



УНИВЕРЗИТЕТ У БАЊОЈ ЛУЦИ  
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ



**мр Татјана Кнежевић**  
**БАКТЕРИЈЕ КАО ПАТОГЕНИ СТРНИХ ЖИТА У СРБИЈИ**  
**ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА**

**Бања Лука, 2022.**



UNIVERSITY OF BANJA LUKA  
FACULTY OF AGRICULTURE



**Tatjana Knežević, M.Sc.**  
**BACTERIA AS PATHOGENS OF SMALL GRAIN CEREALS**  
**IN SERBIA**  
DOCTORAL DISSERTATION

**Banja Luka, 2022.**

1. **Ментор** – Др Алекса Обрадовић, редовни професор, Пољопривредни факултет Универзитета у Београду
2. **Наслов докторске дисертације:**

## **Бактерије као патогени стрних жита у Србији**

**Резиме.** Узорци зараженог биљног материјала стрних жита са симптомима налик онима које проузрокују бактерије прикупљени су у периоду 2009 – 2014. године, а потом је извршена и изолација и идентификација изолованих сојева применом класичних метода проучавања патогених и биохемијско-физиолошких одлика бактерија, али и новијих молекуларних метода анализе ДНК, чиме је по први пут детаљније окарактерисана популација ових патогена у Србији.

Од 55 проучаваних сојева, 15 сојева је идентификовано као *P. s. pv. atrofaciens* и класификовано у филогрупу 2b. Ово је први налаз овог патогена у Србији и то на пшеници, јечму, овсу, ражи, тритикалеу и кукурузу. Шест сојева изолованих са пшенице, јечма, овса, ражи и тритикалеа, идентификовани су као *P. s. pv. lapsa/aptata* и класификовани у филогрупу 2b, што је такође први налаз ових патовара на стрним житима у Србији и један од ретких у свету. Осам сојева је идентификовано као *P. viridiflava* и класификовано у филогрупу 7a, док је сој 27тк класификован у филогрупу 8. Према сазнањима докторанта, ово је први налаз *P. viridiflava* у свету на стрним житима уопште и то на овсу, ражи и тритикалеу.

Одређени број сојева блиско сродан (99%) са патоварима из филогрупе 2b (*P. s. pv. syringae/aptata/atrofaciens/lapsa/japonica*), проузрокује симптоме на јечму, овсу, тритикалеу, дуруму и кукурузу. Од сојева класификованих у филогрупу 2d, један блиско сродан *P. s. pv. coryli* је патоген овса, а други блиско сродан *P. s. pv. aceris/solidagae* проузрокује симптоме на доњем делу стабла пшенице. Према сазнањима докторанта, ни ови патовари нису до сада идентификовани као патогени стрних жита у свету.

Три соја блиско сродна *P. s. pv. coronafaciens/oryzae*, и девет сојева блиско сродних *P. s. pv. porri/striafaciens* проузрокују симптоме на овсу и ражи и класификовани су у филогрупу 4. Ово је први налаз патовара из филогрупе 4 на ражи у Србији, док су на овсу такође први пут у Србији пронађени и патовари *P. s. pv. porri* и *P. s. pv. striafaciens*.

На основу резултата ових истраживања, познати диверзитет бактерија као патогена стрних жита се проширује на нове патоваре у оквиру *P. syringae sensu stricto* или збирне

врсте *P. syringae* и на нову врсту (*P. viridiflava*) у оквиру *P. syringae sensu lato* или *P. syringae* комплекс врста.

Међу примењеним методама, осим филогенетске анализе, као поуздан критеријум за диференцијацију бактерија патогена стрних жита може се користити само стварање синрингомицина и то у карактеризацији сојева из филогрупе 2b. Постојање фазне варијације фенотипа доводи у питање коришћење LOPAT шеме као традиционалног дијагностичког средства за диференцијацију *P. viridiflava* до нивоа врсте. Бактериозе стрних жита у Србији су резултат интеракције више различитих врста/популација бактерија *P. syringae sensu stricto* и *P. syringae sensu lato*, из чега проистиче потреба за дефинисањем и новог Коховог постулата који то узима у обзир.

3. **Кључне речи** - (стрна жита, бактериозе, некроза лишћа, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas viridiflava*)
4. **Научна област** – Пољопривредне науке
5. **Научно поље** – Пољопривредне биљне науке, Заштита здравља биљака и агроекологија
6. **Класификациона ознака за дату научну област према CERIF шифрарнику** – 8000 Биомедицинске науке; 8390 Фитотехника, хортикултура, заштита приноса, фитопатологија
7. **Тип одабране лиценце Креативне заједнице (прилог 3, Изјава 2)** – Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)



1. **Mentor** –Aleksa Obradovic, PhD, full professor, Faculty of agriculture, University of Belgrade
2. **Title of the doctoral dissertation:**

## **Bacteria as pathogens of small grain cereals in Serbia**

**Summary.** Samples of infected plant material of small grain cereals with symptoms similar to those caused by bacteria were collected in the period 2009-2014, followed by isolation and identification of isolated strains obtained using conventional methods of studying pathogenic and biochemical-physiological characteristics of bacteria, including newer molecular methods of DNA analyses, which for the first time characterized the population of these pathogens in Serbia in more detail.

Among 55 studied strains, 15 strains are identified as *P. s. pv. atrofaciens* and classified in phylogroup 2b. This is the first report of this pathogen in Serbia and that on wheat, barley, oat, rye, triticale and corn. Six strains isolated from wheat, barley, rye and triticale are identified as *P. s. pv. lapsa/aptata* and classified in phylogroup 2b, which is also the first report of these pathovars on small grain cereals in Serbia and rare one in the world. Eight strains are identified as *P. viridiflava* and classified in phylogroup 7a, while strain 27tk is classified in phylogroup 8. According to available data, this is the first report of *P. viridiflava* on small grain cereals in the world at all and that on oat, rye and triticale.

Certain number of strains highly similar (99%) to pathovars in phylogroup 2b (*P. s. pv. syringae/aptata/atrofaciens/lapsa/japonica*) cause symptoms on barley, oat, triticale, durum and corn. Among strains classified in phylogroup 2d, one highly similar to *P. s. pv. coryli* is pathogen of oat and another highly similar to *P. s. pv. aceris/solidagae* causes symptoms on lower part of wheat stem. According to available data neither one of these pathovars has been identified as small grain cereals pathogens in the world.

Three strains highly similar to *P. s. pv. coronafaciens/oryzae* and nine strains highly similar to *P. s. pv. porri/striafaciens* cause symptoms on oat and rye and are classified in phylogroup 4. This is the first report of pathovars in phylogroup 4 on rye in Serbia, while pathovars *P. s. pv. porri* и *P. s. pv. striafaciens* are identified for the first time on oat in Serbia, as well.

Based on results of this research, known diversity of bacteria as pathogens of small grain cereals is now extended to new pathovars within *P. syringae sensu stricto* or *P. syringae* complex and also extended to new species (*P. viridiflava*) within *P. syringae sensu lato* or *P. syringae* species complex.

Among methods used, beside phylogenetic analyses, only production of syringomycin can be used as reliable criteria for characterization of bacteria as pathogens of small grain cereals, but only for characterization of strains within phylogroup 2b. Existence of phase variation of phenotype calls into question use of LOPAT scheme as traditional diagnostic tool for differentiation of *P. viridiflava* to species level. Small grain cereals bacterial diseases in Serbia are result of interaction of different species/populations of bacteria within *P. syringae sensu stricto* and *P. syringae sensu lato* hence the need to define new Koch`s postulate that takes this into account.

3. **Key words** - (cereals, bacteriosis, leaf necrosis, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas viridiflava*)
4. **Scientific area** – Agricultural sciences
5. **Scientific field** – Agricultural plant sciences, Plant Protection and Agroecology
6. **Classification coding (CERIF codebook)** – 8000 Biomedical sciences; 8390 Phytotechnology, horticulture, yield protection, phytopathology
7. **Type of selected license Creative Commons (Appendix 3, Statement 2)** – Attribution - Noncommercial - NoDerivs (CC BY-NC-ND)

Због свега љубављу утканог у мене  
што ми омогућава да као слободан човек  
савлађујем живописан пут истражавања у истини  
ову докторску дисертацију посвећујем

***Оцу и Мајци***

"Највеће мисли су научне мисли,  
које су у исто време и највише,  
најнесебичније, најморалније акције,  
ако им је једини циљ истина."

*(др Борислав Лоренц, Мисао и акција)*

**Најискреније и од срца се захваљујем свима који, свако са својом посебном, значајном и незаменљивом деоницом стигоше са мном и до циља једног маратона:**

Проф. др Алекси Обрадовићу, ментору - што је прихватио изазов и упркос бројним препонама истрчао са мном овај маратон до краја, што ми је дао пуну слободу у својој лабораторији онда када ми је то било најпотребније и пружао корисне савете приликом израде, писања и финализације овог рада и што ми је показао шта, када и како морам да пресечем, а шта и како истакнем да би један академски рад добио своју пуноћу.

Проф. др Радивоју Јевтићу, члану Комисије –што ми је предложио овако јединствену и комплексну тему и у дугом низу година увек био подршка и као сапутник од кога се у бројним прегледима поља стрних жита уз песму "Јечам жњела Косовка девојка" имало шта научити и као онај у чијој сам лабораторији била радо виђен гост кад год ми је то било потребно и што нас све ове године веже разумевање и уважавање.

Проф. др Војиславу Тркуљи, председнику Комисије – на указаном поверењу, разумевању и пуној подршци са много у правом моменту изречених лепих речи које и гвоздена врата отварају, као и на корисним саветима и личном ангажовању приликом финализације текста доктората и административне процедуре.

Професорима Пољопривредног факултета Универзитета у Бањој Луци за несебичну помоћ и лично залагање код пријаве: проф. др Гордана Ђурић и проф. др Никола Мићић, као и код финализирања административне процедуре докторске дисертације: проф. др Синиша Митрић и проф. др Златан Ковачевић; посебну захвалност дугујем на љубазности и предусретљивости госпођи Весни Деспот и мр Светиславу Бајићу, секретару Факултета.

Др Немањи Кузмановићу и др Анђелки Прокић (Лабораторија за фитобактериологију Пољопривредног факултета у Београду) на пруженој помоћи у извођењу лабораторијских анализа и финализацији текста.

Свим предавачима и организаторима међународних обука који нам на делу показаше да "није знање знање знати, већ је знање знање дати" (Ј.Ј.Змај), а пре свега проф. др Mark Gleason-у на дугогодишњем пријатељству и усмеравању, као и проф. др Carolle Bull која нас је увела у свет филогенетске анализе спроведене и у овом истраживању.

Мом адвокату Радмили Томић на указаном поверењу, разумевању и пријатељству, а пре свега на незаменљивој улози коју је имала у одбрани истине, као и Јелени, Веселини, Виолети, Милици и Милету, чијих се деоница заједничког пута увек са радошћу сећам.

Мом брату Николи, његовој породици и нашој Зорици на љубави и разумевању.

Мр Мирјани Копривици, мом саборцу из многих битака, хвала до Неба што си одабрала овај пут којим заједно корачамо већ дуже време и у свима преко потребној саборности удруженим снагама савлађујемо бројне, другима често тешко схватљиве изазове; без твога мира, сасвим "случајних" открића и уопште свега што чини твоју деоницу тако јединственом, ни овај маратон не би имао свој пуни смисао – хвала за све и спремај се – на тебе је ред, а и на нови почетак!

И на крају, велико хвала и свима другима који су на било који начин помогли или одмogli у дугогодишњем дешавању заплета и расплета (а они ће се сами препознати) јер је свако на свој начин допринео да овај рад буде бољи, искренији и ближи свом једином циљу – истини.

# САДРЖАЈ

<b>1. УВОД</b> .....	1
<b>2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ</b> .....	5
<b>2.1. Диверзитет, домаћини, распрострањеност и економски значај бактерија као патогена стрних жита</b> .....	5
2.1.1. Диверзитет, домаћини и распрострањеност .....	5
2.1.2. Економски значај .....	12
2.1.2.1. Економски значај бактерија рода <i>Pseudomonas</i> , патогена стрних жита.....	12
2.1.2.2. Економски значај бактерија рода <i>Xanthomonas</i> , патогена стрних жита.....	13
<b>2.2. Епидемиологија</b> .....	14
2.2.1. Епидемиологија бактерија рода <i>Pseudomonas</i> , патогена стрних жита.....	14
2.2.2. Епидемиологија бактерија рода <i>Xanthomonas</i> , патогена стрних жита.....	18
2.2.3. Фактори патогености и вирулентности .....	20
<b>2.3. Фитосанитарна регулатива и заштита</b> .....	27
2.3.1. Фитосанитарна регулатива .....	27
2.3.2. Заштита.....	28
<b>2.4. Симптоми бактериоза стрних жита</b> .....	33
<b>2.5. Детекција и идентификација најзначајнијих родова бактерија као патогена стрних жита</b> .....	42
2.5.1. Детекција и идентификација бактерија рода <i>Pseudomonas</i> , патогена стрних жита .....	43
2.5.1.1. Изолација патогена.....	43
2.5.1.2. Морфолошке, одгајивачке и биохемијско-физиолошке карактеристике.....	44
2.5.1.3. Серолошке карактеристике.....	47
2.5.1.4. Молекуларне карактеристике.....	48
<b>2.6. Провера патогености</b> .....	53
<b>2.7. Појам, историјат и актуелно стање <i>P. syringae</i> комплекса</b> .....	54
<b>3. РАДНА ХИПОТЕЗА</b> .....	62
<b>4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ</b> .....	63
<b>4.1. Прикупљање узорка</b> .....	63
<b>4.2. Изолација патогена и сојеви коришћени у раду</b> .....	66

<b>4.3. Морфолошке, одгајивачке и биохемијско-физиолошке одлике проучаваних сојева .....</b>	<b>70</b>
4.3.1. Морфолошке одлике проучаваних сојева .....	70
4.3.2. Одгајивачке одлике проучаваних сојева.....	70
4.3.3. Биохемијско-физиолошке одлике проучаваних сојева.....	71
<b>4.4. Молекуларна карактеризација и идентификација проучаваних сојева.....</b>	<b>75</b>
4.4.1. Припрема узорака ДНК.....	75
4.4.2. Детекција присуства <i>syrB1</i> гена и <i>Cfl</i> гена применом методе ланчаног умножавања фрагмената нуклеинске киселине – PCR.....	76
4.4.3. Проучавање генетичког диверзитета сојева коришћењем гер-PCR методе.....	77
4.4.4. Филогенетска анализа проучаваних сојева коришћењем 578bp локус <i>proD</i> гена .....	78
4.4.4.1. Одређивање таксономске позиције проучаваних сојева <i>P. syringae</i> комплекса врста према Parkinson et al. (2011).....	79
4.4.4.2. Одређивање таксономске позиције путем сврставања проучаваних сојева у филогрупе и подгрупе према Verge et al. (2014), у односу на диверзитет сојева <i>P. syringae</i> комплекса врста из спољашње средине .....	80
4.4.4.3. Утврђивање генетичког диверзитета и еволутивних веза проучаваних сојева са сојевима <i>P. syringae</i> изолованим са стрних жита.....	81
..	
<b>4.5. Патогене одлике проучаваних сојева.....</b>	<b>81</b>
<b>4.6. Провера осетљивости сортимената.....</b>	<b>82</b>
<b>5. РЕЗУЛТАТИ.....</b>	<b>84</b>
<b>5.1. Симптоми.....</b>	<b>84</b>
<b>5.2. Изолација патогена и избор сојева за даље проучавање.....</b>	<b>92</b>
<b>5.3. Морфолошке, одгајивачке и биохемијско-физиолошке одлике проучаваних сојева .....</b>	<b>93</b>
5.3.1. Морфолошке и одгајивачке одлике проучаваних сојева.....	93
5.3.2. Биохемијско-физиолошке одлике проучаваних сојева.....	98
5.3.2.1. Резултати LOPAT тестова .....	98
5.3.2.2. Остале биохемијско-физиолошке одлике проучаваних сојева.....	103
<b>5.4. Молекуларна карактеризација и идентификација проучаваних сојева.....</b>	<b>108</b>
5.4.1. Детекција присуства <i>syrB1</i> гена и <i>Cfl</i> гена применом методе ланчаног умножавања фрагмената нуклеинске киселине – PCR.....	108
5.4.2. Утврђени генетички диверзитет проучаваних сојева коришћењем гер-PCR методе.....	112

5.4.3. Филогенетска анализа проучаваних сојева коришћењем 578bp локуса <i>proD</i> гена.....	116
5.4.3.1. Таксономска позиција проучаваних сојева <i>P. syringae</i> комплекса врста према Parkinson et al. (2011).....	118
5.4.3.1.1. Филогенетска идентификација проучаваних сојева представника филогрупе 2 према Parkinson et al. (2011).....	123
5.4.3.1.2. Филогенетска идентификација проучаваних сојева представника филогрупе 4 према Parkinson et al. (2011).....	127
5.4.3.1.3. Филогенетска идентификација проучаваних сојева представника филогрупе 7 према Parkinson et al. (2011).....	129
5.4.3.2. Таксономска позиција у односу на диверзитет сојева <i>P. syringae</i> комплекса врста из спољашње средине према Berge et al. (2014).....	131
5.4.3.2.1. Сврставање (класификација) проучаваних сојева у подгрупе у оквиру филогрупе 2 према Berge et al. (2014).....	131
5.4.3.2.2. Сврставање (класификација) проучаваних сојева у подгрупе у оквиру филогрупе 7 према Berge et al. (2014).....	136
5.4.3.2.3. Сврставање (класификација) проучаваних сојева у филогрупу 8 према Berge et al. (2014).....	138
5.4.3.3. Утврђивање генетичког диверзитета и еволутивних веза проучаваних сојева и сојева <i>P. syringae</i> изолованих са стрних жита	140
<b>5.5. Патогене одлике проучаваних сојева.....</b>	<b>153</b>
<b>5.6. Осетљивост сортимента-инфекциони одговор сорти пшенице и јечма на одабране сојеве <i>P.syringae</i> и <i>P.viridiflava</i>.....</b>	<b>164</b>
5.6.1. Сорте пшенице.....	164
5.6.2. Сорте јечма.....	168
<b>6. ДИСКУСИЈА.....</b>	<b>172</b>
<b>7. ЗАКЉУЧАК .....</b>	<b>207</b>
<b>8. ЛИТЕРАТУРА.....</b>	<b>210</b>

## 1. УВОД

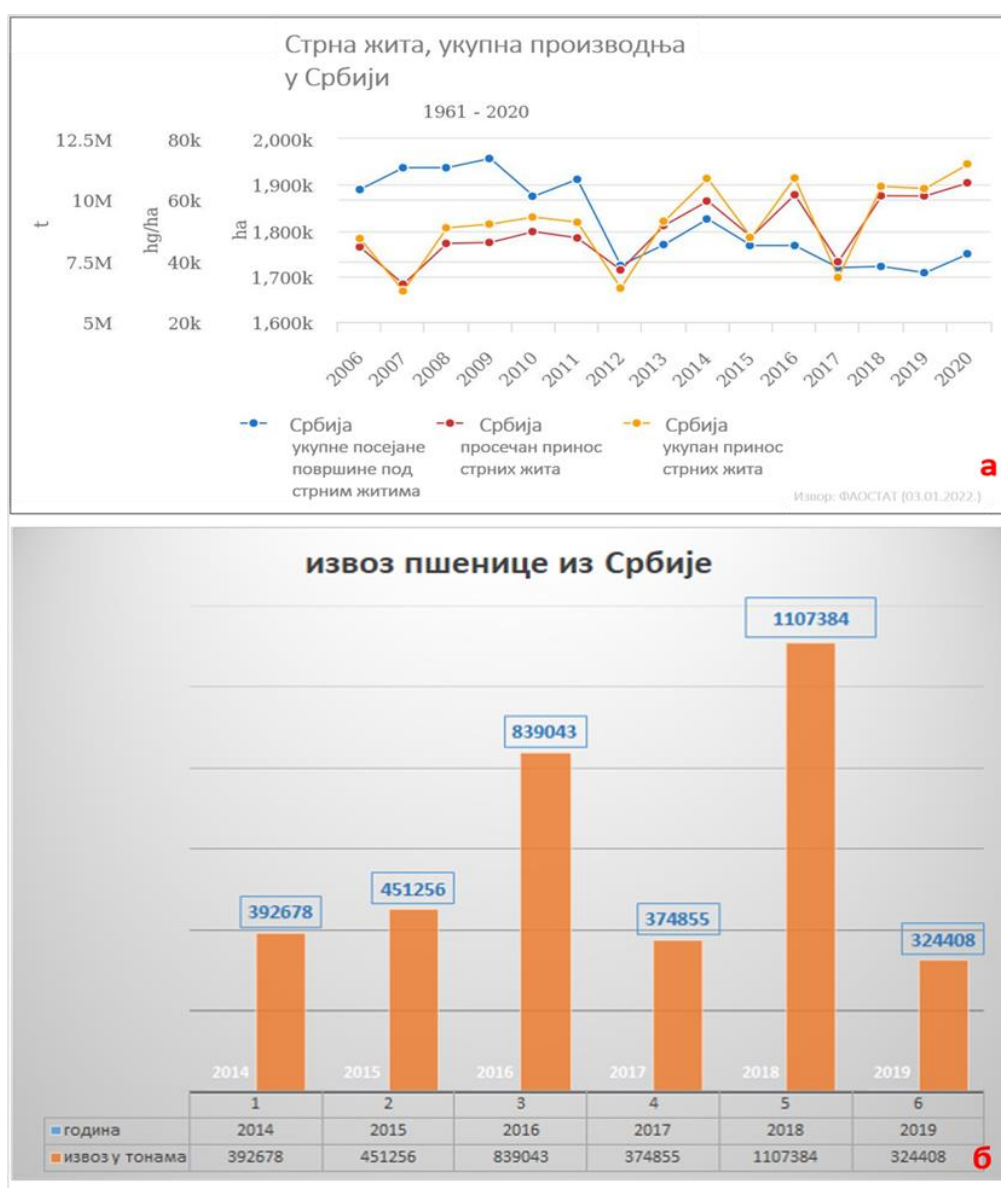
Житарице (хлебна жита, цереалије) су једногодишње биљке из фамилије трава (*Gramineae*), које се деле на права или стрна жита (цвет у облику класа) и просолика жита (цвет у облику метлице). У права или стрна жита убрајају се пшеница (*Triticum*), јечам (*Hordeum*), овас (*Avena*), раж (*Secale*) и тритикале (*Triticale*, хибрид пшенице и ражи), а у просолика пиринач (*Oriza*), просо (*Panicum*), сирак (*Sorgum*) и кукуруз (*Zea*). Пшеница обезбеђује око 20% укупних калорија у свету и за светску прехранбену сигурност има значај какав имају још само пиринач, кукуруз и евентуално кромпир (Wiese, 1987). С обзиром да је семе стрних жита богато угљеним хидратима, протеинима, витаминима и минералима, заједно са другим биљним деловима се користи и у прехранбеној индустрији (пекарска индустрија, производња скроба, алкохола, пивског слада, сирћета, целулозе, лигнина, сурогата кафе, овсених пахуљица, флекуца, гриза, овсног брашна и сл.) и у исхрани стоке, као и у фармацеутској, текстилној и другим индустријама. Повећани захтеви потрошача за функционалном храном (нутритивно вредном, са позитивним ефектом на здравље људи) директно утичу и на развијање тржишта производа који садрже биоактивна једињења, међу којима пшеница и од ње добијени клијанци заузимају значајно место (Ђуровић, 2021).

Према подацима Светске организације за храну и пољопривреду (Food and Agricultural Organization of the United Nations - FAO) који су доступни на порталу FAOSTAT (<http://faostat.fao.org>), површине на којима се стрна жита гаје у свету су 223.413.527 ha (пшеница), 49.373.562 ha (јечам), 9.692.303 ha (овас), 4.436.879 ha (раж) и 4.270.157 ha (тритикале), а у Србији су од 577.499 ha до 643.083 ha (максимум из 2018. године) (пшеница), 100.118 ha (јечам), 22.699 ha (овас), 5.046 ha (раж) и 25.725 ha (тритикале).

Такође, према подацима са истог портала, приноси пшенице у свету јако варирају, па је у периоду од 2014-2019. године најнижи просечан принос забележен у Русији (2,7 t/ha) и САД (3,4 t/ha), док се у Србији (4,3 t/ha) и Европској Унији (ЕУ) (5,7 t/ha), у периоду од неколико последњих деценија удвостручио, што се може приписати увођењу индустријских и потискивању хлебне пшенице из производње. Принос пшенице у Србији знатно варира у зависности од године (слика 1, а), а уочава се и изванредан тренд опадања приноса за период 2014-2019 (4,3 t/ha) у односу на период 2009-2013 (4,6 t/ha). Процењује се да је тренд пораста међународне потребе за пшеницом око 2% годишње и да светска производња износи преко 689 милиона тона у



25 земаља, највећих произвођача пшенице (Valencia-Botin and Cisneros-Lopez, 2012), међу којима су, по површинама од по 20.000.000 ha на првом месту Русија, ЕУ и САД. Светски просек приноса јечма (3,2 t/ha) је нешто мањи него у Србији (3,7 t/ha), док су просечни приноси овса (2,6 t/ha у односу на 3 t/ha) и тритикалеа (4,0 t/ha) на сличном/истом нивоу као у ЕУ. Иако Србија спада међу мале произвођаче стрних жита у свету, извоз стрних жита није занемарљив (сл.1, б). Од стрних жита се највише извози пшеница. За разлику од пшенице која се готово и не увози, увезене количине јечма, овса и ражи премашују количине произведене у нашој земљи (FAOSTAT, 2021). У Србији је у периоду 2010-2013 за око 25% подигнута производња семена пшенице (FAOSTAT, 2021), док је тренд производње семена других стрних жита у опадању.



**Слика 1.** Подаци о укупној површини и приносу житарица у Србији у периоду 2006-2019 (а) и подаци о извозу пшенице из Србије у периоду 2014-2019 (б) (FAOSTAT, 2021)

Услед неповољних метеоролошких услова и активности штетних организама, сваке године се губи око 28% приноса пшенице, која би иначе била доступна за људску и сточну исхрану (Qaim, 2011; loc. cit. Ashraf et al., 2012). Губици приноса пшенице су на трећем месту светских губитака приноса гајених биљака, одмах иза проса и кукуруза (Bayer, 2012; loc. cit. Ashraf et al., 2012), а слична структура губитака приноса је забележена и у случају јечма и овса.

Стрна жита паразитира један или више проузроковача болести, а интензитет појаве у пољу зависи од услова спољашње средине и осетљивости сортимената. Међу око 200 описаних штетних организама пшенице, њих 50-так се сматра економски значајним (Wiese, 1987; Cook and Veseth, 1991). Најчешће се спомињу губици које на стрним житима проузрокују гљиве (проузроковачи пепелнице, рђе, пегавости, трулежи корена и приземног дела стабла) и вируси (посебно код јечма) (Марић и Јевтић, 2005), док су подаци о губицима проузрокованим патогеном активношћу бактерија мање заступљени и чешћи они који се односе на проузроковаче бактериозне пругавости и црнила плева (Forster and Schaad, 1988; Duveiller and Maraite, 1993a; Adhikari et al., 2012).

Појава симптома болести бактериозне природе се све чешће уочава у разним регионима производње стрних жита у свету (Duveiller et al., 1997; Matveeva et al., 2003; Пасичник et al., 2011). Њихов интензитет и учесталост расте у годинама са пуно падавина, а овоме такође доприносе повећан интензитет трговине семеном стрних жита, ширење производње у топлије и влажније крајеве који погодују развоју болести, повољни климатски услови за развој болести (укључујући и услове глобалног загревања повољне за обезбеђивање шире еколошке нише бактеријама као термофилним организмима, као и учесталу појаву екстремних временских услова који погодују ширењу бактерија као факултативних паразита и заражавање биљака озбиљно угрожених мразом и сушом), затим гајење осетљивих сорти, престанак коришћења средстава за третирање семена на бази живе и сл. (Duveiller et al., 1997; Glinuskin et al., 2016).

Захваљујући развоју нових метода детекције и идентификације патогена олакшан је поступак утврђивања етиологије болести, што посредно доприноси и повећању броја регистрованих појава бактериоза стрних жита. Иако према данашњим сазнањима бактерије као патогени стрних жита обухватају врсте родова *Pseudomonas* Migula 1894 emend. Yang et al. 2013, *Xanthomonas* Dowson 1939 (approved lists 1980) emend. Vauterin et al. 1995, *Bacillus* Cohn 1872, *Clavibacter* Davis et al. 1984, gen. nov., *Erwinia* Winslow

et al. 1920 (approved lists 1980) emend. Hauben и *Pectobacterium* (Waldee 1945) emend. Hauben et al. 1999, резултати новијих истраживања у оквиру таксономије и епидемиологије бактерија као патогена гајених биљака уопште, пружају основу и за проширење појма диверзитета бактерија као патогена стрних жита.

Сматра се да су на стрним житима економски најзначајнији и најраспрострањенији патогени варијетети врсте *Xanthomonas translucens* и збирне врсте *Pseudomonas syringae* (Duveiller et al., 1997). С обзиром да је *Xanthomonas translucens* pv. *translucens* карантински патоген за регион Европске организације за заштиту биља (European Plant Protection Organization - EPPO) и Републику Србију, у овом истраживању се, у складу са одредницама међународних стандарда за ову категорију штетних организама, прво приступа теоријској процени ризика од његове појаве и ширења. Иако су патогени варијетети збирне врсте *P. syringae* забележени у скоро свим умереним и субтропским регионима производње стрних жита у свету, у Србији је до данас, забележена појава *Pseudomonas syringae* pv. *coronafaciens* на овсу (Шутић, 1956) и *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* на пшеници (Арсенијевић, 1986; Арсенијевић и Костић, 1989).

Имајући у виду све чешћу појаву симптома непознате етиологије на стрним житима у Србији, налик променама које проузрокују патогене бактерије, а нарочито током година са пуно падавина, истраживањима у овире ове докторске дисертације биће проучен диверзитет бактерија као патогена стрних жита у Србији.

## 2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ

### 2.1. Диверзитет, домаћини, распрострањеност и економски значај бактерија као патогена стрних жита

#### 2.1.1. Диверзитет, домаћини и распрострањеност

Познати диверзитет врста/патовара различитих родова бактерија као патогена стрних жита, као и њихови домаћини и распрострањеност, приказани су у табели 1 (врсте рода *Pseudomonas*), табели 2 (врсте рода *Xanthomonas*) и табели 3 (врсте родова *Bacillus*, *Clavibacter*, *Erwinia* и *Pectobacterium*). Називи бактерија (и ознака њихових типских и патотипских сојева из међународних колекција фитопатогених бактерија) су преузети из Bull et al. (2010), осим назива врсте *Pseudomonas fluorescens* који ови аутори не наводе, те је преузет из званичне базе података „LPSN—list of prokaryotic names with standing in nomenclature“ (Parte, 2014). Разлог је уједначавање назива врста, подврста и патовара, с обзиром да се у LPSN листи наводе само валидна имена родова, врста и подврста која су објављена у *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, али не и патовара.

Резултати новијих истраживања у оквиру таксономије (Gardan et al., 1999; Sarkar and Guttman, 2004; Parkinson et al., 2011; Berge et al., 2014) и епидемиологије бактерија као патогена гајених биљака пружају основу за проширење онога што чини до данас познати диверзитет бактерија као патогена стрних жита (Morris et al., 2008, 2010; Monteil et al., 2013; Lamichhane and Venturi, 2015; Lamichhane et al., 2015).

Међу врстама рода *Pseudomonas* чије је присуство забележено на стрним житима, најраспрострањенији су патовари *P. s. pv. atrofaciens*, *P. s. pv. coronafaciens*, и *P. s. pv. syringae*, који су уједно забележени и на највећем броју биљних врста стрних жита (табела 1).

Врста *X. translucens*<sup>(1)</sup> и њених 11 валидно описаних патовара који су већином патогени биљака фамилије *Poaceae* су широко распрострањени и забележени на свим врстама стрних жита у скоро свим регионима гајења житарица у свету (табела 2).

---

<sup>(1)</sup> Врста *X. translucens* је у истраживањима ДНК-ДНК хибридизације препозната као једна од 16 ДНК хомологих група које се данас сматрају геномоврстама (Vauterin et al., 1995) и на предлог Schaad et al. (2000) призната као врста.

Осим тога, забележено је да остварују инфекцију и *Triticum monococcum* var. *monococcum*, спелте (Jones et al., 1916; loc. cit. Duveiller, 1994c; Bamberg 1936) и трава попут *Bromus inermis* (Noviello et al., 1963; loc. cit. Duveiller, 1994c), *Phalaris arundinacea*, *Elymus repens* (Boosalis, 1952), *Thinopyrum intermedium* и *Elytrigia intermedia* (Mohan et al., 2001), али и шпаргле која припада фамилији *Liliaceae* (Rademaker et al., 2006). У великом броју земаља су (и даље као неки од патовара) регулисани као карантински патогени (Slovareva, 2020), иако се данас сматра да се заправо ради о комплексу проузроковача лисне пругавости или црнила плева стрних жита, како због изгледа симптома (Duveiller et al., 1997), тако и због чињенице да се сојеви ових патовара не могу међусобно раздвојити применом различитих метода (Kerstens et al., 1989; Stead, 1989; Yang et al., 1993; Vauterin et al., 1992; Weller et al., 2000; Rademaker et al., 2006).

Приказивање тачних и актуелних података о географској распрострањености је отежано, због постојања бројних синонима *X. t. pv. translucens* (некад) и патовара врсте *X. translucens* (сад) и чињенице да се записи о њиховој појави углавном односе на пресретање зараженог семена у промету преко државне границе. У односу на литературне податке из табеле 2, патоген је распрострањен и у Перуу, Ирану и Израелу, а није у Шпанији, Белгији, Бугарској, Француској и Шведској, у којима је појава овог штетног организма касније проглашена неважећом (СABИ СРС, 2015).

Забележене врсте осталих родова су само спорадично присутне (табела 3). Иако за већину њих постоји само један или два налаза са оскудним или непостојећим подацима о штетама, неке су и регулисани штетни организми у одређеним земљама (на пример *E. rhapontici* у земљама Источне и Јужне Африке, *R. tritici* у Бразилу, Узбекистану, Грчкој, Молдавији, САД-у, Бангладешу и многим ЕУ земљама) (Slovareva, 2020).

Опсежнија истраживања присуства и распрострањености патогених бактерија на стрним житима у Србији, као и осетљивости сортимента нису предузимана. Досадашњим проучавањима, утврђено је присуство два патовара врсте *P. syringae* и то: *P. s. pv. coronafaciens* на овсу (Шутић, 1956) и *P. s. pv. syringae* на пшеници (Арсенијевић, 1986; Арсенијевић и Балаж, 1986; Арсенијевић и Костић, 1989). Сачињени су и прегледни радови о *P. fuscovaginae*, проузроковачу бактериозне мрке трулежи лисног рукавца пиринча, пшенице, кукуруза и сирка (Арсенијевић, 1991) и фитопатогеним бактеријама стрних жита са литературним подацима о бактеријама рода *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Erwinia*, *Bacillus* и *Clavibacter* (Арсенијевић, 1995; Кнежевић и сар. 2016).

Табела 1. Врсте рода *Pseudomonas*, патогени стрних жита

Назив Типски сој и ознака колекције <sup>(1)</sup>	Народни назив (2а, 2б, 2в)	Домаћини <sup>(3)</sup>	Распрострањеност <sup>(3)</sup>	Референце <sup>(3)</sup> (за домаћине и распрострањеност)
<i>Pseudomonas cichorii</i> (Swingle 1925) Stapp 1928  ATCC 10857; CFBP 2101; ICMP 5707; LMG 2162; NCPFB 943 <sup>T</sup>	проузроковач меланозе стабла пшенице- 2а	пшеница	Канада	Piening and MacPherson, 1985; Пасичник et al., 2011
<i>Pseudomonas fluorescens</i> Migula 1895, <i>species</i> . (синоним: " <i>Bacillus fluorescens liquefaciens</i> " Flügge 1886, " <i>Bacillus fluorescens</i> " Trevisan 1889, " <i>Bacterium fluorescens</i> " (Trevisan 1889) Lehmann и Neumann 1896, " <i>Liquidomonas fluorescens</i> " (Trevisan 1889) Orla-Jensen 1909)	проузроковач тачкасте пегавости пшенице- 2в	пшеница	Украјина	Пасичник, 1996; Пасичник et al., 2011
		раж	Украјина	Пасичник et al., 2011
<i>Pseudomonas fuscovaginae</i> (ex Tanii et al. 1976) Miyajima et al. 1983  CFBP 2065; ICMP 5940; LMG 2158; NCPFB 3085 <sup>T</sup>	проузроковач бактериозне мрке трулежи лисног рукавца пиринча (на пшеници: проузроковач бактеријске трулежи рукаваца пшенице)-2а	пшеница	Мексико	Duveiller and Maraite, 1990; Арсенијевић, 1991, 1997; Пасичник et al., 2011
		кукуруз	Бурунди	Duveiller et al., 1989
		сирак		
<i>Pseudomonas ramosum</i> – није познат ниједан други синоним и под овим именом није валидна у <i>International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology</i>	проузроковач мрке бактериозе пшенице- 2в	пшеница	Украјина	Пасичник et al., 2011
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>atropaciens</i> (McCulloch 1920) Young et al., 1978  CFBP 2213; ICMP 4394; LMG 5095; NCPFB 2612 <sup>PT</sup>	проузроковач бактериозне пегавости основе класака (плева) пшенице и других стрних жита- 2а	пшеница	Европа (Немачка, Бугарска, Чешка, Румунија, Украјина, Русија, Литванија), Сирија, Иран, Јужна Африка, Зимбабве, Канада, САД, Мексико, Нови Зеланд	Toben et al., 1989; Toben et al., 1991; Alexandrova et al., 1995; Diekmann and Putter, 1995; von Kietzell and Rudolph, 1997; Mittelstadt and Rudolph, 1998; Matveeva et al., 2002; Matveeva et al., 2003; Kazempour et al., 2010; Пасичник et al., 2011, Kelpšieve et al., 2021
		јечам		Toben et al., 1989; Toben et al., 1991; Alexandrova et al., 1995; Diekmann and Putter, 1995; von Kietzell and Rudolph., 1997; Mittelstadt and Rudolph, 1998; Matveeva et al., 2002; Matveeva et al., 2003, Kelpšieve et al., 2021
		овас		Alexandrova et al., 1995; Diekmann and Putter, 1995; von Kietzell and Rudolph., 1997
		раж		Diekmann and Putter, 1995; Пасичник и Королева, 1991; von Kietzell and Rudolph., 1997; Matveeva et al., 2002; Matveeva et al., 2003
		тритикале		von Kietzell and Rudolph., 1997; Kelpšieve et al., 2021
		дурум		Alexandrova et al., 1995; Diekmann and Putter, 1995

Наставак на следећој страни

<p><i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>coronafaciens</i> (Elliott 1920) Young et al., 1978</p> <p>CFBP 2216; ICMP 3113; LMG 5060; NCPPB 600<sup>PT</sup></p>	проузроковач ореолне пегавости (пламењаче) овса -2а	Пшеница (вештачка инок.)	Европа (Данска, Немачка, Ирска, Норвешка, Пољска, Румунија, Велика Британија, бивша Југославија), Русија (укључујући Сибир), Азија (Јапан, Узбекистан), Африка (Етиопија, Кенија, Зимбабве), САД, Канада, Мексико, Јужна Америка (Аргентина, Чиле)	Dudnik and Dudler, 2014
		овас		Шутић, 1956; Wilkie, 1972; Smith and Mansfield, 1981; Pavlova-Ivanova, 1989; Janse, 2005; CABI CPC, 2015; Dudnik and Dudler, 2014
		раж		Cunfer and Schaad, 1976; Cunfer et al. 1978; Janse, 2005; Dudnik and Dudler, 2014
		кукуруз		Bowden and Stromberg, 1982
		траве		McBeath and Adelman, 1986b
<p><i>P. syringae</i> pv. <i>japonica</i> (Mukoo 1955) Dye et al., 1980 који се сматра млађим синонимом <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> van Hall, 1902 (Young et al., 1994)</p>	проузроковач црних нодуса јечма и пшенице- 2б	пшеница	Јапан	Mukoo,1955; loc.cit. Duveiller et al., 1997; Goto, 1994; loc.cit. Duveiller et al., 1997
		јечам	Јапан	Goto, 1994; loc.cit. Duveiller et al., 1997
<p><i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>strifaciens</i> (Elliott 1927) Young et al., 1978</p> <p>ATCC 10730*; CFBP 1674*; ICMP 3961*; LMG 2330*; NCPB 1898*<sup>PT</sup></p> <p>* Сојеви су авирулентни и нису погодни за патотипски сој.</p>	проузроковач бактериозне пругавости- 2б	овас	Кенија	Schaad and Cunfer, 1979; Barta and Willis, 2005; Janse, 2005
<p><i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> van Hall 1902 = <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>japonica</i> (Mukoo 1955) Dye et al., 1980 – Young (1992) refers.</p> <p>ATCC 19310; CFBP 1392; CFBP 4364; CFBP 4702; ICMP 3023; LMG 1247; NCPPB 281<sup>T, PT</sup></p>	проузроковач бактериозне пегавости и увелости зељастих биљака и рак рана и бактериозног угињавања воћњака (на пшеници: проузроковач бактериозне пламењаче пшенице)- 2а	пшеница	Космополит	Sellam and Wilcoxson, 1976; Shane and Baumer 1987; Арсенијевић, 1997; Smith and Hattingh, 1991; Young, 1992 Diekmann and Putter, 1995; Duveiller et al., 1997; Kazempour et al., 2010; Пасичник et al., 2011; Najafi Pour and Taghavi, 2014
		јечам		Otta 1974; Peters et al., 1983; Diekmann and Putter, 1995; Martinez-Miller et al., 1997; Najafi Pour and Taghavi, 2014
		овас		Diekmann and Putter, 1995; Najafi Pour and Taghavi, 2014
		раж		Diekmann and Putter, 1995
		тритикале		Diekmann and Putter, 1995

- Валидно име врсте/патовара према Међународном коду номенклатуре бактерија које се налази на Одобреној листи бактеријских имена (Bull et al., 2010); наводи се назив врсте/патовара, синоними и типски/патотипски сојеви;
- Народни назив врсте/патовара: 2а- Арсенијевић, 1988; 2б- превод са енглеског (аутори из колоне Референце); 2в- превод са руског (аутори из колоне Референце);
- Подаци о домаћинима и распрострањености и референце

