

UNIVERZITET U BEOGRADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET

mr Maja V. Ignjatov

DIVERZITET POPULACIJE
***Xanthomonas* spp. PATOGENA PAPRIKE U**
SRBIJI

Doktorska disertacija

Beograd, 2013.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF AGRICULTURE

mr Maja V. Ignjatov

**DIVERSITY OF *Xanthomonas* spp.
POPULATION - PEPPER PATHOGENS IN
SERBIA**

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 Mirjana Milošević, naučni savetnik
Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad

dr Jelica Gvozdanović-Varga, viši naučni saradnik
Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad

dr Milan Ivanović
Univerzitet u Beogradu - Poljoprivredni fakultet

Datum odbrane: _____

Zahvalnica

- ❖ *Posebno se zahvaljujem svom mentoru profesoru dr Aleksi Obradoviću, koji je definisao plan i program istraživanja ove doktorske disertacije. Zahvaljujem se na velikom strpljenju, predusretljivosti, bezrezervnoj podršci i prenetom znanju tokom zajedničkog rada.*
- ❖ *Veliko hvala profesorki dr Mirjani Milošević na savetima, podršci i svemu što me je naučila.*
- ❖ *Zahvalnost dugujem profesorki dr Jelici Balaž na prenetom znanju i pravovremenim savetima tokom višegodišnje saradnje.*
- ❖ *dr Jelici Gvozdanović - Varga hvala na konstruktivnim savetima i sugestijama.*
- ❖ *Veliku zahvalnost dugujem dr Zorici Nikolić na prijateljskoj podršci i dragocenim sugestijama koje su značajno doprinele kvalitetu disertacije.*
- ❖ *Zahvaljujem se dr Katarini Gašić, dr Milanu Ivanoviću i dipl. ing Milanu Ševiću na podršci i pomoći u eksperimentalnom radu.*
- ❖ *Želim da izrazim svoju zahvalnost kolegici mr Dragani Milošević i dipl. ing Aranki Jevtić, kao i svim kolegama iz Laboratorije za ispitivanje semena, Instituta za ratarstvo i povrtarstvo.*
- ❖ *Zahvaljujem se svom sinu Stefanu, porodici i prijateljima na razumevanju i podršci.*

Doktorska disertacija realizovana je u okviru projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja, Republike Srbije, TR31030, pod nazivom: «Stvaranje sorata i hibrida povrća za gajenje na otvorenom polju i zaštićenom prostoru».

DIVERZITET POPULACIJE *Xanthomonas* spp. PATOGENA PAPRIKE U SRBIJI

Rezime. Tokom 2008, 2009 i 2010. godine prikupljeni su uzorci obolelog lišća paprike sa simptomima bakteriозne pegavosti iz različitih lokaliteta Republike Srbije. Izolacijom iz zaraženih listova dobijeno je 116 sojeva bakterija.

Proučavanja patogenih, biohemijsko-fizioloških odlika ukazuju da proučavani sojevi pripadaju vrsti *Xanthomonas euvesicatoria*.

Primenom dva serološka testa (DAS - ELISA i test aglutinacije) potvrđena je antigena uniformnost proučavanih sojeva, kao i serološka sličnost sa bakterijom *X. c. pv. vesicatoria*.

Diferencijacija *Xanthomonas* spp. prouzrokovača bakteriозne pegavosti paprike izvršena je primenom dve molekularne metode. Prvi metod zasnivao se na restrikcionoj analizi - RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) fragmenta *hrp* gena (*HrpB* regiona) nakon digestije (sečenja) dobijenih proizvoda restrikcionim enzimima (*CfoI*, *TaqI* i *HaeIII*). Poređenjem restrikcionih profila proučavanih sojeva sa kontrolnim sojevima, potvrđena je sličnost sa vrstom *X. euvesicatoria*.

Drugi molekularni metod je lančana reakcija polimeraze primenom specifičnih prajmera koji amplifikuju proizvode različite veličine specifične za: *X. euvesicatoria* – 173 bp; *X. vesicatoria* – 138 bp; *X. perforans* – 197 bp i *X. gardneri* – 154 bp. Kod svih proučavanih sojeva, uključujući i kontrolni soj *X. euvesicatoria* KFB (189) detektovani su fragmenti DNK veličine 173 bp, koji odgovaraju vrsti *X. euvesicatoria*. Utvrđeno je da je prag detekcije ove metode $0,4 \times 10^3$ CFU/ml.

Proučeno je dejstvo bakar-sulfata (CuSO_4), antibiotika streptomicina i kasugamicina, pri različitim koncentracijama, na razvoj bakterijskih ćelija u *in vitro* uslovima. U podlogu su dodati filterom sterilisani rastvori bakar-sulfata do konačne koncentracije od 100 i 200 ppm tj. aktivne komponente navedenih antibiotika do konačne koncentracije od 50, 100 i 200 ppm. Sojevi rezistentni na streptomicin nisu detektovani ovim istraživanjima. Rezistentnost prema 50 ppm kasugamicina utvrđena je kod 6 sojeva, a 19 sojeva je bilo rezistentno na 200 ppm bakar-sulfata. Dobijeni rezultati ukazuju na opasnost od razvoja rezistentnosti bakterija prema ovim jedinjenjima.

Zastupljenost pojedinih fizioloških rasa među proučavanim sojevima određena je na osnovu reakcije biljaka paprike sorte Early Calwonder (ECW), njenih izogenih linija ECW-10 (*Bs1*), ECW-20 (*Bs2*), ECW-30 (*Bs3*) i biljaka paprike *Capsicum pubescens* PI235047 (*Bs4*). Ustanovljeno je da proučavani sojevi predstavljaju heterogenu populaciju u kojoj su zastupljene četiri fiziološke rase bakterije *X. euvesicatoria* (P1, P3, P7, P8).

Proučena je osetljivost 11 odabranih genotipova paprike prema rasi P8 bakterije *X. euvesicatoria*: HS-2, Amfora, Plamena, Anita, Novosađanka, Palanačka babura, Palanačko čudo, Slonovo uvo, Brillant F1, Bihar F1 i Boni. Samo je hibrid Bihar F1 ispoljio određeni stepen otpornosti prema bakteriji, dok su svi ostali proučavani genotipovi pokazali visok stepen osetljivosti.

U ovom radu izolovani su bakteriofagi specifični prema vrsti *Xanthomonas euvesicatoria*, prouzrokovaču bakteriozne pegavosti paprike. Proučavanjem kruga domaćina, utvrđeno je da su izolati usko specifični prema vrsti *X. euvesicatoria* i da ne ispoljavaju aktivnost prema ostalim vrstama *Xanthomonas* spp. patogena paprike i paradajza.

Ključne reči: paprika, *Xanthomonas euvesicatoria*, bakteriozna pegavost, karakterizacija, molekularna identifikacija, fiziološke rase, osetljivost genotipova, antibiotici, bakteriofagi

Naučna oblast: Biotehničke nauke

Uža naučna oblast: Fitopatologija

UDK: 632.35:635.649(497.11)(043.3)

DIVERSITY OF *Xanthomonas* spp. POPULATION - PEPPER PATHOGENS IN SERBIA

Abstract. During 2008, 2009 and 2010 samples of diseased pepper leaves with bacterial spot symptoms were collected from different localities in Republic of Serbia. Total of 116 strains of bacteria were obtained by isolation from infected leaves.

Studies of pathogenic, biochemical and physiological traits showed that tested strains belong to species *Xanthomonas euvesicatoria*.

Two serological tests (DAS - ELISA and agglutination test) confirmed antigenic identity of tested bacterial isolates and serological similarity to bacteria *X. c. pv. vesicatoria*.

Differentiation of *Xanthomonas* spp. causal agent of bacterial spot of pepper was performed using two molecular methods. The first method was based on restriction analysis – RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) of the *hrp* gene fragment (HrpB region) after digestion of obtained products by restriction enzymes (*CfoI*, *TaqI* and *HaeIII*). Comparison of restriction profiles of studied strains to control strains confirmed the similarity with the *X. euvesicatoria*. The other molecular method is polymerase chain reaction of specific primers which allow amplification of different size products specific for: *X. euvesicatoria* – 173 bp; *X. vesicatoria* – 138 bp; *X. perforans* – 197 bp and *X. gardneri* – 154 bp. As a result, DNA fragments of 173 bp which belong to species *X. euvesicatoria* were detected at all studied strains, including test strain Xe KFB (189). Threshold of detection was confirmed to be 0.4×10^3 CFU/ml.

The effects of copper-sulphate (CuSO_4), antibiotics streptomycin and kasugamycin on the development of bacterial cells were studied. The sensitivity of strains to bactericides was studied *in vitro* by culturing bacteria on sucrose pepton agar (SPA) plates, amended with filter-sterilized aqueous solution of streptomycin and kasugamycin (50, 100, 200 ppm) or copper-sulphate (100, 200 ppm). Streptomycin resistant strains were not detected, but 6 strains were resistant to kasugamycin (50 ppm) and 19 strains to copper-sulphate (200 ppm), indicating bacterial resistance development.

The pathogen races were determined according to the reaction of differential varieties of Early Calwonder (ECW), their isogenic lines (ECW-10R, ECW-20R, ECW-30R) and *Capsicum pubescens*. The reaction of pepper differential varieties indicated that these strains belonged to pepper races of *X. euvesicatoria* (P1, P3, P7, P8).

Genotype susceptibility to *X. euvesicatoria* (RKFB 263) was examined on 11 pepper genotypes: HS-2, Amfora, Plamena, Anita, Novosađanka, Palanačka babura, Palanačko čudo, Slonovo uvo, Brillant F1, Bihar F1 and Boni. Genotype Bihar F1 showed the highest degree of resistance to the pathogen, while all the other genotypes showed various degree of sensitivity compared to the control varieties.

Bacteriophages specific to *Xanthomonas euvesicatoria*, causal agent of pepper bacterial spot, were isolated in this study. All phages were specific to *X. euvesicatoria* and did not show activity towards other *Xanthomonas* spp., pepper and tomato pathogens.

Key words: pepper, *Xanthomonas euvesicatoria*, bacterial spot, characterization, molecular identification, races, susceptibility of genotype, antibiotics, bacteriophages

Scientific field: Biotechnical Science

Scientific discipline: Phytopathology

UDC: 632.35:635.649(497.11)(043.3)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Poreklo i botanička pripadnost paprike	1
1.2. Proizvodnja i upotreba paprike	2
1.3. Rasprostranjenost i ekonomski značaj bakterija <i>Xanthomonas</i> spp. prouzrokovaca bakteriozne pegavosti paprike	4
1.4. Spektar domaćina	8
1.5. Simptomi bolesti	9
2. PREGLED LITERATURE	12
2.1. Taksonomska pozicija bakterija <i>Xanthomonas</i> spp. prouzrokovaca bakteriozne pegavosti paprike	12
2.2. Epidemiološko-ekološke karakteristike patogena	14
2.3. Patogene odlike	16
2.4. Bakteriološke odlike	19
2.5. Serološke odlike bakterija <i>Xanthomonas</i> spp.	22
2.6. Molekularne odlike bakterija <i>Xanthomonas</i> spp.	23
2.7. Fiziološke rase patogena	24
2.8. Primena antibiotika i bakarnih preparata	27
2.9. Biološka zaštita - bakteriofagi	30
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	33
4. MATERIJAL I METODE	34
4.1. Izolacija patogena i kontrolni sojevi korišćeni u radu	34
4.2. Patogene odlike proučavanih sojeva	36
4.2.1. Inokulacija biljaka paprike	36
4.2.2. Hipersenzitivna reakcija duvana	36
4.3. Morfološke odlike proučavanih sojeva	37
4.3.1. Razlikovanje bakterija po Gramu pomoću KOH testa	37
4.3.2. Posmatranje morfologije transmisionim elektronskim mikroskopom	37
4.4. Odgajivačke odlike proučavanih sojeva	38
4.4.1. Izgled kolonija na hranljivim podlogama	38
4.4.2. Uticaj temperature na porast bakterija	38
4.4.3. Tolerantnost prema NaCl	39
4.4.4. Tolerantnost prema trifenil-tetrazolium hloridu	39
4.5. Biohemijsko-fiziološke odlike sojeva	40
4.5.1. Aktivnost oksidaze	40
4.5.2. Stvaranje katalaze	40
4.5.3. Redukcija nitrata	41
4.5.4. Hidroliza želatina	41
4.5.5. Hidroliza eskulina	41
4.5.6. Hidroliza skroba	42
4.5.7. Pektolitička aktivnost na kriškama krompira	42

4.5.8. Oksidativno-fermentativni metabolizam glukoze	42
4.5.9. Stvaranje kiseline iz ugljenih hidrata	43
4.5.10. Korišćenje <i>cis</i> -akonitinske kiseline.....	43
4.6. Serološke odlike proučavanih sojeva	44
4.6.1. DAS - ELISA test	44
4.6.2. Metod aglutinacije	46
4.7. Molekularne metode proučavanja	47
4.7.1. Restrikciona analiza - RFLP	47
4.7.1.1. Umnožavanje <i>hrp</i> gena.....	47
4.7.1.2. Digestija restrikcionim enzimima	48
4.7.2. Diferencijacija bakterija <i>Xanthomonas</i> spp. primenom specifičnih prajmera	49
4.7.2.1. Utvrđivanje praga osetljivosti PCR-a	51
4.8. Utvrđivanje fizioloških rasa	52
4.9. Proučavanje osetljivosti genotipova paprike prema prouzročivaču bakterijske pegavosti	54
4.10. Proučavanje osetljivosti proučavanih sojeva prema baktericidima	56
4.11. Bakteriofagi	57
4.11.1. Izolacija bakteriofaga	57
4.11.2. Specifičnost bakteriofaga prema <i>Xanthomonas</i> spp.	57
5. REZULTATI	60
5.1. Rasprostranjenost patogena u Srbiji	60
5.2. Patogene odlike proučavanih sojeva	64
5.2.1. Inokulacija biljaka paprike	64
5.2.2. Hipersenzitivna reakcija duvana	65
5.3. Morfološke odlike proučavanih sojeva	66
5.3.1. Razlikovanje bakterija po Gramu pomoću KOH testa	66
5.3.2. Posmatranje morfologije transmisionim elektronskim mikroskopom	66
5.4. Odgajivačke odlike proučavanih sojeva	67
5.4.1. Izgled kolonija na hranljivim podlogama	67
5.4.2. Uticaj temperature na porast bakterija	69
5.4.3. Tolerantnost prema NaCl	69
5.4.4. Tolerantnost prema trifetil-tetrazolium hloridu	70
5.5. Biohemijsko-fiziološke odlike sojeva	71
5.6. Serološke odlike proučavanih sojeva	72
5.6.1. DAS - ELISA test	72
5.6.2. Metod aglutinacije	73
5.7. Molekularne metode proučavanja	74
5.7.1. Restrikciona analiza - RFLP	74
5.7.1.1. Umnožavanje <i>hrp</i> gena	74
5.7.1.2. Digestija restrikcionim enzimima	75
5.7.2. Diferencijacija bakterija <i>Xanthomonas</i> spp. primenom specifičnih prajmera	78
5.7.2.1. Utvrđivanje praga osetljivosti PCR-a	80

5.8. Utvrđivanje fizioloških rasa	82
5.9. Proučavanje osetljivosti genotipova paprike prema prouzročivaču bakterijske pegavosti	85
5.10. Proučavanje osetljivosti proučavanih sojeva prema baktericidima	88
5.11. Bakteriofagi	90
5.11.1. Izolacija bakteriofaga	90
5.11.2. Specifičnost bakteriofaga prema <i>Xanthomonas</i> spp.	91
6. DISKUSIJA	93
7. ZAKLJUČAK	107
8. LITERATURA	109
BIOGRAFIJA	132
IZJAVE	133

1. UVOD

1.1 POREKLO I BOTANIČKA PRIPADNOST PAPRIKE

Paprika (*Capsicum annuum* L.) je jedna od najvažnijih gajenih povrtarskih biljaka u svetu i kod nas. Potiče iz Centralne i Južne Amerike, odakle su je Španci, početkom XVI veka, preneli u Evropu. Bile su to sorte ljutih i sitnih plodova, danas poznate kao „čili“ i služile su kao začin. Ime paprika potiče od grčke reči "peperi" i latinske reči "piper" što znači crni biber. Imala je isti naziv kao i biber, koji se i do sada zadržao u engleskom jeziku: pepper (sweet - slatka, hot - ljuta). U Australiji se koristi i latinski naziv *Capsicum*, kao i "paprika" i "pepper". U naše krajeve je dospela iz Turske, te je naš, turski, mađarski i nemački naziv ove biljke isti (Gvozdenović, 2010).

Paprika pripada familiji Solanaceae (pomoćnica), rodu *Capsicum* i vrsti *annuum*. Sva proučavanja vezana za klasifikaciju zasnivaju se na morfološkim i biološkim karakteristikama najrazličitijih formi paprike sakupljenih u rod *Capsicum* koji ima 25 vrsta, a najznačajnije su sledećih pet (Bosland i sar., 1994):

- *Capsicum annuum* L. – najrasprostranjenija jednogodišnja vrsta paprike.
- *Capsicum frutescens* L. – višegodišnja paprika, visine stabla 30 - 60 cm. Cvetovi imaju 5 - 6 kruničnih listića krem do belozelene boje. Plodovi su sitni. Najčešće se nalazi kao samonikla (divlja forma) u područjima Brazila, Venecuele, Meksika, Kube, Kostarike i Perua.
- *Capsicum pubescens* Ruit at Pavon – višegodišnja biljka, razgranatog stabla. Ima plave cvetove. Seme je sitno i crno. Domovina ove paprike je Peru, Kolumbija i Gvatemala.
- *Capsicum bacatum* L. – višegodišnja vrsta iz Južne Amerike. Odlikuje se razgranatom biljkom, cvetovi su žuti, beli ili boje kafe.
- *Capsicum chinense* L. – vodi poreklo iz Amazona, sa Kariba, Centralne i Južne Amerike.

1.2. PROIZVODNJA I UPOTREBA PAPRIKE

U plodu paprike se nalazi više stotina jedinjenja u promenljivim količinama. Svakako da su od posebnog značaja ona jedinjenja koja ovom povrću daju posebne karakteristike i koje daju paprici visoku hranljivu i biološku vrednost (Somoš, 1984). To su ukus i miris, boja, sadržaj ulja, ugljenih hidrata, belančevina, celuloze, mineralnih materija, vitamina i organskih kiselina. Danas se paprika najviše gaji u Aziji, Evropi i Americi. Uglavnom se gaji u zoni umerenog pojasa, nešto u tropskim predelima, a u Evropi je to proizvod južnih krajeva. Ne retko se gaji i u zaštićenom prostoru na severu Evrope (Gvozdenović i sar., 2005). Najveći proizvođači paprike u svetu su Kina i Indonezija, ali najveće prosečne prinose imaju Španija (26,6 t/ha), Italija (23,8 t/ha), Turska (24,5 t/ha). U Srbiji se po zastupljenosti povrtnarskih biljaka paprika nalazi na drugom mestu, iza paradajza (Gvozdenović i sar., 2008).

Prosečna površina pod povrćem u Srbiji iznosi 247.000 ha, a oko 20.000 ha je pod usevima paprike (Republički zavod za statistiku, Beograd). Od ukupnog broja hektara pod paprikom, 75,21% se nalazi u Centralnoj i Južnoj Srbiji, sa značajno nižim prosečnim prinosom paprike u odnosu na prosečan prinos u Vojvodini (Gvozdenović i Cvejić, 2009; Vlahović i sar., 2010). U periodu od 2000 do 2009. godine prosečan prinos paprike iznosio je oko 150.000 tona na godišnjem nivou, a 2006. godine proizvedeno je 177.300 tona paprike, što je rekordna proizvodnja u poslednjih deset godina (Republički zavod za statistiku, Beograd).

Srbija je 2008. godine na plenarnoj sednici Organizacije za ekonomski razvoj i saradnju (OECD) primljena u članstvo Šeme za sveže voće i povrće OECD-a. Odluku o učlanjenju donele su 23 zemlje članice te međunarodne organizacije, posle boravka Evaluacionog tima OECD – šeme za sveže voće i povrće u Srbiji (Vlahović i Puškarić, 2008). Pored obaveza o uvođenju OECD standarda, koji su gotovo jednaki sa EU standardima, Srbija je dobila pravo izdavanja međunarodnih sertifikata koji joj daju pravo ravnopravnog učesnika u međunarodnoj trgovini. Ulaskom u OECD šemu za sveže voće i povrće zaokružen je ciklus učlanjenja zemlje u sve četiri OECD šeme koje propisuju standarde za trgovinu semenom, šumskim materijalom, svežim voćem i

povrćem, kao i uslove koje moraju da ispunjavaju mašine kojima se obavlja poljoprivredna proizvodnja.

Obzirom na to da Srbija poseduje povoljne agroekološke uslove, postoje realne mogućnosti za ostvarivanje znatno viših prinosa i veće proizvodnje. Za unapređenje povrtarske proizvodnje Marković (2004) pre svega predlaže povećanje površina pod povrćem, posebno kao drugog useva. Pored toga ističe važnost povećanja površina u zaštićenom prostoru, primenu odgovarajućih agrotehničkih mera, izbor kvalitetnog sertifikovanog semena za setvu i pravovremenu zaštitu od bolesti i štetočina. Angažovanje istraživača i stručnjaka u proizvodnji, uz pomoć lokalnih medija za emitovanje emisija sa savetima, takođe bi imalo uticaj na unapređenje povrtarske proizvodnje.

U Srbiji je stvoren veliki broj domaćih sorti koje su zastupljene u proizvodnji, ali se mogu sresti i u inostranstvu. Najznačajnije sorte stvorene su u Institutu za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad (Novosadska babura, Amfora, Atina, Anita, Novosađanka, Plamena i dr.) i Institutu za povrtarstvo iz Smederevske Palanke (Morava, Duga bela, Župska rana, Palanačka babura, Palanačka kapija, Palanačko čudo i dr.). Kompanija „Vitamin” – Horgoš se samostalno bavi razvojem sorti horgoške paprike poslednjih pedeset godina. Do sada su razvili prvu priznatu domaću sortu slatke začinske paprike, Horgoška slatka – 1 (HS - 1), zatim HS - 2, HS - 6, kao i sorte ljute začinske paprike Peščani grom i Tisa.

Proizvodnja sertifikovanog semena paprike predstavlja značajnu privrednu aktivnost u našoj zemlji, između ostalog i kao izvozna roba koja obezbeđuje devizni priliv (Gvozdrenović i Cvejić, 2009). U proizvodnji konzumne paprike cilj je što veći prinos tehnološki zrelih plodova, dok je u proizvodnji semena cilj da se što ranije zametne maksimalni broj plodova koji mogu dostići punu fiziološku zrelost. Ova činjenica diktira razlike između semenske i proizvodnje konzumne paprike, a to uslovljava i manji broj berbi u proizvodnji semenske paprike.

1.3. RASPROSTRANJENOST I EKONOMSKI ZNAČAJ BAKTERIJA *Xanthomonas* spp. PROUZROKOVAČA BAKTERIOZNE PEGAVOSTI PAPRIKE

U intenzivnoj povrtarskoj proizvodnji, bakterioze spadaju među ekonomski najštetnije bolesti. Veoma se brzo umnožavaju u povoljnim uslovima i prenose u nova područja putem semena ili sadnog materijala, što je od posebnog značaja za karantinske patogene (Balaž, 1994; Obradović i sar., 1997).

Papriku parazitira veliki broj patogenih gljiva, bakterija i virusa. Fitopatogene bakterije, prouzrokovajući bakterioza paprike, usled česte pojave i jakog intenziteta mogu prouzrokovati znatne gubitke (Obradović i sar., 1994, 1995; Arsenijević, 1997).

Prouzrokovatelj bakteriozne pegavosti paprike *Xanthomonas euvesicatoria* (Jones i sar., 2006), poznat pod starim nazivom *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, prenosi se semenom i nalazi se na A2 karantinskoj listi štetnih organizama EPPO-a i Pravilniku Republike Srbije (Pravilnik o listama štetnih organizama i listama bilja, biljnih proizvoda i propisanih objekata; «Slika glasnik Republike Srbije» br. 7/10). Spada u red ekonomski najznačajnijih bolesti paprike i paradajza u svetu, posebno u uslovima tropske i subtropske klime (Aysan i Sahin, 2003; Jones i sar., 2004; Obradović i sar., 2008a; Tawfik i sar., 2009). Kao posledica korišćenja zaraženog semena za setvu, u istočnom mediteranskom delu Turske 2002. godine, zabeležen je jak intenzitet bolesti čiji se indeks oboljenja kretao od 50-95% (Aysan i Sahin, 2003). Utvrđeno je prisustvo patogena i na semenu nekih korovskih vrsta (Bogatzevska i Deneva, 1996).

Do ranih 1990-tih, smatralo se da je prouzrokovatelj bakteriozne pegavosti paprike vrsta poznata kao *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Međutim, na osnovu rezultata proučavanja bakterioloških i molekularnih karakteristika patogena, ustanovljena je heterogenost među sojevima i uspostavljena je podela na 4 taksonomski različite grupe A, B, C i D koje čine tzv. *Xanthomonas* kompleks (Jones i sar., 2004). Ove četiri grupe bile su dovoljno različite da steknu status vrste: *X. euvesicatoria* = *X. campestris* (*axonopodis*) pv. *vesicatoria* (grupa A); *X. vesicatoria* = *X. vesicatoria* (grupa B); *X. perforans* = grupa C i *X. gardneri* = grupa D. Sojevi poreklom iz paprike, pripadnici grupe A (*X. euvesicatoria*), najšire su rasprostranjeni i ekonomski najznačajniji.

X. vesicatoria i *X. gardneri* mogu imati značajan uticaj u regionima u kojima se nalaze. Sojevi bakterije *Xanthomonas perforans* do sada su izolovani samo iz paradajza.

Značaj poznavanja populacije patogena u našoj zemlji, kao i usaglašavanje dobijenih rezultata sa najnovijom nomenklaturom, uslovljen je značajem paprike kao gajene biljne vrste.

Bakteriozna pegavost je zvanično potvrđena u većini evropskih zemalja. U nekim od ovih zemalja bolest se nije proširila na celu teritoriju, a naročito tamo gde se dosledno sprovode sve postojeće karantinske mere. Osim većine evropskih zemalja, po podacima EPPO-a bakteriozna pegavost je zabeležena i u drugim delovima sveta, kao i na južnoj hemisferi (Slika 1) (Tabela 1).

U agroekološkim uslovima Srbije prouzrokovatelj bakteriozne pegavosti paprike (*X. euvesicatoria*) redovno se sreće, a intenzitet zaraze i ekonomske štete koje prouzrokuje ova bakterija mogu biti značajne i dosta zavise od vremenskih uslova (Arsenijević, 1997; Balogh i sar., 2003; Mijatović i sar., 2007; Obradović i sar., 2009b). U našoj zemlji oboljenje se permanentno širi od sredine 80-tih godina i smatra se jednom od ekonomski najštetnijih bolesti paprike (Balaž, 1988). Usled pojave ovog oboljenja, 1987. godine, zabeležene su značajne štete u regionu Srema (okolina Rume) i nekim lokalitetima južne Bačke (okolina Srbobrana, Novog Sada i Žablja) (Balaž, 1994). Bakterija parazitira sve nadzemne delove biljaka: klijance, list, cvet, plod. Bakterija u biljku prodire kroz povrede (Calzolari, 1986) i preko stominih otvora (Leandro i Volin, 1987).

Velike štete u polju i potpuno propadanje useva paprike zabeleženi su u nekim zemljama pre svega u navodnjavanim usevima tokom toplijeg dela sezone (Bashan i sar., 1985). Pohronezny i Volin (1983) beleže značajne štete koje nastaju kao posledica rane infekcije lista, cveta i ploda, dok su Ward i O' Garro (1992) ukazali na jaku pojavu bakteriozne pegavosti na Barbadosu. Usled jakog inteziteta oboljenja izneti su podaci o velikim gubicima u SAD, Indiji, Argentini, Sudanu, Nigeriji, Egiptu i Australiji (CABI, 2004). U proizvodnom području Floride (SAD) ova bakterija prouzrokuje gubitke i do 1.5 miliona dolara (Jones i sar., 1986). U Turskoj, poslednjih godina, primećena je učestala pojava bakteriozne pegavosti paprike u proizvodnji u zaštićenom prostoru i to posebno u mediteranskom regionu (Mirik i sar., 2005). Zabeleženi su znatni gubici prinosa paradajza i paprike u Turskoj, nastali kao posledica opadanja lišća i simptoma na

plodovima (Basim i sar. 2004). Tokom 2006. i 2007. godine, u Rusiji je zabeležena jača pojava bakterijske pegavosti, čiji su prouzrokoivači *X. gardneri* i *X. vesicatoria*, dok *X. euvesicatoria* i *X. perforans* nisu detektovani (Ignatov i sar., 2009). Štete od prouzrokoivača bakterijske pegavosti paprike zabeležene su i u Sloveniji (Ravnikar i sar., 2001), Makedoniji (Mitreva i Kovačević, 2006) i dr.

Kao prouzrokoivači bakterioza paprike i paradajza u literaturi se navode i: *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis i sar. - prouzrokoivač bakterijskog raka i uvelosti; *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi i sar. - prouzrokoivač bakterijskog uvenuća; *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Okabe) Young, Dye & Wilkie - prouzrokoivač crne pegavosti i krastavosti plodova; *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* van Hall - prouzrokoivač pegavosti i uvelosti (Arsenijević, 1997; CABI, 2004).

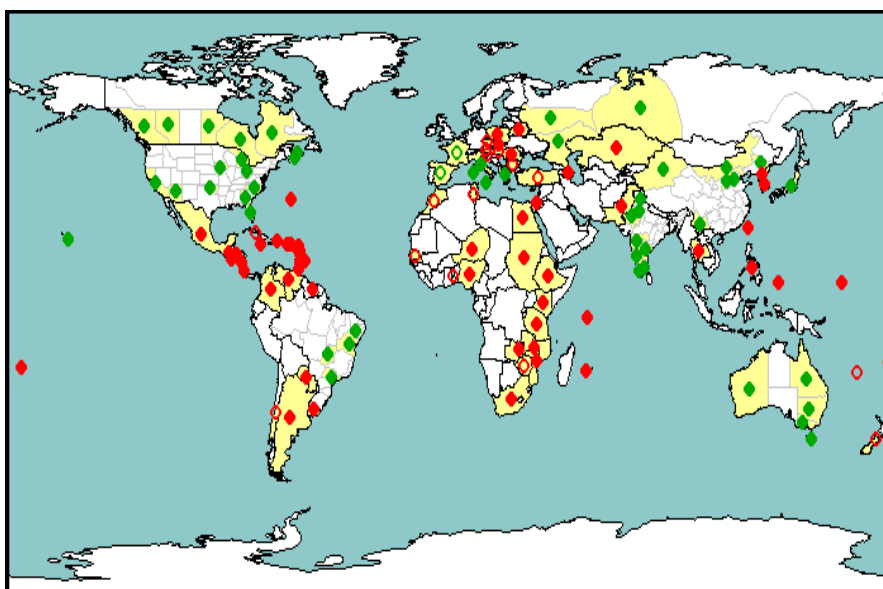
Pored bakterioza, neke od ekonomski najznačajnijih gljivičnih bolesti paprike kod nas su: plamenjača - čiji je prouzrokoivač *Phytophthora capsici*; pepelnica - koju prouzrokuje gljiva *Leveillula taurica*; zeleno uvenuće - koje prouzrokuje gljiva *Verticillium albo-atrum*; crna pegavost - koju prouzrokuje *Alternaria* spp.; siva plesan - *Botrytis cinerea* (Mijatović i sar., 2007).

U proizvodnji paprike problem predstavljaju i široko rasprostranjeni virusi, kao što su virus mozaika krastavca (CMV), virus mozaika duvana (TMV), virus crtičastog mozaika krompira (PVY) i virus mozaika lucerke (AMV) (Krstić i sar., 2008).

Tabela 1. Zemlje u kojima je zabeležena bakteriozna pegavost (EPPO/OEPP, 2006)

Evropa	Azija	Afrika	Severna, Centralna i Južna Amerika		Okeanija
Austrija	DNR	Egipat	Američka	Martinik	Australija
Belorusija	Koreja	Etiopija	Devičanska	Meksiko	Fidži
Bugarska	Pakistan	Južna	ostrva	Nevis	Mikronezija
Češka	Filipini	Afrika	Argentina	Nikaragva	Novi Zeland
Francuska	Indija	Kenija	Barbados	Paragvaj	Palau
Grčka	Izrael	Malavija	Bermude	Portoriko	Tonga
Italija	Japan	Maroko	Brazil	S.Vinsent	
Mađarska	Kina	Mozambik	Čile	SAD	
Poljska	Rusija	Nigerija	El Salvador	Surinam	
Rumunija	Tajland	Sejšeli	Gvadalupe	Sveti Kits	
Rusija	Tajvan	Senegal	Gvatemala	Trinidad i	
Slovačka		Sudan	Honduras	Tobago	
Slovenija		Togo	Jamajka	Urugvaj	
Španija		Tunis	Kanada	Venecuela	
Švajcarska		Zambija	Kolumbija		
Turska		Zimbabve	Kostarika		
			Kuba		

Slika 1. Distributivna mapa rasprostranjenosti (EPPO/OEPP, 2006)



Legenda: ◆ Prisutna na teritoriji cele države ◆ Prisutna lokalno u nekim regionima

1.4. SPEKTAR DOMAĆINA

Obzirom na značaj paprike kao rentabilne i profitabilne gajene biljne vrste (Đinović, 2005; Gvozdenović i Cvejić, 2009), veoma je važno očuvati usev zdravim (Balaž, 1994; Obradović i sar., 2000). Prouzrokovatelj bakteriozne pegavosti prenosi se semenom, tako da promet semena preko državne granice takođe predstavlja potencijalnu opasnost od unošenja i širenja novih sojeva i rasa (Pohronezny i Volin, 1983; Pohronezny i sar., 1992; Obradović i sar., 2000a).

Pored glavnih domaćina, paprike i paradajza utvrđene su i prirodne infekcije na drugim vrstama rodova *Lycopersicon* spp. i *Capsicum* spp. kao što su: *Datura stramonium*, *Hyoscyamus niger*, *Lycium vulgare*, *Nicotiana rustica*, *Nicandra physalodes*, *Physalis minima* i dr. (Peterson, 1963; Laub i Stall, 1967; Bradbury, 1984). Jones i sar. (1986) utvrdili su šest korovskih vrsta domaćina ovog patogena, od kojih su dve iz familije Solanaceae: *Solanum americanum* i *Physalis pubescens*. Populacija patogena ustanovljena je i na: *Ambrosia artemisifolia* L., *Eclipta alba* L., *Trifolium repens* L. i *Eupatorium capilifolium* Watl., dok na korovskim vrstama udaljenim od mesta proizvodnje paradajza nije utvrđeno prisustvo patogena. U Bugarskoj je zabeleženo održavanje ovog patogena na korovskoj flori: *Solanum nigrum*, *Solanum dulcamara*, *Physalis pubescens*, *Amaranthus retroflexus*, *Portulaca oleraceae* (Bogatzevska i sar., 1992; Bogatzevska i Deneva, 1996).

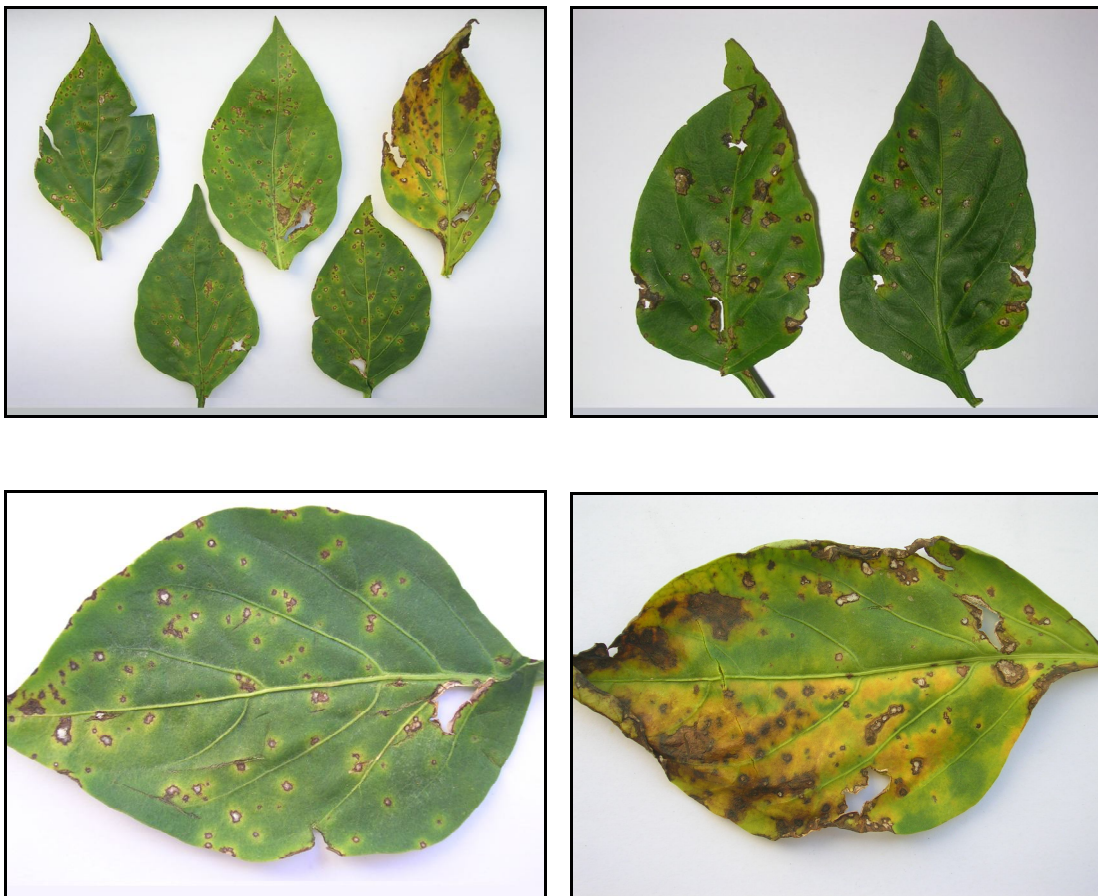
Svi razvojni stadijumi biljaka paprike su podložni napadu. U zaštićenom prostoru uslovi gajenja biljaka doprinose širenju i jačoj pojavi oboljenja (Obradović, 2009a). Pojava bakterioza uglavnom se uočava u objektima sa lošim higijensko-tehničkim merama, bez mogućnosti regulacije mikroklimе (Arsenijević i Balaž, 1978). Osim štete koja nastaje za vreme proizvodnje u zaštićenom prostoru, bakterioze se rasadom mogu proširiti na veće površine na otvorenom polju i tako uvećati gubitke u proizvodnji (Obradović i sar. 1999). Usled velike infektivnosti i ograničenih mogućnosti suzbijanja, kontrola fitopatogenih bakterija na usevima u zaštićenom prostoru predstavlja teško rešiv problem (Obradović i sar., 2000b). Stoga je poznavanje populacije patogena *Xanthomonas* kompleksa, prouzrokovaca bakteriozne pegavosti paprike od presudnog značaja za izbor mera suzbijanja (Obradović, 2009).

1.5. SIMPTOMI BOLESTI

Simptomi na listu - na listovima mladih biljka u početku se pojavljuju vlažne pege, sa masnim odsjajem, nepravilnog oblika (Slika 2). Vremenom tkivo u sredini ovih pega postaje mrko. Pege se povećavaju, spajaju, a nekroza zahvata veći deo liske (Slika 3). Nekrotične zone se lako lome i ispadaju, a obolelo lišće se deformiše, postaje kožasto i hlorotično, suši se i opada. Pri povoljnim uslovima za razvoj bolesti u polju, pegavost i hloroza se šire, zahvatajući mlađe lišće, a jače oboleli donji listovi žute i opadaju (Slika 4). Masovno opadanje lišća može u potpunosti ugroziti usev (Obradović i sar., 2001).



Slika 2. *X. euvesicatoria*. Početni simptomi bakteriozne pegavosti lista paprike (prirodna infekcija)



Slika 3. *X. euvesicatoria*. Simptomi bakteriozne pegavosti na starijem lišću
(prirodna infekcija)



Slika 4. *X. euvesicatoria*. Simptomi bakteriozne pegavosti paprike u polju
(prirodna infekcija)

Simptomi na plodu - najveće štete nastaju na plodovima, počev od zametanja pa sve do berbe. Na zaraženim plodovima u početku se uočavaju sitne, zelenkastomrke pege koje kasnije nekrotiraju i pucaju usled čega plod dobija krstav izgled (Slika 5). Otuda i potiče naziv za ovu bakteriju "vesicatorius" što na latinskom znači krsta, mehur ili plik. Oboleli plodovi gube tržišnu vrednost umanjujući ekonomski efekat proizvodnje (Obradović i sar., 2000a).



Slika 5. *X. euvesicatoria*. Simptomi krstavosti plodova paprike (prirodna infekcija)

2. PREGLED LITERATURE

2.1. TAKSONOMSKA POZICIJA BAKTERIJA *Xanthomonas* spp. PROUZROKOVAČA BAKTERIOZNE PEGAVOSTI PAPRIKE

Skoro pola veka se smatralo da je prouzrokovač bakteriozne pegavosti paprike homogena vrsta poznata pod nazivom *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Doidge) Dye 1978. Razlike koje su se ispoljavale među sojevima dovele su do promena u sistematici. Istraživanja na bazi patogenih, biohemijskih i seroloških odlika potvrdila su da populacija bakterije *X. c.* pv. *vesicatoria* nije homogena (Bouzar i sar., 1994; Buonauro i sar., 1994; Sahin i Miller, 1996; O'Garro, 1998; O'Garro i sar., 1999).

