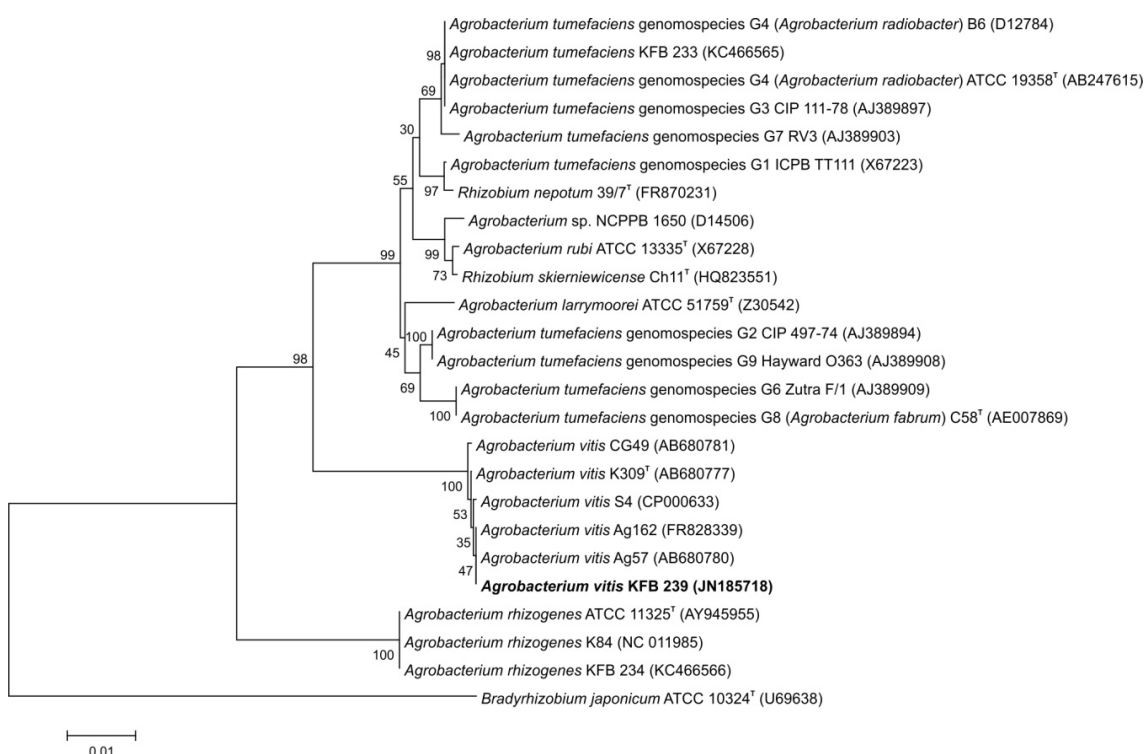
**Slika 10.** Umnoženi fragmenti primenom PCR metode sa tms2F1/tms2R2 prajmerima. KFB 096 (*A. tumefaciens*/biovar 1) korišćen je kao kontrolni soj. K-, negativna kontrola; M, marker (MassRuler LowRange DNA Ladder, Fermentas, Lithuania).



**Slika 11.** Umnoženi fragmenti primenom multipleks PCR metode sa prajmerima UF/B1R/B2R/AvR/ArR. KFB 0209 (*A. tumefaciens*/biovar 1), KFB 0231 (*A. rhizogenes*/biovar 2), KFB 0206 (*A. vitis*) i KFB 0233 (*A. rubi*) korišćeni su kao kontrolni sojevi. K-, negativna kontrola; M, marker (MassRuler LowRange DNA Ladder, Fermentas, Lithuania).

### 5.3.2 Sekvenciona analiza 16S rRNK gena

Parcijalna nukleotidna sekvenca (1290 bp) 16S rRNK gena soja KFB 239, dostavljena je NCBI banci gena pod pristupnim brojem JN185718. BLAST analizom utvrđen je visok stepen nukleotidne sličnosti (99-100%) sa sekvencama drugih sojeva *A. vitis* dostupnim u bazi podataka. Takođe, na dendrogramu konstruisanom na osnovu filogenetske analize, soj KFB 239 je grupisan zajedno sa referentnim sojevima *A. vitis* (Slika 12).



**Slika 12.** Dendrogram konstruisan na osnovu sekvenci (1290-bp) 16S rRNK gena korišćenjem NJ metode prikazuje filogenetsku vezu između soja KFB 239 i srodnih *Agrobacterium/Rhizobium* vrsta. Soj iz Srbije označen je podebljano. Uz čvorišta su naznačene “bootstrap” vrednosti izračunate na osnovu 1000 ponavljanja. Pristupni brojevi navedeni su u zagradi. Dužina grana odgovara stopi supstitucija baznih parova. Filogenetsko stablo ukorenjeno je korišćenjem sekvence 16S rRNK gena soja *B. japonicum* ATCC 10324<sup>T</sup>.

### 5.3.4 Specifičnost prajmera korišćenih u identifikaciji patogenih *A. vitis*

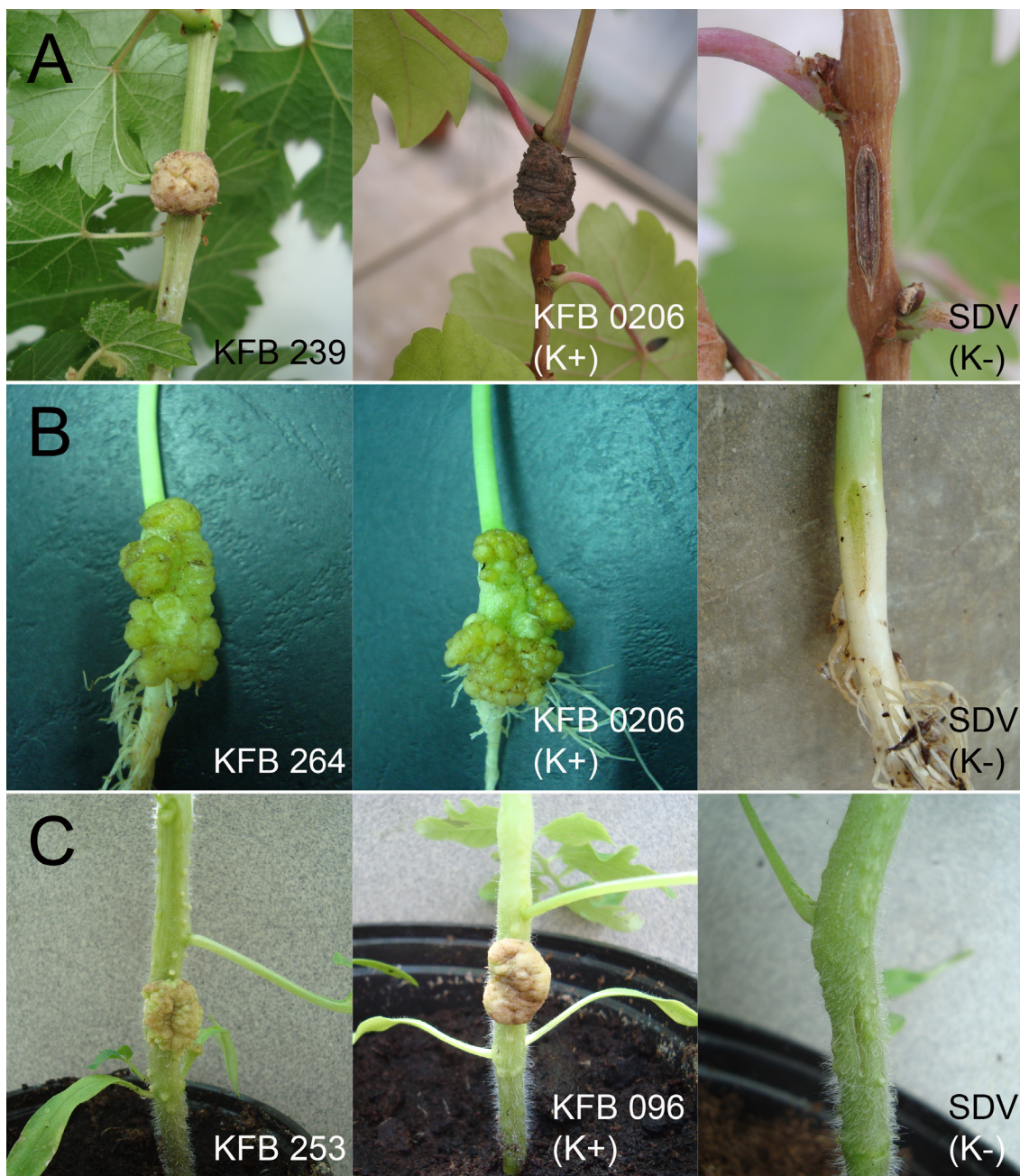
Prajmeri koji su korišćeni u detekciji pTi, kao i u identifikaciji i karakterizaciji sojeva poreklom iz Srbije, takođe su primenjeni u PCR analizi referentnih sojeva *A. vitis* poreklom iz međunarodnih kolekcija, a rezultati su predstavljeni u Tabeli 11. Prajmerima VCF3/VCR3, VirFF1/VirFR2 i VirD2S4F716/VirD2S4R1036 detektovan je pTi kod svih proučavanih referentnih *A. vitis* sojeva, osim kod nepatogenog soja KFB 0207. Prajmerima VirFF1/VirFR2 umnoženi su karakteristični fragmenti kod sojeva koji su posedovali O/C i N tip pTi, dok su prajmerima VirD2S4F716/VirD2S4R1036 umnoženi specifični fragmenti jedino kod sojeva sa V tipom pTi.

A/C' prajmerima takođe su umnoženi odgovarajući fragmenti kod svih proučavanih *A. vitis* sojeva, osim kod nepatogenog soja KFB 0207, ali je dobijeni signal kod pojedinih sojeva bio niskog intenziteta. Sa druge strane, prajmerima CYT/CYT' i tms2F1/ tms2R2 odgovarajući fragment umnožen je jedino kod sojeva sa OL i N tipom pTi, kao i kod dva soja sa O/C tipom pTi (KFB 0193, KFB 0202). PGF/PGR i UF/AvR prajmerima umnoženi su odgovarajući fragmenti kod svih proučavanih *A. vitis* sojeva.

### 5.4 Patogene odlike sojeva

U testu patogenosti na biljkama vinove loze, 34 soja su prouzrokovala razvoj karakterističnih tumora na inokulisanim lastarima (Tabela 12; Slika 13). Izuzetak su bili sojevi KFB 241 i KFB 247, koji su u ovom testu bili negativni, iako je molekularnom analizom utvrđeno da poseduju pTi. Kontrolni sojevi *A. vitis* (KFB 099, KFB 0206) indukovali su stvaranje tumora, dok kod soja *A. tumefaciens*/biovar 1 (KFB 096) to nije bio slučaj. Na biljkama inokulisanim nepatogenim sojem *A. rhizogenes*/biovar 2 i SDV nije došlo do razvoja simptoma.

Iz biljke vinove loze koja je inokulisana sojem KFB 239 izvršena je reizolacija patogena. Bakterijske kolonije koje su odgovarale fenotipu *Agrobacterium* sp. izolovane su iz tkiva tumora na YMA podlogu. U dupleks PCR reakciji sa VCF3/VCR3 i PGF/PGR prajmerima ovi sojevi identifikovani su kao tumorogeni *A. vitis*, čime su ispunjeni Kohovi postulati.



**Slika 13.** Test patogenosti. Biljke vinove loze inokulisane sojem KFB 239, kontrolnim sojem *A. vitis* KFB 0206 i SDV (A). Biljke suncokreta inokulisane sojem KFB 264, kontrolnim sojem *A. vitis* KFB 0206 i SDV (B). Biljke paradajza inokulisane sojem KFB 253, kontrolnim sojem *A. tumefaciens*/biovar 1 KFB 096 i SDV (C).

**Tabela 12.** Patogenost proučavanih sojeva na biljkama vinove loze, suncokreta i paradajza

Soj	Vrsta/ biovar <sup>a</sup>	Geografsko poreklo	Godina izolacije <sup>b</sup>	Tip pTi <sup>c</sup>	Test patogenosti <sup>d</sup>		
					vinova loza	suncokret	paradajz
KFB 239	<i>A. vitis</i>	Vršac	2010.	O/C-1	+	V	+
KFB 240	<i>A. vitis</i>	Vršac	2010.	O/C-1	+	V	+
KFB 241	<i>A. vitis</i>	Vršac	2010.	O/C-1	-	V	V
KFB 242	<i>A. vitis</i>	Irig	2011.	O/C-1	+	V	V
KFB 243	<i>A. vitis</i>	Irig	2011.	V	+	+	-
KFB 244	<i>A. vitis</i>	Irig	2011.	O/C-1	+	V	V
KFB 245	<i>A. vitis</i>	Negotin	2011.	O/C-1	+	V	+
KFB 246	<i>A. vitis</i>	Negotin	2011.	O/C-1	+	V	+
KFB 247	<i>A. vitis</i>	Vršac	2011.	O/C-1	-	V	-
KFB 248	<i>A. vitis</i>	Vršac	2011.	O/C-1	+	V	+
KFB 249	<i>A. vitis</i>	Smederevo	2011.	O/C-1	+	V	+
KFB 250	<i>A. vitis</i>	Smederevo	2011.	O/C-1	+	V	V
KFB 251	<i>A. vitis</i>	Smederevo	2011.	O/C-1	+	V	V
KFB 252	<i>A. vitis</i>	Smederevo	2011.	O/C-1	+	V	V
KFB 253	<i>A. vitis</i>	Smederevo	2011.	O/C-2	+	+	+
KFB 254	<i>A. vitis</i>	Smederevo	2011.	O/C-1	+	-	-
KFB 255	<i>A. vitis</i>	Šabac	2011.	O/C-1	+	V	+
KFB 256	<i>A. vitis</i>	Šabac	2011.	O/C-1	+	V	V
KFB 257	<i>A. vitis</i>	Šabac	2011.	O/C-1	+	V	+
KFB 258	<i>A. vitis</i>	Šabac	2011.	O/C-1	+	V	V
KFB 259	<i>A. vitis</i>	Šabac	2011.	O/C-1	+	V	V
KFB 260	<i>A. vitis</i>	Šabac	2011.	O/C-1	+	V	V
KFB 261	<i>A. vitis</i>	Šabac	2011.	O/C-1	+	V	V
KFB 262	<i>A. vitis</i>	Vladimirci	2011.	O/C-1	+	V	+
KFB 263	<i>A. vitis</i>	Vladimirci	2011.	O/C-1	+	V	+
KFB 264	<i>A. vitis</i>	Vranje	2011.	O/C-2	+	+	V
KFB 265	<i>A. vitis</i>	Vranje	2011.	O/C-2	+	+	V
KFB 266	<i>A. vitis</i>	Vranje	2011.	O/C-2	+	+	V
KFB 267	<i>A. vitis</i>	Bujanovac	2011.	O/C-1	+	V	+
KFB 268	<i>A. vitis</i>	Bujanovac	2011.	O/C-1	+	V	V
KFB 269	<i>A. vitis</i>	Vranje	2011.	O/C-1	+	V	+
KFB 270	<i>A. vitis</i>	Vranje	2011.	O/C-1	+	V	+
KFB 271	<i>A. vitis</i>	Vranje	2011.	O/C-1	+	V	+
KFB 272	<i>A. vitis</i>	Aleksandrovac	2011.	O/C-1	+	V	V
KFB 273	<i>A. vitis</i>	Aleksandrovac	2011.	O/C-1	+	V	+
KFB 274	<i>A. vitis</i>	Aleksandrovac	2011.	O/C-1	+	V	+
KFB 099	<i>A. vitis</i>	Mađarska	1981.	V	+	+	+
KFB 0206	<i>A. vitis</i>	Australija	1977.	OL	+	+	+
KFB 096	At/B1	SAD	1958.	N	-	+	+
KFB 0159	Ar/B2	Australija	/	NP	-	-	-

<sup>a</sup> At/B1, *A. tumefaciens*/biovar 1; Ar/B2, *A. rhizogenes*/biovar 2;

<sup>b</sup> /, nema podataka;

<sup>c</sup> O/C-1, O/C tip pTi kod koga nije došlo do specifičnog umnožavanja sa *ipt* i *tms2* prajmerima; O/C-2, O/C tip pTi kod koga je došlo do specifičnog umnožavanja sa *ipt* i *tms2* prajmerima; OL, oktopin/kukumopin tip pTi sa kompletnim TA-DNK regionom; N, nopalini tip; V, vitopini tip; NP, nepatogeni soj (bez pTi ili pRi);

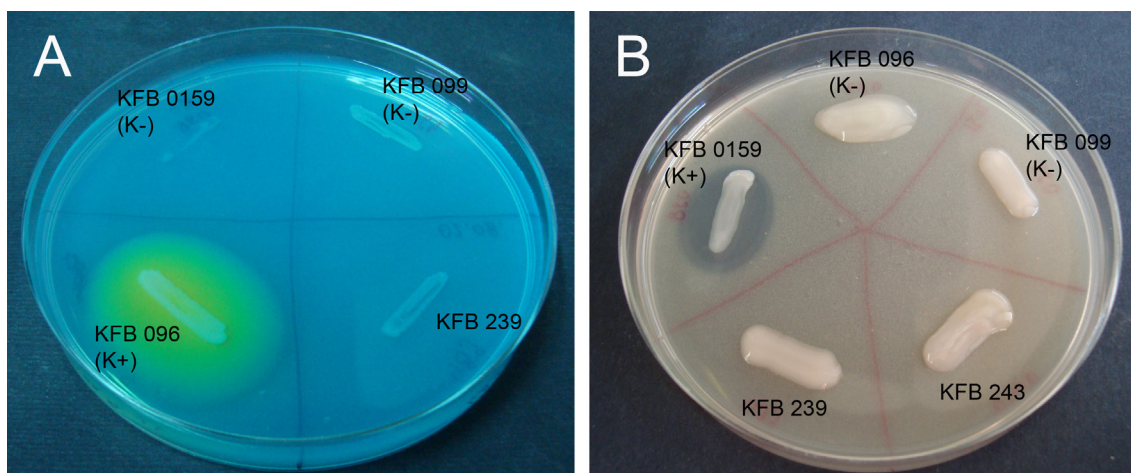
<sup>d</sup> +, pozitivna reakcija; -, negativna reakcija; V, varijabilna reakcija.



Ukupno 17 sojeva prouzrokovalo je razvoj simptoma na paradajzu, tri su bila negativna, dok je 16 sojeva izazvalo varijabilnu reakciju inokuliranih biljaka (Tabela 12; Slika 13). U testu patogenosti na suncokretu, pet sojeva je bilo pozitivno, jedan negativan, a varijabilnu reakciju izazvalo je 30 sojeva (Tabela 12; Slika 13). Kontrolni sojevi *A. tumefaciens*/biovar 1 (KFB 096) i *A. vitis* (KFB 099, KFB 0206) bili su pozitivni u testu patogenosti sa obe biljne vrste, dok na biljkama inokuliranim nepatogenim sojem *A. rhizogenes*/biovar 2 i SDV nije došlo do razvoja tumora.

### 5.5 Morfološke, odgajivačke i biohemijsko-fiziološke odlike

Proučavani sojevi *A. vitis* poreklom iz Srbije ispoljili su morfološke, odgajivačke i biohemijsko-fiziološke odlike osobene vrsti *A. vitis*. Proučavani sojevi su Gram-negativni, oksidaza-pozitivni, razvijaju se pri 35°C i u hranljivoj podlozi sa 2% NaCl, ne proizvode 3-ketolaktozu iz laktoze, ne stvaraju prosvetljene zone na KDA podlozi sa dodatkom CaCO<sub>3</sub>, pokretljivi su pri pH 7,0, razvijaju se u podlozi sa feri amonijum citratom bez stvaranja karakterističnog crvenog pigmenta, koriste citrate, stvaraju kiselinu iz saharoze, ali ne i iz melezitaze, i stvaraju baze iz tartarata (Tabela 13; Slika 14). Jedina odstupanja zabeležena su kod testa stvaranja kiseline iz eritritola kao izvora ugljenika. Soj KFB 243 bio je pozitivan u ovom testu, što je prema podacima iz literature jedino odlika *A. rhizogenes*/biovar 2 sojeva. U ovom testu, pozitivan je bio i kontrolni soj *A. tumefaciens*/biovar 1 (KFB 096), što je takođe u suprotnosti za literaturnim podacima.



**Slika 14.** Biohemijske odlike proučavanih sojeva: Stvaranje 3-ketolaktoze (A) i formiranje prosvetljenih zona na KDA-CaCO<sub>3</sub> (B).

**Tabela 13.** Morfološke, odgajivačke i biohemijsko-fiziološke odlike proučavanih sojeva

Test	AvS <sup>a,b</sup>	Kontrolni sojevi <sup>b</sup>		
		KFB 096	KFB 0159	KFB 099
Reakcija po Gramu	-	-	-	-
Aktivnost oksidaze	+	+	-	+
Razvoj pri 35°C	+	+	-	+
Razvoj u podlozi sa 2% NaCl	+	+	-	+
Stvaranje 3-ketolaktoze	-	+	-	-
Formiranje prosvetljenih zona na KDA-CaCO <sub>3</sub>	-	-	+	-
Pokretljivost pri pH 7.0	-	+	+	-
Razvoj i pigmentacija u podlozi sa feri-amonijum-citratom	-	+	-	-
Korišćenje citrata	+	-	+	+
Stvaranje kiseline iz saharoze	+	+	-	+
Stvaranje kiseline iz eritritola	- <sup>c</sup>	+	+	-
Stvaranje kiseline iz melezitaze	-	+	-	-
Stvaranje baze iz tartarata	+	-	+	+

<sup>a</sup> Proučavani *A. vitis* sojevi poreklom iz Srbije;

<sup>b</sup> +, pozitivna reakcija; -, negativna reakcija;

<sup>c</sup> Soj KFB 243 bio je pozitivan u ovom testu.

## 5.6 Karakterizacija Ti plazmida

U multipleks PCR reakciji sa PGF/PGR, VirFF<sub>1</sub>/VirFR<sub>2</sub> i VirD2S4F<sub>716</sub>/VirD2S4R<sub>1036</sub> prajmerima utvrđeno je da od ukupno 36 proučavanih sojeva poreklom iz Srbije, 35 poseduje O/C ili N tip, a jedan soj V tip pTi (Tabela 11). Dalja karakterizacija sojeva izvršena je korišćenjem prajmera specifičnih za svaki od opin tipova pTi kod *A. vitis*. Prajmerima TF/TR specifičnim za O/C tip pTi, umnoženi su karakteristični fragmenti kod 35 od ukupno 36 proučavanih sojeva, dok prajmerima NF/NR specifičnim za N tip pTi nije došlo do umnožavanja odgovarajućih fragmenata ni kod jednog proučavanog soja *A. vitis* poreklom iz Srbije (Tabela 11). Prajmerima visF/visR karakterističnim za V tip pTi, umnožen je odgovarajući fragment kod jedinog soja koji je bio negativan u PCR reakciji sa TF/TR prajmerima, odnosno soja čiji je pTi označen kao V tip u već gore pomenutoj multipleks PCR reakciji (Tabela 11). Dakle, na osnovu PCR analize, pTi kod 35 sojeva klasifikovan je kao O/C tip, jedan kao V tip, dok N tip pTi nije utvrđen (Tabela 11).

U poglavlju 5.3.1 navedene su izvesne razlike među sojevima utvrđene korišćenjem prajmera specifičnih za *ipt* i *tms2* gene, koji se nalaze na T-DNK. Od ukupno 36 proučavanih sojeva, jedino je kod 4 soja sa O/C tipom pTi došlo do

umnožavanja odgovarajućeg fragmenta korišćenjem ovih prajmera. Stoga su O/C sojevi kod kojih nije došlo do pozitivne reakcije korišćenjem ovih prajmera označeni kao O/C-1, a oni kod kojih su umnoženi odgovarajući fragmenti obeleženi su kao O/C-2 (Tabela 11).

Predmet analize bili su i referentni sojevi *A. vitis* poreklom iz međunarodnih kolekcija (Tabela 11). TF/TR prajmerima umnožen je karakterističan fragment jedino kod sojeva sa O/C tipom pTi, parom prajmera NF/NR kod onih sa N tipom pTi, dok je do specifičnog umnožavanja visF/visR prajmerima došlo jedino kod sojeva sa V tipom pTi. Kod nepatogenog soja KFB 0207 nije došlo do specifičnog umnožavanja ni sa jednim pomenutim prajmerom. Kod atipičnog soja KFB 0188 do pozitivne reakcije došlo je i sa TF/TR i visF/visR prajmerima.

## **5.7 Genetički diverzitet sojeva**

### **5.7.1 RAPD i Rep-PCR**

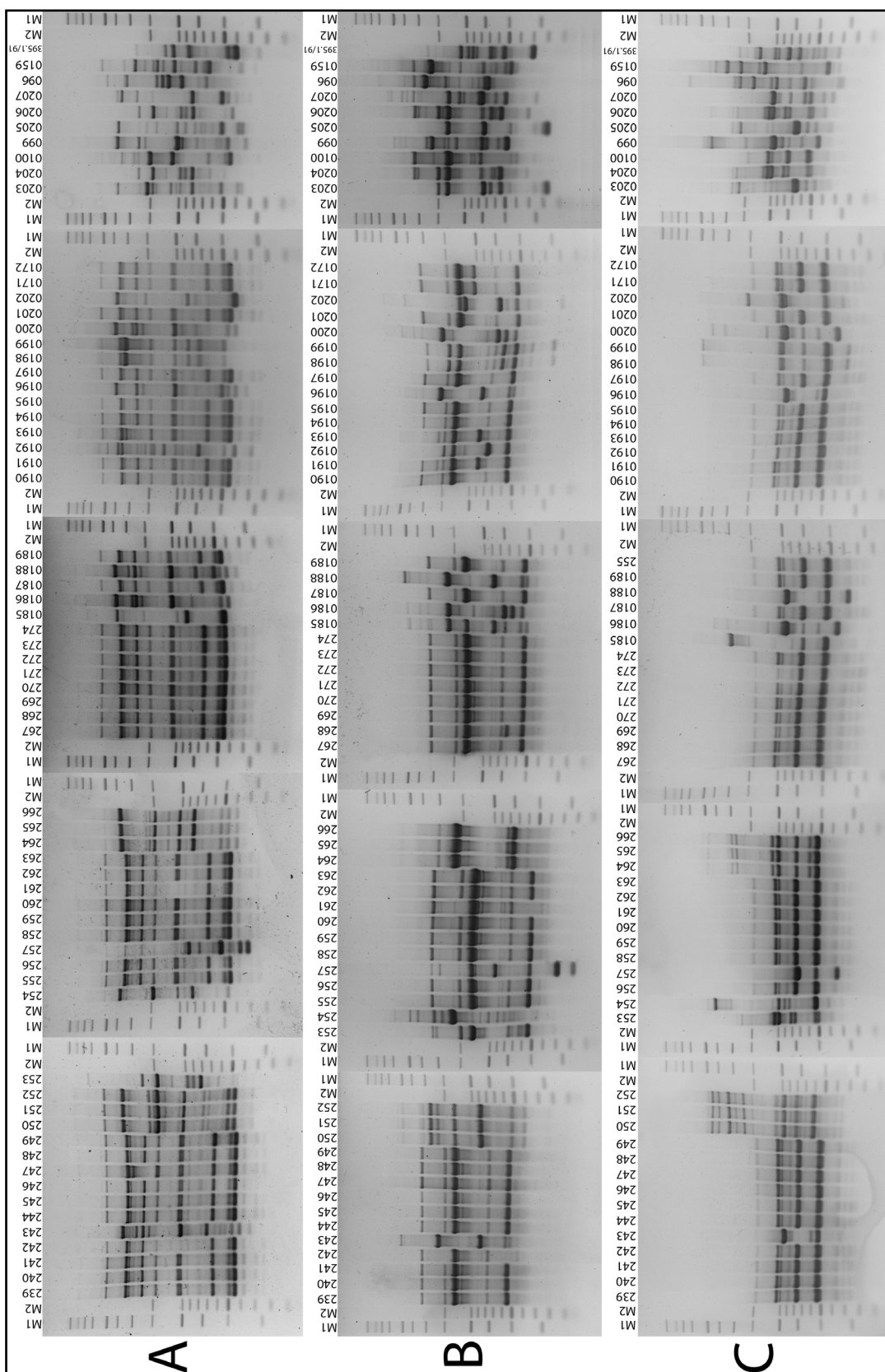
RAPD i rep-PCR profili ukazuju na postojanje genetičkog diverziteta među proučavanim sojevima (Slika 15; Slika 16). Genetički profili dobijeni rep-PCR metodom bili su kompleksniji u odnosu na profile dobijene RAPD metodom. Takođe, rep-PCR metoda ispoljila je veću diskriminacionu moć u odnosu na RAPD. Ovom metodom bilo je moguće razlikovati sojeve koji su posedovali identične RAPD profile.