Табела 2. Врсте рода *Xanthomonas*, патогени стрних жита

Назив Типски сој и ознака колекције <sup>(1)</sup>	Народни назив (2а)	Домаћини <sup>(3)</sup>	Распрострањеност <sup>(3)</sup>	Референце <sup>(3)</sup> (за домаћине и распрострањеност)
<i>Xanthomonas translucens</i> pv. <i>cerealis</i> (Hagborg 1942) Vauterin et al., 1995 = <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>cerealis</i> (Hagborg 1942) Dye 1978b  CFBP 2541; ICMP 1409; LMG 679; NCPPB 1944 <sup>PT</sup>		пшеница	Европа (Белгија, Бугарска, Француска, Шпанија, Шведска, Украјина, Румунија, Русија са Сибиром), Азија (Турска, Грузија, Азербејџан, Кина, Индија, Јапан, Малезија, Казахстан, Пакистан, Сирија, Јемен), Африка (Кенија, Мадагаскар, Етиопија, Мароко, Танзанија, Тунис, Замбија, Јужноафричка Република), САД, Канада, Мексико, Аргентина, Боливија, Бразил, Парагвај, Уругвај, Аустралија и Океанија	Wallin, 1946; Fang et al., 1950; Alizadeh and Rahimian, 1989; Colin et al., 1990; Duveiller, 1994a; Bragard et al., 1997; Пасичник et al. 2011
		јечам		Wallin, 1946; Fang et al., 1950; Alizadeh and Rahimian, 1989; Colin et al., 1990; Duveiller, 1994a; Bragard et al., 1997
		овас		Alizadeh and Rahimian, 1989; Colin et al., 1990
		раж		Fang et al., 1950; Alizadeh and Rahimian, 1989; Duveiller, 1994a
		тритикале		Duveiller, 1994a
		дурум		Duveiller, 1994a
<i>Xanthomonas translucens</i> pv. <i>secalis</i> (Reddy et al., 1924) Vauterin et al. 1995 = <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>secalis</i> (Reddy et al., 1924) Dye 1978b  CFBP 2539; ICMP 5749; LMG 883; NCPPB 2822 <sup>PT</sup>	проузроковач лисне пругавости или црнила плева (проузроковач бактериозне прозрчане пругавости лишћа (и црнила плева)) стрних жита и сродних трава	пшеница	Gorlenko 1960; loc.cit. Duveiller et al., 1997;	
		овас	Cunfer and Scolari, 1982; Bradbury, 1986; Bragard et al., 1995	
<i>Xanthomonas translucens</i> pv. <i>translucens</i> (Jones et al., 1917) Vauterin et al. 1995 = <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>translucens</i> (Jones et al., 1917) Dye 1978b  ATCC 19319; CFBP 2054; ICMP 5752; LMG 876; NCPPB 973 <sup>PT</sup>		раж	Maes et al., 1996	
		пшеница	Akhtar et al., 1986; Azad and Schaad, 1988a., 1988b; Milus and Kirpatrick, 1990; Murray and Maloy, 1990; Maes et al., 1996; Пасичник et al. 2011	
		јечам	Kim et al., 1987; Fourest et al., 1990; Maes et al., 1996; Azad and Schaad, 1988a	
<i>Xanthomonas translucens</i> pv. <i>hordei</i> (Egli et al., 1975) Vauterin et al., 1995, Bradbury (1986) refers. Напомена: Име није валидно и сматра се синонимом за <i>X. t. pv. translucens</i> јер је назив <i>hordei</i> према правилима International Society of Plant Pathology's (ISPP) предвиђен за сојење патогене само на јечму		раж	Azad and Schaad, 1988a; Maes et al., 1996	
		тритикале	Azad and Schaad, 1988a; Maes et al., 1996	
		пшеница	Fang et al., 1950; Mehta et al., 1992; Duveiller, 1994b; Maes et al., 1996; Пасичник et al. 2011	
<i>Xanthomonas translucens</i> pv. <i>undulosa</i> (Smith et al., 1919) Vauterin et al. 1995 = <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>undulosa</i> (Smith et al., 1919) Dye 1978b  ATCC 35935; CFBP 2055; ICMP 5755; LMG 892; NCPPB 2821 <sup>PT</sup>		јечам	Mehta et al., 1992	
		раж	Mehta et al., 1992	
		тритикале	Mehta et al., 1992; Maes et al., 1996	

- (1) Валидно име врсте/патовара према Међународном коду номенклатуре бактерија које се налази на Одобреној листи бактеријских имена (Bull et al., 2010); наводи се назив врсте/патовара и синоними и типски/патотипски сојеви
- (2) Народни назив врсте/патовара: 2а- Арсенијевић (1988)
- (3) Подаци о домаћинима и распрострањености и референце



Табела 3. Врсте осталих родова, патогена стрних жита

Назив Типски сој и ознака колекције <sup>(1)</sup>	Народни назив (2а, 2б, 2в)	Домаћини <sup>(3)</sup>	Распрострањеност <sup>(3)</sup>	Референце <sup>(3)</sup> (за домаћине и распрострањеност)
<i>Bacillus megaterium</i> pv. <i>cerealis</i> Hosford 1982 ATCC 35075; ICMP 8877	проузроковач беле пегавости пшенице- 2а	пшеница	САД	Hosford, 1982
		дурум		Hosford, 1982
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>tessellarius</i> (Carlson and Vidaver 1982) Davis et al., 1984 = <i>Corynebacterium michiganense</i> subsp. <i>tessellarius</i> Carlson и Vidaver 1982 ATCC 33566; CFBP 3496; ICMP 7221; LMG 7294; NCPPB 3664 <sup>Т</sup>	проузроковач бактеријског мозаика пшенице- 2а	пшеница	САД	Carlson and Vidaver, 1982
		јечам		Carlson and Vidaver, 1982
		тритикале		McBeath and Adelman, 1986a; Chang et al., 1990; McBeath et al., 1981; loc.cit. Duveiller et al., 1997
<i>Erwinia rhapontici</i> (Millard 1924) Burkholder 1948c emend. Hauben et al., 1999 = <i>Pectobacterium rhapontici</i> (Millard 1924) Patel и Kulkarni 1951b ATCC 29283; CFBP 3163; DSMZ 4484; ICMP 1582; LMG 2688; NCPPB 1578 <sup>Т</sup>	проузроковач трулежи рабарбаре- 2а	пшеница	Велика Британија, Француска, Израел, Јапан, Кореја, САД, Канада	Roberts, 1974; Wiese, 1987; Forster and Bradbury, 1990; Diekmann and Putter, 1995; Пасичник et al., 2011
		дурум		Huang et al., 2003
<i>Pantoea agglomerans</i> (Beijerinck 1888) Gavini et al., 1989 = <i>Corynebacterium beticola</i> Abdou 1969 = <i>Enterobacter agglomerans</i> (Beijerinck 1888) Ewing и Fife 1972 = <i>Erwinia herbicola</i> (Löhnis 1911) Dye 1964 ATCC 27155; CFBP 3845; ICMP 12534; LMG 1286 <sup>Т</sup>		пшеница	Украјина	Пасичник et al., 2011
		раж		Пасичник et al., 2011
<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> (Jones 1901) Hauben et al., 1999 emend. Gardan et al., 2003  = <i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i> (Jones 1901) Bergey et al., 1923 = <i>Erwinia carotovora</i> pv. <i>carotovora</i> (Jones 1901) Bergey et al., 1923 = <i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i> (Jones 1901) Bergey et al., 1923 ATCC 15713; CFBP 2046; ICMP 5702; LMG 2404; NCPPB 312 <sup>Т</sup>	проузроковач бактеријске влажне трулежи (на пшеници: бактеријска трулеж пшенице)- 2в	пшеница	Украјина	Пасичник et al., 2011

Наставак на следећој страни

<p><b><i>Rathayibacter iranicus</i></b> (Carlson и Vidaver 1982 ex Scharif 1961) Zgurskaya et al., 1993</p> <p>= <i>Clavibacter iranicus</i> (Carlson и Vidaver 1982 ex Scharif 1961) Davis et al., 1984</p> <p>= <i>Corynebacterium iranicus</i> (Carlson и Vidaver 1982 ex Scharif 1961) Davis et al., 1984</p> <p>= <i>Corynebacterium iranicum</i> (ex Scharif 1961) Carlson и Vidaver 1982 и Kemp 1977</p> <p>= <i>Corynebacterium michiganense</i> pv. <i>iranicum</i> (Scharif 1961) Dye</p> <p>CFBP 807; ICMP 3496; LMG 3677; NCPPB 2253 <sup>T</sup></p>	<p>проузроковач гумозе пшенице- 2а</p>	<p>пшеница</p>	<p>Иран</p>	<p>Zgurskaya et al., 1993</p>
<p><b><i>Rathayibacter tritici</i></b> (Carlson и Vidaver 1982 ex Hutchinson 1917) Zgurskaya et al., 1993</p> <p>= <i>Clavibacter tritici</i> (ex Hutchinson 1917) Davis et al., 1984</p> <p>= <i>Corynebacterium michiganense</i> pv. <i>tritici</i> (Hutchinson 1917) Dye и Kemp 1977</p> <p>= <i>Corynebacterium tritici</i> (ex Hutchinson 1917) Carlson и Vidaver 1982</p> <p>ATCC 11403; CFBP 1385; ICMP 2626; LMG 3728; NCPPB 1857 <sup>T</sup></p>	<p>проузроковач Тунду болести или жуте трулежи класова-2б</p>	<p>пшеница</p>	<p>Египат, Индија, Иран, Аустралија</p>	<p>Zgurskaya et al., 1993; Riley and Reardon, 1995</p>

- (1) Валидно име врсте/патовара према Међународном коду номенклатуре бактерија које се налази на Одобреној листи бактеријских имена (Bull et al., 2010); наводи се назив врсте/патовара, синоними и типски сојеви;
- (2) Народни назив врсте/патовара: 2а- Арсенијевић, 1988; 2б- превод са енглеског (аутори из колоне Референце); 2в- превод са руског (аутори из колоне Референце);
- (3) Подаци о домаћинима и распрострањености и референце.

## 2.1.2. Економски значај

### 2.1.2.1. Економски значај бактерија рода *Pseudomonas*, патогена стрних жита

Проучавање економског значаја бактерија као патогена стрних жита је интензивирано тек у последњих пар деценија и то у Русији и Украјини (Matveeva et al, 2003; Пасичник et al., 2011; Slovareva, 2020). До тада су већи губици приноса уочавани само у условима велике влажности током пролећа и лета (Duveiller et al., 1997). Тако је приликом вишегодишњих епифитотичних појава у Јужној Дакоти било уобичајено да се лисна некроза коју изазива *P. s. pv. atrofaciens* појави на 75% и више лисне површине (Otta, 1974). Губици због појаве *P. s. pv. atrofaciens* на пшеници у Јужној Африци су процењивани и на преко 50% (Dippenaar, 1931; loc. cit. Smith and Hattingh, 1991), а Toben et al. (1991) и Alexandrova et al. (1995) наводе да до значајних штета од истог патогена долази у условима хладног и влажног времена у пролеће. Поред смањења приноса, *P. s. pv. syringae* утиче и на редукацију квалитета семена пшенице (Valencia-Botin and Cisneros-Lopes, 2012), а *P. s. pv. atrofaciens* на јечму утиче на састав протеина и меласе, те укусу и арому пива, због чега индустрија меласе и пива не прихвата јечам уколико је присуство овог патогена на семену веће од 4% (Martinez-Miller et al., 1997).

Током опсежнијих истраживања у Русији и Украјини, утврђено је да *P. s. pv. syringae* и *P. s. pv. atrofaciens* спадају у најзначајније болести које су прогресивно растући проблем производње стрних жита, а највеће штете се испољавају у годинама са високим температурама у пролеће и лето и са доста падавина и високом влажношћу током класања (Matveeva et al, 2003; Пасичник et al., 2011). Исти аутори описују *P. s. pv. atrofaciens* као економски значајног патогена који је присутан на 15%, а у условима повољним за његов развој, и на 30-80% биљака. Када се инфекција оствари у фази воштано-млечне зрелости, при јачем интензитету болест захвата 10 – 80% класова и појављује се и на семену. Болест утиче на смањење висине биљака и стварање биомасе већине биљних органа, као и на смањење приноса семена (утичући више на број семена него његову тежину), те на енергију и клијавост као основне параметре квалитета семена, али и редуковање квалитета зрна за производњу брашна (Vasillev and Karov, 1985 и Mavridis et al., 1991; loc. cit. Duveiller et al., 1997; Valencia-Botin and Cisneros-Lopes, 2012). С обзиром да су симптоми трулежи основе плева скорије уочени на житарицама (пшеница, јечам, раж) у свим регионима европског дела Русије у којима

је извршен надзор, предузета су опсежнија истраживања генетичког диверзитета заступљених фитопатогених врста рода *Pseudomonas* (Matveeva et al., 2003).

У нашој земљи јак интензитет појаве *P. s. pv. coronafaciens* на овсу 1953. године, проузроковао је значајне штете услед сушења листова овса, намењеног за сточну исхрану (Шутић, 1956).

#### **2.1.2.2. Економски значај бактерија рода *Xanthomonas*, патогена стрних жита**

У зависности од аутора процењује се да директни губици приноса пшенице услед појаве *X. translucens* износе од 12% (удружена појава са *P. syringae* и факултативним гљивама на листу пшенице, Scharen et al., 1976) до 40% (Forster, 1982 и Forster et al., 1986; loc. cit. Duveiller et al., 1994c; Forster and Schaad, 1988; Duveiller and Maraite, 1993a; Tillman et al., 1996a; Tillman et al., 1999; Kandel et al., 2011). Јак интензитет заразе се јавља и на дурумму и тритикалеу, док инфекције остварене у раним фазама развоја јечма могу довести и до комплетног губитка приноса (Stubbs et al., 1986).

Утврђено је да је губитак приноса у линеарној функцији са процентом инфекције листа заставичара. Тако губитак приноса од преко 20% настаје када се симптоми које изазива *X. t. pv. translucens* појаве на преко 50% лисне површине (Duveiller and Maraite, 1993a), а сличну пропорцију између процента захваћености површине листа заставичара и губитка приноса (однос 2-3 према 1) наводе и Shane et al. (1987) (пшеница) и Tillman et al. (1999) (пшеница и јечам).

Услед патогеног деловања *X. t. pv. translucens* код тритикалеа долази и до умањења приноса и до умањења тежине зрна (Zilinsky and Borlaug, 1971; loc.cit. Duveiller, 1994a). Код јачег интензитета заразе, 5-10% класова може бити стерилно (Forster and Schaad, 1988). Висок ниво инфекције може довести и до смањења тежине зрна од 10-30% (Shane et al., 1987). Adhikari et al. (2012) наводе да је за повећање броја епидемија бактериозне пегавости листа у северном делу америчког средњег запада када просечна зараза са *X. t. pv. translucens* досеже и до 80%, заслужна промена сортимента пшенице и повећан обим сетве озимих сорти осетљивих на *X. t. pv. translucens* и влажни или благи временски услови током каснијих фаза развоја озиме пшенице.

Поред смањења приноса биљака домаћина, економска штета настаје и услед губитка страних и домаћих тржишта због присуства новог карантинског организма.

Економски значај осталих бактерија као патогена стрних жита углавном није изражен кроз мерљиву штету насталу услед губитка приноса.

## 2.2. Епидемиологија

### 2.2.1. Епидемиологија бактерија рода *Pseudomonas*, патогена стрних жита

Већина досадашњих истраживања биологије, екологије, епидемиологије и генетике фитопатогених бактерија, укључујући и *P. syringae* као њихов архетип, стављана је у контекст међусобних односа бактерије, биљке и пољопривредног станишта (Hirano and Uppег, 2000). С тим у вези, уобичајени начин представљања животног циклуса бактерија, патогена гајених култура, искључиво у контексту агроекосистема, приказан је на примеру животног циклуса *X. translucens* (слика 3) (Duveiller et al., 1997).

**Извори инокулума.** Уколико се животно циклус патогена посматра искључиво у контексту агроекосистема, за изворе инокулума *P. syringae* се сматрају оболели биљни делови (укључујући и семе), корови, пољопривредна опрема, инсекти као потенцијални вектори и вода за наводњавање (Morris et al., 2007), а мишљење многих аутора је да и епифитна популација *P. syringae* врста такође представља још један од извора инокулума (Sobiczewski, 1984; Latorre et al., 1985; Mansvelt and Hattingh, 1988; El-Sadek et al., 1992; Hirano and Uppег, 2000; Lamichhane et al., 2015).

**Оболели биљни делови и семе.** Otta (1977), Fessehaie (1993) и von Kietzell и Rudolph (1996) (loc.cit. Duveiller et al., 1997) наводе да је појава *P. s. pv. syringae* и *P. s. pv. atrofaciens* на семену пшенице уобичајена и да достиже концентрацију и до  $10^5$  cfu/50g семена. Иако је опште познато да заражено семе представља најзначајнији извор примарног инокулума за велики број биљних врста и да је интензитет развоја болести у вегетацији у позитивној корелацији са степеном унутрашње заразе семена, до сада је мало пажње посвећивано проучавању епидемиологије *P. syringae* комплекса врста који се преносе зараженим семеном (Lamichhane et al., 2015).

Сојеви овог комплекса врста могу веома дуго преживети у оболелим биљним деловима разних биљака и лисној простирци (Lamichhane et al., 2015), која представља њихов значајан резервоар (Monteil et al., 2012). Способност ових бактерија да преживе у земљишту дужи период доказана је и у лабораторијским и у пољским условима (Lamichhane et al., 2015).

**Корови.** Типични сојеви *P. s. pv. atrofaciens* су изоловани и са неких травних корова (Fessehaie, 1993; loc.cit. Duveiller et al., 1997), а корове као изворе инокулума за инфекцију гајених биљака наводе и други аутори (Latorre and Jones, 1979; Roos and Hattingh, 1986). Забележена је и могућност неких сојева *P. syringae* комплекса да изврше инфекцију трава укључујући *Bromus carinatus*, *Phleum pratense*, овас и траве

из фамилије крсташица (Cintas et al., 2002). Са корова у усеvu пшенице су изоловани сојеви *P. syringae*, *P. viridiflava*, *P. fluorescens*, *Pectobacterium carotovorum*, *Pantoeae agglomerans*, *X. translucens* и *Pseudomonas* sp. (Pasichnik, 2016), као и сојеви *P. s. pv. atrofaciens* (Butsenko et al., 2020).

Епифитне бактерије су бактерије способне да насељавају површину биљних органа (Hirano and Upper, 1991; loc. cit. Gnanamanickam and Immanuel, 2007) Изложеност бактерија на површини листа екстремним и стресним условима за колонизацију биљке, указује на специфичност и јединственост површине листа као станишта (Hirano and Upper, 2000). Познато је да су епифитне бактерије на површини листова развиле низ стратегија преживљавања, које им помажу да превазиђу неповољне услове попут недостатка воде, UV зрачења, варирања температура и променљиве доступности хранљивих материја. Једна од развијених стратегија преживљавања је настајање скупина (агрегација) налик биофилму, најчешће у основи трихома листова широког спектра биљних врста, укључујући и усеve поврћа, лековите биљке и дрвеће (Morris et al., 1997, 1998; Monier and Lindow, 2003). Једнако занимљиве су и остале главне групе епифита које могу бити и проузроковачи болести гајених биљака, као и антагонисти, корисни за заштиту гајених биљака (агенси биолошког сузбијања патогена попут *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* и других (Gnanamanickam and Immanuel, 2007).

Патовари *syringae*, *atrofaciens* и *coronafaciens* збирне врсте *P. syringae* имају веома значајну епифитну фазу (Fryda and Otta, 1978; Latorre and Jones, 1979; Hirano and Upper, 1983, 2000; von Kietzell and Rudolph, 1997; Пасичник, 1999; Tian et al., 2003), током које се концентрација епифитних популација на листовима и класовима пшенице и јечма без симптома креће и до  $10^7$  cfu/cm<sup>2</sup> (von Kietzell and Rudolph, 1997). Доказано је да се *P. s. pv. syringae* са инокулисаног семена стрних жита појављује на првим листовима сејанаца и надаље преживљава као епифит на листовима (Fryda and Otta, 1978; von Kietzell and Rudolph, 1997), вршећи сукцесивну инвазију сваког наредног нивоа нових листова, укључујући и лист заставичар.

**Места уласка.** За разлику од гљива, продор бактерија у унутрашњост биљних ткива умногоме зависи од природних отвора и рана. Код једногодишњих биљних врста најзначајнија места продора бактерија су стоме, хидатоде и трихоме, као и повреде проузроковане биотичким (човек, инсекти, животиње) и абиотичким факторима (олуја, мраз) (Agrios, 2005). После доспевања у биљно ткиво, бактерија се шири кроз међућелијски простор паренхима.

Тако, на пример, у случају колонизације семена јечма *P. s. pv. syringae* се после 6 часова уочава у алеуронском слоју, после 24 часа у ћелијама ендосперма, после 36 часова је близу бразде (набора), а после 48 часова се налази у облику "фластера" у неким ћелијама ембрионалног ткива. *P. s. pv. japonica* се прво уочава на плеви и плевицама, а онда преко спојног места (*funiculus caryopsis*) и даљег умножавања у међућелијским просторима (Valencia-Botin and Cisneros-Lopez, 2012) наставља колонизацију семена пшенице. Peters et al. (1983) су закључили да бактерија продор у плевице највероватније врши преко стома пре везивања плевица и кариопсиса, после чега даље продире преко удубљења или рана у епидермису.

**Критичан моменат за инфекцију семена** и појаву симптома пламењаче основе класака (плева) јечма (*P. s. pv. atrofaciens*) је од касне млечне до ране воштане фазе развоја зрна (Martinez-Miller et al., 1997). Појаву лисне некрозе фаворизује период изузетно високе влажности, али интензитет појаве зависи и од киша са ветром током маја и јуна (Otta, 1974), док појаву трулежи основе плева фаворизује влажно и хладно време (Toben et al., 1991; Martinez-Miller et al., 1997). Болест се такође уочава и у пољима са наводњавањем вештачком кишом (Smith and Hattingh, 1991). У истраживањима у условима стакларе, релативна влажност ваздуха од 80-98% и ниже температуре (10°C) су фаворизовале кретање *P. syringae* ка надземним деловима сејанаца, без обзира на осетљивост сорти (Fryda and Otta, 1978).

Развоју епидемије *P. s. pv. coronafaciens* погодује велика влага касно у зиму и рано у пролеће. Симптоми болести су најочљивији и патоген се најлакше изолује током марта и априла, док се до краја маја може изоловати само из лезија неких сорти (Cunfer and Schaad, 1976). На стварање симптома ореолне пегавости овса и ражи утиче и количина светлости, па је утврђено да у условима слабије осветљености у дужем временском периоду (неповољне временске прилике или густина лисне масе), коју потом замењује веома сунчано време, *P. s. pv. coronafaciens* може проузроковати веће губитке него при дужем, непрекидном периоду високе ирадијације (Cunfer and Youmans, 1978).

**Новији правци епидемиолошких истраживања.** Резултати Morris et al. (2008, 2010) и Monteil et al. (2012, 2013) недвосмислено показују да су сојеви *P. syringae* распрострањени у широком спектру станишта и ван агроекосистема, укључујући снег, планинске водотокове, биофилм микроорганизама на површинама стена, кишу и дивље биљне врсте које припадају планинским и субпланинским зонама. Тако су из снега, воде за наводњавање и оболелих биљака идентификовани сојеви са истом клонском везом, указујући на повезаност пољопривредних и непољопривредних станишта.

Такође, сојеви изоловани из воде горњих токова река, узводно од агроекосистема на 3 континента (236 сојева са 11 локација у САД, Француској и Новом Зеланду) су у филогенетској анализи правили неколико нових генетичких грана (кластера), који нису претходно уочени код сојева изолованих са гајених биљака.

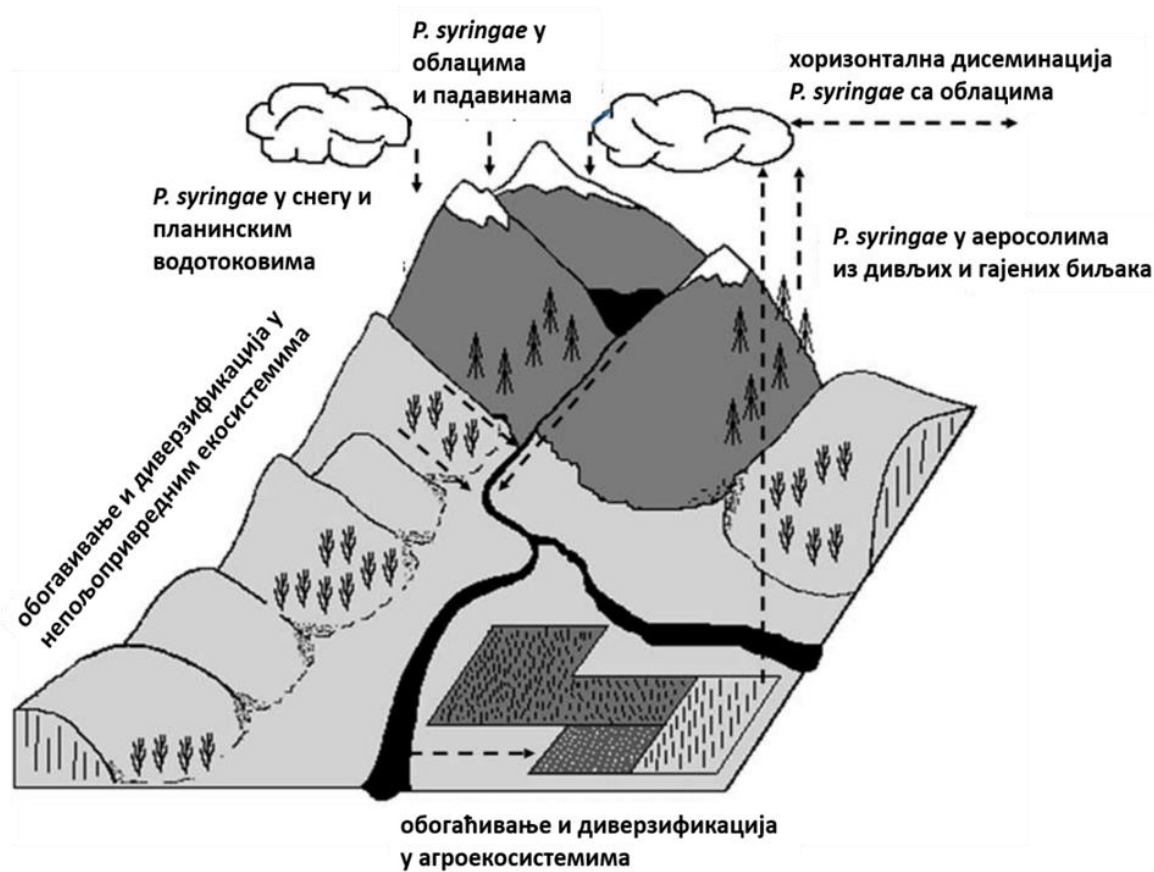
Резултати истраживања Morris et al. (2008) су довели до предлога за проширивање животног циклуса *P. syringae* који сада обухвата и ширење кроз циклус воде и даљу колонизацију станишта у и ван агроекосистема. Проширени циклус су прво предложили Sands et al. још 1982 године (loc.cit. Morris et al., 2008), а Morris et al. (2008, 2010) пружају и доказе за хипотезу да је, поред биљака и кружење воде у природи значајан фактор преношења *P. syringae* до читавог спектра еколошких станишта у којима може да преживи и чији селективни притисци утичу на умањење и/или увећање различитих биотипова популације *P. syringae* (слика 2), као и да вода као станиште значајно доприноси диверзификацији сојева овог комплекса. Дужина преживљавања бактерија зависи од услова спољашње средине и биотипа. У поређењу са површинским водама, кретање воде испод планина излаже *P. syringae* још интензивнијем селективном притиску и специфичним условима по питању хемијске концентрације, количине доступног кисеоника и других физичко хемијских параметара. Неки биотипови *P. syringae* могу бити боље адаптирани на стрес повезан са агроекосистемима.

У последњих пет година радове из ове области је објавило неколико група аутора окопљених око Morris и Monteil (Carotenuto et al., 2017; Failor et al, 2017; Morris et al., 2017; Stopelli et al., 2017; Jimenez-Sanches et al., 2018; van Stan et al., 2020).

Morris et al. (2010) наводе да се метапопулација *P. syringae* састоји од 3 генетичка екотипа: екотип специфичан за усев, екотип специфичан за воду и екотип који се може пронаћи у оба станишта. Улогу непољопривредних средина у појави, еволуцији и ширењу патогена гајених биљака ближе образлажу и Monteil et al. (2013) који наводе да су *P. syringae* сојеви веома сродни са *P. s. pv. tomato* присутни у снегу и нетакнутим рекама (који су ван било каквог агроекосистема) и чине велику популацију чији је генетички диверзитет већи од оног који има популација *P. s. pv. tomato* и сродника у усевима, што додатно указује на то да је мали број генетичких мономорфних патогена као што је *P. s. pv. tomato* настао из велике метапопулације спољашње средине. Резултат филогенетске анализе 100 сојева *P. s. pv. tomato* сакупљених у периоду 1948-2008 указује на то да је овај патоген еволуирао у последњих 50 година, јер су у земљама Европе и Северне Америке популације навелико замениле једна другу, док су се у земљама у развоју задржале локалне популације настале из сојева предака



(Vinatzer, 2010). Када је еволуција патогена у питању, утврђено је и да *P. syringae* патогени испољавају резистентност према предаторима (амеба, нематодe, инсекти) у вези са чим слабо испољавање токсичног ефекта указује на то да је бактерија развила гене који јој омогућавају да се заштити од дејства предатора (Dorati et al., 2010).



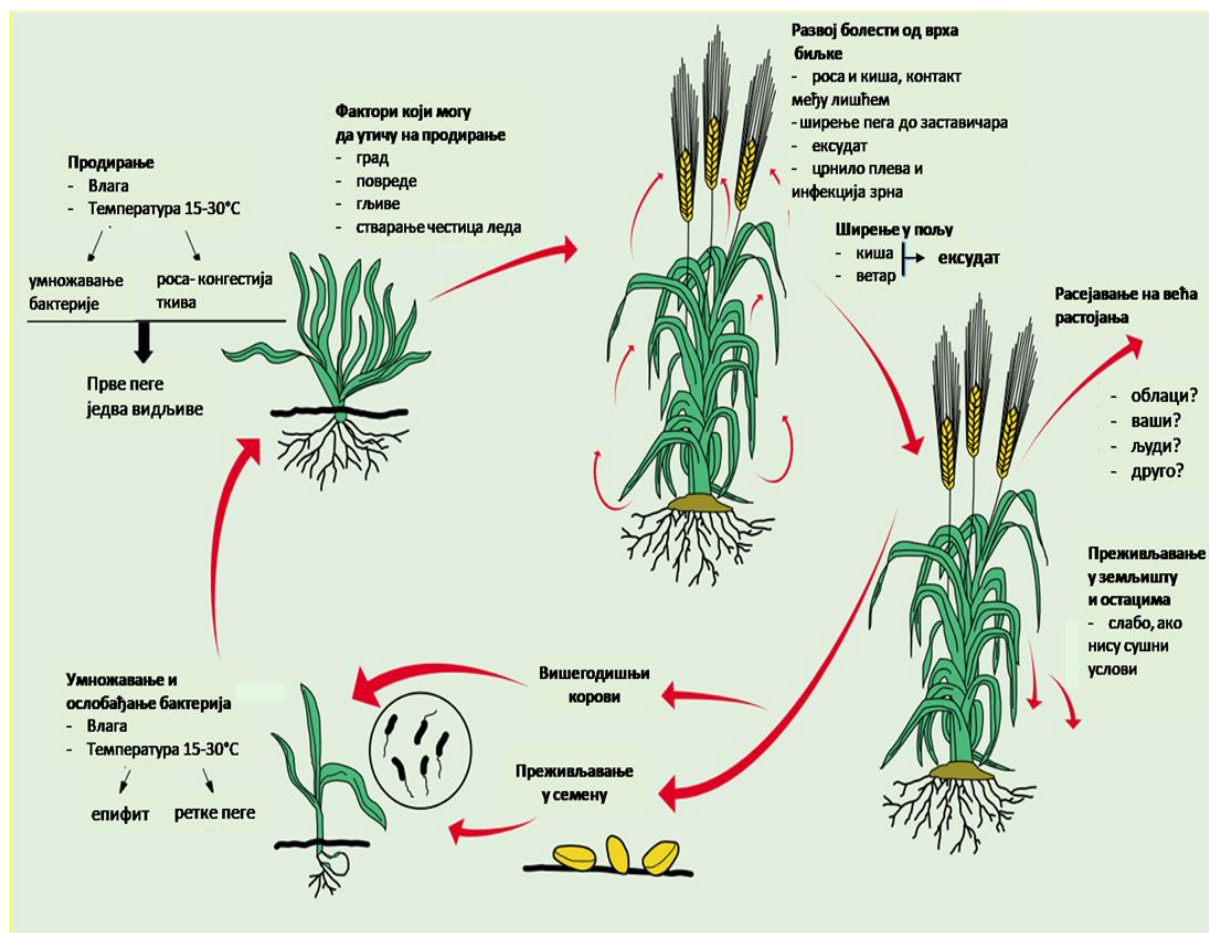
Слика 2. *Pseudomonas syringae* и кружење воде. Хипотетички животни циклус *P. syringae* (преузето из Morris et al., 2008, 2010).

### 2.2.2. Епидемиологија бактерија рода *Xanthomonas*, патогена стрних жита

**Животни циклус** комплекса *Xanthomonas* патовара, проузроковача лисне пругавости стрних жита, приказан је на слици 3 (Duveiller et al., 1997).

Најважнији **извор примарног инокулума** је семе (Duveiller, 1989; Duveiller, 1994c; Milus and Mirlohi, 1995; EPPO, 1997; Tillman et al., 1999), у коме патоген, који се највише концентрише у спољном омотачу (Duveiller, 1992; loc. cit. Duveiller, 1994c), може преживети од 5-7 година (Forster and Schaad, 1990). Опстанку бактерија у земљи доприноси и присуство биљних остатака (Voosalis, 1952). Патоген може да презими и

на озимој пшеници и ражи (Boosalis, 1952), као и на разним коровима и другим биљкама попут *Bromus inermis*, *Phleum pratense* (Wallin, 1946), *Poa pratensis*, *Festuca arundinaceae*, *Festuca rubra*, *Hordeum leporinum* и *Medicago sativa* (Thompson et al., 1989).



**Слика 3.** Животни циклус комплекса *Xanthomonas* патовара, проузроковача лисне пругавости стрних жита (преузето из Duveiller et al., 1997)

Бактерија може као епифит преживети и на биљкама који нису домаћини (Timmer et al, 1987), као и на зараженим биљним остацима у земљишту (Boosalis, 1952; Mehta, 1986a; Wiese, 1987). Сматра се да епифитне популације *X. t. pv. translucens* имају важну улогу у ширењу патогена у оквиру биљке и између биљака (Duveiller, 1994c), јер није забележено да се ова бактерија систематски шири кроз биљку (Milus and Chalkeley, 1994). Појава епифитних популација зависи од услова спољне средине и важан је елемент у разумевању етиологије бактериозне пругавости и црnilа плева (Azad and Schaad, 1988b; Forster and Schaad, 1988; Duveiller, 1994c).

**Начин заражавања клијанаца из семена** описао је Wallin (1946). Патоген кроз ране или стоме продира у колеоптил и потом инфицира први лист пре његовог

избијања из колеоптила. *X. t. pv. translucens* је прави паренхимски патоген, који у интерцелуларне просторе доспева преко стома (EPPO, 1997).

Фактори који фаворизују продор патогена у биљно ткиво су и разне врсте повреда и оштећења, укључујући и оштећења од инсеката, као и присуство гљива. Експерименти показују да присуство гљива, проузроковача трулежи корена и гљива као нпр. *Bipolaris sorokiniana* повећава предиспозицију на инфекцију са бактеријама рода *Xanthomonas* (Boosalis, 1952). Патоген ствара честице леда (Kim et al., 1987), што може бити повезано са оштећењима од мрза (Azad and Schaad, 1988b; Sands and Fourest, 1989). Duveiller et al. (1991) наводе да способност стварања честица леда није неопходан услов за изазивање епидемије.

**Ширење патогена.** Патоген се на већа растојања шири семеном (Sands and Fourest, 1989; Milus and Mirlohi, 1995). Процент преношења патогена семеном је веома мали, али омогућава озбиљне инфекције у пољу под повољним условима (EPPO, 1997). Tubajika et al. (1998) наводе да је детекција патогена на семену била могућа само уколико је претходно на родитељским биљкама ниво инфекције листа заставичара био 15-20% једне (1994/95), односно 30-35% друге (1995/96) производне сезоне. Патоген се током вегетације локално (на удаљеност од око 30 m<sup>2</sup>) шири кишним капима, росом, контактом између биљака и инсектима који преносе лепљиви бактеријски ексудат (Boosalis, 1952; Mehta, 1990). Инфективни циклуси могу бити краћи и од 10 дана (Hall et al., 1981), па је при процени развоја епидемија потребно узети у обзир и висок капацитет умножавања патогена (El-Banoby and Rudolph, 1989).

Отпуштање (ослобађање) и умножавање патогена зависе од температуре и влаге. Патоген толерише широк опсег температура (15-30°C) (Duveiller et al., 1991), а најбоље се развија на температури изнад 26°C (Forster et al., 1986; loc.cit. Duveiller, 1994c). Температура има главни утицај на умножавање патогена у ткиву листа и развој епидемија које не ограничавају ни услови сувог ваздуха (Duveiller and Maraité, 1995). Влага доприноси колонизацији листа и инвазији лисног ткива, а омогућава и отпуштање патогена из семена и ширење патогена, али није до краја документовано да ли је за инфекцију неопходна слободна вода у виду росе, падавина или наводњавања (Sands et al, 1986; Wiese, 1987). Tubajika et al. (1999) наводе да су за појаву болести значајне падавине, температура и брзина ветра, али не и релативна влажност ваздуха.

### 2.2.3. Фактори патогености и вирулентности

Приликом интеракција са биљком домаћином, сојеви *P. syringae* користе изузетну разноликост система повезаних са вирулентношћу, међу којима су и системи за стварање фитотоксина, егзополисахарида, пектолитичких ензима и протеина за стварање честица леда, као и систем за излучивање ефектора (Тип 3 Секрециони Систем (енг. Type III Secretion System-T3SS)) и систем за стварање хормона.

**Стварање фитотоксина.** Фитотоксини су или продукти биљних патогена или настају као резултат интеракције патогена и домаћина, директно оштећују биљне ћелије и утичу на ток развоја болести или симптома. Bender et al. (1999) наводе да врсте рода *Pseudomonas* стварају читав спектар фитотоксичних супстанци (табела 4), као и да су међу њима најбоље проучени фитотоксини које ствара *P. syringae*, а који изазивају хлорозу (коронатин, фазеолотоксин и табтоксин) или некрозу (сирингомицин и сирингопептин). Патовари *P. syringae* са стрних жита стварају сирингомицин, сирингопептин, коронатин и табтоксин. Сирингомицин и са њим повезани једноставнији (сирингостатин, сиринготоксин и псеудомицин) и комплекснији (сирингопептин) липодепсинопептиди омогућавају пасивни проток електролита кроз поре које формирају на мембрани ћелија биљке домаћина и на тај начин проузрокују интензивне некрозе код биљака (Sorensen et al., 1998; Vultreys and Gheysen, 1999). Коронатин је структурални и функционални хомолог метил јасмоната, биљног хормона који активира одређене метаболичке процесе укључене у одбрамбени механизам биљака против хербивора и неких патогена (Bender et al., 1999). Ослобађањем табтоксин-бета-лактама као компоненте табтоксина се неповратно инхибира ензим глутамин синтетаза, једини ефикасан пут детоксикације амонијака и на овај начин долази и до стварања хлороза (Hofte and de Vos, 2007).

Нека каснија истраживања су показала и извесна одступања у односу на резултате истраживања Bender et al. (1999), приказаних у табели 4. Тако, према наводима Vassilev et al. (1996) и Vultreys и Gheysen (1999), сирингопептине, поред сирингомицина, стварају и *P. s. pv. syringae* и *P. s. pv. atrofaciens*. Даље, Hwang et al. (2005) су утврдили да стварање сирингомицина није ограничено само на сојеве групе II филогенетског стабла конструисаног на основу MLST теста са “housekeeping” генима (*P. s. pv. syringae*, *P. s. pv. atrofaciens*, *P. s. pv. aptata*, *P. s. pv. tomato*, *P. s. pv. lachrymans* и *P. s. pv. japonica*), него представља и карактеристику сојева групе I (*P. s. pv. glycinea* и *P. s. pv. maculicola*) и групе IV (*P. s. pv. oryzae*). Сиринготоксин ствара и сој *P. fuscovaginae*,

показујући да цикличне липодепсинопептиде не стварају само сојеви *P. s. pv. syringae* (Sorensen et al., 1998; Bultreys and Gheysen, 1999).

Исти аутори су преко тестова инхибиције пораста индикатор сојева гљива такође показали да ниједан од три испитивана соја *P. syringae* са пшенице (*P. s. pv. syringae*, *P. s. pv. atrofaciens* и *P. s. pv. aptata*) није стварао сириногомицине, чиме је потврђено да у одређеним условима сојеви могу изгубити ову важну карактеристику (табела 4 и табела 5), а ову карактеристику сојева *P. syringae* констатују и Hwang et al. (2005). Такође, могуће је да сојеви истог патовара стварају и више од једног токсина (табела 5, Bull, персонална комуникација).

Иако патогеност *P. syringae* не захтева присуство токсина, Bender et al. (1999) наводе да токсини функционишу као фактори вирулентности чије стварање резултира повећаним интензитетом болести биљака јер они помажу системичном кретању бактерија кроз биљку домаћина (*P. s. pv. phaseolicola*) и повећању величине лезија и умножавања у биљци домаћину (*P. s. pv. tomato*, *P. s. pv. syringae*). Bultreys и Gheysen (1999) наводе да је вирулентност *P. s. pv. syringae* великим делом одређена стварањем сириногомицина и сириногопептина, а да мутанти који не могу да стварају сириногомицин испољавају редукцију вирулентности и до 35%. Одређени мутанти *P. s. pv. syringae* не стварају сириногомицин *in vitro*, али могу да изазивају симптоме у различитој мери, док с друге стране, сојеви *P. syringae* М1 са пшенице који стварају сириногомицин Е, не изазивају симптоме на пшеници.

Други фитотоксини. Неки сојеви фитопатогене бактерије *P. s. pv. syringae* излучују сириноголин А, производ мешане не-рибозомалне пептид/поликетид синтетазе (Misas-Villamil et al., 2010; Schellenberg and Dudler, 2010). Сириноголин А је фактор вирулентности и често проучаваног соја *P. s. pv. syringae* В728а, што је доказано значајним умањењем интензитета симптома болести на пасуљу након инокулације сириноголин негативног мутанта (Schellenberg and Dudler, 2010). Бактерије које стварају сириноголин А имају способност отварања стома, чиме се превазилази механизам затварања стома као фактора природне отпорности пасуља и *Arabidopsis thaliana* (Schellenberg and Dudler, 2010). Misas-Villamil et al. (2010) су утврдили да је биосинтеза сириноголина А код *P. s. pv. syringae* довољна за ширење патовара који се иначе не шири у биљном ткиву и то путем инхибирања протеасоме домаћина, избегавањем примарног места инфекције и вршењем колонизације удаљених ткива дуж васкуларног система.

Већина сојева *P. s. pv. syringae* изолованих са манга стварају манготоксин који инхибира ензим орнитин ацетил трансферазу (ОАТ) и у чије је стварање укључено бар 2 кластера гена (Arrebola et al., 2010).

**Стварање егзополисахарида.** Дуго се сматрало да патовари *P. syringae* комплекса врста производе само 2 типа егзополисахарида: леван и алгинат (Gross and Rudolph, 1987; loc. cit. Hofte and de Vos, 2007). Иако многи *P. syringae* патовари када се гаје на подлози обогаченој сахарозом стварају леван (Hettwer et al., 1998; loc. cit. Hofte and de Vos, 2007), главни егзополисахарид који стварају у воденастим пегама чини се да је заправо алгинат (Fett and Dunn, 1989; loc. cit. Hofte and de Vos, 2007). Стварање алгината је повезано са стањем бактерија у епифитној фази, отпорношћу на десикацију и токсичне материје и стварањем воденстих пега на зараженим листовима (Sundin, 2003). Постоји позитивна корелација између вирулентности *P. syringae* комплекса врста и стварања алгината (Rudolph et al., 1989; loc. cit. Lamichhane et al., 2015). На пример, сојеве *P. viridiflava* карактерише присуство фазне варијације, тј. 2 типа колонија - мукоидног и транспарентног (провидног) (Bartoli et al., 2014), где једино мукоидни сој ствара егзополисахариде, проузрокује трулеж и способан је да изазове болест (Bartoli et al., 2015).