Bakterija je prvi put izolovana u Južnoj Africi, davne 1914. godine. Neujednačenost u pogledu nekih biohemijskih i patogenih karakteristika bakterije *X. c.* pv. *vesicatoria* među prvima su uočili Burkholder i Li (1941), Dye i sar. (1964), Cook i Stall (1969), Cook (1973), Šutić (1957). Ustanovljeno je da između biljaka paradajza i paprike gajenih u neposrednoj blizini u polju ne dolazi do unakrsne zaraze, a takođe razlike su ustanovljene i u mnogim biohemijskim odlikama sojeva poreklom sa paprike i paradajza (Cook i Stall, 1982). Po Dowson-u (1939) bakterije roda *Xanthomonas* svrstane su u familiju *Xanthomonadaceae* kao patogeni varijeteti zbirne (tipske) vrste *X. campestris*. Međutim, nova saznanja o fitopatogenim bakterijama doprinela su da se raniji sistemi klasifikacije i nazivi vrsta preinače ili predlože sasvim novi (Van den Mooter i Swings, 1990; Bonas i sar., 1991; Jones i sar., 1993a; Bouzar i sar., 1994; Buonauro i sar., 1994; Stall i sar., 1994; Vauterin i sar., 1995; Jones i Stall, 1998; Schaad i sar., 2001; Jones i sar. 2004; Obradović i sar., 2004; Vinatzer i Bull, 2009; Bull i sar., 2012).

Pre više od dve decenije, razvojem biljne patologije, intenzivirana su proučavanja varijabilnosti u bakteriološkom pogledu među sojevima bakterije *X. c.* pv. *vesicatoria* (Jones i sar., 1986; Stall i sar., 1986; Bonas i sar., 1989). Sojevi su se pre svega razlikovali u biohemijskim osobinama, a kasnije su utvrđene fiziološke i genetske razlike.

Prva podela u okviru vrste *X. c. pv. vesicatoria* na dve grupe sojeva (A i B) izvršena je na osnovu razlika u sposobnosti korišćenja ugljenikovih jedinjenja. Utvrđeno je da su sojevi iz grupe A i B manje od 50% homologni (Vauterin i sar., 1990, 1991, 1993; Stall i sar., 1994). Dokazano je da sojevi u okviru svake pojedinačne grupe međusobno imaju više od 70% sličnosti, nakon čega je usledila i prva reklasifikacija u dve grupe A i B. Kao predstavnik neamilolitičke grupe A imenovana je vrsta *X. axonopodis pv. vesicatoria*, dok je kao predstavnik amilolitičke grupe B imenovana vrsta *X. vesicatoria* (Vauterin i sar., 1993; 1995; Yang i sar., 1993; Stall i sar., 1994). Skoro istovremeno, Louws i sar. (1995) su metodom REP - PCR-a takođe izdvojili dve grupe sojeva u okviru vrste *X. c. pv. vesicatoria*.

Po Bouzar i sar. (1994) fenotipskoj grupi A pripadaju sojevi koji sadrže α proteinski lanac veličine 32 - 35 kDa, što je u vezi i sa biohemijском aktivnošću sojeva te grupe. Sojevi koji pripadaju ovoj grupi ne ispoljavaju amilolitičku i pektolitičku aktivnost, hidrolizuju želatin i eskulin, ne poseduju oksidazu, stvaraju kiselinu iz manoze, arabinoze, glukoze, galaktoze, dekstrina, razvijaju se na podlozi sa *cis*-akonitinskom kiselinom (Jones i sar., 1993; Vauterin i sar., 1995; Jones i sar., 2000). Sa druge strane, u grupe B i C svrstani su pektolitički sojevi, sa β proteinskim lancem veličine 25 - 27 kDa (Bouzar i sar., 1994a). Analizom masnih kiselina gasnom hromatografijom, kao i hibridizacijom DNK, Jones i Stall (1998a) su izdiferencirali još dve grupe sojeva (C i D). Predstavnici grupe B, za razliku od grupe C, ne koriste galaktozu kao izvor ugljenika, dok su neamilolitički i nepektolitički sojevi, koji ne koriste dekstrin, galaktozu i *cis*-akonitinsku kiselinu svrstani u grupu D.

Predloženo je da vrsta sa karakteristikama fenotipske grupe A bude preimenovana u *X. euvesicatoria*; grupe B - *X. vesicatoria*; grupe C - *X. perforans* i grupe D - *X. gardneri* (Jones i sar., 2004). Nakon postupka validacije prihvaćeni su binominalni nazivi za pomenute četiri vrste, koji se zvanično koriste od 2006. godine (VALIDATION LIST N° 109).

Prema najnovijoj sistematici *Xanthomonas euvesicatoria*, *Xanthomonas vesicatoria*, *Xanthomonas perforans* i *Xanthomonas gardneri* su odvojene, pojedinačne vrste sa svojim karakteristikama. Spadaju u klasu *Gammaproteobacteria*, red

Xanthomodales, familiju *Xanthomodaceae* i rod *Xanthomonas* (Tabela 2) (List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature; Formerly List of Bacterial names with Standing in Nomenclature (LBSN) - <http://www.bacterio.net/>). Međutim, u literaturi se često sreću stari nazivi bakterije kao što su: *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* i *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*.

Veliki broj sojeva fitopatogenih bakterija komercijalno su dostupni i nalaze se u kolekcijama kao što su: Nacionalna kolekcija biljnih patogena Velike Britanije (NCPBP); ICMP - Novi Zeland; CFBP - Francuska; ATTC - SAD; LMG - Belgija.

Tabela 2. Taksonomska pozicija *Xanthomonas* spp. u sistemu klasifikacije

Kraljevstvo	Bacteria
Razdeo	Proteobacteria
Klasa	Gammaproteobacteria
Red	Xanthomonadales
Familija	Xanthomonadaceae
Rod	<i>Xanthomonas</i> Dowson (1939)
Binominalni nazivi:	
<i>Xanthomonas euvesicatoria</i> Jones i sar. (2006)*	
<i>Xanthomonas vesicatoria</i> Doidge (1920); Vauterin (1995)	
<i>Xanthomonas perforans</i> Jones i sar. (2006)*	
<i>Xanthomonas gardneri</i> Šutić (1957); Jones i sar. (2006)*	

* List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature; Formerly List of Bacterial names with Standing in Nomenclature (LBSN) - <http://www.bacterio.net/>.

2.2. EPIDEMIOLOŠKO-EKOLOŠKE KARAKTERISTIKE PATOGENA

Poslednjih godina u našoj zemlji zapažena je pojava bakterijske pegavosti paprike visokog intenziteta (Balaž, 1994; Obradović i sar., 1997, 1999, 2000a, 2001). Na pojavu oboljenja najveći uticaj ima visoka relativna vlažnost vazduha tokom vegetacije (Diab i

sar., 1982). Vremenski uslovi praćeni kišom i vetrom pogoduju bržem i efikasnijem širenju bakterioza (Obradović i sar., 2000b; Balaž, 2005; McInnes i sar., 1988; Gitaitis i sar., 1992). Posebna pažnja se pridaje gajenju paprike u zatvorenom prostoru (plastićni tuneli, platenici, staklenici), u kojima se zbog navodnjavanja stvaraju idealni uslovi za razvoj bolesti (Pohronezny i Volin, 1983; Griesbach i sar., 1988; Gvozdenović i Cvejić, 2009).

Optimalna temperatura za nastanak infekcije kreće se od 24 - 30°C. Temperature iznad 35°C tokom dana, i ispod 16°C tokom noći, sprećavaju nastanak infekcije (Diab i sar., 1982a). U povoljnim uslovima, zaraze nastaju prvo na klijancima, a kasnije se šire i na odrasle biljke (Leben i Slesman, 1981).

Ustanovljeno je da bakterije ostvaruju inicijalnu infekciju preko stoma i hidatoda (Leandro i Volin, 1987; Rudolph, 1993). Prodor patogena ostvaruje se i kroz povrede nastale mehanićkim oštećenjima, aktivnošću insekata, kao i kroz povrede nastale usled vremenskih nepogoda (kišne kapi, vetar) (Calzolari, 1986).

Glavni izvori inokuluma su seme i sadni materijal (Bashan i sar., 1982, 1982a; Leite i sar., 1995; Obradović i sar., 1997, 1999; 2004; Balaž i Delibašić, 2005). Bakterije se održavaju i na druge načine: putem biljnih ostataka u zemljištu, samoniklim biljkama i epifitno na nadzemnim biljnim delovima (Schaad i Dianese, 1981; Jones i sar., 1986; McGuire i Jones, 1991; Bogatzevska i sar., 1992, 1995).

Prve podatke o prenošenju bakterije semenom izneli su Gardner i Kendrick (1923). Bashan i saradnici (1982a) utvrdili su da bakterija može zadržati vitalnost na semenu i do 10 godina. Obzirom na to da se bolest prenosi semenom koje predstavlja jedan od glavnih izvora inokuluma i medijum za širenje u nova područja gajenja paprike, od izuzetne je važnosti očuvati useve semenske paprike zdravim (Balaž, 2005; Obradović, 2009a). Fitopatogene bakterije najčešće nije lako detektovati na semenu. Zaraženo seme može biti sa i bez vidljivih znakova infekcije (latentne infekcije) (Sijam i sar., 1991). Seme u prometu, koje nije podvrgnuto adekvatnom bakteriološkom pregledu, predstavlja potencijalnu opasnost od unošenja novih patogena ili rasa (Obradović i sar., 2008a).

U ciklusu preživljavanja i održavanja fitopatogenih bakterija, Leben (1981) i De Cleene (1989) ustanovili su i opisali postojanje epifitne faze u filospheri biljaka ("resident phase"), koja nastupanjem povoljnih uslova dovodi do infekcije (Bashan i sar., 1982a).

Epifitna faza može biti prisutna na naizgled zdravim biljnim organima (lišće, pupoljci), što može, ali, ne mora dovesti do pojave oboljenja (McGuire i Jones, 1991). Zahvaljujući adhezivnim materijama (ekstra celularni polisaharidi - EPS) u omotaču bakterijskih ćelija omogućeno je epifitno održavanje bakterija na površini lista (Soto i Hultgren, 1999). Zhang i saradnici su (2009), metodom konfokalne fluorescentne laserske mikroskopije, locirali populaciju bakterije *X. euvesicatoria* na površini lista, pre svega, u depresijama između epidermisa ćelija i oko stoma, a kasnije i u substomatalnim komorama apoplasta. Tehnike imunofluorescentne i bioluminiscentne mikroskopije, uz korišćenje zelenog fluorescentnog proteina, poslužile su za posmatranje epifitne faze *X. c. pv. campestris* i *X. o. pv. oryzae* na površini biljnih delova i načina ostvarenja infekcije kroz prirodne otvore lista kupusa i pirinča (Daniel i Boher, 1981; Dane i Marten, 1994; So i sar., 2002; Han i sar., 2008).

Prema Jones-u i sar. (1986) izvor inokuluma za naredni usev mogu biti i korovske biljne vrste na kojima se populacija bakterija epifitno održava, ali samo ukoliko su u blizini ili na parcelama na kojima su uzgajani paprika ili paradajz.

Bashan i sar. (1982a) ukazuju i na mogućnost prezimljavanja bakterije u rizosferi zaraženih biljaka.

Pravilna agrotehnika predstavlja značajnu meru i preventivu u sprečavanju bakterioza, a uništavanje korovskih vrsta i drugih potencijalnih domaćina redukuje pojavu bolesti (Goode i Sasser, 1980). Ova mera ne otklanja potpuno potencijalne izvore populacije bakterija, ali obezbeđuje bolju aeraciju oko biljaka smanjujući pri tom mogućnost širenja bakterija i nastanka infekcije. Uništavanje zaraženih biljnih ostataka i korova predstavlja važnu meru zaštite, naročito u tropskim regionima. Vodeći računa o potencijalnim domaćinima patogena plodored takode predstavlja efikasnu meru zaštite.

2.3. PATOGENE ODLIKE

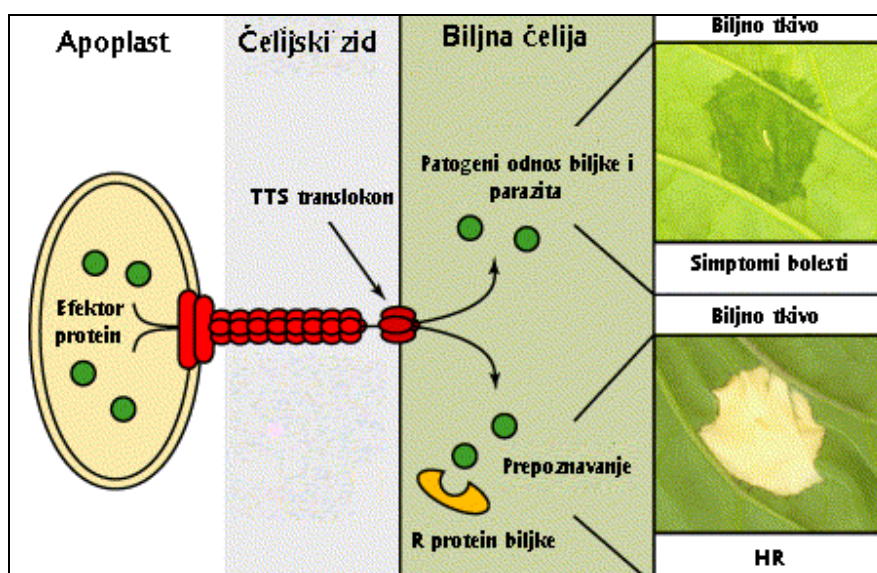
Fitopatogene bakterije po ostvarenoj infekciji i uspostavljanju odnosa sa domaćinom, otpočinju svoj porast i reprodukciju (Minsavage i sar., 1990). Parazit potrebnu "hranu" pronalazi u biljci. Delujući svojim fermentnim sistemom bakterije razlažu i pretvaraju složena jedinjenja biljke u manje složena i pristupačna za usvajanje (Arsenijević,

1997). Kao rezultat parazitne prirode bakterija, nastaju promene na biljkama koje se ispoljavaju kao pegavost, trulež, uvelost i dr. U slučaju inkompatibilnog odnosa između patogena i domaćina ili prodora u otpornog domaćina ne dolazi do pojave simptoma bolesti. U interakciji biljka - patogen pri inkompatibilnom odnosu stvaraju se aktivni kiseonični radikali ("reactive oxygen species" ROS), koji vrše biosintezu fitoaleksina i dovode do nakupljanja tzv. PR proteina ("pathogenesis-related proteins") (Minsavage i sar., 1990; Bogatzevska i Iliev, 1994; Swords i sar., 1996; Garcion i sar., 2007).

Ustanovljeno je postojanje šest tipova ili sistema sekrecije proteina odgovornih za patogenezu: Tip I (T1SS); Tip II (T2SS); Tip III (T3SS); Tip IV (T4SS); Tip V (T5SS); Tip VI (T6SS) (Pugsley, 1993; Holland i sar., 2005; Büttner i He, 2009).

Smatra se da je ključ za patogenost većine *Xanthomonas* patovara u postojanju trećeg (T3SS) tipa sekrecije (Huguet i sar., 1998; Noël i sar., 2001; Büttner i Bonas, 2006; Büttner i He, 2009; Zhang i sar. 2009; Boch i Bonas, 2010). U skoro svim Gram - negativnim fitopatogenim bakterijama roda *Xanthomonas* pronađeni su *hrp* geni, odgovorni za aktivaciju T3SS sistema, posrednika u interakciji biljka domaćin - patogena bakterija (Gough i sar. 1992; Alfano i Collmer, 2004; He i sar., 2004; Büttner i Bonas, 2006). Hromozomalni region bakterije *X. euvesicatoria* veličine 23kb, sadrži šest *hrp* transkripcionih jedinica (operona), *hrpA* do *hrpF* (Bonas i sar., 1991; Bonas, 1994). Operon *hrpD* sadrži šest gena (*hrcQ*, *hrcR*, *hrcS*, *hrpD5*, *hrpD6*, *hpaA*), a smatra se da je *hpaA* efektor protein, odgovoran za razvoj bolesti (Lorenz i Büttner, 2009). Osnovna karakteristika ovog tipa sekrecije je u tzv. «igla aparatu» ("needle apparatus") putem kojeg se ubacuju faktori virulentnosti direktno u ćeliju domaćina (Marlovits i sar., 2004, 2006). Ova mišljenja potvrđena su istraživanjima T3SS sistema u različitim bakterijama gde je zapaženo da patogen "montira" filamentozne supramolekularne strukture za transport efektor proteina (He i sar., 2004; Büttner i Bonas, 2006). Isporuca efektor proteina iz citoplazme bakterije u unutrašnjost biljnih ćelija obavlja se kroz više fizičkih barijera: dve bakterijske membrane odvojene peptidoglikanoznim slojem i jedna membrana biljnih ćelija, koja je okružena gustim ćelijskim zidom (Slika 6). Očekivana reakcija može biti tipična uz pojavu simptoma bolesti ili atipična uz pojavu hipersenzitivne reakcije (Sahin i Miller, 1998).

U biljkama koje poseduju otpornost specifičnu prema patogenu, geni otpornosti (R) kodiraju efektor proteine, odnosno prepoznaju produkte odgovarajućih *avr* gena (gena avirulentnosti) (Bonas i sar., 1989, 1991; Bonas i Van den Ackerveken, 1997). U ovom slučaju prepoznavanje se javlja veoma brzo što dovodi do brze aktivacije odbrambenog mehanizma ćelije domaćina, koja se ispoljava u vidu hipersenzitivne reakcije biljke (Klement, 1963; Lindgren i sar., 1986). Akumulacija antimikrobnih jedinjenja, zadebljanje ćelijskog zida i ekspresija određenih odbrambenih gena u okolnom tkivu mogu da zaustave dalju kolonizaciju biljke od strane patogena (O'Garó i Charlemange, 1994). U slučaju osetljivog domaćina pojavljuju se tipični simptomi bolesti.



Slika 6. Šematski prikaz sekrecije tipa III (T3S) (He i sar., 2004)

Provera patogenosti izolovanih bakterija je od posebnog značaja, pošto samo pozitivna ocena opravdava ispitivanje ostalih osobina parazita do njegove potpune identifikacije (Schaad i sar., 2001). Patogeno svojstvo bakterija najpouzdanije se utvrđuje na biljci domaćinu (Schaad i sar., 2001). U literaturi su opisani postupci unošenja inokuluma različitim metodama, a najzastupljeniji su metod prskanja, sa i bez pritiska, metod potapanja biljnih delova, sa i bez povreda, kao i metod uboda i ubrizgavanja pomoću

medicinskog šprica (Lelliot i Stead, 1987; Obradović i sar., 2000; Schaad i sar., 2001; Agrios, 2005).

Obradović i sar. (2000) proučavali su patogene karakteristike sojeva *X. vesicatoria* poreklom iz Srbije, metodom infiltracije suspenzije bakterija (10^8 CFU/ml) u tkivo između nerava petog ili šestog stalnog lista paprike sorte Palanačka babura.

U cilju provere hipersenzitivnosti kao indikatora patogenosti većine fitopatogenih bakterija mogu poslužiti biljke duvana, tatule, muškatle, klice pšenice, mahune pasulja, kotiledoni listići krastavca, plodovi zelenog voća i povrća i dr. (Lelliot i Stead, 1987).

2.4. BAKTERIOLOŠKE ODLIKE

Identifikacija prouzrokača bakterioza zasnovana na korišćenju standardnih fitobakterioloških metoda zahteva dosta vremena i materijala (Balaž i Delibašić, 2005). Savremene tehnike (serološke i molekularne) imaju značaja pre svega u laboratorijskom radu za brzu i pouzdanu detekciju patogena koji se prenose semenom i sadnim materijalom (Schaad i sar., 2001).

Izolacija patogena se može izvršiti korišćenjem standardnih, poluselektivnih i selektivnih hranljivih podloga (Schaad i sar., 2001). Standardna YDC podloga za izolaciju bakterija roda *Xanthomonas* sastoji se od kvašćevog ekstrakta, dekstroze i CaCO_3 koji deluje kao pufer neutrališući kiseline koje se oslobađaju razgradnjom hranljivih materija (Schaad i Stall, 1988; Schaad i sar., 2001). Po protokolu APS-ISF-a (2010) (*American Phytopathological Society - International Seed Federation*), YDC podloga se navodi kao najpogodnija za morfološku identifikaciju bakterije, na kojoj se razvijaju tipične sluzaste, sjajne, žute kolonije prečnika 2 - 3 mm. Žuta boja koja potiče od pigmenta ksantomonadina predstavlja važan činilac za epifitni opstanak štiteći bakterije od UV zračenja i svetla (Poplawsky i sar., 2000). Pored standardne YDC podloge, za izolaciju i ocenu odgajivačkih karakteristika navodi se i hranljivi mesopeptonski agar (MPA).

Od poluselektivnih podloga u upotrebi su: agar sa trifenil-tetrazolium hloridom (TTCA) (Kelman, 1954); hranljiva podloga sa sukiničnom i kiničnom kiselinom (mSQ) (Schaad i sar., 2001); podloga sa Tween-om 80 (=Tween B) (McGuire i sar., 1986; Sijam i

sar., 1991) i hranljivi agar uz dodatak Tween-a i obranog mleka u prahu (MT - Milk Tween) (Goszczyńska i Serfontein, 1998). U cilju izolacije bakterija iz različitih supstrata i biljnih delova McGuire i sar. (1986) razvili su Tween A, B i C podloge. Autori navode da je podloga Tween A najpogodnija za izolaciju iz plodova; Tween B za izolaciju bakterija iz lista zaraženih biljaka, dok se Tween C uspešno koristi za izolaciju patogena iz zemljišta. Značaj Tween-a 80 ($C_{64}H_{124}O_{26}$), koji ulazi u sastav pomenutih podloga, ogleda se u hemijskom sastavu. To je polisorbitat i sastoji se od sorbitana i oleinske kiseline. Hidrofilnu grupu jedinjenja čini polietar poznat kao polioksietilen, deo polimera etilen-oksida, i polisorbitat koji pripada lipofiličkoj grupi polimera. Usled aktivnosti lipolitičkih enzima bakterija na ovim podlogama, uočavaju se karakteristične promene. Bakterija na Tween B podlozi formira karakteristične, mlečne zone koje nastaju od kalcijumovih soli usled oslobađanja lipida iz Tween-a 80, dok na MT podlozi bakterija pored mlečnih zona stvara i prosvetljene zone usled hidrolize kazeina iz mleka (McGuire i sar., 1986; Goszczyńska i Serfontein, 1998). Ekstrakciju bakterija iz semena paprike korišćenjem ove podloge izvršili su Kritzman (1989) i Sijam i sar. (1991).

Poznavanje biohemijske aktivnosti pojedinih vrsta bakterija je od velikog značaja u pogledu njihove karakterizacije. Standardne postupke proučavanja biohemijskih odlika bakterija navode Schaad (1980), Fahy i Persley (1983), Bradbury (1986), Lelliot i Stead (1987), Schaad (1989), Klement i sar. (1990), Arsenijević (1997), Schaad i sar. (2001).

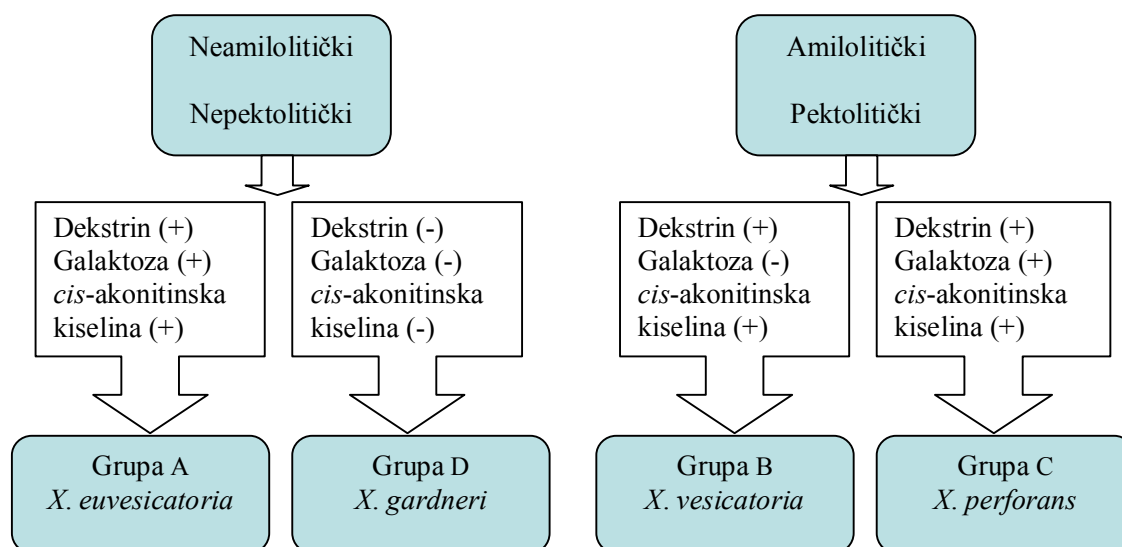
Najveće razlike bakterije, na osnovu kojih je moguće izvršiti diferencijaciju vrsta *Xanthomonas* kompleksa, ispoljavaju u enzimskim reakcijama (amilolitička i pektolitička aktivnost) i korišćenju različitih izvora ugljenikovih jedinjenja (D-galaktoza, dekstrin i *cis*-akonitinska kiselina), (Jones i sar., 2004; Obradović i sar., 2008; Kornev i sar., 2009) (Šema 1).

Grupa A obuhvata neamilolitičke sojeve, koji ne ispoljavaju pektolitičku aktivnost, hidrolizuju želatin i eskulin, ne poseduju oksidazu, stvaraju kiselinu iz manoze, arabinoze, glukoze, galaktoze, dekstrina i razvijaju se na podlozi sa *cis*-akonitinskom kiselinom. Bakterija sa ovim karakteristikama imenovana je kao *X. euvesicatoria* (Jones i sar., 2004).

Grupama B (*X. vesicatoria*) i C (*X. perforans*) pripadaju amilolitičko-pektolitički sojevi, pozitivni u reakcijama sa dekstrinom i *cis*-akonitinskom kiselinom. Jedina razlika

među B i C grupe ogleda se u tome što predstavnik grupe B ne koristi D-galaktozu kao izvor ugljenika. Neamilolitički i nepektolitički sojevi koji ne koriste dekstrin, D-galaktozu i *cis*-akonitisku kiselinu svrstani su u grupu D čiji je predstavnik vrsta *X. gardneri* (Vauterin i sar., 1995; Jones i sar., 2000, 2004; Obradović i sar., 2004, 2008a; Ignatov i sar., 2009; Kornev i sar., 2009; Moretti i sar., 2009). Optimalna temperatura razvoja u *in vitro* uslovima kreće se od 25 - 30°C (Arsenijević, 1997), dok maksimalna temperatura razvoja iznosi 37°C (Obradović i sar., 2001a). Karakteristike sojeva, prouzrokovaca bakterijske pegavosti u Srbiji poslednjih godina proučavali su Obradović i sar. (2004, 2008a, 2009b), Gašić i sar. (2011) i Šević i sar. (2011).

Šema 1. Diferencijacija vrsta *Xanthomonas* kompleksa na osnovu biohemijskih karakteristika (Jones i sar., 2004)



2.5. SEROLOŠKE ODLIKE BAKTERIJA *Xanthomonas* spp.

Pored uobičajenih bakterioloških postupaka, danas su u upotrebi serološke metode koje se zasnivaju na međusobnom dejstvu antigena i antitela (Lelliott i Stead, 1987). Obzirom na potrebe za brzom i pouzdanom detekcijom biljnih patogena, serološke metode su našle veliku primenu.

U laboratorijskom radu zastupljeni su: metod aglutinacije (*Express agglutination test*), ELISA test (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) i IF test (*Immunofluorescence test*), sa komercijalno dostupnim kompletima za detekciju većine fitopatogenih bakterija (Bioreba AG - Switzerland, Loewe Phytodiagnostica - Germany, Neogen Europe Ltd. - UK, DSMZ - Germany, Primediagnostics - Wageningen itd.).

Metod aglutinacije je serološki metod koji se zasniva na svojstvu bakterije da u prisustvu specifičnih antitela stvara makromolekule vidljive u obliku taloga (Weir, 1978; Lelliott i Stead, 1987). Ovi testovi veoma su praktični i prilagođeni za izvođenje kako u laboratoriji tako i u poljskim uslovima, pri čemu nije potrebna prethodna izolacija niti inkubacija (Lematre i sar., 1992).

ELISA test je metoda razvijena krajem sedamdesetih godina prošlog veka (Clark i Adams, 1977; Clark, 1981). Najjednostavnija forma ove metode je PTA - ELISA (*Plate-Trapped Antigen*), ali je u praksi najzastupljeniji DAS - ELISA (*Double Antibody Sandwich - Enzyme Linked Immunosorbent Assay*). Serološki testovi i njihova standardizacija u biljnoj patologiji bili su izazov brojnim istraživačima. Alvarez i sar. (1985) proizveli su monoklonalna antitela za diferencijaciju vrsta *Xanthomonas* roda, i uspeli da razdvoje vrstu *X. c. pv. campestris* od ostalih patovara *X. campestris* tipske vrste. Međutim, sve do rezultata Lemmatre-a i saradnika iz 1992. godine, pokušaji za serološku identifikaciju bakterija su bili pojedinačni sa brojnim poteškoćama (Domen i Alvarez, 1978; Trigalet i sar., 1978; Alvarez i Lou, 1982). Naime, Lemmatre i saradnici (1992) su na Institutu za poljoprivredna istraživanja (INRA - Francuska) razvili opšti postupak za izvođenje DAS - ELISA testa u cilju detekcije *Xanthomonas* vrsta. Metod ELISA testa u cilju identifikacije patogena *X. c. pv. vesicatoria* navode Alvarez i sar., (1985); Jones i sar. (1993a); Bouzar i sar. (1994a); Sahin i Miller (1996); Ravikumar i Khan, (2002); Veena i van Vuurde (2002).

Takođe, Mirik i sar. (2005), primenom DAS - ELISA testa uz korišćenje monoklonalnih antiseruma, detektovali su bakteriju *X. c. pv. vesicatoria*, analizom velikog broja izolata poreklom iz obolelih biljaka paprike u Turskoj. U Srbiji, Obradović i sar. (2000) proučavali su serološke odlike sojeva bakterija poreklom sa paprike primenom indirektnog DAS - ELISA testa.

2.6. MOLEKULARNE ODLIKE BAKTERIJA *Xanthomonas* spp.

Imajući u vidu heterogenost populacije patogena, brza i pouzdana identifikacija imala bi višestruk kako naučni tako i praktični značaj.

Lančana reakcija polimeraze (PCR - *Polymerase Chain Reaction*) je metoda koja je razvijena od strane Mullis-a i saradnika i jedno je od velikih otkrića u nauci (Mullis i sar., 1986). Ključna prednost ovih metoda je u tome što su nezavisne od spoljašnjih uslova, starosti i fiziološkog stanja ciljanog patogena (Louws i sar., 1995; Cuppels i Louws, 2006). Osim toga, moguće je detektovati patogene i u veoma niskim koncentracijama, kako u simptomatičnim, tako i u asimptomatičnim uzorcima. To je posebno značajno u detekciji karantinskih patogena na semenu i sadnom materijalu, kada je izolacijom teško ili nemoguće utvrditi njihovo prisustvo (McManus i Jones, 1995; Obradović i sar., 2004; Moretti i sar., 2009).

Otkrićem da hromozomalni region bakterije *X. c. pv. vesicatoria* veličine 23kb, sadrži šest *hrp* transkripcionih jedinica (operona), *hrpA* do *hrpF* (Bonas i sar., 1991; Bonas, 1994; Lorenz i Buttner, 2009), došlo je do pomaka u identifikaciji vrsta *Xanthomonas* kompleksa ponaosob. Nakon ovih otkrića omogućena je detekcija bakterija, amplifikacijom fragmenata *hrp* regiona DNK a potom diferencijacijom i razdvajem grupa restrikcionim enzimima (*Restriction Fragment Length Polymorphism*-RFLP) (Leite i sar., 1995; Jones i sar., 2000; Obradović i sar., 2004).

Leite i sar. (1994, 1995) ustanovili su prisustvo *EcoRI* kao fragmenta *hrp* regiona DNK prisutnog samo kod fitopatogenih patovara roda *Xanthomonas*. U okviru *hrpB* regiona (lokusa) *hrp* gena, izdiferencirani su fragmenti označeni kao *hrpB5* do *hrpB8* i na osnovu analize oligonukleotida dizajnirani su prajmeri označeni kao RST2, RST3, RST9,

RST10, RST21 i RST22. Nakon digestije restrikcionim enzimima, PCR proizvodi se razdvajaju elektroforezom na 4% agaraznom gelu. Osetljivost ove metode je visoka obzirom da je minimalni detektovani broj bakterijskih ćelija moguć na nivou 10^2 CFU/ml. Mitrev i Kovačević (2006) su korišćenjem restrikcione analize, izvršili diferencijaciju ispitivanih sojeva poreklom iz Makedonije. Ustanovili su genetsku ujednačenost sojeva koji su posedovali odlike karakteristične za vrstu *Xanthomonas euvesicatoria*. Metodom restrikcione analize izvršeno je grupisanje odnosno razdvajanje fenotipskih grupa *Xanthomonas* spp. poreklom iz paprike (Obradović i sar., 2004). Nakon amplifikacije *hrp* gena DNK prajmerima RST65 i RST69, izvršena je digestija PCR proizvoda veličine 420bp restrikcionim enzimima (*CfoI*, *TaqI* i *HaeIII*).

Razvojem biotehnologije u zaštiti bilja, u novijim istraživanjima dizajnirani su specifični prajmeri za svaku od navedenih vrsta bakterija ponaosob, što olakšava i ubrzava detekciju i diferencijaciju patogena (Koenraadt i sar., 2009; Moretti i sar., 2009). Naime, za svaku vrstu je dizajniran specifičan par prajmera koji amplifikuju proizvode različitih veličina baznih parova: XeF i XeR 173 bp za *X. euvesicatoria* (grupa A); XvF i XvR 138 bp za *X. vesicatoria* (grupa B); XpF i XpR 197 bp za *X. perforans* (grupa C); XgF i XgR 154 bp za *X. gardneri* (grupa D) Koenraadt i sar. (2009).

Moretti i sar. (2009), dizajnirali su prajmere i opisali metod visoke osetljivosti za detekciju vrste *X. euvesicatoria*, kako iz dobijenih izolata tako i iz svežeg biljnog materijala. Visoka osetljivost ove metode, utvrđene na nivou 10^2 CFU/ml, postignuta je smanjenjem koncentracije Mg^{2+} i povećavanjem temperature reakcije PCR-a.

2.7. FIZIOLOŠKE RASE PATOGENA

Proučavanje otpornosti prema prouzročivaču bakteriozne pegavosti počelo je šezdesetih i sedamdesetih godina istraživanjima Sowell-a (1960) i Sowell i Dempsey-a (1977). Prve otporne sorte dobijene su ukrštanjem divljih sorti sa komercijalnim genotipovima. U početku se smatralo da sojevi poreklom sa paradajza i paprike vrše unakrsnu kontaminaciju u polju, sve do 1970-tih godina kada je ustanovljena specifičnost prema domaćinu (Cook i Stall, 1969; Cook, 1973). Ustanovljene su rase koje parazitiraju

samo paradajz (XcvT), one koje parazitiraju samo papriku (XcvP), kao i one čiji su domaćini i paprika i paradajz (XcvPT) (Cook i Guevara, 1984). U okviru grupe XcvT determinisane su tri rase (T1, T2 i T3), dok je kod sojeva poreklom sa paprike do sada determinasano 11 rasa (P0-P10) (Ritchie i Dittapongpitch, 1991; Bouzar i sar., 1994, Jones i sar., 1995, 1998, 2002; Kousik i Ritchie, 1995; Sahin i Miller, 1995; 1998; Stall i sar., 2009).

Kada se govori o otpornosti biljaka prema patogenima treba imati u vidu nekoliko važnih činilaca: specifičnost domaćina i patogena, varijabilnost patogena i uticaj ekoloških faktora na njihove međudnose (O'Garó i Charlemange, 1994). Najveće štete nastaju onda kada je domaćin osetljiv, patogen virulentan i postoje povoljni uslovi za ostvarenje infekcije (Canteros i sar., 1991). Za razliku od drugih kvantitativnih svojstava, otpornost ili osetljivost biljaka prema patogenima je rezultat međudejstva dva genoma, patogena i biljke (Minsavage i sar., 1990; Walkes i O'Garó, 1996; Momol i sar., 2002).

Stall i Cook (1966) među prvima su opisali pojavu hipersenzitivne reakcije koja nastaje usled krajnje osetljivosti prema infekciji. Ovaj vid otpornosti zasniva se na modelu "gen-za-gen" čineći osnovu vertikalne otpornosti (Ellingboe, 1984; Hibberd i sar., 1987; Minsavage i sar., 1990). U biljkama koje poseduju otpornost specifičnu prema patogenu, geni otpornosti (R) kodiraju proteine koji prepoznaju proizvode odgovarajućih *avr* gena (geni avirulentnosti) (Bonas i Van den Ackerveken, 1997; Bonas i Lahaye, 2002). Poznato je da se fiziološke rase razlikuju po sposobnosti zaražavanja različitih sorti (Basim, 1998), odnosno ista sorta može biti otporna prema nekim rasama a osetljiva prema drugim. Buonauro i Servili (1999) determinisali su povećanu aktivnost biljnih enzima lipogenaze i peroksidaze u fazi kolapsa biljnih ćelija tokom hipersenzitivne reakcije. Smatra se da je lipogenaza enzim koji učestvuje u oštećivanju membrane biljne ćelije tokom HR (Slusarenko, 1996).

Nakon izolacije gena otpornosti: *Bs1* gen (PI 163192), *Bs2* gen (PI 260435), *Bs3* gen (PI 271322), stvorene su izogene linije (diferencijalne sorte): ECW - 10 (*Bs1*), ECW - 20 (*Bs2*) i ECW - 30 (*Bs3*) (Cook i Stall, 1982; Kousik i Ritchie, 1995; Kousik i Ritchie, 1996; Kousik i Ritchie, 1996a; Kousik i Ritchie, 1998; Sahin i Miller, 1998; Kousik i Ritchie, 1999). U početku su korišćene za identifikaciju rasa od P0 - P5 (Hibberd i sar.,

1987; Swanson i sar., 1988; Bonas i sar., 1989; Minsavage i sar., 1990; Canteros i sar., 1991), a nakon otkrića *Bs4* gena otpornosti u *C. pubescens* (PI 235047) prema rasi P6 izdiferencirane su i ostale 4 rase P7, P8, P9 i P10 (Jones i sar., 1994, Sahin i Miler, 1995; Jones i Stall, 1998; Sahin i Miller, 1998). Na osnovu ocene reakcije diferencijalnih sorti paprike do sada je opisano 11 fizioloških rasa bakterije *X. euvesicatoria* (Jones i sar., 1998; Kousik i Ritchie, 1999; Sahin, 2001; Stall i sar., 2009). Protokol za utvrđivanje i razlikovanje rasnog sastava bakterije *X. euvesicatoria* detaljno je opisan u uputstvu APS-ISF-a (*American Phytopathological Society - International Seed Federation* APS-ISF, 2010). U populaciji *X. euvesicatoria* prisutnoj u Srbiji, Obradović i sar. (1999a, 2000, 2004) ustanovili su sojeve koji pripadaju rasama P1, P3, P7 i P8.

Jones i sar. (2002) objasnili su pojavu otpornosti koja se javlja kod biljaka paprike uz izostanak hipersenzitivne reakcije (Non - HR). Ukrštanjem ECW sa PI271322 i ECW123 kao nosioca gena otpornosti prema svim rasama, stvoren je genotip paprike ECW - 12346 kao nosilac gena otpornosti prema svim rasama patogena. U ogledima izvedenim u polju i staklari nakon veštačke inokulacije sojem rase P6 nije konstatovana pojava HR. Ustanovljena je inhibicija stvaranja elektrolita odgovornih za pojavu HR.

Patogeni mogu da se menjaju mutacijama pri čemu dolazi do genetičkih promena koje se prenose na potomstvo i češće su kod organizama bespolnog tipa razmnožavanja, obezbeđujući tako veću varijabilnost patogena i nastajanje novih patotipova (rasa) (Swords i sar., 1996). To je i razlog što je tokom poslednjih decenija ustanovljen veći broj rasa ovog patogena, što znatno otežava stvaranje otpornih sorti prema svim postojećim rasama. Antagonizam među rasama i međusobna kompeticija utiču na dominaciju jedne rase u odnosu na drugu tokom vegetacione sezone (O'Garro, 1998; O'Garro i Tudor, 1994; Pohronezny i sar., 1992).

Gajenje osetljivog sortimenta paprike u svetu i kod nas predstavlja glavni uzrok čestih pojava bakteriozne pegavosti i to jakog intenziteta. Selekcioni pritisak nastao unošenjem gena otpornosti u komercijalne genotipove gajenih biljaka, često rezultira pojavom sojeva patogena, sposobnih da prevaziđu otpornost (Pernezny i sar., 1995; Gassmann i sar., 2000). Otpornost gajenog sortimenta prema patogenu stoga predstavlja jednu od najznačajnijih mera u kontroli bakterioza (Hibberd i sar., 1987; Swanson i sar.,

1988; Bonas i sar., 1989; Minsavage i sar., 1990; Bonas i sar., 1991; Pernezny i Collins, 1997; Ritchie i sar., 1998; Sahin i Miller, 1998; Obradović i sar. 2000, 2008).

2.8. PRIMENA ANTIBIOTIKA I BAKARNIH PREPARATA

U zaštiti bilja kod nas dominiraju hemijske mere borbe, odnosno korišćenje hemijskih sredstava ili pesticida koji ne obezbeđuju zadovoljavajući efekat zaštite (Obradović i sar., 2004a, 2004b, 2009). Kada se radi o fitopatogenim bakterijama, najčešće su u primeni preparati na bazi bakra. Međutim, kao posledica česte primene bakarnih preparata u svetu je utvrđena pojava rezistentnih sojeva ovih patogena (Adaskaveg i Hine, 1985; Obradović i Ivanović, 2007). Prema literaturnim podacima biološke (primena bakteriofaga) i neke novije alternativne metode (aktivatori otpornosti), ukazuju na mogućnost razvoja efikasne strategije za suzbijanje *X. euvesicatoria* (Obradović i sar., 2002, 2005; Obradović, 2009; Gašić i sar., 2011).