Genetički profili dobijeni RAPD i rep-PCR metodom prevedeni su u binarnu matricu, nakon čega je izvedena filogenetska analiza i konstrukcija dendrograma. Filogenetskom analizom obuhvaćeni su podaci za svaki RAPD prajmer ponaosob (A9, A10, R13), a analizirana je i matrica formirana kombinacijom podataka za sva tri prajmera (A9-A10-R13). Posebno su analizirane i binarne matrice načinjene na osnovu REP-, ERIC- i BOX-PCR profila, a analizirana je i kombinovana matrica (REP-ERIC-BOX). Na ovaj način, među proučavanim sojevima diferencirano je više različitih genetičkih grupa (Tabela 14; Slika 17; Slika 18). RAPD i rep-PCR metodama diferencirane su uglavnom istovetne genetičke grupe, dok je položaj i raspored ovih grupa na dendrogramima bio različit, u zavisnosti od korišćene metode ili prajmera. Grupisanje sojeva bilo je jasnije i preciznije na filogenetskim stablima konstruisanim na osnovu kombinovanih podataka (A9-A10-R13; REP-ERIC-BOX), u odnosu na

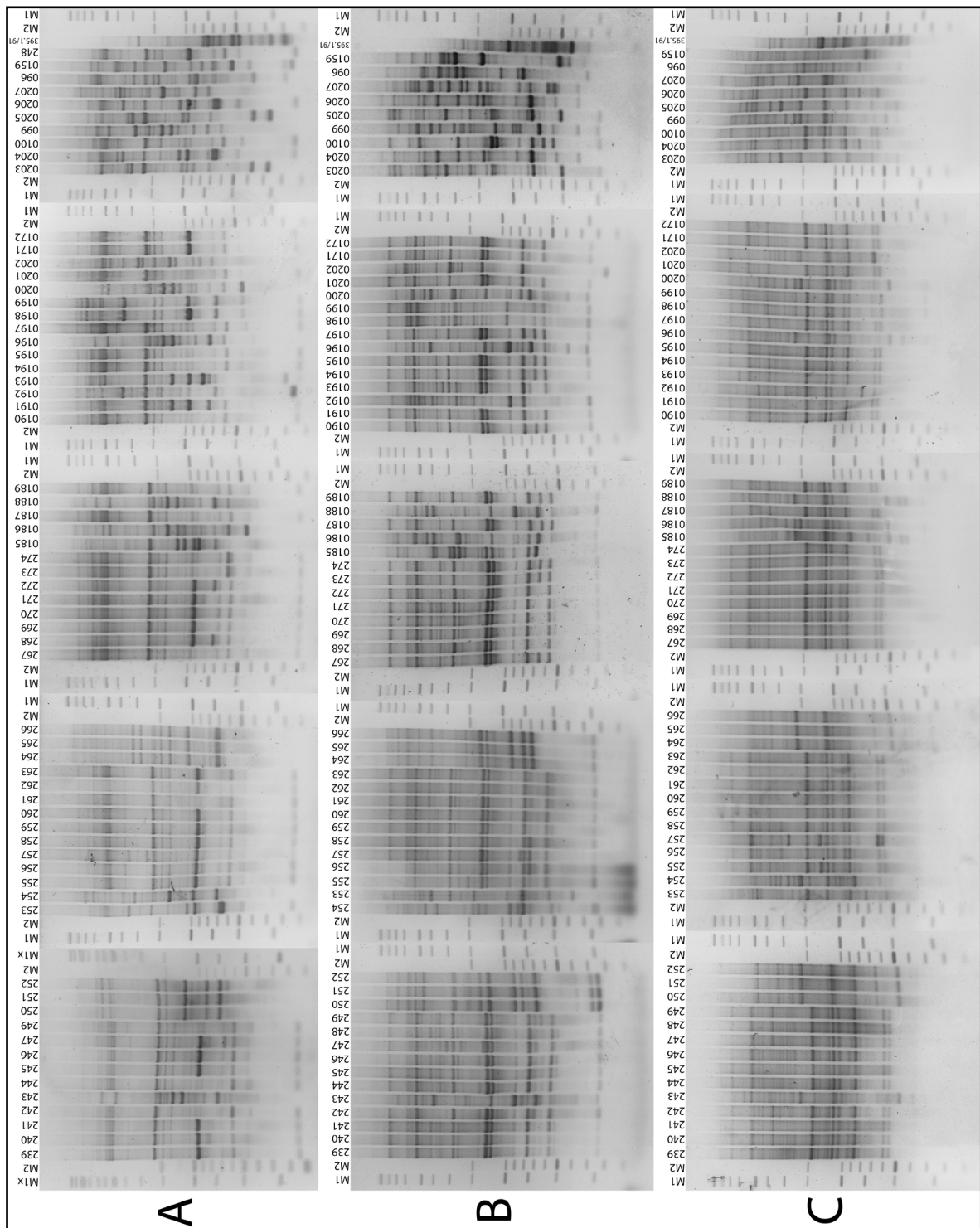
filogenetska stabla zasnovana na podacima za pojedinačne prajmere (A9, A10, R13, REP, ERIC, BOX) (podaci nisu prikazani).

Filogenetskom analizom, korišćenjem kombinovanih podataka za RAPD prajmere (A9-A10-R13), diferencirano je ukupno 13 genetičkih grupa koje su obeležene slovima A-M (Tabela 14; Slika 17). Sojevi poreklom iz Srbije bili su raspoređeni unutar 7 genetičkih grupa. Grupa C bila je najbrojnija, sastavljena od ukupno 38 sojeva, od kojih je 28 bilo poreklom iz Srbije, 3 iz Italije, 2 iz Poljske, i po jedan iz Mađarske, Moldavije, Crne Gore, Bugarske i Maroka (Tabela 14). Svi sojevi iz grupe C posedovali su O/C tip pTi, od kojih soj KFB 0100 OS tip pTi, soj KFB 0193 O/C-2 tip pTi, a svi ostali sojevi posedovali su O/C-1 tip pTi. Grupa F bila je druga po brojnosti, i sastojala se od 6 sojeva poreklom iz Srbije, Italije, Mađarske i Bugarske. Ova grupa bila je sastavljena uglavnom od sojeva koji su posedovali V tip pTi, uz izuzetak soja KFB 0188 koji je posedovao gene kako za V, tako i za O/C tip pTi. Preostali soj sa V tipom pTi (KFB 0185) formirao je posebnu grupu G. Grupi E pripadao je jedan soj poreklom iz Srbije (KFB 253) sa O/C-2 tipom pTi, i dva soja sa OL tipom pTi poreklom iz SAD (KFB 0204) i Australije (KFB 0206). Po tri soja poreklom iz Srbije pripadali su grupi J (KFB 264, KFB 265, KFB 266) i grupi L (KFB 250, KFB 251, KFB 252), od kojih je prva grupa posedovala O/C-2, a druga O/C-1 tip pTi. Grupa D sastojala se od dva soja poreklom iz Italije (KFB 0198, KFB 0199) sa O/C-1 tipom pTi, a grupa M od dva soja poreklom iz SAD (KFB 0203) i Mađarske (KFB 0205) sa N tipom pTi. Po jedan soj pripadao je grupi A (KFB 257), B (KFB 0192), i I (KFB 254), a svi oni su posedovali O/C-1 tip pTi. Grupi H pripadao je soj KFB 0202 sa O/C-2 tipom pTi, a grupi K nepatogeni soj KFB 0207. Filogenetskom analizom zasnovanom na podacima za svaki prajmer ponaosob, izdvojene su identične genetičke grupe (podaci nisu prikazani).

Na osnovu kombinovanih podataka za REP-, ERIC- i BOX-PCR, grupisanje sojeva bilo je istovetno kao kod RAPD prajmera, ali uz nešto različitu topologiju filogenetskog stabla (Tabela 14; Slika 18). Filogenetskom analizom baziranom na REP- i BOX-PCR metodama, takođe su diferencirane identične genetičke grupe (podaci nisu prikazani). Međutim, kod ERIC-PCR metode postojalo je izvesno odstupanje, gde soj KFB 257 nije formirao posebnu genetičku grupu, već je bio grupisan zajedno sa predstavnicima rep-PCR grupe D, odnosno RAPD grupe C (podaci nisu prikazani).

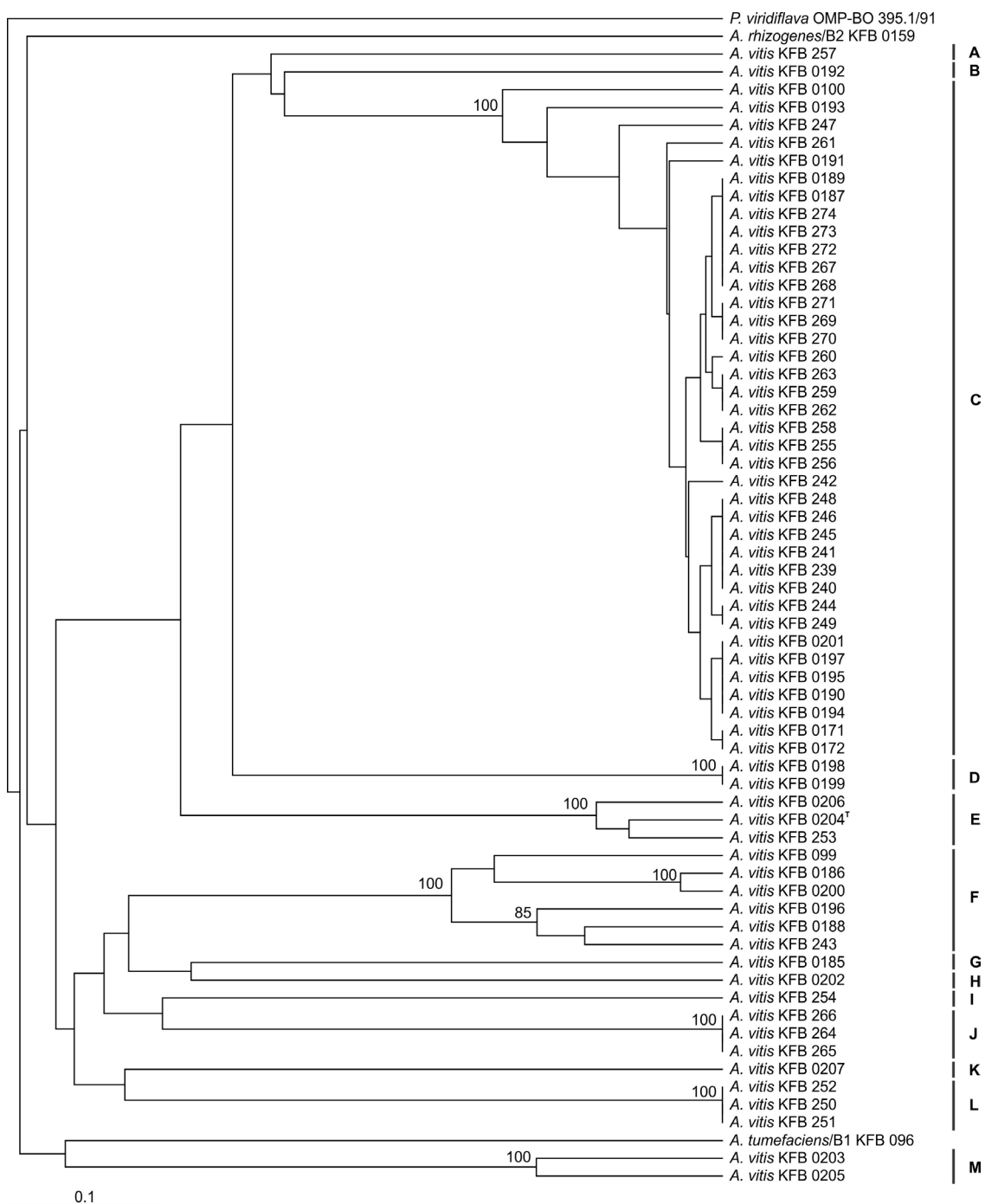


**Slika 15.** RAPD profili dobijeni korišćenjem A9 (A), A10 (B) i R13 (C) prajmera. Brojevi iznad traka odgovaraju šiframa proučavanih sojeva iz KFB kolekcije, osim oznake 395.1/91 koja se odnosi na kolekciju OMP-BO. M1, marker (1 kb DNA Ladder, Promega, Madison, WI, USA); M2, marker (100bp DNA Ladder, Promega, Madison, WI, USA).

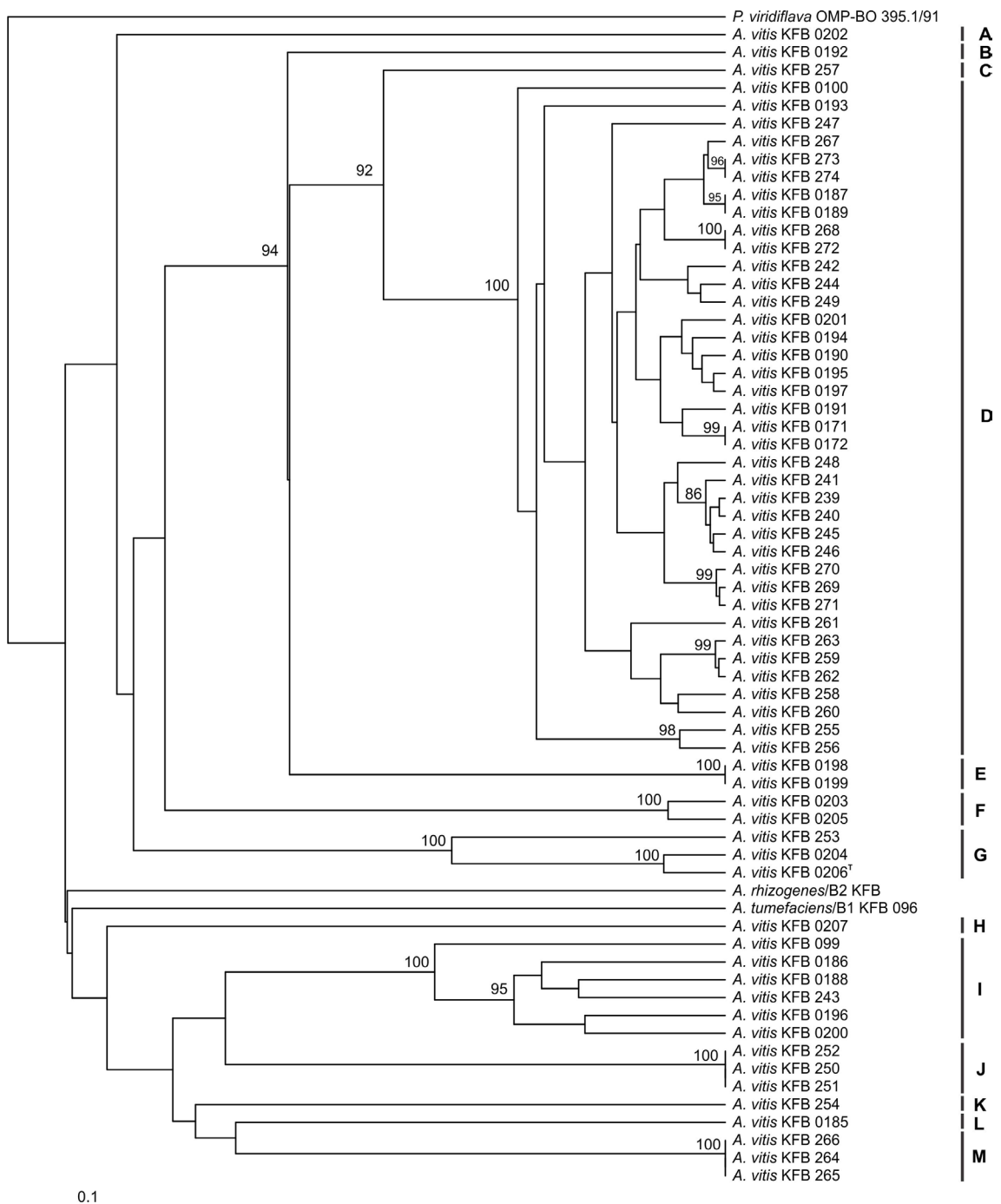


**Slika 16.** Rep-PCR profili dobijeni korišćenjem REP (A), ERIC (B) i BOX (C) prajmera. Brojevi iznad traka odgovaraju šiframa proučavanih sojeva iz KFB kolekcije, osim oznake 395.1/91 koja se odnosi na kolekciju OMP-BO. M1x, marker (O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder, Fermentas, Lithuania); M1, marker (1 kb DNA Ladder, Promega, Madison, WI, USA); traka M2, marker (100bp DNA Ladder, Promega, Madison, WI, USA).

Grupisanje sojeva na osnovu RAPD i rep-PCR metode uglavnom nije odgovaralo geografskom poreklu proučavanih sojeva. Međutim, pojedine genetičke grupe bile su sastavljene isključivo od sojeva istog geografskog porekla (Tabela 14). Sa druge strane, uočena je korelacija između genetičkih grupa i opin tipa pTi (Tabela 14).



**Slika 17.** Dendrogram konstruisan na osnovu RAPD profila proučavanih sojeva *A. vitis* i referentnih *Agrobacterium* spp. korišćenjem UPGMA metode. Soj *Pseudomonas viridiflava* uključen je u analizu kao vrsta koja nije srodna *Agrobacterium* spp. Uz čvorišta su naznačene “bootstrap” vrednosti veće od 85% (1000 ponavljanja).



**Slika 18.** Dendrogram konstruisan na osnovu rep-PCR profila proučavanih sojeva *A. vitis* i referentnih *Agrobacterium* spp. korišćenjem UPGMA metode. Soj *Pseudomonas viridiflava* uključen je u analizu kao vrsta koja nije srodna *Agrobacterium* spp. Uz čvorišta su naznačene “bootstrap” vrednosti veće od 85% (1000 ponavljanja).



**Tabela 14.** Genetičke grupe diferencirane na osnovu RAPD i rep-PCR analize sojeva *A.**vitis*

Soj	Geografsko poreklo	Godina izolacije <sup>a</sup>	Tip pTi <sup>b</sup>	RAPD	Rep-PCR
KFB 239, KFB 240, KFB 241	Vršac	2010.	O/C-1	C	D
KFB 242, KFB 244	Irig	2011.	O/C-1	C	D
KFB 243	Irig	2011.	V	F	I
KFB 245, KFB 246	Negotin	2011.	O/C-1	C	D
KFB 247, KFB 248	Vršac	2011.	O/C-1	C	D
KFB 249	Smederevo	2011.	O/C-1	C	D
KFB 250, KFB 251, KFB 252	Smederevo	2011.	O/C-1	L	J
KFB 253	Smederevo	2011.	O/C-2	E	G
KFB 254	Smederevo	2011.	O/C-1	I	K
KFB 255, KFB 256, KFB 258, KFB 259, KFB 260, KFB 261	Šabac	2011.	O/C-1	C	D
KFB 257	Šabac	2011.	O/C-1	A	C
KFB 262, KFB 263	Vladimirci	2011.	O/C-1	C	D
KFB 264, KFB 265, KFB 266	Vranje	2011.	O/C-2	J	M
KFB 267, KFB 268	Bujanovac	2011.	O/C-1	C	D
KFB 269, KFB 270, KFB 271	Vranje	2011.	O/C-1	C	D
KFB 272, KFB 273, KFB 274	Aleksandrovac	2011.	O/C-1	C	D
KFB 099	Mađarska	1981.	V	F	I
KFB 0100	Mađarska	1982.	OS	C	D
KFB 0171, KFB 0172	Poljska	2010.	O/C-1	C	D
KFB 0185	Italija	1984.	V	G	L
KFB 0186	Italija	2003.	V	F	I
KFB 0187	Italija	2003.	O/C-1	C	D
KFB 0188	Italija	2003.	O/C, V	F	I
KFB 0189	Moldavija	2004.	O/C-1	C	D
KFB 0190	Italija	2005.	O/C-1	C	D
KFB 0191	Crna Gora	2005.	O/C-1	C	D
KFB 0192	Italija	2006.	O/C-1	B	B
KFB 0193	Vršac, Srbija	2006.	O/C-2	C	D
KFB 0194	Vršac, Srbija	2006.	O/C-1	C	D
KFB 0195	Bugarska	2006.	O/C	C	D
KFB 0196	Bugarska	2006.	V	F	I
KFB 0197	Italija	2007.	O/C-1	C	D
KFB 0198	Italija	2007.	O/C-1	D	E
KFB 0199	Italija	2011.	O/C-1	D	E
KFB 0200	Italija	2011.	V	F	I
KFB 0201	Maroko	2011.	O/C-1	C	D
KFB 0202	Hrvatska	2006.	O/C-2	H	A
KFB 0203	SAD	1979.	N	M	F
KFB 0204	SAD	1984.	OL	E	G
KFB 0205	Mađarska	1982.	N	M	F
KFB 0206 <sup>T</sup>	Australija	1977.	OL	E	G
KFB 0207	Južna Afrika	/	NP	K	H

<sup>a</sup> /, nema podataka;<sup>c</sup> O/C-1, O/C tip pTi kod koga nije došlo do specifičnog umnožavanja sa *ipt* i *tms2* prajmerima; O/C-2, O/C tip pTi kod koga je došlo do specifičnog umnožavanja sa *ipt* i *tms2* prajmerima; OL, oktopin/kukumopin tip pTi sa kompletnim TA-DNK regionom; OS, O/C tip pTi sa skraćenim TA-DNK regionom N, nopalin tip; V, vitopin tip; NP, nepatogeni soj (bez pTi ili pRi).

## 5.7.2 Analiza konstitutivnih gena

Analizirano je ukupno 22 reprezentativna soja *A. vitis*, predstavnika glavnih genetičkih grupa diferenciranih na osnovu rep-PCR i RAPD metode. Nakon poravnanja sekvenci *dnaK* (537 bp), *gyrB* (539 bp) i *recA* (564 bp) genskih lokusa nisu detektovane praznine ili insercije. Rezultati analize diverziteta među nukleotidnim sekvencama za pojedinačne genske lokuse, kao i za kombinaciju sva tri proučavana lokusa predstavljeni su u Tabeli 15. Posebno su predstavljeni rezultati za sve proučavane sojeve *A. vitis* poreklom iz Srbije i one poreklom iz inostranstva. Vrednosti indeksa diverziteta ukazuju da je nukleotidni polimorfizam unutar proučavane populacije najveći za *recA* lokus, zatim sledi *dnaK* lokus, dok je najmanji stepen diverziteta u slučaju *gyrB* gena. Procenat polimorfniha mesta iznosio je 9,31, 9,83, 12,41 i 10,55, redom za *dnaK*, *gyrB*, *recA* i kombinovanu sekvencu. Broj različitih alela za *dnaK* genski lokus iznosio je 10, dok je za *gyrB* i *recA* iznosio 11. Ukoliko se posmatra kombinovana sekvencu sva tri genska lokusa (1640 bp), broj različitih tipova sekvenci među svim proučavanim *A. vitis* sojevima iznosio je 12, kod sojeva poreklom iz Srbije 6, a kod onih iz međunarodnih kolekcija 9. Osam tipova sekvenci bilo je predstavljeno pojedinačnim sojem, dok su ostali bili predstavljeni sa 2-6 sojeva (Tabela 16). Najbrojniji je bio tip sekvence 1, predstavljen sa 6 sojeva.