Насупрот првобитном мишљењу да егзополисахариди леван и алгинат имају пресудну улогу у формирању биофилма, коришћењем мутаната који их не стварају је утврђено да и неки други полимери значајно доприносе формирању и структури биофилма (Laue et al., 2006). Међу свим егзополисахаридима које стварају фитопатогене *Pseudomonas* врсте данас се највише проучавају алгинат и Psl (енг. polysaccharide-synthesis loci) полисахариди за који је утврђено да се састоје од подјединица Д-манозе, Д-глукозе и Л- рамнозе у пропорцији 3:1:1 (Heredia-Ponce et al., 2021).

**Стварање пектинолитичких ензима.** Сојеви *P. fluorescens*, *P. marginalis* и *P. viridiflava* имају способност деградације пектина у ћелијским зидовима уз помоћ широког спектра пектолитичких ензима. *P. viridiflava* PeIV ген је есенцијалан за патогенезу влажне трулежи (Hofte and de Vos, 2007).

**Стварање честица леда.** Већ скоро пола века је познато да је оштећење биљака од мрза резултат интеракције неких бактерија са површине листа и утицаја ниских температура. Ове бактерије, услед формирања леда, чине биљке још осетљивијим на мраз. Популација бактерија које стварају честице леда чини око 0.1 до 10% тоталне популације бактерија на површини листова, у које спадају и одређени патовари *P.*

*syringae* и неколико других врста укључујући и *P. fluorescens* и *P. viridiflava* (Morris et al., 2004). Ове бактерије, захваљујући протеину присутном у спољашњој мембрани бактеријске ћелије, на температурама од  $-2^{\circ}\text{C}$  до  $-4^{\circ}\text{C}$  катализују замрзавање воде охлађене у високом интензитету (појава позната као "supercooling"), што проузрокује оштећења биљака осетљивих на мраз (Morris et al., 2004). За формирање леда и повреду биљака у опсегу температура од 0 до  $-5^{\circ}\text{C}$  одговорне су већином (95%) бактерије које стварају честице леда (Hirano and Uppger, 2000; Morris et al., 2004), док на температурама испод  $-5^{\circ}\text{C}$  нека друга хетерогена језгра леда највероватније лимитирају ову појаву ("supercooling"). Код фитопатогених *Pseudomonas* врста, гени за лед (ice genes) су кодирани и секвенционирани из сојева *P. syringae* и *P. fluorescens*. Сој *P. s. pv. syringae* B728а поседује гене који кодирају стварање протеина (енг. "antifreeze protein") помоћу којих се регулише веома варијабилна активност стварања леда од стране *P. syringae* сојева, најчешће по питању интензитета ове појаве. Morris et al. (2004, 2008, 2010) наводе и то да ове бактерије такође играју улогу у атмосферском процесу преципитације јер су сојеви који стварају честице леда пронађени расејани у атмосфери и у облацима на висинама од неколико километара, те да су данас створени и докази и метеоролошке алатке за повратак проучавању биопреципитације где биљке играју улогу као зачетници облака (енг. cloud seeders).

**Систем за излучивање ефектора (Тип 3 Секрециони Систем - енг. Type III Secretion System-T3SS)** је прво откривен код патогене бактерије сисара из рода *Yersinia* и од тада је пронађен у таксономски удаљеним Gram негативним бактеријама, како патогенима биљака из агрокосистема и патогенима животиња, тако и непатогеним бактеријама у асоцијацији са биљкама (Hofte and de Vos, 2007) и бактеријама изолованим из спољашње средине (Monteil et al., 2013). T3SS је есенцијалан за патогеност многих фитопатогених бактерија и проучен је код врста родова *Erwinia*, *Ralstonia* и *Xanthomonas*, а код рода *Pseudomonas* се назива и *hrp* систем (енг. hypersensitive response and pathogenicity - хиперсензитиван одговор и патогеност). На непољопривредним стаништима широко су распрострањени и филогенетски удаљени *P. syringae* сојеви који немају овај систем, али могу бити патогени (Demba et al., 2012).

T3SS је комплексан систем за излучивање (Hofte and de Vos, 2007) и састоји се од око 30 различитих протеина међу којима су најзначајнији ефектор протеини, а укупан сет ефектора који се излучују током инфекције биљака (секретом) је специфичан за сваког патогена понаособ (Мокругакова et al., 2010) и одређује који процеси у ћелијама биљака домаћина су угрожени и на који начин (Greenberg et al., 2010). Основна улога

T3SS система је транслокација ефектора кроз ћелијски зид и плазма мембрану (Buell et al., 2003; loc. cit. Hofte and de Vos, 2007). Ефектори које патоген ствара и излучује стварају комплекс са биљним молекулима познатим под називом "циљеви (мете) вирулентности" и доприносе патогенези изазивањем отпуштања воде и/или хранива у апопластични простор и сузбијањем или избегавањем одбрамбеног одговора биљке домаћина (Lewis et al., 2010; Bartoli et al., 2014). Код отпорних биљака ефектори функционишу као детерминанте авирулентности које активирају хиперсензитивни (ХР) одговор, док код осетљивих биљака функционишу као детерминанте вирулентности које олакшавају патогенезу и подешавају одбрамбени одговор и физиологију биљке домаћина у корист патогена (Oguiza and Asensio, 2005; loc. cit. Hofte and de Vos, 2007). Главни утицај на експресију T3SS гена испољава стопа раста и густина популације бактеријске културе (енг. density-dependant gene regulation, quorum sensing) путем молекула ацил-хомосерин лактона (енг. acyl-homoserine lactone - AHL), али и неких других сигнала које бактерија испушта у подлогу (Stauber and Schechter, 2010).

**Стварање ауксина.** Већина анализираних сојева патовара *P. syringae* и сродних врста ствара ауксин, нарочито у присуству триптофана, а међу њима и сојеви *P. s. pv. syringae* и *P. s. pv. aceris* (Glickmann et al., 1998; loc.cit. Hofte and de Vos, 2007).



**Табела 4.** Токсини и *Pseudomonas* врсте које их стварају (Bender et al., 1999)

Токсин	Организам који ствара токсин
Коронатин	<i>P. s. pv. atropurpurea, glycinea, maculicola, morprunorum, tomato</i>
Корлептин	<i>P. corrugate</i>
Фускопептин	<i>P. fuscovaginae</i>
Персикомицин	<i>P. syringae pv. persicae</i>
Фазеолотоксин	<i>P. syringae pv. actinidiae, phaseolicola</i>
Ризобитоксин	<i>P. andropogonis</i>
Сирингомицин (сиринготоксин, сирингостатин, псеудомицин)	<i>P. s. pv. syringae, aptata, atrofaciens, P. fuscovaginae</i>
Сирингопептин	<i>P. s. pv. syringae</i>
Табтоксин	<i>P. s. pv. tabaci, coronafaciens, garcae</i>
Тагетитоксин	<i>P. syringae pv. tagetis</i>
Толасин	<i>P. tolaasii</i>
Вискосин	<i>P. marginalis (P. fluorescens)</i>

**Табела 5.** Токсини и *P. syringae* патовари који их стварају (Bull, персонална комуникација)

Pv	етилен	коронатин	фазеолотоксин	табтоксин	сирингомицин	антиметаболички токсини	тагетитоксин
<i>aptata</i>	-	-	-	-	+	+	-
<i>atrofaciens</i>	-	-	-	-	+	+	-
<i>atropurpurea</i>	-	±	-	-	-	-	-
<i>coronafaciens</i>	-	±	-	±	-	-	-
<i>striafaciens</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>syringae</i>	-	-	-	-	±	-	-

## 2.3. Фитосанитарна регулатива и заштита

### 2.3.1. Фитосанитарна регулатива <sup>(1)</sup>

Прегледом међународних фитосанитарних споразума, стандарда и протокола<sup>(2)</sup> уочава се слаба и недовољна дефинисаност фитосанитарне регулативе и мера у односу на бактерије као патогене стрних жита, како на глобалном, тако и на нивоу Регионалне организације за заштиту биља (енг. European Plant Protection Organisation - EPPO) и Републике Србије.

У оквиру EPPO A1 и A2 карантинске листе штетних организама (PM 1 / 2 (30)), на позицији A2/183 је регулисан *X. t. pv. transucens*, патоген стрних жита, док су се штуро обрађени карантински захтеви у вези са овим патогеном налазили у једној од претходних верзија PM-2 стандарда (енг. pest specific phytosanitary measures, specific quarantine requirements) који су данас повучени. Других података о бактеријама као патогенима стрних жита нема у EPPO стандардима, па чак ни у оквиру стандарда о доброј пољопривредној пракси (PP2) који се односе на стрна жита (PP2/10 (пшеница), PP2/11 (јечам), PP 2/19 (раж), PP 2/24 (овас)). У оквиру Организације за економску сарадњу и развој (енг. Organisation for Economic Co-operation and Development- OECD-) су развијене сертификационе шеме за сортну чистоћу семена разних биљних врста, укључујући и стрна жита. Иако се међународна трговина семеном обавља уз поштовање OECD сертификације и издавање OECD сертификата, чињеница да бактерије као патогени стрних жита нису посебно регулисане у оквиру ове шеме, указује на то да је њихова несметана дистрибуција семенским материјалом у међународној трговини веома могућа и извесна.

---

<sup>(1)</sup> **Фитосанитарна регулатива** представља службено правило за спречавање уноса и/или ширења штетних организама која се тичу производње, померања или постојања производа (роба) или других артикала и успостављања процедура за фитосанитарну сертификацију, а *фитосанитарне мере* су било која легислатива, регулатива или службена процедура која за циљ има спречавање уноса и/или ширења штетних организама (ISPM 5).

<sup>(2)</sup> **Међународни стандарди за фитосанитарне мере** (енг. International Standards for Phytosanitary Measures- ISPM)- представљају оквире за сачињавање фитосанитарних протокола и процедура једне државе и њихово функционално повезивање у национални фитосанитарни систем; настали су у оквиру правно обавезујуће, мултилатералне Међународне Конвенције за заштиту Биља (енг. International Plant Protection Convention- IPPC-) из 1951. године, која је у међународном SPS (Sanitary and phytosanitary-санитарни и фитосанитарни) споразуму у оквиру Светске Трговинске Организације дефинисана као основни стандард у области здравља биља у односу на који чланице треба да хармонизују своју фитосанитарну регулативу и мере.

**EPPO стандарди** су развијени у оквиру EPPO и односе се на производе за заштиту биља (енг. EPPO Standards on plant protection products, PP 1, 2, 3) и фитосанитарне мере (енг. EPPO Standards on phytosanitary measures, PM1-10).

Дијагностички протоколи за штетне организме су, осим као делови ISPM и EPPO стандарда, развијани и од стране организација које функционишу у оквиру индустрије семена, као што су Међународна асоцијација за тестирање семена (енг. International Seed Testing Association - ISTA), Међународна семенска федерација (енг. International Seed Federation - ISF) и Национални систем за здравље семена САД (енг. The National Seed Health System - NSHS), као и у оквиру истраживања чији су резултати приказани у бројним литературним изворима. Тако је развијен и објављен и дијагностички протокол Forster и Schaad за утврђивање присуства *X. t. pv. translucens* у семену стрних жита у оквиру ISTA приручника за тестирање здравственог стања семена (Working sheet no. 68, није више на снази), док су делове дијагностичког процеса за утврђивање *P. s. pv. atrofaciens* и *P. s. pv. syringae* на семену стрних жита објавили и Duveiller et al. (1997). У формирању протокола за узорковање стрних жита у процесима надзора над бактеријама као њиховим патогенима могу се користити и NSHS процедуре за фитосанитарну инспекцију.

### 2.3.2. Заштита

Успех различитих мера заштите од фитопатогених бактерија је спорадичан (Clafin, 2003). Сваки од протокола има своје предности и недостатке, али се употребом било којег од њих не постиже одговарајући ниво контроле фитопатогених бактерија, због чега је све израженија потреба за њиховом комбинованом применом у оквиру тзв. интегралне заштите биља.

**Коришћење здравог семена (цртификација семена).** Неопходан предуслов за поуздано утврђивање присуства или одсуства патогена у семену представља доступност ефикасних метода за њихову детекцију. Досадашње методе тестирања семена које се заснивају на изолацији, пречишћавању и карактеризацији патогена биохемијским, физиолошким и тестовима патогености захтевају значајан утрошак времена и радне снаге, а препреку њиховом успешном коришћењу представља и потреба тестирања великог броја семена у ограниченом временском периоду. Због потреба за брзом, специфичном и веома осетљивом методом за детекцију сојева који припадају *P. syringae* комплексу, развијене су PCR методе за рану детекцију циљаних сојева на пасуљу (Audy et al., 1996; Cho et al. 2009), парадајзу (Fanelli et al. 2007), биљкама фамилије *Cucurbitaceae* (Shila et al., 2013) и грашку (Grimault et al., 2012). Упркос прогресу постигнутом у скорашње време, већину ових метода и даље

карактерише мали ниво осетљивости, због чега оне нису довољно поуздане када је потребно осигурати одсуство патогена из семена.

**Примена агротехничних мера** као што су промишљен избор биљних врста у плодореду (Cintas et al., 2002), уништавање корова, санитација оруђа, уклањање жетвених остатака и уништавање самониклих биљака може бити ефикасно средство за смањење инокулума или органичавање његовог умножавања.

**Хемијско сузбијање - употреба антибиотика.** Употреба антибиотика за сузбијање фитопатогених бактерија (стрептомицин, окситетрациклин, гентамицин, касугамицин и оксолинска киселина) у САД је углавном ограничена на високовредне усеве као што су воће и поврће (McManus et al., 2002; Vidaver, 2002; Clafin, 2003; Stockwell and Duffy, 2012; Sundin et al., 2016). У другим земљама дозволе за употребу имају и гентамицин, новобиоцин и терамицин. Међутим, на овај начин антибиотици директно улазе у ланац људске исхране и могу допринети појави резистентности хуманих патогена, због чега је њихова шира примена ограничена у многим земљама, док је негде (ЕУ) и забрањена. Код дуже употребе антибиотика, развија се резистентност бактеријских популација, па је код неких сојева *Pseudomonas* и *Erwinia* дошло до појаве резистентности на стрептомицин, док је резистентност на окситетрациклин ретка (McManus et al., 2002), а забележени су и примери резистентности на гентамицин и оксолинску киселину (Sundin et al., 2016). Стратегија даље употребе антибиотика која врши селекцију на резистентност циљаних организама у светлу растућег броја примера хоризонталног трансфера гена и стицања гена резистентности на стрептомицин од стране биљних патогена у многим екосистемима, није одржива (Sundin et al., 2016).

**Хемијско сузбијање - употреба једињења на бази бакра.** Међу свега неколико комерцијално доступних бактерицида, једињења на бази бакра су најзаступљенија и постала су стандардни третман. Иако су многа истраживања показала ефикасност третирања бакарним једињењима у сузбијању *P. syringae* популације на једногодишњим биљкама, масовна употреба ових средстава може довести и до низа нежељених ефеката, као што су развој резистентности (Pernezny et al., 1995), као и неефикасност препарата због стварања хелата са органским једињењима на површини биљака (Menkissoglu and Lindow, 1991) или немогућности доспевања до бактерија које се у епифитној фази налазе у облику биофилма на површини листова (Morris and Monier 2003; loc. cit. Lamichhane et al., 2015). Дуготрајна употреба фунгицида на бази бакра може довести и до стварања микрофлоре резистентне и на бакар и на антибиотике, због генетичке повезаности ове две отпорности (Gouk et al., 2010), док

Iacobellis и LoCantore (2010) указују на врло извесну перспективу губљења бакра као скоро јединог средства у заштити биља против бактерија.

Адекватне хемијске мере заштите од бактерија рода *Xanthomonas* као патогена стрних жита нису доступне (Duveiller, 1994c; Kandel et al., 2012), а неколико претходних покушаја употребе третмана бакар ацетатом (Schaad et al., 1981), формалином (Duveiller, 1989) и гуазатином (Mehta, 1986b; Mehta and Bassoi, 1993) није заживело због њихове фитотоксичности.

**Отпорност биљака домаћина.** Провера осетљивости сортимента биљака домаћина указује на ризик који носе гајење и ширење осетљивих генотипова у производњи. Мали број аутора се бавио истраживањем отпорности сорти стрних жита према патоварима *P. syringae*, јер су се ова истраживања углавном односила на отпорност према *X. translucens* патоварима и то како на комплетну квалитативну, тако и на полигену парцијалну квантитативну отпорност (Pereira et al., 2000), као и наслеђивање отпорности (Tillman and Harrison, 1996)<sup>(1)</sup>. Такође, с обзиром да ови патогени нису били укључивани у програме оплемењивања (Vassilev et al., 1995) и утврђивања генетске основе наслеђивања отпорности код стрних жита (Maraite et al., 2007), у овој области нису ни развијене модерне методе тријаже на отпорност попут коришћења генетичких маркера. Опсежнија тријажа на отпорност сортимента стрних жита, а пре свега пшенице према *P. s. pv. syringae* и *P. s. pv. atrofaciens* се одвијала после вештачке инокулације биљака у различитим фазама развоја, и то углавном само у условима влажне коморе или стакларе, а ретко у пољским условима (Maraite et al., 2007).

Широк опсег квантитативних разлика у вирулентности утврђен је међу 1120 сојева *P. s. pv. atrofaciens*, патогена пшенице у Бугарској (Vasilev et al. 1988; loc. cit. Maraite et al., 2007).

---

<sup>(1)</sup> Истраживања отпорности су обухватила развој и примену "screening" метода за процену гермплазме стрних жита на отпорност на бактериозну пругавост и црнило плева и утврђивање извора отпорности (Tillman et al., 1999; El Attari et al., 1996a и 1996 b; Milus et al, 1996; Kandel et al., 2012). Неки аутори наводе доступност умерено отпорних (Akhtar et al., 1986) и отпорних сорти (El Attari et al., 1996b), као и то да ниво отпорности зависи од врсте стрних жита (Milus and Mirlohi, 1994). Свега 8,3% принова пшенице од 605 испитиваних принова из Америчке националне колекције стрних жита (енг. USDA National Small Grain Collection, NSGC)) и свега два генотипа ражи од 645 испитивана генотипа озиме и јаре пшенице, јечма и ражи је било отпорно према *X. t. pv. undulosa* соју BLSW16 (Adhikari et al., 2012), односно највирулентнијем соју *X. t. pv. cerealis* (Falahi Charkhabi et al., 2015). Уочено је и да отпорност сорти није увек у корелацији у односу на црнило плева и пругавост листа, односно да има сорти које су отпорне на црнило плева, а умерено отпорне на пругавост листа и обрнуто (Tillman et al., 1996b).

Озиме пшенице Садово и Тракија су коришћене за раздвајање 4 расе *P. s. pv. atrofaciens* (Vasilev et al. 1988; loc. cit. Maraite et al., 2007), док разлике у реакцији сорте Star указују на појаву раса *P. s. pv. atrofaciens* и у Немачкој (Toben et al., 1991). Matveeva et al. (2003) су утврдили да *P. syringae* има висок степен варирања у вирулентности у односу на различите биљне врсте (јечам, пшеница, раж) и генотипове стрних жита у Русији.

Скале за оцењивање инфекционог одговора сорти стрних жита према патоварима *P. syringae* које су развили Saari и Prescott (1975) (укључујући и модификације ове скале), Shane и Baumer (1987) и Duveiller (1994a) се могу примењивати када су биљке у фази класања и зрелости, а скале које су развили Sellam и Wilcoxson (1976) и Vassilev et al. (1995) се могу примењивати када су биљке у фази клијанаца.

Податке о генетичком материјалу (линије, генотипови, сорте) пшенице чија је отпорност потврђена у истраживањима објавили су Akhtar et al. (1986), Shane и Baumer (1987), Kotlyarov (1991) (loc. cit. Maraite et al., 2007), Vassilev et al. (1995) и Matveeva et al. (2003), док су Toben et al. (1989) објавили да је приликом испитивања осетљивости сортимента према *P. s. pv. atrofaciens* већина сорти јарих и озимих пшеница показала ниску осетљивост. Виши ниво отпорности је уочен код биљака рода *Aegilops* него код сорти пшенице (Vassilev et al., 1995).

**Биолошка заштита.** Међу методама биолошке заштите позната је и инокулација надземних делова или корена сојевима сапрофитних бактерија и ризобактерија (енг. Plant growth promoting rhizobacteria - PGPRs) која претходи инокулацији патогеном (Lamichhane et al., 2015). Ови сојеви спречавају развој популације патогена и изазивају системски стечену отпорност или одговор биљака сличног карактера, смањујући могућност да патоген колонизира биљку и изазове болест. Тако је претходна колонизација соје епифитним сојем *P. syringae* 22d/93 који ствара сирингомицин, сирингопептин и токсин инхибитор биосинтезе аргинина, довела до значајног смањења количине инокулума *P. s. pv. glycinea* (Völksch and May, 2001; Wensing et al., 2010), а заштиту краставца од *P. s. pv. lachrymans* су обезбедиле ризобактерије *P. putida* и *Serratia marcescens* (Liu, 1995; loc.cit. Clafin, 2003) које раст биљака подстичу на различите начине. Као агенси који се користе за биолошко сузбијање наводе се и *P. fluorescens*, ефикасан у контроли *P. tolaasii* на шампињонима (Miller et al., 1995; loc. cit. Clafin, 2003), *Pantoea agglomerans* која спречава развој *P. s. pv. syringae* на јечму и у пољским (за 45-78%) и у лабораторијским (50-100%) условима (Braun-Kiewnick et al., 2000), као и фолијарни сој *P. syringae* Cit 7 који ефикасно спречава развој бактериозне

пегавости парадајза у пољским условима на неколико локација у Северној Америци (Wilson et al. 2002). Ефикасност биолошких агенаса у условима поља може да варира због разлика у диверзитету сојева и услова спољашње средине у односу на контролисане услове у којима се развијају њихови препарати. Комбинована примена агенаса и третмана, попут примене PGPSs, *Azospirillum brasilense*, стрептомицин сулфата и хемотермичког третмана семена која даје задовољавајуће резултате у сузбијању бактериозне пегавости парадајза (Bashan and De-Bashan, 2002), указују на могући правац даљег развоја методологије биолошке заштите.

У смањењу густине епифитне популације *X. t. pv. translucens* пре развоја болести, улогу могу имати и антагонисти и друге епифитне бактерије (Stromberg et al., 1999; Stromberg et al., 2000).

**Стратегије са перспективом.** Међу производима чија је употреба последњих деценија у порасту јер превазилазе ограничења познатих бактерицида, истиче се ацибензолар С-метил (енг. acibenzolar-S-methyl) (ASM, ВТН, Вion или Actigard). Овај препарат индукује системски стечену отпорност и доприноси значајном спречавању развоја бактериозне пегавости парадајза у пољским огледима (Louws et al., 2001; Wilson et al., 2002), мада његова шира примена, због забележених негативних утицаја на пораст и принос неких биљака (Romero et al., 2001) захтева претходну оптимизацију. Све већу примену има и нетоксични биоразградиви полимер хитосан са својством изазивања имуног одговора биљака, који је у примени за широк спектар биљних патогена укључујући и сојеве *P. syringae* комплекса и делује и на успостављене биофилмове бактерија (Xing et al., 2015). Забележен је и све већи значај силицијума у повећању одбрамбених механизма домаћина против бактерија, проузроковача пегавости парадајза (Andrade et al., 2013), а утврђено је да гајење пшенице на земљишту обогаћеном силицијумом повећава отпорност биљака и према *X. t. pv. undulosa*, као најзначајнијој бактериози стрних жита у Бразилу (Silva et al., 2010).

Новија истраживања указују и на значајну антибактеријску активност неких есенцијалних уља против бактерија родова *Clavibacter*, *Curtobacterium*, *Rhodococcus*, *Erwinia*, *Xanthomonas*, *Ralstonia* и *Agrobacterium*, али је ова активност била далеко мања код бактерија рода *Pseudomonas* (Iacobellis and Lo Cantore, 2010). У истраживањима Lo Cantore et al. (2003), на патоваре *P. s. pv. syringae* и *P. s. pv. atrofaciens*, највећи инхибиторни ефекат су испољила есенцијална уља кима и кумина. Balestra et al. (2009) су показали да су екстракти *Ficus carica*, *Allium sativum* и *Punica granatum* ефикасни у сузбијању *P. syringae* pv. *tomato* на парадајзу.

Као агенси биолошке борбе се користе и бактериофаги који доводе до лизиса ћелија патогених сојева бактерија и могу бити ефикасни у сузбијању бактериоза једногодишњих биљака и у условима стакларе и у пољским условима (Cupples, 1983; Flaherty et al., 2000). Компанија Omnilytics је развила AgriPhage, као читав низ производа који садрже фаге за сузбијање бактерија (Jones et al., 2007).

Од хемијских активатора који индукују отпорност биљака на гљиве, бактерије и вирусе, описују се 2,6-дихлороизоникотинска киселина (енг. 2, 6-dichloroisonicotic acid-INA) и S метил естар бензо (1, 2, 3) тиадизол -7- карбоксиинске киселине (енг. benzo (1, 2, 3) thiadiazole-7- carboxylic acid-S- methyl ester- ВТН) који је комерцијално доступан и дужег дејства код монокотиледоних него код дикотиледоних биљака (Oostendorp et al., 2001; loc. cit. Claffin, 2003). Истраживања Вакуленко et al. (1993) су показала да одређена квартерерна амонијумова једињења (чији хемијски састав се не наводи) имају инхибиторно дејство на сојеве фитопатогених бактерија родова *Xanthomonas*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Erwinia* и *Agrobacterium*. Семе пшенице потопљено у раствор најефикаснијег препарата бр. 3 у трајању од 1 сата је показало 3-6 пута већу клијавост у односу на контролу. Kotlyarov и Kotlyarov (2010) наводе да употреба метионина у веома малим дозама за третирање биљака стрних жита, доводи до дезорганизације бактеријске популације, повећавања отпорности и повећања приноса биљака домаћина.

Најперспективнијим истраживањима у овој области актуелно се сматрају она усмерена на проучавање могућности инхибиције ТЗСС система као једног од најзначајнијих фактора вирулентности фитопатогених бактерија, затим на развој инхибитора формирања биофилмова фитопатогених бактерија, као и на проучавање могућности ометања сигнала за међућелијску комуникацију укљученог у регулацију различитих особина бактерија (енг. quorum sensing) (Sundin et al., 2016).

#### **2.4. Симптоми бактериоза стрних жита**

Први, веома важан корак који битно доприноси правилној идентификацији биљних патогена (Bradbury, 1970) је процена и забележавање симптома који се могу уочити на оболелим биљкама. У литератури су описани симптоми које на стрним житима могу проузроковати различите врсте рода *Pseudomonas* и различити патовари збирне врсте *P. syringae*, као и *Xanthomonas translucens* патовари и врсте родова *Bacillus*, *Clavibacter*, *Erwinia* и *Pectobacterium* (табеле 1, 2 и 3).



*P. s. pv. syringae* се сматра јединственом међу свим патоварима *P. syringae* због своје способности за изазове болест на преко 180 биљних врста из неколико родова који нису у међусобној вези (Valencia-Botin and Cisneros-Lopes, 2012).

Симптоми које на листу стрних жита проузрокује *P. s. pv. syringae* познати су и под називом бактеријска пламењача листа (Sellam and Wilconson, 1976; Valencia-Botin and Cisneros-Lopes, 2012) или лисна некроза (Otta, 1974). Почетак развоја симптома на пшеници испољава се појавом малих воденстих пега без јасних ивица, које се у повољним условима у року од 2-3 дана могу проширити и спајати у неправилне пеге или траке, које некад захватају и 75-100% лисне површине (Otta, 1974; Duveiller et al., 1997; Пасичник et al., 2011). Како ткиво некротира, боја пега се мења од сиво-зелене, преко беж до беле. Боја у оквиру пега често зависи од сорте (Пасичник et al, 2011). Интензитет појаве пега је највећи на доњим и средњим (Пасичник et al., 2011), а у фази влатања и на горњим листовима (Diekmann and Putter, 1995). Са интензивним развојем болести листови изумиру, док се увелост целих биљака ретко уочава (Пасичник et al., 2011). Пеге беж до мрке боје (са јасним ивицама) се понекад појављују на врху или у основи класова (класића) и плева. У случају заражености семена, бактерије се преко клијанаца преносе на здраво лишће (Duveiller et al., 1997). У неким случајевима се, после слабе росе или кише, на наличју старијих воденстих пега уочава и бактеријски ексудат (Sellam and Wilcoxson, 1976).

*P. s. pv. atrofaciens*. У тексту који је на Руском порталу Агроатлас (Afonin et al., 2008) приредио Лазаров на основу референци руских истраживача, објављених у периоду 1938-2005. године, наводи се да *P. s. pv. atrofaciens* изазива симптоме на семену и плевама, али и на листовима и другим вегетативним деловима биљака пшенице. Симптоми су описани углавном на пшеници и јечму: типични симптоми се појављују у фази наливања зрна (Пасичник et al., 2011) на плевама, чија основа (најчешће доња трећина) постаје тамно мрка до црна (Diekmann and Putter, 1995; Duveiller et al., 1997). Симптоми на унутрашњој страни плева су израженији него на спољашњој страни, а некада се на ивици лезија уочавају ситне воденсте пеге (Toben, 1989). Мрље са плева понекад прелазе на осје, а при јачем нападу потамне и све певе у класу, као и његов вршни део и осовина (Пасичник et al., 2011). Ако до инфекције дође пре млечне зрелости, болест се шири и на зрна која постају сувомрка са тамнијом клицом, лагана и штурра. Пошто се бактерије преносе семеном, при јаким инфекцијама пропада или семе у земљишту или клијанци при ницању.

Мада је симптом трулежи основе плева типичан за овог патогена, сличне симптоме могу изазвати и патогени као што је гљива *Septoria nodorum*, генетички меланизам или оштећења од мраза (Schultz and Ronald, 2008).

Такође, на класовима може доћи и до појаве атипичних симптома који могу бити последица или слабијег интензитета инфекције са *P. s. pv. atrofaciens* (Afonin et al., 2008) или абиотског стреса који проузрокује симптоме познате под називима мрка некроза, меланизам или лажна мрка пегавост, када читава плева од основе до врха има тамно мрке или црне пруге. Ови атипични симптоми су често погрешно приписивани *P. s. pv. atrofaciens*, а у неким случајевима су се и појавили као додатак симптомима које проузрокује овај патоген (Wilkie, 1973).

Иако *P. s. pv. atrofaciens* ретко остварује инфекције у фази клијања и бокорења, у случајевима раних инфекција јавља се патуљавост биљака (Afonin et al., 2008). На листовима се у почетку појављују прозирне, уљасто-воденасте, жуте или беле пеге, без бактеријског ексудата, које се временом шире, суше и тамне, а ивице добијају мркољубичасту боју (Afonin et al., 2008), док стабло може и да потамни (СИММУТ, п. д.) При јачим инфекцијама долази до сушења појединачних листова, а понекад и целе биљке (Пасичник et al., 2011).

***P. s. pv. japonica***. Симптоми које изазива *P. s. pv. japonica* су познати под називом бактеријско црnilо нодуса или бактеријска пругаста пламењача, јер се на нодусима и на интернодијама пшенице и јечма појављују тамно мрке лезије које касније мењају боју у мркоцрну (Young, 1992). Valencia-Botin and Cisneros-Lopes (2012) наводе да овај патоген може да изазове неупечатљиве, мрко црне зоне у основи сваке пелеве која покрива зрно, као и пламењачу или пругасте зоне на нодусима стабљике пшенице.

***P. s. pv. coronafaciens*** и ***P. s. pv. striafaciens***. Ореолна пегавост коју проузрокује *P. s. pv. coronafaciens* прво је описана на овсу 1920. године од стране Elliot-а (Duveiller et al., 1997). Једна од карактеристика патогена који проузрокује ореолну пегавост стрних жита је стварање токсина растворљивих у води који проузрокују хлоротични прстен око места продора.

*P. s. pv. coronafaciens* се на овсу обично уочава на листовима, али понекад и на рукавцима и плевама. Лезије су у почетку овалне и светлозелене, смештене око стома као места продора бактерија у биљку. У централном делу пеге се ствара улегнуће, а пеге су сивкасте и суве и достижу пречник од једног до неколико центиметара са светлозеленим до жутиим ореолом који је обично ширине око 1 cm. Око ореола настаје зона бледо винасте боје која се може простирати дуж лиске и по неколико

центиметара. Неке пеге немају довољно јасно изражену ореолну зону. На појединим лискама пеге су многобројне и расуте по целој површини. Оближње пеге се најчешће спајају и стварају хлоротичне неправилне површине. Спајање пега у горњем терминалном делу изазива опште жутило прво врхова, онда и целих лиски, обично праћено уздужним узаним пругама, винасте боје. Овакво лишће се суши и деформише (Шутић, 1956). Ткива нису воденаста и обично не долази до појаве ексудата, али се понекад на неким листовима и са лица и са наличја формира беличаста наслага бактеријског ексудата (Шутић, 1956).

На лишћу ражи се уочавају елипсоидне до линеарне мрке лезије које су оивичене благом хлорозом и често се запажају током зиме, заједно са оштећењима од мраза. Симптоми ореолне пегавости су уочљивији у рано пролеће када су температуре умерене (максимум 15-22°C) и из њих се патоген најлакше може изоловати током марта и априла, док се до краја маја може изоловати само из лезија неких сорти (Cunfer and Schaad, 1976). Појава хлоротичних лезија после класања је мање уобичајена. Ореолне пеге постају благо обојене и током наредних један до два дана лезија добија "крастав" или "опарен" изглед. Ови симптоми су чешћи од цветања до сазревања, али се у периоду до пуне зрелости могу препознати и карактеристичне ореолне пеге. Ситне ореолне пеге се некад могу јавити на плевама, али је најчешће читав класић избељен и сув (Cunfer et al., 1978).

Иако су ореолне пеге лако препознатљиве, оне не представљају најуобичајенији симптом *P. s. pv. coronafaciens* на ражи током трајања вегетације. Од 118 сојева *P. s. pv. coronafaciens* које је у периоду преко 40 година у Манитоби изоловао Hagborg (loc. cit. Cunfer et al., 1978), само 36 сојева је изоловано са листовима са карактеристичним симптомом ореолне пегавости, док се у литератури описује и формирање некротичних пруга и некротичних лисних пега жуто смеђе боје. Симптоми варирају, највероватније и као одговор на варирање услова температуре.

Према Bowden и Stromberg (1982), пеге на листу кукуруза су тамно мрке, скоро елиптичне, издужене (3 cm дуге), окружене широким хлоротичним ореолом, ограничене на доње листове и концентрисане око врхова листовима. Пеге се могу спојити, што даје ефекат пламењаче листа.

На травама (*Bromus inermis* Leyss, *Poa pratensis* L., *Calamagrostis canadensis* (Michx.) Beauv.) *P. s. pv. coronafaciens* проузрокује симптом интензивне пламењаче листовима који почиње појавом малих, пурпурно браон лезија са хлоротичним ореолом које се временом повећавају (McBeath and Adelman, 1986b).

. *P. s. pv. striafaciens* на јечму изазива симптоме пламењаче и то најпре ситне воденасте пеге које се шире, а некад и спајају у пруге или веће пеге које прате ивицу листова, док у случају јаких инфекција долази и до пропадања листова, али ретко настају веће штете (Bugwood Wiki, n. d.). Када се провера патогености врши у експерименталним условима, у комори са подешеном влагом, *P. s. pv. striafaciens* на овсу не ствара исте симптоме као у природи, јер нема стварања линија које прате ивице листова, него само локализованих пега, што значи да у природи, осим влаге и неки други фактори утичу на стварање карактеристичних симптома (Barta and Willis, 2005).

*Pseudomonas fuscovaginae*. Diekmann and Putter (1995) и Пасичник et al. (2011) наводе да се симптоми које овај патоген проузрокује на пшеници испољавају у виду неправилних, угластих тамних пега оивичених тамнољубичастим воденастим зонама. Лезије су некротичне и могу бити дужине од 10 до 20 cm. Duveiller et al. (1989) су објавили први налаз бактерије *Pseudomonas fuscovaginae* Miyajima, Tanii and Akita nom rev.1983, проузроковача бактеријске трулежи лиске пиринча у Јапану на домаћину који није пиринач (кукуруз и сирак). На кукурузу овај патоген проузрокује велике, нерегуларне, пурпурно браон лезије од којих лист кукуруза постаје пурпуран. Ова врста симптома се сматрала безбедним обезбојавањем и претходно је била приписивана сапрофитним организмима који се одржавају на полену.

*Pseudomonas cichorii*. Симптоми које ова бактерија проузрокује на биљкама пшенице се појављују у раним фазама раста и током млечне зрелости када се некроза ткива појачава, тј постаје све тамнија. Заражене биљке се препознају по обезбојеним празним класовима, тамњењу основе класа, дршке и стабла, док се између нодуса развија ситна светломрка некроза стабла (Пасичник et al., 2011).

*Pseudomonas ramonicum*. Пасичник et al. (2011) наводе да ова бактерија изазива обољење које је описано само у Русији. Бактерија напада све делове биљке, али најчешће изазива трулеж стабла и зрна. Болест се посебно шири у условима топлог времена током формирања и поновног раста изданака у рано пролеће. У основи класа се појављују жуте пеге са браон ивицом које се шире и захватају читаво стабло. Касније сва ткива стабла тамне и пропадају. Прва два или три листа губе тургор и на њима се јављају уљасте мрке пеге и пруге. Листови постају светлозелени, потом жути и вену. На зараженим биљкама су зрна неразвијена, мрка и штура и некад са тамном клицом. Приликом клијања површина зрна постаје тамна и трули, а клица пропада. На овим биљкама је осим *P. ramonicum* изолована и *P. carotovorum*. Сличне симптоме изазивају и гљиве: *Alternaria*, *Macrosporium*, *Fusarium* и *Cladosporium*. Аутори

закључују да некроза стабла и корена представља комплекс обољења које изазивају и гљиве и бактерије *P. ramonicum* и *P. carotovorum*.

***Pseudomonas fluorescens***. Слабо агресивне и оксидаза позитивне сојеве ове бактерије су изоловали Пасичник et al. (1991) на ражи и то као пратиоце *P. s. pv. atrofaciens*. Изоловани сојеви су били хетерогени у односу на своје биохемијско-физиолошке одлике и свртани у 4 биовара. Пасичник et al. (2011) наводе да бактерија изазива трулеж стабла и зрна које губи клијавост. Патогени сојеви у Украјини су изоловани из главе корена, увелих младих листова, зрна и осја са мрким пегама биљака пшенице. Alexandrova et al. (1995) су од 101 изолованог и изабраног соја са пшенице, за 7 сојева који су проузроковали симптоме (некрозе) на сејанцима пшенице утврдили да су припадници комплекса *P. fluorescens*. Фитопатогеност није неуобичајена за неке сојеве *P. fluorescens* (Calzolari and Bazzi, 1985; loc. cit. Alexandrova et al., 1995), па се поставља питање њихове улоге у интеракцији биљака и чланова *P. syringae* групе у појави синдрома трулежи основе плева и лисне пламењаче. Патогеност опортунисте *P. fluorescens* се објашњава неповољним климатским условима, земљишним факторима и применом агротехничких мера које смањују отпорност биљка и повећавају осетљивост на опортунистичке бактерије.

***Xanthomonas translucens***. Симптоми овог патогена су описани на различитим биљним врстама стрних жита и уочавају се у виду воденстих лезија (пеге или пруге) на осју, основи класа и листовима које постају беж или у виду прозирних некротичних лезија (изузев љубичастих до црних лезија у основи класа, повремено са жутим центром) (Diekmann and Putter, 1995). Типични симптоми на листу испољавају се појавом издужених некроза светло браон боје, дужине неколико центиметара, које се у почетку развоја болести налазе појединачно на листу, а касније се стапају у веће некротичне површине. Симптоми се често развијају у средини листа где се роса ујутро дуже задржава. Почетне некрозе су воденасте и у влажним условима стварају ексудат налик меду (Duveiller and Maraite, 1993b), који касније отврдне у облику жућкастих, смоластих, лако уочљивих гранула по површини некротичних површина (Zillinsky, 1983). Кад је роса, киша или у присуству гутационих капи, ове грануле се често спајају и формирају млечне капи које се касније могу проширити по лисној површини и после сушења подсећати на танки, сивкасти скоро провидни слој. Не постоје јасни докази о присуству инфекције у пољу пре влатања (Duveiller, 1994c). У условима јаче инфекције лишће се суши. На стаблу се јављају беле до мрке пруге, док је део стабла испод класа некад потпутно мрк (Wegulo, 2006). Тамњење се јавља на вршним деловима класића, а

касније се мрке уздужне пруге јављају дуж класића. Јако заражене биљке не формирају класове, док се при нижем интензитету болести формирају штура зрна са жућкастим тракама (Afonin et al., 2008). Присуство овог патогена на плевама испољава се наизменичном појавом здравих и оболелих делова масног изгледа у облику трака на осју, што је корисна дијагностичка особина у пољу. Болест се чешће испољава на селекционим него на производним пољима, а за интензивнију појаву је потребан период кише или високе влажности. Овај симптом се лако може заменити са симптомом мрке меланозе и симптомима који проузрокују други патогени као што су *Bipolaris sorokoniana*, *Alternaria* spp., *Septoria nodorum* и *P. s. pv. atrofaciens*.

***Bacillus megaterium* pv. *cerealis*.** Hosford (1982) наводи да ова Грам позитивна бактерија проузрокује појаву интензивних белих до беж пруга или мрља на листовима пшенице, што је симптом до тада приписиван већем броју фактора као што су присуство *P. s. pv. syringae* (од чијих се симптома разликује по ширини мрља и недостатку почетне воденасте фазе пруга), присуство вируса који проузрокују жуте и беле пруге и пеге на листовима пшенице, недостатак бакра и азота, деловање озона и водоник диоксида и сл.

***Erwinia rhapontici*.** Заражено семе пшенице је светло ружичасте боје због присуства дифузног пигмента који ствара бактерија у семењачи (Diekmann and Putter, 1995), па ови симптоми подсећају на семена третирана пестицидима која садрже боје или семена биљака заражених гљивама рода *Fusarium*, док симптом наранџастих плева може бити везан и за комплекс бактерија *E. rhapontici* и *Xanthomonas campestris*, као и дејство бактерија из рода *Serratia*. Пасичник et al. (2011) наводе да *E. rhapontici* није економски значајан патоген, јер је уочени број семена са ружичастим пигментом мали.

***Rathayibacter iranicus*** изазива гумозу класова пшенице (Duveiller et al., 1997) .

***Rathayibacter tritici*.** Duveiller et al. (1997) описују пламењачу класа као комплекс болести која укључује *Rathayibacter tritici* и нематоду *Anguina tritici* која ствара гале на неким сортама пшенице. Одликује је појава сјајне жуте гумасте материје на површини листа млађих биљака и бесемених класова, а Diekmann и Putter (1995) описују појаву ове материје и на одбаченом лишћу и на класовима који су са њима у контакту у фази влатања. Када се класови појаве из рукавца они су узани и кратки, а зрна се пуне бактеријском масом и класићи се деформишу. Код класова који имају симптоме ове болести, дршка класа је увек уврнута. Векторе *Rathayibacter tritici* представљају ларве и гале нематодe *Anguina tritici* која може да преживи у земљишту 5-7, а у сувом зрну и преко 20 година.

Типични симптоми болести се појављују у фази сазревања пшенице. Биљке са слабијим интензитетом заразе касне у развоју и формирају патуљасте класове, док у случајевима јачег напада пшеница најчешће не класа, јер клас остаје у рукавцу, а биљке готово да не дају принос (Пасичник et al., 2011).