Od baktericida uglavnom su u upotrebi preparati na bazi bakra, sami ili u kombinaciji sa etilenbisditiokarbamatima (EBDC) kao što su maneb i mankozeb (Balaž i sar., 2002; Grahovac i sar., 2009). Kao posledica česte primene bakarnih preparata registrovani su sojevi *X. c. pv. vesicatoria* tolerantni prema formulacijama bakarnih preparata i niske osetljivosti na kombinaciju sa EBDC fungicidima (Mirik i sar., 2007). Pokazalo se u praksi da je primena bakarnih preparata manje efikasna od njihovih kombinacija sa EBDC fungicidima (Marco i Stall, 1983; Sherf i MacNab, 1986). Razlog rezistentnosti ispitivanih sojeva prema bakru leži u širokoj i čestoj upotrebi bakarnih preparata različitih formulacija (Bordovska čorba, bakar hidroksid, bakar sulfat i dr.) za kontrolu bolesti u proizvodnji (Tabela 3). Koriste se u prevenciji patogena tropskih biljaka, gde se upotrebljavaju u velikim količinama usled tropske vlažne klime i nisu zamenjeni sintetičkim fungicidima do današnjeg vremena (Adriano, 2001). Upotreba bakarnih fungicida je i dalje u porastu, budući da se površine pod povrćem na svetskom nivou povećavaju (Abbasi i sar., 2002). Prema mehanizmu delovanja svi su bazirani na toksičnosti Cu^{++} jona, koje bakterije pasivno apsorbuju. Bakarni preparati se primenjuju kada vremenski uslovi omogućavaju da se biljke brzo osuše. U slučaju pada temperature

ispod 10°C, ili povećane vlažnosti, bakarni jon može na lišću nekih biljaka izazvati ožegotine (Milenković i sar., 2006).

Tabela 3. Bakarna jedinjenja različitih formulacija (Tomlin, 2006)

Naziv	Formula	Istorija upotrebe	Vrsta pesticida
Bakar-hidroksid	Cu(OH)_2	od 1968 /SAD	fungicid baktericid
Bakar-oktanoat	$\text{Cu}[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6 \text{COO}]_2$	od 1997/ SAD	fungicid baktericid algicid
Bakar-oksihlorid	$\text{CuCl}_2 \cdot 3\text{Cu(OH)}_2$	od ranih 90-tih	fungicid baktericid
Bakar (II)-sulfat	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	od kraja 19. veka	fungicid
Bakar-sulfat	$3\text{Cu(OH)}_2 \cdot \text{CuSO}_4$	/	fungicid

Broj antibiotika koji se koriste u fitomedicini nije veliki, u odnosu na one koji se koriste u humanoj medicini i veterini. Preparati na bazi antibiotika nisu registrovani za primenu u zaštiti bilja kod nas (Obradović i Ivanović, 2007). Streptomycin je antibiotik iz grupe aminoglukozida koji u visokim koncentracijama može biti fitotoksičan i formulisan je kao streptomycin-sulfat ili streptomycin-nitrat. Mehanizam delovanja streptomicina ogleda se u vezivanju za bakterijske ribosome i sprečavanju sinteze proteina. Primena streptomicina u usevu paprike za suzbijanje *X. c. pv. vesicatoria* bila je kratkotrajna, jer je već početkom šezdesetih godina prošlog veka, otkrivena rezistentna populacija ove bakterije (Stall i Thayer, 1962). Streptomycin-rezistentni sojevi ubrzo su detektovani u Argentini, Brazilu, Kaliforniji, Floridi, Džordžiji, Ohaju, Pensilvaniji, Tajvanu, primoravajući istraživače da tragaju za drugim rešenjima (Stall i sar., 1986; Swanson i sar., 1988; Bender i sar., 1990; Ritchie i Dittapongpitch, 1991).

Pored streptomicina, kasugamicin je antibiotik takođe iz grupe aminoglukozida koji se u nekim zemljama koristi u zaštiti bilja. Mehanizam delovanja se zasniva na inhibiciji ugradnje aminokiselina tokom sinteze proteina. U prometu je prisutan kao kasugamicin hidrokisid, ali i kao mešavina sa bakar-oksihloridom.

U cilju utvrđivanja praga osetljivosti sojeva bakterija prema antibioticima i bakru koriste se *in vitro* testovi. Pogodna je podloga sa saharozom i peptonom (SPA) (Lelliot i Stead, 1987; Buonauro i sar., 1994; Pernezny i sar., 2008). Istraživanjima osetljivosti sojeva poreklom iz Srbije utvrđeno je da su koncentracije streptomicina od 20, 50, 100 i 200 ppm i bakar sulfata od 200 ppm, bile dovoljne da potpuno zaustave razvoj kolonija na podlozi (Obradović i sar., 2000a). Mitrev i Kovačević (2006), proučavali su osetljivost sojeva poreklom iz Makedonije prema streptomicin-sulfatu (100 ppm) i bakar sulfatu (200 ppm), i nisu utvrdili rezistentost prema pomenutim jedinjenjima. Rezistentne sojeve prema bakru i streptomicinu, poreklom iz Severne Karoline (SAD) navode Ritchie i Dittapongpitch (1991). Takođe, Adaskaveg i Hine (1985) identifikovali su sojeve poreklom iz Meksika, tolerantne prema formulacijama bakra. U jugoistočnom delu SAD-a (Florida, S. Karolina, Džordžija), zaštita od prouzrokovala bakteriozne pegavosti oslanja se na otpornost domaćina i efikasnost bakarnih preparata (Jones i sar., 1985, 1991, 1993; Pernezny i sar., 1995; Kousik i sar., 1996b).

Pesticidi mogu biti različitog hemijskog sastava, toksikoloških osobina, perzistentnosti i potencijalni su zagađivači životne sredine. Međuprodukti degradacije često su perzistentniji od polaznog jedinjenja, ostaju duže vreme u zemljištu ili vodi (Đorđević, 2008). Nekontrolisana upotreba antibiotika i pojava rezistentnosti bakterija, ponovo je usmerila pažnju istraživača na potencijalnu primenu bakteriofaga u zaštiti bilja (Flaherty i sar., 2000; Louws i sar., 2001; Obradović i sar., 2001b, 2004a; Jones i sar., 2006; Obradović, 2009). Stoga, u cilju suzbijanja prouzrokovala bakteriozne pegavosti Obradović i sar. (2002) su proučili efekat primene nekih sojeva bakterija antagonista i stimulatora rasta biljaka, bakteriofaga specifičnih prema prouzrokovalu bolesti, kao i aktivatora indukovane otpornosti. Poslednjih godina u primeni je nova grupa preparata, tzv. aktivatora otpornosti biljaka (SAR - systemic acquired resistance inducers), koji u kontaktu sa biljkom aktiviraju biohemijske procese i dovode do povećanja odbrambene sposobnosti i smanjenja

mogućnosti ostvarenja infekcije (Obradović i sar., 2005, 2008, 2009; Gašić i Obradović, 2012). Efikasnost nekih baktericida u suzbijanju bakteriozne pegavosti paprike proučavali su Šević i sar. (2010), pri čemu je najveću efikasnost u zaštiti paprike od prouzrokača bakteriozne pegavosti ispoljio tretman acibenzolar-S-metil (93%). U kasnijim istraživanjima Šević i sar. (2011) potvrdili su rezultate o efikasnosti primene acibenzolar-S-metil-a prema *X. euvesicatoria* (KFB 13) sa 93 - 97% efikasnosti.

Prema Jones i sar. (2006) tretmani bakteriofagima kombinovani sa drugim preparatima predstavljaju osnovu za buduću strategiju integralne zaštite od prouzrokača bakteriozne pegavosti.

2.9. BIOLOŠKA ZAŠTITA - BAKTERIOFAGI

Stvaranje nepovoljnih uslova za razvoj bolesti primenom agrotehničkih mera, bioloških produkata, antagonističkih organizama i superparazita su tehnologije zaštite kojima se danas teži (Obradović i sar., 2008a; Đorđević i sar., 2011). Biopesticidi podrazumevaju primenu korisnih mikroorganizama ili produkata njihovog metabolizma i predstavljaju alternativu sintetičkim jedinjenjima. Biološki agensi mogu biti na bazi korisnih gljiva, bakterija, kvasaca, virusnih čestica (bakteriofaga), kao i na bazi eteričnih ulja ili biljnih ekstrakata. Mehanizmi delovanja bioloških materija razvijaju se u pravcu direktne kompeticije, antibioze, parazitizma i indukovane otpornosti. Biopreparati predstavljaju preparate sa živim organizmima (gljive, bakterije), koji ispoljavaju toksičnost prema ekonomski značajnim patogenima gajenih biljaka. Primenom ovih preparata ostvaruje se ekološki i ekonomski opravdana proizvodnja i zaštita gajenih biljaka.

U nedostatku efikasnih baktericida rešenje treba tražiti u integralnom pristupu, odnosno sintezi znanja o biologiji i epidemiologiji patogena, tehnologiji biljne proizvodnje, kao i baktericidnom efektu pojedinih supstanci. Najnovija proučavanja i integralni pristup zaštiti paprike i paradajza od prouzrokača bakteriozne pegavosti navode Obradović i sar. (2008a). Kao prirodni antagonisti fitopatogenih bakterija navode se sojevi *Bacillus* sp., *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia* sp. (Mirik i sar., 2008). Tri soja *Bacillus* sp. izolovani su iz rizosfere biljaka paprike gajene u staklari i polju, a kasnije korišćeni u tretmanu biljaka u

cilju redukcije populacije patogena. Rezultati su ukazivali na redukciju populacije od 11 - 65%, u tretmanima sa pojedinačnim *Bacillus* sp. sojevima i 38 - 67% u tretmanima u kombinaciji sva tri soja pomešanih u jednakim količinama.

Među malobrojnim biološkim agensima, koji imaju potencijala da se koriste u zaštiti bilja i primenjuju u praksi, su bakteriofagi ili jednostavnije fagi (Flaherty i sar., 2001; Balogh i sar., 2003; Obradović i sar., 2006). Bakteriofagi žive na račun ćelije domaćina te bakterija u koju je dospelo fag počinje da bubri pri čemu dolazi do pucanja ćelijske membrane (lisis) i oslobađanja velikog broja čestica faga. Odmah nakon otkrića, s početka prošlog veka, fagi su privukli pažnju svojom sposobnošću da parazitiraju ćelije bakterija i tako utiču na redukciju njihove populacije u životnoj sredini. Nedovoljno poznavanje biologije i ekologije bakteriofaga imalo je za posledicu ograničen uspeh početnih istraživanja njihove primene u terapiji bolesti prouzrokovanih patogenim bakterijama. Tretman fagima je deo standardnog programa integralne zaštite paradajza od bakteriozne pegavosti na Floridi i južnim delovima SAD-a (Momol i sar., 2002; Jones i sar., 2006).

Imajući u vidu heterogenost populacije *Xanthomonas* spp. patogena paprike i paradajza (Jones i sar., 2004) kao i njihovo prisustvo i štetnost, naročito u proizvodnji paprike u nas (Obradović i sar., 2004b), utvrđivanje prisustva specifičnih bakteriofaga u rejonima gajenja paprike u Srbiji i proučavanje mogućnosti njihove primene u suzbijanju patogena imalo bi višestruk kako naučni tako i praktični značaj.

Prema literaturnim podacima primena bakteriofaga samih ili u kombinaciji sa aktivatorima otpornosti, ukazuju na mogućnost razvoja efikasne strategije za suzbijanje bakteriozne pegavosti paprike (Balogh, 2002; Jones i sar., 2006). Obradović i sar. (2002, 2004a, 2004b), su ispitivali efikasnost specifičnih bakteriofaga i aktivatora otpornosti (preparat Actigard 50 WG) za suzbijanje ovog patogena u usevu paradajza, pri čemu je postignuta imunizacija paradajza prema bakteriji. Ispitivanja izvođena u severnoj i centralnoj Floridi (SAD) u uslovima suptropske klime, tokom jeseni 2001. i proleća 2002. godine, korišćenjem acibenzolar-S-metil-a u kombinaciji sa bakteriofagima, značajno su redukovali bakterioznu pegavost u odnosu na ostale tretmane (Balogh i sar., 2003). Grupisanjem tretmana gde su primenjivane kombinacije sa bakteriofagima utvrđeno je da

se prinos značajno razlikuje u odnosu na tretmane bez bakteriofaga (Balogh i sar., 2003; Obradović i sar. 2004b).

Neinfektivna imunizacija se može ostvariti i fungicidima (acetil-Al, benomil, cineb, metalaksil, triazol, probenazol i dr.), makro i mikro elementima, materijama rasta i dr. Pod uticajem ovih sredstava kod biljaka se povećava sinteza belančevina, fenola i glikozida koji su sposobni da inhibiraju aktivnost enzima patogena.

U odnosu na fitopatogene bakterije fagi mogu biti specifični, što je slučaj kod bakterija roda *Xanthomonas*. Stoga se specifični fagi mogu koristiti i u identifikaciji fitopatogenih bakterija. Zahvaljujući visokoj specifičnosti odnosa virus – bakterija domaćin, fagi su omogućili razlikovanje usko povezanih grupa fitopatogenih bakterija kao i rasa ili patogenih varijeteta iste bakterijske vrste i tako značajno doprineli klasifikaciji i identifikaciji patogenih bakterija (Klement i sar., 1990; Arsenijević, 1997). Na osnovu istraživanja u svetu i kod nas i obzirom na dinamiku populacije bakterija *Xanthomonas* spp. kompleksa, postoji potreba za stalnim praćenjem i proučavanjem bakteriozne pegavosti paprike kod nas, u cilju unapređenja proizvodnje i to pre svega stvaranjem manje osetljivih sorti prema patogenu.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Polazna osnova ovih istraživanja je da struktura populacije prouzrokovača bakteriozne pegavosti paprike nije homogena. Obzirom da se po najnovijoj sistematici, kao prouzrokovači bakteriozne pegavosti paprike navode tri vrste bakterija *Xanthomonas* spp.: *X. euvesicatoria*, *X. vesicatoria* i *X. gardneri*, cilj rada bio je:

- utvrđivanje sastava populacije prouzrokovača bakteriozne pegavosti paprike korišćenjem konvencionalnih i savremenih metoda proučavanja
- utvrđivanje distribucije i areala rasprostranjenosti u agroekološkim uslovima Republike Srbije
- utvrđivanje prisustva prirodnih neprijatelja koji prate populaciju bakterije
- utvrđivanje osetljivosti, odnosno, rezistentnosti sojeva bakterije prema odabranim baktericidima
- uzimajući u obzir postojanje 11 fizioloških rasa u svetu, jedan od ciljeva ovog rada je ustanovljavanje i identifikacija rasnog sastava, što je od presudnog značaja sa aspekta zaštite oplemenjivanjem i stvaranjem otpornih linija i sorti.

Imajući u vidu heterogenost populacije *Xanthomonas* spp. patogena paprike kao i njihovo prisustvo i štetnost, naročito u proizvodnji u nas, utvrđivanje sastava populacije bakterija u Srbiji imalo bi višestruk kako naučni tako i praktični značaj.

4. MATERIJAL I METODE

Eksperimentalni rad izveden je na Poljoprivrednom fakultetu Univerziteta u Beogradu - Zemunu (Institut za fitomedicinu, katedra za fitopatologiju) i Institutu za ratarstvo i povrtarstvo u Novom Sadu, Laboratoriji za ispitivanje semena.

Kao predmet istraživanja odabrano je 116 sojeva poreklom iz obolelih biljaka paprike, izolovanih u periodu od 2008 - 2010. godine. Bakterijske kulture su održavane periodičnim presejavanjem na podlogu od hranljivog agara (HA), i čuvane u vidu suspenzije u sterilnoj tekućoj vodi, u mikroepruvetama ($V = 1500\mu\text{l}$), pri 5°C (Schaad i sar. 2001). U svim testovima korišćene su sveže kulture bakterija, stare 24 časa, gajene na hranljivom agaru pri 26°C .

Doktorska disertacija realizovana je u okviru projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja, Republike Srbije, TR31030, pod nazivom: «Stvaranje sorata i hibrida povrća za gajenje na otvorenom polju i zaštićenom prostoru».

4.1. IZOLACIJA PATOGENA I KONTROLNI SOJEVI KORIŠĆENI U RADU

U cilju prikupljanja sojeva patogena, prouzrokovača bakteriozne pegavosti paprike u Srbiji, tokom proleća i leta 2008, 2009 i 2010 godine, izvršen je pregled useva paprike u najvažnijim regionima gajenja ove vrste kod nas.

Prikupljeni su uzorci obolelih biljaka sa karakterističnim simptomima bakteriozne pegavosti, sa različitih sorti paprike, iz 35 lokaliteta: Bačka Palanka, Bašaid, Čačak, Čelarevo, Despotovo, Gložan, Gospodinci, Horgoš, Kikinda, Kraljevo, Kucura, Kula, Lalić, Leskovac, Novi Kneževac, Odžaci, Pivnice, Ratkovo, Ruski Krstur, Šabac, Selenča, Senta, Silbaš, Smederevo, Smederevska Palanka, Sombor, Stanišić, Stapar, Subotica, Topola, Tovariševo, Trstenik, Velika Plana, Vrbas i jednog u Hrvatskoj (Vukovar).

Uzorci su transportovani u laboratoriju u papirnim kesama, gde je dalje izvršena izolacija patogena. Obolelo lišće paprike prvo je oprano pod mlazom tekuće vode i osušeno na sterilnom filter papiru. Izolacija je obavljena maceracijom fragmenata lista, uzetih na prelazu zdravog i obolelog dela tkiva. Nakon par minuta, zasejavanje je obavljeno

razmazom macerata, bakteriološkom petljom po podlozi od kvašćevog ekstrakta, glukoze i CaCO₃ (YDC) u Petri-posudama (R=9 cm) (Schaad, 1988; Arsenijević, 1997). Zasejane podloge su inkubirane pri 26°C, 3 - 4 dana. Za proučavanja odabrane su pojedinačne žute, sluzaste kolonije, prečnika 2 - 3 mm, tipične za rod *Xanthomonas*.

Kao kontrolni poslužili su sojevi iz drugih kolekcija: Nacionalne kolekcije fitopatogenih bakterija Velike Britanije, Instituta za fitomedicinu, Poljoprivrednog fakulteta u Beogradu i Instituta za zaštitu bilja i životne sredine, Beograd (Tabela 4).

Tabela 4. Kontrolni sojevi bakterija korišćeni u testovima

Šifra izolata	Naziv bakterije	Kolekcija
NCPPB 881	<i>Xanthomonas gardneri</i>	National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, Central Science Laboratory, Sand Huton, York, UK
NCPPB 1423	<i>Xanthomonas vesicatoria</i>	
NCPPB 4321	<i>Xanthomonas perforans</i>	
NCPPB 3318	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>glycinea</i>	
KFB 1 KFB 13 KFB 189	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>	Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet (prof. dr Aleksa Obradović)
KFB 062	<i>Xanthomonas vesicatoria</i>	
B 130	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	
KFB 85	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	
TX11	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	Institut za zaštitu bilja i životne sredine, Odsek za bolesti bilja, Beograd (dr Tatjana Popović)
VŠ-BC-1 OTM-3 MAL-1 KŠ-23	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	Institut za zaštitu bilja i životne sredine, Odsek za bolesti bilja, Beograd (dr Veljko Gavrilović)

4.2. PATOGENE ODLIKE PROUČAVANIH SOJEVA

Proučavanje patogenih odlika sojeva izvršeno je na biljkama paprike sorte Kalifornijsko čudo. Proverena je i sposobnost prouzrokovanja hipersenzitivne reakcije na biljkama duvana sorte Samsun.

4.2.1. Inokulacija biljaka paprike

Za proveru patogenosti proučavanih sojeva korišćena je sorta Kalifornijsko čudo. Seme paprike posejano je u plastične kutije prethodno napunjene mešavinom sterilnog supstrata (Klasmann 2) i sterilnog peska u odnosu 3:1. Nakon nicanja, biljke su presađene u plastične čaše i gajene uz smenu svetla i tame na 12 sati. Inokulacija biljaka izvršena je metodom infiltracije suspenzije bakterija pomoću medicinskog šprica, u tkivo između nerava petog ili šestog stalnog lista paprike (Obradović i sar., 2000). Za pripremu inokuluma korišćene su kolonije bakterija starosti 24 časa. Pun zahvat kolonije suspendovan je u sterilnoj destilovanoj vodi do koncentracije približno 10^8 CFU/ml.

Nakon inokulacije, biljke paprike su održavane u laboratorijskim uslovima pri temperaturi oko 25°C. Promene su praćene svakodnevno, tokom 10 dana od inokulacije. Kao pozitivna kontrola korišćene su biljke paprike inokulisane kontrolnim sojem bakterije *X. euvesicatoria* (KFB 189). Kao negativna kontrola poslužile su biljke paprike tretirane sterilnom destilovanom vodom.

4.2.2. Hipersenzitivna reakcija duvana

Lišće duvana sorte Samsun inokulisano je suspenzijom bakterija ($\sim 10^8$ CFU/ml), pomoću medicinskog šprica, u tkivo između nerava sa naličja lista (Klement, 1990). Kao pozitivna kontrola korišćeno je lišće duvana inokulisano kontrolnim sojem bakterije *X. euvesicatoria* (KFB 189). Kao negativna kontrola poslužilo je lišće duvana u koje je izvršena infiltracija sterilne destilovane vode (Arsenijević, 1997). Biljke duvana održavane

su u laboratorijskim uslovima pri temperaturi oko 25°C, a pojava hipersenzitivne reakcije ocenjena je nakon 24 časa.

4.3. MORFOLOŠKE ODLIKE PROUČAVANIH SOJEVA

4.3.1. Razlikovanje bakterija po Gramu pomoću KOH testa

U cilju utvrđivanja morfoloških odlika izolata primenjen je posredni metod sa 3% KOH. Jedan pun zahvat bakterijske kolonije, prenese se sterilnom bakteriološkom petljom na mikroskopsku pločicu i izmeša u kapi 3% rastvora KOH. Pod uticajem baza, ukoliko je bakterija Gram - negativna, dolazi do pucanja ćelijskog zida i oslobađanja nukleinske kiseline, usled čega kap postaje sluzaste konzistencije. To se potvrđuje podizanjem bakteriološke petlje od površine pločice pri čemu se formira elastična nit u vidu "končića", za razliku od Gram - pozitivnih bakterija (Schaad i sar., 2001). Kao kontrolni izolat korišćena je Gram - negativna bakterija *P. s. pv. glycinea* (NCPFB 3318).

4.3.2. Posmatranje morfologije transmisionim elektronskim mikroskopom

Ćelije bakterija posmatrane su elektronskim mikroskopom u Centru za elektronsku mikroskopiju Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu (Katedra za biologiju, prof. dr Aleksandra Korać). Uzorci bakterija podvrgnuti su standardnoj proceduri pripreme za transmisionu elektronsku mikroskopiju koja obuhvata fiksaciju u 2.5% rastvoru glutaraldehida u fosfatnom puferu (0.1 M, pH 7.2), ispiranje u fosfatnom puferu i postfiksaciju u 2% rastvoru osmijum-tetraoksida (OsO_4) u istom puferu. Potom su uzorci dehidratirani serijom rastućih koncentracija etanola, prosvetljeni u propilen-oksidu i ukalupljeni u epoksidnoj Araldit smoli (Fluka, Nemačka). Za transmisionu elektronsku mikroskopsku (TEM) analizu, aralditski kalupi tkiva su istrimovani i isečeni dijamantskim nožem (Diatome, Švajcarska) na tanke preseke debljine 70 nm, na UC6 ultramikrotomu (Leica Microsystems, Nemačka). Preseci su montirani na bakarne ili bakar-paladijumske mrežice, kontrastirani uranil acetatom i olovo citratom u EM Stain aparatu (Leica

Microsystems, Nemačka), a potom posmatrani na CM12 transmissionom elektronskom mikroskopu pri uveličanju od x2000-x25000 (Philips/FEI, Holandija) i snimani kamerom MegaView III (Olympus, Nemačka).

4.4. ODGAJIVAČKE ODLIKE PROUČAVANIH SOJEVA

Odgajivačke odlike bakterija proučene su posmatranjem izgleda kolonija na različitim hranljivim podlogama. Ocenjen je razvoj bakterija u tečnoj (YS) podlozi pri 37°C na, kao i uticaj različitih koncentracija NaCl i trifenil-tetrazolium hlorida (TTC).

4.4.1. Izgled kolonija na hranljivim podlogama

Za proučavanja odgajivačkih odlika sojeva korišćene su standardne i poluselektivne podloge. Posmatran je izgled formiranih kolonija kao što su: boja, oblik, veličina, konzistencija, ispupčenost i sjaj. Zabeležene su promene u podlogama oko formiranih kolonija proučavanih sojeva.

Od standardnih podloga korišćene su: YDC (Yeast extract dextrose calcium carbonate agar) (Schaad i sar. 2001) i MPA (Mesopeptonski agar) (Fahy i Persley, 1983), a od poluselektivnih: mSQ (Schaad i sar. 2001), TTCA (Kelman, 1954), Tween B i Milk - Tween (MT) (Goszczyńska i Serfontein, 1998). Zasejavanje proučavanim sojevima obavljeno je metodom razmaza po površini podloge pomoću bakteriološke petlje. Porast bakterijskih kolonija praćen je svakodnevno tokom 5 dana pri temperaturi 26°C .

4.4.2. Uticaj temperature na porast bakterija

Za proučavanje razvoja bakterija pri 37°C, korišćena je tečna podloga od kvašćevog ekstrakta i neorganskih soli (YS) (Fahy i Persley, 1983). Podloga je razlivena u epruvete u količini od 10 ml. Nakon sterilizacije i hlađenja do 37°C, podloga je zasejana punim zahvatom čiste kulture proučavanih sojeva u dva ponavljanja. Zasejana podloga je postavljena u vodeno kupatilo prethodno zagrejano do 37°C. Uticaj temperature na porast

bakterija praćen je tokom 7 dana nakon čega je ocenjeno prisustvo ili odsustvo razvoja bakterija. Kao pozitivna kontrola korišćena je podloga zasejana sojem *X. euvesicatoria* (KFB 189). Nezasejana podloga poslužila je kao negativna kontrola. Zamućenje podloge usled razvoja bakterija smatra se pozitivnom reakcijom, a ukoliko podloga ostaje bistra, bez zamućenja, nema razvoja, reakcija je negativna.

4.4.3. Tolerantnost prema NaCl

Ocena porasta kolonija izvršena je u tečnoj podlozi od kvašćevog ekstrakta i neorganskih soli (YS) sa dodatkom NaCl koncentracija 5% i 7% (Fahy i Persley, 1983). Nakon sterilizacije i hlađenja, podloge su zasejavane punim zahvatom čiste kulture proučavanih sojeva ponaosob u dva ponavljanja. Razvoj bakterija u podlozi praćen je svakodnevno tokom 7 dana pri 26°C, nakon čega je ocenjeno prisustvo ili odsustvo razvoja bakterija. Kao pozitivna kontrola korišćen je soj bakterije *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (KFB 85). Kao negativna kontrola korišćene su nezasejane podloge obe koncentracije.

4.4.4 Tolerantnost prema trifenil-tetrazolium hloridu

Za izvođenje ovog testa korišćena je osnovna (NA) podloga u koju se, nakon autoklaviranja i hlađenja do 50°C, aseptično filtriranjem (»Sterile syringae filter«, Cronus-FSPS2602-50) dodaje 5% vodeni rastvor trifenil-tetrazolijum hlorida do konačne koncentracije 0,1% ili 0,02%. Nakon razlivanja u Petri posude, zasejavanje proučavanih sojeva izvršeno je pipetiranjem po 3 µl bakterijske suspenzije (približno 10⁸ CFU/ml) u vidu kapi, proučavanih sojeva ponaosob u dva ponavljanja. Porast kolonija posmatran je tokom 4 dana pri 26°C (Arsenijević, 1997).

Kao kontrola korišćena je osnovna podloga bez dodatka trifenil-tetrazolijum hlorida. Kao negativna kontrola korišćene su nezasejane podloge obe koncentracije.

4.5. BIOHEMIJSKO-FIZIOLOŠKE ODLIKE SOJEVA

Proučene su biohemijsko-fiziološke odlike sojeva: aktivnost oksidaze i katalaze; redukcija nitrata; hidroliza želatina, eskulina i skroba; aktivnost pektolitičkih fermenta; metabolizam glukoze (O/F test); stvaranje kiseline iz glukoze, galaktoze, manoze i dekstrina; korišćenje *cis*-akonitinske kiseline (Fahy i Persley, 1983; Lelliott i Stead, 1987; Klement i sar., 1990; Arsenijević, 1997; Schaad i sar., 2001).

4.5.1. Aktivnost oksidaze

Za dokazivanje aktivnosti oksidaze korišćene su trake pripremljene u Institutu za virusologiju; vakcine i serume "Torlak" – Beograd. U prisustvu citohrom oksidaze (bakterija koje poseduju ovaj enzim) dolazi do oksidacije tetrametil-p-fenildiamina i stvaranja indofenola što se zapaža pojavom plavo-ljubičaste boje na traci (Kovacs, 1956). Postupak se sastoji u tome što se trake prenesu na sterilnu površinu. Pre upotrebe trake se navlaže sa po jednom kapi sterilne vode, a potom se sterilnim staklenim ili drvenim štapićem prenese deo kolonije proučavanih sojeva, ponaosob u dva ponavljanja. Posle 30 - 40 sekundi javlja se plavo-ljubičasta boja (pozitivna reakcija) ili traka ne menja boju (negativna reakcija). Očitavanje je potrebno obaviti u roku od dva minuta od trenutka nanošenja kolonije na traku. Kao pozitivna kontrola korišćen je soj bakterije *P. fluorescens* (B 130), a kao negativna kontrolni soj bakterije *P. s. pv. glycinea* (NCPPB 3318).

4.5.2. Stvaranje katalaze

Za dokazivanje stvaranja katalaze korišćen je 20% vodonik-peroksid (H_2O_2). Bakteriološkom petljom pun zahvat čiste kulture proučavanih sojeva nanošen je na mikroskopske pločice na koje je potom dodata kap vodonik-peroksida. Test je pozitivan, ukoliko se pojave mehurići gasa koji nastaju kao rezultat izdvajanja kiseonika zbog prisustva fermenta katalaze u ispitivanoj kulturi (Lelliott i Stead, 1987). Kao pozitivna kontrola korišćen je soj *P. s. pv. glycinea* (NCPPB 3318).

4.5.3. Redukcija nitrata

Sposobnost razlaganja nitrata proučena je zasejavanjem bakterija ubodom u po dve epruvete sa NA podlogom uz dodatak KNO_3 . Nakon zasejavanja epruvete se zaliju sterilnim 3% vodenim agarom (Fahy i Hayward, 1983). Razvoj bakterija nakon pet dana pri 26°C ukazuje na pozitivan rezultat testa i redukciju nitrata (Sands, 1990). Kao pozitivna kontrola korišćen je soj *Pseudomonas fluorescens* (B 130), a kao negativna kontrola poslužile su nezasejane podloge.

4.5.4. Hidroliza želatina

Za proučavanje sposobnosti razgradnje (hidrolize) želatina, po 5 ml podloge od kvašćevog ekstrakta, peptona i želatina (pH 7) razliveno je u epruvete. Nakon sterilizacije i hlađenja, podloge su zasejavane punim zahvatom čiste kulture proučavanih sojeva ponaosob u dva ponavljanja. Rezultati su očitavani nakon 3, 7, 14 i 21 dan. Pre očitavanja epruvete sa podlogom se postavljaju u frižider pri temperaturi 4°C u trajanju 30 minuta. Ukoliko nakon tog perioda ne dođe do očvršćavanja podloge to je znak da je zasejani soj razložio želatin usled proteolitičke aktivnosti bakterija (Lelliott i Stead, 1987). Kao pozitivna kontrola korišćen je soj *P. s. pv. glycinea* (NCPPB 3318), a kao negativna kontrola - nezasejana podloga.

4.5.5. Hidroliza eskulina

Za ovaj test korišćena je osnovna podloga (NA) sa dodatkom eskulina. Nakon sterilizacije i hlađenja, podloge su zasejavane punim zahvatom čiste kulture proučavanih sojeva ponaosob u dva ponavljanja. Inkubacija je obavljena tokom 10 dana, pri 26°C . Pozitivnu reakciju označava pojava promene boje podloge u tamnomrku ili cmu (Lelliott i Stead, 1987). Kao pozitivna kontrola korišćen je soj bakterije *X. a. pv. phaseoli* (TX 11), a kao negativna kontrola nezasejana podloga.

4.5.6. Hidroliza skroba

Za proučavanje amilolitičke aktivnosti korišćena je osnovna podloga (NA) sa dodatkom rastvorljivog skroba (Lelliott i Stead, 1987). Nakon razlivanja u Petri posude, izvršeno je zasejavanje proučavanim sojevima u dva ponavljanja. Inkubacija je obavljena tokom 7 dana, pri 26°C. Nakon sedam dana oko formiranih kolonija proučavanih sojeva doda se nekoliko kapi Lugolovog rastvora. Pojava žute boje oko bakterijske kolonije označava pozitivnu reakciju, koja ukazuje da je došlo do hidrolize skroba dejstvom amilolitičkih fermentata. Pojava plave boje oko kolonije ukazuje da skrob nije hidrolizovan i označava negativnu reakciju. Kao pozitivna kontrola korišćen je soj bakterije *X. a. pv. phaseoli* (TX 11).

4.5.7. Pektolitička aktivnost na kriškama krompira

Za ispitivanje pektolitičke aktivnosti proučavanih sojeva korišćene su oprane, oljuštene i pomoću alkohola dezinfikovane krtole krompira, koje su poprečno isečene na manje kriške debljine 7 - 8 mm. Kriške su postavljene u sterilne Petri posude a potom prelivene sterilnom destilovanom vodom do polovine visine kriški. Deo kolonije bakterije sa hranljivog agara nanet je bakteriološkom petljom na površinu kriške. Pojava razmekšavanja tkiva usled aktivnosti pektolitičkih fermentata, nakon 24 časa, predstavlja pozitivan test (Arsenijević, 1997). Kao pozitivna kontrola korišćen soj *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (KFB 85). Neinkulisane kriške krompira korišćene su kao negativna kontrola.

4.5.8. Oksidativno-fermentativni metabolizam glukoze

Sposobnost bakterija da u aerobnim ili anaerobnim uslovima stvaraju kiselinu iz glukoze ispitana je prema metodici koju su predložili Hugh i Leifson (1953). U 4,5 ml osnovne podloge, nakon autoklaviranja aseptično je dodato 0,5 ml 10% vodenog rastvora glukoze, tako da konačna koncentracija bude 1%. Ubodom su zasejavane po četiri epruvete

svakim sojem ponaosob, od kojih se po dve zaliju sterilnim tečnim parafinom do visine sloja 15 mm. Razlaganjem glukoze od strane bakterija u aerobnim (O) i/ili anaerobnim (O/F ili F tip) uslovima dolazi do stvaranja kiseline i promene pH vrednosti podloge, što prouzrokuje i promenu boje podloge u žutu. Kao pozitivna kontrola korišćen je soj *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (KFB 85), a kao negativna kontrola nezasejane podloge. Očitavanje rezultata je vršeno trećeg i sedmog dana (Arsenijević, 1997).

4.5.9. Stvaranje kiseline iz ugljenih hidrata

Razgradnja glukoze, galaktoze, manoze i dekstrina, proučena je korišćenjem osnovne Dye-ove podloge (Dye, 1968), u koju se nakon sterilizacije i hlađenja (50°C), aseptično dodaju 10% rastvori ugljenih hidrata, do konačne koncentracije 1%. Ubodom su zasejavane epruvete, punim zahvatom čistih kultura proučavanih sojeva ponaosob u dva ponavljanja. Promena boje podloge u žutu, koja nastaje usled stvaranja kiseline aktivnošću bakterija, označava pozitivnu reakciju. Očitavanje rezultata vršeno je nakon 7, 14 i 21 dan. Za poređenje su korišćene podloge zasejane kontrolnim sojevima *X. vesicatoria* (NCPPB 1423), *X. gardneri* (NCPPB 881), *X. perforans* (NCPPB 4321) i *X. euvesicatoria* (KFB 189). Kao negativna kontrola korišćena je nezasejana podloga.

4.5.10. Korišćenje *cis*-akonitinske kiseline

U osnovnu Dye-ove podlogu se nakon sterilizacije i hlađenja (50°C), aseptično dodaje 10% rastvor *cis*-akonitinske kiseline do konačne koncentracije 0,5 % (O'Garro, 1998). Podloge se razlivaju u Petri posude i nakon očvršćavanja zasejavaju sa po 3 μ l bakterijske suspenzije ($\sim 10^8$ CFU/ml) proučavanih sojeva ponaosob u dva ponavljanja. Inkubacija je obavljena tokom 5 dana pri 26°C. Pozitivnim su ocenjeni sojevi kod kojih je zabeležen porast. Kao kontrolni korišćeni su sojevi: *X. vesicatoria* (NCPPB 1423), *X. gardneri* (NCPPB 881), *X. perforans* (NCPPB 4321) i *X. euvesicatoria* (KFB 189). Kao negativna kontrola poslužila je nezasejana podloga.

4.6. SEROLOŠKE ODLIKE PROUČAVANIH SOJEVA

U ovom radu korišćene su dve serološke metode: DAS - ELISA test (*Double Antibody Sandwich - Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) i test aglutinacije.

4.6.1. DAS - ELISA test

Korišćenjem poliklonalnih antiseruma bakterije *X. c. pv. vesicatoria* (LOEWE Biochemica GmbH, Germany) DAS - ELISA (*Double Antibody Sandwich - Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) test je izveden po uputstvu proizvođača (Tabela 5). U testu su korišćene polistirenske mikrotitarske ploče Nunc sa 96 (8 x 12) bunarčića (Šema 2). Svi proučavani sojevi testirani su u dva ponavljanja. Promena boje je praćena vizuelno, a zatim i automatskim merenjem ekstinkcije pri talasnoj dužini 405 nm (Multiskan Ascent, Thermo Labsystems, Helsinki, Finland).

Dobijene vrednosti očitanih ekstinkcija pri talasnoj dužini 405 nm, izražavaju se kao srednja vrednost dva ponavljanja, za svaki soj ponaosob, uključujući kontrole. Pozitivnim reakcijama smatraju se vrednosti čija je ekstinkcija najmanje dva puta viša od srednje vrednosti negativne kontrole tzv. "cut-off" vrednosti (Krstić i Tošić, 1994).

Tabela 5. Procedura za izvođenje DAS - ELISA testa po protokolu proizvođača (LOEWE Biochemica GmbH, Germany)

Procedura	Reagens	Zapremina (1 otvor)	Vreme inkubacije	Temperatura inkubacije	Ispiranje
Inkubacija antitela	Antitela (IgG) razređena u odnosu 1:200 u puferu za oblaganje ploče	200 µl	4 sata	37°C	Pufer za ispiranje
Formiranje kompleksa antitelo - antigen	Uzorci i kontrole u ekstrakciono/konjugatnom puferu	200 µl	Tokom noći	4°C	Pufer za ispiranje
Primena konjugata	AP - konjugat razređen u ekstrakciono/konjugatnom puferu u odnosu 1:200	200 µl	4 sata	37°C	Pufer za ispiranje
Enzimaska reakcija	Supstratni rastvor 1 mg p-nitrofenil fosfata u 1 ml supstratnog pufera	200 µl	1-2 sata	Sobna temperatura	-

Napomena: Svi puferi i rastvori pripremljeni su neposredno pre izvođenja testa.

Šema 2. Prikaz rasporeda proučavanih sojeva na mikrotitarskim pločama

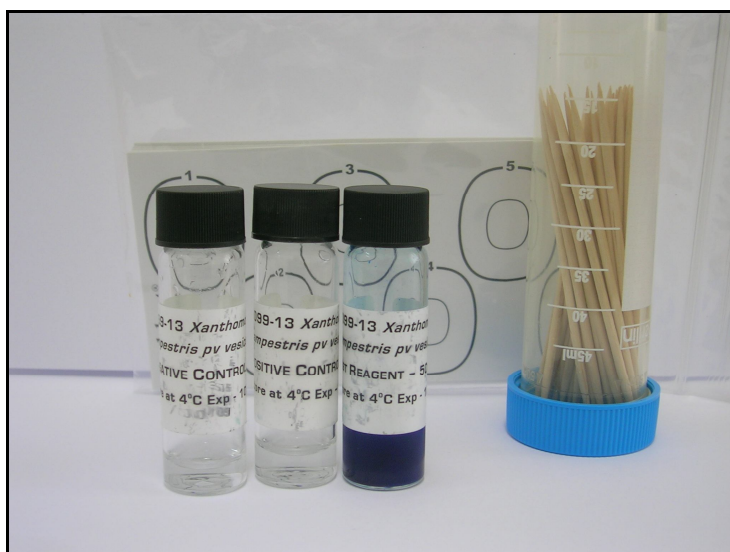
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Ponavljanje											
B	I	Uzorci	Uzorci	Uzorci	Uzorci	Uzorci	Uzorci	Uzorci	Uzorci	Uzorci	K+	
C	II	Uzorci	Uzorci	Uzorci	Uzorci	Uzorci	Uzorci	Uzorci	Uzorci	Uzorci	K+	
D	I	Uzorci	Uzorci	Uzorci	Uzorci	Uzorci	Uzorci	Uzorci	Uzorci	Uzorci	B	
E	II	Uzorci	Uzorci	Uzorci	Uzorci	Uzorci	Uzorci	Uzorci	Uzorci	Uzorci	B	
F	I	Uzorci	Uzorci	Uzorci	Uzorci	Uzorci	Uzorci	Uzorci	Uzorci	Uzorci	K-	
G	II	Uzorci	Uzorci	Uzorci	Uzorci	Uzorci	Uzorci	Uzorci	Uzorci	Uzorci	K-	
H												

Napomena: U bunarčice prve i poslednje kolone, kao i prvog i drugog reda na ploči nisu nanošeni uzorci da bi se izbegla eventualna pojava većih vrednosti ekstinkcija prilikom očitavanja. Uzorci predstavljaju suspenzije bakterija proučavanih sojeva.