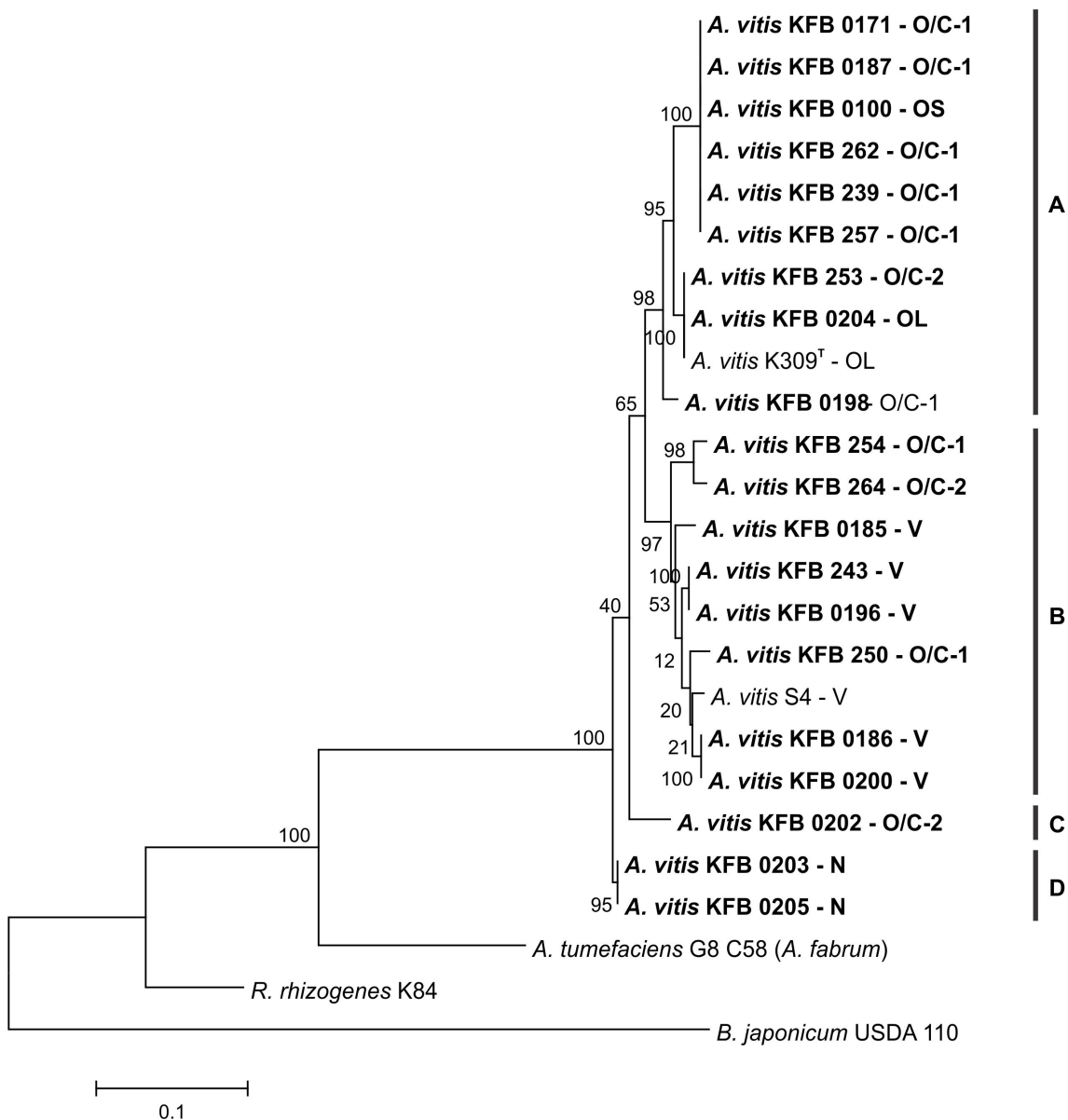
**Tabela 15.** Analiza diverziteta nukleotidnih sekvenci proučavanih sojeva *A. vitis*

Kategorija	Genski lokus	Broj analiziranih sekvenci	Broj različitih haplotipova	Dužina sekvence	% GC	Broj (%) polimorfniha mesta	Indeks diverziteta ( $\pi$ )
Svi proučavani sojevi <i>A. vitis</i>	<i>dnaK</i>	22	10	537 bp	58,0	50 (9,31)	0,03224
	<i>gyrB</i>	22	11	539 bp	59,2	53 (9,83)	0,03018
	<i>recA</i>	22	11	564 bp	56,3	70 (12,41)	0,04169
	Svi	22	12	1640 bp	57,8	173 (10,55)	0,03481
Sojevi poreklom iz Srbije	<i>dnaK</i>	8	5	537 bp	58,0	38 (7,08)	0,03252
	<i>gyrB</i>	8	6	539 bp	59,0	36 (6,68)	0,02968
	<i>recA</i>	8	6	564 bp	56,1	49 (8,69)	0,04173
	Svi	8	6	1640 bp	57,7	123 (7,5)	0,03476
Sojevi poreklom iz međunarodnih kolekcija	<i>dnaK</i>	14	8	537 bp	58,0	46 (8,57)	0,03180
	<i>gyrB</i>	14	8	539 bp	59,3	46 (8,53)	0,03083
	<i>recA</i>	14	8	564 bp	56,3	65 (11,52)	0,04341
	Svi	14	9	1640 bp	57,9	157 (9,57)	0,03547

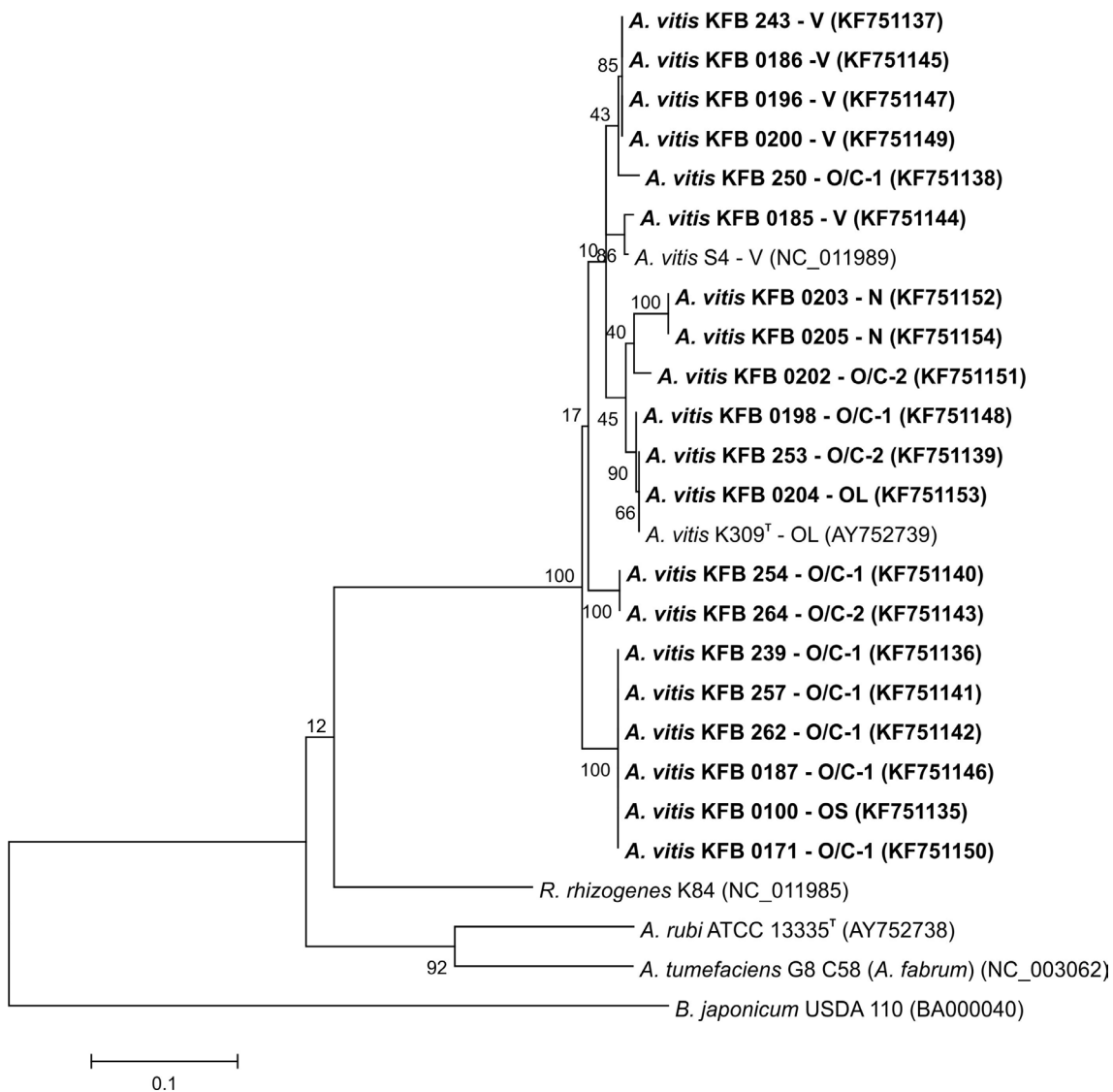
Procenat sličnosti između sekvenci proučavanih *A. vitis* sojeva kretao se u granicama 94,6-100 (*dnaK*), 95-100 (*gyrB*), 92,1-100 (*recA*) i 93,9-100 (*dnaK-gyrB-recA*). Filogenetska stabla dobijena NJ i ML metodom posedovala su slične topologije, te su prikazana samo ML filogenetska stabla za pojedinačne sekvence *dnaK*, *gyrB* i *recA* gena, kao i za njihovu kombinaciju (Slika 19; 20; 21; 22). Sojevi *A. vitis* činili su jasno izdvojenu grupu u odnosu na ostale *Agrobacterium* sp. koji su bili predmet filogenetske analize (Slika 19; 20; 21; 22). Međutim, filogenetska stabla (*dnaK*, *gyrB*, *recA*, *dnaK-gyrB-recA*) nisu bila saglasna među sobom. Na osnovu kombinovane sekvence *dnaK*, *gyrB* i *recA* gena i pojedinačnog *recA* genskog lokusa izdvojene su identične genetičke grupe (Slika 19; 22). U slučaju *dnaK* i *gyrB* genskih lokusa grupisanje sojeva bilo je nešto drugačije (Slika 20; 21). Ipak, filogenija zasnovana na kombinovanim sekvencama *dnaK*, *gyrB* i *recA*, zbog većeg broja genetičkih informacija, uzeta je kao referentna.

Na filogenetskom stablu (*recA-dnaK-gyrB*) razlikovale su se 4 genetičke grupe: A, B, C i D (Slika 19). Grupa A bila je najbrojnija i sastojala se isključivo od sojeva sa O/C tipom pTi, koji su vodili poreklo iz Srbije (KFB 239, KFB 253, KFB 257, KFB 262), Italije (KFB 0187, KFB 0197), Poljske (KFB 0171), Mađarske (KFB 0100), SAD (KFB 0204) i Australije (K309/KFB 0206). Grupa B (9 sojeva) sastojala se uglavnom iz sojeva sa V tipom pTi, poreklom iz Srbije (KFB 243), Italije (KFB 0185, KFB 0186, KFB 0200), Bugarske (KFB 0196) i Mađarske (S4), ali i sojeva sa O/C tipom pTi poreklom iz Srbije (KFB 250, KFB 254, KFB 264). Jedini predstavnik grupe C bio je soj sa O/C tipom pTi, poreklom iz Hrvatske (KFB 0202). Dva soja sa N tipom pTi poreklom iz SAD (KFB 0203) i Mađarske (KFB 0205), bili su jedini predstavnici genetičke grupe D.

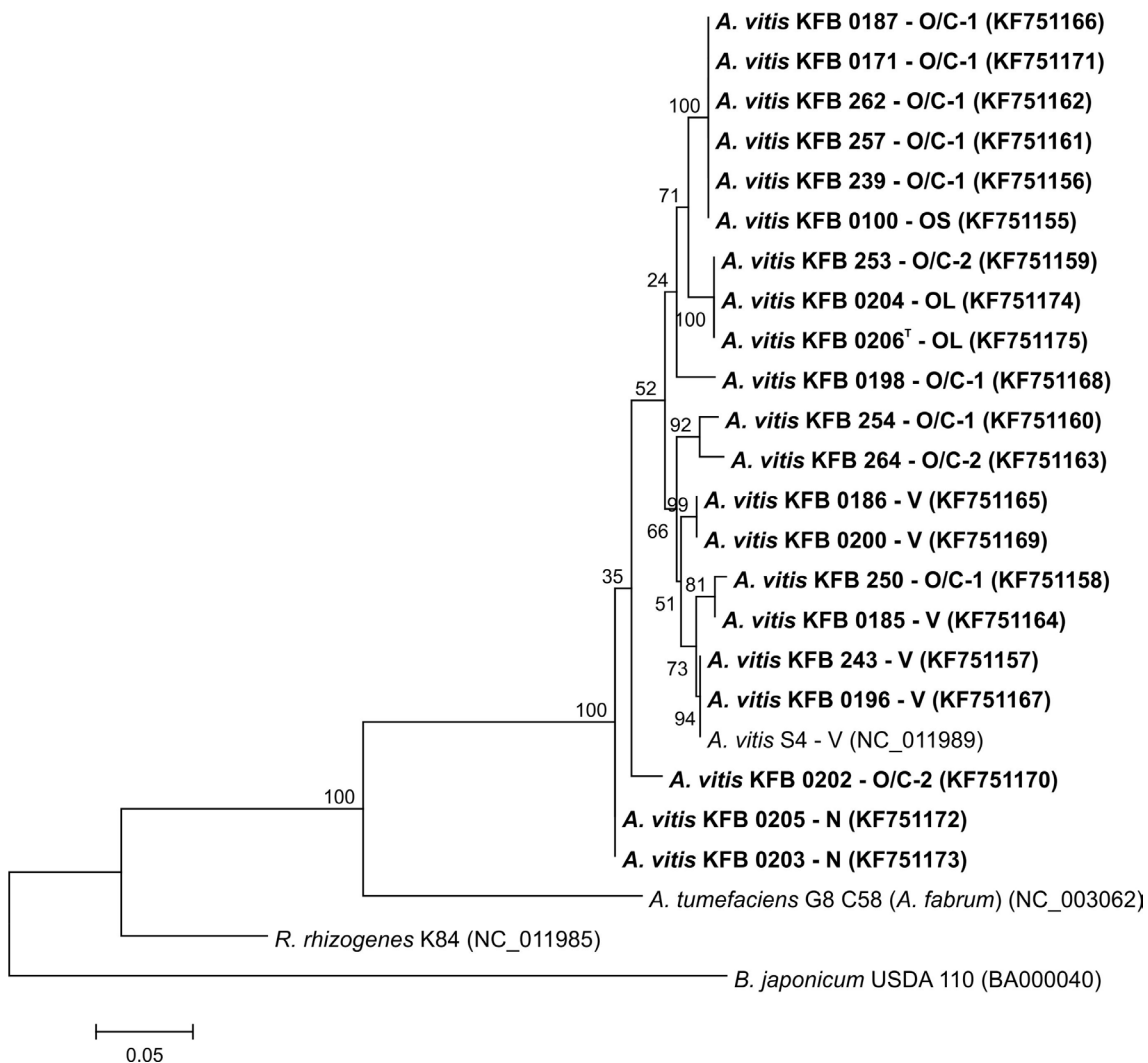
Filogenetsko stablo konstruisano na osnovu sekvence *dnaK* genskog lokusa imalo je drugačiju topologiju, što je bilo posebno izraženo kod sojeva predstavnika gore definisanih genetičkih grupa A i B, koji su u ovom slučaju bili drugačije grupisani (Slika 20). *gyrB* filogenetsko stablo posedovalo je gotovo identičnu topologiju kao kod kombinovane sekvence (*recA-dnaK-gyrB*), ali genetičke grupe A, B, C i D nisu bile podržane visokim “bootstrap” vrednostima (Slika 21). U slučaju *recA* filogenetskog stabla, gore definisane genetičke grupe A, B, C i D bile su jasno izdvojene i imale su visoke “bootstrap” vrednosti (98-100), ali je njihov raspored na filogenetskom stablu bio nešto drugačiji (Slika 22).



**Slika 19.** Dendrogram konstruisan na osnovu kombinovanih parcijalnih sekvenci (1640 bp) *dnaK*, *gyrB* i *recA* gena korišćenjem ML metode. Uz čvorišta su naznačene “bootstrap” vrednosti (1000 ponavljanja). Dužina grana odgovara stopi supstitucija baznih parova. Sojevi proučavani u ovom radu označeni su podebljano. Pored imena vrste i oznake soja, naveden je i tip pTi. Filogenetsko stablo ukorenjeno je korišćenjem sekvenci soja *B. japonicum* USDA 110.

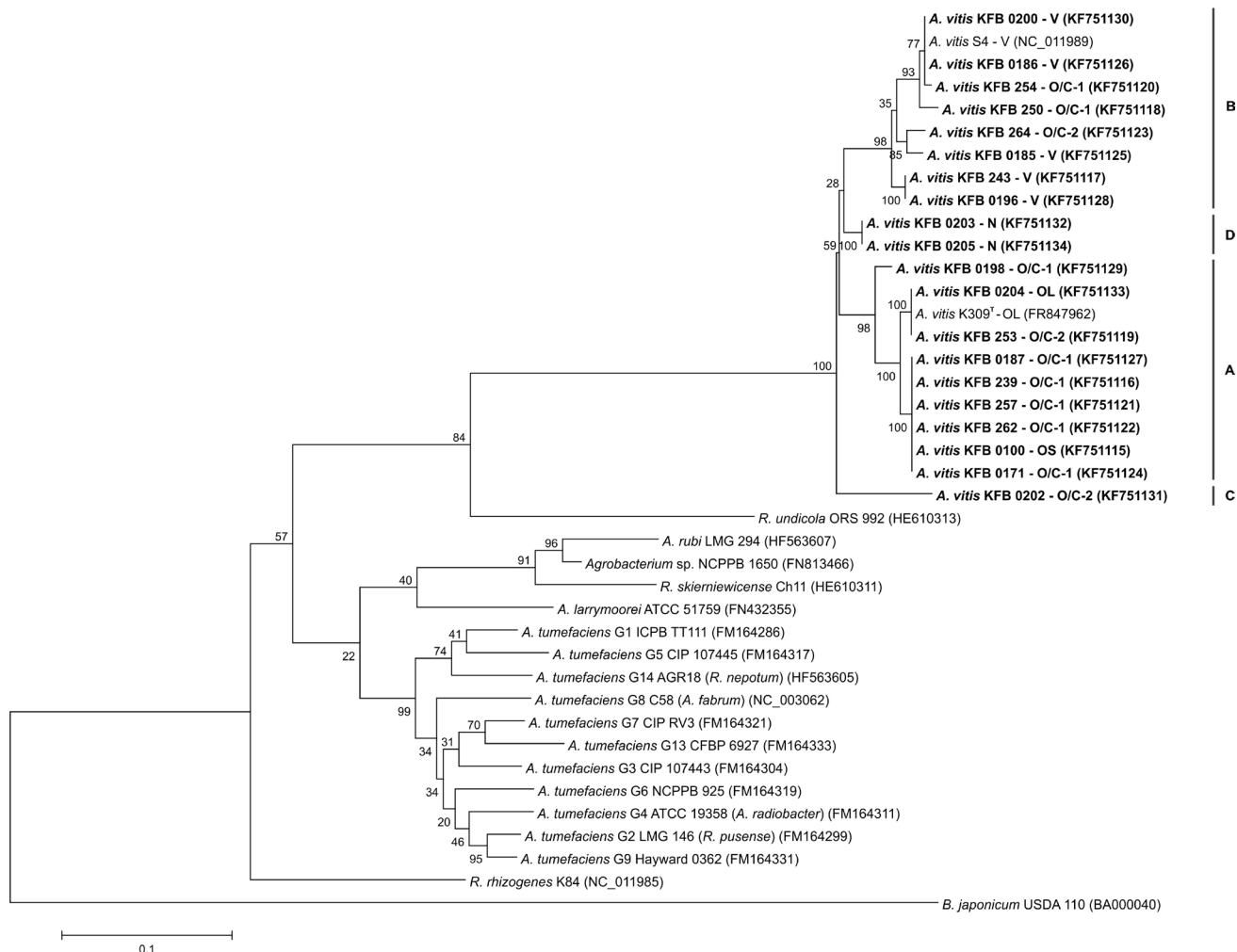


**Slika 20.** Dendrogram konstruisan na osnovu parcijalne sekvence (537 bp) *dnaK* gena korišćenjem ML metode. Uz čvorišta su naznačene “bootstrap” vrednosti (1000 ponavljanja). Dužina grana odgovara stopi supstitucija baznih parova. Sojevi proučavani u ovom radu označeni su podebljano. Pored imena vrste i oznake soja, naveden je i tip pTi. Pristupni brojevi navedeni su u zagradi. Filogenetsko stablo ukorenjeno je korišćenjem sekvenci soja *B. japonicum* USDA 110.



**Slika 21.** Dendrogram konstruisan na osnovu parcijalne sekvence (539 bp) *gyrB* gena korišćenjem ML metode. Uz čvorišta su naznačene “bootstrap” vrednosti (100 ponavljanja). Dužina grana odgovara stopi supstitucija baznih parova. Sojevi proučavani u ovom radu označeni su podebljano. Pored imena vrste i oznake soja, naveden je i tip pTi. Pristupni brojevi navedeni su u zagradi. Filogenetsko stablo ukorenjeno je korišćenjem sekvenci soja *B. japonicum* USDA 110.

U ovom radu nije uočena korelacija između geografskog porekla sojeva i genetičkih grupa određenih na osnovu parcijalnih nukleotidnih sekvenci *dnaK*, *gyrB* i *recA* gena. Takođe, potpuna korelacija nije uočena ni između genetičkih grupa i opina tipa pTi. Iako su genetičke grupe A, C i D bile sastavljene iz sojeva koji su posedovali O/C ili N tip pTi, grupi B pripadali su sojevi kako sa O/C, tako i sa V tipom pTi.



**Slika 22.** Dendrogram konstruisan na osnovu parcijalne sekvence (564 bp) *recA* gena korišćenjem ML metode. Uz čvorišta su naznačene “bootstrap” vrednosti (1000 ponavljanja). Dužina grana odgovara stopi supstitucija baznih parova. Sojevi proučavani u ovom radu označeni su podebljano. Pored imena vrste i oznake soja, naveden je i tip pTi. Pristupni brojevi navedeni su u zagradi. Filogenetsko stablo ukorenjeno je korišćenjem sekvenci soja *B. japonicum* USDA 110.

**Tabela 16.** Alelni profili, genetičke grupe i pristupni brojevi sojeva *A. vitis* korišćenih u filogenetskoj analizi

Soj	Geografsko poreklo	Godina izolacije	Tip Ti plazmida <sup>a</sup>	Tip sekvence	Alelni profil			Genetička grupa ( <i>dnaK-gyrB-recA</i> )	Pristupni broj <sup>b</sup>		
					<i>recA</i>	<i>dnaK</i>	<i>gyrB</i>		<i>dnaK</i>	<i>gyrB</i>	<i>recA</i>
KFB 239	Vršac	2010.	O/C-1	1	1	1	1	A	KF751136	KF751156	KF751116
KFB 243	Irig	2011.	V	2	2	2	2	B	KF751137	KF751157	KF751117
KFB 250	Smederevo	2011.	O/C-1	3	3	3	3	B	KF751138	KF751158	KF751118
KFB 253	Smederevo	2011.	O/C-2	4	4	4	4	A	KF751139	KF751159	KF751119
KFB 254	Smederevo	2011.	O/C-1	5	5	5	5	B	KF751140	KF751160	KF751120
KFB 257	Šabac	2011.	O/C-1	1	1	1	1	A	KF751141	KF751161	KF751121
KFB 262	Vladimirci	2011.	O/C-1	1	1	1	1	A	KF751142	KF751162	KF751122
KFB 264	Vranje	2011.	O/C-2	6	5	6	6	B	KF751143	KF751163	KF751123
KFB 099 (S4)	Mađarska	1981.	V	7	6	2	7	B	NC_011989 <sup>b</sup>	NC_011989 <sup>b</sup>	NC_011989 <sup>b</sup>
KFB 0100	Mađarska	1982.	OS	1	1	1	1	A	KF751135	KF751155	KF751115
KFB 0171	Poljska	2010.	O/C-1	1	1	1	1	A	KF751150	KF751171	KF751124
KFB 0185	Italija	1984.	V	8	7	7	8	B	KF751144	KF751164	KF751125
KFB 0186	Italija	2003.	V	9	2	8	7	B	KF751145	KF751165	KF751126
KFB 0187	Italija	2003.	O/C-1	1	1	1	1	A	KF751146	KF751166	KF751127
KFB 0196	Bugarska	2006.	V	2	2	2	2	B	KF751147	KF751167	KF751128
KFB 0198	Italija	2007.	O/C-1	10	8	9	9	A	KF751148	KF751168	KF751129
KFB 0200	Italija	2011.	V	9	2	8	7	B	KF751149	KF751169	KF751130
KFB 0202	Hrvatska	2006.	O/C-2	11	9	10	10	C	KF751151	KF751170	KF751131
KFB 0203	SAD	1979.	N	12	10	11	11	D	KF751152	KF751173	KF751132
KFB 0204	SAD	1984.	OL	4	4	4	4	A	KF751153	KF751174	KF751133
KFB 0205	Mađarska	1982.	N	12	10	11	11	D	KF751154	KF751172	KF751134
KFB 0206 <sup>T</sup> (K309 <sup>T</sup> )	Australija	1977.	OL	4	4	4	4	A	AY752739 <sup>b</sup>	KF751175	FR847962 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> O/C-1, O/C tip pTi kod koga nije došlo do specifičnog umnožavanja sa *ipt* i *tms2* prajmerima; O/C-2, O/C tip pTi kod koga je došlo do specifičnog umnožavanja sa *ipt* i *tms2* prajmerima; OL, oktopin/kukumopin tip pTi sa kompletnim TA-DNK regionom; OS, O/C tip pTi sa skraćenim TA-DNK regionom N, nopalin tip; V, vitopin tip;

<sup>b</sup> Pristupni brojevi objavljeni u drugim studijama.

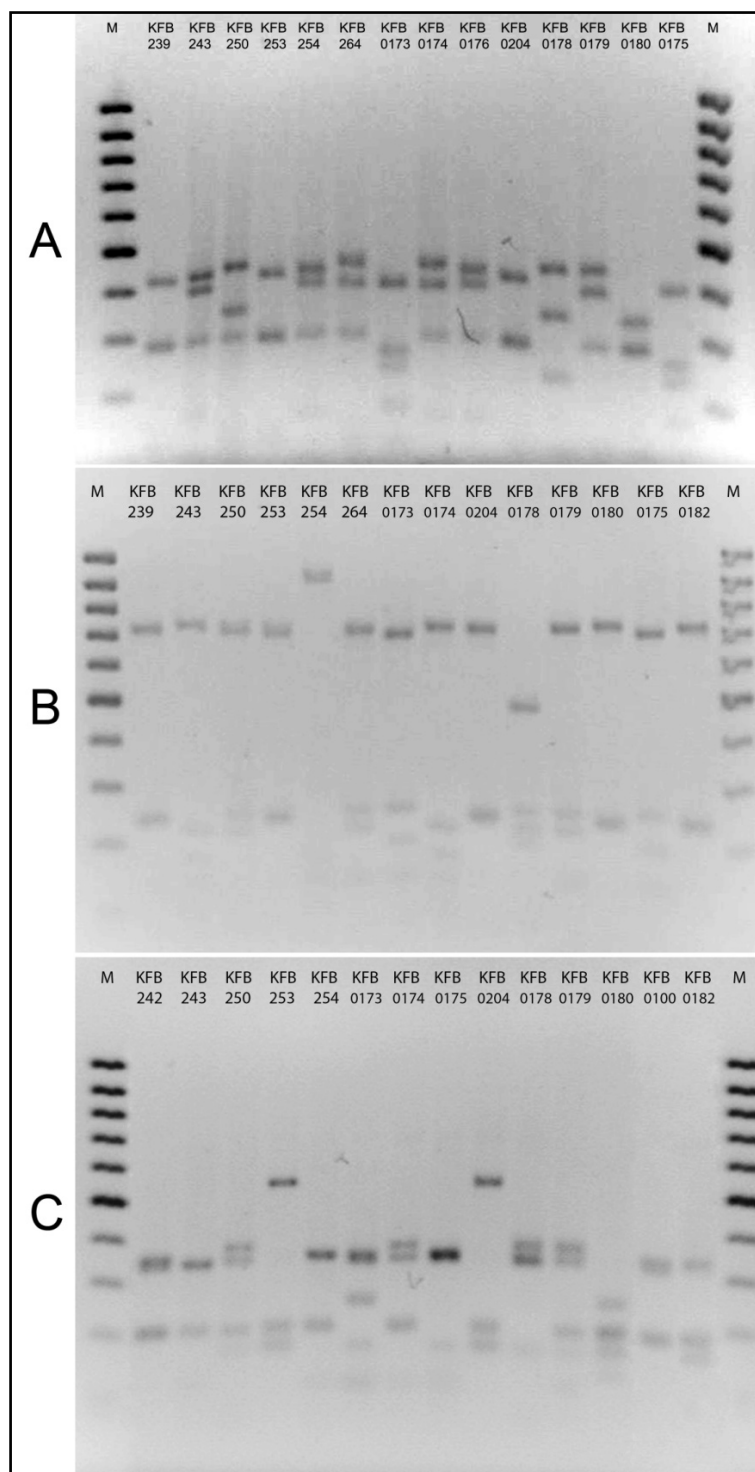


### 5.7.3 Analiza 16S-23S rRNK ITS regiona

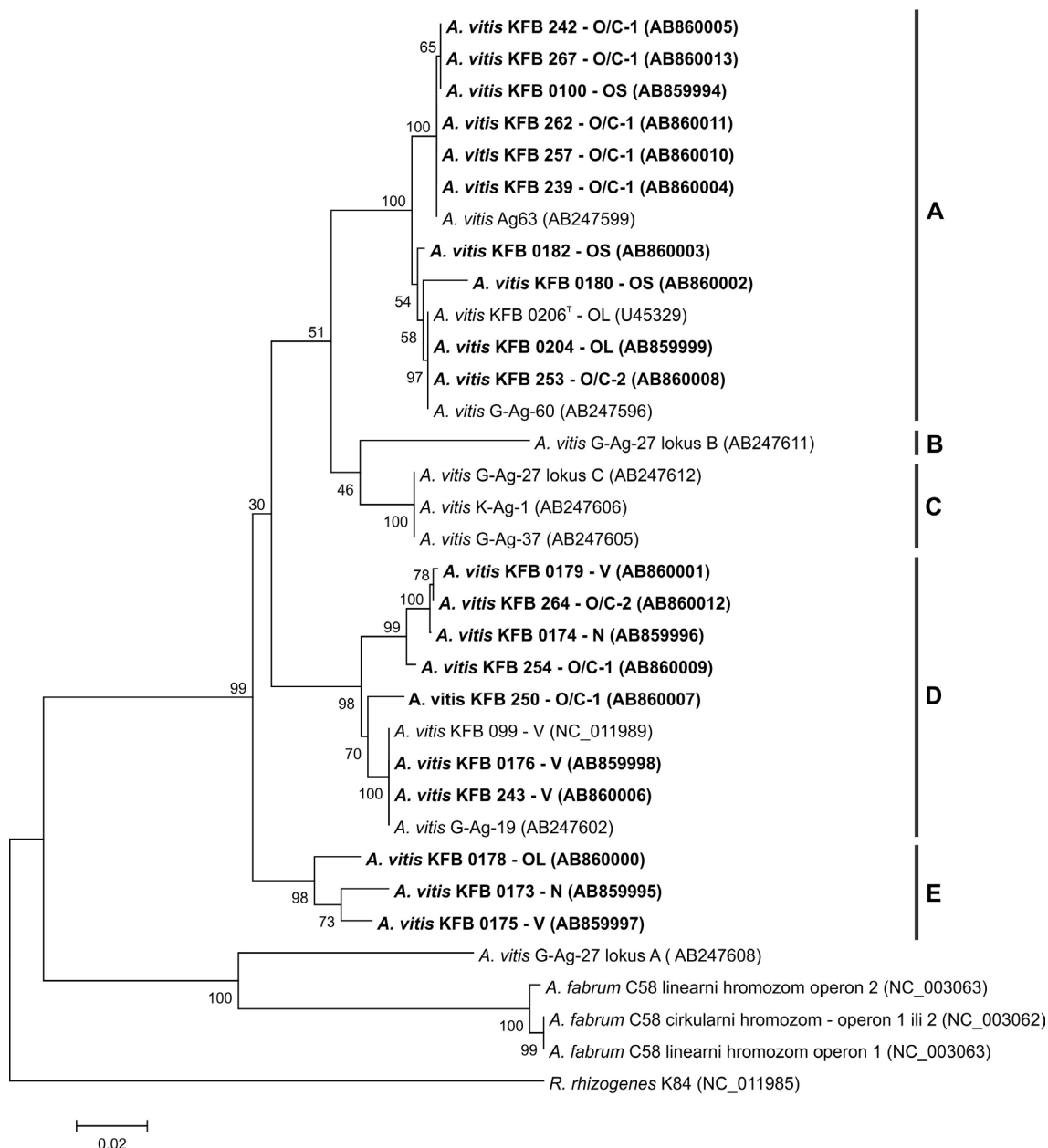
Prajmerima FGPS1490-72/FGPL132' umnoženi su fragmenti 16S-23S rRNK ITS regiona, čija je veličina varirala u zavisnosti od proučavanog soja. RFLP analizom umnoženih fragmenata ustanovljeno je ukupno 12 različitih grupa među 36 proučavanih sojeva *A. vitis* poreklom iz naše zemlje i 12 iz inostranstva (Tabela 17, Slika 23). Većina sojeva poreklom iz Srbije, ukupno 21, i jedan iz SAD, pripadalo je RFLP grupi 1. RFLP grupe 1, 2, 3, 5 i 7 bile su heterogene po pitanju geografskog porekla, odnosno sastavljene iz sojeva poreklom kako iz Srbije, tako i iz inostranstva. Sa druge strane, preostale RFLP grupe bile su sastavljene samo od sojeva poreklom iz Srbije (RFLP grupe 4 i 6) ili samo iz inostranstva (RFLP grupe 8, 9, 10, 11 i 12). Svaka od grupa bila je sastavljena od sojeva koji su posedovali samo jedan opin tip pTi. Restrikcionim enzimima *BsuRI* i *TaqI* diferencirano je ukupno 6 i 8 grupa ponaosob, dok je nešto veći stepen diferencijacije bio u slučaju *HhaI* restrikcionog enzima, kojim je ustanovljeno 9 različitih grupa (Tabela 17; Slika 23).