***Clavibacter michiganensis subsp. tessellarius.*** Симптом бактеријског мозаика одликује појава ситних жутих пега са недефинисаним ивицама које су мање или више униформно распоређене по лиски и изгледају као мозаик који проузрокују вируси (Carlson and Vidaver, 1982; Duveiller et al., 1997). Појединачне лезије личе на хиперсензитивну реакцију коју код пшенице могу изазвати рђе. Пеге нису воденасте и у њима није уочена појава бактеријског ексудата. Пасичник et al. (2011) наводе да се на листовима појављују ситне жуте пеге са тестерастим ивицама које се некада спајају у пруге.

***Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum.*** Симптоми присуства ове бактерије се испољавају у рано пролеће, а некад и у периоду децембар - јануар у форми изумирања чвора бокорења пшенице који постаје светломрке или мрке боје (Пасичник et al., 2011). У доњем делу стабла у нивоу земље се формирају зоне трулог ткива у виду мрких, црних или жутих, ограничених, ситних, уздужних пега. На стаблу се често запажају жуте пеге са мрком ивицом које се шире и постају светло мрке пруге. Као резултат тога, један или два рукавца при дну пожуте или потамне и изгубе облик. Најпре трули парехним листа, онда и спроводни судови што доводи до лаког кидања надземног дела биљке. Заражене биљке заостају у порасту и развијају скраћен клас који потамни. У класу се формирају штура зрна, а са јачом појавом болести зрно се и не формира. Развоју болести погодује продужена јесен и честа топљења снега са температурама преко +5°C. У хладним зимама са температурама испод 0°C симптоми се јављају касније, почетком априла. Са порастом биљке пеге на стаблу не нестају и задржавају се до жетве. Основни извор инфекције је семе контаминирано са *P. carotovorum subsp. carotovorum*.

***Pantoea agglomerans.*** Према Пасичник et al. (2011) на здравим семенима пшенице ова бактерија чини 97-100% укупног микробиома. На рукавцима, листовима и стаблу одраслих биљака пре класања се развијају хлоротичне пеге, а око њих мрки обод. На плевама се појављују мрке или хлоротичне пеге.

***Слични симптоми које проузрокују гљиве.*** Све више се сматра да су болести жита које проузрокују бактерије много распрострањеније него што се то до скоро мислило,

из разлога јер сличне симптоме на листовима пшенице и јечма могу проузроковати и гљиве *Fusarium culmorum*, *Leptosphaeria (Septoria) nodorum*, *Leptosphaeria (Septoria) tritici*, *Pyrenophora tritici-repentis*, као и други абиотички и биотички фактори, укључујући и епифитну популацију *X. translucens* која има способност стварања честица леда (Toben et al., 1991; Alexandrova et al., 1995; Martinez-Miller et al., 1997). Smith и Hattingh (1991) наводе да су се приликом изолације из некротичних лезија листова пшенице, поред гљива увек појављивале и флуоресцентне бактерије.

У различитим реонима гајења јечма у свету, симптоми на семену јечма су описивани као пламењача семена, бактериозна пламењача зрна, црна тачкавост и промена боје зрна. Проузроковачима пламењаче зрна јечма у горњим деловима Средњег запада САД (Martinez-Miller et al., 1997) су сматране разне гљиве, пре свега *Cochliobolus sativus* и *Fusarium* ("head blight"). Међутим, из наведених симптома су у различитим истраживањима изоловани различити проузроковачи: у Ајдаху и Монтани су изоловане бактерије идентификоване као *P. s. pv. syringae* (Martinez-Miller et al., 1997), у Западној Немачкој *P. s. pv. atrofaciens* као проузроковач трулежи основе класа јечма (Toben et al., 1991), а у Русији бактериозе основе зрна пшенице, јечма и ражи. Приликом истраживања проузроковача тамњења класа и плева, Hagborg (1974) је утврдио 3 агенса: *Xanthomonas*, *Alternaria* и тенденцију биљака да развијају меланизам у одређеним условима спољашње средине, док су мање уобичајени проузроковачи били *Puccinia graminis* Pers., *Cochliobolus sativus* (Ito and Kurib.), *Septoria nodorum* Berk. и *P. s. pv. atrofaciens*. Проузроковачи оваквих симптома варирају и у зависности од географског подручја и године: у Монтани је из 90-100% зрна са овим симптомима изолован *P. s. pv. syringae*, а у другим државама 1991 и 1993 године 5-30% и 1992 године 20-75% (Martinez-Miller et al., 1997).

Лезије које *Leptosphaeria (Septoria) nodorum* формира најчешће захватају целе плеве и врло често се у оквиру лезија уочавају пикниди, док *P. s. pv. atrofaciens* напада само доњу трећину плева (углавном). Такође, до инфекције са гљивом долази раније (у периоду класања) него са *P. s. pv. atrofaciens*. Ако третман фунгицидом није дао жељене резултате, у случају присуства карактеристичних симптома, могуће је да се ради о инфекцији бактеријом (Toben et al., 1991).



## 2.5. Детекција и идентификација најзначајнијих бактерија као патогена стрних жита

Међу бактеријама, патогенима стрних жита економски су најзначајнији и најраспрострањенији патогени варијетети врсте *X. translucens* и збирне врсте *P. syringae* (Duveiller et al., 1997). С обзиром да у нашим истраживањима диверзитета бактерија као патогена стрних жита у Србији није утврђено присуство *X. translucens*, а имајући у виду постојање високог ризика од његовог уношења и ширења као карантинског штетног организма за Србију, овде ће бити приказан само кратак преглед метода за детекцију и идентификацију овог патогена, док ће ове методе за *P. syringae* бити изложене детаљније у потпоглављу (2.5.1.).

Детекција и идентификација сојева патогених варијетета врсте *X. translucens* започиње **изолацијом патогена** на неку од одговарајућих селективних и семиселективних подлога као што су КМ-1 подлога (Kim et al., 1982), ХТС подлога (Schaad and Forster, 1985), модификована ХТС подлога (Clafin and Ramundo, 1987) са смањеном количином гентамицина (Schaad and Forster, 1989) и WBC подлога као модификација Wilbrink-ове подлоге у коју се додају борна киселина, цефалексин и циклохексамид (Duveiller, 1989; Duveiller, 1990; Duveiller and Bragard, 1992; Bragard et al., 1993)

Даља карактеризација добијених колонија бактерије врши се применом (појединачно или у комбинацији) различитих метода, међу којима се истичу **серолошке методе** (DIA метод (енг. dot immunobinding assay) (Clafin and Ramundo, 1987)), ELISA тест (Frommel and Pazos, 1994), моноклонална антителиа (Bragard and Verhoyen, 1993; Kayali et al., 2004) и IF тест), затим **молекуларне методе** (конвенционални (Maes and Garbeva, 1994; Maes et al., 1994) и real time PCR (Langlois et al., 2017) и ДНК-ДНК хибридизација (Schaad et al., 2000)), као и методе **филогенетске анализе** које подразумевају коришћење 16S rRNA секвенце (Hauben et al. 1997), коришћење MLST шема (шема Young et al. (2008) са генима *dnaK*, *fyuA*, *gyrB* и *rpoD* и шема Almeida et al. (2010) са генима *fusA*, *gapA*, *gltA*, *gyrB*, *lacF* и *lepA*), коришћење секвенце једног локуса (*gyrB* гена) (Parkinson et al., 2009), као и дијагностичке алатке које омогућује секвенционирање целог генома различитих патовара *X. translucens* (Langlois et al., 2017).

### **2.5.1. Детекција и идентификација бактерија рода *Pseudomonas*, патогена стрних жита**

С обзиром да се сматра да је велики број фитопатогених бактерија рода *Pseudomonas* специјализован према домаћину, прелиминарну процену идентитета проузроковача биљне болести најчешће омогућавају подаци о томе на ком домаћину је патоген утврђен и типу симптома које је проузроковао. Са овим подацима се комбинује и резултат коришћења семиселективне подлоге која фаворизује развој флуоресцентних бактерија рода *Pseudomonas*, а хиперсензитивном реакцијом дувана се најчешће процењује да ли је изоловани сој патоген.

После детекције и изолације, даља идентификација до врсте се код флуоресцентних представника рода *Pseudomonas* углавном заснива на утврђивању LOPAT карактеристика (Lelliot et al, 1966). За диференцијацију на нивоу врста *Pseudomonas* служе и Биолог и Биотип-100 системи, анализа профила масних киселина (Stead, 1992; loc. cit. Ćerņi and Gürel, 2012) - корисна за диференцирање главних филогенетских група, као и SDS-PAGE ћелијских протеина чији су профили протеина специфични за врсту, али ни једна од ових метода не пружа могућност диференцијације до нивоа патовара (Hofte and de Vos, 2007).

Идентификација до патовара је увек много сложенија него идентификација до врсте, те су сојеви *P. syringae* у оквиру и између патовара описивани коришћењем и фенотипских, генетичких и филогенетских карактеристика. Већина аутора се слаже да сојеви унутар патовара *syringae* представљају веома хетерогену популацију (Stead et al., 2003). У истраживања је, ради упоређивања са карактеристикама проучаваних сојева потребно укључити и сојеве чији је идентитет претходно утврђен (типски или референтни сојеви, доступни из националних колекција култура).

#### **2.5.1.1. Изолација патогена**

Циљ изолације је добијање чисте културе бактерија за њихову даљу идентификацију и епидемиолошка и друга истраживања.

**Подлоге за изолацију.** За изолацију флуоресцентних фитопатогених врста рода *Pseudomonas* са различитих делова биљака (али и из спољашње средине) је погодна семиселективна модификована Кингова подлога Б (КВС) са ограниченом количином

гвожђа (Mohan and Schaad, 1987; Monteil et al., 2013), на којој 24 до 48 часова од засејавања ове бактерије производе карактеристични жуто-зелено-плави флуоресцентни пигмент који се уочава помоћу UV светла дужине 366-400nm. КВС подлога представља модификацију основне Кингове подлоге Б насталу додавањем борне киселине, цефалексина и циклохексамида или нистатина у основну подлогу. Високу селективност КВС подлоге обезбеђује пре свега борна киселина јер су фитопатогене бактерије способне да у њеном присуству расту и да се развијају, а уједно долази и до значајне редукције сапрофита (Mohan and Schaad, 1987; Monteil et al., 2013). За изолацију бактерија рода *Pseudomonas* из земљишта, добру селективност испољава селективна подлога сиромашна хранљивим материјама (селективна NAA подлога), која се састоји од раствора соли Winogradsky ( $K_2HPO_4$ ,  $MgSO_4 \times 7H_2O$ , NaCl,  $MnSO_4 \times H_2O$ ,  $NH_4NO_3$ ), N-lauroysarcosine Na-соли, агара, casaminoacid-a, trimethoprim-a и нистатина (Aagot et al., 2001).

Издавање циљаних колонија патогена са подлога потенцијално могу отежати флуоресцентне сапрофитне бактерије рода *Pseudomonas* који на биљкама спадају у једну од 3 врсте: *P. fluorescens*, *P. putida* и *P. chlororaphis*. Од потенцијалних патогена се разликују по морфолошким карактеристикама колонија, количини стварања флуоресцентног пигмента (патовари *P. syringae* су обично плави и стварају мање пигмента од сапрофита који су чешће зелене боје и испољавају слабију флуоресценцију у односу на сапрофите) и основним LOPAT карактеристикама (Schaad et al., 2001).

### **2.5.1.2. Морфолошке, одгајивачке и биохемијско-физиолошке карактеристике**

За карактеризацију и/или диференцијацију сојева фитопатогених бактерија користе се тестови којима се утврђују њихове морфолошке, одгајивачке и биохемијско-физиолошке карактеристике.

Према Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Bergey and Holt, 1994), представници рода *Pseudomonas* су Грам негативни, прави или благо заобљени штапићи, димензија 0.5-1.0 x 1.5 -5.0  $\mu m$ , код којих постојање стадијума за преживљавање (спора) није познато; покретљивост остварују помоћу једне до неколико флагела (ретко нису покретни); аеробни су микроорганизми са кисеоником као терминалним примаоцем електрона у респираторном метаболичком систему, којима у неким случајевима развој и у анаеробним условима омогућава нитрат као

примаоц електрона; већина, ако не и све врсте не могу да се развијају у киселим условима (рН 4.5); оксидаза позитивни или негативни организми; каталаза позитивни; широко распрострањени у природи; неке врсте су патогени људи, животиња или биљака.

Фитопатогене бактерије рода *Pseudomonas* се деле на флуоресцентне (које стварају жуто-зелени дифузни пигмент на неким хранљивим подлогама сиромашним гвожђем (нпр. Кингова подлога Б), али не накупљају поли-бета-хидрокси-битурат (РНВ)) и на не-флуоресцентне (које не стварају ове пигменте, али накупљају РНВ) (Klement et al., 1990). Са изузетком *P. corrugata*, флуоресцентне бактерије рода *Pseudomonas* не расту на 41<sup>0</sup>С, не користе D-арабинозу као једини извор угљеника, не накупљају РНВ (Schaad et al, 2001), не стварају аргинин дехидролазу, не хидролизују скроб и не врше редукцију нитрата (Klement et al., 1990).

У фитопатогене флуоресцентне бактерије рода *Pseudomonas* спадају *P. syringae*, *P. viridiflava*, *P. cichorii*, *P. marginalis* као и сојеви *P. fluorescens* и *P. aeruginosa* који се сматрају опортунистичким биљним патогенима (Klement et al., 1990). Према Vergey и Holt (1994), одлике *P. syringae* патовара су следеће: имају више од 1 флагеле; стварају флуоресцентни, дифузни пигмент; не стварају ни дифузни ни недифузни нефлуоресцентни пигмент; различито се развијају на 4<sup>0</sup>С; леван стварају варијабилно, не стварају оксидазу, не врше хидролизу аргинина, не врше редукцију нитрата, хидролиза желатина је варијабилна, не врше хидролизу скроба; користе месо инозитол варијабилно.

Као основна шема за идентификацију сојева фитопатогених флуоресцентних бактерија рода *Pseudomonas* до врста (табела 6) се користи LOPAT шема (Lelliot et al., 1966) која обухвата пет тестова (стварање левана, активност оксидазе, пектолитичка активност (способност стварања трулежи кртола кромпира), активност аргинин дехидролазе и хиперсензитивна реакција дувана).

До сада је у литератури описан низ биохемијско-физиолошких тестова који се могу користити у карактеризацији сојева фитопатогених врста рода *Pseudomonas*, али међу тестовима који се користе за патогене стрних жита из овог рода, мали број има и диференцијални карактер (табела 7) (Schaad et al., 2001).

**Табела 6.** LOPAT карактеристике (Lelliot et al., 1966)

LOPAT групе	Леван	Оксидаза	Трулеж кртола кромпира	Аргинин дехидролаза	HR дувана	Врста
Ia	+	-	-	-	+	<i>P. syringae pv</i>
Ib	-	-	-	-	+	<i>P. syringae pv e.g. savastanoi, delphinii</i>
II	-	-	+	-	+	<i>P. viridiflava</i>
III	-	+	-	-	+	<i>P. cichorii</i> <i>P. agarici</i>
IVa	+	+	+	+	-	<i>P. marginalis</i> <i>P. fluorescens</i> (пектол.)
IVb	-	+	+	+	-	<i>P. fluorescens</i>
Va	-	+	-	+	-	<i>P. tolaasii</i> <i>P. gingeri</i>
Vb	+	+	-	+	-	<i>P. fluorescens</i> и неки други сапрофитни <i>Pseudomonas</i>

(+) -80% или више сојева је позитивно; (-)-80% или више сојева је негативно.

**Табела 7.** Биохемијско-физиолошке карактеристике *P. syringae* pv. као патогена стрних жита (модификовано према Hildebrand et al. (1988) и Young and Triggs (1994); loc. cit. Shaad et al, 2001)

Карактеристике	<i>syringae</i>	<i>atrofaciens</i>	<i>coronafaciens</i>	<i>striafaciens</i>
Стварање честица леда	+	+	+	+
Леван	+	+	+	+
Пектолитичка активност	-	-	-	НП
$\beta$ -glucosidase	+	+	+	+
Коришћење:				
D-mannitol	+	+	+	+
Adonitol	-	-	-	-
Inositol	+	+	+	+
D-Sorbitol	+	+	+	+
Trigonelline	+	+	-	-
D-quinic acid	+	+	+	-
Erythritol	+	+	+	+
L(+)-tartaric acid	-	-	-	-
D(-)-tartaric acid	D+	НП	-	-
L-lactate	+	+	-	-
Anthranilate	-	-	-	-
DL-homoserine	-	-	-	-
Glutarate	+	+	НП	НП
DL-glycerate	+	+	НП	НП
Разлагање желатина	+	+	-	НП
Хидролиза арбутина	+	+	НП	НП
Хидролиза ескулина	+	+	НП	НП
Polygalacturonase	-	-	НП	НП
Pectate lyase	-	-	НП	НП
Токсини	+	+	+	НП

(+)- 80 % или више сојева позитивно; (D+)- 80 % или више сојева одложено позитивно; (-)- 80% или више сојева негативно; (НП)-није праћено.

### 2.5.1.3. Серолошке карактеристике

Серолошке реакције бактерија се далеко чешће користе у идентификацији бактерија него у њиховој класификацији (Schaad, 1979), премда су, због специфичности која често код ових реакција није апсолутна, за потпуну идентификацију потребни и додатни физиолошки или биохемијски тестови (Bergey and Holt, 1994).

У идентификацији фитопатогених врста рода *Pseudomonas* су коришћени различити серолошки тестови, почевши од тестова аглутинације (Schaad, 1979), који су због мање специфичности и осетљивости брзо замењени методом **агар преципитације**, коришћеном за идентификацију или разликовање различитих сојева рода *Pseudomonas* (*P. savastanoi*, *P. solanacearum*, *P. avenae*, *P. setariae*, *P. glumae*, *P. andropogonis*) и збирне врсте *P. syringae* (*P. s. pv. phaseolicola*, *P. s. pv. lachrymans*, *P. s. pv. pisi*) (Schaad, 1979).

Специфичност детекције вируса и бактерија је значајно унапређена развојем хибридома технологије и коришћењем специфичних моноклоналних и рекомбинатних антитела. До тада познати и коришћени поликлонални антисеруми су представљали мешавину антитела са вишеструком специфичношћу која настаје на основу разних антигених молекула (укључујући протеине, липополисахариде и екстрацелуларне полисахариде) на површини бактеријске ћелије, па је спектар специфичности антисерума било тешко осигурати, а унакрсна реакција са несродним врстама је била уобичајена. Специфична моноклонална антитела су произведена за следеће врсте/патоваре *P. syringae*: *Pseudomonas avenae* (Pa1 to 5), *P. fuscovaginae* (Pf1), *P. glumae* (Pg1, Pg2), *P. syringae*-6 MABs, *P. s. pv. phaseolicola* (AG1, AG2, Psp1, Psp2, Psp3), *P. s. pv. syringae* (Pss1 do Pss 5), *P. s. pv. tomato* (Ps4e) (Alvarez, 2004).

Данас су и поликлонални и моноклонални антисеруми доступни у различитим облицима, укључујући и тест аглутинације, ELISA, Western blot, IF/IFC тестови и серолошке тест траке (енг. lateral flow devices). Сензитивност ELISA теста ( $10^5$ -  $10^6$ ) је адекватна само за откривање патогена у биљном ткиву са симптомима и идентификацију колонија које се добију на подлози, али се може унапредити коришћењем пуфера за екстракцију. IF (енг. Immunofluorescent) метод се у Европи широко користи у откривању бројних бактеријских патогена у семену и садном материјалу као први тријажни тест у шемама идентификације међународних (EPPO) дијагностичких стандарда. За детекцију бактерија постоје и серолошке тест траке за брзу детекцију који се заснивају на истом принципу као брзи тестови за трудноћу и

међу њима за сада нема комерцијално доступних трака за детекцију *P. syringae* патогена.

Неколико покушаја креирања серолошке класификационе шеме за *P. syringae* од стране разних аутора као што су Lovrekovich et al. (1963), Otta и English (1971) и Pastuchenko и Simonovich (1979) (loc. cit. Ovod et al., 1995) нису комплетирани, а није их могуће ни међусобно упоређивати, јер употребљени сетови бактерија у њиховим истраживањима нису били исти. После екстензивних хемијских и имунохемијских истраживања липо-полисахарида у циљу откривања молекуларне основе имуноспецифичности као основе за таксономију и класификацију, Ovod et al. (1995) су много боље разјаснили улогу липополисахарида у раним фазама интеракције домаћина и патогена као што су неки патовари *X. campestris*, *P. syringae* и други родови бактерија. Применом моноклоналних антитела су дефинисани серолошки типови као делови популације патогена који у многоме поткрепљују кластере формиране применом разних молекуларних метода, укључујући и метод полиморфизма дужине рестрикционих фрагмената (RFLP) (Manceau and Horvais, 1997). Ипак, употребна вредност серолошких типова није до краја разјашњена, јер је у различитим истраживањима утврђена различита корелација између њихове вирулентности, патогености, домаћина и географског порекла (Pasichnik and Khodos, 1996; Пасичник et al., 1991; Pasichnik et al., 2003).

#### **2.5.1.4. Молекуларне карактеристике**

Са развојем молекуларних метода, брзо су предложене и лако примењиве методе идентификације: метода насумичног умножавања полиморфне ДНК (енг. randomly amplified polymorphic DNA - RAPD) (Najafi Pour and Taghavi, 2014), метода полиморфизма дужине умножених рестрикционих фрагмената (енг. amplified fragment length polymorphism - AFLP) (Cirvilleri et al., 2006; loc. cit. Џерни and Gürel, 2012), RFLP метода (Manceau and Horvais, 1997) и метода умножавања на основу репетитивних секвенци (енг. repetitive sequence-based PCR - Rep-PCR) (Versalovic et al., 1991, Weingart and Völksch, 1997, Najafi Pour and Taghavi, 2011). Поуздан метод за потврду идентитета патовара могу представљати и PCR прајмери, који су дефинисани и за већи број врста и патовара *P. syringae* комплекса врста (Palacio-Bielsa et al., 2009; Vanneste et al., 2009; An et al., 2015), али не и за патогене стрних жита.

Технике за утврђивање молекуларних карактеристика сојева *P. syringae* веома брзо преузимају примат у односу на било коју другу врсту тестова и анализа за идентификацију бактерија као биљних патогена (Louws et al., 1999; loc. cit. Hofte and de Vos, 2007). Тако је, на пример, до развоја тестова идентификације заснованих на детекцији гена укључених у стварање токсина дошло због потребе за избегавањем физиолошких, биохемијских и тестова патогености у процесу идентификације и карактеризације патогених сојева хетерогеног *P. syringae* комплекса, посебно у ситуацијама када различити патогени комплекса проузрокују сличне симптоме у истом усеву (Bultreys and Gheysen, 1999).

**Тестови присуства токсина** су од користи за диференцијацију патовара који стварају различите токсине. Основни подаци о токсинима (сирингомицин, сирингопептин, коронатин и табтоксин) као факторима вирулентности патовара *P. syringae* са стрних жита, налазе се у поглављу Фактори патогености и вирулентности (2.2.3.).

Пре развоја молекуларних метода, за утврђивање стварања токсина су се користили одговарајући биотестови са индикатор сојевима *Geotrichum candidum* (сирингомицин), *Bacillus megatherium* (сирингопептин), *Rhodotorula pilimanae* (сирингомицин и сирингопептин) и *Escherichia coli* (табтоксин) (Schaad et al., 2001). PCR технике детекције су развијене за патогене који производе: липодепсинопептиде (Sorensen et al., 1998, Bultreys and Gheysen, 1999), коронатин (Ullrich et al., 1993; loc.cit. Palacio-Bielsa et al., 2009; Bereswill et al., 1994; Zhao et al., 2002), табтоксин (Lydon and Patterson, 2001), фазеолотоксин (Schaad et al., 1995; loc.cit. Palacio-Bielsa et al., 2009) и тагетитоксин (Kong et al., 2004; loc.cit. Palacio-Bielsa et al., 2009). Међутим и нетоксични сојеви који избегну детекцију засновану на проналажењу гена за токсичност могу проузроковати болест, као што је то случај са *P. s. pv. phaseolicola* (Rico et al., 2003; loc.cit. Palacio-Bielsa et al., 2009).

Липодепсинопептиди. Познате су секвенце 4 гена за које се претпоставља да су укључени у регулацију (*syrP*), синтезу (*syrB* и *syrC*) и лучење (*syrD*) сирингомицина. *SyrD* ген је неопходан и за стварање сирингопептина (Bultreys and Gheysen, 1999). Две ДНК пробе синтетисане из *syrB* и *syrD* су потврдиле да су код сојева који стварају токсин, ови гени конзервирани као „једна копија“ у геному бактерија. Sorensen et al. (1998) су у својим истраживањима дизајнирали прајмере и за *syrB* (*B1* и *B2*) и за *syrD* ген (*D1* и *D2*), али су касније развили конвенционални PCR тест само за умножавање *syrB* гена јер се показало да се употребом *B1* и *B2* прајмера добијају специфичнији



производи него употребом *D1* и *D2* прајмера. Vultreys и Gheysen (1999) су у својим истраживањима развили конвенционални PCR тест коришћењем прајмера *syD1* и *syD2* који умножавају секвенце *sydD* гена, неопходног за стварање и сириногомицина и сириногопептина, због чега би требало да је овај ген конзервиран у свим сојевима *P. syringae* који стварају липодепсинопептиде. Ови прајмери су испољили већу специфичност у односу на прајмере за *sydB* ген (B1 и B2) које су дизајнирали Sorensen et al. (1998). Резултати Vultreys и Gheysen (1999) потврђују да излучивање фитотоксина (липодепсинопептида) код сојева патовара *P. s. pv. syringae*, *P. s. pv. atrofaciens* и *P. s. pv. aptata* омогућава исти ген *sydD*, због чега се ова врста теста не може користити за њихово даље раздвајање. Резултати PCR теста засновани на *sydD* гену указују да није присутан код *P. fuscovaginae* иако сојеви ове врсте стварају липодепсинопептиде и потврђује разлике у секрецији између *P. syringae* и *P. fuscovaginae*.

Табтоксин. Lydon and Peterson (2001) су за детекцију *tabA* гена, који кодира стварање табтоксина дизајнирали прајмере *tblA1* и *tblA2* и потом прајмере *tabA1* и *tabA2* који су испољили већу осетљивост јер су детектовани и неки сојеви *P. s. pv. coronafaciens* и *P. s. pv. garcae* које прајмери дизајнирани за *tblA* ген нису могли детектовати.

Коронатин. Vereswill et al. (1994) су дизајнирали прајмере *Primer 1* и *Primer 2* за детекцију *Cfl* гена везаног за синтезу коронафакат лигазе (део кластера гена за биосинтезу коронатина). PCR тест који је развијен омогућава специфичну детекцију *P. s. pv. atropurpurea*, *P. s. pv. glycinea*, *P. s. pv. maculicola*, *P. s. pv. morsprunorum* и *P. s. pv. tomato*. У својим истраживањима нису користили сојеве *P. s. pv. coronafaciens*.

Ознаке дизајнираних прајмера и њихове секвенце, величина продукта чије стварање омогућавају прајмери, циљани гени и организам, као и одговарајуће референце су приказани у табели 8. Тип реакције је конвенционални PCR.

**Табела 8.** Листа прајмера специфичних за *P. syringae*, патогена стрних жита

<b>Сирингомицини и сирингопептини</b>					
Ознака прајмера	Секвенца прајмера	Циљани ген	Величина продукта	Циљани организам	литература
<b>B1</b>	5'-CTTTCCGTGGTCTTGATGAGG-3'	<i>SyrB</i>	752 bp	<i>P. s. pv. syringae, atrofaciens, P. fuscovaginae</i>	Sorensen et al., 1998
<b>B2</b>	5'-TCGATTTTGCCGTGATGAGTC-3'				
<b>D1</b>	5'-AAACCAAGCAAGAGAAGAAGG-3'	<i>SyrD</i>	446bp		
<b>D2</b>	5'-GGCAATACCGAACAGGAACAC-3'				
<b>SyD2</b>	5'-CAGCGCGTTGCGTCCATTGC-3'	<i>SyrD</i>	1040bp	<i>P. s. pv. syringae, atrofaciens</i>	Bultreys and Gheysen (1999)
<b>SyD1</b>	5'-TGCCGCCGACGATGTAGACCAGC-3'				
<b>Табтоксин</b>					
<b>Tab A1</b>	5'-GTGCCAATATCCGAAAGCTT-3'	<i>TabA</i>	1020 bp	<i>P. s. pv. coronafaciens</i>	Lydon and Patterson, 2001
<b>Tab A2</b>	5'-ACTTGTCAAAGTTCTCGCAC-3'				
<b>Коронатин</b>					
<b>Primer1</b>	5'-GGCGTCCCTCGCACTT-3'	<i>Cfl</i>	650 bp	<i>P. s. pv. coronafaciens</i> <sup>(1)</sup>	Bull <sup>(1)</sup>
<b>Primer2</b>	5'-GGTATTGGCGGGGGTGC-3'				

<sup>(1)</sup>Способност неких сојева *P. s. pv. coronafaciens* да стварају коронатин наводи и Bull (персонална комуникација)

**Rep-PCR.** Бактеријски региони који су изван гена и не кодирају се (енг. bacterial extragenic non-coding regions) су у широкој употреби у идентификацији и одређивању генотипова фитопатогених бактерија, због могућности добијања специфичних генетичких профила који дају више информација о испитиваним сојевима и поновљивији су од других, раније коришћених маркера као што су RAPD и AFLP.

Геноми прокариота и еукариота имају неколико класа по себи расутих секвенци које се понављају (енг. dispersed repetitive sequences) и раздвајају дуж ДНК секвенце (енг. single copy DNA). Једна од тих класа су и мобилни генетички елементи који се не кодирају, називају се ISR (енг. Interspersed repetitive DNA sequences) или „разасуте секвенце репетитивне ДНК“, а неке од њих попут BOX, ERIC (енг. enterobacterial repetitive extragenic palindromic consensus) и REP (енг. repetitive extragenic palindromic) елемената су конзервирани (Versalovic et al., 1994).

Versalovic et al. (1991) су увели методу rep-PCR у којој прајмери комплементарни са ISR секвенцама омогућавају умножавање ДНК секвенци различите величине које су смештене између ових секвенци и чија је величина (у смислу броја базних парова) различита код различитих сојева. Број и величина умножених секвенци раздвојених електрофорезом представља rep-PCR генетички профил ДНК (енг. rep-PCR genomic DNA) или генетички отисак прста (енг. genetic fingerprint), специфичан за појединачне сојеве бактерија, те се помоћу њега може утврдити и њихов диверзитет. Кључна разлика између ове и других PCR метода је у томе што стварање rep-PCR генетичког профила ДНК подразумева симултано умножавање бројних секвенци ДНК различите

величине и за примену ове методе није потребно предходно знање о ДНК секвенци испитиваног организма (Najafi Pour and Taghavi, 2011).

Да би се спровела што тачнија упоредна анализа, гер-PCR генетички профил ДНК по узорку треба да садржи између 8 и 15 производа умножавања (трака) различите величине. Мање од 5 производа умножавања отежава даљу анализу чији је циљ било шта више од прелиминарне процене идентитета соја, што посебно долази до изражаја приликом примене ове методе код сојева који дају мономорфне траке. Друго ограничење примене гер-PCR методе је њена варијабилност приликом коришћења различитих (BOX, ERIC, REP) прајмера, услед чега различити аутори добијају различите резултате.

Rep-PCR метода се показала корисном у раздвајању и класификацији сојева испод нивоа врсте (Versalovic et al., 1991; Weingart and Volksch, 1997). Matveeva et al. (2003) су у истраживањима диверзитета *Pseudomonas* spp., патогена стрна жита у Русији користили BOX-, REP-, и ERIC-PCR, али су се генетички профили са бројем трака довољним за међусобно поређење сојева добили само коришћењем BOX елемената. У овим истраживањима је доказано да сојеви који припадају LOPAT групи 1 имају сличније BOX-PCR генетичке профиле него сојеви који припадају LOPAT групи 2, 3, 4 и 5. Применом ове методе је доказано да сојеви *Pseudomonas* spp. изоловани са стрних жита у Русији показују висок ниво генетичког диверзитета.

Међутим, поједина истраживања указују да су REP елементи кориснији у утврђивању генетичког диверзитета *P. syringae* патовара од BOX елемената, јер се њиховим умножавањем стварају генетички профили са израженијим полиморфизмом (Џерни and Gürel, 2012). Ови истраживачи наводе да *P. syringae* геном садржи велики број копија REP елемената који су повезани са ISI, чиме објашњавају бројност и различитост генетичких профила код испитиваних сојева. Stead et al. (2003) су испитивали примену гер-PCR методе за потребе класификације већине валидно објављених патовара и врста *Pseudomonas* spp. (преко 500 сојева NCPPВ колекције) и показали да су генетички хетерогене врсте: *P. cichorii*, *P. viridiflava*, *P. syringae*, *P. savastanoi*, *P. marginalis*, *P. caricaprayae*, док су хомогене следеће врсте: *P. avellanae*, *P. amygdale*, *P. tolaasii*, *P. ficuserectae*, *P. corrugate*, *P. asplenii*, *P. agarici*, *P. flavescens* и *P. fuscovaginae*. За врсте *P. cichorii* и *P. viridiflava* су утврдили да имају различите подгрупе које показују корелацију у односу на домаћина и локалитет са ког су изоловани. Патовари геномоврста 2, 3 и 4 међу којима су и *P. s. pv. coronafaciens* и *P. s. pv. striafaciens* су показале тенденцију заједничког груписања у кластере. Међу патоварима генетску хетерогеност су показали: *actinidiae*, *atrofaciens*, *berberidis*,

*lachymans*, *passiflorae*, *phaseolicola*, *pisi*, *ribicola*, *sesame* и *viburni*. Исти аутори наводе да су одређене биљке (међу којима је и пшеница) домаћини и патогена из различитих кластера дендрограма и патогена који се не могу раздвојити. Stead et al. (2003) сматрају да патовар *syringae* треба да остане патоген јоргована, а да патовар *japonica* није део рв. *syringae* и може садржати сојеве примарно са стрних жита, те да је у ствари синоним за рв. *atrofaciens*. Weingart и Völksch (1997) су у својим REP, ERIC и IS50-PCR истраживањима *P. syringae* сојева утврдили да међу њима постоји мала генетичка хетерогеност, осим код рв. *atrofaciens*, *syringae* и *aptata*.

Развој и употреба **метода за утврђивање филогенетских карактеристика сојева** образложен је у поглављу Појам, историјат и актуелно стање *P. syringae* комплекса (2.7).

## 2.6. Провера патогености

Да би се заокружили Кохови постулати и доказало да је бактерија биљни патоген, потребно је извршити и тест патогености. Ови тестови захтевају доста времена, доступност биљака домаћина и оптималне услове за гајење (стакленик, комора и сл.). За прелиминарну индикацију патогености неких бактерија веома је користан и тест хиперсензитивности (ХР) дувана.

За проверу патогености представника рода *Pseudomonas* изолованих са стрних жита користе се различите тест биљке као што су пшеница, јечам, овас, раж, тритикале, кукуруз, сирак (Otta, 1974, 1977; Peters et al., 1983; Smith and Hatting, 1991), пасуљ (Peters et al., 1983; Aleksandrova et al., 1995), као и ХР на дувану. Према Арсенијевићу (1986), вештачке инокулације зељастих биљака (суданске траве, вигне, боба, махуна бораније, луцерке) и летораста дрвенастих биљака (брескве, кајсије, крушке, јоргована и тополе), као и плодова воћака (вишње, трешње, кајсије, крушке и лимуна) показују да бактерија *P. s. рв. syringae* изолована из пшенице може бити њихов патоген. Аутентичност реизолата потврђује се на основу различитих стандардних бактериолошких метода попут једног или више тестова LOPAT шеме (Peters et al., 1983) или, уколико је доступан и специфичним PCR тестом.

Судећи према подацима о осетљивости/отпорности ткива различитих биљних врста у различитим фазама развоја, биљке се могу инокулисати у фази сејанаца (Hagborg, 1974), у фази после фазе издуживања листа (Large, 1954; loc. cit. Vassilev et al., 1995), у фази 7-10 дана пре избијања класова (Арсенијевић и Балаж, 1986; Vasilev and Karov,

1986; loc. cit. Vassilev et al., 1995) у Задокс фази DC 39-45 и на почетку фазе млечно зрење GS 75 (Toben et al., 1989, 1991). Инокулација листова и надземних делова биљака се врши прскањем са или без претходног озлеђивања надземне масе убодом или ваздушном четком (Sellam and Wilcoxson, 1976), као и потапањем у суспензију бактерија у коју је додат оквашивач (Obradovic et al., 2003) а инокулација семена се врши потапањем семена у суспензију бактерија (Matveeva et al., 2003). За инокулацију се користи концентрација бактеријске суспензије од  $10^5$ - $10^6$  cfu/ml, уколико се ради о инокулацији биљних делова прскањем са или без додавања оквашивача (Shane and Baumer, 1987), то јест  $10^7$  - $10^8$ cfu/ml уколико се ради о инокулацији класа и семена (Fryda and Otta, 1978; Арсенијевић и Балаж, 1986; Toben et al., 1989, 1991) и  $10^8$ - $10^9$  cfu/ml уколико се ради о ХР дувана. За инокулацију се може користити и директно nanoшење колонија бактерије убодом у биљно ткиво (Wilkie, 1973; Toben et al., 1991; Duveiller et al., 1997). Критични услов за остварење инфекције је висока влажност, тако да је пожељно биљке после инокулације држати у комори са следећим режимима: 95% влаге (све време од инокулације до појаве симптома) (Shane and Baumer, 1987), са осветљењем и температуром 20-25<sup>0</sup> C (Toben et al., 1991; El-Sadek et al., 1992; Duveiller et al., 1997).

Због брзе идентификације патогена *P. s. pv. atrofaciens* развијен је биотест на сејанцима пшенице при коме се после два до четири дана од nanoшења свеже колоније бактерија иглом на 4-5 дана старе сејанце који се гаје на навлаженом филтер папиру у Петри кутијама, на местима око убода формира тамни ореол, карактеристичан за *P. s. pv. atrofaciens* (Toben et al., 1989, 1991).

## 2.7. Појам, историјат и актуелно стање *P. syringae* комплекса

Патогена популација рода *Pseudomonas* идентификована у делу његове историје као "збирна врста" или '*P. syringae* комплекс' је послужила као посебан оквир за многа таксономска питања, због чега се и назив и садржај онога што чини овај комплекс мењао заједно са променом основног концепта у таксономији. Тако се *P. syringae* (van Hall 1902) као комплекс сојева чија се класификација иницијално базирала на фенотипским карактеристикама (Young, 2010), првобитно везивао за комплекс патовара који чине "збирну врсту" или '*P. syringae* комплекс' (тада коришћен назив), док се са генетичким и филогенетским истраживањима, овај појам полако проширује и достиже данас актуелни назив '*P. syringae* комплекс врста''.

Род *Pseudomonas* је првобитно предложен и прихваћен од стране Migula (1894) као род који чине аеробне, штапићасте Грам негативне бактерије са хеморганотрофичким метаболизмом, покретне, са једном или више поларних флагела (Young, 2010). Тек је коришћењем DNA-rRNA хибридизације (Willems and Vandamme, 2003) и компаративне анализе 16S подјединице рибозомалне ДНК (Young, 2010) у великој мери дошло до редефинисања овог описа. Флуоресцентни представници рода *Pseudomonas*, који не накупљају поли- $\beta$ -хидроксибутират (PHB) и повезани су са типским врстама *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* и *P. syringae* сада спадају у  $\gamma$ -*Proteobacteria*, док већина нефлуоресцентних представника рода *Pseudomonas* који накупљају PHB и налазе се у оквиру родова *Acidovorax*, *Burkholderia* и *Ralstonia* сада спадају у  $\beta$ -*Proteobacteria* (Willems and Vandamme, 2003; Young, 2010).

**Порекло комплекса *P. syringae*.** Први описи фитопатогених бактерија у оквиру рода *Pseudomonas* укључујући и *P. syringae* van Hall 1902, били су засновани на малом броју морфолошких, биохемијских и нутритивних тестова, те изгледу колонија на различитим подлогама и основним патогеним карактеристикама. Касније су Lelliott et al. (1966) показали да се различите групе флуоресцентних фитопатогених врста рода *Pseudomonas* могу диференцирати на основу пет LOPAT тестова.

С обзиром да је још Sands (1970) (loc.cit. Young (2010)) указао на то да се многе фитопатогене врсте из LOPAT групе I (L[+],O[-],P[-],A[-],T[+]) не могу међусобно разликовати ни фенотипски ни помоћу коришћења тада доступних биохемијских и нутритивних тестова, за ове врсте се почео користити појам збирне врсте *P. syringae* (познат и као '*P. syringae* комплекс'), састављене из различитих популација способних да заразе ограничен број домаћина (за које је 80тих година XX века уведен појам патовар), а за коју је накнадно утврђено да се мора проширити ради укључивања бројних повезаних врста (Young, 2010).

**Актуелно стање валидно описаних врста рода *Pseudomonas*.** До данас је, према Bull et al. (2010) и Parkinson et al. (2011) валидно описано <sup>(1)</sup> 13 оксидазно позитивних и 10 оксидазно негативних фитопатогених врста рода *Pseudomonas* у које спадају и најзначајнији патогени као што су *P. syringae* са преко 50 патовара са широким кругом домаћина, *P. savastanoi* са бројним патоварима проузроковачима тумора и гала и *P. viridiflava*, проузроковач некротичних лезија листа и стабла и трулежи основе стабла и корена, широког круга домаћина.

---

<sup>(1)</sup>Дефиницију која је постала стандард за опис врста и представља основу класификације врста до данашњег дана предложили су Wayne et al. (1987) (loc.cit. Young (2010)), одређујући је као популацију коју чине сојеви који деле више од 70% ДНК-ДНК хибридизације и имају разлику у температури топљења ДНК ( $T_m$ ) једнаку или мању од 5°C, а ове карактеристике морају подржати и фенотипски подаци (Young, 2010).

**Концепт вишефазне таксономије.** Развој новог таксономског концепта, тзв. вишефазне таксономије је омогућио интегрисање различитих фенотипских, генетичких и филогенетских информација у циљу сврставања и даљег проучавања непознатих таксона, укључујући и обезбеђивање метода за идентификацију (Vandamme et al., 1996).

**Истраживања генетичких група (геномоврсте) и филогенетских веза (филогроне) *P. syringae*.** Почетком 90тих година прошлог века уочено је да фенотипске карактеристике сојева често не могу да одсликају генетичку релацију у оквиру или између врста и да коришћење тада познатих тестова има ограничену вредност за диференцирање *P. syringae* комплекса на патоваре (Palleroni, 2005; loc.cit. Young, 2010).

Поред низа различитих метода коришћених са више или мање успеха у идентификацији врста рода *Pseudomonas*, велики допринос таксономији су крајем прошлог и почетком овог века дале упоредне студије као што су DNA-DNA реасоцијација (Gardan et al., 1999), DNA-rRNA хибридизација (Inoue and Takikawa, 2000) и филогенетска анализа секвенци (Sarkar and Guttman, 2004; Parkinson et al., 2011; Berge et al., 2014), које представљају средства за проучавање сродности сојева на бази идентитета ДНК секвенци.

**Геномоврсте.** У истраживањима DNA-DNA реасоцијације у оквиру збирне врсте *P. syringae*, Gardan et al. (1999) су идентификовали 9 геномоврста и за сваку од њих препоручили одговарајући типски сој (табела 9). Иако су се исти аутори уздржали од захтева за званично именовање геномоврста као врста (јер нису подржане истраживањима DNA-rRNA хибридизације и одговарајућим фенотипским карактеристикама), њихова структура омогућава значајан увид у везе у оквиру комплекса.