4.6.2. Metod aglutinacije

Metod aglutinacije je serološki test koji se zasniva na formiranju makromolekula, kao rezultata reakcije srodnih antitela i antigena, što se zapaža u vidu pahuljastog taloga. Za ovaj test korišćena su antitela specifična za bakteriju *X. c. pv. vesicatoria*, uključujući pozitivnu i negativnu kontrolu (ADGEN NEOGENEUROPE Ltd., Scotland, UK) (Slika 7).

Postupak se sastoji u tome da se čiste kulture proučavanih sojeva pomoću drvene čačkalice prenesu u pripremljenu kap test reagensa, koji je prethodno nanet na test pločice u dva ponavljanja. Nakon homogenizacije kolonije i reagensa, ukoliko je reakcija pozitivna, dolazi do pojave granuloznog taloga (aglutinacija) u centru kapi, nakon 60 sekundi. U slučaju negativne reakcije, kap test reagensa ostaje prozima, bez taloga. Rezultati su kvantitativni, vidljivi golim okom ili uz korišćenje ručne lupe.



Slika 7. Komplet za izvođenje testa aglutinacije sa specifičnim antitelima bakterije *X. c. pv. vesicatoria*, sa pozitivnom i negativnom kontrolom

4.7. MOLEKULARNE METODE PROUČAVANJA

Diferencijacija *Xanthomonas* spp. prouzrokovaca bakterijske pegavosti paprike izvršena je primenom dve molekularne metode.

Za pripremu uzorka DNK, korišćene su sveže kulture bakterija gajene na NA podlozi tokom 24 časa. Za svaki soj, pojedinačna kolonija je suspendovana u 100 μ l sterilne destilovane vode u mikrotubama. Zatvorene mikrotube zagrevane su pri 95°C u trajanju od 15 minuta, a potom odmah prebačene na led i nakon hlađenja centrifugirane na 11000 rpm, 5 minuta.

4.7.1. Restrikciona analiza - RFLP

Poređenje proučavanih sojeva u pogledu građe DNK, izvršeno je primenom restrikcione analize - RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), prema metodi koju opisuju Obradović i sar. (2004). Eksperimentalni deo izveden je u dve faze: prvo je izvršeno umnožavanje *hrpB* regiona DNK proučavanih sojeva prajmerima RST65 i RST69; a potom je obavljena digestija dobijenih PCR proizvoda restrikcionim enzimima *CfoI*, *TaqI* i *HaeIII*. Za elektroforetsko razdvajanje produkata restrikcije korišćen je 4% agarozni gel. Izvršena je restrikciona analiza kontrolnih sojeva bakterije *X. euvesicatoria*, *X. vesicatoria*, *X. perforans* i *X. gardneri*, kao i sojeva koji pripadaju različitim fiziološkim rasama.

4.7.1.1. Umnožavanje *hrp* gena

Umnožavanje *hrp* (*HrpB* regiona DNK) gena proučavanih i kontrolnih sojeva obavljena je prajmerima RST65 i RST69 primenom lančane reakcije polimeraze (Tabela 6). Reakciona smeša, zapremine 25 μ l, sastoji se od: 12,5 μ l Master Mix Fermentas - Litvanija (Taq DNK polimeraza 0,05 U/ μ l, 4 mM MgCl₂, 0,4 mM dNTP); 0,5 μ l svakog prajmera finalne koncentracije 0,2 μ M; 10,5 μ l H₂O i 1 μ l DNK. Uslovi PCR reakcije podešeni su prema programu prikazanom u tabeli 7.

Dobijeni produkti su razdvojeni elektroforezom na 1,5% agaroznom gelu koji sadrži etidijum-bromid (0,5 g/ml) u 1xTBE puferu, u trajanju od 30 minuta, pri konstantnom

naponu od 100 V i maksimalnoj jačini struje od 5 V/cm. Na gel, u bunarčice, nanošeno je po 10 µl PCR produkata. Fotografisanje je izvršeno primenom DOC Print sistema (VILBER Lourmat, Francuska).

Positivnom reakcijom smatrani su detektovani proizvodi veličine 420 bp, uz uslov da isti nisu zabeleženi u uzorcima koji predstavljaju negativnu kontrolu i blank.

Tabela 6. Prajmeri korišćeni za umnožavanje DNK (Obradović i sar., 2004a)

Prajmeri	Sekvenca (5'...3')	Veličina baznog para
RST 65	GTC GTC GTT ACG GCA AGG TGG TCG	420 bp
RST 69	TCG CCC AGC GTC ATC AGG CCA TC	

Tabela 7. Uslovi PCR reakcije (Leite i sar., 1995)

Stadijum reakcije	Temperatura (°C)	Vreme	Ciklusi
Početa denaturacija	94	5 min	1
Denaturacija	95	30 sek	x30
Aniling	62	30 sek	
Ekstenzija	72	45 sek	
Završna ekstenzija	72	5 min	1

4.7.1.2. Digestija restrikcionim enzimima

Drugi korak primenom ove metode sastoji se u digestiji dobijenih PCR proizvoda (420 bp) restrikcionim enzimima *CfoI*, *TaqI* i *HaeIII* (Fermentas Life Science). Uslovi digestije PCR proizvoda restrikcionim enzimima prikazani su u Tabeli 8.

Nakon digestije enzimima, dobijeni fragmenti razdvojeni su na 4% agaroznom gelu koji sadrži etidijum-bromid (0,5 g/ml) u 1xTBE puferu. U bunarčice gela pipetirano je po 10 µl produkta. Razdvajanje je izvršeno elektroforezom u trajanju 60 minuta, pri

konstantnom naponu 100 V i maksimalnoj jačini struje 5 V/cm. Gel je posmatran na UV transluminatoru i fotografisan pomoću DOC Print sistema (VILBER Lourmat, Francuska).

Jedinstvena kombinacija (otisak) restrikcionih fragmenata karakteristična je za svaku vrstu *Xanthomonas* spp. ponaosob. Dobijeni restrikcioni profili upoređivani su sa profilima kontrolnih sojeva: *X. vesicatoria* (NCPBP 1423), *X. gardneri* (NCPBP 881), *X. perforans* (NCPBP 4321), *X. euvesicatoria* (KFB 189; KFB 13), kao i sa rezultaima datim od strane Obradović i sar. (2004).

Tabela 8. Restrikcioni enzimi i uslovi za digestiju PCR proizvoda nakon amplifikacije

Enzimi	Kompatibilni enzimi*	Mesto sečenja	Sastav smeše za digestiju**	Inkubacija (5 h)
<i>CfoI</i>	<i>AspLEI, BstHHI, HhaI</i>	...GCG C... ...C GCG...	1. PCR proizvoda 10 µl	37°C
<i>TaqI</i>	Nema	...T CGA... ...AGC T...	2. voda bez nukleaze 18 µl 3. 10x Buffer R 2 µl	65°C
<i>HaeIII</i>	<i>BshFI, BspANI, BsuRI, PhoI</i>	...GG CC... ...CC GG...	4. enzim 2 µl	37°C

Napomena:

*Kompatibilni enzimi predstavljaju adekvatnu zamenu navedenim restrikcionim enzimima

**Sastav smeše za digestiju prikazan u tabeli odnosi se na jednu reakciju.

4.7.2. Diferencijacija bakterija *Xanthomonas* spp. primenom specifičnih prajmera

Diferencijacija proučavanih sojeva izvršena je molekularnom metodom uz primenu specifičnih prajmera za vrste *Xanthomonas* spp. ponaosob, prema Koenraad i sar. (2009). Korišćeni prajmeri prikazani su u Tabeli 9, a uslovi PCR reakcija prikazani su u Tabeli 10. Reakciona smeša, zapremine 25 µl, sastoji se od: 12,5 µl Master Mix Fermentas - Lithuania (Taq DNK polimeraza 0,05 U/µl, 4mM MgCl₂, 0,4mM dNTP); po 0,5 µl svakog prajmera finalne koncentracije 0,2 µM; 9,5 µl H₂O i 2 µl DNK. Mikrotubice sa reakcionom smešom,

homogenizovane su i prenete u blok PCR aparata Mastercycler ep gradient S (Eppendorf, Nemačka).

Dobijeni produkti su razdvojeni elektroforezom na 1,5% agaroznom gelu koji sadrži etidijum-bromid (0,5 g/ml) u 1xTBE puferu, u trajanju od 30 minuta, pri konstantnom naponu od 100 V i maksimalnoj jačini struje od 5 V/cm. U gel je pipetirano po 10 µl PCR produkata. Gel je posmatran na UV transluminatoru i fotografisan pomoću DOC Print sistema (VILBER Lourmat, Francuska).

Pojava fragmenata očekivane veličine za svaku vrstu *Xanthomonas* spp. ponaosob smatrana je pozitivnom reakcijom, uz uslov da isti nisu zabeleženi u uzorcima koji predstavljaju negativnu kontrolu i blank.

Tabela 9. Prajmeri korišćeni u radu

Prajmer	Sekvenca (5'.....3')	Veličina baznog para	Bakterija
XeF	CAT GAA GAA CTC GGC GTA TCG	173 bp	<i>X. euvesicatoria</i>
XeR	GTC GGA CAT AGT GGA CAC ATA C		
XvF	CCA TGT GCC GTT GAA ATA CTT G	138 bp	<i>X. vesicatoria</i>
XvR	ACA AGA GAT GTT GCT ATG ATT TGC		
XpF	GTC GTG TTG ATG GAG CGT TC	197 bp	<i>X. perforans</i>
XpR	TGA CCG ATA AAG ACT GCG AAA G		
XgF	TCA GTG CTT AGT TCC TCA TTG TC	154 bp	<i>X. gardneri</i>
XgR	GTG CGA GTC AAT TAT CAG AAT GTG G		

Tabela 10. Uslovi PCR reakcija

Stadijum	<i>X. vesicatoria</i> i <i>X. gardneri</i>			<i>X. euvesicatoria</i> i <i>X. perforans</i>		
	°C	Vreme	Ciklusi	°C	Vreme	Ciklusi
Inicijalna denaturacija	94	2 min	1	94	2 min	1
Denaturacija	94	30 sec	35	94	30 sec	35
Aniling	55	1 min		60	1 min	
Ekstenzija	72	1 min		72	1 min	
Finalna ekstenzija	72	5 min	1	72	5 min	1

4.7.2.1. Utvrđivanje praga osetljivosti PCR-a

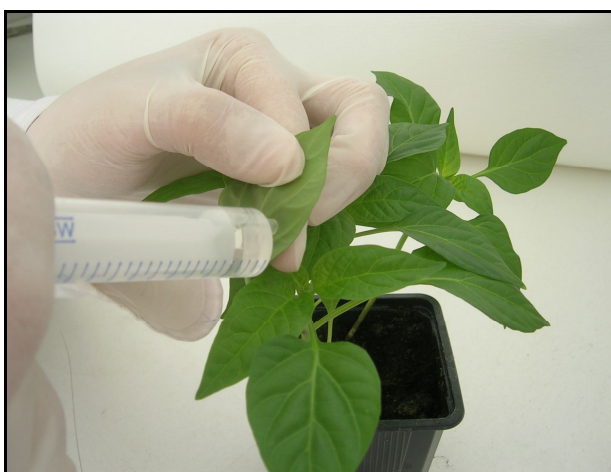
Osetljivost PCR metode proučavana je korišćenjem serije decimalnih razređenja soja RKFB 243 u sterilnoj destilovanoj vodi, počev od $0,4 \times 10^8$ do $0,4$ CFU/ml. Gustina bakterijske suspenzije podešena je pomoću turbidimetra merenjem optičke gustine ($OD=0.3$) pri talasnoj dužini 600 nm. Koncentracija bakterija u uzorcima potvrđena je zasejavanjem razređenja bakterija na NA podlogu i brojanjem pojedinačnih kolonija dva dana kasnije (Klement i sar., 1990). Set prajmera XeF/XeR korišćen je za PCR reakciju (Tabela 9), prema programu prikazanom u tabeli 10.

4.8. UTVRĐIVANJE FIZIOLOŠKIH RASA

Zastupljenost pojedinih fizioloških rasa među proučavanim sojevima određena je na osnovu reakcije biljaka paprike sorte Early Calwonder (ECW) i njenih izogenih linija: ECW-10 (*Bs1*), ECW-20 (*Bs2*), ECW-30 (*Bs3*), i biljaka paprike *Capsicum pubescens* PI235047 (*Bs4*) (Sahin i Miller, 1998; Stall i sar., 2009) (Tabela 11).

Setva semena paprike je izvedena u plastične kutije (25x17 cm) napunjene smešom hranljivog supstrata (Klasmann 2) i sterilnog peska u odnosu 3:1. Posejano je po 50 semena odabranih sorti i linija. Nakon setve, seme je prekriveno smešom hranljivog supstrata (Klasmann 2) i sterilnog peska, debljine oko 1 cm, a kutije su potom zatvorene plastičnim poklopcima i inkubirane u termostatu na 25°C. Nakon nicanja, kutije su otvorene i izložene izvoru svetlosti naredna 24 časa. Potom, biljke su presađene u plastične čaše i gajene u kontrolisanim uslovima uz smenu svetla (16 časova) i tame (8 časova). Biljke, u fazi šestog - sedmog stalnog lista, pažljivo su odabrane, obeležene i pripremljene za inokulaciju.

Gustina bakterijske suspenzije ($\sim 10^8$ CFU/ml) podešena je pomoću turbidimetra merenjem optičke gustine (OD=0.3) pri talasnoj dužini 600 nm. Pripremljenom suspenzijom inokulacija biljaka izvedena je metodom ubrizgavanja suspenzije bakterija pomoću medicinskog šprica bez igle (Slika 8). Na taj način suspenzija ispuni interkostalni prostor, obično između dva nerva.



Slika 8. Inokulacija metodom infiltracije bakterijske suspenzije pomoću medicinskog šprica

Promene na inokuliranim listovima praćene su svakodnevno tokom sedam dana. Pojava hiperzenzivne reakcije, koja se ispoljava nakon 24 časa, nastaje ukoliko se radi o otpornom domaćinu koji poseduje gene otpornosti prema avirulentnim genima patogena (Minsavage i sar. 1990). Ukoliko biljka domaćin ne poseduje gene otpornosti, do promena dolazi obično nakon pet dana od izvršene inokulacije što je posledica kompatibilnog odnosa patogen - domaćin (Sahin i Miller, 1998; Stall i sar., 2009). Diferencijacija rasa na osnovu reakcije biljaka prikazana je u tabeli 11.

Tabela 11. Diferencijacija rasa na osnovu reakcije biljaka (Stall i sar., 2009).

Rasa	Funkcionalni avirulentni (<i>avr</i>) geni patogena	Diferencijalne linije paprike				
		ECW*	ECW-10 <i>Bs1</i>	ECW-20 <i>Bs2</i>	ECW-30 <i>Bs3</i>	PI235047 <i>Bs4</i>
P0	<i>avrBs1, avrBs2, avrBs3, avrBs4</i>	S	HR	HR	HR	HR
P1	<i>avrBs2, avrBs3, avrBs4</i>	S	S	HR	HR	HR
P2	<i>avrBs1, avrBs2</i>	S	HR	HR	S	S
P3	<i>avrBs2, avrBs4</i>	S	S	HR	S	HR
P4	<i>avrBs3, avrBs4</i>	S	S	S	HR	HR
P5	<i>avrBs1</i>	S	HR	S	S	S
P6	<i>avrBs4</i>	S	S	S	S	HR
P7	<i>avrBs2, avrBs3</i>	S	S	HR	HR	S
P8	<i>avrBs2</i>	S	S	HR	S	S
P9	<i>avrBs3</i>	S	S	S	HR	S
P10	nema	S	S	S	S	S

* ECW-Early Calwonder ne poseduje gene otpornosti (osetljiva prema svim rasama patogena)
ECW-10, ECW-20, ECW-30 izogene linije sorte Early Calwonder sa različitim genima otpornosti *Bs*
PI235047 (*C. pubescens*) sa *Bs4* genima otpornosti koja diferencira rasu P1 i P7; P3 i P8; P4 i P9; P6 i P10.
(S) - Osetljiva (kompatibilna) reakcija; (HR) - Otporna reakcija

4.9. PROUČAVANJE OSETLJIVOSTI GENOTIPOVA PAPRIKE PREMA PROUZROKOVAČU BAKTERIOZNE PEGAVOSTI

U cilju proučavanja osetljivosti genotipova paprike izvedena su dva oglada u uslovima zaštićenog prostora (staklenik Instituta za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad, Zavod za uljane kulture). Inokulacija biljkaka potapanjem izvedena je uz primenu dve koncentracije inokuluma (10^6 CFU/ml i 10^8 CFU/ml) odabranog soja *X. euvesicatoria* RKFB 263 rase (P8), po metodi koju opisuju Kousik i Ritchie (1996). Gustina bakterijske suspenzije ($\sim 10^8$ CFU/ml) podešena je pomoću turbidimetra merenjem optičke gustine (OD=0.3) pri talasnoj dužini 600 nm. Ocena pojave i intenziteta simptoma u oba eksperimenta izvršena je nakon 7 i 14 dana.

Za inokulaciju je odabrano 11 genotipova paprike: HS-2, Amfora, Plamena, Anita, Novosađanka, Palanačka babura, Palanačko čudo, Slonovo uvo, hibrid - Brillant F1, Bihar F1 i Boni. Kao kontrola uzeta je sorta Early Calwonder (ECW) osetljiva prema svim rasama patogena, a kao nosilac gena otpornosti *Bs2* prema genu avirulentnosti patogena *avrBs2* njena izogena linija ECW - 20. Setva semena je izvedena u smešu supstrata (Klasmann 2) i sterilnog peska u odnosu 3:1. Nakon nicanja biljke su izložene fotoperiodu uz osvetljeni deo u trajanju od 16 časova i mraka u trajanju od 8 časova.

Veštačka inokulacija biljaka izvedena je u fazi 5 - 6 potpuno razvijenih listova, metodom potapanja u suspenziju bakterija lisne mase biljaka u potpunosti tokom 10 sekundi (Slika 9). U suspenziju je neposredno pre inokulacije dodat okvašivač Silwet L - 77, do konačne koncentracije od 0,01%.

Oba oglada postavljena su po potpuno slučajnom blok rasporedu u četiri ponavljanja sa po pet biljaka u svakom ponavljanju. Ocena reakcije genotipova paprike prema patogenu i intenzitet zaraze izvršeni su prema skali po Horsfall i Barratt-u (HB scale) 7 i 14 dana nakon inokulacije (Horsfall i Barratt, 1945) (Tabela 12). Dobijeni podaci iz oglada statistički su obrađeni metodom analize varijanse, a razlike između sorti i linija testirane su multiplim rang testom (Duncan test, program Statistica 10).

Tabela 12. Skala za ocenu po Horsfall-Barratt-u

Ocena	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Infekcija (%)	0	0-3	3-6	6-12	12-25	25-50	50-75	75-87	87-94	94-97	97-100	100



Slika 9. Inokulacija metodom potapanja biljaka

4.10. PROUČAVANJE OSETLJIVOSTI PROUČAVANIH SOJEVA PREMA BAKTERICIDIMA

Za ova proučavanja korišćena je podloga sa saharozom i peptonom (SPA) (Lelliot i Stead, 1987). Ispitivano je dejstvo bakar-sulfata (CuSO_4), antibiotika streptomicina i kasugamicina, pri različitim koncentracijama, na razvoj bakterijskih ćelija (Tabela 13). U autoklaviranu i podlogu prohlađenu na 50°C , dodati su filterom sterilisani rastvori bakar-sulfata do konačne koncentracije od 100 i 200 ppm tj. aktivne komponente navedenih antibiotika do konačne koncentracije od 50, 100 i 200 ppm (Loper i sar., 1991; Obradović i sar., 2000a).

Zasejavanje je obavljeno pipetiranjem po 3 μl bakterijske suspenzije (približno 10^8 CFU/ml) u vidu kapi, proučavanih sojeva ponaosob u dva ponavljanja. Inkubacija zasejanih podloga obavljena je pri temperaturi 28°C . Nakon 48 časova, ocenjeno prisustvo ili odsustvo razvoja kolonija. Kao kontrolni korišćen je soj *X. vesicatoria* rezistentan na CuSO_4 i pomenute antibiotike (KFB 062). Zasejana je i podloga bez dodatka testiranih baktericida, kao negativna kontrola. Ogled je izveden za svaki tretman u tri ponavljanja.

Tabela 13. Korišćeni baktericidi

Aktivna materija	Koncentracija (ppm)
CuSO_4	100, 200
Streptomicin	50, 100, 200
Kasugamicin	50, 100, 200

4.11. BAKTERIOFAGI

4.11.1. Izolacija bakteriofaga

Kao materijal za izolaciju specifičnih faga korišćeno je zemljište uzeto neposredno ispod zaraženih biljaka (Obradović i sar., 2006; Gašić i sar., 2007). Oko 200 g zemljišta potopljeno je u 200 ml 0,01 M rastvora MgSO₄. Nakon kraćeg mešanja na magnetnoj mešalici smeša je ostavljena preko noći na sobnoj temperaturi. Sutradan, pažljivo je odlicena tečna faza i nakon centrifugiranja na 11000 rpm-a u trajanju od 10 min, supernatant je pipetom prenet u sterilne staklene posude. Zatim je dodat hloroform (10:1 v/v) i nakon sat vremena tretiranja, izdvojena je gornja faza suspenzije u kojoj se očekuje prisustvo faga. Mikroeprove su čuvane pri 4°C, bez prisustva svetlosti.

4.11.2. Specifičnost bakteriofaga prema *Xanthomonas* spp.

Do sada je utvrđeno da bakterioznu pegavost paprike u svetu može prouzrokovati više vrsta roda *Xanthomonas* spp. (Obradović i sar., 2004a). Takođe, poznato je i da se fagi mogu razlikovati po spektru domaćina odnosno specifičnosti prema bakterijama. Zbog toga je proučena specifičnost izolovanih faga bakterije *X. euvesicatoria* prema sojevima patogena izolovanih iz uzoraka paprike poreklom iz najznačajnijih regiona gajenja u Srbiji (Tabela 14).

Proučena je specifičnost izolata faga prema 59 sojeva bakterije *X. euvesicatoria* kao i prema 7 kontrolnih sojeva, patogena paprike i paradajza (Tabela 15).

Na dno prazne Petri kutije naneto je po 100 µl suspenzije svakog soja bakterije u sterilnoj česmenskoj vodi, a potom je dodata prohlađen NYA podloga. Po očvršćavanju, pipetom je na površinu podloge naneto po 4 µl suspenzije faga. Nakon 24 časa inkubacije u termostatu pri 27°C, posmatrana je pojava plakova. Test je urađen u tri ponavljanja.

Tabela 14. Sojevi bakterije *Xanthomonas euvesicatoria* korišćeni u radu

Redni broj	Soj	Poreklo	Redni broj	Soj	Poreklo
1.	RKFB 112	Horgoš	29.	RKFB 231	Novi Kneževac
2.	RKFB 113	Horgoš	30.	RKFB 235	Novi Kneževac
3.	RKFB 114	Horgoš	31.	RKFB 236	Novi Kneževac
4.	RKFB 115	Horgoš	32.	RKFB 239	Gospođinci
5.	RKFB 116	Horgoš	33.	RKFB 240	Gospođinci
6.	RKFB 164	Kula	34.	RKFB 241	Gospođinci
7.	RKFB 165	Topola	35.	RKFB 243	Gložan
8.	RKFB 167	Kula	36.	RKFB 244	Gložan
9.	RKFB 189	Kula	37.	RKFB 248	Gložan
10.	RKFB 191	Despotovo	38.	RKFB 249	Gložan
11.	RKFB 192	Despotovo	39.	RKFB 251	Pivnice
12.	RKFB 198	Despotovo	40.	RKFB 252	Pivnice
13.	RKFB 202	Horgoš	41.	RKFB 255	Silbaš
14.	RKFB 203	Horgoš	42.	RKFB 257	Vukovar
15.	RKFB 204	Horgoš	43.	RKFB 261	Ruski Krstur
16.	RKFB 205	Horgoš	44.	RKFB 262	Ruski Krstur
17.	RKFB 208	Smederevo	45.	RKFB 265	Kula
18.	RKFB 212	Smederevo	46.	RKFB 266	Kula
19.	RKFB 213	Smederevo	47.	RKFB 267	Odžaci
20.	RKFB 216	Bačka Palanka	48.	RKFB 269	Vrbas
21.	RKFB 217	Bačka Palanka	49.	RKFB 271	Kucura
22.	RKFB 218	Tovariševo	50.	RKFB 274	Stanišić
23.	RKFB 220	Bašaid	51.	RKFB 275	Stanišić
24.	RKFB 221	Bašaid	52.	RKFB 276	Lalić
25.	RKFB 223	Senta	53.	RKFB 279	Lalić
26.	RKFB 224	Senta	54.	RKFB 282	Sombor
27.	RKFB 227	Kikinda	55.	RKFB 283	Sombor
28.	RKFB 228	Kikinda	56.	RKFB 284	Ratkovo

Tabela 15. Kontrolni sojevi *Xanthomonas* spp. korišćeni u radu

Sojevi bakterija	Poreklo	Opis
<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>		
KFB* 1	Kovilj	Rasa P8
KFB 13	Horgoš	Rasa P7
KFB 189	Družetić	Rasa P8
<i>Xanthomonas vesicatoria</i>		
KFB 29	Lozovik	Rasa T2
KFB 0108	NCPPB**1423	
<i>Xanthomonas perforans</i>		
KFB 061	91-118 RIF	Rasa T3
KFB 0109	NCPPB 4321	
<i>Xanthomonas gardneri</i>		
KFB 0110	NCPPB 881	
KFB 0111	NCPPB 881	
KFB 0116	ATCC*** 19865	

Kolekcije kontrolnih sojeva: KFB Kolekcija fitopatogenih bakterija, Poljoprivredni fakultet, Zemun. prof. dr Aleksa Obradović; NCPPB National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, UK: ATCC American Type Culture Collection, Manassas, USA

5. REZULTATI

U cilju identifikacije patogena proučene su patogene, odgajivačke, biohemijsko-fiziološke, serološke i molekularne odlike sojeva. Utvrđena je rasprostranjenost patogena u Srbiji, ustanovljene su 4 fiziološke rase, različit stepen osetljivosti prema baktericidima, ocenjena je osetljivost genotipova paprike prema patogenu i izvršena je izolacija prirodnih neprijatelja - bakteriofaga.

5.1. RASPROSTRANJENOST PATOGENA U SRBIJI

Topla proleća i padavine iznad višegodišnjeg proseka pogodovale su širenju patogena u svim lokalitetima tokom 2008, 2009 i 2010. godine (Tabela 16).

U ovom radu je proučeno 116 sojeva bakterija, izolovanih u periodu od 2008 do 2010. godine poreklom iz 35 različitih lokaliteta paprike u Srbiji i jednog lokaliteta u Republici Hrvatskoj (Vukovar) (Tabela 17).

Tabela 16. Agrometeorološki podaci prosečnih srednjih mesečnih temperatura i ukupnih količina padavina tokom juna 2008, 2009 i 2010. godine (RHMZ, Beograd)

Godina	Jun							
	Srednja mesečna temperature vazduha (°C)							
	Sombor	Kiknda	Novi Sad	Loznica	S. Palanka	Kraljevo	Zaječar	Niš
2008	22	22	22	22	22	21	21	23
2009	20	20	20	20	20	20	20	21
2010	20	20	20	20	21	20	20	21
Ukupna količina padavina (mm)								
2008	90	123	116	119	36	63	44	28
2009	106	117	123	187	153	210	77	111
2010	238	201	174	196	137	136	94	66

Tabela 17. Spisak proučavanih sojeva poreklom iz Srbije

Sojevi RKFB	Genotipovi paprike	Lokalitet
164	P. čudo	Kula
165	P. čudo	Topola
166	P. čudo	Topola
167	P. čudo	Kula
189, 190	Slonovo uvo	Despotovo
191, 192, 193, 194, 195, 196	Boni	Despotovo
197, 198, 199, 200, 201	Boni	Despotovo
202, 203	HS-2	Horgoš
204, 205, 206, 207	HS-6	Horgoš
208, 209, 210, 211	Slonono uvo	Smederevo
212, 213	Palanačka bela	Smederevo
214, 215, 216, 217	Slonovo uvo	Bačka Palanka
218, 219	Slonovo uvo	Tovariševo
220, 221, 222	S-20	Bašaid
223, 224, 225, 226	Kaloča	Senta
227, 228, 229, 230	Kaloča	Kikinda
231, 232, 233	HS-6	Novi Kneževac
234, 235, 236	Slonovo uvo	Novi Kneževac
237, 238, 239, 240	Ami	Gospođinci
241, 242	Century	Gospođinci
243, 244, 245, 246	S-20	Gložan
247, 248, 249, 250	HS-6	Gložan
251, 252, 253, 254	HS-6	Pivnice
255, 256	S-80	Silbaš
257, 258	Istra	Vukovar
259, 260, 261, 262	Slonovo uvo	Ruski Krstur
263, 264, 265, 266	Slonovo uvo	Kula
267, 268	Slonovo uvo	Odžaci
269, 270	Anita	Vrbas
271, 272, 273	Slonovo uvo	Kucura
274, 275	HS-8	Stanišić
276, 277, 278, 279	Slonovo uvo	Lalić
280, 281	Amfora	Stapar
282, 283	Ami	Sombor
284, 285	Šorokšari	Ratkovo
286	HS-6	Subotica
287	Slonovo uvo	Senta
288	Anita	Čelarevo
289	Boni	Šabac
290	Atina	Kraljevo
291	Kurtovska kapija	Čačak
292	Palanačka babura	Trstenik
293	Kurtovska kapija	Smederevska Palanka
294, 295	Palanačka kapija	Velika Plana
296	Amfora	Leskovac
297, 298	HS-6	Horgoš
299, 300	HS-5	Selenča

Simptomi bakteriozne pegavosti paprike, gajene u polju ispoljavali su se tokom cele vegetacije, od juna do avgusta, u svim fenofazama razvoja biljaka. U početku su simptomi bili najuočljiviji na mladim listovima u vidu tamnozelenih, vlažnih pega. Vremenom središnji deo pega postajao je mrk, a obolelo lišće hlorotično i na dodir se lako odvajalo od stabljike. Osim mrkih pega i hloroze na listovima, na lisnim drškama, peteljka i plodovima mogle su se takođe uočiti mrke pege, lezije i kraste (Slika 3, 4, 5).

Prilikom prikupljanja uzoraka obolelih biljaka paprike u cilju izolacije patogena, zapažena je zastupljenost domaćih sorti paprike različitih grupa zrenja i tipova ploda. Najzastupljenije su srednje rane i srednje kasne sorte tipa babura, kapija i šipka. Većina ovih sorti poreklom je iz domaćih kompanija koje se bave selekcijom i oplemenjivanjem: "Institut za povrtarstvo" iz Smederevske Palanke, "Institut za ratarstvo i povrtarstvo" iz Novog Sada, "Superior" iz Velike Plane. Industrijske paprike sorte Horgoška slatka zastupljene su u Horgošu i okolini ali i na drugim lokalitetima Bačke i Banata. Ova sorta stvorena je kao rezultat selekcije kompanije "Vitamin" iz Horgoša i koristi se kao industrijska začinska paprika zbog visokog procenta suve materije. Međutim, pomenute sorte nisu prepoznate kao otporne ili tolerantne prema prouzrokovaču bakteriozne pegavosti obzirom na visok intenzitet oboljenja u polju u svim pomenutim lokalitetima u Srbiji.

Visok intenzitet oboljenja zabeležen je u većini lokaliteta severnog i južnog dela Bačke (Odžaci, Kula, Vrbas, Bačka Palanka, Gložan, Čelarevo, Selenča, Despotovo, Silbaš, Bački Petrovac i Pivnice). Najveći intenzitet zabeležen je u okolini Horgoša i Subotice (Senta, Novi Kneževac, Kanjiža, Čoka). Nešto niži stepen zaraze zabeležen je u Somboru i okolini i kretao se od 5 - 10%. U Banatu, pogotovo u okolini Kikinde (selo Bašaid) zabeleženi su usevi sa infekcijom >90%.

Naredne, 2009. i 2010. godine, izvršen je pregled useva paprike u zapadnim i centralnim delovima Srbije. Pojava oboljenja konstatovana je u lokalitetima: Šabac, Kraljevo, Trstenik, S. Palanka, Leskovac, Čačak i Velika Plana. Intenzitet oboljenja kretao se u intervalu od 10-50%

Rasprtostranjenost prouzrokovača bakteriozne pegavosti paprike utvrđena je u većini proizvodnih regiona u Srbiji tokom 2008, 2009 i 2010. godine. Najveći broj

proučavanih sojeva poreklom je iz obolelih uzoraka biljaka paprike sa simptomima bakteriozne pegavosti, prikupljenih tokom 2008. godine (Slika 10).



Slika 10. Mapa geografske rasprostranjenosti prouzrokovača bakteriozne pegavosti paprike u Srbiji

5.2. PATOGENE ODLIKE PROUČAVANIH SOJEVA

5.2.1. Inokulacija biljaka paprike

Svi proučavani sojevi ispoljili su patogenost prema biljci domaćinu - sorti paprike Kalifornijsko čudo. Razvoj simptoma odvijao se postepeno. Među proučavanim sojevima su zapažene razlike u brzini prouzrokovanja prvih simptoma.

Većina sojeva je nakon trećeg dana od infiltracije, prouzrokovala promene u okviru zone infiltracije listnog tkiva. Sa naličja lista formirale su se promene praćene pojavom tamnozelenih zona (pega), dok je sa lica lista tkivo u okviru formiranih pega bilo glatko i sjajno. Nakon 5 dana zahvaćeni deo tkiva žuti, nekrotira, dobijajući mrku boju. Nakon sedam dana zapaženo je širenje hloroze i spajanje pojedinačnih pega u veće nekrotične površine (Slika 11). Identične promene zabeležene su i na biljkama inokulisanim kontrolnim sojem bakterije *X. euvesicatoria* (KFB 189).

Grupi proučavanih sojeva, koja se razlikovala od ostalih po prouzrokovanju prvih promena nakon pet dana, pripada 14 sojeva (RKFB: 164, 201, 209, 214, 215, 225, 247, 262, 271, 274, 280, 281, 282, 295).

Na inokulisanim biljkama sterilnom destilovanom vodom nije bilo promena.

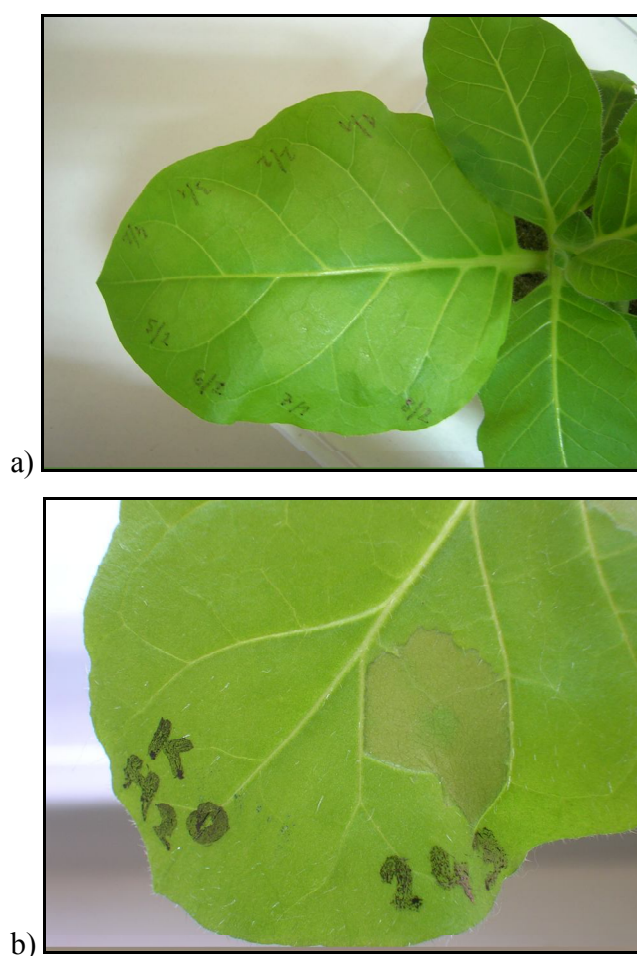


Slika 11. *X. euvesicatoria*. Promene na listu paprike sorte Kalifornijsko čudo 7 dana od inokulacije

5.2.2. Hipersenzitivna reakcija duvana

Proučavani sojevi prouzrokovali su hipersenzitivnu reakciju duvana sorte Samsun. Nakon 24 časa, promene su se ispoljile prvo u vidu hlorotičnih zona inokulisanog tkiva (Slika 12a), koja je praćena nekrozom i kolapsom lisnog tkiva posle 48 časova (Slika 12b).

Kontrolni soj *X. euvesicatoria* (KFB 189) prouzrokovao je HR nakon 24 časa. Na mestu inokulacije sterilnom destilovanom vodom nije bilo promena.

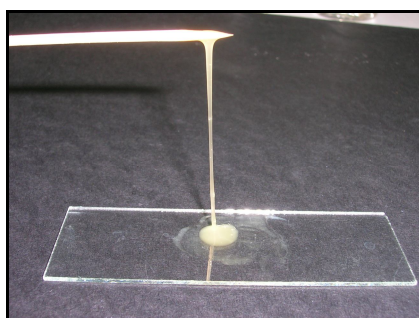


Slika 12. Promene na lisnom tkivu duvana sorte Samsun kao znak hipersenzitivne reakcije nakon inokulacije proučavanim sojevima bakterije *X. euvesicatoria*: a) pojava hlorotičnih zona nakon 24 časa; b) nekroza lisnog tkiva duvana posle 48 časova

5.3. MORFOLOŠKE ODLIKE PROUČAVANIH SOJEVA

5.3.1. Razlikovanje bakterija po Gramu pomoću KOH testa

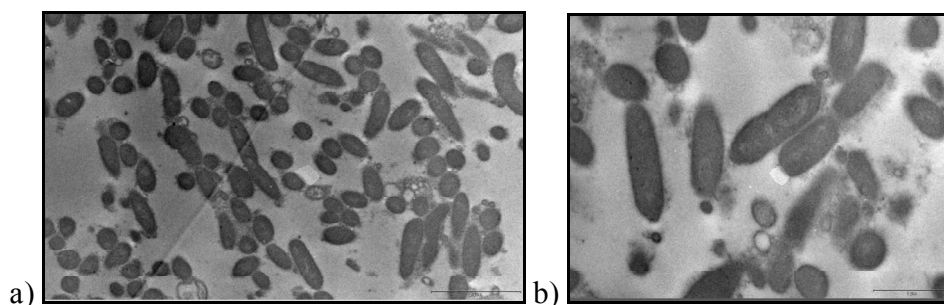
Svi proučavani sojevi obrazovali su sluzast "končić" nakon homogenizacije u kapi 3% KOH, na osnovu čega je zaključeno da pripadaju Gram-negativnim bakterijama (Slika 13), uključujući i kontrolni soj *P. s. pv. glycinea*.



Slika 13. *X. euvesicatoria*. Pojava sluzastog "končića"

5.3.2. Posmatranje morfologije transmisionim elektronskim mikroskopom

Ćelije bakterija su posmatrane elektronskim mikroskopom na Univerzitetu u Beogradu (Katedra za biologiju, prof. dr Aleksandra Korać), pod uvećanjem od x5000 i x20.000, pri čemu je utvrđeno da su bakterije štapićastog oblika sa zaobljenim ivicama, veličine od 0.9 -1.2 μm ; asporogene i pojavljuju se pojedinačno ili u parovima. Na slikama su prikazani poprečni i uzdužni preseci pojedinačnih bakterija (Slika 14).



Slika 14. *X. euvesicatoria*. Ćelije bakterija (soj RKFB 243): a) uvećanje x5000; b) uvećanje x20000

5.4. ODGAJIVAČKE ODLIKE PROUČAVANIH SOJEVA

5.4.1. Izgled kolonija na hranljivim podlogama

Posmatranjem kolonija na YDC podlozi proučavani sojevi su nakon 24 - 48 časova formirali kolonije žute boje, sluzaste konzistencije, okrugle, ispupčene, sjajne, prečnika 2-3 mm. Ovakav izgled kolonija na YDC podlozi tipičan je za predstavnike roda *Xanthomonas* (Slika 15a). Sedam proučavanih sojeva formirali su kolonije svetlije, krem-žute boje, sluzaste konzistencije (RKFB: 194, 195, 196, 197, 204, 205, 225). Na MPA podlozi nakon 24 časa od zasejavanja formirale su se sitne, sjajne, blago ispupčene kolonije, krem-žute boje, sluzaste konzistencije, prečnika 1 - 2 mm (Slika 15 b).

Kolonije bakterija na poluselektivnim podlogama (mSQ, TTCA, Tween B, Milk-Tween) razlikovale su se u boji, kao i promenama koje su nastajale u samoj podlozi.

Na mSQ podlozi proučavani sojevi su nakon dva do tri dana od zasejavanja formirali sjajne, ispupčene kolonije, ujednačene veličine (prečnika 2 - 3 mm) i brzine porasta, krem-žute boje i sluzaste konzistencije. U podlozi, neposredno ispod i oko kolonija zapaženo je prisustvo sitnih kristala, nastalih usled razgradnje kinične kiseline pod dejstvom ksantomonadina (Slika 15c).

Na TTCA podlozi sa trifenil-tetrazolijum hloridom, obrazovale su se okrugle, ispupčene, sjajne, sluzaste i crvene kolonije, prečnika 2 - 3 mm. Za potpun razvoj kolonija potrebna su tri do četiri dana (Slika 15d).

Na Tween B podlozi oko kolonija pojavljuju se bele (mlečne) zone kalcijumovih soli masnih kiselina koje nastaju usled oslobađanja lipida iz Tween-a 80 pod dejstvom lipolitičkih enzima. Formirane kolonije su pojedinačne sitne, okrugle, žute, sjajne, sluzaste konzistencije, prečnika 1 - 2 mm (Slika 15e).