Sekvencionom analizom 16S-23S rRNK ITS regiona obuhvaćeno je ukupno 20 sojeva, bar po jedan predstavnik iz svake RFLP grupe i ovi sojevi su naznačeni u Tabeli 17. Dobijeni hromatogrami nisu ukazivali na postojanje polimorfizma među ITS regionima unutar pojedinačnih sojeva. Obradom i poravnanjem sekvenci izdvojeni su unutrašnji fragmenti 16S-23S rRNK ITS regiona koji su korišćeni za dalju analizu i dostavljeni banci gena pod pristupnim brojevima navedenim u Tabeli 17. Veličina ovih fragmenata razlikovala se u zavisnosti od proučavanog soja i kretala se 1094-1249 bp (Tabela 17). Unutar ovih fragmenata, po pravilu, nalazili su se tRNK<sup>Ile</sup> i tRNK<sup>Ala</sup> geni. Nukleotidna sekvenca tRNK gena bila je identična kod svih proučavanih sojeva.

Procenat sličnosti između sekvenci 16S-23S rRNK ITS regiona proučavanih *A. vitis* sojeva kretala se u granicama 89,82-100. Na filogenetskom stablu, sojevi *A. vitis* formirali su pet filogenetskih grupa (Slika 24). Grupa A sastojala se od sojeva poreklom iz Srbije, Australije, Mađarske i SAD, koji su isključivo posedovali O/C pTi. Ovoj grupi



**Slika 23.** RFLP profili amplifikovanih fragmenata 16S-23S rRNK ITS regiona kod proučavanih *A. vitis* sojeva, dobijeni korišćenjem *TaqI* (A), *BsuRI* (B) i *HhaI* (C) restrikcionih enzima. Traka M, marker (MassRuler LowRange DNA Ladder, Fermentas, Lithuania)



**Slika 24.** Dendrogram konstruisan na osnovu parcijalne sekvence 16S-23S rRNK ITS regiona korišćenjem NJ metode. Uz čvorišta su naznačene “bootstrap” vrednosti (1000 ponavljanja). Dužina grana odgovara stopi supstitucija baznih parova. Sojevi proučavani u ovom radu označeni su podebljano. Pored imena vrste i oznake soja, naveden je i tip pTi. Pristupni brojevi navedeni su u zagradi. Filogenetsko stablo ukorenjeno je korišćenjem sekvenci soja *R. rhizogenes* K84.

pripadali su takođe i soj Ag63 i G-Ag-60 čije su sekvence preuzete iz banke gena i za koje nema podataka o opin tipu pTi. Grupi B pripadao je jedino soj G-Ag-27 (lokus B) poreklom iz Japana. Sojevi G-Ag-27 (lokus C), K-Ag-1 i G-Ag-37 poreklom iz Japana činili su filogenetsku grupu C koja se odlikovala identičnim sekvencama. Filogenetskoj grupi D pripadali su sojevi iz Srbije, Japana, Mađarske i SAD, a bili su zastupljeni svi opin tipovi pTi (O/C, N i V). Unutar grupe D izdvojila su se dva klastera sastavljena od sojeva čije su ITS sekvence ispoljile visok procenat identiteta ili su bile u potpunosti identične. Prvom klasteru pripadali su sojevi KFB 264 poreklom iz Srbije sa O/C pTi, kao i KFB 0174 i KFB 0179 poreklom iz SAD, koji su redom posedovali N i V pTi. Drugi klaster formirala su četiri soja poreklom iz Srbije (KFB 243), Japana (G-Ag-19), Mađarske (KFB 099) i SAD (KFB 0176), od kojih je tri posedovalo V pTi, dok za soj iz Japana nije bilo podataka o opin tipu pTi (Slika 24). Filogenetska grupa E sastojala se od tri soja poreklom iz SAD, među kojima su bila zastupljena sva tri opin tipa pTi.

Korelacija između pojedinih grupa i geografskog porekla sojeva nije uočena, ako se izuzme da su grupe B i C pripadali samo sojevi poreklom iz Japana, a filogenetskoj grupi E sojevi poreklom iz SAD. Takođe, korelacija nije uočena ni između specifičnog ITS genotipa i opin tipa pTi. Međutim u slučaju grupe A i posebnog klastera vitopin sojeva unutar grupe D, postojala je povezanost između određenog ITS genotipa i opin tipa pTi.

**Tabela 17.** RFLP i sekvenciona analiza 16S-23S ITS regiona sojeva *A. vitis*

Soj <sup>a</sup>	Geografsko poreklo	Godina izolacije	Tip Ti plazmida <sup>b</sup>	RFLP profil ITS regiona			RFLP grupa (ITS)	Dužina sekvenci <sup>c</sup>	Pristupni broj u banci gena <sup>c</sup>
				<i>TaqI</i>	<i>BsuRI</i>	<i>HhaI</i>			
<b>KFB 239</b> , KFB 240, KFB 241	Vršac	2010.	O/C-1	1	1	1	1	1094 bp	AB860004
<b>KFB 242</b> , KFB 244	Irig	2011.	O/C-1	1	1	2	2	1094 bp	AB860005
<b>KFB 243</b>	Irig	2011.	V	2	2	2	3	1237 bp	AB860006
KFB 245, KFB 246	Negotin	2011.	O/C-1	1	1	1	1	/	/
KFB 247, KFB 248	Vršac	2011.	O/C-1	1	1	1	1	/	/
KFB 249	Smederevo	2011.	O/C-1	1	1	2	2	/	/
<b>KFB 250</b> , KFB 251, KFB 252	Smederevo	2011.	O/C-1	3	3	3	4	1189 bp	AB860007
<b>KFB 253</b>	Smederevo	2011.	O/C-2	1	1	4	5	1094 bp	AB860008
<b>KFB 254</b>	Smederevo	2011.	O/C-1	2	4	2	6	1230 bp	AB860009
KFB 255, KFB 256, <b>KFB 257</b> , KFB 258, KFB 259, KFB 260, KFB 261	Šabac	2011.	O/C-1	1	1	1	1	1094 bp	AB860010
<b>KFB 262</b> , KFB 263	Vladimirci	2011.	O/C-1	1	1	1	1	1094 bp	AB860011
<b>KFB 264</b> , KFB 265, KFB 266	Vranje	2011.	O/C-2	4	3	3	7	1249 bp	AB860012
<b>KFB 267</b> , KFB 268	Bujanovac	2011.	O/C-1	1	1	2	2	1094 bp	AB860013
KFB 269, KFB 270, KFB 271	Vranje	2011.	O/C-1	1	1	1	1	/	/
KFB 272	Aleksandrovac	2011.	O/C-1	1	1	2	2	/	/
KFB 273, KFB 274	Aleksandrovac	2011.	O/C-1	1	1	1	1	/	/
<b>KFB 0173</b>	SAD	1979.	N	5	5	5	8	1180 bp	AB859995
<b>KFB 0174</b>	SAD	1979.	N	6	2	6	9	1249 bp	AB859996
<b>KFB 0175</b>	SAD	1981.	V	5	5	7	10	1174 bp	AB859997
<b>KFB 0176</b>	SAD	1983.	V	2	2	2	3	1237 bp	AB859998
<b>KFB 0204</b>	SAD	1984.	OL	1	1	4	5	1094 bp	AB859999
<b>KFB 0178</b>	SAD	1985.	OL	7	6	8	11	1142 bp	AB860000
<b>KFB 0179</b>	SAD	1981.	V	4	3	3	7	1249 bp	AB860001
<b>KFB 0180</b>	SAD	1984.	OS	8	1	9	12	1125 bp	AB860002
<b>KFB 0182</b>	SAD	1986.	OS	1	1	1	1	1094 bp	AB860003
<b>KFB 0100</b>	Mađarska	1982.	OS	1	1	2	2	1094 bp	AB859994
KFB 099	Mađarska	1981.	V	2	2	2	3	1237 bp	NC_011989
KFB 0206	Australija	1977.	OL	1	1	4	5	1095 bp	U45329

<sup>a</sup> Sojevi kod kojih je sekvenciran 16S-23S rRNK ITS region u ovom radu obeleženi su podebljano;

<sup>b</sup> O/C-1, O/C tip pTi kod koga nije došlo do specifičnog umnožavanja sa *ipt* i *tms2* prajmerima; O/C-2, O/C tip pTi kod koga je došlo do specifičnog umnožavanja sa *ipt* i *tms2* prajmerima; OL, oktopin/kukumopin tip pTi sa kompletnim TA-DNK regionom; OS, O/C tip pTi sa skraćenim TA-DNK regionom N, nopalin tip; V, vitopin tip;

<sup>c</sup> Odnosi se na sojeve kod kojih je sekvenciran 16S-23S rRNK ITS region. Predstavljena je dužina sekvenci nakon obrade i poravnanja.

## 5.8 Osetljivost prema antagonističkom soju KFB 0207 (F2/5)

U ovom radu utvrđene su razlike u inhibitornom uticaju antagonističkog soja KFB 0207 (F2/5), prema proučavanim sojevima *A. vitis* poreklom iz Srbije. Sojevi KFB 250 i KFB 253 bili su osetljivi prema antagonističkom soju, i izmerena je zona inhibicije 3-5 mm (Tabela 18; Slika 25). Kod sojeva KFB 243, KFB 257, KFB 262 i KFB 267 nije došlo do potpune inhibicije razvoja testiranog soja (Tabela 18; Slika 25). Sa druge strane, sojevi KFB 239, KFB 242, KFB 254 i KFB 263 bili su potpuno neosetljivi prema uticaju antagonističkog soja (Tabela 18). Zona inhibicije kod kontrolnog soja *A. vitis* KFB 0206 (K+) iznosila je 3 mm, dok je soj *A. tumefaciens*/biovar 1 KFB 096 (K-) bio neosetljiv (Tabela 18; Slika 25).

**Tabela 18.** Osetljivost proučavanih sojeva prema antagonističkom soju KFB 0207 (F2/5)

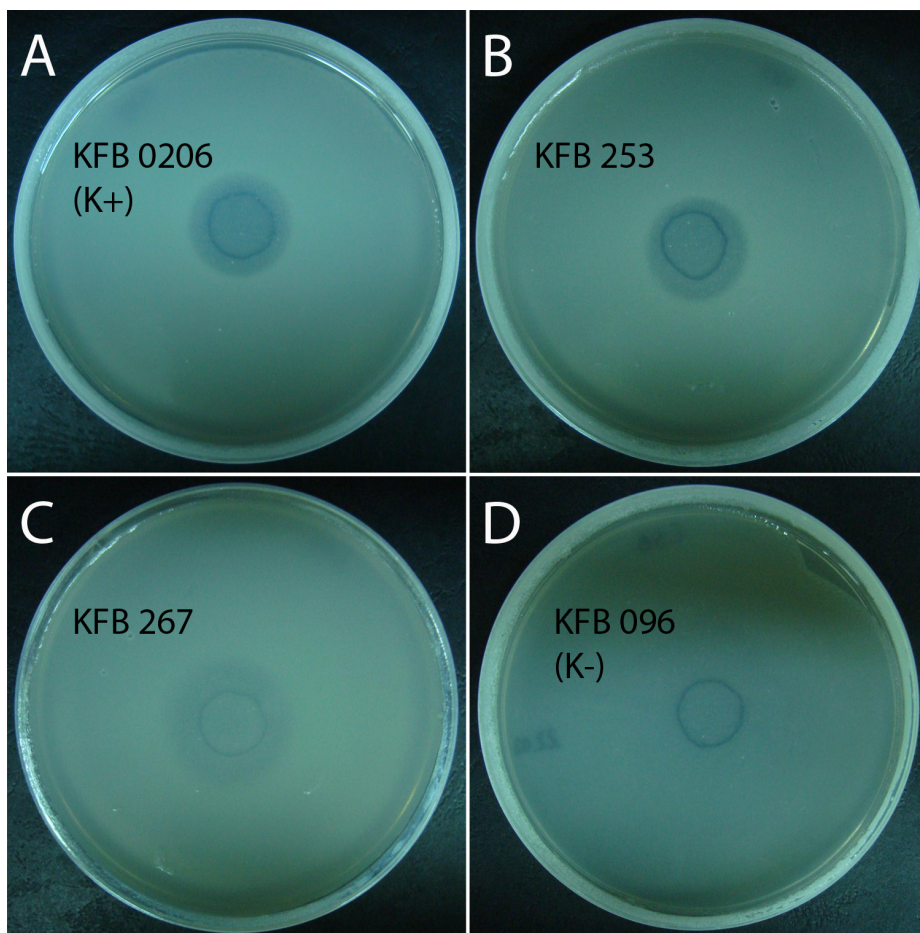
Soj	Vrsta <sup>a</sup>	Geografsko poreklo	Godina izolacije	Tip Ti plazmida <sup>b</sup>	Prečnik zone inhibicije (mm) <sup>c</sup>
<b>KFB 239</b>	<i>A. vitis</i>	Vršac	2010.	O/C-1	0
<b>KFB 242</b>	<i>A. vitis</i>	Irig	2011.	O/C-1	0
<b>KFB 243</b>	<i>A. vitis</i>	Irig	2011.	V	3 <sup>d</sup>
<b>KFB 250</b>	<i>A. vitis</i>	Smederevo	2011.	O/C-1	5
<b>KFB 253</b>	<i>A. vitis</i>	Smederevo	2011.	O/C-2	3
<b>KFB 254</b>	<i>A. vitis</i>	Smederevo	2011.	O/C-1	0
<b>KFB 257</b>	<i>A. vitis</i>	Šabac	2011.	O/C-1	3 <sup>d</sup>
<b>KFB 262</b>	<i>A. vitis</i>	Vladimirci	2011.	O/C-1	3 <sup>d</sup>
<b>KFB 264</b>	<i>A. vitis</i>	Vranje	2011.	O/C-2	0
<b>KFB 267</b>	<i>A. vitis</i>	Bujanovac	2011.	O/C-1	3 <sup>d</sup>
KFB 0206	<i>A. vitis</i>	Australija	1977.	OL	3
KFB 096	At/B1	SAD	1958.	N	0

<sup>a</sup> At/B1, *A. tumefaciens*/biovar 1;

<sup>b</sup> O/C-1, O/C tip pTi kod koga nije došlo do specifičnog umnožavanja sa *ipt* i *tms2* prajmerima; O/C-2, O/C tip pTi kod koga je došlo do specifičnog umnožavanja sa *ipt* i *tms2* prajmerima; OL, oktopin/kukumopin tip pTi sa kompletnim TA-DNK regionom; N, nopalina tip; V, vitopin tip;

<sup>c</sup> Prosečna vrednost;

<sup>d</sup> Zona inhibicije nije bila jasna, već je u manjoj meri došlo do razvoja testiranih sojeva.



**Slika 25.** Osetljivost prema antagonističkom soju KFB 0207 (F2/5). Zona inhibicije kod kontrolnog soja KFB 0206 (A) i proučavanog soja KFB 253 (B). Inhibicija kod proučavanog soja KFB 267 bila je delimična (C). Zona inhibicije kod kontrolnog soja KFB 096 je izostala (D).

## 6. DISKUSIJA

Bakteriozni rak vinove loze je oboljenje koje je poznato još od sredine 18. veka i prisutno je u većini područja intenzivnog gajenja ove biljne vrste (Burr i sar., 1998; Burr i Otten, 1999). Zbog svoje destruktivnosti, ovo oboljenje je i dalje od izuzetnog fitopatološkog značaja. Štete se mogu ogledati u značajnom smanjenju bujnosti i prinosa zaraženih čokota (Schroth i sar., 1988), a posebno negativno utiče na rasadničku proizvodnju. Glavni uzročnik bakterioznog raka vinove loze je vrsta *A. vitis*, čiji je prirodni krug domaćina ograničen na ovu biljnu vrstu. U redim slučajevima, ovo oboljenje mogu prouzrokovati patogeni sojevi *A. tumefaciens*/biovar 1, *A. rhizogenes*/biovar 2 i nedavno opisana vrsta *R. nepotum*, koji pored vinove loze mogu parazitirati i druge biljne vrste (Panagopoulos i Psallidas, 1973; Panagopoulos i sar., 1978; Süle, 1978; Burr i Katz, 1983; 1984; Thies i sar., 1991; Ridé i sar., 2000; Argun i sar., 2002; Genov i sar., 2006a; Bini i sar., 2008b; López i sar., 2008; Kawaguchi i Inoue, 2009; Palacio-Bielsa i sar., 2009; Puławska i sar., 2012a; Rouhrazi i Rahimian, 2012a; Abdellatif i sar., 2013).

U Srbiji, bakteriozni rak vinove loze prvi put je uočen 1962. godine, u trsteničkom vinogorju, na sorti Kardinal uveženoj iz Italije (Panić, 1973; 1977). Smatra se da je bolest tada u našu zemlju zapravo i uneta iz Italije, putem zaraženog sadnog materijala (Panić, 1973). Masovna pojava bakterioznog raka i prevremeno sušenje čokota dovelo je do krčenja pojedinih vinograda. Nešto kasnije, iz obolelih biljaka vinove loze sa područja Horgoša izolovani su sojevi bakterija koji su na osnovu tada dostupnih metoda identifikovani kao *A. tumefaciens* (Arsenijević i sar., 1974). U tom periodu sojevi iz vinove loze još uvek nisu bili izdvojeni kao posebna vrsta/biovar.

Od trenutka kad je prvi put utvrđen, bakteriozni rak bio je uglavnom sporadično prisutan u našim vinogradima. Stoga se ovo oboljenje i bakterija prouzrokovala nisu kod nas intenzivnije proučavali duži niz godina. Međutim, poslednjih nekoliko godina, u većini vinogradarskih rejona primećena je izražena pojava bakterioznog raka, uz visoku stopu zaraženih biljaka. Posebno su bili zahvaćeni mladi vinogradi, starosti 2-4 godine. Tipični simptomi koji su se ispoljili na zaraženim čokotima bili su snažan pokazatelj da



se radi o bakteriозnom raku vinove loze. Sve navedeno ukazivalo je da je bolest raširena putem zaraženog sadnog materijala, koji je uglavnom vodio poreklo iz uvoza.

Kako bi se izvršila pravilna i pouzdana dijagnoza oboljenja, odnosno potvrdila pretpostavka da bakteriозni rak vinove loze u Srbiji prouzrokuju fitopatogene vrste roda *Agrobacterium*, pristupilo se prikupljanju uzoraka, izolaciji i identifikaciji prouzrokovaca. Kao najpogodnije vreme za uzorkovanje pokazao se period od septembra do decembra, kada su na zaraženim čokotima prisutni aktivni i krupni tumori, koji su se razvili tokom tekuće sezone. Ključno je obezbediti vitalno tkivo tumora, iz koga bi se uspešnije mogao izolovati patogen. U ovom radu izolacija je izvršena iz fragmenata tkiva tumora na YMA podlogu. Iako neselektivna, YMA podloga bila je pogodna za izolaciju bakterija, pri čemu je posebna pažnja posvećena dezinfekciji biljnog materijala. Sa druge strane, patogeni sojevi *Agrobacterium* spp. takođe mogu biti izolovani iz uzoraka zemljišta u blizini zaraženih čokota, a *A. vitis* i iz soka ksilema zaraženih simptomatičnih i asimptomatičnih biljaka (Burr i Katz, 1983; 1984; Szegedi i Bottka, 2002). Za pojedine *Agrobacterium* vrste/biovarе razvijene su poluselektivne, selektivne i/ili diferencijalne podloge, koje su posebno značajne pri izolaciji bakterija iz uzoraka zemljišta (Moore i sar., 2001).

Tumorogenost *Agrobacterium* spp. određena je prisustvom pTi u genomu bakterije (Van Larebeke i sar., 1974; Watson i sar., 1975). Taksonomija vrsta roda *Agrobacterium* prvenstveno se zasnivala samo na njihovim patogenim odlikama, što nije pouzdan kriterijum, budući da su plazmidi mobilni genetički elementi. Novija klasifikacija zasnovana je na jasnim i stabilnim odlikama sojeva vezanim za hromozomsku DNK.

U ovom radu, diferencijacija patogenih od nepatogenih sojeva i identifikacija do nivoa vrste/biovara izvršena je primenom kako molekularnih metoda, tako i klasičnih bakterioloških testova. Utvrđeno je da bakteriозni rak vinove loze u Srbiji prouzrokuju isključivo tumorogeni sojevi *A. vitis*. S obzirom da su u svetu iz obolelih biljaka vinove loze izolovani tumorogeni sojevi koji su pripadali drugim *Agrobacterium* spp., nije isključeno njihovo prisustvo u našoj zemlji. Od ukupno 62 simptomatična uzorka vinove loze analizirana u ovom radu, kod 52 je utvrđeno prisustvo patogena. Neuspešnost izolacije iz 10 uzoraka može se objasniti činjenicom da u tumorima koji se

normalno razvijaju ne moraju biti prisutne vitalne ćelije patogena, imajući u vidu genetički karakter infekcije.

Molekularne metode, pre svega PCR, omogućavaju brzu detekciju pTi i/ili pRi, odnosno diferencijaciju sojeva do nivoa vrste/biovara. Budući da su u literaturi utvrđeni izvesni nedostaci po pitanju specifičnosti, u ovom radu je prilikom izvođenja PCR metode kombinovano više prajmera u cilju povećanja pouzdanosti detekcije. Specifičnost prajmera primenjenih u molekularnoj identifikaciji sojeva izolovanih u našoj zemlji, zatim je proučena korišćenjem 36 referentnih sojeva *A. vitis* poreklom iz drugih evropskih zemalja, Severne Amerike, Afrike i Australije. U analizi su korišćeni i sojevi *A. tumefaciens*/biovar 1, *A. rhizogenes*/biovar 2, *A. rubi*, *A. larrymoorei*, *R. skierniewicense* i *R. nepotum* kao kontrole.

Preliminarna identifikacija sojeva izolovanih u ovom istraživanju izvedena je primenom PCR metode sa prajmerima specifičnim za *virC* gen (VCF3/VCR3), koji se nalazi na pTi ili pRi, i prajmerima komplementarnim hromozomskom *pehA* genu (PGF/PGR), karakterističnom za vrstu *A. vitis* (Szegedi i Bottka, 2002; Suzaki i sar., 2004). U ranijim istraživanjima, VCF3/VCR3 prajmeri ispoljili su visok stepen specifičnosti prema širokom krugu patogenih *Agrobacterium* spp. (Suzaki i sar., 2004; Kawaguchi i sar., 2005; Kumagai i Fabritius, 2008; Kawaguchi i Inoue, 2009; Süle i sar., 2012), dok su PGF/PGR prajmeri bili pouzdani u diferencijaciji vrste *A. vitis* (Szegedi i Bottka, 2002; Bini i sar., 2008b; Kumagai i Fabritius, 2008). U ovom radu, VCF3/VCR3 i PGF/PGR prajmeri korišćeni su istovremeno u dupleks PCR reakciji (Kumagai i Fabritius, 2008), i na ovaj način je za dalji rad izdvojeno ukupno 36 reprezentativnih sojeva, identifikovanih kao patogeni *A. vitis*. Kada se u obzir uzmu i rezultati dobijeni sa referentnim sojevima *A. vitis*, ova kombinacija prajmera u dupleks PCR reakciji veoma je pogodna i može se smatrati univerzalnom metodom za rutinsku identifikaciju patogenih *A. vitis*. Pored tumorogenih *A. vitis*, VCF3/VCR3 prajmerima detektovan je pTi ili pRi plazmid kod svih proučavanih patogenih *Agrobacterium* sp.