Познати патогени стрних жита се налазе у оквиру геномоврста 1 и 4 (табела 9). Геномоврста 1 представља *P. syringae sensu stricto* и укључује *P. s. pv. syringae* и 8 признатих патовара (Hofte and de Vos, 2007; Bull et al., 2010; Young, 2010), од којих за неке (патовари *atrofaciens* и *japonica*) Stead et al. (2003) предлажу да представљају једни другима синониме. Геномоврсту 4 коју су Gardan et al. (1999) означили са *P. coronafaciens* чине углавном патовари са трава, али и *P. s. pv. porri* изолован са лука који припада фамилији *Liliaceae* и чији је типски сој CFBR 1908 коришћен за испитивања ДНК хибридизације и *P. s. pv. garcae* изолован са кафе који припада фамилији *Rubiaceae*.

Осим Gardan et al. (1999), Inoue и Takikawa (2000) су користили гене *hrp* кластера и путем дигестије ДНК и Јужне (Southern) хибридизације утврдили генетичку варијабилност комплекса и постојање 4 јасно дефинисане групе међу којима се познати патогени стрних жита налазе у групама III и IV <sup>(1)</sup>.

**Филогрупе.** С обзиром да коришћење биохемијских тестова, анализе састава масних киселина и филогенетске анализе 16S rDNA нису омогућиле поуздану диференцијацију на таксоне у оквиру збирне врсте *P. syringae*, даљи правац развоја класификације и утврђивање сродности међу сојевима у новије време је омогућила упоредна секвенциона анализа локуса гена који кодирају протеине и који су елементи „сржи генома“ (тзв. „housekeeping“ гени, конститутивни гени) како појединачно, тако и преко MLST (енг. Multy Locus Sequence Typing) методе, која омогућава раздвајање сојева и клонских линија и са максималном могућом тачношћу открива порекло клонова, а помоћу ње се могу откривати и мерити и рекомбинације које имају изузетан утицај на еволуциону динамику бактерија.

Yamamoto et al. (2000) су утврдили да два „housekeeping“ гена (*rpoD* и *gyrB*), еволуирају брже од гена одговорног за рибозомалну ДНК и тиме обезбеђују високу резолуцију погодну за анализу варијабилности унутар врсте. Ови гени су се показали као одлични филогенетски маркери и играју кључну улогу у метаболизму угљених хидрата (Hwang et al., 2005). Исти аутори наводе да коришћење конкатинованих секвенци ова два гена показује груписање неколико врста комплекса *P. syringae* у складу са истраживањима Gardan et al. (1999).

Sarkar и Guttman (2004) су у првој MLST анализи из 21 фитопатогене бактерије извршили секвенционирање 7 „housekeeping“ гена <sup>(1)</sup> и утврдили да често коришћени гени *gyrB* и *rpoD* деле најмању сличност/везу са других пет гена (*acnB*, *cts*, *gap*, *pgi*, *pfk*). У овим истраживањима је први пут ближе одређена филогенетска структура *P. syringae* и утврђено груписање проучаваних сојева у пет основних таксона као филогрупа, што су потврдили и истраживачи Hwang et al. (2005) и Sarkar et al. (2006). Иако у истраживања нису били укључени и патотипски сојеви (као референтни), њихови резултати су подржали концепт 4 главне геномоврсте описане од стране Gardan et al. (1999).

---

<sup>(1)</sup> група I- представник *P. s. pv. phaseolicola* (са врстом *P. ficuserectae* и патоварима са пасуља, соје, краставца), II- представник *P. s. pv. maculicola* (са патоварима са парадајза, кивија и сл.), III- представник *P. s. pv. syringae* (са патоварима *aptata*, *atofaciens*, *lapsa*, *japonica*, *aceris*, *pisi*) и IV- представник *P. s. pv. coronafaciens* (са патоварима *striafaciens*, *porri*, *atropurpurea*, *oryzae*).



Hwang et al. (2005) су у својој MLST шеми која користи 4 „housekeeping“ гена (*gap1*, *gltA*, *gyrB* и *rpoD*) показали да појединачне секвенце ова 4 гена укупне дужине 1850 bp поузданије показују еволутивне везе у оквиру *P. syringae* од свих 7 „housekeeping“ гена које је користила Sarkar et al. (2006) заједно. Morris MLST шема користи ова 4 гена у другачијој дужини секвенце за *cts* (*gltA*) и *rpoD* и у комбинацији са *gap1* и *gyrB* из Hwang MLST шеме (Morris et al., 2008). Све секвенце добијене применом ових шема су обезбеђене у бази података микроорганизама везаних за биљке и из животне средине (енг. Plant Associated and Environmental Microbes Database-PAMDB (<http://genome.ppws.vt.edu/cgi-bin/MLST/home.pl>)) (Almeida et al., 2010).

После истраживања Mulet et al. (2010) када је први пут прецизније дефинисан и појам *P. syringae* комплекса врста, да би утврдили сродност свих валидно описаних врста овог комплекса, Parkinson et al. (2011) су реализовали истраживања коришћењем 4 локуса “housekeeping” гена\* (*rpoD*, *acn*, *pgi* и *cts*- појединачно и њихових конкатинованих секвенци) доступних типских сојева *P. syringae* комплекса врста и филогенетском анализом 578bp локуса *rpoD* гена свих (67) типских сојева патовара наведених у Одобреној листи бактеријских имена (Young et al., 1996). На основу ових истраживања, Parkinson et al. (2011) су описали седам филогрупа у које су класификоване валидно описане врсте *P. syringae* на основу филогеније *rpoD* “housekeeping” гена (табела 9).

Исти аутори наводе да се патогеност према травама развила у најмање две филогрупе: тако патоген пшенице *P. s. pv. atrofaciens* припада филогрупи 2 (која, осим приказаних патовара у табели 9, обухвата и валидно описану врсту *P. syringae*, типски сој са јоргована, забележен и као патоген стрних жита и трава), а филогрупа 4 садржи типски сој *P. s. pv. coronafaciens* и још 5 патовара, сви са монокотиледоних биљака, изузев патогена кафе (*P. s. pv. garcae*), за кога Barta и Willis (2005) наводе да напада и овас.

Berge et al. (2014) су применом Morris MLST шеме (2008) (*cts*, *rpoD*, *gapA* и *gyrB*) сврстали 216 сојева из спољашње средине у 13 филогрупа и 23 подгрупе (табела 9).

---

<sup>(1)</sup> „Housekeeping” или конститутивни гени кодирају стварање: РНК полимераза сигма 70 фактора (енг. RNA polymerase sigma 70 factor) (*rpoD* ген), гиразе Б (енг. gyrase B) (*gyrB* ген), аконитрат хидратазе Б (*acnB* ген), цитрат синтазу (*cts* ген), глицералдехид-3-фосфат дихидрогеназу (*gap* ген), фосфоглукоизомераза (*pgi* ген) и фосфо-фруктокиназу (*pfk* ген).

Исти аутори<sup>(1)</sup> су потом за потребе сврставања 763 соја из спољашње средине показали да међу ова 4 „housekeeping“ гена коришћење секвенце *cts* гена у филогенетској анализи најуспешније раздваја сојеве у филогрупе и подгрупе, као и да коришћење одређених фенотипских особина пружа ограничене (недовољне) информације за идентификацију сојева на нивоу кластера или филогрупе.

**Актуелно стање "P. syringae комплекса"**. После првобитног назива и садржаја збирне врсте *P. syringae* или *P. syringae* комплекса, прво је у генетичким истраживањима (Gardan et al., 1999) и MLST анализама "housekeeping" гена (Sarkar and Gutman, 2004) објављен "комплекс *P. syringae*" који обухвата различите врсте или геномоврсте које укључују и неколико десетина патовара, али и бактерије познате под називом "*P. viridiflava*".

Укључивање и биљног патогена *P. cichorii* у "комплекс врста *P. syringae*" (актуелни назив) је предложено касније (Mulet et al., 2010; Vodilis and Barray, 2006; loc. cit. Berge et al., 2014). Оксидазно позитивна врста *P. cichorii* је друга сродна врста, која се монофилетички групише са овом групом патогена преко *rpoB* локуса и као фактор вирулентности поседује тип III секретори систем (T3SS) (Parkinson et al., 2011).

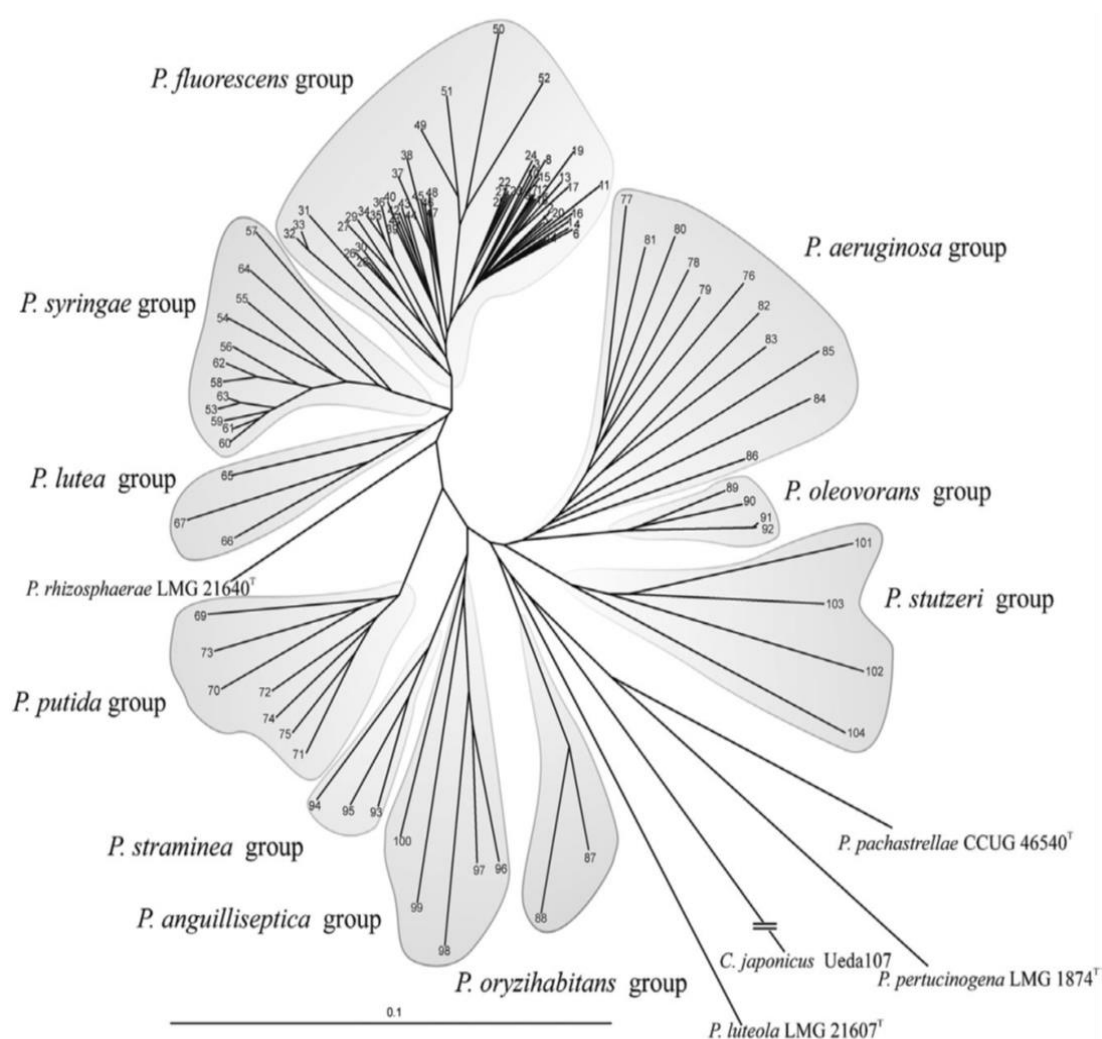
Проучавајући филогенетске везе комплексног рода *Pseudomonas*, Mulet et al. (2010) су применом анализе 4 "housekeeping" гена (*16S rRNA*, *gyrB*, *rpoB* и *rpoD*) утврдили постојање две линије: *P. fluorescens* и *P. aeruginosa*, док један број врста није припадао ниједној од њих (слика 4).

---

<sup>(1)</sup> У односу на истраживања Parkinson et al. (2011), Berge et al. (2014) су потврдили да представници геномоврсте 3 и 8 припадају истој **филогрупи 1**, али се у оквиру ње раздвајају на два кластера (Ф01а и Ф01b); **филогрупа 2** се састоји од 5 кластера од којих се фитопатогене бактерије налазе у једном (2b-типски сој *P. s. pv. syringae*), а у остала 4 се налазе непатогени сојеви *P. syringae*, као и сојеви изоловани из кише, водених басена и других станишта у животној средини; **филогрупе 3, 4, 5, 6 и 7** обе групе аутора се поклапају с тим што представници филогрупе 3 не стварају токсине сличне сирингомицину, представници филогрупе 4 имају изразиту способност стварања честица леда иако се ретко детектују у животној средини, затим филогрупа 7 састоји од два кластера и то 7а у ком се налази већина сојева из спољашње средине заједно са *P. viridiflava* и два *P. syringae* патовара (*P. s. pv. ribicola* и *pv. primulae*) и 7b са неспецифичним тип III секретори системом (T3SS) системом. Представници врсте *P. viridiflava* се налазе и у **филогрупама 7 и 8**, које деле бројне фенотипске карактеристике укључујући и фазну варијацију фенотипа која утиче на стварање левана, испољавање трулежи кромпира и патогеност. **Филогрупе 9, 10, 11, 12 и 13** не укључују биљне патогене, већ углавном сојеве *P. syringae* изоловане из различитих станишта животне средине, осим филогрупе 11 у којој се налази биљни патоген *P. cichorii*, као једини оксидазно позитивни представник овог комплекса (табела 9).

Како сама *P. syringae* група која спада у *P. fluorescens* линију обухвата валидно описане врсте: *P. meliae*, *P. savastanoi*, *P. ficuserectae*, *P. amygdale*, *P. tremae*, *P. congelans*, *P. syringae*, *P. caricapapayae*, *P. avellanaea*, *P. cannabina*, *P. viridiflava* и *P. cichorii*, поједини аутори је означавају као *P. syringae sensu lato* (*P. syringae* у ширем смислу) (Bull et al., 2011) или *P. syringae* филогенетски комплекс (Parkinson et al., 2011; Berge et al., 2014) или *P. syringae* комплекс врста (Bartoli et al., 2014; Lamichhane et al., 2015).

*P. syringae sensu stricto* (*P. syringae* у ужем смислу) обухвата геномоврсту 1, односно филогрупу 2 (некадашње "збирне" врсте), односно валидно описану врсту *P. syringae* (Gardan et al., 1999).



**Слика 4.** Неукорењено филогенетско стабло 107 типских сојева рода *Pseudomonas* на основу анализе парцијалних секвенци *16S rRNA*, *gyrB*, *rpoB* и *rpoD* gena (преузето из Mulet et al., 2010)

**Табела 9.** Приказ геномоврста и филогрупа у оквиру „*P. syringae* комплекса врста“ (*P. syringae sensu lato*)

Gardan et al. (2009)	Представник	Parkinson et al. (2011)	Представник	Berge et al. (2014)	Таксон
Г1	<i>P. syringae</i> NCPFB 281	Φ2	<i>P. syringae</i> NCPFB 281	Φ2b	<i>P. syringae</i> pv. <i>aptata</i> , <i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> , <i>P. syringae</i> pv. <i>lapsa</i> , <i>P. syringae</i> pv. <i>pisi</i> , <i>P. syringae</i> pv. <i>papulans</i> , <i>P. syringae</i> pv. <i>dysoxyli</i> , <i>P. syringae</i> pv. <i>aceris</i> и <i>P. syringae</i> pv. <i>solidagae</i>
Г2	<i>P. savastanoi</i> NCPFB 639	Φ3	<i>P. savastanoi</i> NCPFB 639	Φ3	<i>P. amygdali</i> , <i>P. ficuserectae</i> , <i>P. meliae</i> , <i>P. syringae</i> pv. <i>ulmi</i> , <i>P. syringae</i> pv. <i>mori</i> , <i>P. syringae</i> pv. <i>lachrymans</i> , <i>P. syringae</i> pv. <i>sesami</i> , <i>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i> , <i>P. syringae</i> pv. <i>morsprunorum</i> , <i>P. syringae</i> pv. <i>ciccaronei</i> , <i>P. syringae</i> pv. <i>eriobotryae</i> , <i>P. syringae</i> pv. <i>mellea</i> , <i>P. syringae</i> pv. <i>aesculi</i> , <i>P. syringae</i> pv. <i>hibisci</i> , <i>P. syringae</i> pv. <i>myricae</i> , <i>P. syringae</i> pv. <i>photiniae</i> , <i>P. syringae</i> pv. <i>dendropanacis</i> <i>P. savastanoi</i> pv. <i>fraxini</i> , <i>P. savastanoi</i> pv. <i>nerii</i> , <i>P. savastanoi</i> pv. <i>retacarpa</i> , <i>P. savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> , <i>P. savastanoi</i> pv. <i>phaseolicola</i> , <i>P. savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i>
Г3	<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> NCPFB 1106	Φ1	<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> NCPFB 1106	Φ01a	<i>P. syringae</i> pv. <i>persicae</i> , <i>P. syringae</i> pv. <i>antirrhini</i> , <i>P. syringae</i> pv. <i>maculicola</i> , <i>P. syringae</i> pv. <i>viburni</i> , <i>P. syringae</i> pv. <i>berberidi</i> , <i>P. syringae</i> pv. <i>apii</i> , <i>P. syringae</i> pv. <i>delphinii</i> , <i>P. syringae</i> pv. <i>passiflorae</i> , <i>P. syringae</i> pv. <i>philadelphi</i> , <i>P. syringae</i> pv. <i>ribicola</i> , <i>P. syringae</i> pv. <i>primulae</i>
Г4	<i>P. syringae</i> pv. <i>porri</i> CFBP 1908	Φ4	<i>P. syringae</i> pv. <i>coronafaciens</i> NCPFB 600	Φ4	<i>P. syringae</i> pv. <i>coronafaciens</i> , <i>P. syringae</i> pv. <i>garcae</i> , <i>P. syringae</i> pv. <i>striaefaciens</i> , <i>P. syringae</i> pv. <i>atropurpurea</i> , <i>P. syringae</i> pv. <i>oryzae</i> , <i>P. syringae</i> pv. <i>zizaniae</i>
Г5	<i>P. syringae</i> pv. <i>tremae</i> ICMP 9151	Φ3	<i>P. syringae</i> pv. <i>tremae</i> NCPFB 3693	Φ3	
Г6	<i>P. viridiflava</i> NCPFB 655	Φ7	<i>P. viridiflava</i> NCPFB 655	Φ7a Φ8 <sup>a</sup>	<i>P. syringae</i> pv. <i>primulae</i> NCPFB 133* и <i>P. syringae</i> pv. <i>ribicola</i> NCPFB 963*
Г7	<i>P. syringae</i> pv. <i>tagetis</i> NCPFB 2488	Φ6	<i>P. caricapapayae</i> NCPFB 1863	Φ6	<i>P. syringae</i> pv. <i>helianthi</i>
Г8	<i>P. avellanae</i> NCPFB 2607	Φ1 <sup>a</sup>	<i>P. avellanae</i> NCPFB 3487	Φ01b	<i>P. syringae</i> pv. <i>theae</i>
Г9	<i>P. cannabina</i> NCPFB 1437	Φ5	<i>P. cannabina</i> N CPPB 1437	Φ5	<i>P. cannabina</i> pv. <i>allisalensis</i> , <i>P. cannabina</i> pv. <i>coriandricola</i> , <i>P. syringae</i> pv. <i>philadelphii</i>

<sup>a</sup>представник филогрупе *P. viridiflava* *gaw0203*

### 3. РАДНА ХИПОТЕЗА

Имајући у виду значај стрних жита као усева који представља значајан артикал прехранбене сигурности и трговинске размене и глобално и локално, затим све учесталију појаву симптома бактериозне природе и растући економски значај бактерија као патогена стрних жита у разним регионима њихове производње у свету, али и све чешћу појаву симптома непознате етиологије налик бактериозама на стрним житима у Србији, као и чињеницу да у Србији до данас опсежнија истраживања присуства и распрострањености бактерија као патогена стрних жита нису предузимана, те да о њиховом диверзитету у Србији постоје веома оскудни подаци из периода од пре неколико деценија, предложено је истраживање које за циљ има утврђивање диверзитета бактерија као патогена стрних жита у Србији.

Предложена истраживања полазе од претпоставке да су бактерије као патогени стрних жита присутне у Србији. Обрадом узорака са симптомима карактеристичним за бактерије као патогене стрних жита, сакупљеним на различитим локалитетима, утврдиће се њихово присуство и диверзитет, као и основне епидемиолошке карактеристике. Такође, претпоставља се да се ови патогени неконтролисано шире зараженим семеном, као и да је сортимент различите осетљивости. Разлике у осетљивости сортимента указаће на ризик који носе осетљиви генотипови тј. њихово гајење и ширење у производњи. Осим доприноса познавању популације бактерија присутне на стрним житима у нас, добијени резултати ових истраживања могу послужити за планирање програма селекције, као и развој стратегија заштите стрних жита.

## 4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

### 4.1. Прикупљање узорака

План за прикупљање узорака зараженог биљног материјала стрних жита, који подразумева дефинисање типа прегледа, основног критеријума за узорковање, локалитета, времена и процедуре узорковања, сачињен је према методологији Међународног стандарда за фитосанитарне мере ISPM 6 (енг. Guidelines for surveillance - Смернице за надзор).

Тип прегледа који је потребно спровести утврђен је на основу актуелне категорије/статуса познатог диверзитета бактерија као патогена стрних жита у међународној и домаћој регулативи и података о досадашњим налазима ових штетних организама у Србији (табела 10). За све наведене патогене се у одређеном подручју (дефинисаним локалитетима у Србији) спроводи преглед типа детекције који има за циљ утврђивање да ли је патоген присутан, а односи се и на оне патогене чије је присуство претходно утврђено у Србији (*P. s. pv. syringae* на пшеници и *P. s. p v. coronafaciens* на овсу), јер код њих постоји могућност детекције (првих налаза) и на другим врстама стрних жита.

Основни критеријум за процес узорковања је узимање циљног узорка (делови или целе биљке) са симптомима који подсећају на симптоме бактерија као патогена стрних жита. Током прикупљања узорака зараженог биљног материјала стрних жита, забележени су карактеристични симптоми које бактерије на њима проузрокују, а дијагностички значај уочених промена на оболелим биљкама оцењен је упоређивањем са описом (и фотографијама) симптома у референтној литератури и на разним интернет порталима, приказаним у Прегледу литературе, у оквиру посебног поглавља (2.4.).

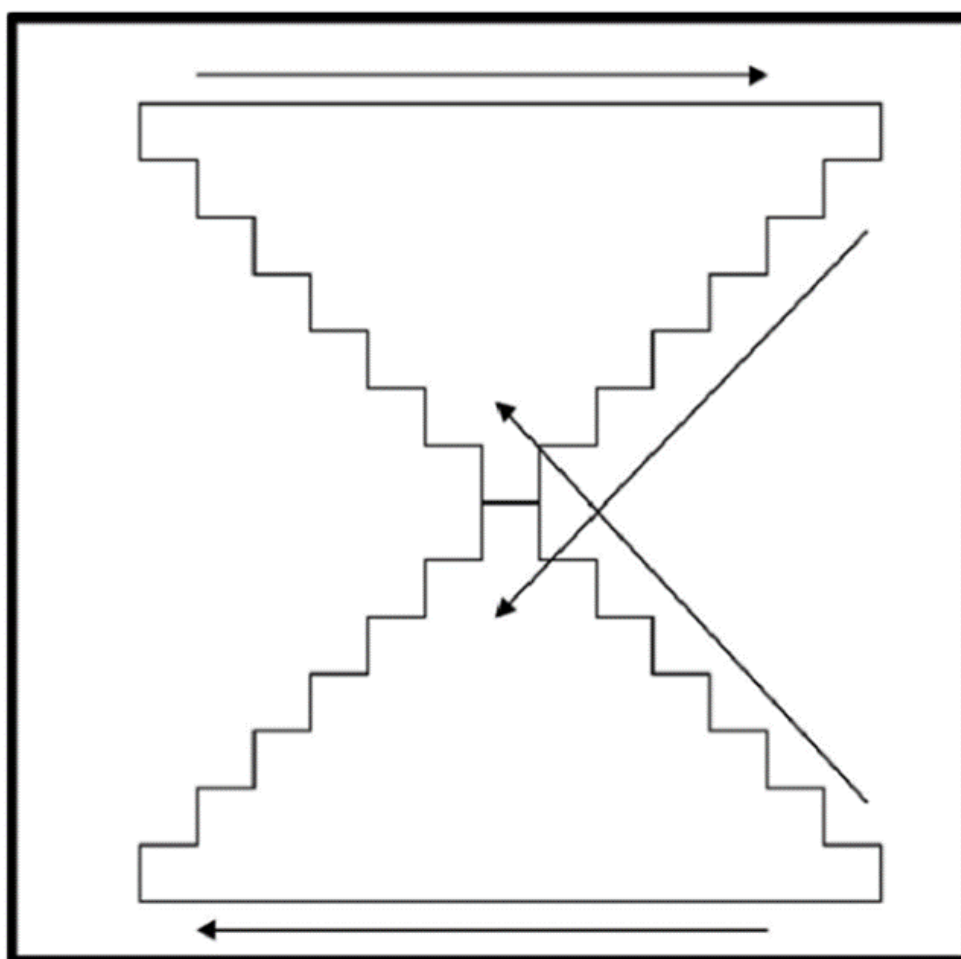
Географска област за прикупљање узорака је територија Републике Србије, а систем производње обухвата селекционе парцеле три Института за стрна жита (Нови Сад/Римски Шанчеви, Крагујевац и Зајечар), производњу семенских и меркантилних усева ових Института, неколико огледних поља Пољопривредних стручних служби (Ниш, Чачак, Панчево и Сомбор), као и производна поља у областима гајења стрних жита.

Узорковање је обухватило период од производне сезоне 2008/2009 године до производне сезоне 2013/2014 године. На основу података о животном циклусу бактерија као патогена стрних жита у односу на фенофазе развоја биљака домаћина,

узорци су се прикупљали у два наврата, од средине априла до краја маја и почетка јуна, а нарочито у време класања, неколико дана после јаких падавина, што уједно представља и моменат (период) максималног испољавања симптома на листу и класу. Узоркују се и остали биљни делови на којима се уочавају промене налик онима које проузрокују бактерије.

Визуелни преглед поља се врши на основу шеме за фитосанитарну инспекцију Националног (САД) система за здравље семена (енг. National Seed Health System - NSHS) (<http://www.seedhealth.org/>) (слика 5).

Узорковани су различити биљни делови са симптомима: листови, стабло, корен и клас. До допремања у лабораторију, узорковани материјал је чуван у пластичним кесама у ручном фрижидеру. Обрада узоркованог материјала је изведена непосредно по доласку у лабораторију или после неколико дана, током којих су узорци чувани у фрижидеру на температури од 5<sup>0</sup> С.



*Слика 5.* Шема за пољски преглед („X“ pattern) (преузето из NSHS (2019))

**Табела 10.** Дефинисање типа прегледа који је потребно спровести на основу актуелне категорије/статуса познатог диверзитета бактерија као патогена стрних жита у међународној и домаћој регулативи и података о досадашњим налазима ових штетних организама у Србији

Назив	Категорија /статус штетног организма					Тип прегледа		
	Карантински	Регулисани некарантински	Карантински <sup>4</sup>	Регулисани некарантински <sup>5</sup>	Економски штетни <sup>6</sup>	Детекција	Ограничење	Мониторинг
	EPPO <sup>1</sup> /EУ <sup>2</sup>	EPPO/EУ <sup>3</sup>	Србија	Србија	Србија			
<i>Xanthomonas</i>								
<i>X. t. pv. translucens</i>	EPPO A2	-	AI деоI	-	-	+	-	-
<i>X. t. pv. secalis</i>	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>X. t. pv. hordei</i>	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>X. t. pv. undulosa</i>	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>Pseudomonas</i>								
<i>P. s. pv. syringae</i>	-	-	-	+	+	+	+	-
<i>P. s. pv. japonica</i>	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>P. s. pv. atrofaciens</i>	-	-	-	+	+	+	-	-
<i>P. s. pv. coronafaciens</i>	-	-	-	+	+	+	+	-
<i>P. s. pv. striafaciens</i>	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>P. cichorii</i>	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>P. fluorescens</i>	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>P. fuscoviginae</i>	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>Bacillus, Erwinia, Clavibacter, Pantoea, Pectobacterium, Rathayibacter</i>								
<i>B. megaterium pv. cerealis</i>	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>E. rhapontici</i>	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>C. m. subsp. tessellarius</i>	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>P. agglomerans</i>	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>P. c. subsp. carotovorum</i>	-	-	-	-	+	+	-	-
<i>R. iranicus</i>	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>R. tritici</i>	-	-	-	-	-	+	-	-

(\*) налази у Србији: *P. s. pv. coronafaciens* на овсу (Шутић, 1956) и *P. s. pv. syringae* на пшеници (Арсенијевић, 1986; Арсенијевић и Балаж, 1986, Арсенијевић и Костић, 1989).

(1) EPPOA1/A2 листа организама који су препоручени за регулисање у статус карантинских организама (енг. EPPO A1/A2 list of pests recommended for regulation as quarantine pests)

(2) Регулотива ЕУ бр. 2016/2031 о мерама заштите од штетних организама биљака која представља скуп измењених регулатива (енг. Regulation (EU) 2016/2031 of the European Parliament and of the Council on protective measures against pests of plants, amending Regulations (EU) No. 228/2013, (EU) No. 652/2014 and (EU) No. 1143/2014 of the European Parliament and of the Council and repealing Council Directives 69/464/EEC, 74/647/EEC, 93/85/EEC, 98/57/EC, 2000/29/EC, 2006/91/EC and 2007/33/EC)

(3) Директива ЕЗ бр. 66/402/ЕЕС о стављању у промет семена жита (енг. Council Directive 66/402/EEC on the marketing of cereal seed)

(4) Правилник о листама штетних организама и листама биља, биљних производа и прописаних објеката („Службени гласник РС“, бр. 7/2010, 22/2012 и 57/2015)

(5) Правилник о здравственом прегледу усева и објеката за производњу семена, расада и садног материјала и здравственом прегледу семена, расада и садног материјала ("Сл. Лист СРЈ", бр. 66/99 и 13/2002, "Сл. лист СЦГ", бр. 10/2003 и 13/2003 и "Сл. гласник РС", бр. 39/2006, 59/2006, 115/2006, 119/2007 и 107/2008)

(6) Правилник о утврђивању листе економски штетних организама („Службени гласник РС“, бр. 25/2008)



## 4. 2. Изолација патогена и сојеви коришћени у раду

Изолација бактерија је извршена из различитих биљних делова пшенице, јечма, овса, ражи, тритикалеа, дурума и кукуруза (табела 11). Биљни делови са симптомима болести су прво испирани под млазом чесменске воде у трајању од око 15 минута, ради уклањања потенцијално присутних нечистоћа, сапрофита и епифита. Делови ткива величине око 3 x 3 mm су исечени са прелаза здравог и оболелог ткива и мацерирани у стерилној води у авану. Мацерат је засејан размазом по модификованој Кинговој подлози Б (КВС) (Duveiller et al., 1997; Schaad et al., 2001) у Петри-кутијама које су након засејавања инкубиране при температури 27<sup>0</sup>С.

КВС подлога представља модификацију основне Кингове подлоге Б која настаје додавањем борне киселине (100ml 0.5% воденог раствора), цефалексина (80mg/l у дестилованој води) и циклохексамида (200mg/l у 70% метанолу) или нистатина (80mg/l у 70% метанолу) у основну подлогу која је припремана на два начина: према упутству произвођача HiMedia као готова подлога (*Pseudomonas* agar, ознаке M120) или од следећих састојака: Proteose peptone (Difco No3/Oxoid L 46), 20g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5g, MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O, 1.5g, агар, 20g, глицерол, 10ml, вода 900 ml).

Ради добијања чистих култура, из популације бактерија у изолату прихватане су појединачне колоније, припремана разређења (10X) у стерилној дестилованој води и поново засејавана на хранљиву подлогу у Петри кутијама.

Тријажа сојева је извршена на основу морфолошких карактеристика колонија, стварања пигмента (флуоресценција и изглед колоније) и позитивне ХР дувана. За даља истраживања је одабрано 55 сојева изолованих из биљног материјала прикупљеног у периоду 2009-2014 године (табела 11). Као контрола коришћени су типски и патотипски сојеви бактерија патогена стрних жита из NCPPВ колекције (National Collection of Plant Pathogenic Bacteria) (табела 12) и детерминисани контролни сојеви бактерија из Колекције фитопатогених бактерија Пољопривредног факултета у Београду (куратор: проф. др Алекса Обрадовић) (табела 13).

Бактеријске културе су чуване у криоепруветама, у хранљивом бујону са 30% глицерола при -80<sup>0</sup>С (Schaad et al., 2001) и одржаване периодичним пресејавањима. Приликом извођења свих тестова коришћене су свеже културе бактерија гајене 24-48 часова на хранљивим подлогама при 27<sup>0</sup>С.

**Табела 11.** Проучавани сојеви фитопатогених бактерија изолованих са стрних жита у Србији

Сој	Друга шифра	Биљна врста	Сорта	Биљни део	Локалитет	Година изолације
1тк	13-5	Овас	Колекција овса 975	Лист	Р. Шанчеви	2009
2тк	95	Тритикале	Тријумф	Лист	Алексинац- Ниш	2009
3тк	118	Тритикале	Одисеј	Лист	Крагујевац	2009
4тк	130	Јари јечам	Непозната	Лист	Панчево	2009
5тк	37	Тритикале	Непозната	Доњи део стабла	Алексинац- Ниш	2011
6тк	316	Јечам	НС 565	Доњи део стабла	Сомбор	2011
7тк	311	Јечам	НС 565	Семе, плеве	Сомбор	2011
8тк	18-1	Раж	Колекција, Ф6 линија	Доњи део стабла	Крагујевац	2012
9тк	18-3	Раж	Колекција, Ф6 линија	Доњи део стабла	Крагујевац	2012
10тк	12-1	Раж	Колекција, Ф6 линија	Глава корена	Крагујевац	2012
11тк	12-2	Раж	Колекција, Ф6 линија	Глава корена	Крагујевац	2012
12тк	30(12) ХР	Раж	Колекција, Ф6 линија	Коренчићи	Крагујевац	2012
13/14тк	119/1	Тритикале	КГ 20	Лист	Крагујевац	2009
16тк	132	Овас	Дунав	Лист	Р. Шанчеви	2009
17тк	14/3	Пшеница	Самоникла	Доњи део стабла	Б. П. Село	2014
19тк	14/12	Јечам	Непозната	Лист	Сомбор, Билић	2014
20тк	14/13	Пшеница	Самоникла	Лист	Сомбор, Билић	2014
21тк	14/14	Пшеница	К11191, огледна сорта Saatzucht-donau	Лист	Сомбор, Колекција	2014
22тк	14/16	Пшеница	К11186, огледна сорта Saatzucht-donau	Лист	Сомбор, Колекција	2014
23тк	14/17	Раж	НС/КГ1/502, сорта НС Института у приз.	Лист	Сомбор, Колекција	2014
24тк	14/22	Јечам	Шестореди	Лист	Крагујевац, Колекција	2014
25тк	14/25	Тритикале	Непозната	Лист	Крагујевац, Колекција	2014
26тк	14/14	Пшеница	К11191, огледна сорта Saatzucht-donau	Лист	Сомбор, Колекција	2014
27тк	14/19	Овас	Јадар	Лист	Римски Шанчеви	2014
28тк	14/21	Јечам	Шестореди	Лист	Крагујевац, Колекција	2014
29тк	14/21	Јечам	Шестореди	Семе	Крагујевац, Колекција	2014
30тк	14/29	Јечам	Шестореди	Лист	Крагујевац, Колекција	2014
31тк	14/30-2	Овас	Јадар	Лист	Р. Шанчеви	2014
32тк	14/32	Пшеница	НС Рапсодија	Лист	Р. Шанчеви	2014
33тк	14/35	Овас	Непозната	Лист	Б. П. Село	2014
34тк	14/41	Раж	Саво	Лист	Сомбор, Билић	2014
35тк	14/43	Раж	Pallazio	Лист	Сомбор, Билић	2014
36тк	14/46	Тритикале	Тријумф	Лист	Сомбор, Билић	2014

Наставак на следећој страни

37TK	14/52	Раж	Непозната	Лист	Сомбор, Колекција	2014
38TK	14/55	Кукуруз	Непозната	Лист	Сомбор, Колекција	2014
39TK	14/49	Јари овас	Непозната	Лист	Сомбор, Билић	2014
40TK	14/53	Овас	Непозната	Лист	Сомбор, Колекција	2014
41TK	14/54	Дурум	Дурумко	Лист	Сомбор, Колекција	2014
42TK	14/56	Овас	Абел	Лист	Сомбор, Колекција	2014
43TK	14/56	Овас	Абел	Стабло	Сомбор, Колекција	2014
44TK	14/35	Овас	Непозната	Стабло	Б.П. Село	2014
45TK	14/64	Тритикале	Тријумф	Лист	Крагујевац	2014
46TK	14/69	Овас	Ловћен	Лист	Крагујевац	2014
47TK	14/31	Овас	Јадар	Семе	Р.Шанчеви	2014
48TK	14/42	Раж	Саво	Семе	Сомбор	2014
49TK	14/58	Јечам	Шестореди	Семе	Крагујевац	2014
50TK	14/76	Пшеница	Непозната	Семе	Б.П. Село	2014
51TK	14/75	Пшеница	Победа	Семе	Чачак	2014
52TK	14/40-1	Овас	Јадар	Плеве - семе	Сомбор	2014
53TK	14/40-2	Овас	Јадар	Семе	Сомбор	2014
54TK	14/59	Јечам	Двореди	Семе	Крагујевац	2014
55TK	14/44	Раж	Pallazio	Семе	Сомбор	2014
56TK	14/62	Тритикале	Непозната	Семе	Крагујевац	2014
57TK	14/33	Пшеница	Рапсодија	Доњи део стабла	Р. Шанчеви	2014
58TK	14/50-1	Пшеница	Победа	Доњи део стабла	Р.Шанчеви	2014
59TK	Кук. БПС	Кукуруз	Непозната (Институт за ратарство Н.Сад)	Лист	Б.П. Село	2014

Табела 12. Типски, патотипски и референтни сојеви рода *Pseudomonas*

NCPPB <sup>1)</sup>	Назив	Домаћин	Земља порекла	Година изолације	Карактеристике
NCPPB 281	<i>P. s. pv. syringae</i>	<i>Syringa vulgaris</i>	Велика Британија	1950	Типски сој врсте, патотипски сој
NCPPB 2842	<i>P. s. pv. syringae</i>	<i>Triticum aestivum</i>	САД	1972	Референтни сој
NCPPB 2612	<i>P. s. pv. atrofaciens</i>	<i>Triticum aestivum</i>	Нови Зеланд	1968	Патотипски сој
NCPPB 600	<i>P. s. pv. coronafaciens</i>	<i>Avena sativa</i>	Велика Британија	1958	Патотипски сој
NCPPB 1898	<i>P. s. pv. striafaciens</i>	Непознат	Непозната	1966	Патотипски сој
NCPPB 3093	<i>P. s. pv. japonica</i>	<i>Hordeum vulgare</i>	Јапан	1951	Патотипски сој
NCPPB 3732	<i>P. fuscovaginae</i>	<i>Triticum aestivum</i>	Мексико	1987	Референтни сој

<sup>1)</sup> NCPPB – National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, Food and Environmental Research Agency (FERA), Sand Hutton, York, UK.

Табела 13. Типски, патотипски, референтни и детерминисани контролни сојеви коришћени у истраживањима

Сој	Бактерија	Тест	Колекција
NCPPB 281	<i>P.s. pv. syringae</i>	Реакција по Gram-у, стварање флуоресцентног пигмента, изглед	NCPPB <sup>1)</sup>
NCPPB 2842	<i>P.s. pv. syringae</i>	колонија на модификованој Кинговој подлози Б, стварање	NCPPB
NCPPB 2612	<i>P.s. pv. atrofaciens</i>	левана, активност оксидазе, пектолитичка активност, аргинин	NCPPB
NCPPB 600	<i>P.s. pv. coronafaciens</i>	дехидролаза, хиперсензитивна реакција дувана, хидролиза	NCPPB
NCPPB 1898	<i>P.s. pv. striafaciens</i>	ескулина, хидролиза желатина, О/Ф тест, разлагање скроба,	NCPPB
NCPPB 3093	<i>P.s. pv. japonica</i>	коришћење манитола, сорбитола, еритритола, инозитола,	NCPPB
NCPPB 3732	<i>P. fuscovaginae</i>	стварање базе из квината и тартарата, редукција нитрата,	NCPPB
CM-1	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	Реакција по Gram-у	KFB <sup>2)</sup>
	<i>P. marginalis</i>	Пектолитичка активност	KFB
KFB 145	<i>P. s. pv. tomato</i>	Стварање честица леда	KFB
KFB 0101	<i>P. s. pv. morsprunorum</i>	Стварање честица леда	KFB
KFB 013	<i>Dickeya chrysanthemi</i>	Развој на 37 <sup>0</sup> С	KFB
KFB 85	<i>Pectobacterium carotovora</i> subsp. <i>carotovorum</i>	Пектолитичка активност, О/Ф тест	KFB
KFB 2	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>	Хидролиза желатина	KFB
KFB 275	<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>corylina</i>	Хидролиза скроба	KFB
B-56	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Оксидаза, аргинин дехидролаза, редукција нитрата	KFB
KFB 096	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> /biovar 1	Коришћење Д(-)тартарата	KFB

<sup>1)</sup> NCPPB – National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, Food and Environmental Research Agency (FERA), Sand Hutton, York, UK.

<sup>2)</sup> KFB – Колекција фитопатогених бактерија (куратор: проф. др Алекса Обрадовић)

### 4.3. Морфолошке, одгајивачке и биохемијско-физиолошке одлике проучаваних сојева

#### 4.3.1. Морфолошке одлике проучаваних сојева

**Одређивање реакције по Граму.** Коришћен је тест осетљивости према 3% КОН (Suslow, 1982). Бактеријска колонија старости 24 часа се захвати врхом стерилне дрвене чачкалице и хомогенизује у капи 3% КОН на микроскопској плочици. Услед дејства јаке базе, код Грам негативних бактерија долази до разарања ћелијског зида и ослобађања ДНК, због чега се приликом повлачења чачкалице на горе ствара еластична нит, док код Грам позитивних бактерија услед разлике у грађи ћелијског зида стварање нити изостаје. Као позитивна контрола коришћен је сој Грам-позитивне бактерије *S. m. subsp. michiganensis* (СМ-1), а као негативна контрола сој *P. s. pv. atrofaciens* (NCPPB 2612) (Schaad et al., 2001).

#### 4.3.2. Одгајивачке одлике проучаваних сојева

**Стварање флуоресцентног пигмента на модификованој Кинговој подлози Б.** Стварање флуоресцентног пигмента се посматра после гајења проучаваних сојева на модификованој Кинговој подлози Б у Петри кутијама 48-72 часа при 27<sup>0</sup>С, у тами под UV светлом (365nm). Сој *P. s. pv. atrofaciens* (NCPPB 2612) је коришћен као позитивна контрола (Schaad et al., 2001).