Na Milk-Tween (MT) podlozi su okrugle, sitne prečnika 1 - 2 mm, sjajne, sluzaste konzistencije. Karakteristično je da su se u podlozi oko kolonija proučavanih izolata formirale dve zone hidrolize: I - veća prosvetljena zona nastala usled hidrolize kazeina; II - manja mlečna zona koja nastaje usled hidrolize Tween-a 80 (Slika 15f).



a) YDC



b) MPA



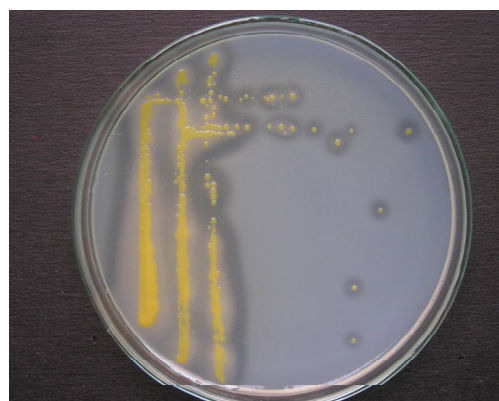
c) mSQ



d) TTCA



e) Tween B



f) MT

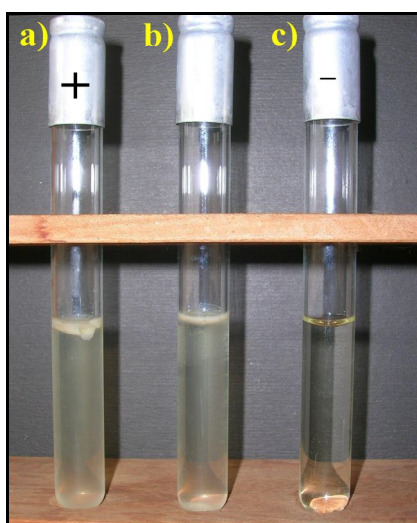
Slika 15. *X. euvesicatoria* Izgled kolonija na hranljivim podlogama (soj RKFB 263):
a) YDC ; b) MPA; c) mSQ; d) TTCA podloga; e) Tween B; f) Milk-Tween (MT)

5.4.2. Uticaj temperature na porast bakterija

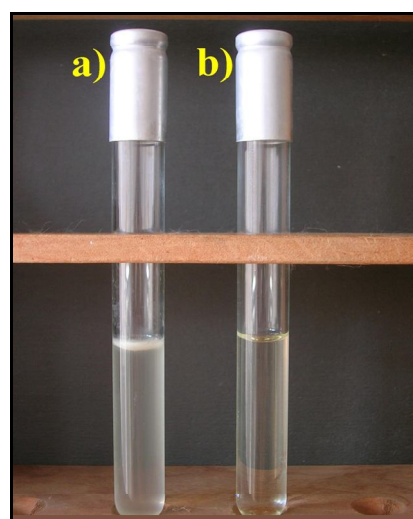
Svi proučavani sojevi, uključujući i kontrolni soj *X. euvesicatoria* (KFB 189) razvijaju se pri temperaturi 37°C, usled čega dolazi do zamućenja podloge nakon 7 dana (Slika 16).

5.4.3. Tolerantnost prema NaCl

Proučavani sojevi se razvijaju u podlozi sa 5% NaCl, ali ne i u podlozi sa 7% NaCl (Slika 17). Tolerantnost prema obe koncentracije NaCl ispoljio je jedino kontrolni soj *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (KFB 85).



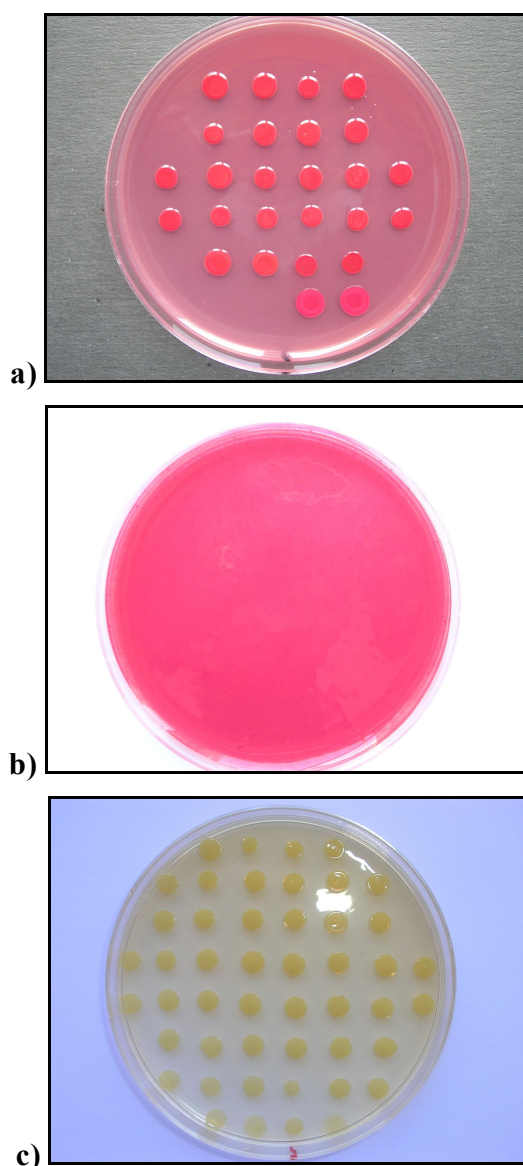
Slika 16. Porast kolonija pri 37°C: a) kontrolni soji *X. euvesicatoria* KFB 189; b) proučavani soj RKFB 243; c) negativna kontrola



Slika 17. Tolerantnost prema NaCl: a) porast kolonija proučavanog soja RKFB 243 u podlozi sa 5% NaCl; b) izostanak razvoja u podlozi sa 7% NaCl-a

5.4.4. Tolerantnost prema trifenil-tetrazolium hloridu

Porast kolonija proučavanih sojeva na podlozi sa 0,02% trifenil-tetrazolijum hlorida, zabeležen je nakon 2 - 3 dana od zasejavanja (Slika 18a), za razliku od koncentracije 0,1% (Slika 18b). Na kontrolnoj podlozi bez dodatka trifenil-tetrazolijum hlorida, proučavani sojevi obrazovali su kolonije nakon 48 časova (Slika 18c).



Slika 18. Tolerantnost prema trifenil-tetrazolijum hloridu: a) porast kolonija na podlozi sa 0,02% TTC-a; b) inhibicija porasta kolonija na podlozi sa 0,1% TTC-a c) porast kolonija na kontrolnoj podlozi bez dodatka TTC-a

5.5. BIOHEMIJSKO-FIZIOLOŠKE ODLIKE SOJEVA

Rezultati proučavanja biohemijsko-fizioloških karakteristika pokazali su da proučavani sojevi razlažu glukozu oksidativno (O), ne redukuju nitrate, hidrolizuju želatin i eskulin ali ne i skrob, poseduju ferment katalazu ali ne i oksidazu i pektinazu. Stvaraju kiselinu iz manoze, glukoze, galaktoze i dekstrina, i razvijaju se na podlozi sa *cis*-akonitinskom kiselinom (Tabela 18). Obzirom da su najviše sličnosti imali sa kontrolnim sojem KFB189, preliminarno je zaključeno da pripadaju fenotipskoj grupi A, odnosno vrsti *X. euvesicatoria*. Razlike su zabeležene samo među kontrolnim sojevima, i ogledaju se u stvaranju kiseline iz galaktoze, dekstrina i *cis*-akonitinske kiseline (Tabela 18).

Tabela 18. Biohemijsko-fiziološke odlike proučavanih i kontrolnih sojeva

Test	Proučavani sojevi	Kontrolni sojevi			
		<i>Xanthomonas euvesicatoria</i> KFB 189	<i>Xanthomonas vesicatoria</i> NCPBP 1423	<i>Xanthomonas perforans</i> NCPBP 4321	<i>Xanthomonas gardneri</i> NCPBP 881
KOH test	-	-	-	-	-
Aktivnost oksidaze	-	-	-	-	-
HR na duvanu	+	+	+	+	+
Porast na 37°C	+	+	+	+	+
Metabolizam glukoze O/F	O	O	O	O	O
Redukcija nitrata	-	-	-	-	-
Stvaranje katalaze	+	+	+	+	+
Hidroliza želatina	+	+	+	+	+
Hidroliza eskulina	+	+	+	+	+
Pektolitička aktivnost	-	-	+	+	-
Amilolitička aktivnost	-	-	+	+	-
Stvaranje kiseline:					
- glukoze	+	+	+	+	+
- galaktoze	+	+	-	+	-
- dekstrina	+	+	+	+	-
- manoze	+	+	+	+	+
Korišćenje <i>cis</i> -akonitinske kiseline	+	+	+	+	-
TTC*:					
- 0.02%	+	+	+	+	+
- 0.1%	-	-	-	-	-

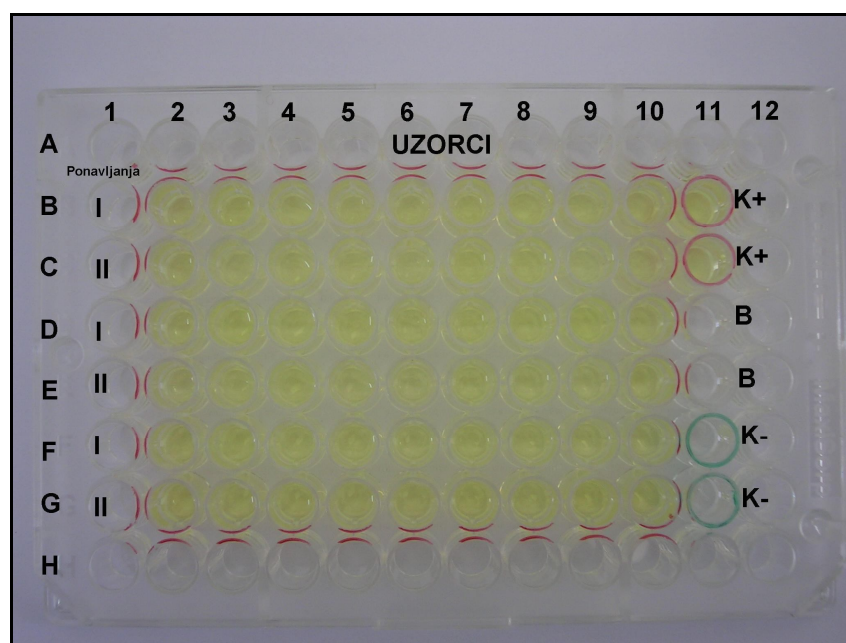
Legenda: (-) negativna reakcija; (+) pozitivna reakcija; (O) oksidativni metabolizam

*TTC - trifetil-tetrazolijum hlorid

5.6. SEROLOŠKE ODLIKE PROUČAVANIH SOJEVA

5.6.1. DAS - ELISA test

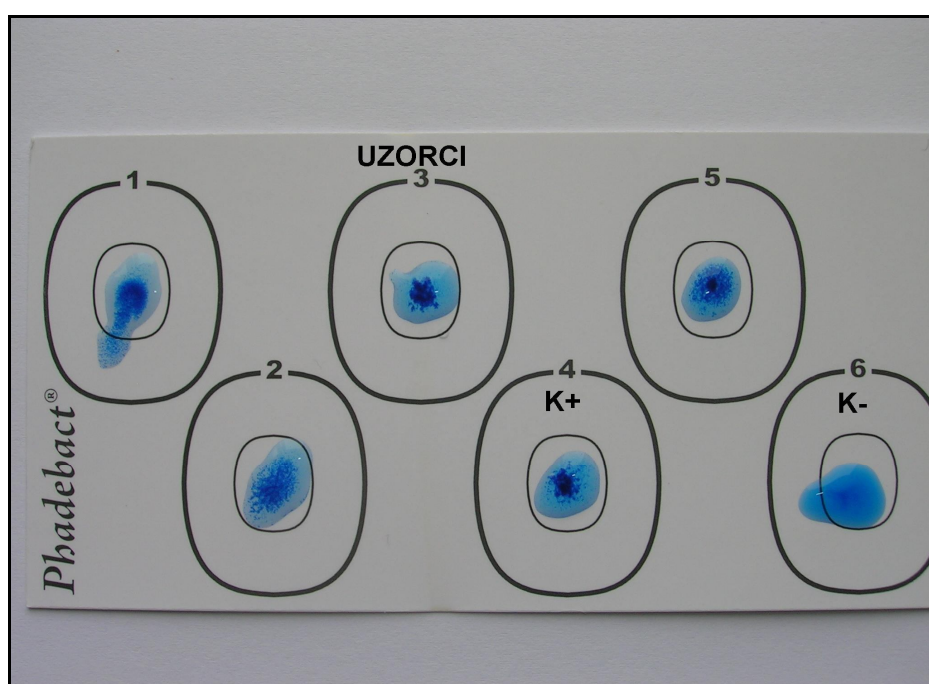
Poređenjem srednjih vrednosti ekstinkcija proučavanih sojeva, utvrđeno je da su srednje vrednosti bile dva ili više puta veće od negativne kontrole, što je ocenjeno kao pozitivna reakcija (Slika 19).



Slika 19. DAS - ELISA test - pojava žute boje u bunarčiću mikrotitarske ploče Nunc - 96 znak je pozitivne reakcije; (K+) pozitivna kontrola; (B) blank; (K-) negativna kontrola.

5.6.2. Metod aglutinacije

Metod aglutinacije spada u kvalitativan test obzirom da se rezultati očitavaju vizuelnim putem, odnosno posmatra se odsustvo ili prisustvo kompleksa antigen - antitelo u vidu taloga. Pojava pahuljastog taloga (aglutinat) u kapi bakterija i seruma, nakon 60 sekundi, na test pločicama, označava pozitivnu reakciju (Slika 20).



Slika 20. Pojava pahuljastog taloga (kompleksa antigen - antitelo) kao znak pozitivne reakcije: polje 1 - soj RKFB 164; 2 - soj RKFB 165; 3 - soj RKFB 166; 5 - soj RKFB 167; polje 4 - pozitivna kontrola; polje 6 - negativna kontrola

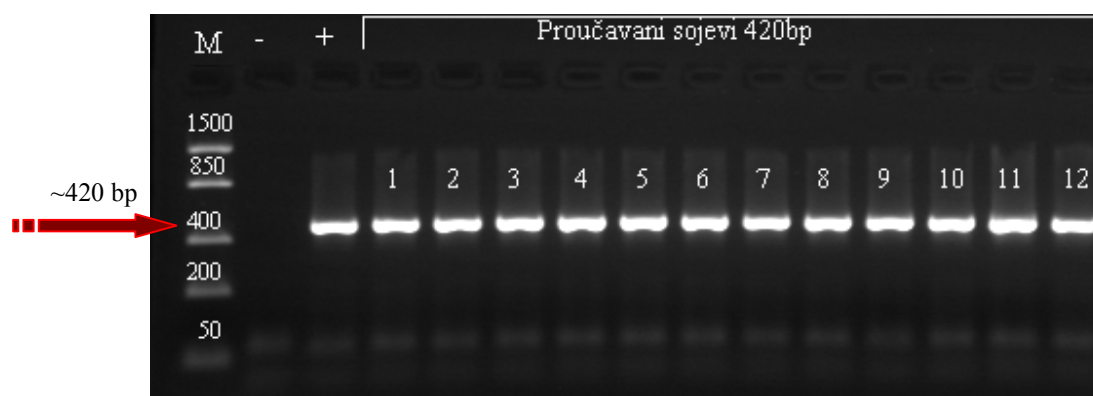
5.7. MOLEKULARNE METODE PROUČAVANJA

5.7.1. Restrikciona analiza - RFLP

Upoređivanjem DNK fragmenata proučavanih sojeva, dobijenih restrikcijom analizom sa kontrolnim sojevima ustanovljeno je da proučavani sojevi poseduju identičan restrikcioni profil sa kontrolnim sojem *X. euvesicatoria* (KFB 189).

5.7.1.1. Umnožavanje *hrp* gena

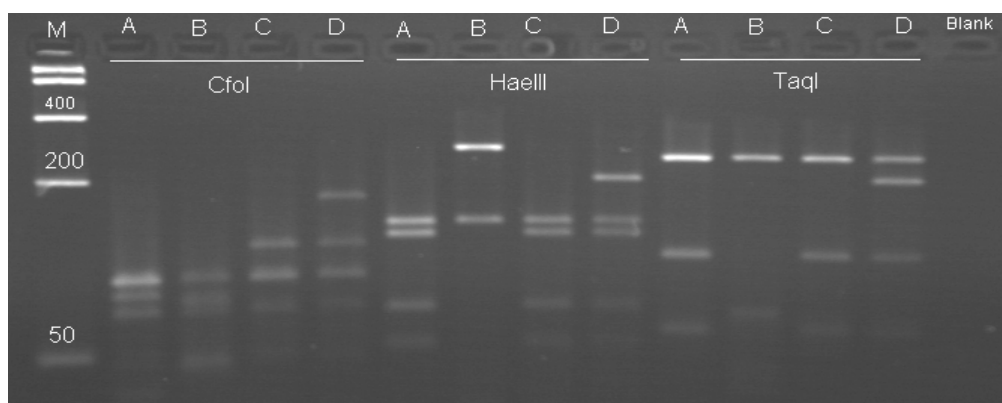
Korišćenjem prajmera RST65 i RST69, umnožen je *hrpB* region pri čemu su dobijeni proizvodi veličine 420 bp svih proučavanih sojeva (Slika 21).



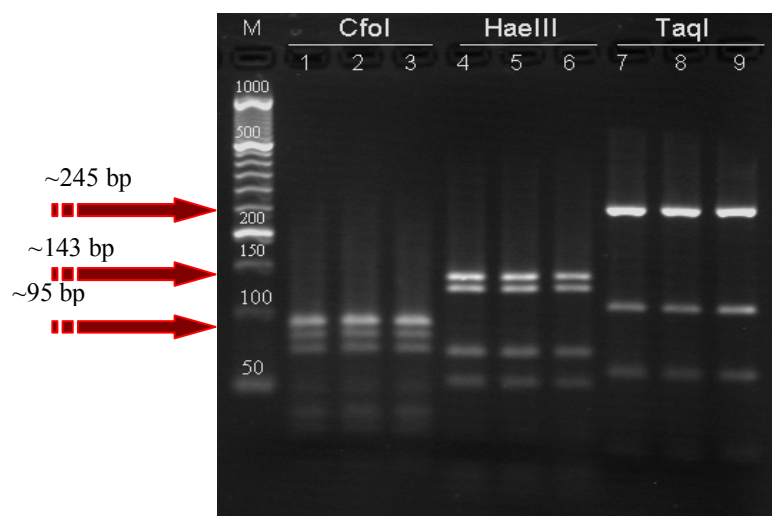
Slika 21. Agarozni gel (1.5%) nakon amplifikacije *hrpB* regiona sa RST65 i RST69 prajmerima. M marker FastRuler™ Low Range DNA Ladder 50 - 1500 (Fermentas, SM1103); - negativna kontrola *P. s. pv. glycinea* NCPPB 3318; + pozitivna kontrola *X. euvesicatoria* KFB 189; Linije 1-12 proučavani sojevi.

5.7.1.2. Digestija restrikcionim enzimima

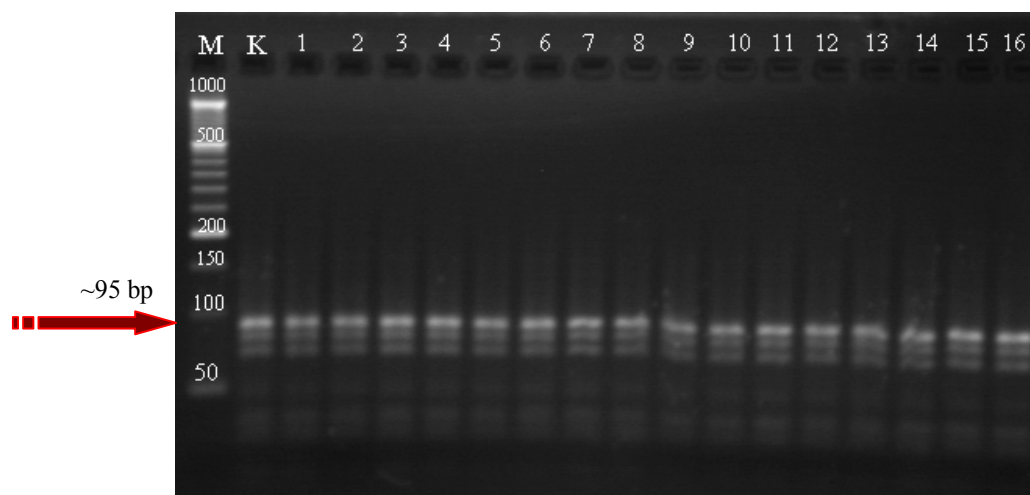
Nakon digestije umnoženih fragmenata DNK proučavanih sojeva, izvršeno je razdvajanje proizvoda elektroforezom, pri čemu je dobijen restrikcioni profil za svaki soj ponaosob. Kao matrica za poređenje poslužile su jedinstvene kombinacije elektroforetskih profila kontrolnih sojeva, karakteristične za svaku vrstu *Xanthomonas* spp. (Slika 22). Poređenjem restrikcionih profila proučavanih sojeva sa profilima kontrolnih sojeva kao i sa ranije utvrđenim profilima koje su prikazali Obradović i sar. (2004a) nije utvrđen polimorfizam među proučavanim sojevima. Na osnovu formiranih otisaka (profila) kontrolnih sojeva koji pripadaju različitim rasama nisu utvrđene razlike (Slika 23). Restrikcionom analizom ustanovljeno je da su profili proučavanih sojeva identični restrikcionim profilima kontrolnog soja *X. euvesicatoria* (KFB 189) (Slika 24, 25 i 26).



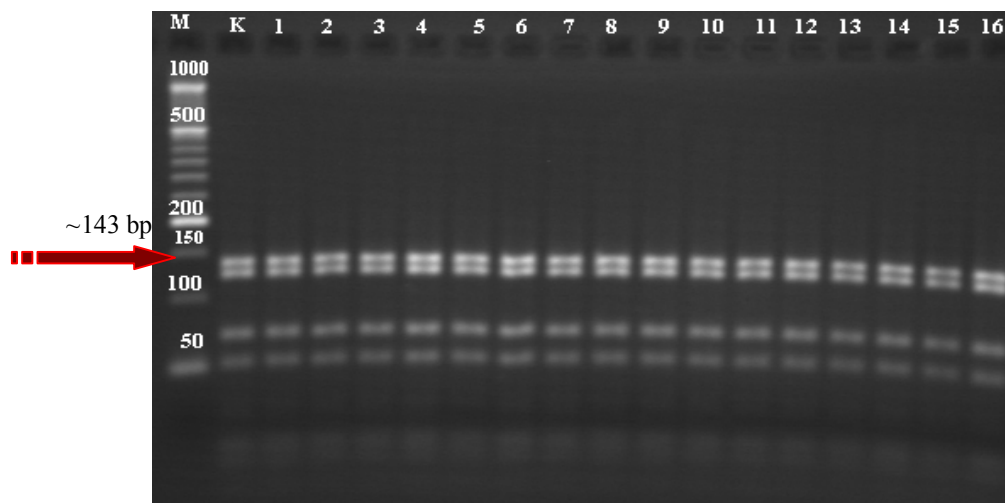
Slika 22. Polimorfizam restrikcionih fragmenata referentnih sojeva na agaroznom gelu (4%) nakon digestije enzimima *CfoI*, *HaeIII* i *TaqI* za sve predstavnike *Xanthomonas* spp.: A - *X. euvesicatoria* (KFB189); B - *X. vesicatoria* (NCPPB 1423); C - *X. perforans* (NCPPB 4321); D - *X. gardneri* (NCPPB 881); M - marker FastRuler™ Low Range DNA Ladder 50 - 1500 bp (Fermentas, SM 1103).



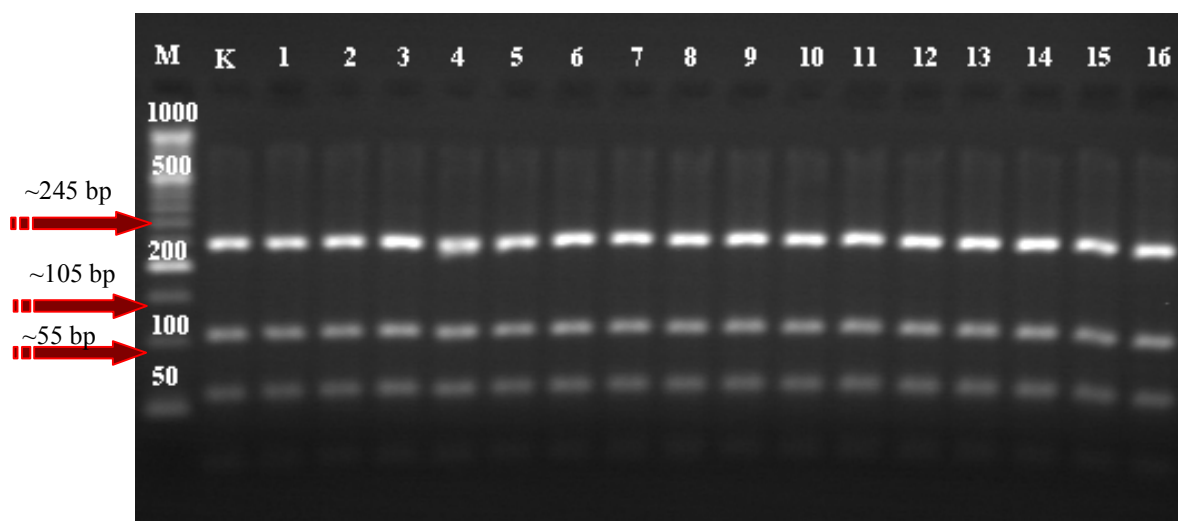
Slika 23. Restrikcioni profili kontrolnih sojeva *X. euvesicatoria* na 4% agaroznom gelu nakon digestije ezimima (*CfoI*, *HaeIII*, *TaqI*). Linije 1, 4, 7 soj KFB1 (P8); Linije 2, 5, 8 soj KFB13 (P7); Linije 3, 6, 9 izolat KFB 189 (P8); M-marker O Range Ruler 50 bp Ladder 50 - 1000 bp (Fermentas-SM 0613).



Slika 24. Restrikcioni profili proučavanih sojeva na agaroznom gelu (4%) nakon digestije *CfoI* enzimom. M - marker O Range Ruler 50 bp Ladder 50 - 1000 bp (Fermentas - SM 0613); K - kontrolni soj *X. euvesicatoria* (KFB 189).



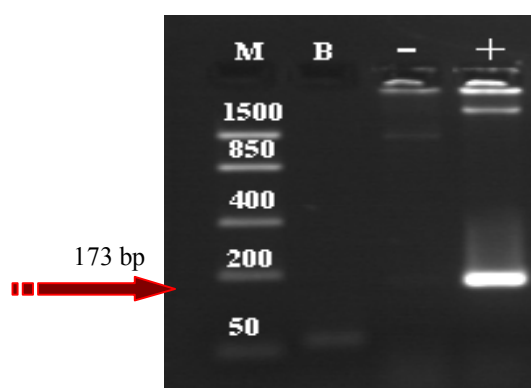
Slika 25. Restrikcioni profili proučavanih sojeva na agaroznom gelu (4%) nakon digestije *HaeIII* enzimom. M - marker O Range Ruler 50 bp Ladder 50 - 1000 bp (Fermentas - SM 0613); K - kontrolni soj *X. euvesicatoria* (KFB 189).



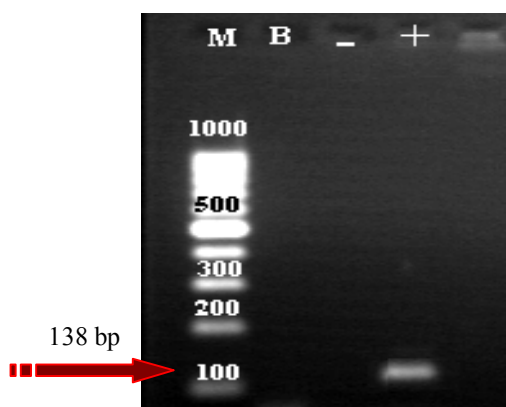
Slika 26. Restrikcioni profili proučavanih sojeva na agaroznom gelu (4%) nakon digestije *TaqI* enzimom. M - marker O Range Ruler 50 bp Ladder 50 - 1000 bp (Fermentas - SM 0613); K - kontrolni soj *X. euvesicatoria* (KFB 189).

5.7.2. Diferencijacija proučavanih sojeva primenom specifičnih prajmera

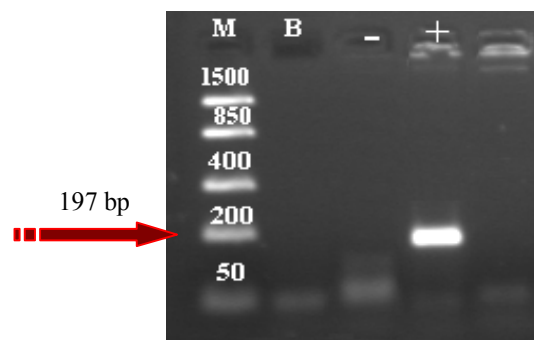
Prema molekularnoj metodi koju su opisali Koenraad-t-u i sar. (2009) u ovom radu primenom specifičnih prajmera detektovane su različite veličine baznih parova među kontrolnim sojevima vrsta *Xanthomonas* spp. (Slika 27, 28, 29 i 30). Poređenjem amplifikovanih fragmenata proučavanih sojeva ustanovljena je veličina 173 bp, koji odgovaraju vrsti *X. euvesicatoria* (Slika 31).



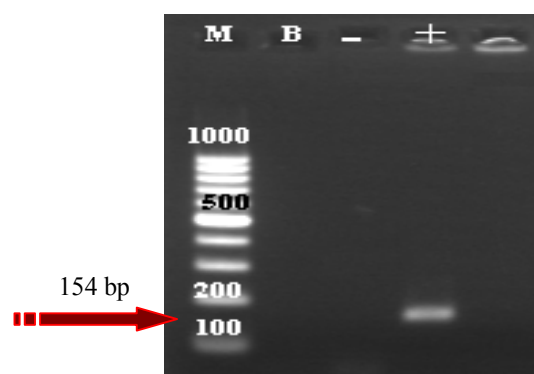
Slika 27. PCR produkti referentnih sojeva na 1.5 % agaroznom gelu amplifikovanim sa Bs XeF/XeR-(*X. euvesicatoria*) Linije: (M) - marker FastRuler™ Low Range DNA Ladder 50 - 1500 bp (Fermentas, SM 1103); (B) blank; (-) negativna kontrola *P. s. pv. glycinea* NCPPB 3318; (+) kontrolni soj *X. euvesicatoria* KFB 189 (173 bp).



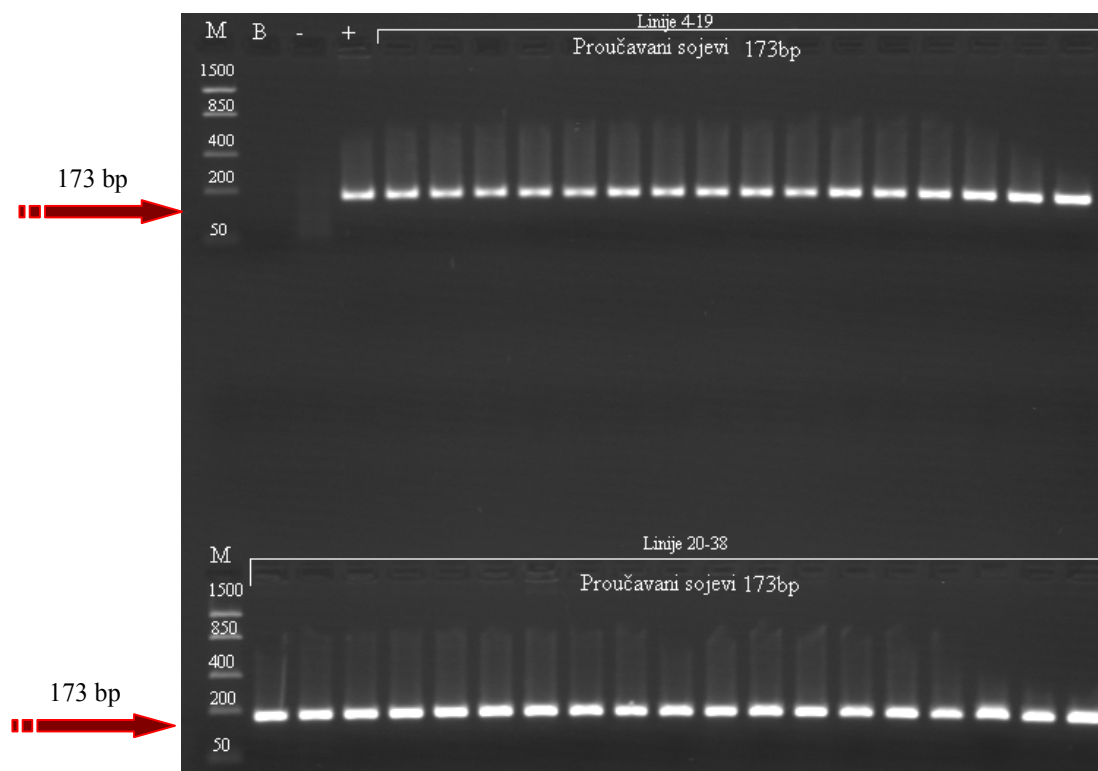
Slika 28. PCR produkti referentnih sojeva na 1.5 % agaroznom gelu amplifikovanim sa Bs XvF/XvR-(*X. vesicatoria*) Linije: (M) - marker FastRuler™ Low Range DNA Ladder 100 - 1000 bp (Fermentas, SM 0241); (B) blank; (-) negativna kontrola *P. s. pv. glycinea* NCPPB 3318; (+) kontrolni soj *X. vesicatoria* NCPPB 1423 (138 bp).



Slika 29. PCR produkti referentnih sojeva na 1.5 % agaroznom gelu amplifikovanim sa Bs XpF/XpR-(*X. perforans*) Linije: (M) - marker FastRuler™ Low Range DNA Ladder 50 - 1500 bp (Fermentas, SM 1103); (B) blank; (-) negativna kontrola *P. s. pv. glycinea* NCPPB 3318; (+) kontrolni soj *X. perforans* NCPPB 4321 (197 bp).



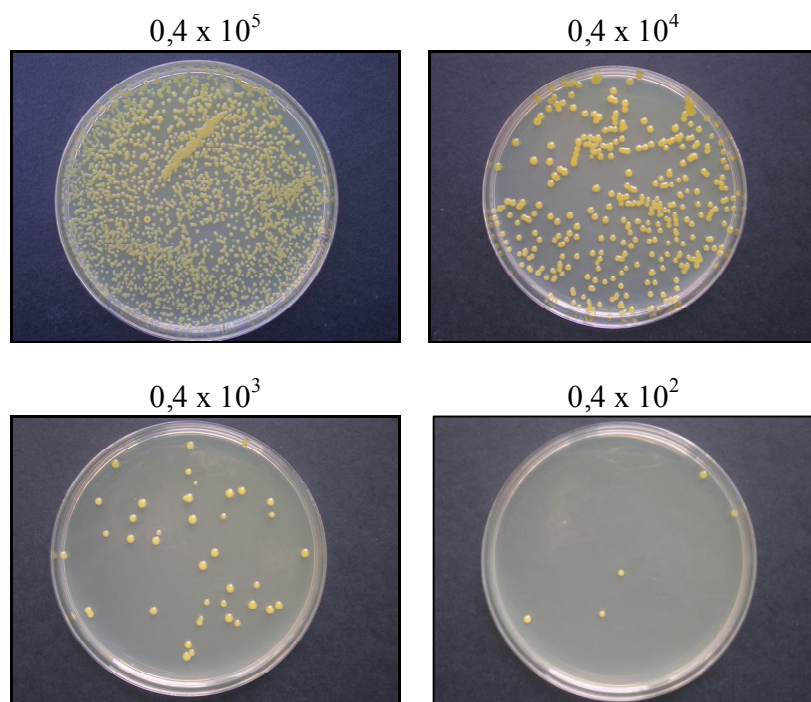
Slika 30. PCR produkti referentnih sojeva na 1.5 % agaroznom gelu amplifikovanim sa Bs XvF/XvR-(*X. vesicatoria*) Linije: (M) - marker FastRuler™ Low Range DNA Ladder 100 - 1000 bp (Fermentas, SM 0241); (B) blank; (-) negativna kontrola *P. s. pv. glycinea* NCPPB 3318; (+) kontrolni soj *X. gardneri* NCPPB 881 (154 bp).



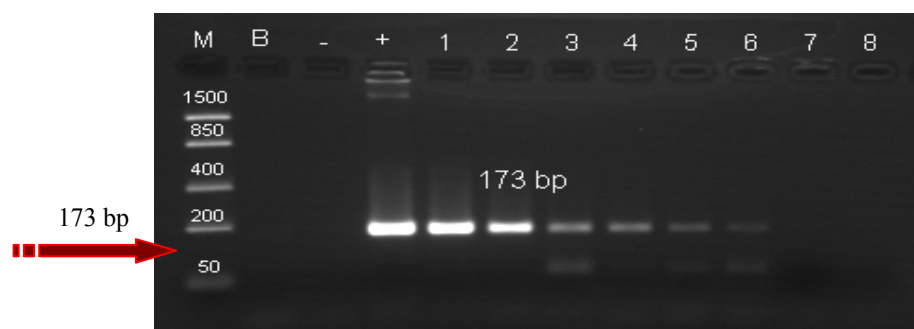
Slika 31. PCR produkti na 1.5 % agaroznom gelu amplifikovanim sa Bs XeF/XeR prajmerima. Linije: (M) FastRuler™ Low Range DNA Ladder (Fermentas, Lithuania); (B) blank; (-) negativna kontrola *P. s. pv. glycinea* NCPPB 3318; (+) pozitivna kontrola KFB 189; Linije 4-35 proučavani sojevi.

5.7.2.1. Utvrđivanje praga osetljivosti PCR testa

Korišćenjem prajmera XeF i XeR, amplifikovani su fragmenti DNK veličine 173 bp u veoma niskim koncentracijama. Određivanje koncentracije početne suspenzije bakterija izvršeno je metodom brojanja kolonija nakon zasejavanja serijom decimalnih razređenja (Slika 32). Najniža koncentracija bakterijske suspenzije u kojoj se mogu detektovati bakterije iznosila je $0,4 \times 10^3$ CFU/ml (Slika 33).



Slika 32. Određivanje koncentracije početne suspenzije bakterija metodom brojanja kolonija nakon zasejavanja serijom decimalnih razređenja



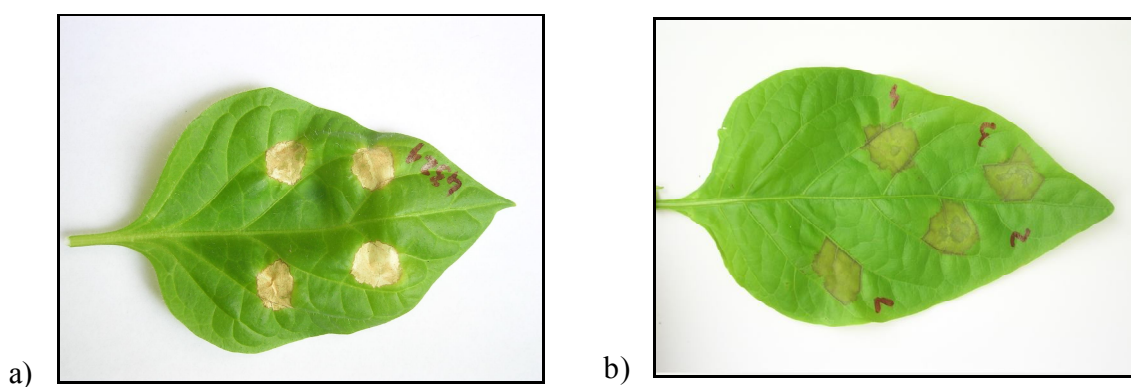
Slika 33. Osetljivost PCR testa. Linije: (M) FastRuler™ Low Range DNA Ladder (Fermentas, Lithuania); (B) blank; (-) negativna kontrola *P. s. pv. glycinea* NCPPB 3318; (+) pozitivna kontrola KFB 189; linije 1 - 8 serija razređenja soja RKFB 243 (1: $0,4 \times 10^8$; 2: $0,4 \times 10^7$; 3: $0,4 \times 10^6$; 4: $0,4 \times 10^5$; 5: $0,4 \times 10^4$; 6: $0,4 \times 10^3$; 7: $0,4 \times 10^2$; 8: $0,4 \times 10^1$).

5.8. UTVRĐIVANJE FIZIOLOŠKIH RASA

Na osnovu ocena reakcije na biljkama paprike uočene su razlike među proučavanim sojevima. Utvrđeno je da proučavani sojevi pripadaju rasama: P1, P3, P7 i P8 bakterije *X. euvesicatoria* (Tabela 19).

Otporna reakcija koja nastaje usled inkompatibilnog odnosa domaćin – patogen, zabeležena je na biljkama koje poseduju *Bs* gene otpornosti prema avirulentnim genima patogena (*avr*). Reakcije na biljkama koje poseduju *Bs4* gene otpornosti (*C. pubescens*) ispoljavale su se u vidu beličasto-mrkih lezija sa jasno ograničenom ivicom (Slika 34 a), ili pojavom lezija sa ljubičasto-mrkim obodom karakteristična za izogene linije koje poseduju *Bs1*, *Bs2* i *Bs3* gene otpornosti (Slika 34 b).

Na biljkama koje ne poseduju gene otpornosti, kao posledica kompatibilnog odnosa patogen - domaćin dolazi do pojave tipičnih simptoma bolesti (Slika 35a, 35b). U početku simptomi oboljenja se ispoljavaju u vidu vodenastih pega sa masnim odsjajem. Vremenom pege se povećavaju i šire, središte postaje nekrotično i mrko sa hlorotičnom zonom oko mesta inokulacije. Od ukupnog broja proučavanih sojeva, na osnovu ocenjenih reakcija biljaka, najzastupljenija je fiziološka rasa P8 (93 soja), potom rasa P7 (17 sojeva), rasa P1 sa 5 sojeva i rasa P3 (1 soj) (Tabela 19). Kontrolni soj (KFB 189) pripada rasi P8.