Korišćenjem dupleks PCR metode sa prajmerima specifičnim za *virD2* (A/C') i *ipt* (CYT/CYT') gen (Haas i sar., 1995), nisu dobijeni potpuno dosledni rezultati. Kod pojedinih sojeva, pored specifičnih, umnoženi su i nespecifični fragmenti, što ukazuje na nedostatke ovih prajmera ili na potrebu da se optimizuju uslovi reakcije. Iako su sa A/C' prajmerima umnoženi odgovarajući fragmenti kod svih 36 proučavanih sojeva

izolovanih u našoj zemlji, kod pojedinih sojeva signal je bio vrlo slab, što je ukazivalo na nedostatak homologije između prajmera i ciljane sekvence na genomu bakterije. Slična zapažanja po pitanju specifičnosti A/C' prajmera zabeležena su u literaturi (Bini i sar., 2008b; Kumagai i Fabritius, 2009). Prajmerima CYT/CYT' odgovarajući fragmenti umnoženi su samo kod 4 soja. U PCR reakciji sa prajmerima specifičnim za *tms2* gen (*tms2F1/tms2R2*; Puławska i sar., 2005), takođe je samo kod ova 4 soja došlo do specifičnog umnožavanja. Činjenica da sa CYT/CYT' i *tms2F1/tms2R2* prajmerima nije došlo do pozitivne reakcije kod većine sojeva ukazuje na nespecifičnost ovih prajmera ili izostanak *ipt* i *tms2* gena kod ove grupe sojeva. Slični rezultati zabeleženi su i u slučaju analiziranih referentnih *A. vitis* sojeva.

U multipleks PCR reakciji sa kombinacijom prajmera specifičnih za *virF* (*VirFF1/VirFR2*), *virD2* (*VirD2S4F<sub>716</sub>/VirD2S4R<sub>1036</sub>*) i *pehA* (*PGF/PGR*) gene (Bini i sar., 2008b), svih 36 proučavanih sojeva iz Srbije su identifikovani kao tumorogeni *A. vitis*. Ovom metodom dobijeni su očekivani rezultati i kada su analizirani referentni *A. vitis* sojevi poreklom iz međunarodnih kolekcija. Prednost ove metode je to što se istovremeno vrši i delimična karakterizacija sojeva u pogledu opin tipa pTi. Međutim, nedostatak ove metode, koja je razvijena prvenstveno za detekciju i identifikaciju patogenih *Agrobacterium* spp. iz vinove loze, predstavlja nedovoljna specifičnost prema sojevima *A. tumefaciens*/biovar 1 sa N tipom pTi, koji se takođe mogu javiti na ovoj biljnoj vrsti (Bini i sar., 2008b). Prajmerima specifičnim za hromozomski 23S rRNK gen (Puławska i sar., 2006), takođe su identifikovani svi proučavani sojevi *A. vitis* izolovani u okviru ovog istraživanja, a ovi prajmeri su bili specifični i prema svim referentnim *A. vitis* sojevima.

Klasifikacija prokariota može se izvršiti analizom sličnosti između genskih sekvenci ribozomalne RNK (rRNK), pre svega 16S rRNK (Woese, 1987). Uprkos brojnim prednostima ove metode, klasifikacija samo na osnovu ovog kriterijuma nije dovoljna. Ukoliko postoji visok stepen sličnosti između sekvenci rRNK gena kod dva soja, potrebno je primeniti i druge metode kako bi se utvrdilo da li su analizirani sojevi dovoljno slični da bi bili označeni kao ista vrsta (Gevers i sar., 2005). Tako je metoda bazirana na analizi sekvenci 16S rRNK gena nedovoljna da bi se razlikovale genomske vrste *A. tumefaciens*/biovar 1 (Mougel i sar., 2002), koje su diferencirane na osnovu DNK-DNK hibridizacije (Popoff i sar., 1994), AFLP metode (Portier i sar., 2006) ili

sekvencione analize *recA* konstitutivnog gena (Costechareyre i sar., 2010; Shams i sar., 2013). Ipak, u literaturi nisu zabeleženi ovakvi slučajevi kada je u pitanju vrsta *A. vitis*. Stoga je u cilju potkrepljenja rezultata dobijenih PCR analizom sojeva, izvršeno sekvenciranje i analiza 16S rRNK gena odabranog soja poreklom iz naše zemlje. Parcijalna nukleotidna sekvenca 16S rRNK gena soja KFB 239 ispoljila je visok stepen nukleotidne sličnosti (99-100%) sa sekvencama drugih sojeva vrste *A. vitis* dostupnim u banci gena, dok je na dendrogramu konstruisanom na osnovu filogenetske analize ovaj soj bio grupisan zajedno sa referentnim sojevima *A. vitis*.

Taksonomska pripadnost proučavanih sojeva dalje je potvrđena primenom klasičnih bakterioloških metoda, odnosno biohemijsko-fizioloških testova. Takođe, proučene su i morfološke i odgajivačke osobine sojeva. Ove metode su pouzdane, jednostavne i jeftine, te i dalje zauzimaju značajno mesto u procesu identifikacije bakterija. Međutim, mogu biti vremenski vrlo zahtevne i stoga u današnje vreme sve više bivaju zamenjene molekularnim metodama. Svi proučavani sojevi ispoljili su morfološke, odgajivačke i biohemijsko-fiziološke odlike karakteristične za vrstu *A. vitis*. Jedini izuzetak bio je soj KFB 243, koji je i pri ponavljanju testa stvaranja kiseline iz eritritola kao izvora ugljenika ispoljio odlike svojstvene vrsti *A. rhizogenes*/biovar 2. Takođe, u ovom testu je bio pozitivan i kontrolni soj *A. tumefaciens*/biovar 1 (KFB 096), što prema literaturnim podacima nije odlika ove vrste. Imajući u vidu ove nedoslednosti, kao i da je poslednjih godina opisano nekoliko novih vrsta iz roda *Agrobacterium/Rhizobium*, postoji potreba da se izvrši ponovna procena pogodnosti postojećih i eventualno uključivanje novih dijagnostičkih testova.

U okviru ovog istraživanja, primenom PCR analize diferencirani su patogeni sojevi i utvrđeno je prisustvo pTi u njihovom genomu. Na ovaj način zapravo su determinisane izvesne genetske predispozicije za patogenezu. Imajući ovo u vidu, molekularne metode se mogu koristiti samo u rutinskoj i preliminarnoj analizi sojeva. Stoga je u cilju potvrde rezultata dobijenih PCR analizom, izveden test patogenosti. Mada može biti vremenski veoma zahtevan, ovaj test je jedini pouzdan način da se utvrde patogene odlike sojeva. S obzirom da patogenost sojeva nije uvek moguće testirati na biljci iz koje je soj izolovan, izbor test biljaka može biti kritičan faktor u izvođenju oglada. Pri tome posebno treba imati u vidu podatak da među patogenim sojevima roda *Agrobacterium* mogu postojati razlike u spektru domaćina (Anderson i

Moore, 1979). Još u prvim studijama koje su se bavile tumorogenim *Agrobacterium* spp. iz vinove loze, uočeno je da ovi sojevi imaju spektar domaćina pretežno ograničen na biljku iz koje su izolovani (Panagopoulos i Psallidas, 1973; Panagopoulos i sar., 1978).

U ovom istraživanju, test patogenosti izveden je na vinovoj lozi, suncokretu i paradajzu. Od ukupno 36 proučavanih sojeva izolovanih u ovom radu, 34 je ispoljilo patogenost na biljkama vinove loze (cv. Cabernet Sauvignon). Međutim, dva soja (KFB 241, KFB 247) bila su negativna u testu patogenosti, iako je PCR analizom utvrđeno da poseduju pTi. U literaturi je ranije saopšteno da pojedini sojevi *A. vitis* mogu biti specijalizovani prema određenim sortama vinove loze (Knauf i sar., 1982). Međutim, ovi sojevi su izolovani iz iste sorte vinove loze koja je korišćena za test patogenosti, te je razlog izostanka pozitivne reakcije, i posle ponavljanja testa, ostao nepoznat. U cilju potvrde etiologije oboljenja, iz biljke inokulisane sojem KFB 239 izvršena je reizolacija bakterija i njihova ponovna identifikacija korišćenjem PCR metode, čime su ispunjeni svi Kohovi postulati.

Za proveru patogenosti proučavanih sojeva u ovom radu korišćene su i biljke suncokreta i paradajza. Za razliku od vinove loze, u ovom slučaju zabeležene su značajne razlike među proučavanim sojevima. Pored sojeva koji su bili pozitivni ili negativni, definisana je i treća kategorija sojeva koji su izazivali varijabilnu reakciju na test biljkama. Varijabilnom reakcijom smatrani su simptomi koji su odstupali od tipične pozitivne, odnosno negativne reakcije, ili su uočene razlike u intenzitetu simptoma, kako unutar pojedinačnog oglada, tako i među različitim ponavljanjima. Kako bi se ustanovio razlog ovih varijacija, potrebno je sprovesti dodatna istraživanja koja bi podrazumevala analizu odnosa patogen - inokulisana biljka. Uzevši u obzir dobijene rezultate, može se zaključiti da je vinova loza, kao prirodni domaćin, najpouzdanija biljka za test patogenosti. Korišćenje suncokreta i paradajza kao test biljaka, i pored bržeg razvoja simptoma, ne može se preporučiti kao pouzdan test.

Komparativne studije genoma bakterija ukazuju da se genom bakterija sastoji iz dva nezavisna, ali isprepletana dela: sržnog i fleksibilnog genoma (Hacker i Carniel, 2001). Sržnom delu pripadaju geni koji su prisutni u svim sojevima i koji imaju ulogu u osnovnim životnim funkcijama. Fleksibilni deo genoma može biti varijabilan među sojevima jedne vrste, i njemu pripadaju geni vezani za virulentnost, rezistenciju na

antibiotike i mobilni genetički elementi (npr. plazmidi). Ranije pomenuti ribozomalni i konstitutivni geni nalaze se na hromozomima i pripadaju tzv. sržnom delu genoma. Međutim, u ekološkim studijama i studijama koje se bave patogenim karakteristikama sojeva i odnosima između patogena i biljke domaćina, kao predmet molekularne analize mogu se koristiti fragmenti gena koji pripadaju fleksibilnom delu genoma. U ovom radu, predmet analize bile su sekvence na pTi i hromozomima (PCR, PCR-RFLP, sekvenciranje), ali i kompletna genomska DNK (RAPD, rep-PCR).

Karakterizacija pTi podrazumevala je određivanje opin tipa kod 36 proučavanih sojeva izolovanih u ovom radu. Iako ima ograničen značaj, ovaj pristup se tradicionalno koristi pri klasifikaciji sojeva, odnosno njihovih pTi ili pRi (Dessaux i sar., 1998; Matthyse, 2006; Otten i sar., 2008). S obzirom da su sojevi *A. vitis* na osnovu opin tipa pTi podeljeni u tri glavne grupe: O/C, N i V tip (Szegedi i sar., 1988; Paulus i sar. 1989a), u okviru ovog istraživanja izvedena je PCR analiza sekvenci koje su karakteristične za svaku od ovih grupa. Na ovaj način, od ukupno 36 proučavanih sojeva, pTi 35 sojeva klasifikovan je kao O/C tip, jedan kao V tip, dok N tip pTi nije utvrđen. Slične rezultate dobili su Genov i sar. (2006b), proučavajući populaciju *A. vitis* u Bugarskoj. Ovi rezultati bili su delimično u skladu i sa rezultatima iz Mađarske (Szegedi, 2003) i Francuske (Ridé i sar., 2000), gde su takođe dominantni bili sojevi sa O/C tipom pTi, s tim da je tamo prisutan i N tip pTi. Prema podacima Bini i sar. (2008b), u Italiji, kao i u našoj zemlji, nije utvrđen N tip pTi unutar proučavane populacije *A. vitis*.

Uzimajući u obzir i rezultate prethodno izvedene PCR analize, pTi sojeva kod kojih nije došlo do specifičnog umnožavanja sa prajmerima specifičnim za *ipt* (CYT/CYT') i *tms2* (tms2F1/tms2R2) gene (Haas i sar., 1995; Puławska i sar., 2005), označeni su kao O/C-1, a oni kod kojih su umnoženi odgovarajući fragmenti obeleženi su kao O/C-2. Između ostalih, predmet analize bili su i referentni sojevi kod kojih je T-DNK karakterisana po pitanju svoje strukture, što se pre svega odnosi na one sa O/C tipom pTi (Otten i sar., 1996). Naime, O/C tip T-DNK se može podeliti na dve podgrupe: jednu sa kompletnim TA-DNK (OL) i drugu sa skraćenim TA-DNK regionom (OS), gde izostaju TA-*iaaM*, TA-*iaaH*, ili *ipt* geni (Paulus i sar., 1989a; Burr i sar., 1998; Burr i Otten, 1999). Kasnije je utvrđeno postojanje i još jednog O/C tipa T-DNK, svojstvenog soju CG474 (Otten i sar., 1996; Burr i sar., 1998; Burr i Otten,

1999). Do specifičnog umnožavanja sa prajmerima specifičnim za *ipt* i *tms2* gene došlo je kod sojeva sa OL tipom pTi, dok kod onih sa OS tipom to nije bio slučaj. Imajući ovo u vidu, može se pretpostaviti da svi ostali sojevi, kod kojih nije došlo do specifičnog umnožavanja pomenutim prajmerima (O/C-1) poseduju OS tip pTi, dok oni koji su označeni kao pozitivni (O/C-2) poseduju OL tip pTi. Međutim, detaljnija analiza je neophodna kako bi se definitivno utvrdio tip T-DNK kod ovih sojeva.

Budući da su izuzetno rasprostranjene, sposobne da naseljavaju različite životne sredine i parazitiraju širok krug gajenih i šumskih biljaka, *Agrobacterium* spp. poseduju veoma visoku stopu genetičkog diverziteta. Analiza genetičkog diverziteta može doprineti razumevanju taksonomije, strukture i dinamike populacije fitopatogenih bakterija i obezbediti okvir za razvoj osetljivih, specifičnih i brzih metoda za detekciju patogena i dijagnozu bolesti, što je preduslov za kontrolu oboljenja (Louws i sar., 1999). U okviru ovog istraživanja korišćene su metode kojima se vrši analiza kompletnog genoma (RAPD, Rep-PCR), a analiziran je i diverzitet pojedinačnih fragmenata prisutnih na hromozomskoj DNK (16S-23S rRNK ITS region, konstitutivni geni) primenom RFLP metode i sekvenciranjem.

RAPD metoda, sa prajmerima koji su korišćeni u ovoj disertaciji, već je primenjivana u proučavanju genetičkog diverziteta *A. vitis* u Kanadi i SAD, na osnovu čega je ustanovljen značajan genetički diverzitet unutar ove vrste (Irelan i Meredith, 1996; Momol i sar., 1998). U filogenetskoj analizi *A. vitis*, takođe je korišćena i rep-PCR metoda (ERIC i BOX-PCR), čime je izdvojeno više genetičkih grupa, među sojevima poreklom pretežno iz Japana (Kawaguchi i sar., 2008). S obzirom da su se pokazale podjednako pogodne za analizu genetičkog diverziteta *A. vitis*, ove metode su primenjene i u ovom radu.

Filogenetskom analizom, zasnovanoj na RAPD metodi sa tri vrste prajmera (A9, A10, R13) i rep-PCR metodi (REP-, BOX-, ERIC-PCR), ustanovljen je visok stepen genetičkog diverziteta među sojevima *A. vitis* poreklom iz Srbije. Obe metode bile su gotovo podjednako pogodne za analizu genetičkog diverziteta *A. vitis*. Međutim, rep-PCR metoda ispoljila je veću diskriminacionu moć, jer su na ovaj način ustanovljene razlike i među sojevima koji su posedovali identične RAPD profile. Takođe, rezultati dobijeni RAPD i rep-PCR metodom bili su u velikoj meri saglasni među sobom i diferencirane su uglavnom istovetne genetičke grupe. Korišćenjem kombinovanih

podataka (A9-A10-R13; REP-ERIC-BOX) u filogenetskoj analizi, omogućena je jasnija i preciznija diferencijacija genetičkih grupa, koje su bile podržane visokim “bootstrap” vrednostima na filogenetskom stablu. Na ovaj način, među 63 proučavana soja *A. vitis*, diferencirano je ukupno 13 različitih genetičkih grupa. Sojevi poreklom iz Srbije bili su raspoređeni unutar 7 genetičkih grupa i uglavnom grupisani zajedno sa sojevima poreklom iz međunarodnih kolekcija. Međutim, izdvojene su i dve grupe sastavljene isključivo od sojeva poreklom iz Srbije.

Rezultati rep-PCR i RAPD analize ukazivali su na postojanje klonalnih grupa među proučavanim sojevima *A. vitis*. To se pre svega odnosi na RAPD grupu C, odnosno rep-PCR grupu D, koja je bila prilično homogena i zauzimala dominantno mesto po broju sojeva. Ova grupa sastavljena je od 38 sojeva različitog geografskog porekla, izolovanih u periodu 2003-2011. godine, izuzimajući soj KFB 0100, koji je izolovan 1982. godine. Iako su bili izuzetno raznovrsni u pogledu geografskog porekla, ovi sojevi bili su genotipski srodni, te se može pretpostaviti da imaju isto poreklo, odnosno da potiču iz istog izvora zaraze.

U daljem radu, detaljnije su proučeni filogenetski odnosi među reprezentativnim sojevima *A. vitis*, predstavnicima glavnih grupa definisanih na osnovu rep-PCR i RAPD metode. Takođe je izvršeno poređenje ovih sojeva sa drugim srodnim sojevima *Agrobacterium/Rhizobium* kompleksa. Predmet analize bili su unutrašnji fragmenti tri konstitutivna gena: *dnaK*, *gyrB* i *recA*. Ovaj pristup ranije je korišćen u proučavanju genetičkog diverziteta kod *Agrobacterium* spp. (Kawaguchi i sar., 2008; Costechareyre i sar., 2010; Aujoulat i sar., 2011; Puławska i Kałużna, 2011; Shams i sar., 2013).

Rezultati analize nukleotidnih sekvenci svakog pojedinačnog genskog lokusa, kao i njihove kombinacije (*dnaK-gyrB-recA*), ukazuju na postojanje genetičkog diverziteta među proučavanim sojevima. Nukleotidni diverzitet bio je najviši za *recA* gen, gde je procenat polimorfnih mesta iznosio 12,14, dok je za *dnaK* i *gyrB* bio nešto manji i iznosio redom 9,48 i 9,83. Procenat polimorfnih mesta za sekvencu *dnaK* gena, unutar proučavane populacije *A. vitis*, bio je značajno niži u odnosu na sojeve *A. tumefaciens*/biovar 1 kompleksa poreklom iz životne sredine i kliničkih uzoraka, gde je iznosio 14 (Aujoulat i sar., 2011). Procenat sličnosti između sekvenci *dnaK*, *gyrB* i *recA* gena, kretao se, redom, u granicama 94,6-100, 95-100 i 92,1-100. Nešto veći stepen genetičkog diverziteta utvrđen je kod sojeva pripadnika *A. tumefaciens*/biovar 1



kompleksa gde je procenat sličnosti *gyrB* sekvenci bio u granicama 88-100, dok je vrsta *A. rhizogenes*/biovar 2 bila homogenija, sa procentom sličnosti *gyrB* gena većim od 98,5 (Puławska i Kałużna, 2011).

Ukupno 10 (*dnaK*), odnosno 11 (*gyrB* i *recA*) različitih alela detektovano je za sva tri genska lokusa, dok je broj različitih tipova sekvenci iznosio 12. Tip sekvence 1 bio je najbrojniji i predstavljen sa šest sojeva (KFB 239, KFB 257, KFB 262, KFB 0100, KFB 0171, KFB 0187). Ovih šest sojeva *A. vitis* izolovani su u periodu 1982-2011. godine u različitim evropskim zemljama. Tip sekvence 4 bio je predstavljen sa tri soja (KFB 253, KFB 0204, KFB 0206) koji su izolovani na tri kontinenta u periodu od 35 godina. Mada je neophodna dalja analiza, koja bi uključila još konstitutivnih gena, moguće je da ove grupe predstavljaju klonalne komplekse. Određivanje klonalnih kompleksa se može postići MLST metodom, koja podrazumeva analizu uglavnom 7 genskih lokusa (Maiden i sar., 1998; Enright i Spratt, 1999). Klonalni kompleks je prvenstveno definisan kao grupa sojeva koja ima isti tip sekvence određen na osnovu 7 genskih lokusa (Enright i Spratt, 1999). Kasnije je definicija doživela određene modifikacije, te se klonalnim kompleksom smatrala grupa sojeva u kojoj svaki soj deli bar pet identičnih alela, od ukupno sedam, sa bar još jednim genotipom u grupi (Feil i sar., 2001). Feil i sar. (2004) smatraju, međutim, da definicija klonalnog kompleksa treba da bude fleksibilna i da zavisi od odlika proučavane vrste.

Na filogenetskom stablu zasnovanom na podacima za kombinovanu sekvencu *dnaK*, *gyrB* i *recA*, gena, proučavani sojevi *A. vitis* formirali su monofiletičku grupu, jasno različitu od ostalih *Agrobacterium/Rhizobium* vrsta. Među proučavanim sojevima *A. vitis*, izdvojene su četiri genetičke grupe, podržane visokim “bootstrap” vrednostima. Iste grupe, uz nešto drugačiji raspored na filogenetskom stablu, izdvojene su kada je u filogenetskoj analizi korišćena sekvenca *recA* gena. Stoga se korišćenjem ovog genskog lokusa, može izvršiti preliminarna analiza filogenetskih odnosa unutar vrste *A. vitis*. Analiza *recA* gena pokazala se podesnom i u identifikaciji i diferencijaciji vrsta *A. tumefaciens*/biovar 1 kompleksa (Costechareyre i sar., 2010; Shams i sar., 2013). Sa druge strane, filogenetsko stablo konstruisano na osnovu *dnaK* genskog lokusa imalo je drugačiju topologiju u odnosu na ono kod *recA*, *gyrB* ili kombinovane (*recA-dnaK-gyrB*) sekvence. Ovakve neusaglašenosti između filogenija mogu biti posledica rekombinacija koje se odigravaju kod bakterija (Posada i sar., 2002).

RAPD i rep-PCR metodama analiziraju se genomske sekvence raspoređene unutar kompletnog genoma, koje iz uglavnom nepoznatih razloga evoluiraju veoma brzo (Maiden i sar., 1998). Na ovaj način mogu se detektovati mikrovarijacije među sojevima, te su ove metode pogodne za proučavanje kratkoročne epidemiologije. Sa druge strane, konstitutivni geni evoluiraju veoma sporo, što ih čini pogodnim za karakterizaciju patogena u studijama koje se bave dugoročnom, odnosno globalnom epidemiologijom (Maiden i sar., 1998; Enright i Spratt, 1999). Razlike u diskriminacionoj moći ove dve metode mogu se posmatrati na primeru genetičke grupe B, određene na osnovu analize konstitutivnih gena. Unutar ove grupe, procenat sličnosti kombinovane sekvence *dnaK*, *gyrB* i *recA* gena bio je u granicama 96,5-100. Međutim, kada su primenjene metode RAPD i rep-PCR, predstavnici ove genetičke grupe posedovali su među sobom izrazito različite genetičke profile.

Analiza 16S-23S rRNK ITS regiona, koji može biti značajno varijabilan u pogledu veličine i nukleotidne sekvence, pokazao se posebno korisnim u grupisanju *Agrobacterium* spp. (Ponsonnet i Nesme, 1994; Otten i sar., 1996; Burr i sar., 1999; Argun i sar., 2002; Peluso i sar., 2003; Raio i sar., 2004; Genov i sar., 2006b; Bautista-Zapanta i sar., 2009). Stoga je ovaj pristup korišćen u cilju daljeg proučavanja filogenetskih odnosa među sojevima *A. vitis*, izolovanih u našoj zemlji. U ovaj segment istraživanja uključeni su i sojevi *A. vitis* poreklom iz međunarodnih kolekcija, predstavnici hromozomskih grupa definisanih na osnovu PCR-RFLP analize 16S rRNK gena i 16S-23S rRNK ITS regiona (Otten i sar., 1996). Predmet analize u ovom radu bili su unutrašnji fragmenati 16S-23S rRNK ITS regiona, a korišćene su metode PCR-RFLP i sekvenciranje. Sekvenciranjem ovog regiona su na precizniji način utvrđeni filogenetski odnosi među proučavanim sojevima, za razliku od većine prethodnih studija gde je korišćena jedino PCR-RFLP metoda. U ovom radu, proučavani sojevi razlikovali su se po pitanju veličine i nukleotidne sekvence ITS regiona. Moguće je da su razlike u veličini ovog regiona posledica insercija ili delecija koje su se odigrale tokom evolucije. Iako je kod pojedinačnih sojeva *A. vitis* utvrđeno postojanje polimorfizma među *rrn* operonima unutar njihovog genoma (Bautista-Zapanta i sar., 2009), to nije bio slučaj kod sojeva proučavanih u ovoj doktorskoj disertaciji.

PCR-RFLP metodom, korišćenjem *BsuRI*, *HhaI* i *TaqI* restrikcionih enzima, izdvojeno je ukupno 12 različitih grupa među proučavanim sojevima *A. vitis*. Ovom

metodom je na relativno brz, jeftin i jednostavan način izvršena diferencijacija sojeva na osnovu ITS regiona. Sedam grupa utvrđeno je među sojevima poreklom iz Srbije, od kojih su dve bile jedinstvene i nisu ustanovljene među proučavanim sojevima poreklom iz međunarodnih kolekcija. Ovi rezultati bili su u skladu sa rezultatima dobijenim RAPD i rep-PCR metodama, kojima je među sojevima iz naše zemlje takođe diferencirano 7 različitih genetičkih grupa.

Metodom sekvenciranja određen je redosled baznih parova ITS regiona kod bar jednog predstavnika iz svake RFLP grupe. Unutar ovog regiona nalazili su se tRNK<sup>Le</sup> i tRNK<sup>Ala</sup> geni koji su bili visoko konzervirani. Filogenetskom analizom, izdvojeno je pet genetičkih grupa među proučavanim sojevima. Unutar ovih grupa bili su prisutni posebni klasteri sastavljeni od sojeva izolovanih u različitom vremenskom periodu i u različitim geografskim rejonima, ali čija je sekvenca ITS regiona bila identična. Npr. klaster unutar genetičke grupe A, bio je sastavljen od četiri soja, od kojih je tri korišćeno u ovom radu (KFB 253, KFB 0204, KFB 0206). Soj KFB 253 izolovan je 2011. godine u Srbiji, KFB 0204 1984. godine u SAD, dok je soj KFB 0206 izolovan 1977. godine u Australiji. Ova tri soja posedovala su isti tip sekvence i u slučaju konstitutivnih gena, odnosno identičnu sekvencu *dnaK*, *gyrB* i *recA* gena, što može biti još jedan pokazatelj da se radi o klonalnom kompleksu unutar vrste *A. vitis*.

Izuzimajući genetičke grupe sastavljene isključivo od sojeva poreklom iz Japana, nije ustanovljena jasna veza između pojedinih ITS grupa i geografskog porekla sojeva. Slično je bilo i kod RAPD i rep-PCR metode, kao i kod sekvencione analize konstitutivnih gena, gde grupisanje sojeva nije odražavalo njihovo geografsko poreklo. Ovo je u skladu sa glavnim načinom širenja patogena, a to je putem zaraženog sadnog materijala. U svetskim okvirima, trgovina loznim kalemovima posebno je intenzivna, još od pojave filoksere krajem 19. veka i uvođenja tehnologije kalemljenja u vinogradarstvo. Naša zemlja nije izuzetak, a u poslednjih 10 godina, loznim kalemovima poreklom iz inostranstva zasnovan je veliki broj vinograda.