**Изглед колонија на модификованој Кинговој подлози Б.** Проучавани сојеви су засејавани на модификовану Кингову подлогу Б размазом бактериолошком петљом методом исцрпљивања ради добијања појединачних колонија. После 72 часа развоја бактерија при температури 27<sup>0</sup>С посматрани су боја, облик, пречник, изглед обода, испупченост и сјај колонија.

**Развој бактерија при температури 37<sup>0</sup>С.** По 5 ml течне подлоге од квашчевог екстракта и неорганских соли (YS) (Jones and Geider, 2001; loc.cit. Ивановић, 2010) је разливено у епрувете и након аутоклавирања постављено у водено купатило на 37<sup>0</sup>С, ради постизања жељене температуре подлоге пре засејавања. Подлога је засејана пипетирањем по 100 µl суспензије бактерија концентрације 10<sup>8</sup> cfu/ml и затим поново враћена у водено купатило. Тест је рађен у два понављања. Посматран је развој

бактерија на 37°C. Као негативна контрола је коришћена незасејана подлога, а као позитивна контрола сој *Dickeya chrysanthemi* (sin. *Erwinia chrysanthemi*) (KFB 013) (Гавриловић, 1998, loc.cit. Ивановић, 2010). Развој бактерија испољава се замућењем подлоге и оцењује се 3 и 7 дана након засејавања (Арсенијевић, 1997).

#### 4.3.3. Биохемијско-физиолошке одлике проучаваних сојева

**Стварање левана** је карактеристика већине бактерија рода *Pseudomonas*, а у неким случајевима има и диференцијални карактер. Леван је сложени полимер који настаје деловањем ензима на сахарозу и даљом полимеризацијом фруктозе, саставног дела овог дисахарида. Сојеви бактерија који стварају леван на подлогама обогаћеним сахарозом стварају крупне, мукоидне, сјајне, испупчене колоније тзв. "леван" типа. Бактеријска култура старости 24 часа се засејава на месопептонску подлогу обогаћену са 5% сахарозе (NAS) (Lelliot and Stead, 1987). Оцењивање стварања колонија леван типа вршено је после 48-72 часа. Као позитивна контрола је коришћен сој *P. s. pv. atrofaciens* (NCPPB 2612), а као негативна контрола сој *P. fuscovaginae* (NCPPB 3732) (Schaad et al., 2001).

**Активност оксидазе.** Присуство респираторног ензима цитохром оксидазе (активност оксидазе) је одређивано применом Ковачевог метода (Kovacs, 1956; loc. cit. Арсенијевић, 1997). Уколико бактерија поседује цитохром оксидазу, када се њена колонија старости 24 часа нанесе на траку са реагенсом који се понаша као донор електрона, долази до оксидације цитохром оксидазе и брзе промене, тј стварања љубичасте боје. Коришћене су готове оксидазне траке произвођача HiMedia (DD 018). Појава љубичасте боје у року од 5-10 секунди се сматра позитивном, у року од 10-60 секунди одложеном, а преко 60 секунди негативном реакцијом. Као позитивна контрола су коришћени сојеви *P. fluorescens* (B-56) и *P. fuscovaginae* (NCPPB 3732), а као негативна контрола сој *P. s. pv. atrofaciens* (NCPPB 2612) (Schaad et al., 2001).

**Активност пектолитичких фермената.** На кришке кромпира, дебљине 7-8 mm, постављене у стерилне Петри кутије наливене стерилном водом до половине висине кришки, наноси се 0,1 ml бактеријске суспензије проучаваних изолата концентрације 10<sup>8</sup> cfu/ml. Трулеж кришки на месту инокулације означава позитивну реакцију (Арсенијевић, 1997), а резултати су читавани након 48 часова од засејавања тако што је убодом у кришку чачкалицом проверавано да ли је дошло до размекшавања ткива. Као позитивна контрола су коришћени сојеви *P. s. subsp. carotovorum* (KFB 85) и *P.*

*marginalis*, а као негативна инокулисана кришка кромпира и оне инокулисане сојем *P. s. pv. atrofaciens* (NCPPB 2612) (Schaad et al., 2001).

**Активност аргинин-дехидролазе.** Ово је тест на присуство два ензима који одређеним врстама рода *Pseudomonas* омогућавају развој у анаеробним условима. У процесу стварања АТФ долази до разлагања аминокиселине аргинина до орнитина кроз ензимску реакцију у којој учествују ензими аргинин десмидаза и цитрулин уреидаза и у којој се као крајњи продукт стварају и  $\text{CO}_2$  и  $\text{NH}_3$ , те услед алкалне реакције стварања  $\text{NH}_3$  индикатор у подлози у коју су засејане бактерије које поседују ове ензиме мења боју. Коришћена је готова HiMedia подлога (М619). По 5 ml подлоге зеленкасте нијансе се сипа у епрувете и аутоклавира. После засејавања пуног захвата бактеријске колоније проучаваних сојева старости 24 часа, епрувете се инкубирају на температури од  $27^\circ\text{C}$ , а промена боје се уочава већ после 24 часа. Промена боје у интензивно љубичасту боју означава позитивну реакцију, тј присуство ензима који врше разлагање аргинина. Као позитивна контрола су коришћени сојеви *P. fuscovaginae* (NCPPB 3732) и *P. fluorescens* (B56), а као негативна контрола сој *P. s. pv. atrofaciens* (NCPPB 2612) (Schaad et al., 2001).

**Хиперсензитивна реакција дувана.** Фитопатогене бактерије које код осетљивих домаћина проузрокују некрозе биљног ткива, индукују стварање хиперсензитивне реакције на листовима дувана који су инфилтрирани бактеријском суспензијом концентрације око  $10^8$  cfu/ml. Суспензија бактерија се инфилтрира помоћу медицинског шприца, без игле, у мезофил листа дувана сорте Самсун, у предео између два нерва са наличја листа. Позитивну реакцију означава некроза инфилтрираног ткива после 24 часа. Непатогене бактерије неће проузроковати реакцију, иако неколико дана после инокулације може доћи до појаве хлорозе. Као позитивна контрола је коришћен сој *P. s. pv. atrofaciens* (NCPPB 2612), а као негативна контролни сој *P. fuscovaginae* (NCPPB 3732) (Schaad et al., 2001).

**Хидролиза ескулина.** Ескулин је гликозид који се у условима киселе средине хидролизује на глукозу и ескулетин који реагује са индикатором фери-цитратом и формира се тамно браон боја комплекса фенол гвожђе. Коришћена је течна подлога са ескулином (Klement et al., 1990) у коју је додавано 100  $\mu\text{l}$  засејане бактеријске суспензије проучаваних сојева старости 24 часа. Позитивна реакција појаве тамно смеђе боје подлоге је очитавана после 48 часова. Као позитивна контрола коришћен је сој *P. s. pv. atrofaciens* (NCPPB 2612), а као негативна контрола сој *P. fuscovaginae* (NCPPB 3732) (Schaad et al., 2001).

**Способност разградње желатина.** Желатин је протеин чије добијање из колагена преко полипептида до аминокиселина врше ензими желатиназе. Присуство желатина се утврђује коришћењем подлоге у којој је желатин истовремено и састојак за очвршћавање и супстрат за ензимску активност засејаних бактерија. По две епрувете са по 5 ml подлоге од квашчевог екстракта, пептона и желатина су засејане сваким проучаваним сојем и потом држане у термостату на 27<sup>0</sup>С, а резултати су читавани након 4, 7, 14 и 21 дан. С обзиром да се желатин топи на 28<sup>0</sup>С, епрувете са подлогом су пре читавања постављене у фрижидер (4<sup>0</sup>С) у трајању од сат времена. Немогућност очвршћавања подлоге после тог времена је знак разлагања желатина од стране засејаног соја (Lelliot and Stead, 1987). Као позитивна контрола су коришћени сојеви *Xanthomonas euvesicatoria* (KFB 2) и *P. s. pv. atrofaciens* (NCPPB 2612), а као негативна контрола незасејане подлоге и сој *P. s. pv. coronafaciens* (NCPPB 600).

**Оксидативно ферментативни тест.** Овим тестом се утврђује да ли проучавани сојеви разлажу угљене хидрате (глукозу) оксидативним или ферментативним путем. Разлагањем глукозе од стране бактерија у аеробним (О тип) и/или анаеробним (О/Ф или Ф тип) условима долази до стварања киселине и промене рН вредности подлоге, што проузрокује и промену боје индикатора, а самим тим и боју подлоге из плаве у жуту. У 4.5 ml аутоклавиране основне подлоге по Toming et al. 1978 (loc.cit. Арсенијевић, 1997) је асептично додато 0.5ml 10% раствора глукозе, тако да коначна концентрација буде 1%. Убодом су засејаване по 4 епрувете сваким сојем понаособ, од којих су по две заливане стерилним течним парафином до висине слоја 15mm. Као позитивна контрола за разлагање глукозе и у аеробним и у анаеробним условима је коришћен сој *P. c. subsp carotovorum* (KFB 85), а као негативна контрола за разлагање глукозе у анаеробним условима незасејана подлога и сојеви *P. s. pv. atrofaciens* (NCPPB 2612) (О) и *P. s. pv. japonica* (NCPPB 3093) (Ф). Очитавање је вршено 3 и 7 дана од засејавања подлоге (Арсенијевић, 1997).

**Способност разлагања скроба.** Скроб је велики молекул полисахарида који се састоји од  $\alpha$ -D-гликозних подјединица повезаних 1-6- $\alpha$ -гликозидним везама. Организми који производе и излучују екстраћелијске ензиме алда амилазе и олиго-1,6-глукозидазе имају способност хидролизе скроба разарањем гликозидних веза између подјединица простијих шећера (глукозе), које су уједно и коначни производи ових разлагања. Коришћена је подлога од хранљивог агара (28g), растворљивог скроба (2g) и воде (1000 ml) која се после аутоклавирања разлива у Петри кутије и на коју се засејавају бактеријске колоније старости 24 часа. Очитавање разлагања скроба се врши



после 7 дана инкубације засејаних подлога на 27<sup>0</sup>С. Површина Петри кутије се прелива Луголовим раствором. Одсуство промене боје око колонија означава разлагање скроба. У супротном, остаје тамно плава боја која настаје у реакцији јода и неразложеног скроба. Као позитивна контрола је коришћен сој *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina* (KFB 275), а као негативна контрола је коришћен сој *P. s.* pv. *atrofaciens* (NCPPB 2612) (Schaad et al., 2001).

**Коришћење манитола, сорбитола, еритритола и инозитола.** У 4.5 ml аутоклавиране основне подлоге (Науward, 1964; loc.cit. Schaad et al., 2001) асептично је додато 0.5ml 10% раствора манитола, сорбитола, еритритола и инозитола понаособ, тако да коначна концентрација буде 1%. Сојеви бактерија засејавани су убодом, а епрувете инкубиране на 27<sup>0</sup>С у трајању од 14 дана. У случају позитивне реакције долази до промене боје подлоге у жуту услед оксидације шећера, односно промене боје индикатора (бром тимол плаво) као последица стварања киселине. Као позитивна контрола је коришћен сој *P. s.* pv. *atrofaciens* (NCPPB 2612) (Schaad et al., 2001), а као негативна незасејане подлоге.

**Стварање база из тартарата и квината.** У тесту стварања базе из тартарата и квината коришћена је основна подлога (Аyers et al., 1919; loc.cit. Кузмановић, 2013) са додатком D-винске киселине (енг. D (-) tartaric acid) и D –хининске киселине (енг. D (-) quinic acid). Пре аутоклавирања рН се подешава на 7.1 и подлога добија зеленкасту нијансу. После аутоклавирања подлоге се разливају у Петри кутије а затим засејавају бактеријском колонијом проучаваних сојева старости 24 часа. Засејана подлога у Петри кутијама инкубирана је при 27<sup>0</sup>С у трајању 3-7 дана. У случају позитивне реакције долази до промене боје подлоге из зелене у плаву, услед стварања базе што утиче на промену боје индикатора (бром тимол плаво). Као негативна контрола за стварање база из тартарата је коришћен сој *Agrobacterium tumefaciens/biovar 1* (KFB 096), а према литературним подацима као позитивна контрола у обе реакције сој *P. s.* pv. *atrofaciens* (NCPPB 2612) (Schaad et al., 2001).

**Редуција нитрата.** Многи сојеви рода *Pseudomonas* имају способност раста у анаеробним условима богатим нитратним јонима, а енергију добијају из реакције редукције нитрата до нитрита путем ензима нитрат редуктазе. Нитрите често бактерије даље разлажу и до нитро оксида или гасовитог азота. Овај процес денитрификације је често познат као нитратна респирација. Неке бактерије могу редуковати нитрате до нитрита и у аеробним условима. Облигатни аероби не могу ферментисати, али неки могу користити нитрате у одсуству кисеоника, редукујући их до нитрита и касније до

азота (N<sub>2</sub>). Способност разлагања нитрата проучена је засејавањем бактерија убодом у по две епрувете које се затим залију стерилним 3% воденим агаром. Коришћена је подлога по Fahy и Hayward-у (1983; loc.cit. Sands, 1990). Негативна контрола подразумева неинокулисану подлогу и сој *P. s. pv. atrofaciens* (NCPPB 2612), а позитивна контрола сој *P. fluorescens* (B-56). Развој бактерија након 5 дана при 27<sup>0</sup>С указује на позитиван резултат теста и редукцију нитрата (Sands, 1990).

**Стварање честица леда.** Бактерије су гајене у 2 ml течне СРГ подлоге (Васто Casamino acid, 1g, Васто reptone, 10g, глукоза, 10g, вода, 1000ml), у епруветама, при оптималној температури за развој на хоризонталном мешачу током 24 часа. Пре извођења теста бактерије су 2 часа држане у фрижидеру (4<sup>0</sup>-5<sup>0</sup>С). На површину припремљене мешавине леда и 95% етанола у коју је постављен и термометар ради контроле температуре (око -10<sup>0</sup>С) поставља се алуминијумска посуда. Из културе бактерија у течной подлози пипетира се по 10 µl на дно алуминијумске посуде и посматра прелазак капи из течног у чврсто агрегатно стање. Стварање леда у року од неколико секунди сматра се позитивном реакцијом. Као позитивна контрола коришћени су сојеви *P. s. pv. syringae* (NCPPB 281) и *P. s. pv. morsprunorum* (KFB 0101), а као негативна сој *P. s. pv. tomato* (KFB 145).

#### **4.4. Молекуларна карактеризација и идентификација проучаваних сојева**

##### **4.4.1. Припрема узорака ДНК**

Припрема узорака ДНК проучаваних сојева извршена је излагањем суспензије бактерија (~10<sup>8</sup> cfu/ml) температури 100<sup>0</sup>С, у трајању 10 min. Лизирание бактеријске ћелије су затим инкубирание 5 min на леду и центрифугиране при 8000 rpm током 5 min. Квалитет и принос екстраховане ДНК утврђени су електрофорезом 1 µl узорка ДНК у 0.8% агарозном гелу (120V, 30 min). Супернатант је коришћен директно за PCR или је чуван при -20<sup>0</sup>С за каснија истраживања.

#### 4.4.2. Детекција присуства *surB1* гена и *Cfl* гена применом методе ланчаног умножавања фрагмента нуклеинске киселине – PCR

За прелиминарну идентификацију проучаваних сојева коришћена је PCR анализа присуства *surB1* гена одговорног за синтезу сирингомицина и *Cfl* гена везаног за синтезу коронафакат лигазе (коронатина). За умножавање јединственог ДНК продукта величине 752bp фрагмента *surB1* гена су коришћени прајмери: B1 5'-CTTCCGTGGTCTTGATGAGG-3' и B2 5'-TCGATTTTGCCGTGATGAGTC-3' (Sorensen et al., 1998), док су за умножавање продукта величине 650 bp секвенце *Cfl* гена коришћени прајмери: Primer1 5'-GGCGCTCCCTCGCACTT-3' и Primer2 5'-GGTATTGGCGGGGGTGC-3' (Bereswill et al., 1994).

Садржај реакционе смеше коначне запремине 15  $\mu$ l у обе PCR анализе је био следећи: 1 $\times$  DreamTaq зелени пуфер који садржи 20 mM MgCl<sub>2</sub> (Fermentas, Vilnius, Lithuania), 0,2 mM dNTPs, 0,5  $\mu$ M прајмера, 0,3 U DreamTaq ДНК полимеразе (Fermentas, Vilnius, Lithuania) и 1,5  $\mu$ l узорка ДНК.

Реакција детекције *surB1* гена се одвијала према следећем модификованом протоколу Лабораторије за фитобактериологију, Пољопривредни факултет, Београд: почетна денатурација при температури 94°C у трајању 5 min, 35 циклуса денатурације при 94°C у трајању 1 min, везивања прајмера при 67°C у трајању 1 min и екстензије при 72°C у трајању 1 min. Завршна екстензија одвијала се при температури 72°C у трајању 5 min. Реакција детекције *Cfl* гена се одвијала према следећем програму: почетна денатурација при температури 93°C у трајању 2 min, 37 циклуса денатурације при 93°C у трајању 2 min, везивања прајмера при 67°C у трајању 1 min и екстензије при 72°C у трајању 2 min. Завршна екстензија одвијала се при температури 72°C у трајању 5 min (Gašić et al., 2012).

Реакције умножавања ДНК су изведене у апарату Thermo Cycler 2240 (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA). Умножени ДНК продукти раздвојени су електрофорезом у 1,5% агарозном гелу. Гелови су потом обојени у раствору етидијум бромида (1  $\mu$ g/ml) и посматрани под UV светлом на трансилуминатору (Vilber Lourmat, Marne la Vallée Cedex, France).

#### 4.4.3. Проучавање генетичког диверзитета сојева коришћењем гер-PCR методе

За анализу генетичког диверзитета проучаваних сојева и одабир сојева за даљу идентификацију коришћен је гер-PCR метод којим је извршена анализа репетитивних секвенци распоређених унутар геномске ДНК.

У реализацији гер-PCR методе коришћени су прајмери REP 1-I: 5'-III ICG ICG ICA TCI GGC -3' и REP 2-I: 5'-ICG ICT TAT CIG GCC TAC-3' (Versalovic et al., 1991). Садржај реакционе смеше коначне запремине 25  $\mu$ l је 1 $\times$  PCR пуфера (Invitrogen, Sao Paulo, Brazil), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200  $\mu$ M dNTP, 2  $\mu$ M прајмера, 0.16 mg/ml бовин серум албумина, 10 % DMSO, 2 U Taq ДНК полимеразе (Invitrogen, Sao Paulo, Brazil) и 2  $\mu$ l узорка ДНК (Gašić et al., 2012).

Реакција се одвијала према следећем програму: почетна денатурација при температури 95°C у трајању 2 min, 30 циклуса денатурације при 94°C у трајању 3s и при 92°C у трајању 30s, везивање прајмера при 50°C у трајању 1 min и екстензије при 65°C у трајању 8 min. Завршна екстензија одвијала се при температури 65°C у трајању 8 min (Gašić et al., 2012).

Умножени ДНК продукти су раздвојени у 1.5 % (w/v) агарозном гелу у 1 $\times$  ТАЕ пуферу при 60 V у трајању од 30 min и при 75 V у трајању од 5 min (Gašić et al., 2012). Гелови су потом обојени у раствору етидијум бромид (1  $\mu$ g/ml) и посматрани под UV светлом на трансилуминатору (Vilber Lourmat, Marne la Vallée Cedex, France).

Добијени генетички профили проучаваних сојева су преведени у бинарну матрицу, где је бележено присуство (1) или одсуство (0) сваког умноженог фрагмента, под претпоставком да су фрагменти једнаке величине у различитим тракама хомологи. Филогенетска анализа је изведена коришћењем FreeTree програма (Hampl et al., 2001).

Примењена је непондерисана метода за спаривање група на темељу просечних вредности (енг. Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean, UPGMA), коришћењем Nei и Li коефицијента сличности (Nei and Li, 1979). Статистичка значајност је тестирана са 1000 "bootstrap" понављања. Конструкција дендрограма је изведена коришћењем TreeView програма (Page, 1996).

#### 4.4.4. Филогенетска анализа проучаваних сојева коришћењем 578bp локус *rpoD* гена

Због погодности универзалне примене 578bp локус *rpoD* гена у биномној класификацији валидно описаних врста и патовара, као и сврставању у геномоврсте и филогрупе, филогенетска анализа проучаваних сојева извршена је коришћењем секвенци 578bp локус *rpoD* гена проучаваних сојева добијених на начин описан од стране Parkinson et al. (2011) јер су ови аутори за потребе брзе идентификације изолованих сојева развили метод који се односи на коришћење само једног конститутивног гена (енг. single locus sequence).

Филогенетска анализа 578bp локуса *rpoD* гена проучаваних сојева укључује: одређивање таксономске позиције проучаваних сојева *P. syringae* путем њиховог сврставања (класификације) у филогрупе према Parkinson et al. (2011) и даље идентификације у односу на валидно описане врсте и патоваре, затим одређивање таксономске позиције проучаваних сојева путем њиховог сврставања (класификације) у филогрупе и подгрупе према Berge et al. (2014) у односу на диверзитет сојева *P. syringae* из спољашње средине и потом утврђивање генетичког диверзитета и еволутивних веза проучаваних сојева у односу на сојеве *P. syringae* изоловане са стрних жита.

Сојеви за филогенетску анализу 578bp локуса *rpoD* гена су изабрани на основу анализе добијеног гер-PCR генетичког профила.

**Екстракција ДНК.** Укупна ДНК је добијена из суспензије бактерија (око  $10^8$  cfu/ml) коришћењем комерцијално доступног комплета за екстракцију DNAasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) према упутству произвођача. Квалитет ДНК је проверен електрофорезом у агарозном гелу. Узорци ДНК су разређени на 10–20 ng/μl и остављени на чување на  $-20$  °C до даље анализе.

**PCR анализа 578bp локуса *rpoD* гена.** Фрагмент 578bp локуса *rpoD* гена умножен је коришћењем прајмера дизајнираних од стране Parkinson et al. (2011): PsrpoDFnp1 5` TGA AGG CGA RAT CGA AAT CGC CAA 3` и PsrpoDnp rpcr1 5` YGC MGW CAG CTT YTG CTG GCA 3`. Добијени производи секвенционирани су у оба смера са истим прајмерима (MacroGen Inc. Europe, Amsterdam, Netherlands).

Садржај реакционе смеше коначне запремине 50 μl је: 25 μl Fermentas 2x PCR Mastermix (Fermentas, Vilnius, Lithuania), 2 μl прајмера, 19 μl H<sub>2</sub>O и 2 μl uzorka ДНК. Реакција се одвијала према следећем програму: почетна денатурација при температури

94°C у трајању 2 min, 34 циклуса денатурације при 94°C у трајању 45s, везивања прајмера при 60°C у трајању 1 min и екстензије при 72°C у трајању 1 min. Завршна екстензија одвијала се при температури 72°C у трајању 7 min.

Квантификација ДНК и успешност амплификације 578bp локуса *rpoD* гена сојева одабраних за филогенетску анализу је одређена визуелним поређењем PCR продуката са маркером 100 bp MassRuler DNA Ladder Mix (Fermentas, Vilnius, Lithuania).

Добијени хроматограми су визуелизовани коришћењем софтвера FinchTV 1.4.0 (Geospiza, Inc., Seattle, WA, USA; <http://www.geospiza.com>). Секвенце (“forward” и “reverse”) одабраних сојева су обрађене коришћењем софтверског пакета MEGA 5.1 (Tamura et al., 2011) и за све су одређене консензус секвенце које обухватају 578bp локус *rpoD* гена.

#### **4.4.4.1.Одређивање таксономске позиције проучаваних сојева *P. syringae* комплекса врста према Parkinson et al. (2011)**

**Сврставање (класификација) сојева у филогрупе.** У циљу проучавања међусобног односа као и сврставања 36 проучаваних сојева у филогрупе утврђене од стране Parkinson et al. (2011), реконструисано је филогенетско стабло коришћењем парцијалних секвени 578bp локуса *rpoD* гена ових сојева заједно са типским и патотипским сојевима - представницима различитих филогрупа доступних у Банци гена NCBI. Све секвенце су поравнате на минималну заједничку дужину коришћењем CLUSTAL W алгорита (Thompson et al., 1994) интегрисаног у MEGA 5.2. софтверски пакет на минималну заједничку дужину и даље анализирани коришћењем истог софтвера (Tamura et al., 2011). Филогенетска анализа је изведена коришћењем “neighbor-joining” (NJ) методе (Saitou and Nei, 1987) са генетичком удаљеношћу израчунатом према Tajima & Nei моделу (Tajima and Nei, 1984) у 500 „bootstrap“ понављања (Parkinson et al., 2011). Филогенетско стабло је укорено са типским сојем *P. cichorii* (NCPBV 943) (Parkinson et al., 2011). За класификовање сојева у филогрупе коришћена је генетичка удаљеност 0,05 односно 5% (Sarkar and Guttman, 2004; Parkinson et al., 2011; Berge et al., 2014) приказана у форми матрикса. Осим тога, за сврставање (класификовање) сојева у филогрупе праћена је топологија филогенетског стабла.

**Даља идентификација проучаваних сојева** у оквиру филогрупа у које су претходно сврстани је извршена поређењем њихових секвенци 578b локуса *rpoD* гена са екстрахованим секвенцама типских и патотипских сојева валидно описаних врста и

патовара у оквиру дате филогрупе, а које су за Банку гена NCBI обезбедили Parkinson et al. (2011). Филогенетско стабло и матрикс генетичке удаљености за идентификацију проучаваних сојева су изведени према Parkinson et al. (2011).

#### **4.4.4.2.Одређивање таксономске позиције путем сврставања проучаваних сојева у филогрупе и подгрупе према Berge et al. (2014), у односу на диверзитет сојева *P. syringae* комплекса врста из спољашње средине**

*Сврставање проучаваних сојева у филогрупе и њихове подгрупе према Berge et al. (2014)* је извршено кроз неколико корака: (1) екстракција доступних секвенци *rpoD* гена представника ових подгрупа и то целих *rpoD* гена из Банке гена (енг. GenBank) Националног центра за биотехнолошке информације (енг. National Center for Biotechnology Information, NCBI) и секвенци локуса *rpoD* гена из Hwang et al. (2005) и Morris et al. (2008) MLST шеме из Базе података микроорганизама везаних за биљке и из животне средине (енг. Plant Associated and Environmental Microbes Database-PAMDB) (<http://genome.ppws.vt.edu/cgi-bin/MLST/home.pl>), (2) поравнање секвенци проучаваних сојева и екстракованих секвенци на минималну заједничку дужину коришћењем CLUSTAL W алгоритма и (3) извођење филогенетске анализе за сваку од испитиваних филогрупа применом „maximum likelihood“ методе према Kimura – 2 моделу (Kimura, 1980) са gamma 1 фактором корекције, а статистичка значајност је за сва упоређења тестирана “bootstrap” анализом са 100 понављања (Berge et al., 2014). Филогенетско стабло је укоренењено коришћењем секвенци типског соја врсте *P. aeruginosa* PAO1 (Berge et al., 2014). Сврставање (класификација) проучаваних сојева у подгрупе у оквиру сваке анализиране филогрупе је вршена на основу топологије изведеног филогенетског стабла и матрикса генетичке удаљености.

За проучавани *сој који предходно није био сврстан (класификован) у филогрупе према Parkinson et al. (2011)*, коришћен је програм BLAST (енг. Basic Local Alignment Search Tool) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) у бази PAMDB, како би се у односу на његову секвенцу утврдиле идентичне или блиско сродне секвенце сојева сврстаних у неку од филогрупа према Berge et al. (2014), након чега су ове секвенце екстраховане и изведена је филогенетска анализа, такође применом „maximum likelihood“ методе према Kimura – 2 моделу (Kimura, 1980) са gamma 1 фактором корекције, а статистичка значајност је за сва упоређења тестирана “bootstrap” анализом са 100 понављања (Berge et al., 2014). За упоређење су искоришћене и секвенце представника филогрупе 7 са

којом сој 27тк који није претходно класификован према Parkinson et al. (2011), дели најмању генетичку удаљеност.

#### **4.4.4.3. Утврђивање генетичког диверзитета и еволутивних веза проучаваних сојева са сојевима *P. syringae* изолованим са стрних жита**

Извршена је претрага базе PAMDB у циљу екстраховања *rpoD* секвенци сојева *P. syringae* изолованих са стрних жита, које су у својим истраживањима обезбедили Hwang et al. (2005) и неки други аутори.

Коришћењем ових екстрахованих секвенци изведено је филогенетско стабло и матрикс генетичких удаљености применом “neighbor-joining“ (NJ) методе (Saitou and Nei, 1987) са генетичком удаљеношћу израчунатом према Tajima & Nei моделу (Tajima and Nei, 1984) у 1000 „bootstrap“ понављања (Hwang et al, 2005). Филогенетско стабло је укорењено са сојем *P. fluorescens* Pf5 (Hwang et al, 2005).

Осим тога, за филогрупе 2 и 4 је изведена посебна филогенетска анализа која је имала за циљ утврђивање сличности (еволутивних веза) између 36 проучаваних сојева из Србије и сојева који су идентификовани као патогени стрних жита у свету. Примењена је UPGMA метода, коришћењем Tajima & Nei модела (Tajima and Nei, 1984), у 1000 „bootstrap“ понављања. Конструкција неукорењеног дендрограма је изведена коришћењем MEGA 5.2. софтверског пакета.

#### **4.5. Патогене одлике проучаваних сојева**

Патогене одлике проучаваних сојева проучене су инокулацијом биљака домаћина из којих су изоловани (табела 11). Изузетак су сојеви 1тк и 17тк за које је патогеност проучена и на другим биљкама и то за сој 1тк (поред овса из којег је изолована) и на биљкама ражи, а за сој 17тк (поред пшенице из које је изолована) и на биљкама јечма, овса, тритикалеа и ражи. За представника сваке биљне врсте је изабрана сорта из које је изолован један или више одабраних сојева. Сојеви за проучавање патогених одлика одабрани су на основу гер-PCR генетичког профила, тако што је из сваке од добијених 36 група изабран по један представник (табела 17).

Биљке су гајене у тресетном супстрату у пластичним саксијама, у клијалишту при Т од  $25 \pm 1^{\circ}$  С, светлосном режиму 12 сати дан и 12 сати ноћ и влажности од 95%. Биљке су инокулисане у фази сејанаца 7-12 дана након сетве (у зависности од брзине развоја биљака). Инокулум је припремљен тако што је мерена оптичка густина суспензије



бактеријске културе старе 24 часа у стерилној дестилованој води и подешена концентрација на  $10^6$ cfu/ml. Потом је у суспензију додат Силвет у концентрацији 0.025%. Као метод инокулације примењена је модификована метода Obradović et al. (2003). Инокулација је извршена потапањем листова биљака у посуду са суспензијом. На једном делу листова у саксијама су пре потапања одсечени врхови, како би се створиле свеже повреде. После инокулације, биљке су држане у комори при 95% влаге,  $T 25 \pm 1^0$  C и светлосном режиму 12 сати дан и 12 сати ноћ. Појава симптома је процењивана после 7 и 14 дана. Позитивну контролу су представљале биљке инокулисане типским и патотипским сојевима *P. s. pv. atrofaciens* (NCPPB 2612), *P. s. pv. syringae* (NCPPB 281, 2842), *P. s. pv. coronafaciens* (NCPPB 600), *P. s. pv. striafaciens* (NCPPB 1898), *P. s. pv. japonica* (NCPPB 3093) и *P. fuscovaginae* (NCPPB 3732), а негативну контролу биљке третиране стерилном дестилованом водом са Силветом (0.025%). Позитивном реакцијом је сматрана појава карактеристичних некроза на листовима и другим биљним деловима, а негативном одсуство било каквих симптома. Из инокулисаних биљака домаћина је рађена реизолација, на идентичан начин као и изолација, а карактеристике добијених реизолата су потврђиване употребом стандардних бактериолошких метода.

#### 4.6. Провера осетљивости сортимената

Осетљивост сортимената проучена је на неколико најзаступљенијих сората пшенице (Симонида, НС 40С, Apache, Победа, Ренесанса, ССВ Ingenio, Balaton, Звездана, Европа 90, Sirtaki и Рапсодија), и јечма (Нектариа, Нониус, Новосадски 525, Новосадски 565, Гранд и НС Марко) изабраних на основу рангирања у Годишњем извештају о атестираним количинама семена и садног материјала у 2013/2014 години који Пољопривредна саветодавна и стручна служба Сомбор издаје у склопу сертификације семена и садног материјала на територији Републике Србије (ПССС Сомбор, 2014).

За проверу осетљивости сортимената изабрани су сојеви који су се у тестовима провере патогености показали као највирулентнији представници сваке од група у коју су сврстани/идентификовани, а то су: сој 20тк (класификован у филогрупу 2b, идентификован као *P. s. pv. atrofaciens*), сој 7тк (класификован у филогрупу 2b као блиско сродан *P. s. pv. syringae/aptata/atrofaciens/lapsa/japonica*), сој 36тк (класификован у филогрупу 2b као сој који дели *groD* секвенцу са *P. s. pv. lapsa/aptata*), сој 42тк (класификован у филогрупу 4 као блиско сродни *P. s. pv.*

*coronafaciens/oryzae/porri/striaefaciens*) и сој 12тк (класификован у филогрупу 7а, идентификован као *P. viridiflava*). .

Провера осетљивости сортиментата извршена је применом исте методе као код провере патогености, а појава симптома је процењивана после 7 и 14 дана.

Интензитет инфективног одговора сорти пшенице и јечма према одабраним сојевима утврђен је према скали за оцену осетљивости Sellam и Wilcoxson (1976): **(0)** Отпорна – нема симптома инфекције; **(1)** Умерено отпорна- појава симптома у виду пега на око 5-10% површине листа; **(2)** Умерено осетљива- лезије различите величине са понеким спајањем, 10-15% површине листа захваћено; **(3)** Осетљива- некроза која захвата више од 25% листа.

## 5. РЕЗУЛТАТИ

### 5.1. Симптоми

Током прегледа стрних жита на одређеним локалитетима њихове производње у Србији узети су узорци зараженог биљног материјала на којима су уочени различити симптоми налик онима које проузрокују фитопатогене бактерије и који је даље послужио за изолацију патогена.

**Симптоми на листу.** У почетку развоја симптома, на листовима се појављују прозирне округле пеге које највероватније окружују стоме као место продора бактерија (слика 6, а, б). Око оваквих пега се понекад формира хлоротични ореол (слика 6, в) или прстен тамне боје (слика 6, а). У зависности од временских услова и интензитета обољења пеге или остају појединачне или се стапају у некротичне површине различитих димензија (слика 7) које временом избледе, тако да листови могу изгледати као осушени (слика 8). Понекад се око некротичних површина формирају тамније површине слабијег (слика 6) или јачег (слике 9, 10, 11) интензитета, а понекад на листовима остају само острвца зелене боје (слика 12). У оквиру пега и некротичних површина може доћи до испадања ткива (слике 10, 11). Појава бактеријског ексудата је ретка, а понекад цели листови добијају мастан изглед (слика 13). Пеге се понекад "сливају" низ лист, визуелно га сужавајући (слика 14).

**Симптоми на стаблу.** Некротичне пеге се понекад шире и на лисне рукавце и на стабло (слика 15).

**Доњи део стабла.** Најуочљивији симптом је некроза адвентивних коренова, а понекад и првог нодуса; адвентивни коренови су или некротичних врхова и заустављеног пораста или некроза прстенасто обухвата место њиховог избијања; **Коренов врат**- у пределу кореновог врата се понегде уочавају некрозе; **Коренови-**корен је на доста места крт и ломи се, а на тим местима се често уочава и некроза корена; углавном тамо где се после детаљног прања задржи земља, испод те земље (када се пажљиво уклони) се налази некротирано ткиво и ту је корен задебљао (слика 16).



**Слика 6.** Почетак развоја симптома на листовима у виду прозирних округлих пега- сој 57тк (пшеница, а) и сој 42тк (овас, б); појава хлоротичног ореола око пега на листовима- сој 39тк (јари оvas, в)

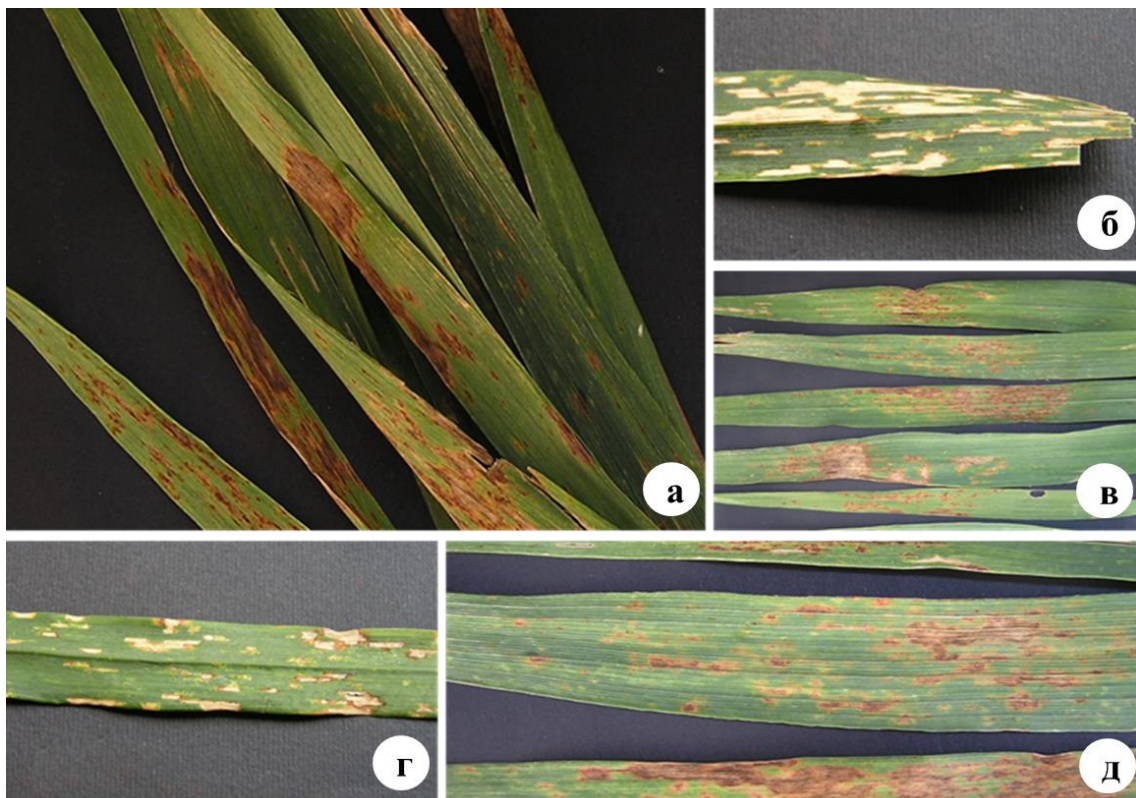


**Слика 7.** Пеге су појединачне или се стапају у некротичне површине различитих димензија – сој 45тк (тритикале, а), сој 32тк (пшеница, б, г) и сој 37тк (раж, в)



**Слика 8.** Пеге се стапају у некротичне површине које временом избледе и листови изгледају сасушени – сој 30тк (јечам, а) и сој 34тк (раж, б)





**Слика 9.** Појава некротичних површина јачег интензитета око пега –сој 40тк (овас, а, в, д) и сој 45тк (тритикале, б, г)

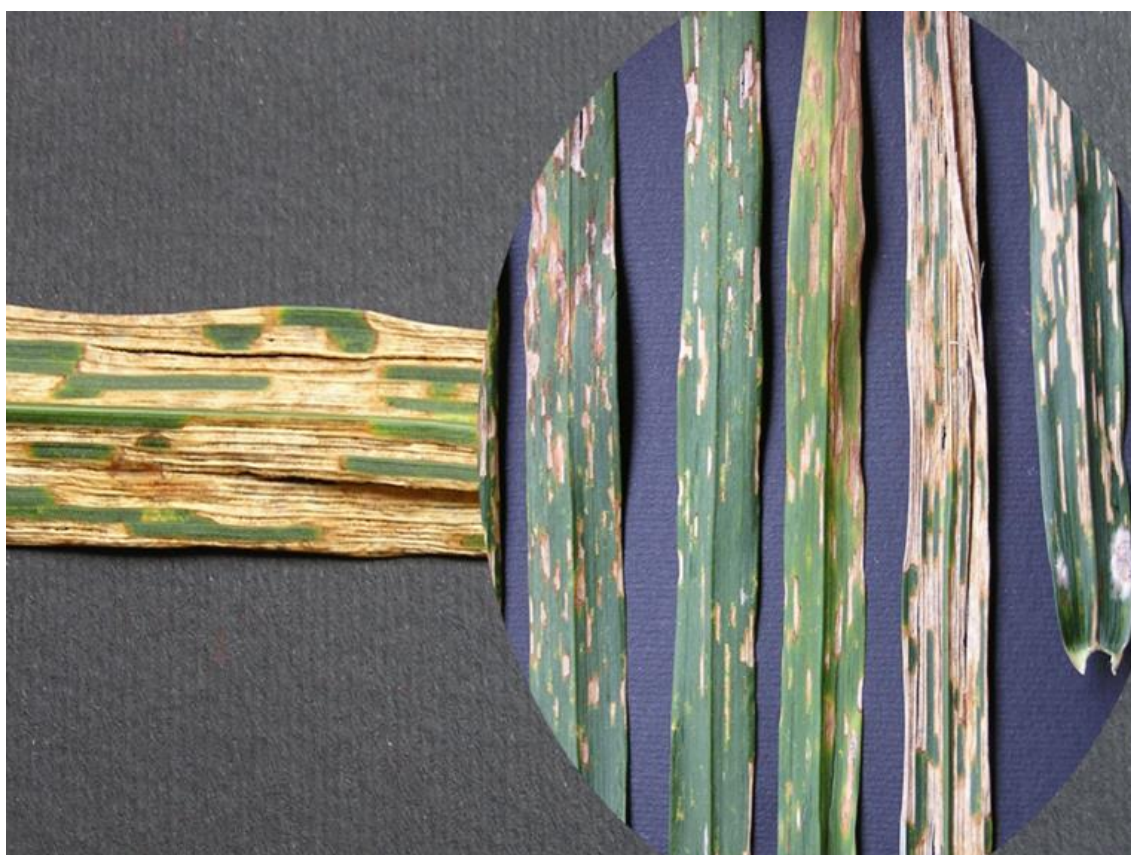


**Слика 10.** Појава некроза јачег интензитета, цепање и испадање ткива из пега: - сој 33тк (овас)





**Слика 11.** Појава некроза јачег интензитета, цепање и испадање ткива из пега: - сој 59тк (кукуруз, а) и сој 36тк (тритикале, б)



**Слика 12.** Некротичне пеге се шире, некроза захвата цео лист и остају само острвца зелене боје – сој 45тк (тритикале)



**Слика 13.** Појава масног изгледа листова – сој 22тк (пшеница, а) и сој 19тк (јечам, б, в)



**Слика 14.** Појава “сливања” пега низ лист и визуелног сужавања листа – сој 42тк (овас)





*Слика 15.* Појава симптома некрозе лисних рукаваца и стабла- сој бтк (јечам)



*Слика 16.* Појава симптоманекрозе корена- сојеви 8, 9, 10, 11 и 12тк (раж)

**Симптоми на класу и зрну.** У фази наливања зрна доњи део плева потамни, често интензивније са унутрашње стране плева (слика 17). Некротичне површине различитих димензија захватају и осје. Семе је смежурано, делимично потамнело, лагано и штуро (слике 17, 18). На неким класовима се уочава појава тамнијих пруга/површина које нису на доњој трећини плева, него на целим плевама.