Slika 34. Otporna reakcijama na inokulisanim delovima lista: a) beličasto-mrke zone (*C. pubescens*); b) pege sa ljubičasto - mrkim obodom (ECW - 20)



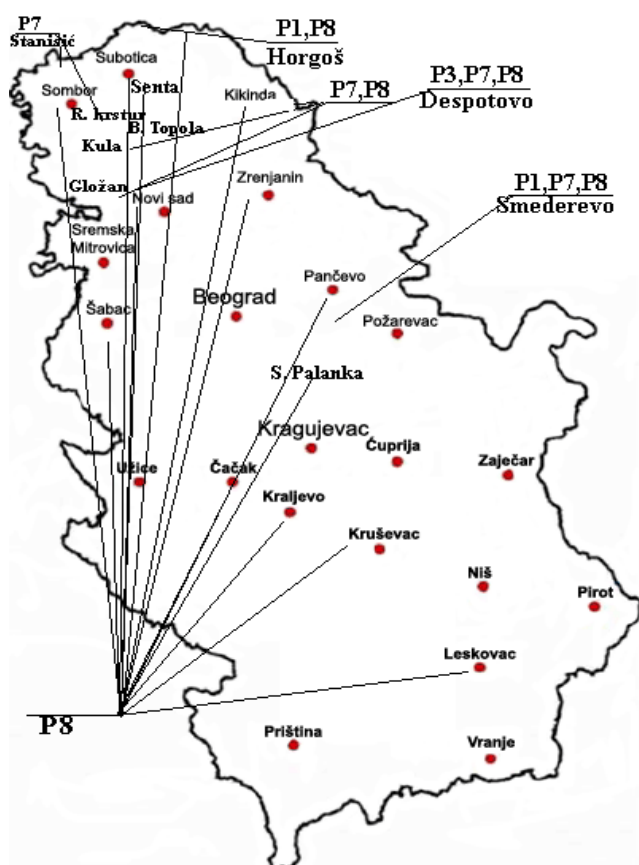
Slika 35. Osetljiva reakcija na biljkama sorte ECW u vidu vodenastih pega sa masnim odsjajem i pojavom hloroze oko mesta inokulacije: a) lice lista; b) naličje lista

Sojevi rase P8 izolovani su iz uzoraka svih testiranih sorti paprike, dok je među sojevima poreklom sa linije HS-8 bila zastupljena samo rasa P7. Izolovani sojevi poreklom sa sorte Palanačko čudo pripadali su dvema rasama, P7 i P8. Na sojevima poreklom sa sorti Boni, Slonovo uvo i HS-6 utvrđene su po tri fiziološke rase. Sojevi poreklom sa sorte Boni pripadali su rasama P3, P7 i P8, dok su sa sorte Slonovo uvo i linije HS-6 izolovani sojevi, pored rase P7 i P8 pripadali i rasi P1.

Ukoliko se posmatra zastupljenost rase u Srbiji u 2008. godini, može se konstatovati da je rasa P8 zastupljena u svim lokalitetima, osim u Ruskom Krsturu i Stanišiću u kojima je konstatovana rasa P7 (Slika 36). Izdvajaju se i lokaliteti u kojima su prisutne po tri rase parazita: Despotovo sa rasama 3, 7, 8 i Smederevo sa rasama 1, 7, 8. U Horgošu su prisutne rase 1 i 8, dok su u Gložanima, Kuli i B. Topoli prisutne rase 7 i 8. Sojevi poreklom iz lokaliteta Čačak, Kraljevo, Leskovac, Smederevska Palanka, Šabac, Trstenik i Velika Plana, izolovani tokom 2009 i 2010. godine pripadaju rasi P8.

Tabela 19. Zastupljenost fizioloških rasa proučavanih sojeva bakterije *X. euvesicatoria*

Rasa	Šifre sojeva RKFB
P1(5)	206, 207, 209, 210, 211
P3(1)	197
P7(17)	166, 167, 189, 190, 191, 192, 193, 208, 247, 248, 249, 259, 260, 261, 262, 274, 275
P8(93)	164, 165, 194, 195, 196, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300

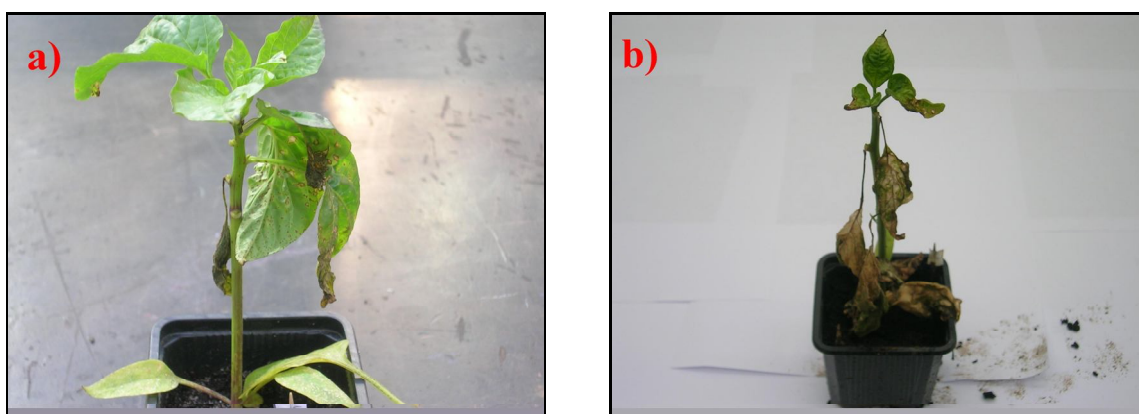


Slika 36. Mapa geografske rasprostranjenosti i zastupljenosti fizioloških rasa u Srbiji

5.9. PROUČAVANJE OSETLJIVOSTI GENOTIPOVA PAPRIKE PREMA PROUZROKOVAČU BAKTERIOZNE PEGAVOSTI

Proučavani genotipovi paprike ispoljili su različit stepen osetljivosti prema bakteriji *X. euvesicatoria* (soj 263, P8).

Prve promene tkiva na mestu infiltracije suspenzije bakterija u list paprike, uočene su nakon 3 dana od inokulacije (Slika 37a). Vremenom došlo je do širenja i pojave nekroze većeg dela liske da bi se nakon 14 dana uočilo opadanje donjeg lišća kod većine proučavanih genotipova paprike (Slika 37b).



Slika 37. Simptomi na biljkama paprike sorte Brillant: a) simptomi pegavosti i hloroze lišća paprike nakon 7 dana; b) opadanje donjeg lišća nakon 14 dana

Pri prvoj oceni, uz primenjenu koncentraciju inokuluma 10^6 CFU/ml, proučavani genotipovi paprike ispoljili su različit stepen osetljivosti, formirajući 4 statistički značajno različite grupe (Tabela 20). U prvu grupu izdvojile su se sorta Bihar i otporna linija ECW-20, na kojima je zabeležen najmanji intenzitet simptoma u vidu malobrojnih, sitnih nekrotičnih pega, čiji se broj i veličina nisu bitno menjali između dve ocene. U drugu grupu po stepenu osetljivosti svrstana je sorta Plamena, dok je trećoj grupi pripao, pored kontrolne osetljive sorte ECW, najveći broj proučavanih genotipova paprike: Palanačko čudo, Boni, Novosađanka, Brillant F1, Anita, HS-2, Amfora i Slonovo uvo. Među ovim genotipovima nije postojala statistički značajna razlika u osetljivosti na nivou verovatnoće od 0,05. Interesantno je napomenuti da se kontrolna osetljiva sorta ECW nije pokazala kao

najosetljivija. Kao najosetljivija, sorta Palanačka babura svrstana je u četvrtu grupu osjetljivosti sa ocenom intenziteta zaraze 6.3.

Nakon druge ocene, posle 14 dana, na svim proučavanim genotipovima, usled spajanja pega u veće nekrotične površine, hloroze i opadanja lišća, zabeleženo je povećanje intenziteta oboljenja. Pored prve grupe sa najnižim intezitetom oboljena, u koju se svrstavaju otporna linija ECW-20 i hibrid Bihar F1, na osnovu reakcije prema patogenu izdvojile su se još 3 grupe genotipova paprike (Tabela 20). U drugu grupu osjetljivosti, pored Plamene, svrstana je i sorta Boni. Trećoj grupi pripada najveći broj proučavanih genotipova uključujući i osjetljivu kontrolnu sortu ECW, a nešto viši intenzitet zaraze ispoljile su: Novosađanka, Palanačko čudo, Brillant F1, Amfora, HS-2. U četvrtu najosetljiviju grupu, nakon druge ocene, osim Palanačke babure, svrstana je i sorta Slonovo uvo.

Tabela 20. Intenzitet zaraze proučavanih genotipova paprike prema *X. euvesicatoria* P8 (konc. 10^6 CFU/ml)

Genotipovi paprike	Intenzitet zaraze (7 dan)	Intenzitet zaraze (14 dan)
Bihar F1	1.0a	1.1 a
ECW-20	1.0a	1.55a
Plamena	4.5b	6.9b
Palanačko čudo	4.875bc	7b
Boni	4.9 bc	7.3bc
Novosađanka	4.9 bc	7.3 bc
Brillant F1	4.925 bc	7.35 bc
Anita	5.4 bc	7.35 bc
ECW	5.45 bc	7.5 bc
HS-2	5.525 bc	7.55 bc
Amfora	5.65 bc	7.75 bc
Slonovo uvo	5.9 bc	8.0c
Palanačka babura	6.325c	8.15c

U drugom eksperimentu uz primenjenu koncentraciju inokuluma 10^8 CFU/ml, odnos između ispitivanih sorti je bio gotovo identičan kao i pri nižoj koncentraciji. Zbog visoke koncentracije suspenzije došlo je nagle nekroze biljaka lisnog tkiva te su pri prvoj oceni vrednosti bile više u odnosu na prvu ocenu pri nižoj koncentraciji gde je došlo do

postepenog razvoja simptoma. Nakon sedmog dana od inokulacije izdvojilo se 6 grupa osetljivosti, među kojima je postojala statistički značajna razlika (Tabela 21). U ovom eksperimentu samo je linija ECW-20, kao otporna, svrstana u prvu grupu. Hibrid Bihar F1 pripada drugoj grupi osetljivosti, ali simptomi u vidu sitnih nekrotičnih pega zabeleženi na ovom hibridu ipak su ukazivali da se radi o otpornoj reakciji. U drugu grupu, svrstana je i sorta Amfora sa tipičnim simptomima oboljenja, potom sledi treća grupa kojoj pripada sorta Plamena, četvrta grupa sa hibridom Brillant F1, dok se u petu grupu osetljivosti, pored kontrolne osetljive sorte ECW, ubrajaju Novosađanka, Palanačko čudo, Boni, HS-2, Anita i Slonovo uvo. Kao najosetljivija izdvojila se sorta Palanačka babura, svrstana u šestu grupu.

Nakon druge ocene intenziteta zaraze (14. dana), bez tipičnih simptoma bolesti, izdajaju se otporna linija ECW-20 i hibrid Bihar F1 koji je svrstan u drugu grupu osetljivosti (Tabela 21). Trećoj grupi pripadaju Plamena i Novosađanka, a potom slede Anita, Palanačka babura, Boni, Palanačko čudo, Amfora, HS-2, ECW i Slonovo uvo. Kao najosetljiviji, u ovom ogledu, izdvojio se hibrid Brillant F1. Međutim, zbog visoke koncentracije inokuluma, koja je prouzrokovala brzu nekrozu lisnog tkiva i opadanje lišća, ocena intenziteta oboljenja nakon 14. dana bila je otežana.

Tabela 21. Intenzitet zaraze proučavanih genotipova paprike prema *X. euvesicatoria* P8 (konc. 10^8 CFU/ml)

Genotipovi paprike	Intenzitet zaraze 7 dan	Intenzitet zaraze 14 dan
ECW-20	1.0 a	1.0a
Bihar F1	3.2 b	3.5 b
Amfora	3.7 b	6.525 cdef
Plamena	4.525 c	6.075 c
Brillant F1	5.275 d	7.0 f
ECW	5.375 de	6.775 def
Novosađanka	5.375 de	6.15 c
Palanačko čudo	5.425 de	6.475 cde
Boni	5.5 de	6.475 cde
HS-2	5.575 de	6.775 def
Anita	5.675 de	6.275 cd
Slonovo uvo	5.7 de	6.85 ef
Palanačka babura	6.075 e	6.375 cde

5.10. PROUČAVANJE OSETLJIVOSTI PROUČAVANIH SOJEVA PREMA BAKTERICIDIMA

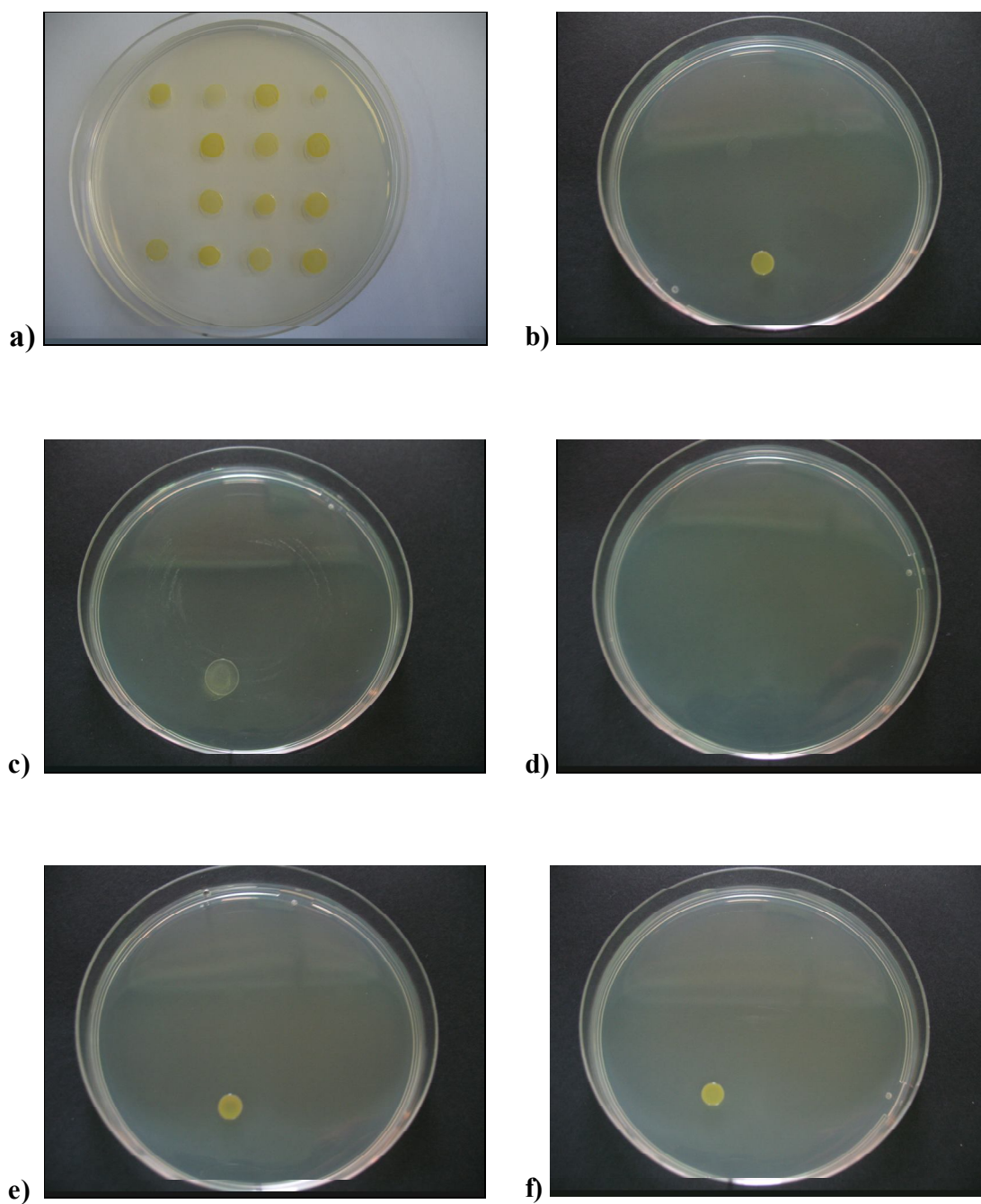
Proučavani sojevi su ispoljili različitu osetljivost prema upotrebljenim baktericidima (CuSO_4 , streptomycin-sulfat, kasugamicin), u *in vitro* uslovima (Slika 38). Prema rezultatima prikazanim u Tabeli 22 proučavani sojevi pokazali su određeni stepen rezistentnosti prema jedinjenju bakra, kao i prema antibiotiku kasugamicinu. Za razliku od ovih jedinjenja, prema streptomycinu nisu ustanovljeni rezistentni sojevi, odnosno sve primenjene koncentracije delovale su inhibitory na razvoj sojeva. Na podlozi sa 100 ppm bakar-sulfata zabeležen je porast svih proučavanih sojeva. Međutim, koncentracija 200 ppm ovog jedinjenja u podlozi, nije zaustavila porast svih proučavanih sojeva (Tabela 22).

Razlike su se ispoljile i u pogledu osetljivosti prema kasugamicinu. Pri koncentraciji 50 ppm ovog preparata u podlozi zabeležen je razvoj kolonija 6 proučavanih sojeva, dok su koncentracije 100 i 200 ppm potpuno zaustavile porast kolonija svih proučavanih sojeva. Za razliku od bakar-sulfata i kasugamicina, streptomycin - sulfat je pokazao baktericidno delovanje i pri najmanjoj koncentraciji, odnosno, ni jedan soj se nije razvio u podlozi sa 50 ppm ovog jedinjenja. Prema dobijenim rezultatima, minimalna inhibitory koncentracija streptomycin-sulfata je 50 ppm, a kasugamicina 50 ppm za većinu i 100 ppm za sve sojeve. Minimalna inhibitory koncentracija bakar-sulfata za većinu proučavanih sojeva iznosi 200 ppm ovog baktericida.

Tabela 22. Osetljivost prema baktericidima CuSO_4 , streptomycinu i kasugamicinu

Baktericid	Koncentracija (ppm)	Ocena
CuSO_4	100	+
	200	19
Streptomycin-sulfat	50	–
	100	–
	200	–
Kasugamicin	50	6
	100	–
	200	–
*Kontrola	SPA	+

Legenda: + normalan razvoj kolonija; – bez porasta kolonija; *Kontrola (SPA) osnovna podloga bez dodatka baktericida



Slika 38. Osetljivost sojeva prema baktericidima: a) potpun razvoj proučavanih kolonija na SPA podlozi sa koncentracijom CuSO_4 (100 ppm); b) razvoj kontrolnog soja KFB 062 (*X. vesicatoria*) na podlozi sa CuSO_4 (200 ppm); c) razvoj kontrolnog soja na podlozi sa kasugamicinom (50 ppm); d) izostanak porasta kolonija na podlozi sa 100 ppm kasugamicina; e) razvoj kontrolnog soja na podlozi sa streptomycin sulfatom (50 ppm); f) razvoj kontrolnog soja na podlozi sa streptomycin sulfatom (100 ppm).

5.11. BAKTERIOFAGI

5.11.1. Izolacija bakteriofaga

Tokom 2008. godine prikupljeni su uzorci zemljišta neposredno oko biljaka paprike sa izraženim simptomima bakterijske pegavosti, pri čemu je metodom direktne izolacije dobijeno 20 izolata faga (Tabela 23).

Tabela 23. Izolati bakteriofaga

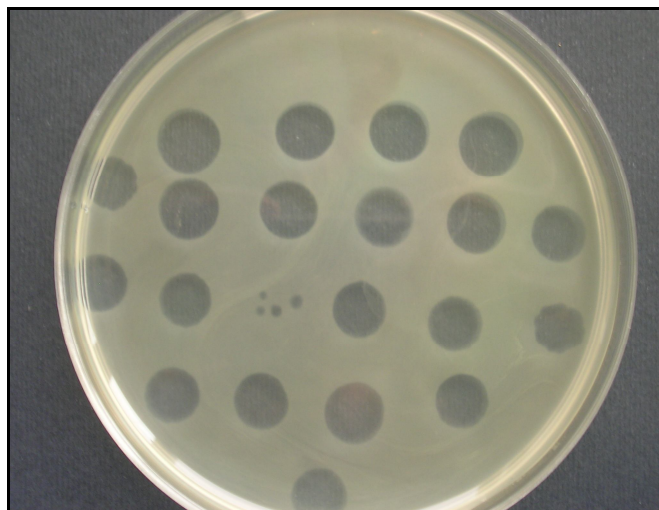
Izolati	Veza sa sojem bakterije	Datum	Izolacija
F 9	RKFB 189	17.06.08	Zemlja
F 10	RKFB 191	17.06.08	Zemlja
F 11	RKFB 194	17.06.08	Zemlja
F 12	RKFB 198	17.06.08	Zemlja
F 13	RKFB 202	20.06.08	Zemlja
F 14	RKFB 204	20.06.08	Zemlja
F 15	RKFB 208	23.06.08	Zemlja
F 16	RKFB 212	23.06.08	Zemlja
F 17	RKFB 214	25.06.08	Zemlja
F 18	RKFB 218	25.06.08	Zemlja
F 19	RKFB 220	26.06.08	Zemlja
F 20	RKFB 223	26.06.08	Zemlja
F 21	RKFB 227	26.06.08	Zemlja
F 22	RKFB 231	27.06.08	Zemlja
F 23	RKFB 237	30.06.08	Zemlja
F 24	RKFB 241	30.06.08	Zemlja
F 25	RKFB 243	01.07.08	Zemlja
F 26	RKFB 247	01.07.08	Zemlja
F 27	RKFB 251	01.07.08	Zemlja
F 28	RKFB 255	01.07.08	Zemlja

5.11.2. Specifičnost bakteriofaga prema *Xanthomonas* spp.

Eksperimentom je proučena aktivnost 20 izolata faga prema *Xanthomonas* spp. patogenima paprike. Kao potencijalni domaćini faga, korišćeno je 59 sojeva *X. euvesicatoria* izolovanih iz najvažnijih rejonu gajenja paprike u Srbiji i 7 sojeva *X. vesicatoria*, *X. perforans* i *X. gardneri*.

Proučavani izolati faga ispoljili su litičku aktivnost prema svim proučavanim sojevima *X. euvesicatoria* (Slika 39). Nijedan od proučavanih izolata faga nije ispoljio aktivnost prema kontrolnim sojevima *X. vesicatoria*, *X. perforans* i *X. gardneri*, što je dokaz njihove uske specifičnosti prema vrsti *X. euvesicatoria* (Tabela 24).

Ovim proučavanjima potvrđeno je postojanje prirodnih antagonista (bakteriofaga) u zemljištu oko biljaka paprike sa simptomima bakterijske pegavosti čiji je prouzročivač *X. euvesicatoria*. Takođe, biologija bakteriofaga, specifičnost prema bakteriji *X. euvesicatoria* ide u prilog činjenici da se mogu koristiti u biološkoj borbi. Osim toga, obzirom da izolati bakteriofaga nisu ispoljili aktivnost prema kontrolnim sojevima bakterija *X. vesicatoria*, *X. perforans* i *X. gardneri*, mogu se koristiti za brzu i pouzdanu identifikaciju bakterije *X. euvesicatoria*.



Slika 39. Bakteriofagi specifični prema sojevima bakterije *X. euvesicatoria*. Formirani plakovi ukazuju na prisustvo bakteriofaga

Tabela 24. Specifičnost bakteriofaga prema kontrolnim sojevima

Soj bakterije	Vrsta bakterije	Izolati bakteriofaga												
		9	11	13	14	15	16	17	18	19	20	22	24	25
KFB 189	<i>X. euvesicatoria</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KFB 1	<i>X. euvesicatoria</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KFB 13	<i>X. euvesicatoria</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KFB 29	<i>X. vesicatoria</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KFB 0108	<i>X. vesicatoria</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KFB 0109	<i>X. perforans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KFB 061	<i>X. perforans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KFB 0116	<i>X. gardneri</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KFB 0110	<i>X. gardneri</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KFB 0111	<i>X. gardneri</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: + formiranje prozračnog plaka; - izostanak formiranja plaka.

6. DISKUSIJA

Srbija je tradicionalno povrtarska zemlja sa izvanrednim klimatskim i zemljišnim potencijalom za ovaj vid proizvodnje. Ipak, prinos povrća u Srbiji značajno je manji u odnosu na ostvareni evropski prosek (Vlahović i sar., 2006). Za stabilan prinos, u kontinuitetu, neophodan je kvalitetan semenski i sadni materijal, kao i odgovarajuća i pravovremena agrotehnika. Osim toga, za visoke prinose veoma je važno očuvati useve zdravim (Balaž, 1994; Obradović i sar., 2000b). Fitopatogene bakterije mogu prouzrokovati znatne gubitke na povrtarskim gajenim biljkama (Obradović i sar., 1995; Arsenijević, 1997).

Paprika u našoj zemlji ima veliki privredni značaj i spada u grupu najznačajnijih povrtarskih biljnih vrsta. Po podacima Republičkog zavoda za statistiku (Beograd), gaji se na oko 20.000 ha. Papriku parazitira veliki broj patogenih gljiva, bakterija i virusa. U ekonomski najznačajnije patogene paprike u našim agroekološkim uslovima gajenja, ubraja se prouzrokovatelj bakteriozne pegavosti *Xanthomonas euvesicatoria* (Arsenijević i sar., 1997a; Balaž i sar., 2003; Obradović i sar. 1995; 2004a; 2008a; Gašić i sar., 2011; Šević i sar., 2011). Na rasprostranjenost i značaj ovog patogena u Srbiji pored meteoroloških činilaca, utiče gajenje osetljivog sortimenta, neadekvatno primenjena agrotehnika, tip zemljišta kao i nedovoljno efikasne mere zaštite useva (Balaž i sar., 2003; Obradović i sar., 2008a).

Dugo se smatralo da bakterioznu pegavost paprike prouzrokuje relativno homogena vrsta poznata pod nazivom *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Međutim, neujednačenost u pogledu nekih biohemijskih i patogenih karakteristika među sojevima uočena je još 70-tih godina prošlog veka (Dye i sar., 1964; Cook i Stall, 1969; Cook, 1973). Podelu sojeva na dve grupe A i B među prvima su izvršili Vauterin i sar. (1995). U grupu - A svrstani su neamilolitički sojevi čiji je predstavnik vrsta imenovana kao *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, dok je kao predstavnik amilolitičke grupe B imenovana vrsta *X. vesicatoria*. Kasnije, analizom masnih kiselina gasnom hromatografijom i hibridizacijom DNK, Jones i Stall (1998) su izdiferencirali još dve grupe sojeva (C i D). Daljim

proučavanjem bakterija na nivou DNK predloženo je da vrsta sa karakteristikama fenotipske grupe A bude preimenovana u *X. euvesicatoria* (Jones i sar., 2006); grupa B u *X. vesicatoria* (Vauterin i sar., 1995); *X. perforans* kao predstavnik grupe C (Jones i sar., 2006) i *X. gardneri* kao predstavnik grupe D (Šutić, 1957; Jones i sar., 2006).

Nakon postupka validacije prihvaćeni su binominalni nazivi za pomenute četiri vrste, koji se zvanično koriste od 2006. godine. Sve promene u sistematici fitopatogenih bakterija koje su se dogodile u poslednjih nekoliko godina nalaze se na validacionoj listi sa predstavnicima tipskih sojeva za svaku vrstu ponaosob (Bull i sar. 2012).

Obzirom na navedene promene u sistematici fitopatogenih bakterija i činjenicu da se bakteriozna pegavost paprike pojavljuje svake godine u Srbiji, ukazala se potreba za ustanovljavanjem sastava i diverziteta populacije i usaglašavanja sa najnovijom sistematikom.

Stoga je u periodu od 2008 do 2010. godine izvršeno prikupljanje i izolacija patogena iz listova obolelih biljaka paprike sa simptomima bakteriozne pegavosti. Nakon izolacije u cilju identifikacije patogena odabrano je 116 sojeva, poreklom iz 32 lokaliteta Republike Srbije. Detaljno su proučene patogene, odgajivačke, biohemijsko-fiziološke, serološke i molekularne karakteristike prikupljenih sojeva. Izvršena je diferencijacija fizioloških rasa, ocenjena je osetljivost najčešće gajenih genotipova paprike u nas prema rasi P8. Izvršena je izolacija prirodnih antagonista (bakteriofaga) i utvrđena je osetljivost sojeva prema baktericidima (CuSO_4 , streptomycin, kasugamicin).

Potvrda patogenosti proučavanih sojeva potvrđena je na osnovu reakcije biljaka paprike sorte Kalifornijsko čudo korišćenjem metode inokulacije ubrizgavanjem bakterijske suspenzije u mezofil sa naličja lisnog tkiva. Većina proučavanih sojeva prouzrokovala je prve promene nakon tri dana od inokulacije, u vidu tamnozelenih zona sa naličja lista. Vremenom zahvaćeno tkivo žuti, nekrotira, dobijajući mrku boju i ubrzo dolazi do opadanja inokulisanog lišća. Slične rezultate o patogenosti sojeva poreklom iz paprike prema biljci domaćinu sorte Palanačka babura izneli su Obradović i sar. (2000). Novija istraživanja pokazuju da su patogena svojstva bakterija u direktnoj vezi sa postojanjem *hrp* (*hypersensitive response and pathogenicity*) gena koji je ustanovljen u skoro svim Gram - negativnim bakterijama roda *Xanthomonas* (Büttner i He, 2009; Boch i Bonas, 2010).

Smatra se da su upravo ovi geni ključ patogenosti većine *Xanthomonas* patovara koji su odgovorni za aktivaciju T3S sistema sekrecije, posrednika u interakciji biljka domaćin - patogena bakterija (Alfano i Collmer, 2004; He et al. sar., 2004.; Büttner i Bonas, 2006)

Na test biljkama duvana sorte Samsun svi proučavani sojevi prouzrokovali su hipersenzitivnu reakciju posle 24 časa. Iz ove reakcije zaključeno je da se bakterije proučavanih sojeva nalaze u inkompatibilnom odnosu sa test biljkama duvana (Klement i sar., 1990). Hipersenzitivna reakcija predstavlja jedan od vidova aktivne odbrane biljaka u koju su uključeni svi mehanizmi biohemijskog suprotstavljanja napadnutih ćelija biljke. Jedan od najznačajnijih odbrambenih reakcija vezana za aktivnost membrane jeste oslobađanje kiseoničnih radikala i brojnih enzima, koja vodi do kolapsa ćelije i do njene smrti. Posledice su takve da napadnute ćelije odumiru, zahvaćeni deo lisnog tkiva nekrotira čime se zaustavlja dalje širenje patogena (Arsenijević, 1997).

U morfološkom pogledu, bakterijske ćelije proučavanih sojeva su Gram-negativne, štapićastog oblika sa zaobljenim ivicama, veličine od 0.9 -1.2 μm ; asporogene, pojedinačne ili u parovima.

Ocnom odgajivačkih odlika, posmatranjem izgleda kolonija na standardnim (YDC i MPA) i polusektivnim podlogama (Tween 80, Milk-Tween, mSQ i TTCA) među proučavanim sojevima nisu zapažene razlike.

Na standardnoj YDC podlozi, svi proučavani sojevi su formirali žute, okrugle, sluzaste, ispučene i sjajne kolonije, tipične za bakterije roda *Xanthomonas*. Po protokolu APS-ISF-a (2010) (*American Phytopathological Society - International Seed Federation*) YDC podloga se navodi kao najpogodnija za morfološku identifikaciju bakterije i preporučuje se za izolaciju patogena. Na mesopeptonskoj podlozi (MPA) formirane kolonije bile su sjajne, krem-žute boje, prečnika 1 - 2 mm.

Međutim, od ranije je poznato da se nedostatak standardnih podloga ogleda u njihovoj neselektivnosti i razvoju velikog broja saprofitnih bakterija. Težnja istraživača tokom vremena bila je usmerena ka stvaranju podloga koje bi omogućile selektivnost pri izolaciji što bi umnogome olakšalo odabir bakterijskih kolonija. Rezultatima naših proučavanja potvrđeno je da su podloge Tween B i Milk - Tween (MT) zbog svoje selektivnosti i jednostavne pripreme veoma pogodne za razlikovanje kolonija, a promene

koje nastaju u samim podlogama, oko formiranih kolonija, karakteristične su za rod *Xanthomonas*. Beličasta zona koja je formirana oko kolonija proučavanih sojeva, ukazivala je na stvaranje kalcijum-oleata usled hidrolize Tween-a 80, što je već poznata karakteristika bakterija roda *Xanthomonas*. Po McGuire i saradnicima (1986), mlečne (bele) zone hidrolize oko formiranih kolonija, nastaju kao rezultat oslobađanja lipida iz Tween-a 80 usled aktivnosti lipolitičkih enzima. Na MT podlozi svi proučavani sojevi su, pored beličastih zona, formirali i prosvetljene zone usled hidrolize kazeina iz mleka. Ova odlika bakterija roda *Xanthomonas* može poslužiti kao diferencijalna karakteristika u odnosu na kolonije bakterije *P. s. pv. syringae* (Goszczyńska i Serfontein, 1998). Na mSQ podlozi, neposredno ispod kolonija formiraju se silikati što se takođe smatra diferencijalnom karakteristikom bakterija roda *Xanthomonas* (Schaad i sar., 2001). Obzirom na zadovoljavajuću selektivnost podloga kao što su Tween B i MT, visoka cena hemikalija koje ulaze u sastav podloga kao što su TTCA i mSQ utiče na to da se one ređe koriste. Veću selektivnost podloga moguće je postići dodatkom određenih antibiotika, što su u svojim ogledima potvrdili Sijam i sar. (1991), Balaž i Delibašić (2005), Mirik i Aysan (2009).

Porast bakterija svih proučavanih sojeva je zabeležen i u tečnoj (YS) podlozi pri 37°C, u podlozi sa 5% NaCl, kao i pri koncentraciji trifetil-tetrazolium hlorida 0,02%, što su već poznate karakteristike bakterije *X. euvesicatoria* (Obradović i sar. 2000a).

Poznavanje biohemijske aktivnosti pojedinih vrsta bakterija je od velikog značaja u pogledu njihove identifikacije. Već je pomenuto u prethodnim poglavljima da se ocenom amilolitičke i pektolitičke aktivnosti može izvršiti diferencijacija i preliminarna potvrda identiteta vrsta *Xanthomonas* spp. (Vauterin i sar., 1995). Jones i sar. (2004) izdvajaju korišćenje dekstrina, D-galaktoze i *cis*-akonićinske kao diferencijalne testove za razlikovanje vrsta *Xanthomonas* spp. U našim istraživanjima, svi proučavani sojevi imali su zajedničke karakteristike kao što su odsustvo stvaranja oksidaze, oksidativni metabolizam glukoze, stvaranje kiseline iz dekstrina, galaktoze, glukoze i manoze, porast na podlozi sa *cis*-akonićinskom kiselinom stvaranje katalaze, nedostatak amilolitičkih i pektolitičkih enzima, hidroliza želatina i eskulina. U pogledu korišćenja azotnih jedinjenja zabeleženo je odsustvo redukujućih supstanci - ni jedan od proučavanih sojeva nije redukovao nitrate.

Imajući u vidu pomenute rezultate preliminarno je zaključeno da proučavani sojevi poseduju karakteristike bakterije *X. euvesicatoria*.

Iako su konvencionalne metode proučavanja fitopatogenih bakterija standardnim diferencijalnim testovima i dalje u primeni, uvek je postojala težnja istraživača za razvojem pouzdanijih, bržih i automatizovanih metoda u cilju potvrde identiteta patogena. U identifikaciji bakterija danas se u velikoj meri koriste serološke metode koje se zasnivaju na enzimskim reakcijama kao što su ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), IF (*Immunofluorescence*) i test aglutinacije. Prema Arsenijević (1997) identifikacija bakterija serološkim putem ima za cilj dokazivanje zajedničkih antigenih struktura pojedinih bakterija koja je uslovljena njihovom hemijskom građom.

Primenom serološkog testa DAS - ELISA u našim istraživanjima, utvrđena je antigena uniformnost proučavanih sojeva sa korišćenim antitelima bakterije *X. c. pv. vesicatoria*. Međutim, nedovoljna specifičnost seroloških testova ogleda se u tome što su u i dalje u upotrebi poliklonalni antiserumi bakterije *X. c. pv. vesicatoria*. Ovaj test često je korišćen u identifikaciji *X. c. pv. vesicatoria* Mitrev i Kovačević (2006), Yuzbasioglu i Saygili (2007) i Tawfik i sar. (2009).

Korišćenjem aglutinacionog testa, kao drugog serološkog testa u ovom radu, potvrđene su zajedničke serološke karakteristike proučavanih sojeva. Lemattre i sar. (1992) i McLaughlin i Chen (1990) svrstavaju ovaj serološki metod u kvalitativan obzirom na to da nema egzaktnih merenja. Usled heterogene populacije *Xanthomonas* spp., korišćenjem primenjenih antitela bakterije *X. c. pv. vesicatoria* u oba primenjena serološka testa može se govoriti samo o sličnim ili istim antigenim karakteristikama proučavanih sojeva.

Leite i sar. (1995) su na ovu pojavu i razlike među sojevima u serološkom smislu ukazivali u svojim ranijim istraživanjima. Smatrali su da da bi upotreba specifičnih antitela doprinela tačnijoj identifikaciji. Međutim, svoj dalji rad usmerili su u proučavanja strukture genoma bakterija *Xanthomonas* kompleksa u cilju iznalaženja adekvatnih metoda detekcije korišćenjem molekularnih testova. Među prvima su ustanovili da fitopatogene bakterije roda *Xanthomonas*, poseduju *hrp* gen koji je odgovoran za patogenezu, a pri tom nije prisutan u genomu saprofitnih i nepatogenih bakterija ovog roda.

Intenziviranjem ovih proučavanja koje se baziraju na molekularnim osobinama fitopatogenih bakterija roda *Xanthomonas* spp. Obradović i sar. (2004) sintetisali su prajmere RST 65 i RST 69 koji umnožavaju HrpB region *hrp* gena patogena veličine 420 bp. Utvrdili su jedinstvene restrikcione profile za svaku vrstu *Xanthomonas* spp. ponaosob. Molekularni metod RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) primenjen u ovom radu zasnivao se na analizi fragmenta *hrp* gena (HrpB regiona) pručavanih sojeva, dobijenih nakon digestije (sečenja) restrikcionim enzimima (*CfoI*, *TaqI* i *HaeIII*) prema metodi Obradović i sar. (2004).

Među proučavanim sojevima nije utvrđen polimorfizam, obzirom da su dobijeni restrikcioni profili proučavanih sojeva bili identični sa profilom kontrolnog soja bakterije *X. euvesicatoria*. Međutim, razlike u izgledu restrikcionih profila ispoljile su se jedino među kontrolnim sojevima bakterija *X. vesicatoria*, *X. perforans* i *X. gardneri*. Takođe, polimorfizam nije utvrđen ni među sojevima koji pripadaju različitim fiziološkim rasama.

Korak dalje i sintezu specifičnih prajmera za sve vrste *Xanthomonas* spp. u cilju identiteta proučavanih sojeva uz primenu lančane reakcije polimeraze opisali su Koenraadt i sar. (2009). Primenom ove metode i specifičnih prajmera, svi proučavani sojevi formirali su fragmente DNK veličine 173 bp. Poređenjem sa kontrolnim sojem potvrđeno je da pripadaju vrsti *X. euvesicatoria*. Prag detekcije ove metode utvrđen je na nivou $0,4 \times 10^3$ CFU/ml.

Uzimajući u obzir rezultate ranijih proučavanja, može se konstatovati da u pogledu patogenih, morfoloških, seroloških i molekularnih odlika nije došlo do promena u sastavu populacije *Xanthomonas* spp. u Srbiji tokom poslednje decenije (Obradović i sar. 2004, 2008a 2000b). Neophodno je dalje i praćenje populacije *Xanthomonas* spp. obzirom da je paprika kao gajena biljna vrsta veoma zastupljena u povrtarskoj proizvodnji u nas, kao i da postoji opasnost od pojave novih patogena *Xanthomonas* spp. koji nisu do sada registrovani u Srbiji.

Bakterija *X. euvesicatoria* rasprostranjena je na teritoriji Republike Srbije, na šta pre svega utiču povoljni agroekološki uslovi gajenja, nedovoljno razvijene efikasne mere zaštite, nepoštovanje osnovnih pravila agrotehnike i upotreba osetljivog sortimenta. Plodored kao osnovna agrotehnička mera biće uspešan samo ako se paprika na istu parcelu

vрати posle minimum 3 godine (Gvozdenović i sar. 2008). Izrazito povoljni vremenski uslovi, topla leta sa padavinama kao i obilno navodnjavanje tifonima, rasprskivačima, pogoduju širenju bakterija, te masovnoj infekciji lišća i plodova, što može dovesti do defolijacije biljaka. Prema Balaž, (2005) prouzrokovatelj bakteriozne pegavosti *X. euvesivatoria* spada u grupu tzv. termofilnih bakterija, a optimalna temperatura za ostvarenje infekcije je od 24 - 30 °C.