Potpuna korelacija nije uočena ni između ITS genotipa i opin tipa pTi. Tako su ITS grupama D i E pripadali sojevi koji su posedovali sva tri opin tipa pTi. Uz to, sojevi KFB 264, KFB 0174 i KFB 0179 posedovali su gotovo identične ITS sekvence, ali su među njima bili zastupljeni svi tipovi pTi. Međutim, pojedine ITS grupe i klasteri bili su sastavljeni od sojeva koji su posedovali jedan određen tip pTi. Ovo je bio slučaj kod

ITS grupe A sastavljene isključivo od O/C sojeva ili posebnog klastera vitopin sojeva unutar grupe D. Čini se da u prirodi ne dolazi do nasumične ramene različitih tipova pTi među sojevima *A. vitis*, već postoji izvesna povezanost između hromozomske DNK i određenog pTi. Imajući u vidu da su ovi sojevi izolovani u periodu 1979-2011. (ITS grupa A), ili 1981-2011. godine (klaster vitopin sojeva unutar ITS grupe D), odnosno da je ovakva kombinacija hromozomske i plazmidne DNK ustaljena kroz dugi niz godina, može se pretpostaviti da u ovom slučaju postoji snažna povezanost između pojedinih pTi i bakterije domaćina. Korelacija između RFLP profila ITS regiona i opin tipa pTi različitih *A. vitis* sojeva je uočena i u prethodnim studijama (Paulus i sar., 1989b; Otten i sar., 1996; Genov i sar., 2006b), a sličan vid korelacije uočen je i kada je analiziran 5' region 23S rRNK gen primenom PCR-RFLP metode (Momol i sar., 1998).

Kada su primenjene metode RAPD i rep-PCR, uočen je visok stepen korelacije između genetičkih grupa i opin tipa pTi. Povezanost između RAPD profila i opin tipa pTi zabeležili su i drugi autori, analizirajući sojeve *A. vitis* raznovrsnog geografskog porekla (Momol i sar., 1998). Sa druge strane, kada su kod reprezentativnih sojeva izdvojenim metodama RAPD i rep-PCR, analizirani i konstitutivni geni, nije uočena potpuna korelacija između genetičkih grupa i opin tipa pTi. Genetičke grupe A, C, D i E bile su sastavljene od sojeva koji su posedovali jedan tip pTi, ali su unutar genetičke grupe B bili prisutni sojevi kako sa O/C, tako i sa V tipom pTi. Ovaj vid neusaglašenosti, pre svega, posledica je razlika između metoda RAPD i rep-PCR sa jedne strane, i analize konstitutivnih gena sa druge strane, o čemu je ranije posebno diskutovano.

Na osnovu genetičke analize odabrano je 10 reprezentativnih sojeva poreklom iz Srbije, prema kojima je testiran antagonistički efekat soja KFB 0207 (F2/5). Proučavani sojevi reagovali su različito na uticaj antagonističkog soja. Kod pojedinih sojeva došlo je do inhibicije, kod nekoliko sojeva inhibicija je bila delimična, dok su pojedini bili potpuno neosetljivi. Međutim, nije poznato da li su ove razlike među sojevima posledica aktivnosti gena prisutnih na hromozomskoj ili plazmidnoj DNK, ili oboje. Neosetljivost pojedinih sojeva *A. vitis* na inhibitorni efekat korišćenog antagonističkog soja zabeležena je i u prethodnim studijama (Burr i Reid, 1994).

Rezultati dobijeni u ovoj doktorskoj disertaciji imaju za krajnji cilj da doprinesu razvoju održive strategije kontrole bakterioznog raka vinove loze u našoj zemlji.

Korišćenjem različitih pristupa, prvenstveno PCR metode, postavljen je okvir za razvoj protokola za brzu, osetljivu i pouzdanu detekciju i identifikaciju patogena. Analizom genetičkog diverziteta detaljno su proučeni filogenetski odnosi među proučavanim sojevima, ali su i rasvetljena pojedina pitanja vezana za ekologiju patogena i epidemiologiju oboljenja. Pre svega, genotipska srodnost sojeva poreklom iz naše zemlje sa proučavanim sojevima iz inostranstva, ukazuje na njihovo zajedničko poreklo. U ovom radu utvrđeno je postojanje klonalnih grupa unutar proučavane populacije, a postojale su i snažne indicije o prisustvu klonalnih kompleksa unutar vrste *A. vitis*. Takođe, još jednom je potvrđeno postojanje povezanosti između hromozomske i plazmidne DNK kod vrste *A. vitis*.

## 7. ZAKLJUČAK

Na osnovu rezultata dobijenih tokom ovih istraživanja, može se zaključiti sledeće:

- Kao prouzrokovatelj bakterioznog raka vinove loze u Srbiji identifikovan je isključivo tumorogeni *A. vitis*.
- Molekularne metode, pre svega PCR, pokazale su se pogodnim za rutinsku i preliminarnu identifikaciju sojeva *A. vitis*, dok su primenom klasičnih bakterioloških metoda potvrđeni ovi rezultati.
- Među proučavanim sojevima *A. vitis* poreklom iz Srbije ustanovljene su genetičke razlike, vezane kako za hromozomsku, tako i plazmidnu DNK.
- Genotipska srodnost sojeva poreklom iz naše zemlje sa proučavanim sojevima iz inostranstva, ukazuje na njihovo zajedničko poreklo.
- Korišćenjem metoda RAPD i rep-PCR, kao i sekvenciranjem tri konstitutivna gena (*dnaK*, *gyrB* i *recA*) i 16S-23S rRNK ITS regiona, utvrđeno je postojanje klonalnih grupa unutar proučavane populacije, a postoje i snažne indicije o prisustvu klonalnih kompleksa unutar vrste *A. vitis*.
- Ustanovljena je povezanost između hromozomske i plazmidne DNK kod pojedinih genetičkih grupa unutar vrste *A. vitis*.

## 8. LITERATURA

- Abdellatif, E., Valentini, F., Janse, J.D., Bouri, M., Rhouma, A., Chebil, S., D'Onghia, A.M. (2013): Occurrence of crown gall of the grapevine in Tunisia and characterization of Tunisian *Agrobacterium vitis* and *A. tumefaciens* strains. *Journal of Plant Pathology* 95, 115-126.
- Al-Momani, F., Abussaud, M. (1990): Characterization of *Agrobacterium tumefaciens* biotypes isolated from Jordan. *Pakistan Journal of Botany* 22, 79-84.
- Al-Momani, F., Albasheer, S., Saadoun, I. (2006): Distribution of *Agrobacterium tumefaciens* Biovars in Jordan and Variation of Virulence. *Plant Pathology Journal* 22, 318-322.
- Alarcon, B., López, M.M., Cambra, M., Ortiz, J. (1987): Comparative study of *Agrobacterium* biotypes 1, 2 and 3 by electrophoresis and serological methods. *Journal of Applied Bacteriology* 62, 295-308.
- Albiach, M.R., López, M.M. (1992): Plasmid heterogeneity in Spanish isolates of *Agrobacterium tumefaciens* from thirteen different hosts. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 2683-2687.
- Alconero, R. (1980): Crown gall of peaches from Maryland, South Carolina, and Tennessee and problems with biological control. *Plant Disease* 64, 835-838.
- Al-Karablieh, N., Khlaif, H., Al Banna, L. (2006): Identification of *Agrobacterium tumefaciens* strains by PCR-RFLP analysis of the 16S-rDNA. *Jordan Journal of Agricultural Science* 2, 209-221.
- Alippi, A.M., López, A.C., Balatti, P.A. (2009): First Report of *Agrobacterium rubi* and *A. rhizogenes* Causing Crown and Root Gall and Hairy Root on Blueberry in Argentina. *Plant Disease* 94, 1064.3-1065.
- Alippi, A.M., López, A.C., Balatti, P.A. (2012): Diversity among agrobacteria isolated from diseased plants of blueberry (*Vaccinium corymbosum*) in Argentina. *European Journal of Plant Pathology* 134, 415-430.

- Allardet-Servent, A., Michaux-Charachon, S., Jumas-Bilak, E., Karayan, L., Ramuz, M. (1993): Presence of one linear and one circular chromosome in the *Agrobacterium tumefaciens* C58 genome. *Journal of Bacteriology* 175, 7869-7874.
- Allen, O.N., Holding, A.J. (1974): Genus II. *Agrobacterium*. In: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8<sup>th</sup> ed. Eds. R.E. Buchanan, N.E. Gibbons. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, pp. 264-267.
- Amaya, R.A., Edwards, M.S. (2003): *Agrobacterium radiobacter* bacteremia in pediatric patients: case report and review. *The Pediatric Infectious Disease Journal* 22, 183-186.
- Anderson, A.R., Moore, L.W. (1979): Host specificity in the genus *Agrobacterium*. *Phytopathology* 69, 320-323.
- Argun, N., Momol, M., Maden, S., Momol, E., Reid, C., Celek, H., Burr, T.J. (2002): Characterisation of *Agrobacterium vitis* strains isolated from Turkish grape cultivars in the central Anatolia region. *Plant Disease* 86, 162-166.
- Arsenijević, M. (1989): *Agrobacterium tumefaciens* parazit pitome kupine (*Rubus* sp.). Kongres mikrobiologov Jugoslavije (VI), 11-15.09., Maribor. Zbornik povzetkov, 53.
- Arsenijević, M. (1997): Bakterioze biljaka. S Print, Novi Sad.
- Arsenijević, M., Stojić, J., Panić, M. (1974): Prilog proučavanju bakterioznog raka (*Agrobacterium tumefaciens*) vinove loze u Jugoslaviji. *Zaštita bilja* 128-129, 257-264.
- Aujoulat, F., Jumas-Bilak, E., Masnou, A., Sallé, F., Faure, D., Segonds, C., Marchandin, H., Teyssier, C. (2011): Multilocus sequence-based analysis delineates a clonal population of *Agrobacterium (Rhizobium) radiobacter (Agrobacterium tumefaciens)* of human origin. *Journal of Bacteriology* 193, 2608-2618.
- Banta, L.M., Bohne, J., Lovejoy, S.D., Dostal, K. (1998): Stability of the *Agrobacterium tumefaciens* VirB10 protein is modulated by growth temperature and periplasmic osmoadaptation. *Journal of Bacteriology* 180, 6597-6606.



- Bauer, C., Schulz, T.F., Lorenz, D., Eichhorn, K.W., Plapp, R. (1994): Population dynamics of *Agrobacterium vitis* in two grapevine varieties during the vegetation period. *Vitis* 33, 25-29.
- Bautista-Zapanta, J.N., Arafat, H.H., Tanaka, K., Sawada, H., Suzuki, K. (2009): Variation of 16S-23S internally transcribed spacer sequence and intervening sequence in rDNA among the three major *Agrobacterium* species. *Microbiological Research* 164, 604-612.
- Bazzi, C., Burr, T.J. (1986): La rogna della vite. *Informatore Fitopatologico* 36, 11-14.
- Bazzi, C., Piazza, C., Burr, T.J. (1987): Detection of *Agrobacterium tumefaciens* in grapevine cuttings. *EPPO Bulletin* 17, 105-112.
- Bazzi, C., Minardi, P., Burr, T.J., Katz, B.H., Bishop, A.L., Blanchard, L.M. (1988): Monoclonal and polyclonal antibodies in a comparative serological study of *Agrobacterium* Conn. biovars. *Phytopathologia Mediterranea* 27, 51-56.
- Beauchamp, C.J., Chilton, W.S., Dion, P., Antoun, H. (1990): Fungal catabolism of crown gall opines. *Applied and Environmental Microbiology* 56, 150-155.
- Beauchamp, C.J., Kloeppe, J. W. Lifshitz, R. Dion, P., Antoun, H. (1991): Frequent occurrence of the ability to utilize octopine in rhizobacteria. *Canadian Journal of Microbiology* 37, 158-164.
- Beijerinck, M.W., van Delden, A. (1902): Ueber die Assimilation des freien Stickstoffs durch Bakterien. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene* II 9, 3-43.
- Benjama, P.A., El Gadda, M., El Boustani, E., El Modafar, C., Nesme, X., Cubero, J. (2004): Détection moléculaire spécifique de la région vir du plasmide pTi d'*Agrobacterium tumefaciens* dans les sols et plants au Maroc. *EPPO Bulletin* 34, 403-406.
- Bernaerts, M.J., De Ley, J. (1963): A biochemical test for crown gall bacteria. *Nature* 197, 406-407.

- Bien, E., Lorenz, D., Eichhorn, K., Plapp, R. (1990): Isolation and characterization of *Agrobacterium tumefaciens* from the German vineregion Rheinpfalz. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 97, 313-322.
- Bini, F., Geider, K., Bazzi, C. (2008a): Detection of *Agrobacterium vitis* by PCR using novel *virD2* gene-specific primers that discriminate two subgroups. *European Journal of Plant Pathology* 122, 403-411.
- Bini, F., Kuczmog, A., Putnoky, P., Otten, L., Bazzi, C., Burr, T.J., Szegedi, E. (2008b): Novel pathogen-specific primers for the detection of *Agrobacterium vitis* and *Agrobacterium tumefaciens*. *Vitis* 47, 181-189.
- Bishop, A.L., Katz, B.H., Burr, T.J. (1988): Infection of grapevine by soilborne *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3 and population dynamics in host and nonhost rhizospheres. *Phytopathology* 78, 945-948.
- Bishop, A. L., Mittak, V.L., Katz, B.H., Burr, T.J. (1989): A monoclonal antibody specific to *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3 and its utilization for indexing grapevine propagation material. *Phytopathology* 79, 995-998.
- Blasioli, S., Biondi, E., Braschi, I., Mazzucchi, U., Bazzi, C., Gessa, C.E. (2010): Electronic nose as an innovative tool for the diagnosis of grapevine crown gall. *Analytica Chimica Acta* 672, 20-24.
- Bošković, M. (1955): Suzbijanje korenovog raka na voćnim sadnicama. *Zaštita bilja* 31, 33-44.
- Bouzar, H. (1994): Request for a judicial opinion concerning the type species of *Agrobacterium*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 44, 373-374.
- Bouzar, H., Chilton, W.S., Nesme, X., Dessaux, Y., Vaudequin, V., Petit, A., Jones, J.B., Hodge, N.C. (1995a): A new *Agrobacterium* strain isolated from aerial tumors on *Ficus benjamina* L. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 65-73.
- Bouzar, H., Jones, J.B. (2001): *Agrobacterium larrymoorei* sp. nov., a pathogen isolated from aerial tumours of *Ficus benjamina*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51, 1023-1026.

- Bouzar, H., Jones, J.B. (1992): Distinction of biovar 2 strains of *Agrobacterium* from other chromosomal groups by differential acid production. *Letters in Applied Microbiology* 15, 83-85.
- Bouzar, H., Jones, J.B., Bishop, A.L. (1995b): Simple cultural test for identification of *Agrobacterium* biovars. In: *Methods in Molecular Biology*, vol. 44: *Agrobacterium* Protocols. Eds. K.M.A. Garland, M.R. Davey. Humana Press, Inc., Totowa, NJ, pp. 9-13.
- Bouzar, H., Jones, J.B., Hodge, N.C. (1993a): Differential characterization of *Agrobacterium* species using carbon-source utilization patterns and fatty acid profiles. *Phytopathology* 83, 733-739.
- Bouzar, H., Moore, L.W. (1987a): Complementary methodologies to identify specific *Agrobacterium* strains. *Applied and Environmental Microbiology* 53, 2660-2665.
- Bouzar, H., Moore, L.W. (1987b): Isolation of different *Agrobacterium* biovars from a natural oak savanna and tallgrass prairie. *Applied and Environmental Microbiology* 53, 717-721.
- Bouzar, H., Moore, L.W., Schaad, N.W. (1983). Crown gall on pecan: A survey of *Agrobacterium* strains and potential for biological control in Georgia. *Plant Disease* 67, 310-312.
- Bouzar, H., Quadah, D., Krimi, Z., Jones, J.B., Trovato, M., Petit, A., Dessaux, Y. (1993b): Correlative association between resident plasmids and the host chromosome in a diverse *Agrobacterium* soil population. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 1310-1317.
- Bradbury, J.F. (1986): *Guide to Plant Pathogenic Bacteria*. CAB International Mycological Institute, London.
- Braun, A.C. (1947): Thermal studies on the factors responsible for tumor initiation in crown-gall. *American Journal of Botany* 34, 234-240.
- Brenner, D.J., Staley, J.T., Krieg, N.R. (2005): Classification of prokaryotic organisms and the concept of bacterial speciation. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed., vol. 2A. Eds. D.J. Brenner, N.R. Krieg, J.T. Staley. Springer, New York, NY, pp. 27-31.

- Brisbane, P.G., Kerr, A. (1983): Selective media for the three biovars of *Agrobacterium*. *Journal of Applied Bacteriology* 54, 425-431.
- Britton, M.T., Escobar, M.A., Dandekar, A.M. (2008): The oncogenes of *Agrobacterium tumefaciens* and *Agrobacterium rhizogenes*. In: *Agrobacterium: from Biology to Biotechnology*. Eds. T. Tzfira, V. Citovsky. Springer, NY, USA, pp. 523-563.
- Burr, T.J., Bazzi, C., Süle, S., Otten, L. (1998): Crown gall of grape: biology of *Agrobacterium vitis* and the development of disease control strategies. *Plant Disease* 82, 1288-1297.
- Burr, T.J., Bishop, A.L., Katz, B.H., Blanchard, L.M., Bazzi, C. (1987a): A root-specific decay of grapevine caused by *Agrobacterium tumefaciens* and *A. radiobacter* biovar 3. *Phytopathology* 77, 1424-1427.
- Burr, T.J., Hurwitz, B. (1981): Occurrence of *Agrobacterium radiobacter* pv. *tumefaciens* (Smith and Townsend) Conn biotype 3 on grapevines in New York State. *Phytopathology* 71, 206.
- Burr, T.J., Katz, B.H. (1984): Grapevine cuttings as potential sites of survival and means of dissemination of *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Disease* 68, 976-978.
- Burr, T.J., Katz, B.H. (1983): Isolation of *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3 from grapevine galls and sap, and from vineyard soil. *Phytopathology* 73, 163-165.
- Burr, T.J., Katz, B.H., Bishop, A.L. (1987b): Populations of *Agrobacterium* in vineyard and non vineyard soils and grape roots in vineyards and nurseries. *Plant Disease* 71, 617-620.
- Burr, T.J., Katz, B.H., Bishop, A.L., Meyers, C.A., Mittak, V.L. (1988): Effect of shoot age and tip culture propagation of grapes on systemic infestations by *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3. *American Journal of Enology and Viticulture* 39, 67-70.
- Burr, T.J., Otten, L. (1999): Crown gall of grape: biology and disease management. *Annual Review of Phytopathology* 37, 53-80.

- Burr, T.J., Reid, C.L. (1994): Biological control of grape crown gall with nontumorigenic *Agrobacterium vitis* F2/5. *American Journal of Enology and Viticulture* 45, 213-219.
- Burr, T.J., Reid, C.L., Adams, C.E., Momol, E.A. (1999): Characterization of *Agrobacterium vitis* strains isolated from feral *Vitis riparia*. *Plant Disease* 83, 102-107.
- Burr, T.J., Reid, C.L., Taglicti, E., Bazzi, C., Süle, S. (1997): Biological control of grape crown gall by strain F2/5 is not associated with agrocin production or competition for attachment site on grape cells. *Phytopathology* 87, 706-711.
- Burr, T.J., Reid, C.L., Yoshimura, M., Momol, E.A., Bazzi, C. (1995): Survival and tumorigenicity of *Agrobacterium vitis* in living and decaying grape roots and canes in soil. *Plant Disease* 79, 677-682.
- Bush, A., Pueppke, S.G. (1991): A rapid and efficient new assay for determination of the three biotypes of *Agrobacterium tumefaciens*. *Letters in Applied Microbiology* 13, 126-129.
- Butrov D. (1983): Prilog proučavanju bakterijskog raka vinove loze u SR Makedoniji. Magistarski rad, Poljoprivredni fakultet, Beograd-Zemun.
- Canaday, J., Gérard, J.C., Crouzet, P., Otten, L. (1992): Organization and functional analysis of three T-DNAs from the vitopine Ti plasmid pTiS4. *Molecular Genetics and Genomics* 235, 292-303.
- Cavara, F. (1897): Tubercolosi della vite. Intorno alla eziologia de alcune malattie di piante coltivate. *Stazioni Sperimentali Agrarie Italiane* 30, 483-487.
- Chebil, S., Fersi, R., Chenenaoui, S., Abdellatif, E., Durante, G., Zacchi, E., Rhouma, A., Mliki A. (2013): First Report of *Agrobacterium vitis* as Causal Agent of Crown Gall Disease of Grapevine in Tunisia. *Plant Disease* 97, 836-836.
- Chen, C.-Y., Hansen, K.S., Hansen, L.K. (2008): *Rhizobium radiobacter* as an opportunistic pathogen in central venous catheter associated bloodstream infection: case report and review. *Journal of Hospital Infection* 68, 203-207.

- Chilton, M.D., Drummond, M.H., Merio, D.J., Sciaky, D., Montoya, A.L., Gordon, M.P., Nester, E.W. (1977): Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis. *Cell* 11, 263-271.
- Chilton, W.S., Petit, A., Chilton, M.D.; Dessaux, Y. (2001): Structure and characterization of the crown gall opines heliopine, vitopine and rideopine. *Phytochemistry* 58, 137-142.
- Coenye, T., Goran, J., Spilker, T., Vandamme, P., LiPuma, J.J. (2002): Characterization of unusual bacteria isolated from respiratory secretions of cystic fibrosis patients and description of *Inquilinus limosus* gen. nov. sp. nov. *Journal of Clinical Microbiology* 40, 2062-2069.
- Conn, H.J. (1942): Validity of the genus *Alcaligenes*. *Journal of Bacteriology* 44, 353-360.
- Conner, A.J., Dommissé, E.M. (1992): Monocotyledonous plants as hosts for *Agrobacterium*. *International Journal of Plant Sciences* 153, 550-555.
- Costechareyre, D., Rhouma, A., Lavire, C., Portier, P., Chapulliot, D., Bertolla, F., Boubaker, A., Dessaux, Y., Nesme, X. (2010): Rapid and efficient identification of *Agrobacterium* species by *recA* allele analysis. *Microbial Ecology* 60, 862-872.
- Cubero, J., López, M.M. (2001): An efficient microtitre system to determine *Agrobacterium* biovar. *European Journal of Plant Pathology* 107, 757-760.
- Cubero, J., Martínez, M.C., Llop, P., López, M.M. (1999): A simple and efficient PCR method for the detection of *Agrobacterium tumefaciens* in plant tumours. *Journal of Applied Microbiology* 86: 591-602.
- D'Hondt, S., Jørgensen, B.B., Miller, D.J., Batzke, A., Blake, R., Cragg, B.A., Cypionka, H., Dickens, G.R., Ferdelman, T., Hinrichs, K.U., Holm, N.G., Mitterer, R., Spivack, A., Wang, G., Bekins, B., Engelen, B., Ford, K., Gettemy, G., Rutherford, S.D., Sass, H., Skilbeck, C.G., Aiello, I.W., Guèrin, G., House, C.H., Inagaki, F., Meister, P., Naehr, T., Niitsuma, S., Parkes, R.J., Schippers, A., Smith, D.C., Teske, A., Wiegand, J., Padilla, C.N., Acosta, J.L. (2004): Distributions of microbial activities in deep seafloor sediments. *Science* 306, 2216-2221.

- De Cleene, M. (1985): Susceptibility of monocotyledons to *Agrobacterium tumefaciens*. *Phytopathologische Zeitschrift* 113, 81-89.
- De Cleene, M., De Ley, J. (1976): The host range of crown gall. *Botanical Review* 42, 389-466.
- De Ley, J. (1974): Phylogeny of prokaryotes. *Taxon* 23, 291-300.
- De Ley, J., Tijtgat, R., De Smedt, J., Michiels, M. (1973): Thermal stability of DNA:DNA hybrids within the genus *Agrobacterium*. *Journal of General Microbiology* 78, 241-252.
- De Oliveira, J. R., Da Silva Romeiro, R., De Souza Leão Lacerda, B. (1994): Occurrence of *Agrobacterium tumefaciens* Biovar 3 on Grapevine in Brazil. *Journal of Phytopathology* 140, 363-366.
- Dessaux, Y., Petit, A., Farrand, S.K., Murphy, P.J. (1998): Opines and opine-like molecules involved in plant-*Rhizobiaceae* interactions. In: *The Rhizobiaceae: Molecular Biology of Model Plant-Associated Bacteria*. Eds. H.P. Spaink, A. Kondorosi, P.J.J. Hooykaas. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 173-197.
- Dhanvantari, B.N. (1978): Characterization of *Agrobacterium* isolates from stone fruits in Ontario. *Canadian Journal of Botany* 56, 2309-2311.
- Dhanvantari, B.N. (1983): Etiology of grape crown gall in Ontario. *Canadian Journal of Botany* 61, 2641-2646.
- Dong, L.C., Sun, C.W., Thies, K L., Luthe, D.S., Graves Jr., C.H. (1992): Use of polymerase chain reaction to detect pathogenic strains of *Agrobacterium*. *Phytopathology* 82, 434-439.
- Dua, A., Sangwan, N., Kaur, J., Saxena, A., Kohli, P., Gupta, A.K., Lal, R. (2013): Draft genome sequence of *Agrobacterium* sp. strain UHFBA-218, isolated from rhizosphere soil of crown gall-infected cherry rootstock Colt. *Genome Announcements* 1, e00302-13.

- Eastwell, J.C., Willis, L.G., Cavileer, T.D. (1995): A rapid and sensitive method to detect *Agrobacterium vitis* in grapevine cuttings using the polymerase chain reaction. *Plant Disease* 79, 822-827.
- Edmond, M.B., Riddler, S.A., Baxter, C.M., Wicklund, B.M., Pascuile, A.W. (1993): *Agrobacterium radiobacter* a recently recognized opportunistic pathogen. *Clinical Infectious Diseases* 16, 388-391.
- Ellis, J.G., Kerr, A., Petit, A., Tempé, J. (1982): Conjugal transfer of nopaline and agropine Ti-plasmids - the role of agrocinopines. *Molecular and General Genetics* 186, 269-273.
- Enright, M.C., Spratt, B.G. (1999): Multilocus sequence typing. *Trends in Microbiology* 7, 482-487.
- Fabre, E., Dunal, F. (1853): Observations sur les maladies regantes de la vigne. *Bulletin de la Société d'Agriculture du Département de l'Hérault* 40, 46.
- Farrand, S.K., Van Berkum, P.B., Oger, P. (2003): *Agrobacterium* is a definable genus of the family *Rhizobiaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53, 1681-1687.
- Feil, E.J., Holmes, E.C., Bessen, D.E., Chan, M.-S., Day, N.P.J., Enright, M.C., Goldstein, R., Hood, D.W., Kalia, A., Moore, C.E., Zhou, J., Spratt, B.G. (2001): Recombination within natural populations of pathogenic bacteria: short-term empirical estimates and long-term phylogenetic consequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 182-187.
- Feil, E.J., Li, B.C., Aanensen, D.M., Hanage, W.P., Spratt, B.G. (2004): eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. *Journal of Bacteriology* 186, 1518-1530.
- Gelvin, S.B. (2003): *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the “genejockeying” tool. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67, 16-37.
- Genov, I., Atanassov, I., Tsvetkov, I., Atanassov, A. (2006a): Isolation and characterization of *Agrobacterium* strains from grapevines in Bulgarian vineyards and wild grapes, *V. vinifera* ssp. *silvestris*. *Vitis* 45, 97-101.