**Слика 17.** Тамњење основе плева и штура зрна – сој 54тк (јечам)



**Слика 18.** Некроза плева и штура зрна- сој 52тк (овас а, б) и сој 47тк (овас, в)

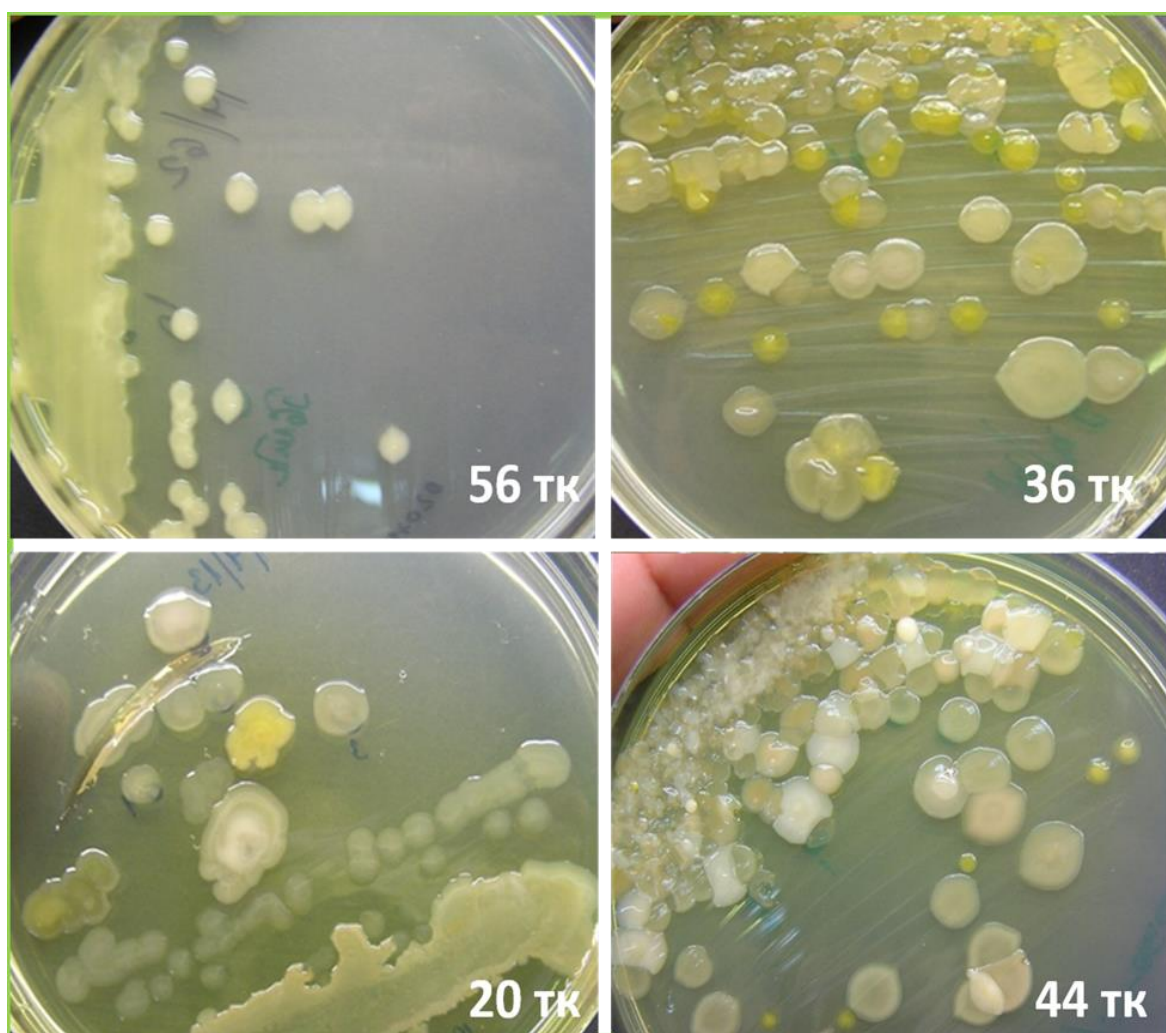


## 5.2. Изолација патогена и избор сојева за даље проучавање

На модификованој Кинговој подлози Б (КВС), после 48-72 часа, развиле су се бактерије различитог типа колонија (слика 19).

За даља истраживања су прихваћени сојеви (табела 11) чији је изглед колонија одговарао изгледу контролних сојева *Pseudomonas* spp. на истој подлози и/или које су стварале плаво-зелени флуоресцентни пигмент и проузроковале хиперсензитивну реакцију дувана.

Иако је приликом изолације примећен и развој колонија жуте боје, што је карактеристика бактерија рода *Xanthomonas*, у даљим анализама присуство *X. translucens* није утврђено.



Слика 19. Изглед Петри кутија 72 часа после засејавања мацерата биљног ткива

### 5.3. Морфолошке, одгајивачке и биохемијско-физиолошке одлике проучаваних сојева

#### 5.3.1. Морфолошке и одгајивачке одлике проучаваних сојева

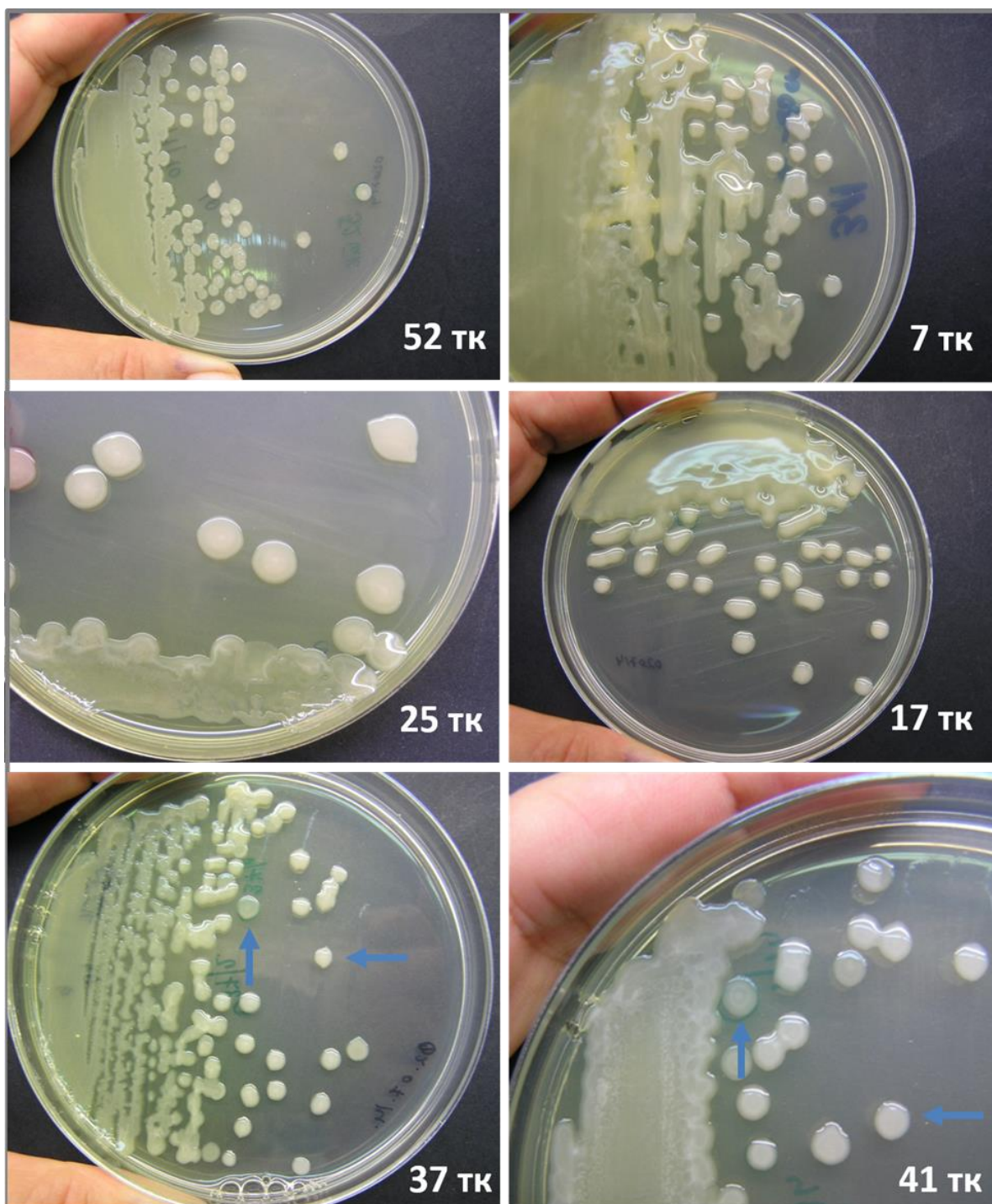
*Реакција по Граму*- сви проучавани сојеви су Грам негативни.

*Стварање флуоресцентног пигмента и изглед колонија на модификованој Кинговој подлози Б.* Развој колонија на модификованој Кинговој подлози Б (КВС) се уочава после 24 до 36 часова. После 48 часова колоније су око 1.5-2 mm у пречнику, округле, равних ивица, слабо испупчене, глатке, крем беле до крем-сиве боје. Карактеристичан изглед добијају након 72 часа од засејавања и постају светло сиво-зелене, маргина колоније се проширује и за разлику од центра колоније постаје прозирна. Сојеви стварају плаво-зелени флуоресцентни пигмент који се уочава под UV светлом (слика 24).

Проучавани сојеви се међу собом разликују према типу (1, 2 и 3) колонија развијених на модификованој Кинговој подлози Б (КВС) после 72 часа развоја при 27<sup>0</sup>С (табела 14). Такође, код неких проучаваних сојева се уочава и појава полиморфизма, то јест стварања више од једног типа колонија.

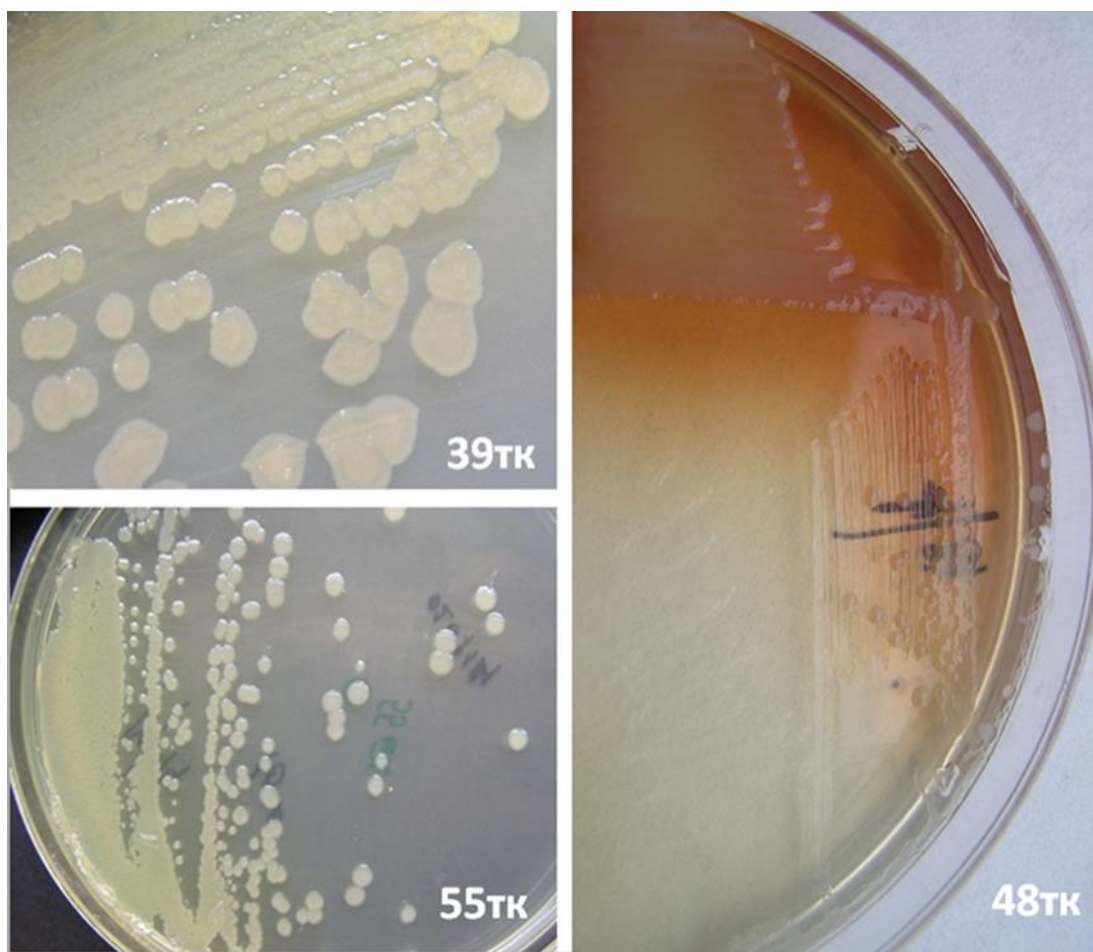
*Тип 1:* Колоније су беличасте или сивкасто-зеленкасте боје, округлог облика, пљоснате или благо испупчене, целих ивица, величине 3-5mm, провидне, са мање провидним центром; у зависности од количине слузасте материје коју стварају, колоније неких сојева могу имати мање (52тк) или више слузаст изглед (7тк, 25тк), а понекад и изглед слузасте капи беле боје (17тк). Уочено је да неки сојеви овог типа могу стварати колоније са различитом количином слузасте материје (37тк, 41тк). Сви сојеви стварају јасан флуоресцентни пигмент на Кинговој подлози Б, осим што је флуоресценција мало слабија код соја 52тк који је пореклом са овса (слика 20).

*Тип 2:* Колоније су беж нијансе, округлог облика, 2-3mm, пљоснате или благо испупчене и у односу на тип колонија 1 су мањег пречника, тамније са јаче израженим концентричним круговима, а изглед им је мање слузаст (39тк, 55тк). Колоније су слабије флуоресцентне у односу на колоније типа 1. Примећено је и да сојеви пореклом са овса и ражи у неким пресејавањима стварају мрки пигмент у подлози (48тк) (слика 21).



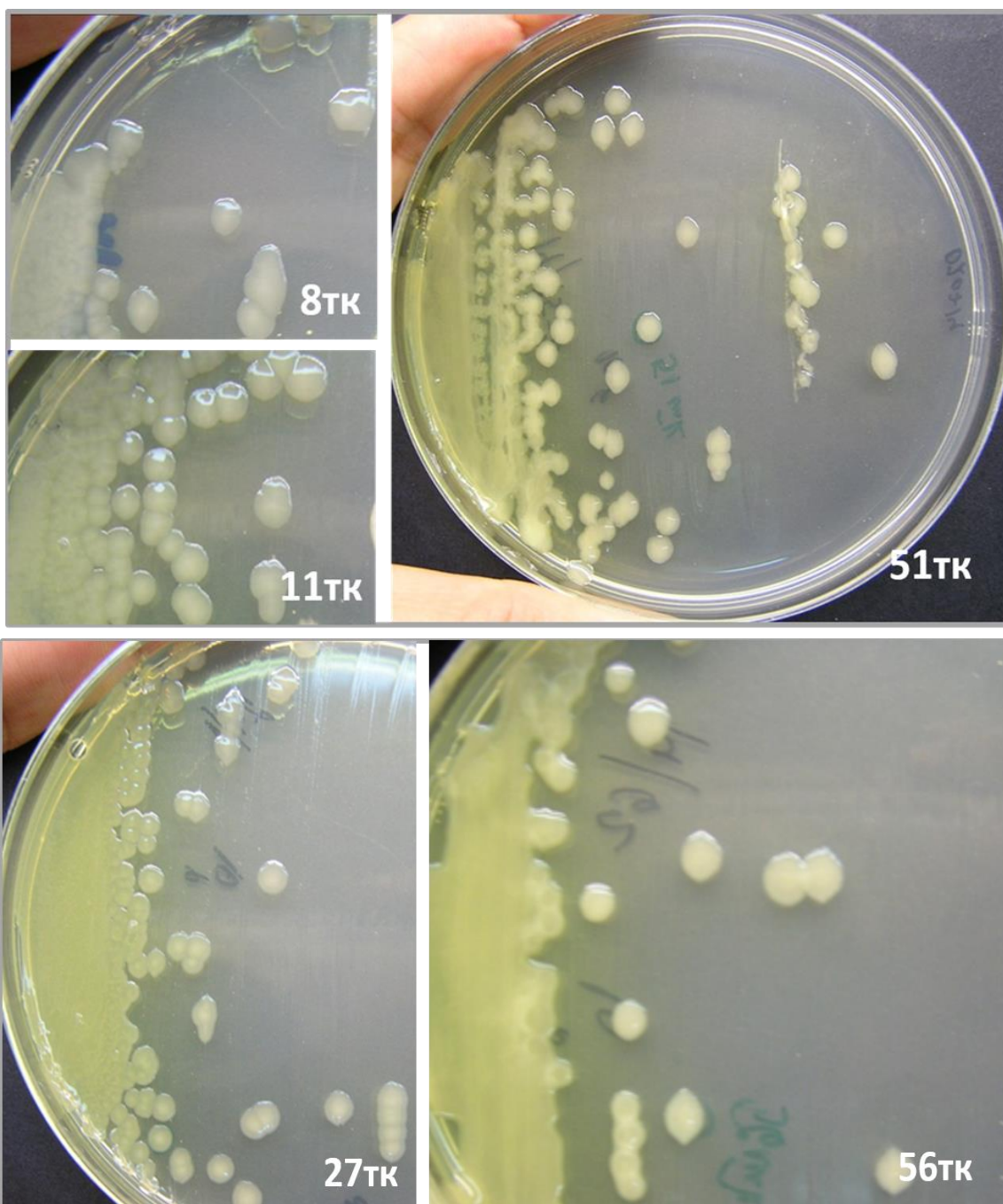
**Слика 20.** Изглед колонија *Tun 1* на КВС подлози након 72 часа: беличасте или сивкасто-зеленкасте боје, округлог облика, пљоснате или благо испупчене, целих ивица, величине 3-5mm, провидне, са мање провидним центром: мање слузасте-сој 52тк; више слузасте-сој 7 тк и сој 25тк; слузаста кап беле боје—сој 17тк; неки сојеви могу стварати колоније са различитом количином слузасте материје (обележено стрелицом)-сој 37тк и сој 41тк



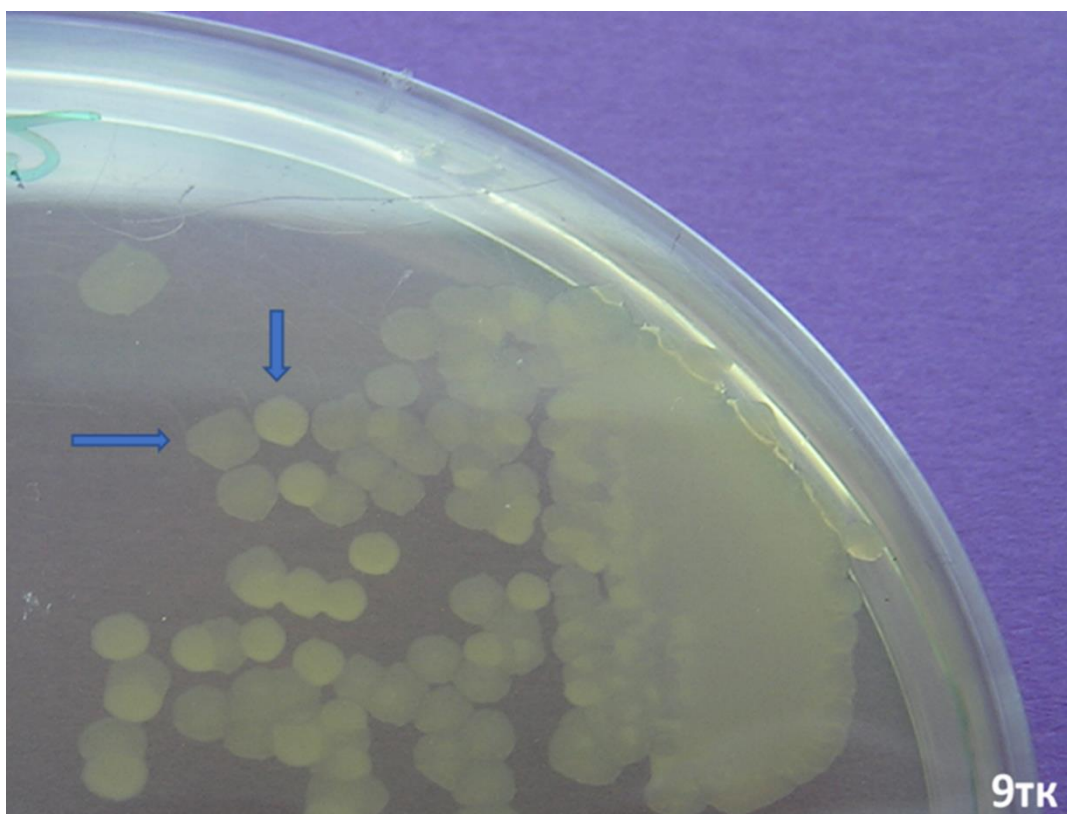


**Слика 21.** Изглед колонија *Tun 2* на КВС подлози након 72 часа: колоније беж нијансе, округлог облика, пречника 2-3mm, пљоснате или благо испупчене, тамније са јаче израженим концентричним круговима, мање слузасте: сој 39тк и сој 55 тк; сојеви пореклом са овса и ражи у неким пресејавањима стварају мрки пигмент– сој 48тк.

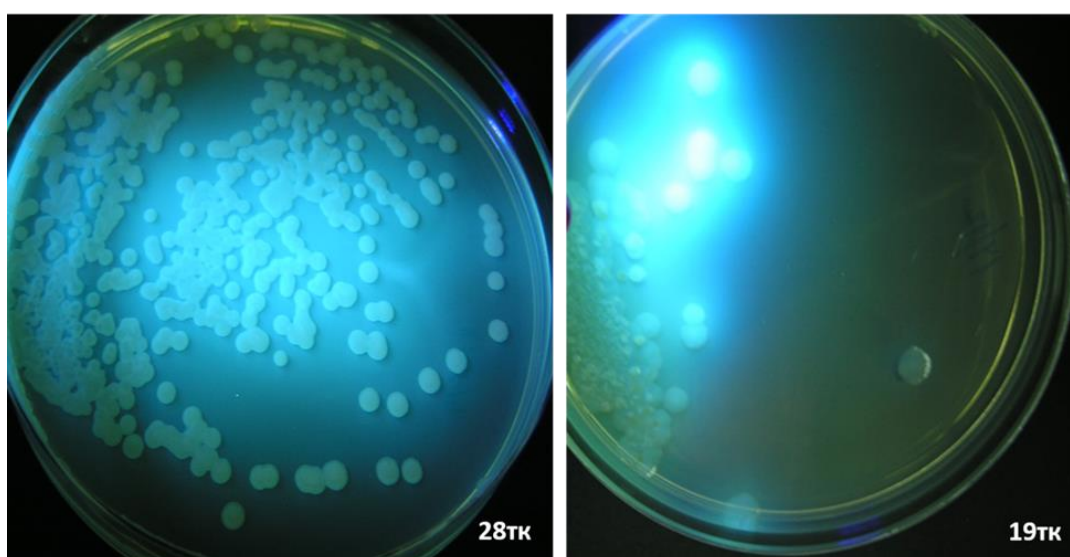
***Tun 3:*** Колоније су пљоснате или благо испупчене, целих ивица, величине 3-5mm са светлијим центром који изгледа као тачка; могу бити светло сиво-зелене, без или са мало слузасте материје и пљоснате (сој 8тк, сој 11тк и сој 51тк) или жуте са мање (сој 27тк) или више (сој 56тк) слузасте материје због које подсећају на сјајну жуту испупчену кап (слика 22). Код неких изолата (сој 9тк) се може уочити стварање два типа колонија (полиморфизам) (слика 23). Сви сојеви са тип 3 колонијама стварају флуоресцентни пигмент на модификованој Кинговој подлози Б, а флуоресценција соја 51тк је нешто слабија у односу на остале колоније овог типа.



**Слика 22.** Изглед колонија *Tun 3* на КВС подлози после 72 часа: пљоснате или благо испупчене колоније, целих ивица, величине 3-5 mm са светлијим центром који изгледа као тачка; могу бити светло сиво-зелене, без или са мало слузасте материје и пљоснате (сој 8тк, сој 11тк и сој 51тк) или жуте са мање (сој 27тк) или више (сој 56тк) слузасте материје



**Слика 23.** Стварање два типа колонија различите боје и конзистенције (полиморфизам)



**Слика 24.** Стварање флуоресцентног пигмента који се уочава под UV светлом

**Развој бактерија при температури 37°C.** У течној YS подлози при температури 37°C развијао се само сој 7тк, као и контролни сој *Dickeya chrysanthemi* KFB 013 (табела 14).



## 5.3.2. Биохемијско-физиолошке одлике проучаваних сојева

### 5.3.2.1. Резултати LOPAT тестова

Већина проучаваних сојева на подлози обogaћеној сахарозом ствара карактеристичне беле, испупчене и сјајне колоније "леван" типа (табела 14), међу којима се по изгледу истичу веома воденасте и слузаве колоније соја 17тк (слика 25). Сојеви 1тк, 8тк и 10тк не стварају леван, док је код сојева 9тк, 11тк, 12тк, 13/14тк, 27тк, 51тк и 56тк стварање левана варијабилно, што значи да га некада стварају, а некада не (слика 27). Када ствара колоније "леван" типа, код наведених сојева (9тк, 11тк, 12тк, 13/14тк, 27тк, 51тк и 56тк) се уочава специфична реакција стварања испупчених конвексних колонија са некарактеристичним жућкастим слузастим материјалом (слика 27).

Сви проучавани сојеви су оксидаза негативни.

Проучавани сојеви не показују пектолитичку активност на кришкама кромпира (табела 14), осим сојева 9тк, 11тк, 12тк, 13/14тк, 27тк и 51тк (слика 26) који је некада испољавају, а некада не (варијабилно) и то у различитом интензитету, на пример сој 51тк је испољава у већем интензитету него други сојеви.

Ни један од сојева не испољава активност аргинин дехидролазе (слика 28, а; табела 14).

Хиперсензитивну реакцију дувана су испољили сви сојеви (табела 14), али су неки од њих (попут 8тк, 10тк, 11тк, 12тк, 13/14тк, 39тк, 40тк, 42тк, 43тк, 45тк, 51тк и 56тк) у каснијим тестирањима ову реакцију испољавали само понекад (варијабилно).

**Диференцирање проучаваних сојева до врсте** извршено је на основу приказаних резултата LOPAT теста. LOPAT групи Ia (L [+], O [-], P [-], A [-], T[+]), односно збирној врсти *P. syringae* припадају сви осим соја 1тк који припада Ib (L [-], O [-], P [-], A [-], T[+]) и сојева 8тк, 9тк, 10тк, 11тк, 12тк, 13/14тк, 27тк, 51тк и 56тк код којих се, према именованој шеми, не може са сигурношћу одредити LOPAT група, јер позитивне реакције стварања левана, пектолитичку активност на кришкама кромпира и хиперсензитивну реакцију дувана испољавају само понекад (варијабилно).

Табела 14. Тип колонија, развој на 37<sup>0</sup>С и резултати LOPAT теста проучаваних сојева

ТК или реф.број	биљна врста, сорта, биљни део, локалитет	Тип колонија	37 °С	L <sup>(1)</sup>	O <sup>(2)</sup>	P <sup>(3)</sup>	A <sup>(4)</sup>	T <sup>(5)</sup>
<b>NCPPB 281</b>	<i>P. s.pv. syringae</i>	<b>1</b>	-	+	-	-	-	+
<b>NCPPB 2842</b>	<i>P. s. pv. syringae</i>	<b>1</b>	-	+	-	-	-	+
<b>NCPPB 2612</b>	<i>P. s. pv. atrofaciens</i>	<b>1</b>	-	+	-	-	-	+
<b>NCPPB 600</b>	<i>P. s. pv. coronafaciens</i>	<b>2</b>	-	+	-	-	-	+
<b>NCPPB 1898</b>	<i>P. s. pv. striafaciens</i>	<b>1</b>	-	+	-	-	-	+
<b>NCPPB 3093</b>	<i>P. s. pv. japonica</i>	<b>1</b>	-	+	-	-	-	+
<b>NCPPB 3732</b>	<i>Pseudomonas fuscovaginae</i>	<b>2</b>	+	-	+	-	+	-
<b>1тк</b>	овас, колекција 975, лист, Римски Шанчеви	<b>2</b>	-	-	-	-	-	+
<b>2тк</b>	тритикале, Тријумф, лист, Ниш-Алексинач	<b>1</b>	-	+	-	-	-	+
<b>3тк</b>	тритикале, Одисеј, лист, Крагујевац	<b>1</b>	-	+	-	-	-	+
<b>4тк</b>	јари јечам, непозната, лист, Панчево	<b>1</b>	-	+	-	-	-	+
<b>5тк</b>	тритикале, непозната, доњи сео стабла, Ниш-Алексинач	<b>1</b>	-	+	-	-	-	+
<b>6тк</b>	јечам, НС 565, доњи део стабла, Сомбор	<b>1</b>	-	+	-	-	-	+
<b>7тк</b>	јечам, НС 565, семе, Сомбор	<b>1</b>	+	+	-	-	-	+
<b>8тк</b>	раж, Ф6, доњи део стабла, Крагујевац	<b>3</b>	-	-	-	-	-	[-][+]
<b>9тк</b>	раж, Ф6, доњи део стабла, Крагујевац	<b>3</b>	-	[-][+]	-	[-][+]	-	+
<b>10тк</b>	раж, Ф6, глава корена, Крагујевац	<b>3</b>	-	-	-	-	-	[-][+]
<b>11тк</b>	раж, Ф6, глава корена, Крагујевац	<b>3</b>	-	[-][+]	-	[-][+]	-	[-][+]
<b>12тк</b>	раж, Ф6, коренчићи, Крагујевац	<b>3</b>	-	[-][+]	-	[-][+]	-	[-][+]
<b>13/14тк</b>	тритикале, КГ 20, лист, Крагујевац	<b>3</b>	-	[-][+]	-	[-][+]	-	[-][+]
<b>16тк</b>	овас, Дунав, лист, Римски Шанчеви	<b>1</b>	-	+	-	-	-	+
<b>17тк</b>	пшеница, самоникла, доњи део стабла, Бачко Петрово Село	<b>1</b>	-	+	-	-	-	+
<b>19тк</b>	јечам, непозната, лист, Сомбор- Билић	<b>1</b>	-	+	-	-	-	+
<b>20тк</b>	пшеница, самоникла, лист, Сомбор-Билић	<b>1</b>	-	+	-	-	-	+
<b>21тк</b>	пшеница, К11191, огл. сорта Saatzucht-donau, лист, Сомбор	<b>1</b>	-	+	-	-	-	+
<b>22тк</b>	пшеница, К11186, огл. сорта Saatzucht-donau, лист, Сомбор	<b>1</b>	-	+	-	-	-	+
<b>23тк</b>	раж, НС/КГ1/502, сорта НС Института у приз., лист, Сомбор	<b>1</b>	-	+	-	-	-	+
<b>24тк</b>	јечам, шестореди, колекција, лист, Крагујевац	<b>1</b>	-	+	-	-	-	+
<b>25тк</b>	тритикале, непозната, колекција, лист, Крагујевац	<b>1</b>	-	+	-	-	-	+
<b>26тк</b>	пшеница, колекција 11191, лист, Сомбор	<b>1</b>	-	+	-	-	-	+
<b>27тк</b>	овас Јадар, лист, Римски Шанчеви	<b>3</b>	-	[-][+]	-	[-][+]	-	+
<b>28тк</b>	јечам, шестореди, колекција, лист, Крагујевац	<b>1</b>	-	+	-	-	-	+
<b>29тк</b>	јечам, шестореди, колекција, семе, Крагујевац	<b>1</b>	-	+	-	-	-	+

Наставак на следећој страни

ТК или реф.број	биљна врста, сорта, биљни део, локалитет	Тип колонија	37 °C	L <sup>(1)</sup>	O <sup>(2)</sup>	P <sup>(3)</sup>	A <sup>(4)</sup>	T <sup>(5)</sup>
30тк	јечам, шестореди, колекција, лист, Крагујевац	1	-	+	-	-	-	+
31тк	овас, Јадар, лист, Римски Шанчеви	1	-	+	-	-	-	+
32тк	пшеница, НС Рапсодија, лист, Римски Шанчеви	1	-	+	-	-	-	+
33тк	овас, непозната, лист, Бачко Петрово село	1	-	+	-	-	-	+
34тк	раж, Саво, лист, Сомбор- Билић	1	-	+	-	-	-	+
35тк	раж, Pallazio, лист, Сомбор- Билић	1	-	+	-	-	-	+
36тк	тритикале, Тријумф, лист, Сомбор- Билић	1	-	+	-	-	-	+
37тк	раж, непозната, колекција, лист, Сомбор	1	-	+	-	-	-	+
38тк	Кукуруз, непозната, колекција, лист, Сомбор	1	-	+	-	-	-	+
39тк	јари оvas, непозната, лист, Сомбор- Билић	2	-	+	-	-	-	[-][+]
40тк	овас, непозната, колекција, лист, Сомбор	2	-	+	-	-	-	[-][+]
41тк	дурум, Дурумко, колекција, лист, Сомбор	1	-	+	-	-	-	+
42тк	овас, Абел, колекција, лист, Сомбор	2	-	+	-	-	-	[-][+]
43тк	овас, Абел, колекција, стабло, Сомбор	2	-	+	-	-	-	[-][+]
44тк	овас, непозната, стабло, Бачко Петрово село	1	-	+	-	-	-	+
45тк	тритикале, Тријумф, лист, Крагујевац	1	-	+	-	-	-	[-][+]
47тк	овас, Јадар, семе, Римски Шанчеви	1	-	+	-	-	-	+
48тк	раж, Саво, семе, Сомбор	2	-	+	-	-	-	+
49тк	јечам, шестореди, семе, Крагујевац	1	-	+	-	-	-	+
50тк	пшеница, непозната, семе, Бачко Петрово село	1	-	+	-	-	-	+
51тк	пшеница, Победа, семе, Чачак	3	-	[-][+]	-	[-][+]	-	[-][+]
52тк	овас, Јадар, семе/плеве, Сомбор	1	-	+	-	-	-	+
53тк	овас, Јадар, семе, Сомбор	2	-	+	-	-	-	+
54тк	јечам, двореди, семе, Крагујевац	1	-	+	-	-	-	+
55тк	раж, Pallazio, семе, Сомбор	2	-	+	-	-	-	+
56тк	тритикале, непозната, семе, Крагујевац	3	-	[-][+]	-	-	-	[-][+]
57тк	пшеница, Рапсодија, доњи део стабла, Римски Шанчеви	1	-	+	-	-	-	+
58тк	пшеница, Победа, доњи део стабла, Римски Шанчеви	1	-	+	-	-	-	+
59 тк	кукуруз, непозната (Институт Н. Сад), лист, Б. Петрово Село	1	-	+	-	-	-	+

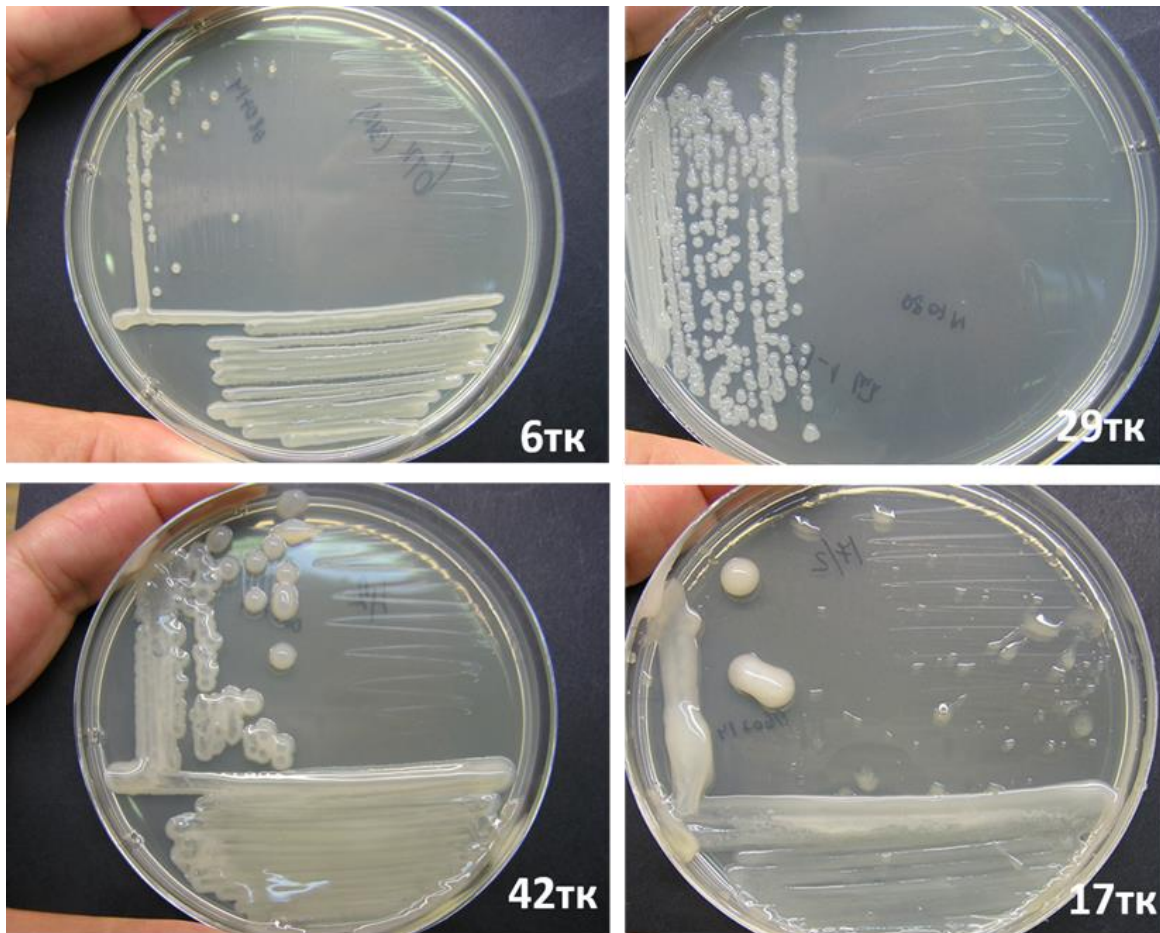
1) Стварање левана: (+) сој ствара леван; (-) сој не ствара леван; [-][+] стварање левана је варијабилно;

2) Реакција оксидазе: (+) позитивна реакција; (-) негативна реакција;

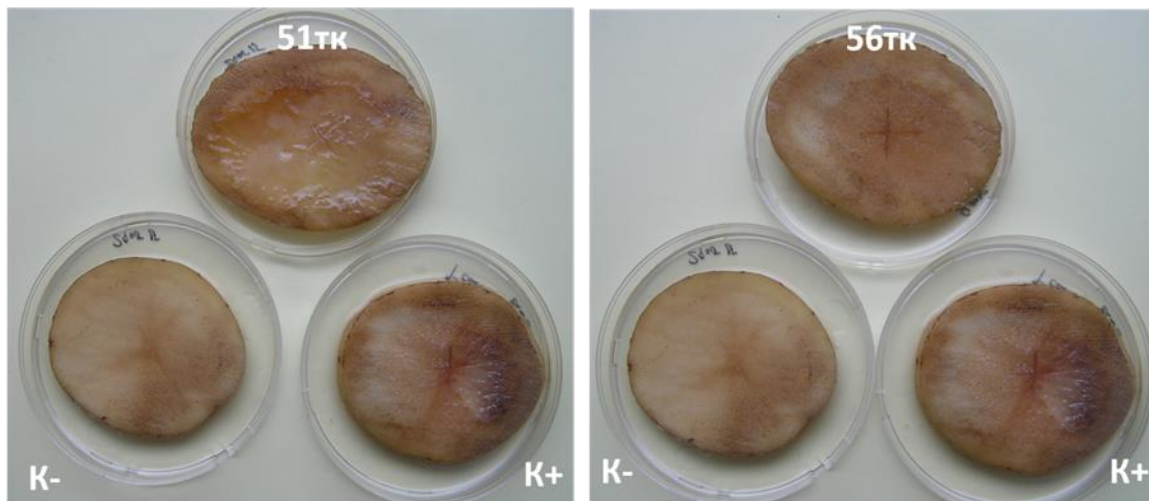
3) Пектолитичка активност: (+) сој има пектолитичку активност; (-) сој нема пектолитичку активност; [-][+] пектолитичка активност је варијабилна;

4) Активност аргинин дехидролазе: (+) позитивна реакција; (-) негативна реакција;

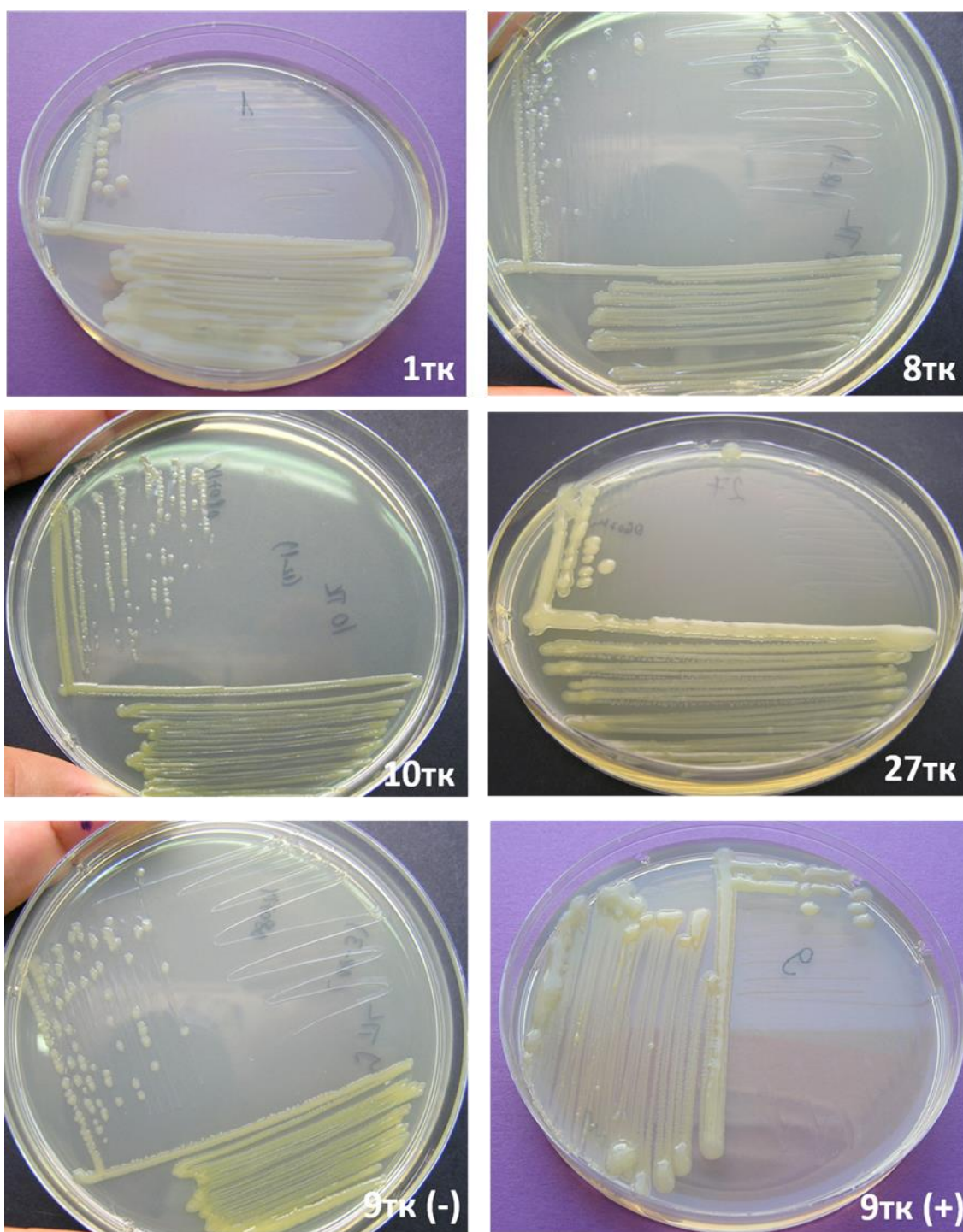
5) ХР дувана: (+) сој изазива ХР дувана; (-) сој не изазива ХР дувана; [-][+] ХР дувана је варијабилна.