Pogodni vremenski uslovi koji su nastupili u maju 2008. godine, kada je srednja mesečna temperatura bila je za 1.1 °C viša od proseka i imala je vrednost 17.5 °C, uticali su na masovnu pojavu i širenje bakteriozne pegavosti paprike. Obzirom da je i druga polovina maja bila značajno toplija sa temperaturama iznad ili značajno iznad uobičajenih vrednosti, u okolini Horgoša i Subotice (Senta, Novi Kneževac, Kanjiža, Čoka) u 2008. godini, zabeležen je visok intenzitet oboljenja na usevima industrijske (začinske) paprike sorte Horgoška slatka. Osim toga u ovom regionu zastupljene su domaće sorte slatke začinske paprike Horgoška slatka sa svojim varijacijama HS-1, HS-2, HS-5, HS-6, HS-8, koje su stvorene kao rezultat selekcije kompanije "Vitamin" u Horgošu. Ove sorte odlikuju se izuzetnim karakteristikama u smislu kvaliteta ploda i gaje se pre svega za mlevenje zbog visokog procenta suve materije. Međutim, sve sorte Horgoške paprike spadaju u grupu osetljivih prema prouzrokovatelju bakteriozne pegavosti (Balaž i Delibašić, 2005). Iz godine u godinu na usevima na kojima se gaje sorte Horgoške slatke ovo oboljenje se pojavljuje u većem ili manjem intenzitetu. Jedan od razloga leži u činjenici da se setva obavlja direkto iz semena, a ugovaranjem proizvodnje ovih sorti sa poljoprivrednim proizvođačima iz cele Srbije otvara se put širenju patogena u nova područja. Pored Horgoša, visok intenzitet oboljenja zabeležen je i u drugim lokalitetima Bačke (Odžaci, Kula, Vrbas, Bačka Palanka, Gložan, Čelarevo, Selenča, Despotovo, Silbaš, Bački Petrovac i Pivnice). Analizom zastupljenog sortimenta u svim pomenutim lokalitetima zapaženo je da su u upotrebi najvećim delom domaće sorte, koje pripadaju različitim grupama zrenja i odlikuju se različitim tipovima ploda (kapije, šipke, babure). Može se reći da su biljke paprike svih pomenutih sorti bile osetljive u svim fazama razvoja (klijanci, list, cvet, plod), bez obzira na tip ploda ili grupu zrenja. Na navodnjavanjem usevima, kao i na usevima na kojima nije primenjena adekvatna agrotehnika intenzitet zaraze bio je znatno viši.

U 2009. godini takođe visok intenzitet oboljenja zabeležen je u lokalitetima centralne, zapadne i južne Srbije u lokalitetima: Šabac, Kraljevo, Trstenik, Smederevska Palanka, Leskovac sa indeksom oboljenja u polju između 20 - 50%. I na ovim usevima širenju oboljenja doprineli su povoljni vremenski uslovi, osetljiv sortiment, nedovoljno efikasne mere zaštite, kao i korišćenje sistema za navodnjavanje rasprskivanjem. Primena adekvatnih mera zaštite uz pravilnu agrotehniku doprinela je redukciji oboljenja u okolini Čačka i Velike Plane (10%).

Još uvek se u praksi kao glavni uzrok čestih pojava bakteriozne pegavosti jakog intenziteta, navodi gajenje osetljivog sortimenta paprike (Mijatović i sar., 2004). Gubici su najveći ukoliko se infekcija javi u ranim fenofazama, kao što je zabeleženo u Izraelu (Bashan i sar., 1985); Turskoj (Mirik i sar., 2005); SAD-u (Jones i sar., 1986); Sloveniji (Ravnikar i sar., 2001); Makedoniji (Mitrev i Kovačević, 2006).

Obzirom na postojanje više fizioloških rasa bakterije *X. euvesicatoria*, (P0 - P10) sa različitim arealom rasprostranjenja (Kousik i Ritchie, 1996; Jones i sar., 1998a; Sahin i Miller, 1998), jedan od ciljeva ovog rada bio je ustanovljavanje rasnog sastava prouzrokovala bakteriozne pegavosti paprike u našim uslovima, što je od presudnog značaja sa aspekta zaštite oplemenjivanjem i stvaranjem otpornih linija i sorti.

Zastupljenost pojedinih fizioloških rasa među proučavanim sojevima određena je na osnovu reakcije biljaka paprike sorte Early Calwonder (ECW), njenih izogenih linija ECW-10 (*Bs1*), ECW-20 (*Bs2*), ECW-30 (*Bs3*) i biljaka paprike *Capsicum pubescens* PI235047 (*Bs4*). Ključevi za identifikaciju fizioloških rasa patogena *X. euvesicatoria* poreklom sa paprike opisani su u protokolu za utvrđivanje i razlikovanje rasnog sastava bakterije *X. euvesicatoria* APS - ISF-a (*American Phytopathological Society - International Seed Federation*, 2010).

Na osnovu razlika ispoljenih u reakciji diferencijalnih sorti paprike, među našim sojevima utvrđena je heterogenost populacije bakterije *X. euvesicatoria* i ustanovljeno je da pripadaju rasama: P1, P3, P7 i P8. Od ukupno 116 proučavanih sojeva *X. euvesicatoria*, rasi P8 pripadaju 93 soja, rasi P7 17 sojeva, rasi P1 pripada pet, a rasi P3 jedan soj. Rasa 8 je najzastupljenija kako u pogledu prisustva na gajenom sortimentu, tako i sa aspekta rasprostranjenosti po lokalitetima. Prisutna je u skoro svim lokalitetima, osim Ruskog

Krstura i Stanišića u kojima je konstatovana samo rasa 7. U Horgošu su prisutne dve rase 1 i 8, u Gložanima, Kuli i B. Topoli ustanovljene su rase 7 i 8, dok je u ostalim lokalitetima konstatovana samo rasa 8. Ni u jednom lokalitetu nisu prisutne sve četiri rase patogena, ali izdvajaju se lokaliteti u kojima su zabeležene tri rase: Despotovo (3, 7, 8) i Smederevo sa rasama 1, 7, 8.

Pojavu o nejednakoj distribuciji više različitih rasa na istom lokalitetu, kao i mogućnost da različite rase mogu biti izolovane sa jedne iste sorte paprike opisao je Garton (2009) u svojoj studiji. Takav slučaj, u našim proučavanjima, zabeležen je na sortama Boni (3, 7, 8), Slonovo uvo, HS-6 (1, 7, 8) i Palanačko čudo (7, 8).

Ohrabruje činjenica da nije došlo do pojave novih rasa bakterije *X. euvesicatoria*. U prethodnim proučavanjima Obradović-a i saradnika (1999a, 2000a, 2004a), kod nas su utvrđene rase P1, P3, P7 i P8. Rowell i sar. (1998) ističu, da bez obzira na postojanje *Bs2* gena u nekih sorti, može doći do infekcije biljaka, obzirom da uvek postoji opasnost od pojave novih rasa.

Neke studije ukazuju na pojavu da u toku vegetacije dolazi do promena u rasnom sastavu bakterije *X. euvesicatoria* (Kousik i Ritchie, 1996a). U SAD-u postoje podaci koji ukazuju na smenjivanje dominacije jedne rase u donosu na drugu. Na teritoriji Floride, Severne Karoline i oko Centralne Amerike su, kao dominantne, ustanovljene rase P0, P1 i P3 (Bouzar i sar., 1994b). Nešto kasnije su Romero i saradnici (1996) u jugoistočnom delu SAD konstatovali rasu 3 kao dominantnu. Rowell i saradnici (2001) su u Centralnom i istočnom Kentakiju determinisali prisustvo rasa 1, 3, 4 i 6, dok je O'Garro (1998) ustanovio rase 1 i 6 na teritoriji Grenade. Do sada nisu registrovani komercijalni genotipovi paprike sa *Bs4* genima otpornosti (Stall i sar., 2009). Obzirom na tu činjenicu Garton (2009) iznosi zabrinutost od šteta koje nanosi rasa P10 u Džordžiji kao najdominantnija rasa na tom području. U Australiji je do sada konstatovana samo rasa P4 (Bouzar i sar., 1996), dok su u Kini dominantne rase P0 i P2.

Selekcionni pritisak nastao unošenjem gena otpornosti u komercijalne genotipove gajenih biljaka, često rezultira pojavom sojeva sposobnih da prevaziđu otpornost (Pernezny i Collins, 1997). Česte mutacije *X. euvesicatoria* omogućuju da se prevaziđu geni otpornosti (Gassmann i sar., 2000; Minsavage i sar., 1990; Ritchie i Dittapongpitch, 1991),

čiji je rezultat raspad otpora domaćina (Kousik i Ritchie, 1998). Učestalost ovih promena i mutacija utiče na rasni sastav patogena i utiče na trajnost i postojanost otpornosti biljaka (Stall i sar., 2009), što znatno otežava stvaranje otpornih sorti prema postojećim rasama.

Obzirom na dominaciju i zastupljenost rase 8 u skoro svim regionima gajenja u nas, proučena je osetljivost 11 genotipova paprike: HS-2, Amfora, Plamena, Anita, Novosađanka, Palanačka babura, Palanačko čudo, Slonovo uvo, Brillant, Bihar i Boni. Kao osetljiva prema svim rasama patogena uzeta je sorta Early Calwonder (ECW), a kao nosilac gena otpornosti *Bs2* prema genu avirulentnosti patogena *avrBs2* njena izogena linija ECW-20. Izvedena su dva eksperimenta sa dve primenjene koncentracije inokuluma: 10^6 CFU /ml i 10^8 CFU /ml.

Na osnovu ispoljenog intenziteta zaraze odabranih genotipova paprike u uslovima veštačke inokulacije u zaštićenom prostoru, ustanovljen je visok stepen osetljivosti većine proučavanih genotipova. U oba eksperimenta, bez obzira na primenjenu koncentraciju, na inokulisanim listovima osetljivih sorti obrazovale su se karakteristične vodenaste pege, u početku tamnozelene a kasnije mrke, sa manjim ili većim hlorotičnim oreolom. Pri koncentraciji inokuluma 10^6 CFU /ml, došlo je do postepenog razvoja simptoma, dok je u drugom ogledu viša koncentracija inokuluma (10^8 CFU/ml) uticala na bržu pojavu nekroze, sušenja i opadanja lišća. Većina proučavanih genotipova, u oba eksperimenta, bila je na nivou osetljivosti sorte ECW. Kao najosetljivije, izdvojile su se sorte Palanačka babura i Slonovo uvo.

Može se konstatovati da su svi proučavani genotipovi, osim hibrida Bihar-a F1, u oba ogleda, bili osetljivi prema rasi P8 patogena. Kada se govori o otpornosti biljaka prema patogenima treba imati u vidu nekoliko važnih činilaca: specifičnost domaćina i patogena, varijabilnost patogena i uticaj ekoloških faktora na njihove međuodnose (O'Garro i Charlemange, 1994; Lopes i sar., 2001). Pojava kod nekih genotipova, da iako su osetljivi, dolazi do sporijeg razvoja simptoma, manjeg intenziteta, može se donekle objasniti aktiviranjem mehanizama prirodne otpornosti domaćina usled stvaranja supstanci koje usporavaju širenje patogena u tkivima (Pohronezny i sar., 1992). Veoma značajnu ulogu u odbrani biljaka od patogena imaju faktori prirodne otpornosti i jedinjenja kao što su fenoli, glikozidi, glukonaze, hitinaze koje usporavaju ili potpuno zaustavljaju razvoj patogena.

O'Garo i Charlemange (1994), ustanovili su da bakterijska populacija može biti značajno redukovana usled aktivnosti β -1,3- glukonaze i hitinaze, enzima koji su prirodno prisutni u tkivima cveta i lista paprike.

Obzirom da je većina proučavanih genotipova ispoljila visok stepen osetljivosti prema prouzrokovaču bakteriozne pegavosti, kao i da postoji izolovan gen otpornosti prema najzastupljenijoj rasi patogena u nas, selekcija paprike na otpornost bila bi značajan doprinos kontroli ovog ekonomski značajnog oboljenja.

U zaštiti bilja kod nas još uvek dominiraju hemijske mere borbe, odnosno korišćenje hemijskih sredstava ili pesticida (Obradović, 2009; Ivanović i sar., 1998). Kontrola i suzbijanje oboljenja izazvanih bakterijama, predstavljaju stalni izazov, kako za proizvođače i stručne službe, tako i za istraživače fitopatologe. Kao i kod većine bakterioznih oboljenja, ni bakteriozna pegavost paprike se ne suzbija lako i jednostavno. Potrebno je preduzeti niz mera koje uključuju: agrotehničke, hemijske, stvaranje otpornih hibrida i sorti i alternativne mere zaštite (aktivatori otpornosti i biopesticidi). Proizvođači paprike nemaju adekvatna sredstva za borbu protiv ovog patogena, a jedini registrovani baktericidi u našoj zemlji na bazi jona bakra često nisu dovoljno efikasni posebno u vremenskim uslovima koji pogoduju intenzivnom razvoju bolesti (Šević i sar., 2011a).

Preparati na bazi antibiotika nisu registrovani za upotrebu u zaštiti bilja u našoj zemlji, ovom prilikom korišćeni su *in vitro* u eksperimentalne svrhe. Obzirom na mali spektar aktivnih materija za suzbijanje bakteriozne pegavosti paprike i nekontrolisanu upotrebu antibiotika, kao i čestu primenu bakarnih preparata, uočene razlike u osetljivosti proučavanih sojeva ukazuju da postoji velika opasnost od razvoja rezistentnosti bakterija.

U našim proučavanjima minimalna inhibitorna koncentracija streptomycin-sulfata, za sve sojeve je iznosila 50 ppm. U ranijim istraživanjima osetljivosti sojeva u *in vitro* uslovima prema bakar-sulfatu i streptomycinu, utvrđeno je da su koncentracije streptomicina 20, 50, 100 i 200 ppm i bakar sulfata 200 ppm, potpuno zaustavile razvoj kolonija na podlozi (Obradović i sar., 2000b). Upoređivanjem rezultata iznetim u ovoj disertaciji sa prethodnim rezultatima Obradovića i saradnika (2000b), može se konstatovati da je u periodu od 2000-2011 godine došlo do pojave rezistentosti patogena prema bakru i jednim delom prema kasugamicinu, što posebno zabrinjava. Obzirom da antibiotici u našoj

zemlji nisu registrovani u zaštiti bilja, nekontrolisana i ilegalna upotreba antibiotika je ekološki neopravdana i može dovesti do pojave rezistentnih sojeva patogena, što je potvrđeno i našim rezultatima.

Rezultati eksperimenta izvedenog u cilju ocene osetljivosti proučavanih sojeva prema različitim koncentracijama bakar-sulfata *in vitro* pokazao je da nisu svi sojevi podjednako osetljivi na bakar-sulfat. Proučavani sojevi razvijali su se podjednako pri 100 ppm bakar-sulfata u podlozi, dok koncentracija od 200 ppm CuSO_4 nije delovala inhibitory na sve proučavane sojeve. To ukazuje na moguću pojavu rezistentnosti bakterije na navedeno jedinjenje bakra. Naime, 19 sojeva se slabije razvijalo u podlozi sa 200 ppm bakar-sulfata. Njihove kolonije su bile manje, slabije su se razvijale i nije dolazilo do njihovog spajanja. Razlog pojave rezistentnosti proučavanih sojeva prema ovom jedinjenju leži u širokoj i često upotrebi ove i drugih aktivnih supstanci na bazi jona bakra za kontrolu mikoza i bakterioza u biljnoj proizvodnji.

Kao posledica česte primene bakarnih preparata na Floridi su još 1983. godine registrovani sojevi patogena rezistentni prema jedinjenjima bakra i streptomocina (Marco i Stall, 1983). Pokazalo se u praksi da je primena bakarnih preparata manje efikasna od njihovih kombinacija sa EBDC fungicidima (Adaskaveg i Hine, 1985). Razlog rezistentnosti ispitivanih sojeva prema bakru leži u širokoj i često upotrebi bakarnih preparata različitih formulacija (Bordovska čorba, bakar hidroksid, bakar sulfat) za kontrolu bolesti u proizvodnji.

Stoga, u nedostatku efikasnih baktericida rešenje treba tražiti u integralnom pristupu, odnosno sintezi saznanja o biologiji i epidemiologiji patogena, tehnologiji biljne proizvodnje, kao i baktericidnom efektu pojedinih supstanci (Obradović i sar., 2008a).

Prema literaturnim podacima biološke (primena bakteriofaga) i neke novije alternativne metode (aktivatori otpornosti), ukazuju na mogućnost razvoja efikasne strategije za suzbijanje *X. euvesicatoria* (Obradović i Ivanović, 2007; Obradović, 2009; Gašić i sar., 2011). Kao sintetisana jedinjenja, pesticidi su različitog hemijskog sastava, toksikoloških osobina, perzistentnosti i potencijalni su zagađivači životne sredine. Međuprodukti degradacije često su perzistentniji od polaznog jedinjenja i ostaju duže vreme u zemljištu ili vodi (Đorđević i sar., 2008).

Poslednjih godina u primeni je nova grupa preparata, tzv. aktivatora otpornosti biljaka (SAR-systemic acquired resistance inducers), koji u kontaktu sa biljkom aktiviraju biohemijske procese i dovode do povećanja odbrambene sposobnosti i smanjenja mogućnosti ostvarenja infekcije patogenim mikroorganizmima (Louws i sar., 2001; Romero i sar., 2001; Obradović i sar., 2005, 2008a). Louws i sar. (2001) ističu upravo mogućnost korišćenja acibenzolar-S-metil-a (SAR-Systemic Acquired Resistance) aktivatora sistemične otpornosti biljaka, kao alternativu bakarnim preparatima, u regionima u kojima su registrovani rezistentni sojevi *X. euvesicatoria* prema jedinjenjima bakra. Obradović i sar. (2001b, 2002a) proučavali su mogućnosti kontrole prouzrokovača bakterijske pegavosti paradajza u rasadu korišćenjem bakteriofaga i SAR aktivatora otpornosti.

Sve veći značaj proizvodnje paprike kao rentabilne biljne vrste i visokih zahteva tržišta u smislu kvaliteta, usmeriće rad i na utvrđivanje eventualnog prisustva prirodnih neprijatelja koji prate populaciju bakterije, a mogu se koristiti kao prirodni agensi u cilju biološke zaštite. Integralni pristup u zaštiti bilja, uključujući i zaštitu paprike od bakterijske pegavosti uz korišćenje bioloških preparata navode Obradović i sar. (2005). Stvaranje nepovoljnih uslova za razvoj bolesti primenom agrotehničkih mera, bioloških produkata, antagonističkih organizama i superparazita su tehnologije zaštite kojima se danas teži (Obradović, 2009). Biopesticidi podrazumevaju primenu korisnih mikroorganizama ili produkata njihovog metabolizma i predstavljaju alternativu sintetičkim jedinjenjima. Biološki agensi mogu biti na bazi korisnih gljiva, bakterija, kvasaca, virusnih čestica (bakteriofaga), kao i na bazi eteričnih ulja ili biljnih ekstrakata. Mehanizmi delovanja bioloških materija razvijaju se u pravcu direktne kompeticije, antibioze, parazitizma i indukovane otpornosti.

Među onima koji su prihvaćeni za primenu u praksi nalaze se i bakteriofagi ili jednostavnije fagi (Flaherty i sar., 2000; Balogh i sar., 2003; Jones i sar., 2006; Obradović i sar., 2004a, 2006, 2008a, 2009; Gašić i sar., 2007). Bakteriofagi predstavljaju najbrojnije mikroorganizme na planeti i spadaju u posebnu grupu virusa čiji su domaćini bakterije. Poslednjih godina intenzivirana su proučavanja u cilju suzbijanja bakterijske plamenjače voćaka i ukrasnih biljaka, bakterijskog uvenuća duvana, bakterijskog raka i pegavosti

citrusa, bakteriozne pegavosti paradajza i paprike, lisne plamenjače crnog luka i dr. (Obradović, 2009). Bakteriofagi su široko prisutni u prirodi, umnožavaju se samo u prisustvu ćelije domaćina, usko su specifični eliminišući samo kompatibilnu vrstu ili soj bakterije i netoksični su za eukariote.

U ovom radu izolovani su fagi, specifični prema vrsti *Xanthomonas euvesicatoria*, prouzrokovaču bakteriozne pegavosti paprike. Bakteriofagi su, metodom direktne izolacije, izolovani iz uzoraka zemljišta na kome je gajena paprika. Izolovani fagi potiču iz zemljišta u neposrednoj blizini korena zaraženih biljaka. Spektar domaćina i specifičnost faga proučeno je korišćenjem 59 sojeva *X. euvesicatoria* i 7 sojeva *X. vesicatoria*, *X. gardneri* i *X. perforans*. Svi izolati faga ispoljili su specifičnost prema bakteriji *X. euvesicatoria* i nisu lizirali ostale *Xanthomonas* spp. patogene paprike i paradajza, čime je dokazano prisustvo faga kao prateće populacije patogena u prirodi.

Sve ove činjenice čine fage veoma značajnim biološkim agensima za suzbijanje bolesti prozrokovanih fitopatogenim bakterijama.

Postojanje bakteriofaga u zemljištu oko zaraženih biljaka kao i mogućnost izolacije potvrđuju i rezultati brojnih autora koji ukazuju na probleme prilikom izolacije faga iz filozofe biljaka (Okabe i Goto, 1963; Erskin, 1973; Flaherty i sar, 2001; Gill i sar., 2003). Ova pojava može se objasniti činjenicom da zemljište, u poređenju sa nadzemnim delovima biljke, predstavlja povoljniju sredinu za opstanak faga. Takođe, zemljište obezbeđuje zaštitu od UV zračenja i isušivanja, dva glavna faktora koja utiču na inaktivaciju faga (Iriarte i sar., 2007).

Specifičnost faga prema pojedinim vrstama ili sojevima bakterija često je korišćena u identifikaciji biljnih patogena (Dye i sar., 1964; Cupples, 1984), obzirom da je procedura detekcije plakova veoma brza i efikasna. Na osnovu različite specifičnosti faga prema vrstama *X. euvesicatoria*, *X. vesicatoria*, *X. gardneri* i *X. perforans*, moguće je diferencirati ove vrste.

Ustanovljavanje populacije *Xanthomonas* kompleksa, rasnog sastava, osetljivosti prema baktericidima trebalo bi da postane kontinuiran proces i ubuduće obzirom na česte promene i pojavu novih sojeva i rasa.

7. ZAKLJUČAK

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

- Simptomi bakteriozne pegavosti lišća i krastavosti plodova paprike ispoljavaju se svake godine u Srbiji u većem ili manjem intenzitetu.
- Iz obolelih biljaka izolovano je 116 sojeva bakterija tokom 2008, 2009 i 2010. godine.
- Proučavanjem patogenih, odgajivačkih, biohemijsko-fizioloških odlika svi proučavani sojevi ispoljavaju karakteristike bakterije *X. euvesicatoria*.
- Serološkim testovima (DAS – ELISA, aglutinacija) utvrđeno je da proučavani sojevi poseduju iste antigene karakteristike.
- Identifikacija primenom molekularnih metoda (RFLP, PCR) potvrđeno je da proučavani sojevi poseduju odlike vrste *X. euvesicatoria*.
- Na osnovu ispoljenih reakcija diferencijalnih sorti i izogenih linija paprike utvrđene su 4 fiziološke rase: P1, P3, P7, P8. Najzastupljenija je rasa P8, prisutna u svim lokalitetima u Srbiji.
- Proučena je osetljivost najčešće gajenih genotipova paprike u Srbiji prema najzastupljenijoj rasi (P8) bakterije *X. euvesicatoria*. Utvrđeno je da su svi proučavani genotipovi paprike u našim istraživanjima ispoljili visok stepen osetljivosti prema rasi P8 bakterije *X. euvesicatoria*.
- Utvrđen je različit stepen osetljivosti među proučavanim sojevima prema baktericidima u *in vitro* uslovima. Među proučavanim sojevima 19 je rezistentno prema CuSO₄ (konc. 200 ppm), a 6 sojeva prema kasugamicinu koncentracije 50 ppm. Za razliku od bakar-sulfata i kasugamicina, streptomycin-sulfat je delovao baktericidno i pri najmanjoj koncentraciji.

- Izolacijom iz zemljišta uzetog neposredno oko zaraženih biljaka utvrđeno je prisustvo bakteriofaga u neposrednom okruženju. Proučavani sojevi faga specifični su prema vrsti *Xanthomonas euvesicatoria*, dok prema ostalim *Xanthomonas* spp. nisu ispoljili aktivnost.
- Prouzrokovatelj bakteriozne pegavosti lišća i krastavosti plodova paprike u Srbiji je *X. euvesicatoria*. Utvrđena je rasprostranjenost i diverzitet populacije na teritoriji Srbije u svim proizvodnim lokalitetima paprike. Obzirom na postojanje 4 fiziološke rase i gajenje osjetljivog sortimenta preporučuje se selekcija na otpornost prema najzastupljenijoj rasi 8. Rezistenost proučavanih sojeva prema najčešće korišćenim baktericidima u nas upućuje na korišćenje novih mera zaštite. Utvrđena je populacija prirodnih antagonista – bakteriofaga čime se otvaraju mogućnosti njihove primene u identifikaciji patogena, kao i u biološkoj zaštiti.
- Ustanovljavanje populacije *Xanthomonas* spp., rasnog sastava, osjetljivosti prema baktericidima trebalo bi da postane kontinuiran proces i ubuduće obzirom na česte promene i pojavu novih sojeva i rasa.

8. LITERATURA

Abbasi, P., Soltani, N., Cuppels, A. D., Lazarovits, G. (2002): Reduction of bacterial spot disease severity on tomato and pepper plants with foliar applications of ammonium lignosulfonate and potassium phosphate. *Plant disease*, 86 (11): 1232 - 1236.

Adaskaveg, J. E., Hine, R. B. (1985): Copper tolerance and zink sensitivity strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, causal agent of bacterial spot of pepper. *Plant disease*, 69 (11): 993 - 996.

Adriano, D. (2001): Trace Elements in Terrestrial Environments: Bioavailability, Biogeochemistry and Risks of Metals. The 2nd Edition. Springer Verlag - New York.

Agrios, G. N. (2005): Plant Pathology. Elsevier Academic Press, Burlington, Massachusetts, USA.

Alfano, J. R., Collmer, A. (2004): Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense. *Annual Review Phytopathology*, 42: 385 - 414.

Alvarez, A. M., Lou, K. (1982): Rapid field identification of a bacterial pathogen by an Enzyme - Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Phytopathology*, 72: 947.

Alvarez, A. M., Benedict, A. A., Mizumoto, C. Y. (1985): Identification of xanthomonads and grouping of strains of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* with monoclonal antibodies. *Phytopathology*, 75: 722 - 728.

Arsenijević, M., Balaž, J. (1978): Etiološka proučavanja bakteriozne pegavosti lista paprike. *Savremena poljoprivreda*, 7 - 8: 75 - 76.

Arsenijević, M., Jovanović, O. (1993): *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* parazit rasada paradajza. *Zaštita bilja*, 203: 73 - 83.

Arsenijević, M., Jovanović, O. (1995): Nov postupak razlikovanja bakterija po Gramu. *Zaštita bilja*, 211: 57 - 62.

Arsenijević, M. (1997): Bakterioze biljaka. S print. Novi Sad.

Arsenijević, M., Trkulja, V., Obradović, A. (1997): Pathogenic and bacteriological characteristics of Yugoslav *Erwinia* soft rot strains originating from pepper and eggplant fruits. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 104 (4): 394 - 402.

- Aysan, Y., Sahin, F. (2003): Occurrence of bacterial spot disease, caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* on pepper in the eastern Mediterranean region of Turkey. *Plant Pathology*, 52: 781.
- Balaž, J. (1988): Pojava novih i nekih manje poznatih bakterioza u Jugoslaviji tokom 1987. godine. XII Seminar zaštite bilja, Arandelovac. Zbornik radova: 58 - 60.
- Balaž, J. (1994): Pegavost lišća paprike prouzrokovana bakterijom *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Savremena poljoprivreda*, vanredni broj, 42: 341 - 345.
- Balaž, J., Knežević, T., Rašić, Đ. (2002): Ispitivanje mogućnosti hemijskog suzbijanja ekonomski najštetnijih fitopatogenih bakterija u našim uslovima. XII simpozijum o zaštiti bilja i savetovanje o primeni pesticida, Zlatibor. Knjiga abstrakata: 132.
- Balaž, J., Obradović, A., Knežević, T. (2003): Bakterioze na semenu i sadnom materijalu povrtarskih, ratarskih i ukrasnih biljaka. *Biljni lekar*, 31 (6): 629 - 638.
- Balaž, J. (2005): Seme kao izvor primarnog inokuluma za nastanak bakterioza povrća i integrisane mere zaštite. *Pesticidi i fitomedicina*, 20 (2): 79 - 88.
- Balaž, J., Delibašić, T. (2005): Iznalaženje meoda za izolaciju *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* sa semena paprike. *Pesticidi i fitomedicina*, 20 (1): 51 - 60.
- Balogh, B. (2002): Strategies for improving the efficacy of bacteriophages for controlling bacterial spot of tomato. Masters Thesis, University of Florida. Florida, USA.
- Balogh, B., Jones, J. B., Momol, M. T., Olson, S. M., Obradović, A., King, B., Jackson, L. E. (2003): Improved efficacy of newly formulated bacteriophages for management of bacterial spot on tomato. *Plant Disease*, 87: 949 - 954.
- Bashan, Y., Okon, Y., Henis, Y. (1982): Long-term survival of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in tomato and pepper seeds. *Phytopathology*, 72: 1143 - 1144.
- Bashan, Y., Diab, S., Okon, Y., (1982a): Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in pepper seeds and roots, in symptomless and dry leaves in non-host plants and in the soil. *Plant and Soil*, 68: 1691 - 170.
- Bashan, Y., Azaizeh, M., Diab, S., Yunis, H., Okon, Y. (1985): Crop loss of pepper plants artificially infected with *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in relation to symptom expression. *Crop Protection*, 4: 77 - 84.
- Basim, H. (1998): Recent development in molecular genetics of plant disease resistant. *Turkey Journal of Biology*, 22: 413 - 420.

- Basim, H., Basim, E., Jones, J. B., Minsavage, G. V., Dickstein, E. R. (2004): Bacterial spot of tomato and pepper caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* in the western Mediterranean region of Turkey. *Plant Disease*, 88 (1): 85.
- Bedlan, G. (1985): Bacterial speck diseases of tomatoes. *Pflanzenschutz*, 10: 12 - 13.
- Bender, C. L., Malvick, D. K., Conway, K. E., George, S., Pratt, P. (1990): Characterization of pXV10A, a copper resistance plasmid in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Applied Environmental Microbiology*, 56 (1): 170 - 175.
- Bogatzevska, N., Iliev, I., Boneva, P. (1992): Characterization of epiphytic *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* from symptomless weeds in Bulgaria. *Plant Pathogenic Bacteria*, 8th Int. Con. INRA: 831 - 834.
- Bogatzevska, N., Iliev, I. (1994): Difference of *Xanthomonas campestris* pathovars (*vesicatoria*, *glycines*, *phaseoli*) in pathogenicity and bacteriological properties in host and non-host plants. In: *Plant Pathogenic Bacteria*: 523 - 526.
- Bogatzevska, N., Sotirova, V., Deneva, S. (1995): Naturally epiphytic survival of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* on symptomless tomato and weed. *TGC Report*, 45: 17-18.
- Bogatzevska, N., Deneva, S. (1996): Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *glycines*, *phaseoli*, *vesicatoria* in the seeds of weeds. 9th International conference Plant pathogenic bacteria, India: 72.
- Boch, J., Bonas, U. (2010): *Xanthomonas* AvrBs3 Family - Type III Effectors: Discovery and Function. *Annual Review of Phytopathology*, 48: 419 - 36.
- Bonas, U., Stall, R. E., Staskawicz, B. (1989): Genetic and structural characterization of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Molecular and General Genetics*, 218: 127 - 136.
- Bonas, U., Schulte, R., Fenselau, S., Minsavage, G. V., Staskawicz, B. J. (1991): Isolation of a gene cluster from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that determines pathogenicity and the hypersensitive response on pepper and tomato. *Molecular Plant-Microbe Interacion*, 4: 81 - 88.
- Bonas, U. (1994): *hrp* genes of phytopathogenic bacteria. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 192: 79 - 98.
- Bonas, U., Van den Ackerveken, G. (1997): Recognition of bacterial avirulence proteins occurs inside the plant cell: A general phenomenon in resistance to bacterial diseases. *The Plant Journal*, 12: 1 - 7.

- Bonas, U., Lahaye, T. (2002): Plant disease resistance triggered by pathogen-derived molecules: Refined models of specific recognition. *Current Opinion in Microbiology*, 5 (1): 44 - 50.
- Bosland, P. W., Iglesias, J., Gonzalez, M. M. (1994): 'NuMex Centennial' and 'NuMex Twilight' ornamental chiles. *Horticultural Science*, 29: 1090.
- Bouzar, H., Jones, J. B., Minsavage, G. V., Stall, R. E., Scott, J. W. (1994): Proteins unique to phenotypically of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* revealed by silver staining. *Phytopathology*, 84: 39 - 44.
- Bouzar, H., Jones, J. B., Stall, R. E., Hodge, N. C., Minsavage, G. V., Benedict, A. A., Alvarez, A. M. (1994a): Physiological, chemical, serological and pathogenic analysis of a worldwide collection of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* strains. *Phytopathology*, 84 (7): 663 - 671.
- Bouzar, H., Ahmed, N. E., Somodi, G. C., Jones, J. B., Stall, R. E. (1994b): Characterization of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* strains from tomato and pepper grown in Sudan. *Plant Disease*, 78 (12): 1219.
- Bouzar, H., Jones, J. B., Somodi, G. C., Stall, R. E., Daouzli, N., Lambe, R. C., Felix-Gastelum, R., Trinidad-Correa, R. (1996): Diversity of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in tomato and pepper fields of Mexico. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 18 (1): 75 - 77.
- Bradbury, J. F. (1984): Genus II. *Xanthomonas*. Dowson 1939, 187AL, 100-210. In: Krieg NR, Holt JG, ed. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1. Baltimore, USA: Williams & Wilkins.
- Bradbury, J. F. (1986): *Guide to Plant Pathogenic Bacteria*. CAB International Mycological Institute, Kew, England.
- Bull, C. T., De Boer, S. H., Denny, T. P., Firrao, G., Fischer-Le Saux, M., Saddler, G. S., Scortichini, M., Stead, D. E., Takikawa, Y. (2008): Demystifying Nomenclature of Bacterial Plant Pathogens. *Journal of Plant Pathology*, 90: 403 - 417.
- Bull, C. T., De Boer, S. H., Denny, T. P., Firrao, G., Fischer-Le Saux, M., Saddler, G. S., Scortichini, M., Stead, D. E., Takikawa, Y. (2010): Comprehensive list of names of plant pathogenic bacteria, 1980-2007. *Journal of Plant Pathology*, 92: 551 - 592.
- Bull, C. T., De Boer, S. H., Denny, T. P., Firrao, G., Fischer-Le Saux, M., Saddler, G. S., Scortichini, M., Stead, D. E., Takikawa, Y. (2012): List of new names of plant pathogenic bacteria (2008-2010). *Journal of Plant Pathology*, 94 (1): 21 - 27.

- Buonaurio, R., Stravato, V. M., Scortichini, M. (1994): Characterization of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* from *Capsicum annuum* L. in Italy. *Plant Disease*, 78: 296 - 299.
- Buonaurio, R., Servili, M. (1999): Involvement of lipoxygenase, lipoxygenase pathway volatiles, and lipid peroxidation during the hypersensitive reaction of pepper leaves to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 54: 155 - 169.
- Burkholder, W. C., Li, C. C. (1941): Variation in *Phytophthora vesicatoria*. *Phytopathology*, 31: 753 - 755.
- Büttner, D., Bonas, U. (2006): Who comes first? How plant pathogenic bacteria orchestrate type III secretion. *Current Opinion in Microbiology*, 9 (2): 193 - 200.
- Büttner, D., He, Y. S. (2009): Type III Protein Secretion in Plant Pathogenic Bacteria. *Plant Physiology*, 150: 1656 - 1664.
- CABI (2004): Crop Protection Compendium - CD.
- Calzolari, A. (1986): Bacterial diseases of tomatoes: symptoms, epidemiology, diagnosis, control. *Informatore Fitopatologico*, 36: 11 - 17.
- Canteros, B. I., Minsavage, G. V., Bonas, U., Pring, D., Stall, R. E. (1991): A gene from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that determines avirulence in tomato is related to *avrBs3*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 4: 628 - 632.
- Chan, J. W. Y. F., Goodwin, P. H. (1999): The molecular genetics of virulence of *Xanthomonas campestris*. *Biotechnology Advances*, 17: 489 - 508.
- Clark, M. F. (1981): Immunosorbent assays in plant pathology. *Annual Review of Phytopathology*, 19: 83 - 106.
- Clark, M. F., Adams, A. N. (1977): Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology*, 34: 475 - 483.
- Cook, A. A. (1973): Characterization of hypersensitivity in *Capsicum annuum* induced by the tomato strain of *Xanthomonas vesicatoria*. *Phytopathology*, 63: 915 - 918.
- Cook, A. A., Stall, R. E. (1969): Differentiation of pathotypes among isolates of *Xanthomonas vesicatoria*. *Plant Disease*, 55: 617 - 619.
- Cook, A. A., Stall, R. E. (1982): Distribution of races of *Xanthomonas vesicatoria* pathogenic on pepper. *Plant Disease*, 66: 388 - 389.

- Cook, A. A., Guevara, Y. G. (1984): Hypersensitivity in *Capsicum chacoense* to race 1 of the bacterial spot pathogen of pepper. *Plant Disease*, 68: 329 - 330.
- Cruz, M., Fernández, A. I. (1979): Immunofluorescence in the testing of seeds and leaves of plants with bacterial infection. *Ciencias, Sanidad Vegetal*. 17. Havana University, Havana, Cuba.
- Cupples, D. A. (1984): The use of pathovar - indicative bacteriophage leaf and fruit lesions. *Phytopathology*, 74: 891 - 894.
- Cuppels, D. A., Louws, F. J., Ainsworth, T. (2006): Development and evaluations of PCR-based diagnostic assays for the bacterial speck and bacterial spot pathogens of tomato. *Plant Disease*, 90: 451 - 458.
- Dane, F., Marten, M. H. (1994): Growth of bioluminescent *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in tomato cultivars. *Horticultural Science*, 29: 1037 - 1038.
- Daniel, J. F., Boher, B. (1981): Fluorescent antibody technique for detection of *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* on cassava leaves. *Proceedings of the International Conference on Plant Pathogenic Bacteria 5th*. In J. C. Lozano (Ed.), Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia: 176 - 180.
- De Cleene, M. (1989): Scanning electron microscopy of the establishment of compatible and incompatible *Xanthomonas campestris* pathovars on the leaf surface of Italian ryegrass and maize. *EPPO Bulletin*, 19: 81 - 88.
- Diab, S., Bashan, Y., Okon, Y., Henis, Y. (1982): Effects of relative humidity on bacterial scab caused by *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* on pepper. *Phytopathology*, 72: 1257 - 1260.
- Diab, S., Bashan, Y., Okon, Y. (1982a): Studies on infection with *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, causal agent of bacterial scab of pepper in Israel. *Phytoparasitica*, 10: 183 - 191.
- Domen, H. Y., Alvarez, A. M. (1978): Detection of *Xanthomonas campestris* in soil using a direct immunofluorescent technique. *Proc. 4th Int. Conf. Plant Pathogenic bacteria*, 1: 301 - 305.
- Dye, D. W., Starr, M. P., Stolp, H. (1964): Taxonomic clarification of *Xanthomonas vesicatoria* based upon host specificity, bacteriophage sensitivity and cultural characteristics. *Phytopathology*, 51: 394 - 407.
- Đinović, I. (2005): Paprika je tropska biljka. *Poljoprivredni list*, V/55: 22.
- Đorđević, M., Zečević, B., Cvikić, D., Đorđević, R., Šević M. (2008): Vestal PVP-179 novi

preparat za suzbijanje prouzrokovala bakteriozne pegavosti paprike *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. IX Savetovanje o zaštiti bilja, Društvo za zaštitu bilja Srbije, Zlatibor. Zbornik rezimea: 86.

Dorđević M., Mijatović, M., Šević, M., Obradović, A., Ivanović, M. (2011): Biological control of tomato pathogens with *Bacillus subtilis* in vitro. The 5th Balkan Symposium on Vegetables and Potatoes. 9 - 12 October, Tirana, Albania, Book of Abstracts: 47.

Erskin, J. M. (1973): Characteristics of *Erwinia amylovora* bacteriophage and its possible role in the epidemiology of fire blight. Canadian Journal of Microbiology, 19: 837 - 845.

Ellingboe, A. H. (1984): Genetics of host - parasite relations: An essay: 131 - 151 in: Advances in Plant Pathology, Vol. 2, D. D. Ingram and P. H. Williams, eds. Academic Press, New York.

Fahy, P. C., Persley, G. J. (1983): Plant Bacterial Diseases. A Diagnostic Guide. Academic Press, Australia.

Flaherty, J. E., Jones, J. B., Harbaugh, B. K., Somodi, G. C., Jackson, L. E. (2000): Control of bacterial spot on tomato in the greenhouse and field with h - mutant bacteriophages. Horticultural Science, 35: 882 - 884.

Flaherty, J. E., Harbaugh, B. K., Jones, J. B., Somodi, G. C., Jackson, L. E. (2001): H-mutant bacteriophages as a potential biocontrol of bacterial blight of geranium. Hort Science, 36: 98 - 100.

Garcion, C., Lamotte, O., Métraux, J. P. (2007): Mechanisms of Defence to Pathogens: Biochemistry and Physiology, in Induced Resistance for Plant Defence: A Sustainable Approach to Crop Protection (eds D. Walters, A. Newton and G. Lyon), Blackwell Publishing, Oxford, UK.

Gardner, M. W., Kendrick, J. B. (1923): Bacterial spot of tomato and pepper. Phytopathology, 13: 307 - 315.

Garton, J. E. Jr. (2009): Evaluation of race and copper tolerant strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*, causal agent of bacterial leaf spot of bell pepper in Georgia. Master of science.

Gassmann, W., Dahlbeck, D., Chesnokova, O., Minsavage, G. V., Jones, J. B., Staskawicz, B. J. (2000): Molecular evolution of virulence in natural field strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Journal of Bacteriology, 182: 7053 - 7059.

Gašić, K., Ivanović, M., Obradović, A. (2007): Proučavanje specifičnosti bakteriofaga prema *Xanthomonas* sp. patogena paprike i paradajza. XIII simpozijum sa savetovanjem o zaštiti bilja, Zlatibor, Zbornik rezimea: 121 - 122.