- Genov, I., Atanassov, I., Yordanov, Y., Tsvetkov, I., Atanassov, A. (2006b): Genetic diversity of *Agrobacterium vitis* strains, isolated from grapevines and wild grapes in Bulgaria, assessed by Cleaved Amplified Polymorphic Sequences analysis of 16S-23S rDNA. *Vitis* 45, 125-130.
- Gevers, D., Cohan, F.M., Lawrence, J.G., Spratt, B.G., Coenye, T., Feil, E.J., Stackebrandt, E., Van de Peer, Y., Vandamme, P., Thompson, F.L., Swings, J. (2005): Opinion: re-evaluating prokaryotic species. *Nature Reviews Microbiology* 3, 733-739.
- Gillings, M., Ophel-Keller, K. (1995): Comparison of strains of *Agrobacterium vitis* from grapevine source areas in Australia. *Australasian Plant Pathology* 24, 29-37.
- Gonzalez, E.T., Maccree, M., Zaid, M., Kluepfel, D.A. (2008): Evaluation of *Agrobacterium tumefaciens* genetic diversity in CA walnut growing regions and resistance to the biocontrol agent, *Agrobacterium rhizogenes* K84. *Phytopathology* 98, S61-S61.
- Goodner, B., Hinkle, G., Gattung, S., Miller, N., Blanchard, M., Quorllo, B., Goldman, B.S., Cao, Y.W., Askenazi, M., Halling, C., Mullin, L., Houmiel, K., Gordon, J., Vaudin, M., Iartchouk, O., Epp, A., Liu, F., Wollam, C., Allinger, M., Doughty, D., Scott, C., Lappas, C., Markelz, B., Flanagan, C., Crowell, C., Gurson, J., Lomo, C., Sear, C., Strub, G., Cielo, C., Slater, S. (2001): Genome sequence of the plant pathogen and biotechnology agent *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science* 294, 2323-2328.
- Gürtler, V., Stanisich, V.A. (1996). New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology* 142, 3-16.
- Haas, J.H., Moore, L.W., Ream, W., Manulis, S. (1995): Universal PCR primers for detection of phytopathogenic *Agrobacterium* strains. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 2879-2884.
- Haas, J.H., Zveibil, A., Tanne, E., Manulis, S. (1991): The presence of crown gall of grape incited by *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3 in Israel. *Phytoparasitica* 19, 311-318.

- Hacker, J., Carniel, E. (2001): Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity: a Darwinian view of the evolution of microbes. *EMBO Reports*, 2, 376-381.
- Hampl, V., Pavlicek, A., Flegr, J. (2001): Construction and bootstrap analysis of DNA fingerprinting-based phylogenetic trees with the freeware program FreeTree: Application to trichomonad parasites. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51, 731-735.
- Hendrickson, A.A., Baldwin, I.L., Riker A.J. (1934): Studies on Certain Physiological Characters of *Phytomonas tumefaciens*, *Phytomonas rhizogenes*, and *Bacillus radiobacter*, Part II. *Journal of Bacteriology* 28, 597-618.
- Hildebrand, E.M. (1940): Cane gall of brambles caused by *Phytomonas rubi* n. sp. *Journal of Agricultural Research* 61, 685-696.
- Holmes, B. (1988): The taxonomy of *Agrobacterium*. *Acta Horticulturae* 225, 47-52.
- Holmes, B., Roberts, P. (1981): The classification, identification and nomenclature of agrobacteria. *Journal of Applied Bacteriology* 50, 443-467.
- Hooykaas, P.J.J., Den Dulk-Ras, H., Ooms, G., Schilperoort, R.A. (1980): Interactions between octopine and nopaline plasmids in *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Bacteriology* 143, 1295-1306.
- Irelan, N.A., Meredith, C.P. (1996): Genetic analysis of *Agrobacterium tumefaciens* and *A. vitis* using randomly amplified polymorphic DNA. *American Journal of Enology and Viticulture* 47, 145-151.
- Jarvis, B.D.W., Sivakumaran, S.W., Tighe, S.W., Gillis, M. (1996): Identification of *Agrobacterium* and *Rhizobium* species based on cellular fatty acid composition. *Plant and Soil* 184, 143-158.
- Johnson, K.L., Zheng, D., Kaewnum, S., Reid, C.L., Burr, T. (2013): Development of a Magnetic Capture Hybridization Real-Time PCR Assay for Detection of Tumorigenic *Agrobacterium vitis* in Grapevines. *Phytopathology* 103, 633-640.
- Jovanović, O. (1993a): Ispitivanje antagonističkog dejstva saprofitnih bakterija i gljiva prema *Agrobacterium tumefaciens*. *Zaštita bilja*, 204, 113-123.

- Jovanović, O. (1993b): Ispitivanje mogućnosti primene antibiotika u suzbijanju *Agrobacterium tumefaciens*. *Zaštita bilja*, 204, 125-132.
- Jovanović, O. (1990): Proučavanje antagonističkog dejstva nekih gljiva i bakterija prema vrsti *Agrobacterium tumefaciens* (Amith and Townsend) Conn. Magistarska teza. Poljoprivredni fakultet, Beograd-Zemun.
- Jumas-Bilak, E., Michaux-Charachon, S., Bourg, G., Ramuz, M., Allardet-Servent, A. (1998): Unconventional genomic organization in the alpha subgroup of the *Proteobacteria*. *Journal of Bacteriology* 180, 2749-2755.
- Kaufman, M., Kassemeyer, H.H., Otten, L. (1996): Isolation of *Agrobacterium vitis* from grapevine propagating material by means of PCR after immunocapture cultivation. *Vitis* 35, 151-153.
- Kawgauchi, A., Inoue, K. (2009): Grapevine crown gall caused by *Rhizobium radiobacter* (Ti) in Japan. *Journal of General Plant Pathology* 75, 205-212.
- Kawaguchi, A., Sawada, H., Ichinose, Y. (2008): Phylogenetic and serological analyses reveal genetic diversity of *Agrobacterium vitis* strains in Japan. *Plant Pathology* 57, 747-753.
- Kawaguchi, A., Sawada, H., Inoue, K., Nasu, H. (2005): Multiplex PCR for the identification of *Agrobacterium* biovar 3 strains. *Journal of General Plant Pathology* 71, 54-59.
- Keane, P.J., Kerr, A., New, P.B. (1970): Crown gall of stone fruit. II. Identification and nomenclature of *Agrobacterium* isolates. *Australian Journal of Biological Sciences* 23, 585-595.
- Kennedy, B.W., Alcorn, S.M. (1980): Estimates of U.S. crop losses to prokaryote plant pathogens. *Plant Disease* 64, 674-676.
- Kerr, A. (1969): Transfer of virulence between isolates of *Agrobacterium*. *Nature* 223, 1175-1176.
- Kerr, A., Gibb, K. (1997): Bacteria and phytoplasmas as plant parasites. In: *Plant Pathogens and Plant Diseases*. Eds. J.F. Brown, H.J. Ogle. Rockvale Publications, NSW, Australia, pp. 86-102.

- Kerr, A., Manigault, P., Tempé, J. (1977): Transfer of virulence *in vivo* and *in vitro* in *Agrobacterium*. *Nature* 265, 560-561.
- Kerr, A., Panagopoulos, C.G. (1977): Biotypes of *Agrobacterium radiobacter* var. *tumefaciens* and their biological control. *Phytopathologische Zeitschrift* 90, 172-179.
- Kerstens, K., De Ley, J. (1984): Genus III. *Agrobacterium* Conn. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 1, 8th ed. Eds. NR Krieg, JG Holt. The Williams and Wilkins Co., Baltimore-London, pp 244-254.
- Kerstens, K., De Ley, J. (1975): Identification and grouping of bacteria by numerical analysis of their electrophoretic protein patterns. *Journal of General Microbiology* 87, 333-342.
- Kerstens, K., De Ley, J., Sneath, P.H.A., Sackin, M. (1973): Numerical taxonomic analysis of *Agrobacterium*. *Journal of General Microbiology* 78, 227-239.
- Kim, H., Farrand, S.K. (1998): Opine catabolic loci from *Agrobacterium* plasmids confer chemotaxis to their cognate substrates. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11, 131-143.
- Kim, K.-S., Baek, C.-H., Lee, J.K., Yang, J.M., Farrand, S.K. (2001): Intracellular accumulation of mannopine, an opine produced by crown gall tumors, transiently inhibits growth of *Agrobacterium tumefaciens*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14, 793-803.
- Kimura, M. (1980): A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16, 111-120.
- King, E.O., Ward, M.K., Raney, D.E. (1954): Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 44, 301-307.
- Kišpatić, J. (1987): Bolesti voćaka i vinove loze. Skripta za studente smjera VVV i Zaštite bilja, Skripta fakulteta poljoprivrednih znanosti. Sveučilište u Zagrebu, Fakultet poljoprivrednih znanosti. Zagreb.

- Knauf, V.C., Panagopoulos, C.G., Nester, E.W. (1982): Genetic factors controlling the host range of *Agrobacterium tumefaciens*. *Phytopathology* 72, 1545-1549.
- Kovacs, N. (1956): Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. *Nature*. 178,703.
- Krimi, Z., Petit, A., Mougel, C., Dessaux, Y., Nesme, X. (2002): Seasonal fluctuations and long-term persistence of pathogenic populations of *Agrobacterium* spp. in soils. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 3358-3365.
- Krimi, Z., Raio, A., Nesme, X., Dessaux, Y. (2006): *Eucalyptus occidentalis* plantlets are naturally infected by pathogenic *Agrobacterium tumefaciens*. *European Journal of Plant Pathology* 116, 237-246.
- Kumagai, L., Fabritius, A.-L. (2008): Detection and differentiation of pathogenic *Agrobacterium vitis* and *Agrobacterium tumefaciens* in grapevine using multiplex Bio-PCR. Proceedings of National Viticulture Research Conference, Davis, California. pp. 42-43.
- Kuzmanović, N., Gašić, K., Ivanović, M., Prokić, A., Puławska, J., Obradović, A. (2012a): Identification and characterization of *Agrobacterium* spp. isolated from apricot in Serbia. 1st International Congress for Bacterial Diseases of Stone Fruits and Nuts. 14-17.02., Zurich, Switzerland. Book of Abstracts, 29.
- Kuzmanović, N., Gašić, K., Ivanović, M., Prokić, A., Obradović, A. (2012b): Bakteriozni rak voćaka u Srbiji. 14. Kongres voćara i vinogradara Srbije sa međunarodnim učešćem, 9-12.10., Vrnjačka Banja. Zbornik radova i apstrakata, 204.
- Kuzmanović, N., Ivanović, M., Prokić, A., Gašić, K., Blagojević, N., Puławska, J., Obradović, A. (2013): Identification and characterization of *Agrobacterium* spp. isolated from apricot in Serbia. *European Journal of Plant Pathology* 137, 11-16.
- Kwon, S.W., Park, J.Y., Kim, J.S., Kang, J.W., Cho, Y.H., Lim, C.K., Parker, M.A., Lee, G.B. (2005): Phylogenetic analysis of the genera *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* and *Sinorhizobium* on the basis of 16S rRNA gene and internally transcribed spacer region sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55, 263-270.

- Lapage, S.P., Sneath, P.H.A., Lessel Jr., E.F., Skerman, V.B.D., Seeliger H.P.R., Clark, W.A. (1992): International Code of Nomenclature of Bacteria, Revision. Bacteriological Code, American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Lassalle, F., Campillo, T., Vial, L., Baude, J., Costechareyre, D., Chapulliot, D., Shams, M., Abrouk, D., Lavire, C., Oger-Desfeux, C., Hommais, F., Guéguen, L., Daubin, V., Muller, D., Nesme, X. (2011): Genomic species are ecological species as revealed by comparative genomics in *Agrobacterium tumefaciens*. *Genome Biology and Evolution* 3, 762-781.
- Lehoczky, J. (1968): Spread of *Agrobacterium tumefaciens* in the vessels of the grapevine after natural infection. *Phytopathologische Zeitschrift* 63, 239-246.
- Lehoczky, J. (1971): Further evidences concerning the systemic spreading of *Agrobacterium tumefaciens* in the vascular system of grapevines. *Vitis* 10, 215-221.
- Li, A., Geng, J., Cui, D., Shu, C., Zhang, S., Yang, J., Xing, J., Wang, J., Ma, F., Hu, S. (2011): Genome sequence of *Agrobacterium tumefaciens* strain F2, a bioflocculant-producing bacterium. *Journal of Bacteriology* 193, 5531.
- Lim, S.H., Kim, J.G., Kang, H.W. (2009): Novel SCAR primers for specific and sensitive detection of *Agrobacterium vitis* strains. *Microbiological Research* 164, 451-460.
- Lindström, K., Martínez-Romero, M.E. (2002): International Committee on Systematics of Prokaryotes Subcommittee on the taxonomy of *Agrobacterium* and *Rhizobium*. Minutes of the meeting, 4 July 2001, Hamilton, Canada. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52, 2337.
- Lindström, K., Young, J.P.W. (2011): International Committee on Systematics of Prokaryotes. Subcommittee on the taxonomy of *Agrobacterium* and *Rhizobium*: Minutes of the meeting, 7 September 2010, Geneva, Switzerland. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 61, 3089-3093.
- Lippincott, J.A., Lippincott, B.B. (1969): Tumour-initiating ability and nutrition in the genus *Agrobacterium*. *Journal of General Microbiology* 59, 57-75.

- Llop, P., Lastra, B., Marsal, H., Murillo, J., López, M.M. (2003): Tracking *Agrobacterium* strains by a RAPD system to identify single colonies from plant tumours. *European Journal of Plant Pathology* 109, 381-389.
- López, M.M., Gorris, M.T., Montojo, A.M. (1988): Opine utilization by Spanish isolates of *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Pathology* 37, 565-572.
- López, M.M., Palacio-Bielsa, A., González-Abolafio, R., Santiago, R., Salcedo, C.I., Penyalver, R. (2008): Tumorigenic *Agrobacterium rhizogenes* (biovar 2) isolated from grapevine in Spain. *Plant Pathology* 57, 367.
- Loubser, J.T. (1978): Identification of *Agrobacterium tumefaciens* biotype 3 on grapevine in South Africa. *Plant Disease Reporter* 62, 730-731.
- Louws, F.J., Rademaker, J.L.W., de Bruijn, F.J. (1999): The three Ds of PCR-based genomic analysis of phyto bacteria: Diversity, detection, and disease diagnosis. *Annual Review of Phytopathology* 37, 81-125.
- Ma, D.Q., Yanofsky, M.F., Gordon, M.P., Nester, E.W. (1987): Characterization of *Agrobacterium tumefaciens* strains isolated from grapevine tumors in China. *Applied and Environmental Microbiology* 53, 1338-1343.
- Maiden, M.C., Bygraves, J.A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J.E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, D.A., Feavers, I.M., Achtman, M., Spratt, B.G. (1998): Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 3140-3145.
- Maier, T., Kostrzewa, M. (2007): Fast and reliable MALDI-TOF MS-based microorganism identification. *Nature Chemistry* 2568-2571.
- Martens, M., Dawyndt, P., Coopman, R., Gillis, M., De Vos, P., Willems, A. (2008): Advantages of multilocus sequence analysis for taxonomic studies: a case study using 10 housekeeping genes in the genus *Ensifer* (including former *Sinorhizobium*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58, 200-214.
- Martens, M., Delaere, M., Coopman, R., De Vos, P., Gillis, M., Willems, A. (2007): Multilocus sequence analysis of *Ensifer* and related taxa. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57, 489-503.

- Matthysse, A.G. (2006). The genus *Agrobacterium*. *Prokaryotes* 5, 91-114.
- McCullen, C.A., Binns, A.N. (2006): *Agrobacterium tumefaciens* and Plant Cell Interactions and Activities Required for Interkingdom Macromolecular Transfer. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 22, 101-127.
- McGuire, R.G., Rodriguez-Palenzuela, P., Coilmer, A., Burr, T.J. (1991): Polygalacturonase production by *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3. *Applied and Environmental Microbiology* 57, 660-664.
- Michel, M.F., Brasileiro, A.C., Depierreux, C., Otten, L., Delmotte, F., Jouanin, L. (1990): Identification of different agrobacterium strains isolated from the same forest nursery. *Applied and Environmental Microbiology* 56, 3537-3545.
- Milijašević, S., Gavrilović, V., Živković, S., Trkulja, N. and Puławska, J. (2007): First report of tumorigenic *Agrobacterium radiobacter* on raspberry in Serbia. *Pesticidi i fitomedicina*, 22, 113-119.
- Miller, H.J., Vrugink, H. (1981): An assessment of biochemical and serological tests for *Agrobacterium radiobacter* subsp. *tumefaciens*. *Phytopathologische Zeitschrift* 102, 292-300.
- Mohammadi, M., Fatehi-Paykani, R. (1999): Phenotypical characterization of Iranian isolates of *Agrobacterium vitis*, the causal agent of crown gall disease of grapevine. *Vitis* 38, 115-121.
- Momol, E.A., Burr, T.J., Reid, C.L., Momol, M.T., Otten, L. (1998): Genetic diversity of *Agrobacterium vitis* as determined by DNA fingerprints of the 5'-end of the 23S rRNA gene and Random Amplified Polymorphic DNA. *Journal of Applied Microbiology* 85, 685-692.
- Montoya, A.L., Chilton, M.-D., Gordon, M.P., Sciaky, D., Nester, E.W. (1977): Octopine and nopaline metabolism in *Agrobacterium tumefaciens* and crown gall tumor cells: role of plasmid genes. *Journal of Bacteriology* 129, 101-107.
- Moore, L.W., Bouzar, H., Burr, T. (2001): *Agrobacterium*. In: *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*, 3rd edn. Eds. N.W. Schaad, J.B. Jones, W. Chun. APS Press, St Paul, MN, USA, pp. 17-35.



- Moore, L.W., Chilton, W.S., Canfield, M.L. (1997): Diversity of opines and opine-catabolizing bacteria isolated from naturally occurring crown gall tumors. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 201-207.
- Moore, L., Warren, G., Strobel, G. (1979): Involvement of a plasmid in the hairy root disease of plants caused by *Agrobacterium rhizogenes*. *Plasmid* 2, 617-626.
- Moriguchi, K., Maeda, Y., Satou, M., Hardayani, N.S.N., Kataoka, M., Tanaka, N., Yoshida K. (2001): The complete nucleotide sequence of a plant root-inducing (Ri) plasmid indicates its chimeric structure and evolutionary relationship between tumor-inducing (Ti) and symbiotic (Sym) plasmids in *Rhizobiaceae*. *Journal of Molecular Biology* 307, 771-784.
- Mougel, C., Cournoyer, B., Nesme, X. (2001): Novel tellurite-amended media and specific chromosomal and Ti plasmid probes for direct analysis of soil populations of *Agrobacterium* biovar 1 and 2. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 65-74.
- Mougel, C., Thioulouse, J., Perrière, G., Nesme, X. (2002): A mathematical method for determining genome divergence and species delineation using AFLP. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52, 573-586.
- Nei, M., Li, W.-H. (1979): Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76, 5269-5273.
- Nesme, X., Leclerc, M.C., Bardin, R. (1990): PCR detection of an original endosymbiont: the Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. In: *Endocytobiology IV*. Eds. P. Nardon, V. Gianinazzi-Pearson, A.M. Greines, L. Margullis, C. Smith. INRA Editions, Versailles, France, pp. 47-50.
- Nesme, X., Michel, M.-F., Digat, B. (1987): Population heterogeneity of *Agrobacterium tumefaciens* in galls of *Populus* L. from a single nursery. *Applied and Environmental Microbiology* 53, 655-659.
- Nesme, X., Picard, C., Simonet, P. (1995): Specific DNA sequences for detection of soil bacteria. In: *Nucleic Acids in the Environment. Methods and applications*. Eds. J.T. Trevors, J.D. van Elsas. Springer-Verlag KG, Berlin, Germany, pp. 111-139.

- Nesme, X., Ponsonnet, C., Picard, C., Normand, P. (1992): Chromosomal and pTi genotypes of *Agrobacterium* strains isolated from *Populus* tumors in two nurseries. *FEMS Microbiology* 101, 189-196.
- New, P.B., Kerr, A. (1972): Biological Control of Crown Gall: Field Measurements and Glasshouse Experiments. *Journal of Applied Bacteriology* 35, 279-287.
- Normand, P., Ponsonnet, C., Nesme, X., Neyra, M., Simonet, P. (1996): ITS analysis of prokaryotes. In: *Molecular Microbial Ecology Manual*. Eds. A.D.L. Akkermans, J.D. van Elsas, F.J. de Bruijn. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 1-12.
- Oger, P., Dessaux, Y., Petit, A., Gardan, L., Manceau, C., Chomel, C., Nesme, X. (1998): Validity, sensitivity and resolution limit of the PCR-RFLP analysis of the *rrs* (16S rRNA gene) as a tool to identify soil-borne and plant-associated bacterial populations. *Genetics Selection Evolution* 30, S311-S321.
- OIV - International organisation of vine and wine (2012): Statistical report on world vitiviniculture, 10.
- Ophel, K., Burr, T.J., Magarey, P.A., Kerr, A. (1988): Detection of *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3 in South Australian grapevine propagation material. *Australasian Plant Pathology* 17, 61-66.
- Ophel, K., Kerr, A. (1990): *Agrobacterium vitis* sp. nov. for strains of *Agrobacterium* biovar 3 from grapevines. *International Journal of Systematic Bacteriology* 40, 236-41.
- Otten, L., Burr, T., Szegedi, E. (2008): *Agrobacterium*: a disease-causing bacterium. In: *Agrobacterium: From Biology to Biotechnology*. Eds. T. Tzfira, V. Citovsky. Springer, NY, USA, pp. 1-46.
- Otten, L., Canaday, J., Gerard, J.C., Fournier, P., Crouzet, P., Paulus, F. (1992): Evolution of agrobacteria and their Ti plasmids - a review. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 5, 279-287.
- Otten, L., de Ruffray, P., Momol, E.A., Momol, M.T., Burr, T.J. (1996): Phylogenetic relationship between *Agrobacterium vitis* isolates and their Ti plasmids. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 9, 782-786.

- Page, R.D.M. (1996): TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* 12, 357-358.
- Palacio-Bielsa, A., González-Abolafío, R., Álvarez, B., Lastra, B., Cambra, M.A., Salcedo, C.I., López, M.M., Penyalver, R. (2009): Chromosomal and Ti plasmid characterization of tumorigenic strains of three *Agrobacterium* species isolated from grapevine tumours. *Plant Pathology* 58, 584-593.
- Panagopoulos, C.G., Psallidas, P.G., Alivizatos, A.S. (1978): Studies on biotype 3 of *Agrobacterium radiobacter* var. *tumefaciens*. *Proceedings of the Fourth International Conference of Plant Pathogenic Bacteria, Angers, France*, 221-228.
- Panagopoulos, C.G., Psallidas, P.G. (1973): Characteristics of Greek isolates of *Agrobacterium tumefaciens* (E.F. Smith & Townsend) Conn. *Journal of Applied Bacteriology* 36, 233-240.
- Panday, D., Schumann, P., Das, S.K. (2011): *Rhizobium pusense* sp. nov., isolated from rhizosphere of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 61, 2632-2639.
- Panić, M. (1973): Bakteriozni rak vinove loze. *Jugoslovensko vinogradarstvo i voćarstvo* 8, 19-22.
- Panić, M. (1976): Metoda dokazivanja bakterioznog raka loznih kalemova. *Poljoprivredna znanstvena smotra, Zagreb*, 39, 301-308.
- Panić, M. (1977): O bakterioznom raku vinove loze. Savjetovanje o ekzoriozi i virusnim bolestima vinove loze. 16-18.11., Mostar. *Zbornik radova, IRC - Hepok*, 185-211.
- Panić, M. (1974): Primena zeljastih biljaka u dijagnozi bakterioznog raka voćaka. IV kongres biologa Jugoslavije, 25-29.06., Sarajevo.
- Panić, M., Dinić M. (1976): Proučavanje osobina sojeva bakterije *Agrobacterium tumefaciens* (Smith and Townsend) Conn, prouzrokovača korenovog raka jabuke. IV Kongres voćara Jugoslavije, 19-23.10., Ohrid.
- Panić, M., Ivanović, M., Dragutinović, S. (1981): Mogućnost suzbijanja raka jabuke i vinove loze primenom pesticida. *Glasnik zaštite bilja* 10-11, 369.

- Paphitou, N.I., Rolston, K.V. (2003): Catheter related bacteremia caused by *Agrobacterium radiobacter* in a cancer patient: case report and literature review. *Infection* 31, 421-424.
- Paulus, F., Huss, B., Bonnard, G., Ridé, M., Szegedi, E., Tempé, J., Petit, A., Otten, L. (1989a): Molecular systematics of biotype III Ti plasmids of *Agrobacterium tumefaciens*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 2, 64-74.
- Paulus, F., Ridé, M., Otten, L. (1989b): Distribution of two *Agrobacterium tumefaciens* insertion elements in natural isolates: Evidence for stable association between Ti plasmids and their bacterial hosts. *Molecular and General Genetics* 219, 145-152.
- Peduto, F., Marchi, G., Surico, G. (2010): Indexing *Agrobacterium vitis* in asymptomatic grapevine propagation material by two nested PCR assays. *American Journal of Enology and Viticulture* 61, 102-112.
- Peluso, R., Raio, A., Morra, F., Zoina, A. (2003): Physioplogical, biochemical and molecular analyses of an Italian collection of *Agrobacterium tumefaciens* strains. *European Journal of Plant Pathology* 109, 291-300.
- Petit, A., Tempé, J. (1985): The function of T-DNA in nature. In: *Molecular form and function of the plant genome*. Eds. L. Van Vloten-Doting, G.S.P. Groot, T.C. Hall. New York and London: Plenum Press, pp. 625-636.
- Picard, C., Ponsonnet, C., Paget, E., Nesme, X., Simonet, P. (1992): Detection and enumeration of bacteria in soil by direct DNA extraction and polymerase chain reaction. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 2717-2722.
- Pionnat, S., Keller, H., Hericher, D., Bettachini, A., Dessaux, Y., Nesme, X., Poncet, C. (1999): Ti plasmids from *Agrobacterium* characterize rootstock clones that initiated a spread of crown gall disease in Mediterranean countries. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 4197-4206.
- Ponsonnet, C., Nesme, X. (1994): Identification of *Agrobacterium* strains by PCR-RFLP analysis of pTi and chromosomal regions. *Archives of Microbiology* 161, 300-309.

- Popoff, M.Y., Kersters, K., Kiredjian, M., Miras, I., Coynault, C. (1984): Position taxonomique de souches de *Agrobacterium* d'origine hospitalière. *Annals of Microbiology* 135A, 427-442.
- Poppenberger, B., Leonhardt, W. Redl, H. (2002): Latent persistence of *Agrobacterium vitis* in micropropagated *Vitis vinifera*. *Vitis* 41, 113-114.
- Portier, P., Fischer-Le Saux, M., Mougel, C., Lerondelle, C., Chapulliot, D., Thioulouse, J., Nesme, X. (2006): Identification of genomic species from *Agrobacterium* biovar 1 by AFLP genomic markers. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 123-131.
- Posada, D., Crandall, K.A., Holmes, E.C. (2002): Recombination in evolutionary genomics. *Annual Review of Genetics* 36, 75-97.
- Pothier, J.F., Pflueger, V., Ziegler, D., Tonolla, M., Vogel G., Duffy, B. (2011): MALDI-TOF mass spectrometry: Applications for rapid bacterial identification and phylogenetic analysis. *Phytopathology* 101, S145.
- Puławska, J., Kałużna, M. (2011): Phylogenetic relationship and genetic diversity of *Agrobacterium* spp. isolated in Poland based on *gyrB* gene sequence analysis and RAPD. *European Journal of Plant Pathology* 133, 379-390.
- Puławska, J., Maes, M., Willems, A., Sobiczewski, P. (2000): Phylogenetic analysis of 23S rRNA gene sequences of *Agrobacterium*, *Rhizobium* and *Sinorhizobium* strains. *Systematic and Applied Microbiology* 23, 238-244.
- Puławska, J., Malinowski, T., Sobiczewski, P. (1998): Diversity of plasmids of *Agrobacterium tumefaciens* isolated from fruit trees in Poland. *Journal of Phytopathology* 146, 465-468.
- Puławska, J., Sobiczewski, P. (2005): Development of a semi-nested PCR-based method for sensitive detection of tumorigenic *Agrobacterium* in soil. *Journal of Applied Microbiology* 98, 710-721.
- Puławska, J., Willems, A., De Mayer, S., Süle, S. (2012a): *Rhizobium nepotum* sp. nov. isolated from tumors on different plant species. *Systematic and Applied Microbiology* 35, 215-220.

- Puławska, J., Willems, A., Sobiczewski, P. (2006): Rapid and specific identification of four *Agrobacterium* species and biovars using multiplex PCR. *Systematic and Applied Microbiology* 29, 470-479.
- Puławska, J., Willems, A., Sobiczewski, P. (2012b): *Rhizobium skierniewicense* sp. nov. isolated from tumors on chrysanthemum and cherry plum. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62, 895-899.
- Puopolo, G., Raio, A., Zoina, A. (2007): Early detection of *Agrobacterium tumefaciens* in symptomless artificially inoculated *Chrysanthemum* and peach plants using PCR. *Journal of Plant Pathology* 89, 185-190.
- Rademaker, J.L.W., de Bruijn, F.J. (1997). Characterization and classification of microbes by rep-PCR genomic fingerprinting and computer assisted pattern analysis. In: *DNA Markers: Protocols, Applications and Overviews*. Eds. G. Caetano-Anollés, P.M. Gresshoff. John Wiley, NY, USA. pp. 151-171.
- Raio, A., Peluso, R., Nesme, X., Zoina, A. (2004): Chromosomal and plasmid diversity of *Agrobacterium* strains isolated from *Ficus benjamina* tumors. *European Journal of Plant Pathology* 110, 163-174.
- Rezzonico, F., Vogel, G., Duffy, B., Tonolla, M. (2010): Application of whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for rapid identification and clustering analysis of *Pantoea* species. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 4497-4509.
- Rhouma, A., Boubaker, A., Nesme, X., Dessaux, Y. (2006): Plasmid and chromosomal diversity of a Tunisian collection of *Agrobacterium tumefaciens* strains. *Tunisian Journal of Plant Protection* 1, 73-84.
- Ridé, M., Ridé, S., Petit, A., Bollet, C., Dessaux, Y., Gardan, L. (2000): Characterization of plasmid-borne and chromosome-encoded traits of *Agrobacterium* biovar 1, 2 and 3 strains from France. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 1818-1825.
- Riker, A.J., Banfield, W.M., Wright, W.H., Keitt, G.W., Sagen, H.E. (1930): Studies on infectious hairy root of nursery trees of apples. *Journal of Agricultural Research* 41, 507-540.

- Rodriguez-Palenzuela, P., Burr, T.J., Collmer, A. (1991): Polygalacturonase is a virulence factor in *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3. *Journal of Bacteriology* 173, 6547-6552.
- Rouhrazi, K., Rahimian, H. (2012a): Characterization of Iranian grapevine isolates of *Rhizobium (Agrobacterium)* spp. *Journal of Plant Pathology* 94, 555-560.
- Rouhrazi, K., Rahimian, H. (2012b): Genetic diversity of Iranian *Agrobacterium* strains from grapevine. *Annals of Microbiology* 62, 1661-1667.
- Roy, M.A., Sasser, M. (1983): A medium selective for *Agrobacterium tumefaciens* biotype 3. *Phytopathology* 73, 810.
- Rozas, J., Sanchez-Del Barrio, J.C., Messeguer, X., Rozas, R. (2003): DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19, 2496-2497.
- RSZ - Republički zavod za statistiku (2012): Statistički godišnjak Republike Srbije, Poglavlje 9: Poljoprivreda, 211.
- Ruffing, A.M., Castro-Melchor, M., Hu, W.-S., Chen, R.R. (2011): Genome sequence of the curdolan-producing *Agrobacterium* sp. strain ATCC 31749. *Journal of Bacteriology* 193, 4294-4295.
- Rüger, H.-J., Höfle, M.G. (1992): Marine star-shaped-aggregate-forming bacteria: *Agrobacterium atlanticum* sp. nov., nom. rev.; *Agrobacterium meteori* sp. nov.; *Agrobacterium ferrugineum* sp. nov., nom. rev.; *Agrobacterium gelatinovorum* sp. nov., nom. rev.; and *Agrobacterium stellulatum* sp. nov., nom. rev. *International Journal of Systematic Bacteriology* 42, 133-143.
- Sachadyn, P., Kur, J. (1997): A new PCR system for *Agrobacterium tumefaciens* detection based on amplification of T-DNA fragment. *Acta Microbiologica Polonica* 46, 145-156.
- Saïdi, S., Mnasri, B., Mhamdi, R. (2011): Diversity of nodule-endophytic agrobacteria-like strains associated with different grain legumes in Tunisia. *Systematic and Applied Microbiology* 34, 524-530.

- Saitou, N., Nei, M. (1987): The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.
- Salmassi, T.M., Venkateswaram, K., Satomi, M., Neilson, K.H., Newman, D.K., Hering, J.G. (2002): Oxidation of arsenite by *Agrobacterium albertimagni* AOL15, sp. nov., isolated from Hot Creek, California. *Geomicrobiology Journal* 19, 53-66.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74, 5463-5467.
- Sawada, H., Ieki, H. (1992a): Crown gall of kiwifruit caused by *Agrobacterium tumefaciens* in Japan. *Plant Disease* 76, 212.
- Sawada, H., Ieki, H. (1992b): Phenotypic characteristics of the genus *Agrobacterium*. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 58, 37-45.
- Sawada, H., Ieki, H., Kobayashi, S., Oiyama, I. (1992a): Grouping of tumorigenic *Agrobacterium* spp. based on Ti plasmid-related phenotypes. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 58, 244-252.
- Sawada, H., Ieki, H., Masuda, I. (1995): PCR detection of Ti and Ri plasmids from phytopathogenic *Agrobacterium* strains. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 828-831.
- Sawada, H., Ieki, H., Oyaizu, H., Matsumoto, S. (1993): Proposal for rejection of *Agrobacterium tumefaciens* and revised descriptions for the genus *Agrobacterium* and for *Agrobacterium radiobacter* and *Agrobacterium rhizogenes*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 43, 694-702.
- Sawada, H., Ieki, H., Takikawa, Y. (1990): Identification of grapevine crown gall bacteria isolated in Japan. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 56, 199-206.
- Sawada, H., Imada, J., Ieki, H. (1992b): Evaluation of serodiagnosis for differentiating serogroups of *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 58, 91-94.



- Sawada, H., Imada, J., Ieki, H. (1992c): Serogroups of *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3 determined using somatic antigens. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 58, 52-57.
- Sawada, H., Oyaizu, H., Matsumoto, S., Ieki, H. (1992d): Differentiation of *Agrobacterium* taxa based on partial sequences of 16S rRNA. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 58, 761-765.
- Sawada, H., Takikawa, Y., Ieki, H. (1992e): Fatty acid methyl ester profiles of the genus *Agrobacterium*. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 58, 46-51.
- Schaad, N.W., Jones, J.B., Chun, W. (2001): *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. The American Phytopathological Society, St. Paul, USA.
- Schroth, M.N., McCain, A.H., Foott, J.H., Huisman, O.C. (1988): Reduction in yield and vigor of grapevine caused by crown gall disease. *Plant Disease* 72, 241-246.
- Schroth, M.N., Thompson, J.P., Hildebrand, D.C. (1965): Isolation of *Agrobacterium tumefaciens*-*Agrobacterium radiobacter* group from soil. *Phytopathology* 55, 645-647.
- Schroth, M.N., Weinhold, A.R., McCain, A.H., Hildebrand, D.C., Ross, N. (1971): Biology and control of *Agrobacterium tumefaciens*. *Hilgardia* 40, 537-552.
- Schulz, T.F., Bauer, C., Lorenz, D., Plapp, R., Eichhorn, K.W. (1993a): Studies on the evolution of *Agrobacterium vitis* as based on genomic fingerprinting and IS element analysis. *Systematic and Applied Microbiology* 16, 322-329.
- Schulz, T.F., Lorenz, D., Eichhorn, K.W., Otten, L. (1993b): Amplification of different marker sequences for identification of *Agrobacterium vitis* strains. *Vitis* 32, 179-182.
- Shams, M., Vial, L., Chapulliot, D., Nesme, X., Lavire, C. (2013): Rapid and accurate species and genomic species identification and exhaustive population diversity assessment of *Agrobacterium* spp. using *recA*-based PCR. *Systematic and Applied Microbiology* 36, 351-358.
- Sheikholeslam, S., Lin, B.-C., Kado, C.I. (1979): Multiple-size plasmids in *Agrobacterium radiobacter* and *A. tumefaciens*. *Phytopathology* 69, 54-58.

- Simmons, J.S. (1926): A culture medium for differentiating organisms of typhoid-colon aerogenes groups and for isolation of certain fungi. *The Journal of Infectious Diseases* 39, 209.
- Skerman, V.B.D., McGowan, V., Sneath, P.H.A. (1980): Approved lists of bacterial names. *International Journal of Systematic Bacteriology* 30, 225-420.
- Slater, S.C., Goldman, B.S., Goodner, B., Setubal, J.C., Farrand, S.K., Nester, E.W., Burr, T.J., Banta, L., Dickerman, A.W., Paulsen, I., Otten, L., Suen, G., Welch, R., Almeida, N.F., Arnold, F., Burton, O.T., Du, Z., Ewing, A., Godsy, E., Heisel, S., Houmiel, K. L., Jhaveri, J., Lu, J., Miller, N.M., Norton, S., Chen, Q., Phoolcharoen, W., Ohlin, V., Ondrusek, D., Pride, N., Stricklin, S.L., Sun, J., Wheeler, C., Wilson, L., Zhu, H., Wood, D.W. (2009): Genome sequences of three *Agrobacterium* biovars help elucidate the evolution of multichromosome genomes in bacteria. *Journal of Bacteriology* 191, 2501-2511.
- Smith, E.F., Townsend, C.O. (1907): A plant tumor of bacterial origin. *Science* 25, 671-673.
- Sobiczewski, P. (1996): Etiology of crown gall on fruit trees in Poland. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research* 4, 147-161.
- Sobiczewski, P., Puławska, J., Berczynski, S., (2005): Practical use of PCR-based method for detection of tumorigenic *Agrobacterium* in soil. *Phytopathologia Polonica* 35, 79-84.
- Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G.M., Grimont, P.A.D., Kämpfer, P., Maiden, M.C.J., Nesme, X., Rosselló-Mora, R., Swings, J., Trüper, H.G., Vauterin, L., Ward, A.C., Whitman, W.B. (2002): Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52, 1043-1047.
- Staphorst, J.L., van Zyl, F.G.H., Strijdom, B.W., Groenewold, Z.E. (1985): Agrocinn-producing pathogenic and nonpathogenic biotype-3 strains of *Agrobacterium tumefaciens* active against biotype-3 pathogens. *Current Microbiology* 12, 45-52.
- Stonier, T. (1960): *Agrobacterium tumefaciens* Conn. II. Production of an antibiotic substance. *Journal of Bacteriology* 79, 889-898.

- Studholme, D.J., Glover, R.H., Boonham, N. (2011): Application of high-throughput DNA sequencing in phytopathology. *Annual Review of Phytopathology* 49, 87-105.
- Süß, J., Schubert, K., Sass, H., Cypionka, H., Overmann, J., Engelen, B. (2006): Widespread distribution and high abundance of *Rhizobium radiobacter* within Mediterranean subsurface sediments. *Environmental Microbiology* 8, 1753-1763.
- Süle, S (1978): Biotypes of *Agrobacterium tumefaciens* in Hungary. *Journal of Applied Bacteriology* 44, 207-213.
- Süle, S., Horká, M., Matoušková, H., Kubesová, A., Salplachta, J., Horký, J. (2012): Characterization of *Agrobacterium* species by capillary isoelectric focusing. *European Journal of Plant Pathology* 132, 81-89.
- Suslow, T.V., Schroth, M.N., Isaka, M. (1982): Application of a rapid method for Gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. *Phytopathology* 72, 917-918.
- Suzaki, K., Yoshida, K., Sawada, H. (2004): Detection of tumorigenic *Agrobacterium* strains from infected apple saplings by colony PCR with improved PCR primers. *Journal of General Plant Pathology* 70, 342-347.
- Suzuki, K., Iwata, K. Yoshida, K. (2001): Genome analysis of *Agrobacterium tumefaciens*: construction of physical maps for linear and circular chromosomal DNAs, determination of copy number ratio and mapping of chromosomal virulence genes. *DNA Research* 8, 141-152.
- Szegedi, E. (2003): Opines in naturally infected grapevine crown gall tumors. *Vitis* 42: 39-41.
- Szegedi, E., Bottka, S. (2002): Detection of *Agrobacterium vitis* by polymerase chain reaction in grapevine bleeding sap after isolation on a semiselective medium. *Vitis* 41, 37-42.
- Szegedi, E., Bottka, S., Mikulás, J., Otten, L., Süle, S. (2005): Characterization of *Agrobacterium tumefaciens* strains isolated from grapevine. *Vitis* 44, 49-54.

- Szegedi, E., Czakó, M., Otten, L., Koncz, C.S. (1988): Opines in crown gall tumours induced by biotype 3 isolates of *Agrobacterium tumefaciens*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 32, 237-247.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. (2011): MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28, 2731-2739.
- Tan, B.S., Yabuki, J., Matsumoto, S., Kageyama, K., Fukui, H. (2003): PCR primers for identification of opine types of *Agrobacterium tumefaciens* in Japan. *Journal of General Plant Pathology* 69, 258-266.
- Tarbah, F.A., Goodman, R.N. (1986): Rapid detection of *Agrobacterium tumefaciens* in grapevine propagating material and the basis for an efficient indexing system. *Plant Disease* 70, 566-568.
- Tarbah, F.A., Goodman, R.N. (1987): Systemic spread of *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3 in the vascular system of grapes. *Phytopathology* 77, 915-920.
- Thies, K.L., Griffin, D.E., Graves, C.H., Hegwood, C.P. (1991): Characterization of *Agrobacterium* isolates from muscadine grape. *Plant Disease* 75, 634-637.
- Tighe, S.W., de Lajudie, P., Dipietro, K., Lindström, K., Nick, G., Jarvis, B.D.W. (2000): Analysis of cellular fatty acids and phenotypic relationships of *Agrobacterium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* and *Sinorhizobium* species using the Sherlock Microbial Identification System. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50, 787-801.
- Tolba, I.H., Zaki, M.F. (2011): Characterization of *Agrobacterium vitis* isolates obtained from galled grapevine plants in Egypt. *Annals of Agricultural Science* 56, 113-119.
- Tremblay, G., Gagliardo, R., Chilton, W.S., Dion, P. (1987): Diversity among opine-utilizing bacteria: identification of coryneform isolates. *Applied and Environmental Microbiology* 53, 1519-1524.

- Trimble, W.L., Phung, L.T., Meyer, F., Gilbert, J.A., Silver, S. (2012): Draft genome sequence of *Agrobacterium albertimagni* strain AOL15. *Journal of Bacteriology* 194, 6986-6987.
- Untergrasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B.C., Remm, M., Rozen, S.G. (2012): Primer3 - new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research* 40, e115.
- Urbanczyk, H., Suzuki, K., Yoshida, K., Kondo, K. (2003): Physical and gene maps of *Agrobacterium* biovar 2 strains and their relationship to biovar 1 chromosomes. *Microbiology* 149, 3035-3042.
- Van Larebeke, N., Engler, G., Holsters, M., Van den Elsacker, S., Zaenen, I., Schilperoort, R.A., Schell, J. (1974): Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall-inducing ability. *Nature* 252, 169-170.
- Vanechoutte, M., Rossau, R., De Vos, P., Gillis, M., Janssens, D., Paepe, N., De Rouck, A., Fiers, T., Claeys, G., Kersters, K. (1992): Rapid identification of bacteria of the Common- adadceae with amplified ribosomal DNA-restriction analysis (ARDRA). *FEMS Microbiology Letters* 93, 227-234.
- Velázquez, E., Palomo, J.L., Lastra, B., Mateos, P., García-Benavides, P., Martínez-Molina, E. (2001): Rapid identification of *Agrobacterium* species by staircase electrophoresis of low molecular weight RNA profiles. *European Journal of Plant Pathology* 107, 931-938.
- Velázquez, E., Peix, A., Zurdo-Pineiro, J.L., Palomo, J.L., Mateos, P.F., Rivas, R., Muñoz-Adelantado, E., Toro, N., García-Benavides, P., Martínez-Molina, E. (2005): The coexistence of symbiosis and pathogenicity-determining genes in *Rhizobium rhizogenes* strains enables them to induce nodules and tumours or hairy roots in plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 18, 1325-1332.
- Versalovic, J., Koeuth, T., Lupski, J.R. (1991): Distribution of repetitive DNA-sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research* 19, 6823-6831.

- 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.
- Vogel, J., Normand, P., Thioulouse, J., Nesme, X., Grundmann, G. (2003): Relationship between spatial and genetic distance in *Agrobacterium* spp. in 1 cubic centimeter of soil. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 1482-1487.
- Watson, B., Currier, T.C., Gordon, M.P., Chilton, M.D., Nester, E.W. (1975): Plasmid required for virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Bacteriology* 123, 255-264.
- Wayne, L.G., Brenner, D.J., Colwell, R.R., Grimont, P.A.D., Kandler, O., Krichevsky, M.I., Moore, L.H., Moore, W.E.C., Murray, R.G.E., Stackebrandt, E., Starr, M.P., Trüper, H.G. (1987): Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *International Journal of Systematic Bacteriology* 37, 463-464.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., Lane, D.J. (1991): 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* 173, 697-703.
- Weller, S.A., Stead, D.E. (2002): Detection of root mat associated *Agrobacterium* strains from plant material and other sample types by post-enrichment TaqMan PCR. *Journal of Applied Microbiology* 92, 118-126.
- Welsh, J., McClelland, M. (1990): Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research* 18, 7213-7218.
- White, L.O. (1972): The taxonomy of the crown-gall organism *Agrobacterium tumefaciens* and its relationship to rhizobia and other agrobacteria. *Journal of General Microbiology* 72, 565-574.
- White, P.R., Braun, A.C. (1942): A cancerous neoplasm of plants: autonomous bacteria-free crown gall tissue. *Cancer Research* 2, 597-617.
- Wibberg, D., Blom, J., Jaenicke, S., Kollin, F., Rupp, O., Scharf, B., Schneiker-Bekel, S., Sczcepanowski, R., Goesmann, A., Setubal, J.C., Schmitt, R., Pühler, A., Schlüter, A. (2011): Complete genome sequencing of *Agrobacterium* sp. H13-3, the former *Rhizobium lupini* H13-3, reveals a tripartite genome consisting of a circular

- and a linear chromosome and an accessory plasmid but lacking a tumor-inducing Ti-plasmid. *Journal of Bacteriology* 155, 50-62.
- Willems, A., Collins, M.D. (1993): Phylogenetic analysis of rhizobia and agrobacteria based on 16S rRNA gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology* 43, 305-313.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V. (1990): DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18, 6531-6535.
- Woese, C.R. (1987): Bacterial evolution. *Microbiological Review* 51, 221-271.
- Wood, D.W., Setubal, J.C., Kaul, R., Monks, D.E., Kitajima, J.P., Okura, V.K., Zhou, Y., Chen, L., Wood, G.E., Almeida, N.F., Woo, L., Chen, Y.C., Paulsen, I.T., Eisen, J.A., Karp, P.D., Bovee, D., Chapman, P., Clendenning, J., Deatherage, G., Gillet, W., Grant, C., Kutayavin, T., Levy, R., Li, M.J., McClelland, E., Palmieri, A., Raymond, C., Rouse, G., Saenphimmachak, C., Wu, Z.N., Romero, P., Gordon, D., Zhang, S.P., Yoo, H.Y., Tao, Y.M., Biddle, P., Jung, M., Krespan, W., Perry, M., Gordon-Kamm, B., Liao, L., Kim, S., Hendrick, C., Zhao, Z.Y., Dolan, M., Chumley, F., Tingey, S.V., Tomb, J.F., Gordon, M.P., Olson, M.V., Nester, E.W. (2001): The genome of the natural genetic engineer *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science* 294, 2317-2323.
- Yakabe, L.E., Maccree, M.M., Sudarshana, P., McClean, A.E., Parker, S.R, Wechter, W.P., Presting, G., Marutani-Hert, M., Kluepfel, D.A. (2012): Novel PCR primers for detection of genetically diverse virulent *Agrobacterium tumefaciens* biovar 1 strains. *Journal of General Plant Pathology* 78, 121-126.
- Yang, W., Ji, L., Tan, L.-R., Li, S.-M., Wang, Y., Liu, H.-X., Luo, Y.-M. (2011): Sensitive and specific detection of *Agrobacterium tumefaciens* in soil using a rapid polymerase chain reaction (PCR). *African Journal of Microbiology Research* 5, 708-713.
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., Madden, T. (2012): Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* 13, 134.

- Young, J.M., Kerr, A., Sawada, H. (2005): Genus *Agrobacterium* Conn 1942. In: The *Proteobacteria*. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd ed., vol. 2. Eds. D.J. Brenner, N.R. Krieg, J.T. Staley, G. Garrity. Springer, New York, USA, pp. 340-345.
- Young, J.M., Kuykendall, L.D., Martinez-Romero, E., Kerr, A., Sawada, H. (2001): A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* De Lajudie et al. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 51, 89-103.
- Young, J.M., Kuykendall, L.D., Martinez-Romero, E., Kerr, A., Sawada, H. (2003): Classification and nomenclature of *Agrobacterium* and *Rhizobium* - a reply to Farrand, van Berkum and Oger. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 53, 1689-1695.
- Young, J.M., Park, D.C., Weir, B.S. (2004): Diversity of 16S rDNA sequences of *Rhizobium* spp. implications for species determinations. FEMS Microbiology Letters 238, 125-131.
- Young, J.M., Pennycook, S.R., Watson, D.R.W. (2006): Proposal that *Agrobacterium radiobacter* has priority over *Agrobacterium tumefaciens*. Request for an opinion. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 56, 491-493.
- Zaenen, I., Van Larebeke, N., Van Montagu, M., Schell, J. (1974): Supercoiled circular DNA in crown gall inducing *Agrobacterium* strains. Journal of Molecular Biology 86, 109-127.
- Zhu, J., Oger, P.M., Schrammeijer, B., Hooykaas, P.J.J., Farrand, S.K., Winans, S.C. (2000): The bases of crown gall tumorigenesis. Journal of Bacteriology 182, 3885-3895.
- Zidarič, I. (2009): Monitoring of bacteria of the genus *Agrobacterium* on grapevine in 2006 and 2007. 9th Slovenian Conference on Plant Protection. 04.-05.03. Nova Gorica, Slovenia. Book of lectures and papers, 225-229.



Zupan, J., Muth, T.R., Draper, O., Zambryski, P. (2000): The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. *The Plant Journal* 23, 11-28.

## Biografija

Nemanja Kuzmanović rođen je 13.06.1986. godine u Beogradu. Osnovnu školu i gimnaziju završio je u Beogradu. Odsek za zaštitu bilja i prehrambenih proizvoda na Poljoprivrednom fakultetu Univerziteta u Beogradu, upisao je školske 2005/06 godine. Diplomirao je 2009. godine, sa prosečnom ocenom 9,11, odbranivši diplomski rad pod nazivom „Toksini *Pseudomonas syringae* i detekcija siringomicina“. Na Odseku za Fitomedicinu istog fakulteta, školske 2009/10 godine, upisuje doktorske akademske studije. Od februara 2010. angažovan je kao stipendista doktorand u Laboratoriji za fitobakteriologiju pod rukovodstvom prof. dr Alekse Obradovića.

U toku 2010. godine učestvovao je u organizaciji međunarodnog kursa iz oblasti fitobakteriologije pod nazivom: „*Pseudomonas* Pathogens of Stone Fruits and Nuts: Classical and Molecular Phytobacteriology“ koji je održan na Poljoprivrednom fakultetu u Beogradu. U okviru projekta “COST Action 873 - Bacterial diseases of stone fruits and nuts” pohađao je intenzivni kurs: “Phytopathology Training Course for the Biosecurity Pathogen, *Xylella fastidiosa*” koji je održan na Mediteranskom agronomskom institutu u Bariju, Italija. U toku 2011. godine realizovao je jednomesečni studijski boravak pod nazivom: “Isolation, molecular identification and genetic diversity study of *Agrobacterium* spp.” u Laboratoriji za bakteriologiju Instituta za hortikulturu u Skjernevicama, Poljska. U toku 2011. godine, učestvovao je na intenzivnom kursu: “*Agrobacterium* Phytobacteriology Training Course” koji je održan na Univerzitetu u Lionu, Francuska. Tokom 2011. i 2012. godine, realizovao je desetomesečni studijski boravak na Poljoprivrednom fakultetu Univerziteta u Bolonji, u svojstvu studenta doktoranda na razmeni.

Kao stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije bio je angažovan u okviru projekta Ministarstva nauke i tehnološkog razvoja TR20062: “Biološka zaštita kao alternativa hemijskim sredstvima za zaštitu bilja”. Trenutno je angažovan na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja III46008: “Razvoj integrisanih sistema upravljanja štetnim organizmima u biljnoj proizvodnji sa ciljem prevazilaženja rezistentnosti i unapređenja kvaliteta i bezbednosti hrane”. Učestvovao je i u realizaciji međunarodnog projekta „Ring Test on Diagnosis

and Detection of *Erwinia amylovora*” u toku 2010. godine. U periodu 2010-2013. godine bio je angažovan na realizaciji projekata Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede, u nadzoru pojedinih poljoprivrednih kultura na prisustvo karantinskih fitopatogenih bakterija.

Tokom doktorskih studija objavio je i saopštio veći broj naučnih i stručnih radova u domaćim i međunarodnim časopisima iz oblasti fitopatologije i učestvovao na više nacionalnih i međunarodnih naučnih skupova. Član je Društva za zaštitu bilja Srbije i Društva mikrobiologa Srbije.

Prilog 1.

## Izjava o autorstvu

Potpisani-a Nemanja Kuzmanović

Broj indeksa ili prijave doktorske disertacije 39/09

### Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom:

IDENTIFIKACIJA, KARAKTERIZACIJA I GENETIČKI DIVERZITET SOJEVA  
*Agrobacterium* spp., PROUZROKOVAČA BAKTERIOZNOG RAKA VINOVE  
LOZE

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

Potpis doktoranda

U Beogradu, 04.10.2013

Nemanja Kuzmanović

Prilog 2.

**IZJAVA O ISTOVETNOSTI ŠTAMPANE I ELEKTRONSKE  
VERZIJE DOKTORSKE DISERTACIJE**

Ime i prezime autora Nemanja Kuzmanović

Broj indeksa ili prijave doktorske disertacije 39/09

Studijski program Poljoprivredne nauke, Modul: Fitomedicina

Naslov doktorske disertacije IDENTIFIKACIJA, KARAKTERIZACIJA I  
GENETIČKI DIVERZITET SOJEVA *Agrobacterium* spp., PROUZROKOVAČA  
BAKTERIOZNOG RAKA VINOVE LOZE

Mentor prof. dr Aleksa Obradović

Potpisani/a Nemanja Kuzmanović

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

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

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

**Potpis doktoranda**

U Beogradu, 04.10.2013.

Nemanja Kuzmanović

### Prilog 3.

#### Izjava o korišćenju

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

IDENTIFIKACIJA, KARAKTERIZACIJA I GENETIČKI DIVERZITET SOJEVA  
Agrobacterium spp., PROUZROKOVAČA BAKTERIOZNOG RAKA VINOVE  
LOZE

koja je moje autorsko delo.

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

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

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

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

**Potpis doktoranda**

U Beogradu, 04.10.2013.



1. **Autorstvo** - Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.

2. **Autorstvo** - nekomercijalno. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

3. **Autorstvo** - nekomercijalno - bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.

4. **Autorstvo** - nekomercijalno - deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.

5. **Autorstvo** - bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

6. **Autorstvo** - deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.