- Gašić, K., Ivanović, M. M., Ignjatov, M., Čalić, A., Obradović, A. (2011): Isolation and characterization of *Xanthomonas euvesicatoria* bacteriophages. *Journal of Plant Pathology*, 93 (2): 415 - 423.
- Gašić, K., Obradović, A. (2012): Indukovana otpornost biljaka. *Ratarstvo i povrtarstvo*, 49 (3): 326 - 334.
- Gill, J. J., Svirčev, A. M., Smith, R., Castle, A. J. (2003): Bacteriophages of *Erwinia amylovora*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 2133 - 2138.
- Gitaitis, R., McCarter, S., Jones, J. (1992): Disease control in tomato transplants produced in Georgia and Florida. *Plant Disease*, 76 (7): 651 - 656.
- Goode, M. J., Sasser, M. (1980): Prevention-The key to controlling bacterial spot and bacterial speck of tomato. *Plant diseases*, 64: 831 - 834.
- Goszczyńska, T., Serfontein, J. (1998): Milk-Tween agar, a semiselective medium for isolation and differentiation of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. *Journal of Microbiological Methods*, 32: 65 - 72.
- Gough, C. L., Genin, S., Zischek, C., Boucher, C. A. (1992): *hrp* genes of *Pseudomonas solanacearum* are homologous to pathogenicity determinants of animal pathogenic bacteria and are conserved among plant pathogenic bacteria. *Molecular plant Microbe Interaction*, 5: 384 - 389.
- Grahovac, M., Indić, D., Lazić, S., Vuković, S. (2009): Biofungicidi i mogućnosti primene u savremenoj poljoprivredi. *Pesticidi i fitomedicina*, 24 (4): 245 - 258.
- Griesbach, E., Lattauschke, G., Schmidt, A., Naumann, K., (1988): On the occurrence of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* on pepper under glass and plastic covers. *Nachrichtenblatt für den Pflanzenschutz*, 42 (9): 176 - 178.
- Gvozdenović, Đ., Takač, A., Bugarski, D., Jovičević, D. (2005): Mogućnost dugotrajnog čuvanja semena paprike. *Selekcija i semenarstvo*, 2 (2): 209 - 211.
- Gvozdenović, Đ., Bugarski, D., Gvozdanović-Varga, J., Vasić, M., Červenski, J., Takač, A., Jovičević, D. (2008): Doprinosi unapređenju povrtarske proizvodnje za 70 godina rada instituta za ratarstvo i povrtarstvo. *Zbornik radova*, 45 (1): 113 - 129.
- Gvozdenović, Đ., Cvejić, S. (2009): Oplemenjivanje paprike. *Institut za ratarstvo i povrtarstvo*, Novi Sad.
- Gvozdenović, Đ. (2010): *Paprika*. *Institut za ratarstvo i povrtarstvo*. Novi Sad.

- Han, S. W., Park, C. J., Lee, S. W., Ronald, P. C. (2008): An efficient method for visualization and growth of fluorescent *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in planta. *BMC Microbiology*, 8: 164.
- He, S. Y., Nomura, K., Whittam, T. S. (2004): Type III protein secretion mechanism in mammalian and plant pathogens. *Biochimica Biophysica Acta*, 1694: 181 - 206.
- Hibberd, A. M., Basset, M. J., Stall, R. E. (1987): Allelism tests of three dominant genes for hypersensitive resistance to bacterial spot of pepper. *Phytopathology*, 77: 1304 - 1307.
- Holland, I. B., Schnitt, L., Young, J. (2005): Type I protein secretion in bacteria, the ABC transporter dependent pathway. *Molecular Membrane Biology*, 22: 29-39.
- Huguet, E., Hahn, K., Wengelnik, K., Bonas, U. (1998): *hpaA* mutants of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* are affected in pathogenicity but retain the ability to induce host-specific hypersensitive reaction. *Molecular Microbiology*, 29: 1379 - 1390.
- Ignatov, A. N., Kornev, K. P., Mateeva, E. V., Pekhtereva, E. S., Polityko, V. A., Budenkov, N. I., Schaad, N. W. (2009): Occurrence of bacterial spot and bacterial canker of tomato in the Russian Federation. *Acta Horticulturae*, 808: 247 - 250.
- Ivanović, M., Mijatović, M., Obradović, A. (1998): Suzbijanje prouzrokovala bolesti, štetočina i korova u lejama za proizvodnju rasada paradajza i paprike. *Poljoprivredne aktuelnosti*, 1 - 2: 59 - 63.
- Iriarte, F. B., Balogh, B., Momol, M. T., Smith, L. M., Wilson, M., Jones, J. B. (2007): Factors Affecting Survival of Bacteriophage on Tomato Leaf Surfaces. *Applied and environmental Microbiology*, 73 (6): 1704 - 1711.
- Jones, J. B., Jones, J. P. (1985): The effect of bactericides, tank mixing time and spray schedule on bacterial leaf spot of tomato. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, 98: 244 - 247.
- Jones, J. B., Pohronezny, K. L., Stall, R. E., Jones, J. P. (1986): Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in Florida on tomato crop residue, weeds, seeds, and volunteer tomato plants. *Phytopathology*, 76 (4): 430 - 434.
- Jones, J. B., Woltz, S. S., Jones, J. P., Portier, K. L. (1991): Population dynamics of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* on tomato leaflets treated with copper bactericides. *Phytopathology*, 81 (7): 714 - 719.
- Jones, J. B., Jones, J. P., Woltz, S. S. (1993): The effect of selected copper bactericides on population dynamics of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* on tomato leaflets. *Pro. of the Fl. St. Hort. Soc.* 106: 160 - 163.

- Jones, J. B., Minsavage, G. V., Stall, R. E., Kelly, R. O., Bouzar, H. (1993a): Genetic analysis of a DNA region involved in expression of two epitops associated with lipopolysaccharide in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Phytopathology*, 83: 551 - 556.
- Jones, J. B., Stall, R. E., Minsavage, G. V., Scott, J. W., Bouzar, H. (1994): Distribution of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* races in the Caribbean and Central America. *Phytopathology*, 84: 1476.
- Jones, J. B., Stall, R. E., Scott, J. W., Somodi, G. C., Bouzar, H., Hodge, N. C. (1995): A third tomato race of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Plant Disease*, 79 (4): 395 - 398.
- Jones, J. B., Bouzar, H., Somodi, G. C., Stall, R. E., Pernezny, K. (1998): Evidence for the preemitive nature of tomato race 3 of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in Florida. *Phytopathology*, 88: 33 - 38.
- Jones, J. B., Stall, R. E. (1998): Diversity among xanthomonads pathogenic on pepper and tomato. *Annual Review Phytopathology*, 36: 41 - 58.
- Jones, J. B., Bouzar, H., Stall, R. E., Almira, E. C., Roberts, P., Bowen, B. W. (2000): Sytematic analysis of *Xanthomonads* (*Xanthomonas* spp.) associated with pepper and tomato lesions. *International Journal od Systematic Bacteriology*, 50: 1211 - 1219.
- Jones, J. B., Stall, R. E., Minsavage, G. V., Roberts, P. D., Kousik, C. S., Subramanya, S. R., Johnson, R. R. (2002): A Non-Hypersensitive resistance in *Capsicum annuum* to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* races associated with field resistance to all known pepper races. XII simpozijum o zaštiti bilja i savetovanje o primeni pesticida, Zlatibor. Knjiga abstrakata: 22 - 23.
- Jones, J. B., Lacy, G. H., Bouzar, H., Stall, R. E., Schaad, N. W. (2004): Reclassification of the *Xanthomonads* associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. *Systematic and Applied Microbiology*, 27: 755 - 762.
- Jones, J. B., Iriarte, F. B., Obradović, A., Balogh, B., Momol, M. T., Jackson, L. E. (2006): Management of bacterial spot on tomatoes with bacteriophages. *Proceedings of the 1st International Symposium on Biological control of Bacterial Plant Diseases*. Dermstadt, Germany, 23 - 26 October. *Mitt. Biol. Bundesanst. Land-Forstwirtschaft*, 408: 154 - 157.
- Kelman, A. (1954): The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. *Phytopathology*, 44: 693 - 695.
- Klement, Z. (1963): Rapid detection of the pathogenecity of phytopathogenic pseudomonads. *Nature*, 199: 299 - 300.

- Klement, Z., Rudolph, K., Sands, D. C. (1990): *Methods in Phytobacteriology*. Akademiai Kiado. Budapest.
- Koenraadt, H., van Betteray, B., Germain, R., Hiddink, G., Jones, J. B., Oosterhof, J. (2009): Development of specific primers for the molecular detection of bacterial spot of pepper and tomato. *Acta Horticulturae (ISHS)*, 808: 99 - 102.
- Kornev, K. P., Matveeva, E. V., Pekhtereva, E. S. H., Polityko, V. A., Ignatov, A. N., Punina, N. V., Schaad, N. W. (2009): *Xanthomonas* species causing bacterial spot of tomato in the russian federation. *Acta Horticulturae (ISHS)*, 808: 243 - 246.
- Kousik, C. S., Ritchie, D. F. (1995): Isolation of pepper races 4 and 5 of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* from diseased peppers in southeastern U. S. fields. *Plant Disease*, 79 (5): 540.
- Kousik, C. S., Ritchie, D. F. (1996): Disease potential of pepper bacterial spot pathogen races that overcome the *Bs2* gene for resistance. *Plant disease*, 79 (5): 540.
- Kousik, C. S. Ritchie, D. F. (1996a): Race shift in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* within a season in field grown pepper. *Phytopatology*, 86: 952 - 958.
- Kousik, C. S., Ritchie, D. F. (1998): Response of bell pepper cultivars to bacterial spot pathogen races that individually overcome major resistance genes. *Plant Disease*, 82: 181 - 186.
- Kousik, C. S., Ritchie, D. F. (1999): Development of bacterial spot on near-isogenic lines of bell pepper carrying gene pyramids composed of defeated major resistance genes. *Phytopatology*, 89: 1066 - 1072.
- Kovacs, N. (1956): Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. *Nature*, 178: 703.
- Kritzman, G. (1989): Tomato seed assay for seedborne pathogenic bacteria. *Hassadeh*, 69 (4): 614 - 617.
- Krstić, B., Tošić, M. (1994): Biljni virusi, neke osobine i dijagnoza. Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet.
- Krstić, B., Bulajić, A., Đekić, I., Berenji, J. (2008): Virus bronzavosti paradajza - jedan od najdestruktivnijih biljnih virusa. *Pesticidi i fitomedicina*, 23: 153 - 166.
- Kurowski, C., Conn, K., Himmel, P. (2010): Guideline for identification of pepper bacterial leaf spot races using differential hosts. APS - ISF (www.worldseed.org) .

- Laub, C. A., Stall, R. E. (1967): An evaluation of *Solanum nigrum* and *Physalis minima* as susceptors of *Xanthomonas vesicatoria*. *Plant Disease*, 51: 659 - 661.
- Lazarovits, G., Zutra, D., Bar-Joseph, M. (1987): Enzyme-linked immunosorbent assay on nitrocellulose membranes (dot-ELISA) in the serodiagnosis of plant pathogenic bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 33: 98 - 103.
- Leandro, J. R., Volin, B. R. (1987): Role of stomata opening and frequency of infection of *Lycopersicon* spp. by *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Phytopathology*, 77 (9): 1311 - 1317.
- Leben, C., Slesman, J. P. (1981): Bacterial pathogens: Reducing Seed and In Vitro Survival by Physical Treatments. *Plant Disease*, 65: 876 - 878.
- Leite, R. P. Jr, Minsavage, G. V., Bonas, U., Stall, R. E. (1994): Detection and identification of phytopathogenic *Xanthomonas* strains by amplification of DNA sequences related to the *hrp* genes of *X. c.* pv. *vesicatoria*. *Applied Environmental Microbiology*, 60: 1068 - 1077.
- Leite, R. P. Jr, Jones, J. B., Somodi, G. C., Minsavage, G. V., Stall, R. E. (1995): Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* associated with pepper and tomato seed by DNA amplification. *Plant Disease*, 79 (9): 917 - 922.
- Lelliott, R. A., Stead, D. E. (1987): *Methods for the Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants*. British Society for Plant Pathology Blackwell Scientific Publications. London, UK.
- Lemattre, M., Narcy, J. P., Berthier, Y., Philippot, P., Jacquet, C., Clauzel, J. M. (1992): Development of serological tools for the detection of *Xanthomonas* species. *Plant Pathogenic Bacteria*, 66: 287 - 291.
- Lindgren, P. B., Peet, R. C., Panopoulos, N. J. (1986): Gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* controls pathogenicity of bean plants and hypersensitivity on nonhost plants. *Journal of Bacteriology*, 168: 512 - 522.
- Lopes, C. A., Quezado-Duval, A. M. (2001): Reaction of capsicum genotypes to bacterial wilt and bacterial spot. *Proceedings of the 10th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria*, Charlottetown, Prince Edward Island, Canada: 306 - 308.
- Lorenz, C., Büttner, D. (2009): Functional characterization of the type III secretion ATPase HrcN from the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Journal of Bacteriology*, 191: 1414 - 1428.
- Louws, F. J., Fulbright, D. W., Stephens, C. T., de Bruijn, F. J. (1995): Differentiation of genomic structure by rep - PCR fingerprinting to rapidly classify *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Phytopathology*, 85: 528 - 536.

- Louws, F. J., Cuppels, D. A. (2001): Appendix A: molecular techniques. In: Schaad, N. W., Jones, J. B., Chun, W. (eds) Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria, 3rd edition. APS Press: 321 - 331.
- Louws, F. J., Wilson, M., Campbell, H. L., Cuppels, D. A., Jones, J. B., Shoemaker, P. B., Sahin, F., Miller, S. A. (2001): Field control of bacterial spot and bacterial speck of tomato using a plant activator. *Plant Disease*, 85: 481 - 488.
- Machado, J. C., Langerak, C. J., Jacoud-Filho, D. S. (2002): Seed - borne fungi: A Contribution to Routine Seed Health Analysis. ISTA, Switzerland.
- Mathur, S. B., Kongsdal, O. (2003): Common Laboratory Seed Health Testing Methods for Detecting Fungi. ISTA, Switzerland.
- Marković, V. (2004): Stanje i perspektive povrtarske proizvodnje u Vojvodini. Agrarna saznanja, Novi Sad.
- Marco, G. M., Stall, R. E. (1983): Control of bacterial spot of pepper initiated by strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that differ in sensitivity to copper. *Plant disease*, 67 (7): 779 - 781.
- Marlovits, T. C., Kubori, T., Sukhan, A., Thomas, D. R., Gala'n, J. E., Unger, V. M. (2004): Structural insights into the assembly of the type III secretion needle complex. *Science*, 306: 1040 - 1042.
- Marlovits, T. C., Kubori, T., Lara-Tejero, M., Thomas, D., Unger, V. M., Gala'n, J. E. (2006): Assembly of the inner rod determines needle length in the type III secretion injectisome. *Nature*, 441: 637 - 640.
- McGuire, R. G., Jones, J. B., Sasser, M. (1986): Tween media for semiselective isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* from soil and plant material. *Plant Disease*, 70 (9): 887 - 891.
- McGuire, R. G., Jones, J. B. (1991): Epiphytic populations of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* on tomato cultigens resistant and susceptible to bacterial spot. *Plant Disease*, 75: 606 - 609.
- McLaughlin, R. J., Chen, T. A. (1990): ELISA Methods for Plant Pathogenic Prokaryotes. In: Serological Methods for Detection and Identification of Viral and Bacterial Plant Pathogens a Laboratory Manual, Hampton, R., E. Ball and S.D. Boer (Eds.). APS Press, St. Paul Minnesota: 197 - 204.
- McInnes, T. B., Gitaitis, R. D., McCarter, S. M., Jaworski, C. A., Phatak, S. C. (1988): Airborne dispersal of bacteria in tomato and pepper transplant fields. *Plant Disease*, 72 (7): 575 - 579.

- McManus, P. S., Jones, A. L. (1995): Detection of *Erwinia amylovora* by nested PCR and PCR dot-blot and reverse blot hybridizations. *Plant Disease*, 85: 618 - 623.
- Mijatović M., Zečević B., Cvikić D., Obradović A. (2004): Diseases of pepper in Serbia and results of breeding for resistance. XII Meeting on Genetics and Breeding of Capsicum and Eggplant, Noordwijk, Netherlands. Book of abstracts: 187.
- Mijatović, M., Obradović, A., Ivanović, M. (2007): Zaštita povrća. AgroMivas, Smederevska Palanka.
- Milenković, S., Petanović, R., Jevremović, D., Milijašević, S., Tanasković, S. (2006): Aktuelana istraživanja u oblasti zaštite voćaka. *Voćarstvo*, 156 (40): 367 - 378.
- Minsavage, G. V., Dahlbeck, D., Whalen, M. C., Kearney, B., Bonas, U., Staskawicz, B. J., Stall, R. E. (1990): Gene-for-gene relationships specifying disease resistance in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* - pepper interactions. *Molecular Plant Microbe Interaction*, 3: 41 - 47.
- Mirik, M., Aysan, Y., Cinar, O. (2005): Prevalence and incidence of bacterial spot disease caused by *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* on pepper in the eastern mediterranean region of Turkey. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 8 (12): 1656 - 1658.
- Mirik, M., Aysan, Y., Cinar, O. (2007): Copper-resistance strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (Doidge) Dye in the eastern mediterranean region of Turkey. *Journal of Plant Pathology*, 89 (1): 153 - 154.
- Mirik, M., Aysan, Y., Cinar, O. (2008): Biological control of bacterial spot disease of pepper with *Bacillus* strains. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 32 (5): 381 - 390.
- Mirik, M., Aysan, Y. (2009): Detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* in naturally infected pepper seeds in Turkey. *Journal of Plant Pathology*, 91 (2): 433 - 436.
- Mitrev, S., Kovačević, B. (2006): Characterization of *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* isolated from peppers in Macedonia. *Journal of Plant Pathology*, 88 (3): 321 - 324.
- Momol, M. T., Jones, J. B., Otson, S., Obradović, A., Balogh, B., King, P. (2002): Integrated management of bacterial Spot on Tomato in Florida. Fact Sheet PP110, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida (<http://edis.ifas.ufl.edu>).
- Moretti., C., Amatulli, M. T., Buonauro, R. (2009): PCR-based assay for the detection of *Xanthomonas euvesicatoria* causing pepper and tomato bacterial spot. *Applied Microbiology*, 49: 466 - 471.

- Mullis, K., Faloona, S., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H. (1986): Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harbor Symposium. Quantitative Biology, 51: 263 - 273.
- Noël, L., Thieme, F., Nennstiel, D., Bonas, U. (2001): cDNA-AFLP analysis unravels a genome-wide *hrpG*-regulon in the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Molecular Microbiology, 41: 1271 - 1281.
- Obradović, A., Arsenijević, M., Marinković, N., Mijatović M. (1994): Bakteriozna pegavost rasada paprike. Treći jugoslovenski kongres o zaštiti bilja, Vrnjačka Banja. Zbornik rezimea: 65.
- Obradović, A., Arsenijević, M., Marinković, N., Mijatović, M. (1995): Bakteriozna pegavost rasada paprike. Zaštita bilja, 213: 215 - 220.
- Obradović, A., Arsenijević, M., Mijatović, M. (1997): Bakterioze paprike. Treće jugoslovensko savetovanje o zaštiti bilja, Zlatibor. Zbornik rezimea: 33 - 34.
- Obradović, A., Mavridis, A., Rudolph, K., Arsenijević, M. (1999): Characterization of pathogenic bacteria isolated from pepper in Yugoslavia. Phytomedizin, Mitteilungen aus der Deutschen Phytomedizinischen Gesellschaft, 29: 40 - 41.
- Obradović A., Arsenijević M., Mijatović M. (1999a): Određivanje rasa bakterije *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* patogena paprike u Jugoslaviji. Četvrto jugoslovensko savetovanje o zaštiti bilja, Zlatibor. Zbornik rezimea: 86.
- Obradović, A., Arsenijević, M., Mavridis, A., Rudolph, K. (2000): Patogene i biohemijsko fiziološke karakteristike sojeva *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* patogena paprike u Srbiji. Zaštita bilja, 51 (1 - 2): 157 - 175.
- Obradović, A., Mavridis, A., Rudolph, K., Arsenijević, M. (2000a): Bacterial spot of capsicum and tomato in Yugoslavia. OEPP/EPPO, Bulletin, 30: 333 - 336.
- Obradović, A., Arsenijević, M., Mijatović, M., Ivanović, M. (2000b): Sve učestalija pojava *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* parazita paradajza u Srbiji. 11. jugoslovenski simpozijum o zaštiti bilja, Zlatibor. Zbornik rezimea: 51.
- Obradović, A., Mavridis, A., Rudolph, K., Arsenijević, M., Mijatović, M. (2001): Bacterial diseases of pepper in Yugoslavia. In: De Boer SH (ed) Plant Pathogenic Bacteria: 255-258. Kluwer Academic Publishers, the Netherlands.
- Obradović, A., Mavridis, A., Rudolph, K., Zdravković, J. (2001a): Sudden appearance of the tomato race of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in Yugoslavia. In: De Boer SH (ed) Plant Pathogenic Bacteria (pp 350 - 352). Kluwer Academic Publishers, the Netherlands.

- Obradović, A., Jones, J. B., Momol, T., Olson, S., Pradhanang, P., Balogh, B. (2001b): Interaction of PGPR, bacteriophages, bacterial antagonists, and SAR inducers in control of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* on tomato in the greenhouse. 17th Annual Tomato Disease Workshop, West Palm Beach, Florida. Proceedings book: 77 - 79.
- Obradović, A., Jones, J. B., Momol, M. T., Olson, S. M., King, p. C., Balogh, B. (2002): Mogućnosti primene nekih bioloških agenasa i aktivatora otpornosti biljaka u integralnoj zaštiti paradajza od bakterijske pegavosti. XII simpozijum o zaštiti bilja i savetovanje o primeni pesticida, Zlatibor. Knjiga abstrakata: 40 - 41.
- Obradović, A., Jones, J. B., Momol, M., T., Olson, S. M., Pradhanang, P., Balogh, B. (2002a): Efficacy of biocontrol agents and resistance inducers against tomato bacterial spot in the greenhouse. Annual Meeting of the American Phytopathological Society, Milwaukee, WI, USA. *Phytopathology*, 92: S 60.
- Obradović, A., Mavridis, A., Rudolph, K., Janse, J. D., Arsenijević, M., Jones, J. B., Minsavage, G. V., Wang, J. F. (2004): Characterization and PCR-based typing of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* from peppers and tomatoes in Serbia. *European Journal of Plant Pathology*, 110: 285 - 292.
- Obradović, A., Jones, J. B., Momol, M. T., Balogh, B., Olson, S. M. (2004a): Management of Tomato Bacterial Spot in the Field by Foliar Applications of Bacteriophages and SAR Inducers. *Plant Disease*, 88: 736 - 740.
- Obradović, A., Jones, J. B., Momol, M. T., Balogh, B., Olson, S. M. (2004b): Bakteriofagi i aktivatori sistemne otpornosti - nova strategija u zaštiti paradajza od bakterijske pegavosti. V kongres o zaštiti bilja Zlatibor. Knjiga abstrakata: 178 - 179.
- Obradović, A., Jones, J. B., Momol, M. T., Olson, S. M., Jackson, L. E., Balogh, B., Guven, K., Iriarte, F. B. (2005): Integration of biological control agents and systemic acquired resistance inducers against bacterial spot on tomato. *Plant Disease*, 89: 712 - 716.
- Obradović, A., Gašić, K., Ivanović, M. (2006): Izolacija bakteriofaga specifičnih prema sojevima *Xanthomonas euvesicatoria* patogenu paprike u Srbiji. VIII savetovanje o zaštiti bilja, Zlatibor. Zbornik rezimea: 74.
- Obradović, A., Ivanović, M. (2007): O primeni antibiotika u zaštiti bilja. *Biljni lekar*, 1: 52 - 59.
- Obradović, A., Gašić, K., Stepanović, M. (2008): Bakteriofagi u zaštiti bilja. *Biljni lekar*, 36 (1): 36 - 44.
- Obradović, A., Jones, J. B., Balogh, B., Momol, M. T. (2008a): Integrated management of tomato bacterial spot in: Ciancio, A i Mukerji K. G. (eds.), *Integrated Management of*

Diseases Caused by Fungi, Phytoplasma and Bacteria: 211 - 223. Springer Science+Business Media B. V. USA.

Obradović, A. (2009): Bakteriofagi kao baktericidi u zaštiti bilja. Pesticidi i fitomedicina, 24: 9 - 17.

Obradović, A. (2009a): Najznačajnije bakterioze biljaka gajenih u zaštićenom prostoru. Biljni lekar, 5: 513 - 527.

Obradović, A. (2009b): Bakterioze paprike u Srbiji. X Savetovanje: Savremena proizvodnja povrća, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad. Savremeni povrtnar - Zbornik radova: 32 - 35.

O' Garro, L. W., Tudor, S. (1994): Contribution of four races of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* to bacterial spot in Barbados. Plant disease, 78: 88 - 90.

O' Garro, L. W., Charlemagne, E. (1994): Comparison of bacterial growth and activity of glucanase and chitinase in pepper leaf and flower tissue infected with *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Physiological and Molecular Plant Pathology, 45 (3):181 - 188.

O' Garro, L. W. (1998): Bacterial Spot of tomato and pepper on four east caribbean islands: races, their abundance, distribution, aggressiveness, and prospects for control. Plant Disease, 82: 864 - 870.

O' Garro, L. W., Gore, J. P., Ferguson, E. (1999): Races of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* overcoming the gene *Bs2* for bacterial spot resistance in pepper, prevalent on *Capsicum chinense* in Barbados and Grenada and weakly pathogenic on bell pepper and tomato in the field. Plant Pathology, 48 (5): 588.

Okabe, N., Goto, M. (1963): Bacteriophages of plant pathogens. Annual Review of Phytopathology, 1: 397 - 418.

OEPP/EPPO (1992): Quarantine procedures. *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* – seed - testing method. EPPO/EPPO Bulletin, 22: 247 - 252.

Pernezny, K., Kudela, V., Kokosková, B., Hládká, I. (1995): Bacterial diseases of tomato in the Czech and Slovak Republics and lack of streptomycin resistance among copper - tolerant bacterial strains. Crop Protection, 14 (4): 267 - 270.

Pernezny, K., Collins, J. (1997): Epiphytic populations of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* on pepper: Relationships to host-plant resistance and exposure to copper sprays. Plant disease, 81: 791 - 794.

Pernezny, K., Nagata, R., Havranek, N., Sanchez, J. (2008): Comparison of two culture media for determination of the copper resistance of *Xanthomonas* strains and their

usefulness for the prediction of control with copper bactericides. *Crop Protection*, 27: 256 - 262.

Peterson, G. H. (1963): Survival of *Xanthomonas vesicatoria* in soil and diseased tomato plants. *Phytopathology*, 53: 765 - 767.

Pohronezny, K. L., Volin, R. B. (1983): The effect of bacterial spot on yield and quality of fresh market tomatoes. *Horticultural Science*, 18: 69 - 70.

Pohronezny, K., Stall, R. E., Canteros, B. I., Kegley, M., Datnoff, L. E., Subramanya, R. (1992): Sudden shift in the prevalent race of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in pepper fields in southern Florida. *Plant Disease*, 76 (2): 118 - 120.

Poplawsky, A. R., Urban, S. C., Chun, W. (2000): Biological role of xanthomonadin pigments in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Applied Environmental Microbiology*, 66 (12): 5123 - 5127.

Pugsley, A. P. (1993): The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. *Microbiological Reviews*, 57: 50 - 108.

Ravnikar, M., Demsar, T., Dreo, T. (2001): Laboratory diagnosis of bacterial spot on tomato and pepper. Zbornik predavanja in referatov 5. Slovensko Posvetovanje o Varstvu Rastlin, Catez ob Savi, Slovenija, 6 - 8. marec: 195 - 196.

Ravikumar, M. R., Khan, A. (2002): Detection of *Xanthomonas vesicatoria* in tomato seeds by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). *Indian Journal of Agricultural Research*, 36 (1): 39 - 43.

Ritchie, D. F., Dittapongpitch, V. (1991): Copper and streptomycin resistant strains and host differential races of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in North Carolina. *Plant disease*, 75: 733 -736.

Ritchie, D. F., Kousik, C. S., Paxton, T. C. (1998): Response of bacterial spot pathogen strains to four major resistance genes in pepper. *Proceeding National Pepper Conference*, San Antonio: 14.

Romero, A. M., Kousik, C. S., Ritchie, D. F. (1996): Characteristics of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* race 3 strains isolated from pepper. *Phytopathology*, 86: 78.

Romero, A. M., Kousik, C. S., Ritchie, D. F. (2001): Resistance to bacterial spot in bell pepper induced by acibenzolar-S-methyl. *Plant Disease*, 85: 189 - 194.

Rowell, B., Jones, R. T., Nesmith, W., Snyder, J. C. (1998): In: *Proc. Natl. Pepper Conf.*, San Antonio, 13-15 Oct: Bacterial spot resistance, yield, and quality of bell pepper cultivars in epidemic and disease-free environments: 39 - 40.

- Rowell, B., Terry-Jones, R., Nesmith, W., Satanek, A., Snyder, J. C. (2001): Bacterial spot resistance, yield and quality of bell and speciality peppers. *Hort Technologie*, 11 (4): 648 - 657.
- Rudolph, K. (1993): Infection of the plant by *Xanthomonas*. In Swings, J. G. & Civerolo, E. L. (Eds.), *Xanthomonas*. London: Chapman & Hall.
- Sahin, F. (2001): Pepper races 7, 8 and 10 of *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* isolated from diseased pepper plants in Turkey. *Plant Pathology*, 50: 809.
- Sahin, F., Miller, S. A. (1995): First report of pepper race 6 of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, causal agent of bacterial spot of pepper. *Plant Disease*, 79 (11): 1188.
- Sahin, F., Miller, S. A. (1996): Characterization of Ohio Strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, Causal Agent of Bacterial Spot of Pepper. *Plant Disease*, 80 (7): 773 - 778.
- Sahin, F., Miller, S. A. (1998): Resistance in *Capsicum pubescens* to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* Pepper Race 6. *Plant Disease*, 82: 794 - 799.
- Sands, D. C. (1990): Physiological criteria - determinative tests. In: *Methods in Phytobacteriology*. Eds. Klement, Z., Rudolph, K., Sands, D.C. Akademiai Kiado, Budapest, Hungary: 133 - 143.
- Schaad, N. W., Stall, R. E. (1988): *Xanthomonas*. In: Schaad N.W., ed. *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*, 2nd ed. St. Paul, USA: APS Press: 81 - 94.
- Schaad, N. W. (1980): Gram-negative bacteria: *Xanthomonas*. In: Schaad, N. W., Jones, J. B., Chun, W. eds. *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. St Paul, MN, USA: 175 - 200.
- Schaad, N. W. (1989): Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in crucifers. In: Saettler, A. W., Schaad, N. W., Roth, D. A. eds. *Detection of Bacteria in Seed and Other Planting Material*. St Paul, MN, USA: APS Press: 68 - 75.
- Schaad, N., Jones, J. B., Chun, W. (2001): *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA.
- Schaad, N. W., Dianese, J. C. (1981): Cruciferous weeds as source of inoculum of *Xanthomonas campestris* to black rot of crucifers. *Plant disease*, 64: 91 - 92.
- Sherf, A. F., MacNab, A. A. (1986): *Vegetable diseases and their control*. Vegetable diseases and their control., Ed. 2: 728.

- Sijam, K., Chang, C. J., Gitaitis, R. D. (1991): An agar medium for the isolation and identification of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* from seed. *Phytopathology*, 81 (8): 831 - 834.
- Slusarenko, A. J. (1996): The role of lipoxygenase in plant resistance to infection. In: Piazza, G. J., ed. *Lipoxygenase and lipoxygenase pathway enzymes*. Champaign: AOCS Press: 176 - 197.
- So, J. S., Lim, H. T., Oh, E. T., Heo, T. R., Koh, S. C., Leung, K. T. (2002): Visualizing the infection process of *Xanthomonas campestris* in cabbage using green fluorescent protein. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18: 17 - 21.
- Somoš, A. (1984): *A paprika*, Akademia Kiado Budapest.
- Soto, G. E., Hultgren, S. J. (1999): Bacterial adhesins: common themes and variations in architecture and assembly. *Journal of Bacteriology*, 181: 1059 - 1071.
- Sowell, G., Jr. (1960): Bacterial spot resistance of introduced peppers. *Plant Disease Report*, 44: 587 - 590.
- Sowell, G., Dempsey, A. H. (1977): Additional sources of resistance to bacterial spot of pepper. *Plant Disease*, 61: 684 - 686.
- Stall, R. E., Thayer, P. L. (1962): Streptomycin resistance of the bacterial spot pathogen and control with streptomycin. *Plant Disease*, 45: 389-92
- Stall, R. E., Cook, A. A. (1966): Multiplication of *Xanthomonas vesicatoria* and lesion development in resistant and susceptible pepper. *Phytopathology*, 56: 1152 - 1154.
- Stall, R. E., Loschke, D. C., Jones, J. B. (1986): Linkage of copper resistance and avirulence loci on a self-transmissible plasmid in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Phytopathology*, 76: 240 - 243.
- Stall, R. E., Beaulieu, C., Egel, D., Hodge, N. C., Leite, R. P., Minsavage, G. V., Bouzar, H., Jones, J. B., Alvarez, A. M., Benedict, A. A. (1994): Two genetically diverse groups of strains are included in a pathovar of *Xanthomonas campestris*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44: 47 - 53.
- Stall, R. E., Jones J. B., Minsavage, G. V. (2009): Durability of Resistance in Tomato and Pepper to *Xanthomonads* Causing Bacterial Spot. *Annual Review of Phytopathology*, 47: 265 - 284.
- Swanson, J., Kearney, B., Dahlbeck, D., Staskawicz, B. (1988): Cloned avirulence gene of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* complements spontaneous race-change mutants. *Molecular Plant Microbe Interaction*, 1: 5 - 9.

- Swords, K. M., Dahlbeck, D., Kearney, B., Roy, M., Staskawicz, B. J. (1996): Spontaneous and induced mutations in a single open reading frame to both virulence and avirulence in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* avrBs2. *Journal of Bacteriology*, 178: 4661 - 4669.
- Šević, M., Gašić, K., Mijatović, M., Obradović, A. (2010): Proučavanje efikasnosti nekih baktericida u suzbijanju bakteriozne pegavosti paprike. X Savetovanje o zaštiti bilja, Zlatibor. Zbornik rezimea: 61.
- Šević, M., Gašić, K., Đorđević, M., Ignjatov, M., Mijatović, M., Obradović, A. (2011): Efficacy of some bactericides in control of bacterial spot of papper. *Book of Abstracts 5th Balkan Symposium on Vegetables and Potatoes*, Tirana, Albania: 41.
- Šević, M., Gašić, K., Ignjatov, M., Đorđević, M., Mijatović, M., Obradović, A. (2011a): Pručavanje efikasnosti Acibenzolar-S-metil-a u suzbijanju prouzrokovala bakteriozne pegavosti paprike. XI Savetovanje o zaštiti bilja, Zlatibor. Zbornik rezimea: 74.
- Šutić, D. (1957): Bakterioze crvenog patlidžana. Institut za zaštitu bilja, Beograd. Posebna izdanja, 1 - 67.
- Tawfik, A. E., El-Shaimaa, M. M., Barakat, M. I. E., Shalaby, O. Y. (2009): The occurrence of bacterial spot of tomato in Egypt. *Acta Hort. (ISHS)*, 808: 295 - 300.
- Tomlin, C. D. S. (2006): *A World Compendium The Pesticide Manual*, 14th edition. BCPC British Crop Production Council, UK.
- Trigalet, A., Samson, R., Coleno, A. (1978): A Problems Related to the Use of Serology in Phytobacteriology. *Proceedings of the 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria*, Angers: 271 - 288.
- Van den Mooter, M., Swings, J. (1990): Numerical analysis of 295 phenotypic features of 266 *Xanthomonas* strains and related strains and an improved taxonomy of the genus. *International Journal Systematic Bacteriology*, 40: 348 - 369.
- Vauterin, L., Swings, J., Kersters, K., Gillis, M., Mew, T. W., Schroth, M. N., Palleronni, N. J., Hildebrand, D. C., Stead, D. E., Civerolo, E. L., Hayward, A. C., Maraite, H., Stall, R. E., Vidaver, A. K., Bradbury, J. F. (1990): Towards an improved taxonomy of *Xanthomonas*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 40 (3): 12 - 16.
- Vauterin, L., Swings, J., Kersters, K. (1991): Grouping of *Xanthomonas campestris* pathovars by SDS-PAGE of proteins. *Journal Genetics Microbiology*, 137: 1677 - 1687.

- Vauterin, L., Hoste, B., Yang, P., Alvarez, A., Kersters, K., Swings, J. (1993): Taxonomy of genus *Xanthomonas*, In: Swings, J.G. and Civerolo, E. L., eds., *Xanthomonas*. Chapman&Hall, London: 156 - 191.
- Vauterin, L., Hoste, B., Kersters, K., Swings, J. (1995): Reclassification of *Xanthomonas*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45: 472 - 489.
- Veena, M. S., van Vuurde, J. W. (2002): Indirect immunofluorescence colony staining method for detecting bacterial pathogens of tomato. *Journal of Microbiological Methods*, 49 (1): 11 - 17.
- Vlahović, B., Stevanović, S., Tomašević, D., Zelenjak, M. (2006): Agrarna proizvodnja u Republici Srbiji/Agricultural Production in Republic of Serbia. Društvo agrarnih ekonomista Srbije.
- Vlahović, B., Puškarić, A. (2008): Izvoz povrća iz republike Srbije, XIII Savetovanje o biotehnologiji, Čačak.
- Vlahović, B., Puškarić, A., Červenski, J. (2010): Obeležja proizvodnje povrća u Republici Srbiji. *Ratarstvo i povrtarstvo*, 47 (2): 461 - 466.
- Vinatzer, B. A., Bull, C. T. (2009): The impact of genomic approaches on our understanding of diversity and taxonomy of plant pathogenic bacteria. Pages 37 - 61 in: *Plant Pathogenic Bacteria: Genomics and Molecular Biology*. R. W. Jackson, ed. Horizon Scientific Press Hethersett, Norwich, UK.
- Walkes, C. M., O 'Garro, L. W. (1996): Role of extracellular polysaccharides from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in bacterial spot of pepper. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 48 (2): 91 - 104.
- Ward, H. P., O'Garro, L. W. (1992): Bacterial spot of pepper and tomato in Barbados. *Plant Disease*, 76: 1046 - 1048.
- Weir, D. M. (1978): *Handbook of Experimental Immunology*. Blackwell Scientific Publications. Oxford.
- Yang, P., Vauterin, L., Vancanneyt, M., Swings, J., Kersters, K. (1993): Application of fatty acid methyl esters for the taxonomic analysis of the genus *Xanthomonas*. *Systematic Applied Microbiology*, 16: 47 - 71.
- Yuzbasioglu, E. G., Saygili, H. (2007): The study on detection of important seed borne bacterial disease agents on tomato. The 2nd International symposium on tomato diseases, 8-12 October, Kushadasi. Book of abstract: 116.

Zhang, Y., Callaway, E. M., Jones, J. B., Wilson, M. (2009): Visualisation of *hrp* gene expression in *Xanthomonas euvesicatoria* in the tomato phyllosphere. *European Journal of Plant Pathology*, 124 (3): 379 - 390.

BIOGRAFIJA

Maja V. Ignjatov je rođena 11.05.1972. godine u Novom Sadu. Školske 1991/1992. godine upisala je Poljoprivredni fakultet u Novom Sadu, odsek za zaštitu bilja, koji je završila 1997. godine sa prosečnom ocenom 8.60. Poslediplomske studije upisala je školske 2002/2003. godine na predmetu Fitopatologija, na Institutu za zaštitu bilja, Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu. Sve ispite na poslediplomskim studijama položila je sa ocenom 9.33. Magistarski rad pod nazivom "Bakteriozna pegavost soje u Vojvodini" odbranila je 2007. godine na Poljoprivrednom fakultetu u Novom Sadu. Iste godine izabrana je u zvanje istraživača saradnika za naučnu oblast fitopatologija.

Od 2001. godine zaposlena je u Institutu za ratarstvo i povrtarstvo u Laboratoriji za ispitivanje semena kao saradnik na ispitivanju zdravstvene ispravnosti semena.

Do sada je učestvovala je na dva Tehnološka projekta Ministarstva nauke Republike Srbije, na projektima Pokrajinskog sekretarijata za nauku i tehnološki razvoj, kao i na dva projekta Ministarstva poljoprivrede Republike Srbije.

Trenutno je angažovana na projektu Ministarstva nauke i prosvete Republike Srbije TR31030: pod nazivom: «Stvaranje sorata i hibrida povrća za gajenje na otvorenom polju i zaštićenom prostoru». Učesnik je u realizaciji projektnih zadataka u tekućem FP7 projektu pod nazivom: «Seed health: development of seed treatment methods, evidence for seed transmission and assessment of seed health».

Kao autor i koautor objavila je više naučnih i stručnih radova koji su objavljeni u časopisima i prezentovani na međunarodnim i domaćim skupovima.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a Maja Ignjatov

broj indeksa _____

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

Diverzitet populacije *Xanthomonas* spp. patogena paprike u Srbiji

rezultat sopstvenog istraživačkog rada,

- da predložena 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 intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda



U Beogradu, 29.05.2013. godine

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora _____ Maja Ignjatov _____

Broj indeksa _____

Studijski program _____ Poljoprivredne nauke _____

Naslov rada _____ Diverzitet populacije *Xanthomonas* spp. patogena paprike u Srbiji _____

Mentor _____ prof. dr Aleksa Obradović, redovni profesor _____


Potpisani/a _____ Maja Ignjatov _____

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

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

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

Potpis doktoranda



U Beogradu, _____ 29.05.2013. godine _____

Izjava o korišćenju

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

Diverzitet populacije *Xanthomonas* spp. patogena paprike u Srbiji

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 poledini lista).

Potpis doktoranda



U Beogradu, 29.05.2013. godine