**Слика 25. Стварање левана.** Изглед колонија проучаваних сојева који стварају леван на месопептонској подлози обогаћеној са 5% сахарозе - карактеристичне беле, испупчене и сјајне колоније (леван тип): сојеви 6 тк, 29тк, 42тк и 17тк



**Слика 26. Пектолитичка активност:** Појава трулежи кромпира 24-48 сати од засејавања је знак позитивне реакције (К+ *Pectobacterium carotovorum* (КФВ 85); К- неинкулисана кришка кртоле кромпира; проучавани сој 51тк који испољава и сој 56тк који не испољава пектолитичку активност)



**Слика 27.** Изглед колонија проучаваних сојева који не стварају леван на месопептонској подлози обогаћеној са 5% сахарозе: сојеви 1тк, 8тк и 10тк и изглед колонија проучаваних сојева који леван на месопептонској подлози обогаћеној са 5% сахарозе стварају варијабилно: сојеви 27тк (леван позитивна колонија) и сој 9тк (леван негативна и леван позитивна колонија); изглед леван позитивне колоније: уочава се појава испупчених колонија са некарактеристичним жућкастим слузастим материјалом.



### 5.3.2.2. Остале биохемијско-физиолошке одлике проучаваних сојева

Сви проучавани сојеви разлажу ескулин (слика 29, а), имају оксидативни метаболизам глукозе, не користе скроб (слика 30) и не редукују нитрате (слика 29, б); већина проучаваних сојева користи манитол, сорбитол, инозитол и еритритол, осим соја 27тк (-) (сорбитол и инозитол) и соја 56тк (-) (еритритол) (табела 15).

Желатин хидролизују, у периоду до 4 дана после инокулације подлоге, сојеви 6тк, 9тк, 10тк, 11тк, 12тк, 21тк, 25тк, 27тк, 38тк, 49тк, 56тк и 59тк, за разлику од сојева 2тк, 8тк, 19тк, 29тк, 32тк, 37тк, 44тк, 45тк, 55тк, 57тк и 58тк код којих се реакција хидролизе желатина не испољава ни после 21 дан (слика 28, б). Остали сојеви показују одложено реакцију хидролизе желатина и то у периоду 4 - 7 дана (20тк, 22тк, 23тк, 24тк, 26тк, 28тк, 30тк, 33тк, 34тк, 35тк, 39тк, 42тк и 51тк), 7 - 14 дана (13/14тк, 16тк, 31тк, 40тк, 47тк и 54тк) и 14 - 21 дан (3тк и 50тк). Сојеви 1тк, 4тк, 5тк, 7тк, 17тк, 36тк, 41тк, 43тк, 48тк, 52тк и 53тк испољавају варијабилне реакције у два понављања истог теста (у првом понављању не разлажу, у другом разлажу желатин и обратно) (табела 15).

Базу из Д - винске киселине стварају сојеви 8тк, 9тк, 10тк, 11тк, 12тк, 13/14тк и 27тк, док су сојеви 7тк и 17тк испољили негативну реакцију (слика 31). Код свих осталих контролних и проучаваних сојева дошло је до делимичне промене боје подлоге из зелене у плаву боју, тако да се овај резултат сматра слабо-позитивном реакцијом [+]. На основу појаве плаве боје подлоге, базу из Д - хининске киселине стварају сојеви 8тк, 9тк, 16тк, 25тк, 26тк, 30тк и 33тк и контролни сојеви *P. s. pv. syringae* (NCPPB 281) и *P. s. pv. japonica* (NCPPB 3093), док је само контролни сој *P. fuscovaginae* (NCPPB 3732) испољио негативну реакцију. Код свих осталих контролних и проучаваних сојева дошло је до делимичне промене боје подлоге из зелене у плаву боју тако да се и овај резултат сматра слабо-позитивном реакцијом [+] (табела 15).

Проучавани сојеви 1тк, 2тк, 3тк, 6тк, 16тк, 17тк, 20тк, 23тк, 24тк, 25тк, 26тк, 27тк, 31тк, 32тк, 33тк, 34тк, 35тк, 39тк, 40тк, 42тк, 43тк, 48тк, 49тк, 50тк, 52тк, 53тк и 55тк стварају честице леда у моменталној реакцији, док сојеви 4тк, 5тк, 7тк, 9тк, 10тк, 12тк, 19тк, 22тк, 36тк, 37тк, 38тк и 44тк стварају честице леда у одложеној реакцији. Сојеви 8тк, 11тк, 13/14тк, 21тк, 28тк, 29тк, 30тк, 41тк, 45тк, 47тк, 51тк, 54тк, 56тк, 57тк, 58тк и 59тк не стварају честице леда (слика 32; табела 15).

Табела 15. Биохемијско-физиолошке карактеристике проучаваних сојева

ТК или реф бр.	хидролиза				О/Ф Тест	Хидрол .скроба	Коришћење угљеникових једињења					Редукција нитрата	IN <sup>3)</sup>		
	ескулин	Желатин (дани)					манитол	сорбитол	инозитол	еритрол	квинат <sub>1)</sub>			тартарат <sub>2)</sub>	
		4	7	14											21
NCPPB 281	+	-	-	-	-	+/-	-	+	+	+	+	+	зеленожута	-	+
NCPPB 2842	+	-	-	-	-	+/-	-	+	+	+	+	[+]	[+]	-	[+] <sup>4)</sup>
NCPPB 2612	+	+	+	+	+	+/-	-	+	+	+	+	[+]	[+]	-	[+]
NCPPB 600	+	-	-	-	-	+/-	-	+	+	+	+	[+]	[+]	-	+
NCPPB 1898	+	+	+	+	+	+/-	-	+	+	+	+	[+]	[+]	-	+
NCPPB 3093	+	+	+	+	+	+/-	-	+	+	+	+	+	[+]	-	+
NCPPB 3732	-	+	+	+	+	+/-	-	-/+	-	-/+	-	-	[+]	-/+	+
1тк	+	-	-	-/+	+	+/-	-	+	+	+	+	[+]	[+]	-	+
2тк	+	-	-	-	+	+/-	-	+	+	+	+	[+]	[+]	-	+
3тк	+	-	-	-	+	+/-	-	+	+	+	+	[+]	[+]	-	+
4тк	+	-/+	-/+	+	+	+/-	-	+	+	+	+	[+]	[+]	-	[+]
5тк	+	-/+	-/+	+	+	+/-	-	+	+	+	+	[+]	[+]	-	[+]
6тк	+	+	+	+	+	+/-	-	+	+	+	+	[+]	[+]	-	+
7тк	+	-	-/+	+	+	+/-	-	+	+	+	+	[+]	-	-	[+]
8тк	+	-	-	-	-	+/-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
9тк	+	+	+	+	+	+/-	-	+	+	+	+	+	+	-	[+]
10тк	+	+	+	+	+	+/-	-	+	+	+	+	[+]	+	-	[+]
11тк	+	+	+	+	+	+/-	-	+	+	+	+	[+]	+	-	-
12тк	+	+	+	+	+	+/-	-	+	+	+	+	[+]	+	-	[+]
13/14тк	+	-	-	+	+	+/-	-	+	+	+	+	[+]	+	-	-
16тк	+	-	-	+	+	+/-	-	+	+	+	+	+	[+]	-	+
17тк	+	-/+	-/+	+	+	+/-	-	+	+	+	+	[+]	-	-	+
19тк	+	-	-	-	-	+/-	-	+	+	+	+	[+]	[+]	-	[+]
20тк	+	-	+	+	+	+/-	-	+	+	+	+	[+]	[+]	-	+
21тк	+	+	+	+	+	+/-	-	+	+	+	+	[+]	[+]	-	-
22тк	+	-	+	+	+	+/-	-	+	+	+	+	[+]	[+]	-	[+]
23тк	+	-	+	+	+	+/-	-	+	+	+	+	[+]	[+]	-	+
24тк	+	-	+	+	+	+/-	-	+	+	+	+	[+]	[+]	-	+
25тк	+	+	+	+	+	+/-	-	+	+	+	+	+	[+]	-	+
26тк	+	-	+	+	+	+/-	-	+	+	+	+	+	[+]	-	+
27тк	+	+	+	+	+	+/-	-	+	-	-	+	[+]	+	-	+
28тк	+	-	+	+	+	+/-	-	+	+	+	+	[+]	[+]	-	-

Наставак на следећој страни

ТК или реф бр.	хидролиза				О/Ф Тест	Хидрол. скроба	Коришћење угљеникових једињења						Редукција нитрата	IN <sup>(3)</sup>	
	ескулин	Желатин (дани)					манитол	сорбитол	инозитол	еритрол	квинат <sup>1)</sup>	тартарат <sup>2)</sup>			
		4	7	14											21
29тк	+	-	-	-	-	+/-	-	+	+	+	+	[+]	[+]	-	-
30тк	+	-	+	+	+	+/-	-	+	+	+	+	+	[+]	-	-
31тк	+	-	-	+	+	+/-	-	+	+	+	+	[+]	[+]	-	+
32тк	+	-	-	-	-	+/-	-	+	+	+	+	[+]	[+]	-	+
33тк	+	-	+	+	+	+/-	-	+	+	+	+	+	[+]	-	+
34тк	+	-	+	+	+	+/-	-	+	+	+	+	[+]	[+]	-	+
35тк	+	-	+	+	+	+/-	-	+	+	+	+	[+]	[+]	-	+
36тк	+	-/+	-/+	-/+	-/+	+/-	-	+	+	+	+	[+]	[+]	-	[+]
37тк	+	-	-	-	-	+/-	-	+	+	+	+	[+]	[+]	-	[+]
38тк	+	+	+	+	+	+/-	-	+	+	+	+	[+]	[+]	-	[+]
39тк	+	-	+	+	+	+/-	-	+	+	+	+	[+]	[+]	-	+
40тк	+	-	-	+	+	+/-	-	+	+	+	+	[+]	[+]	-	+
41тк	+	-	-	-	-/+	+/-	-	+	+	+	+	[+]	[+]	-	-
42тк	+	-	+	+	+	+/-	-	+	+	+	+	[+]	[+]	-	+
43тк	+	-	-/+	-/+	+	+/-	-	+	+	+	+	[+]	[+]	-	+
44тк	+	-	-	-	-	+/-	-	+	+	+	+	[+]	[+]	-	[+]
45тк	+	-	-	-	-	+/-	-	+	+	+	+	[+]	[+]	-	-
47тк	+	-	-	+	+	+/-	-	+	+	+	+	[+]	[+]	-	-
48тк	+	-	-	-/+	+	+/-	-	+	+	+	+	[+]	[+]	-	+
49тк	+	+	+	+	+	+/-	-	+	+	+	+	[+]	[+]	-	+
50тк	+	-	-	-	+	+/-	-	+	+	+	+	[+]	[+]	-	+
51тк	+	-	+	+	+	+/-	-	+	+	+	+	[+]	[+]	-	-
52тк	+	-/+	-/+	-/+	-/+	+/-	-	+	+	+	+	[+]	[+]	-	+
53тк	+	-	-	-/+	+	+/-	-	+	+	+	+	[+]	[+]	-	+
54тк	+	-	-	+	+	+/-	-	+	+	+	+	[+]	[+]	-	-
55тк	+	-	-	-	-	+/-	-	+	+	+	+	[+]	[+]	-	+
56тк	+	+	+	+	+	+/-	-	+	+	+	-	[+]	[+]	-	-
57тк	+	-	-	-	-	+/-	-	+	+	+	+	[+]	[+]	-	-
58тк	+	-	-	-	-	+/-	-	+	+	+	+	[+]	[+]	-	-
59 тк	+	+	+	+	+	+/-	-	+	+	+	+	[+]	[+]	-	-

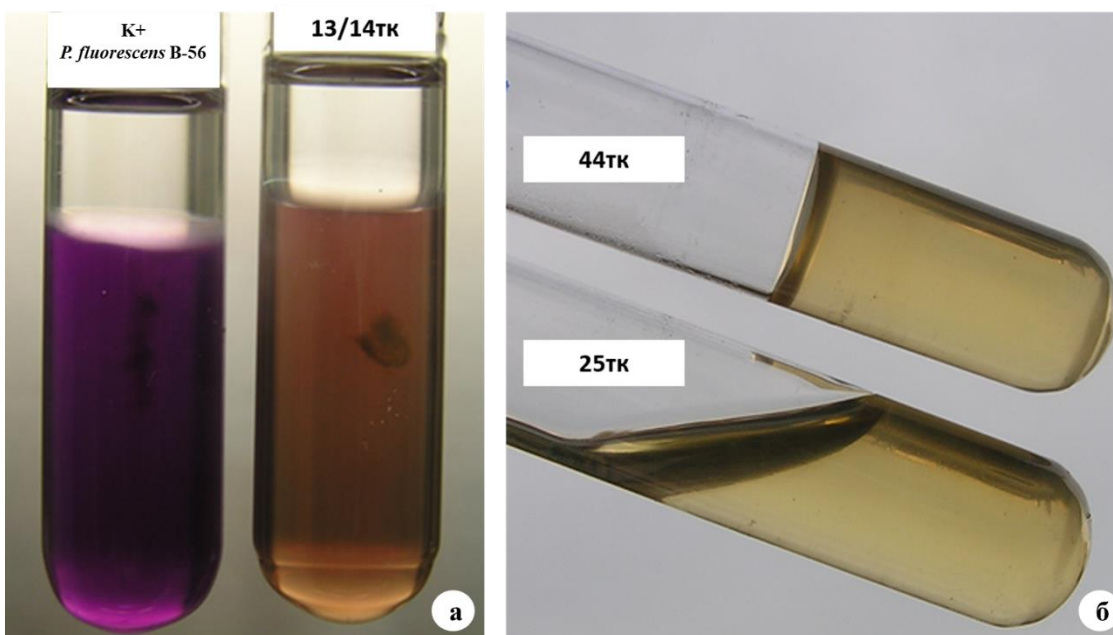
<sup>1)</sup> стварање базе из хинонске киселине

<sup>2)</sup> стварање базе из Д-винске киселине

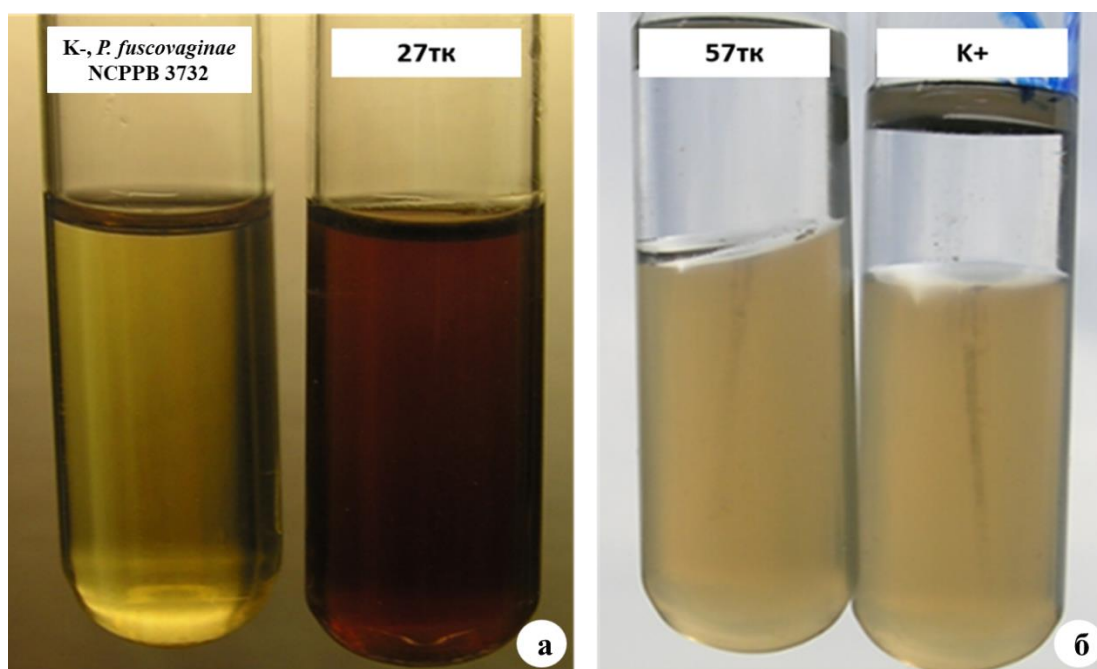
<sup>3)</sup> стварање честица леда

<sup>4)</sup> [+ ] одложена реакција

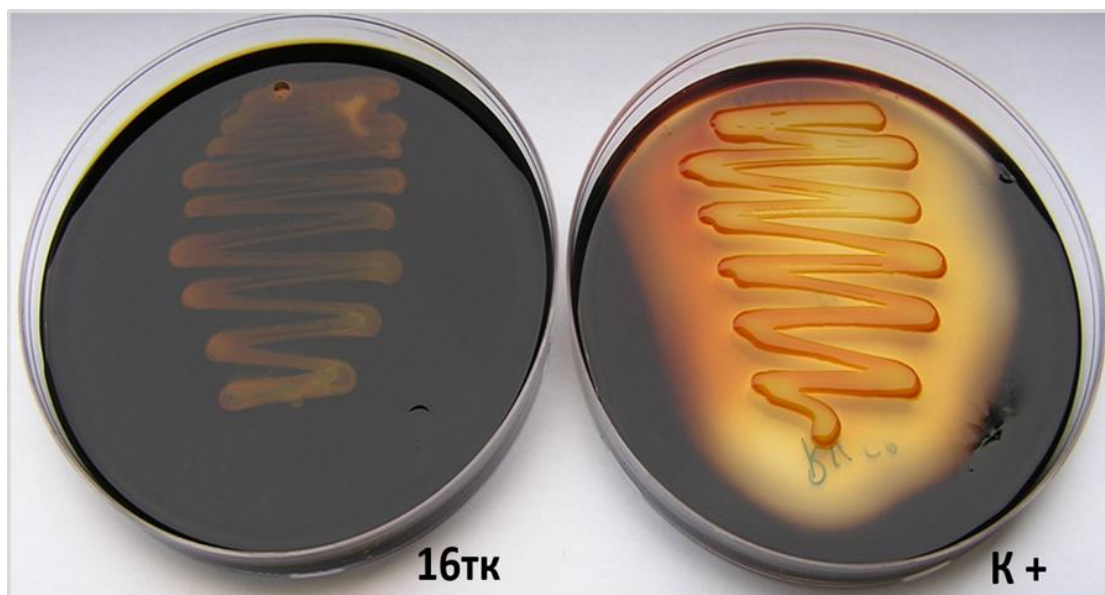




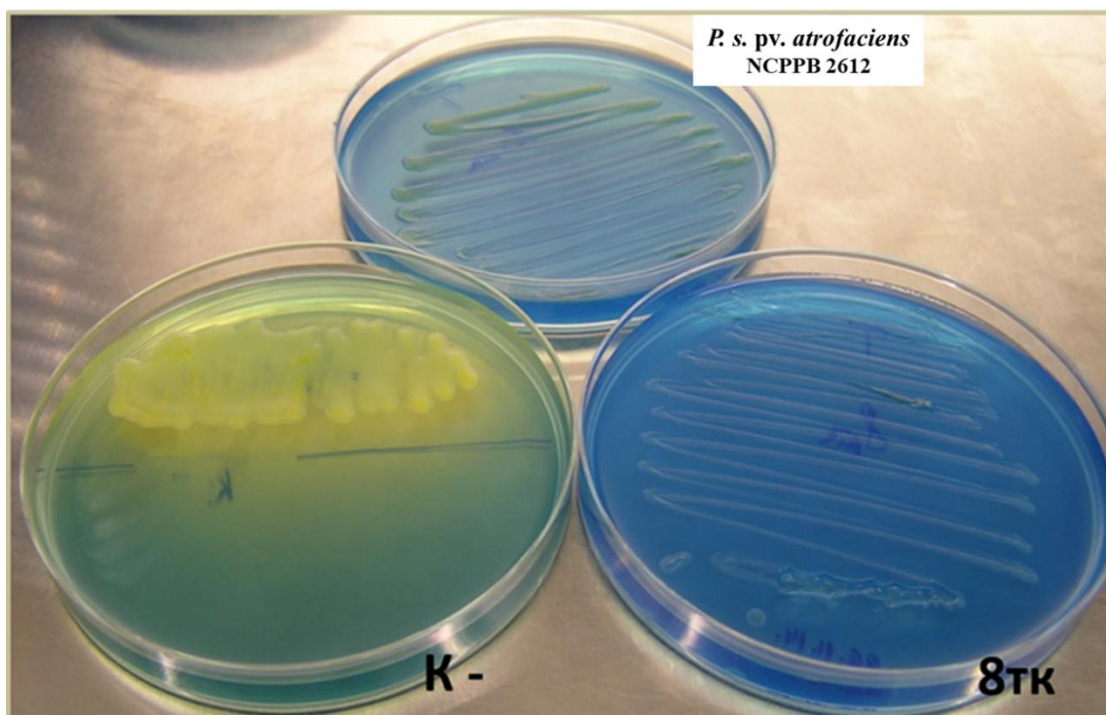
**Слика 28. Активност аргинин дехидролазе** (а): Промена боје подлоге у љубичасту након 1-2 дана је знак позитивне реакције (K+ *P. fluorescens* (B-56) и сој 13/14тк који не испољава активност аргинин дехидролазе); **Хидролиза желатина** (б): претварање чврсте подлоге у течну након 4 дана је знак позитивне реакције (сој 25тк), док чврста подлога означава негативну реакцију (сој 44тк)



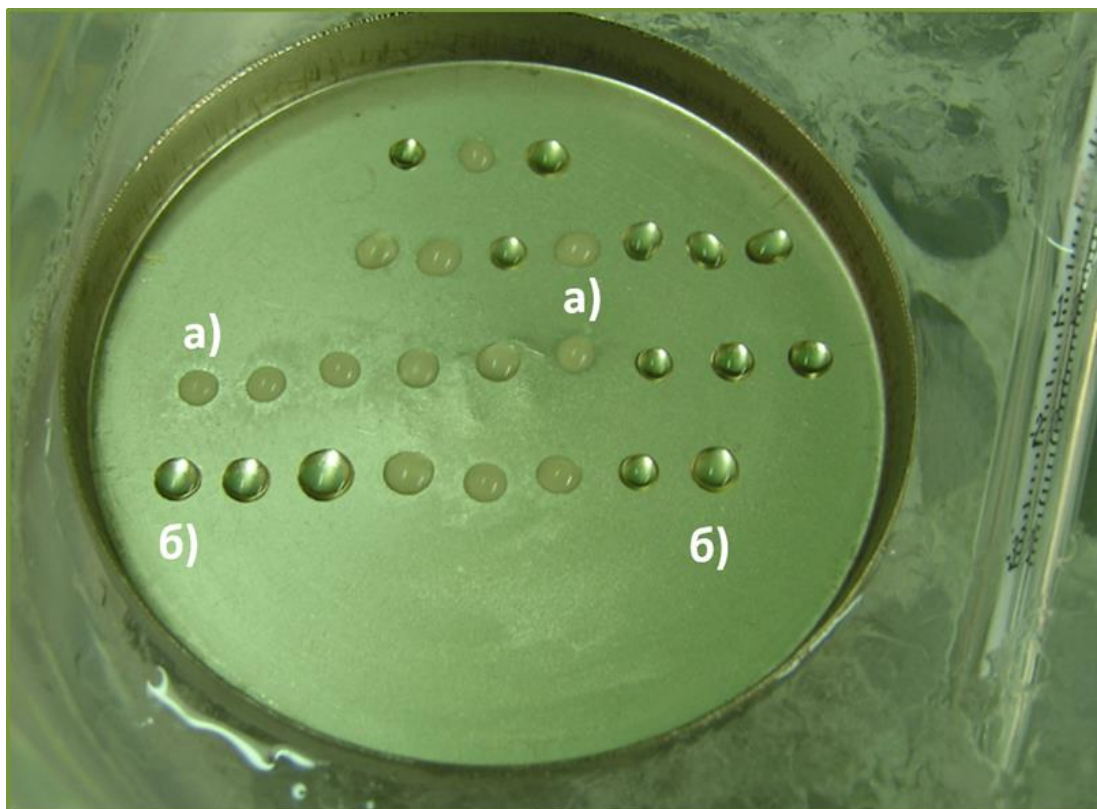
**Слика 29. Хидролиза ескулина** (а): стварање браон боје подлоге је знак позитивне реакције (сој 27тк); **Редуција нитрата** (б): развој бактерија у подлози је знак позитивне реакције (K+ *P. fluorescens* (B-56) и сој 57тк који не испољава активност редуције нитрата).



**Слика 30. Хидролиза скроба:** одсуство тамне боје око развоја бактерије је знак позитивне реакције (K+ *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina* (KFB 275) и негативна реакција - сој 16тк)



**Слика 31. Коришћење тартарата:** прелазак зелене боје подлоге у плаву знак је позитивне реакције (K- *Agrobacterium tumefaciens/biovar 1* (KFB 096) и проучавани сој 8тк који користи тартарат).



Слика 32. Стварање честица леда: залеђена кап (а) је знак позитивне, а течна кап (б) знак негативне реакције

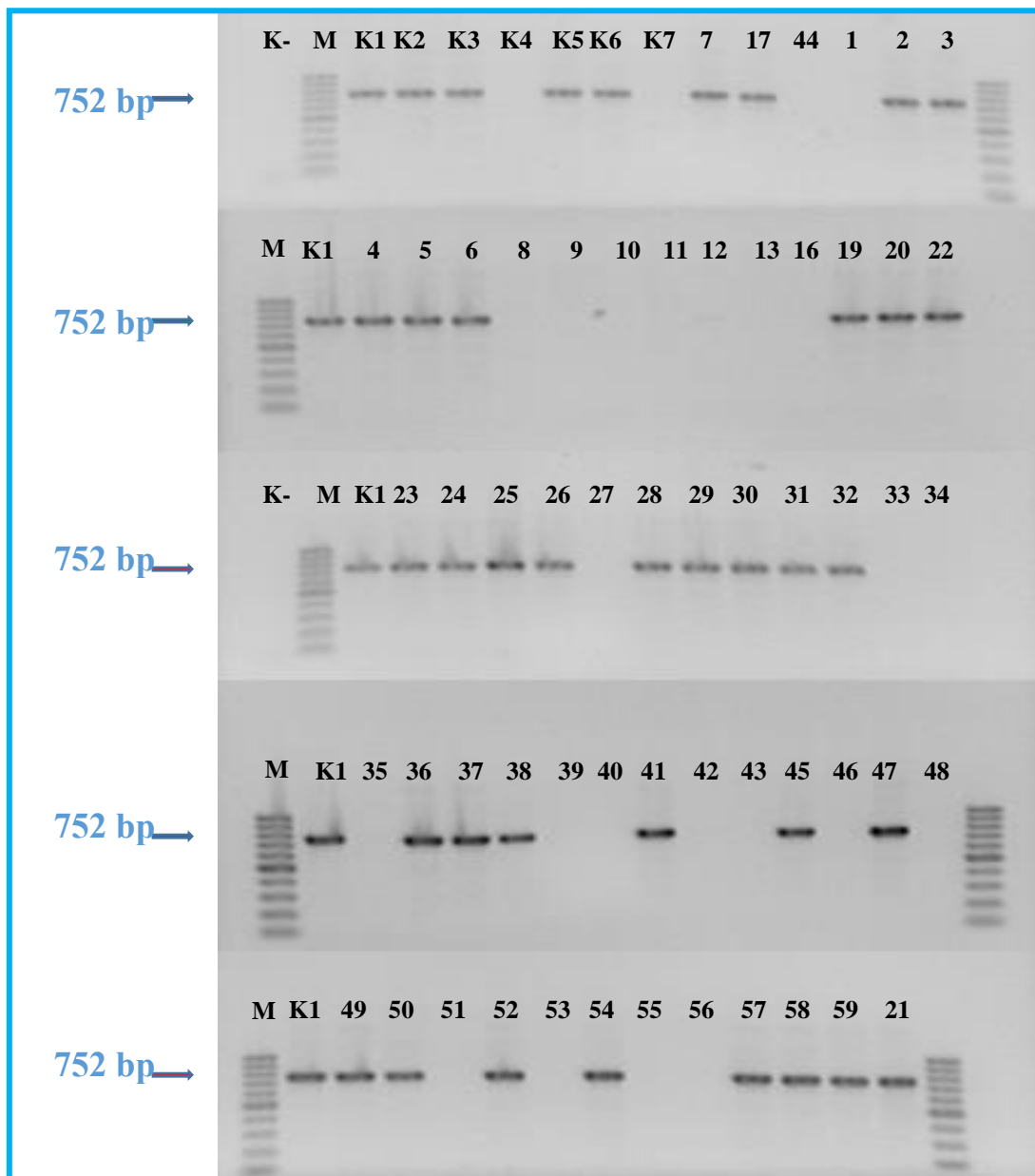
#### 5.4. Молекуларна карактеризација и идентификација проучаваних сојева

##### 5.4.1. Детекција присуства *surB1* гена и *Cfl* гена применом методе ланчаног умножавања фрагмента нуклеинске киселине - PCR

Применом конвенционалне PCR методе са В1 и В2 прајмерима код 33 проучавана соја детектовано је присуство *surB1* гена који учествује у синтези сирингомицина, док код преостала 23 соја није дошло до умножавања фрагмента очекиване величине (слика 33; табела 16). Продукт величине 752bp детектован је и код типских, патотипских и референтних сојева из колекције NCPPB: *P. s. pv. syringae* (NCPPB 281 и NCPPB 2842), *P. s. pv. atrofaciens* (NCPPB 2612), *P. s. pv. japonica* (NCPPB 3093), *P. s. pv. striafaciens* (NCPPB 1898), а није детектован код сојева *P. s. pv. coronafaciens* (NCPPB 600) и *P. fuscovaginae* (NCPPB 3732). Сојеви код којих није дошло до амплификације фрагмента очекиване величине не стварају сирингомицин.

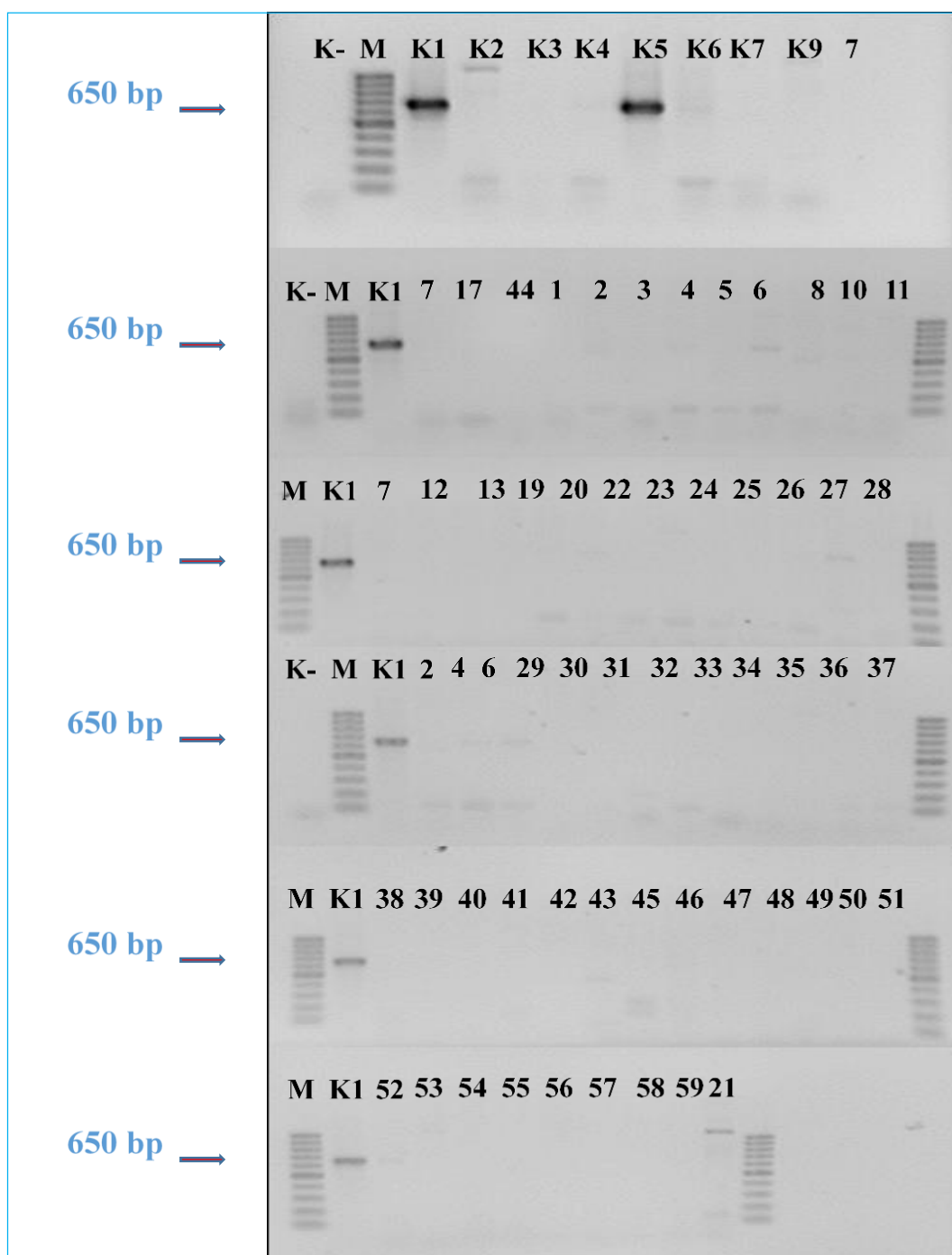
**Коронатин.** Применом конвенционалне PCR методе са Primer 1 и Primer 2 прајмерима ни код једног од проучаваних сојева није детектовано присуство *Cfl* гена који учествује у синтези коронатина (слика 34; табела 16). Продукт величине 650bp,

карактеристичан за присуство *Cfl* гена детектован је код контролног соја *P. s. pv. morsprunorum* (KFB 0101) и патотипског соја *P. s. pv. coronafaciens* (NCPРВ 600).



**Слика 33.** Фрагменти величине 752bp умножени применом конвенционалне PCR методе са *B1* и *B2* прајмерима. Контролни сојеви – позитивне контроле: *P. s. pv. syringae* (NCPРВ 281 (К1) и 2842 (К2)), *P. s. pv. atrofaciens* (NCPРВ 2612 (К3)), *P. s. pv. striafaciens* (NCPРВ 1898 (К5)), *P. s. pv. japonica* (NCPРВ 3093 (К6)) и остали контролни сојеви: *P. s. pv. coronafaciens* (NCPРВ 600 (К4)) и *P. fuscovaginae* (NCPРВ 3732 (К7)); негативна контрола (К-), М, marker (Mass Ruler Low Range DNA Ladder, Fermentas, Lithuania); шифре сојева (без ознаке тк) су изнад одговарајућих колона; приказано као негатив слике гела обојеног у раствору етил бромида





**Слика 34.** Фрагменти величине 650bp умножени применом конвенционалне PCR методе са Primer1 и Primer 2 прајмерима. Позитивна контрола *P. s. pv. morsprunorum* (сој KFB 0101 (K1)) и контролни сојеви *P. s. pv. syringae* (NCPBV 281 (K2) и 2842 (K3)), *P. s. pv. atrofaciens* (NCPBV 2612 (K4)), *P. s. pv. coronafaciens* (NCPBV 600 (K5)), *P. s. pv. striafaciens* (NCPBV 1898 (K6)), *P. s. pv. japonica* (NCPBV 3093 (K7)) и *P. fuscovaginae* (NCPBV 3732 (K8)); негативна контрола (K-), M, marker (Mass Ruler Low Range DNA Ladder, Fermentas, Lithuania); шифре сојева (без ознаке тк) су изнад одговарајућих колона; приказано као негатив слике гела обојеног у раствору етидијум бромаида

Табела 16. Резултати PCR анализе присуства *syfB1* гена и *Cfl* гена

шифра соја	PCR резултати <sup>а</sup> детекције <i>SyfB1</i> гена	PCR резултати <sup>а</sup> детекције <i>Cfl</i> гена	шифра соја	PCR резултати <sup>а</sup> детекције <i>SyfB1</i> гена	PCR резултати <sup>а</sup> детекције <i>Cfl</i> гена	шифра соја	PCR резултати <sup>а</sup> детекције <i>SyfB1</i> гена	PCR резултати <sup>а</sup> детекције <i>Cfl</i> гена
NCPPB 281 <sup>б</sup>	+	-	17тк	+	-	39тк	-	-
NCPPB 2842 <sup>б</sup>	+	-	19тк	+	-	40тк	-	-
NCPPB 2612 <sup>б</sup>	+	-	20тк	+	-	41тк	+	-
NCPPB 3093 <sup>б</sup>	+	-	21тк	+	-	42тк	-	-
NCPPB 1898 <sup>б</sup>	+ <sup>(1)</sup>	-	22тк	+	-	43тк	-	-
NCPPB 600 <sup>б</sup>	-	+ <sup>(2)</sup>	23тк	+	-	44тк	-	-
NCPPB 3732 <sup>б</sup>	-	-	24тк	+	-	45тк	+	-
1тк	-	-	25тк	+	-	46тк	-	-
2тк	+	-	26тк	+	-	47тк	+	-
3тк	+	-	27тк	-	-	48тк	-	-
4тк	+	-	28тк	+	-	49тк	+	-
5тк	+	-	29тк	+	-	50тк	+	-
6тк	+	-	30тк	+	-	51тк	-	-
7тк	+	-	31тк	+	-	52тк	+	-
8тк	-	-	32тк	+	-	53тк	-	-
9тк	-	-	33тк	-	-	54тк	+	-
10тк	-	-	34тк	-	-	55тк	-	-
11тк	-	-	35тк	-	-	56тк	-	-
12тк	-	-	36тк	+	-	57тк	+	-
13/14тк	-	-	37тк	+	-	58тк	+	-
16тк	-	-	38тк	+	-	59тк	+	-

<sup>а</sup> +, позитивна реакција; -, негативна реакција;

<sup>б</sup> Контролни сојеви: *P. s. pv. syringae* (NCPPB 281 и NCPPB 2842), *P. s. pv. atrofaciens* (NCPPB 2612), *P. s. pv. japonica* (NCPPB 3093), *P. s. pv. striafaciens* (NCPPB 1898), *P. s. pv. coronafaciens* (NCPPB 600) и *P. fuscovaginae* (NCPPB 3732);

<sup>(1)</sup> Продукт величине 752bp детектован је и код патотипског соја из колекције NCPPB 1898 (*P. s. pv. striafaciens*) добијеног у размени са NCPPB;

<sup>(2)</sup> Продукт величине 650bp умножен је и код типског соја из колекције NCPPB 600 (*P. s. pv. coronafaciens*) добијеног у размени са NCPPB;

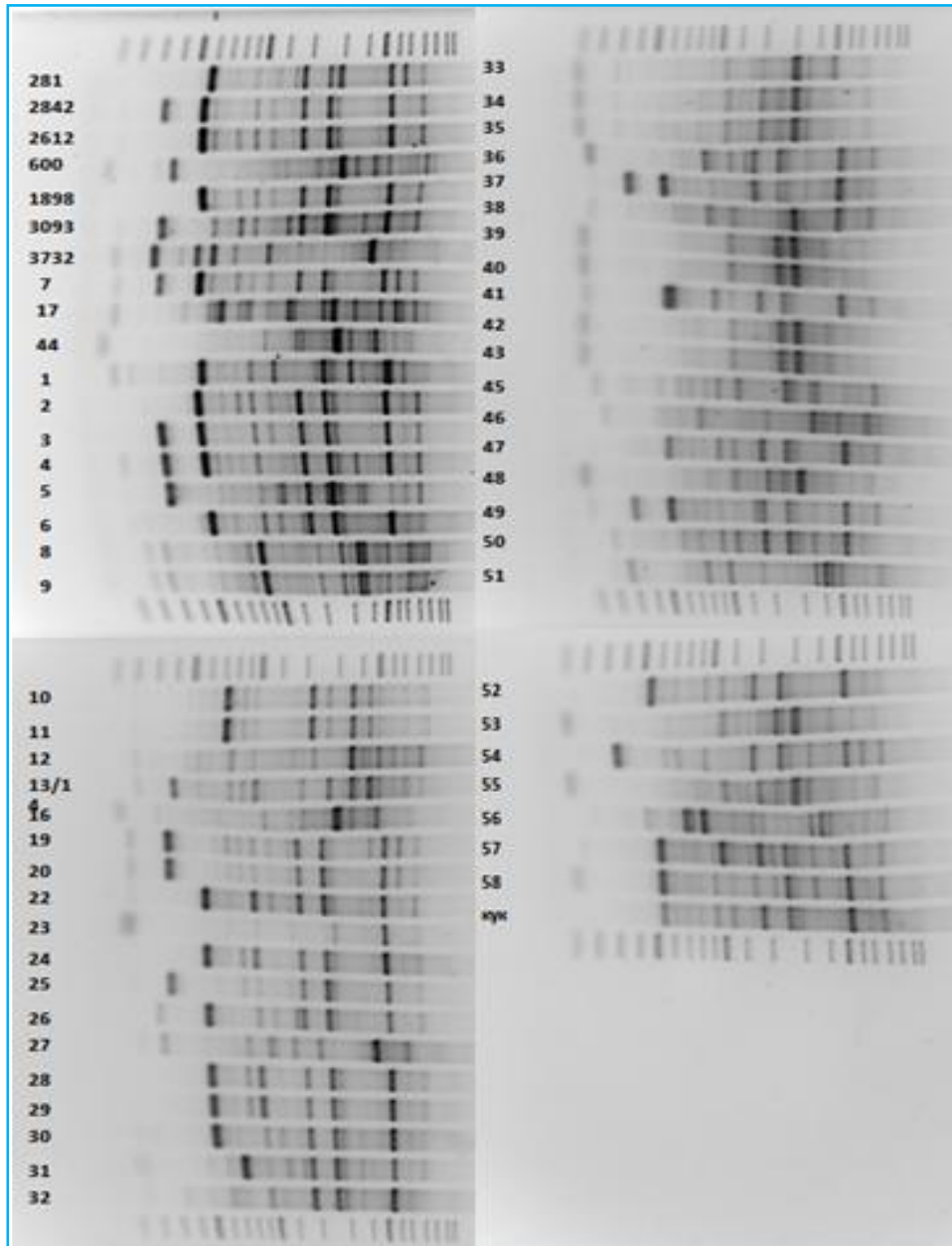
#### 5.4.2. Утврђени генетички диверзитет проучаваних сојева коришћењем гер-PCR методе

Умножавањем геномске ДНК коришћењем REP1 и REP2 прајмера, а касније и електрофорезом, код проучаваних сојева умножени су ДНК фрагменти различите величине (између 150bp и 6kb). Добијени генетички профили су имали 6 до 19 фрагмената по проучаваном соју и омогућили су диференцијацију сојева и указали на њихову генетичку разноврсност (слика 35).

Бинарна матрица у коју је преведено 73 продукта добијених применом гер-PCR методе је анализирана коришћењем Nei и Li коефицијента сличности и UPGMA. На основу конструисаног дендрограма уочена је значајна хетерогеност међу проучаваним сојевима (слика 36).

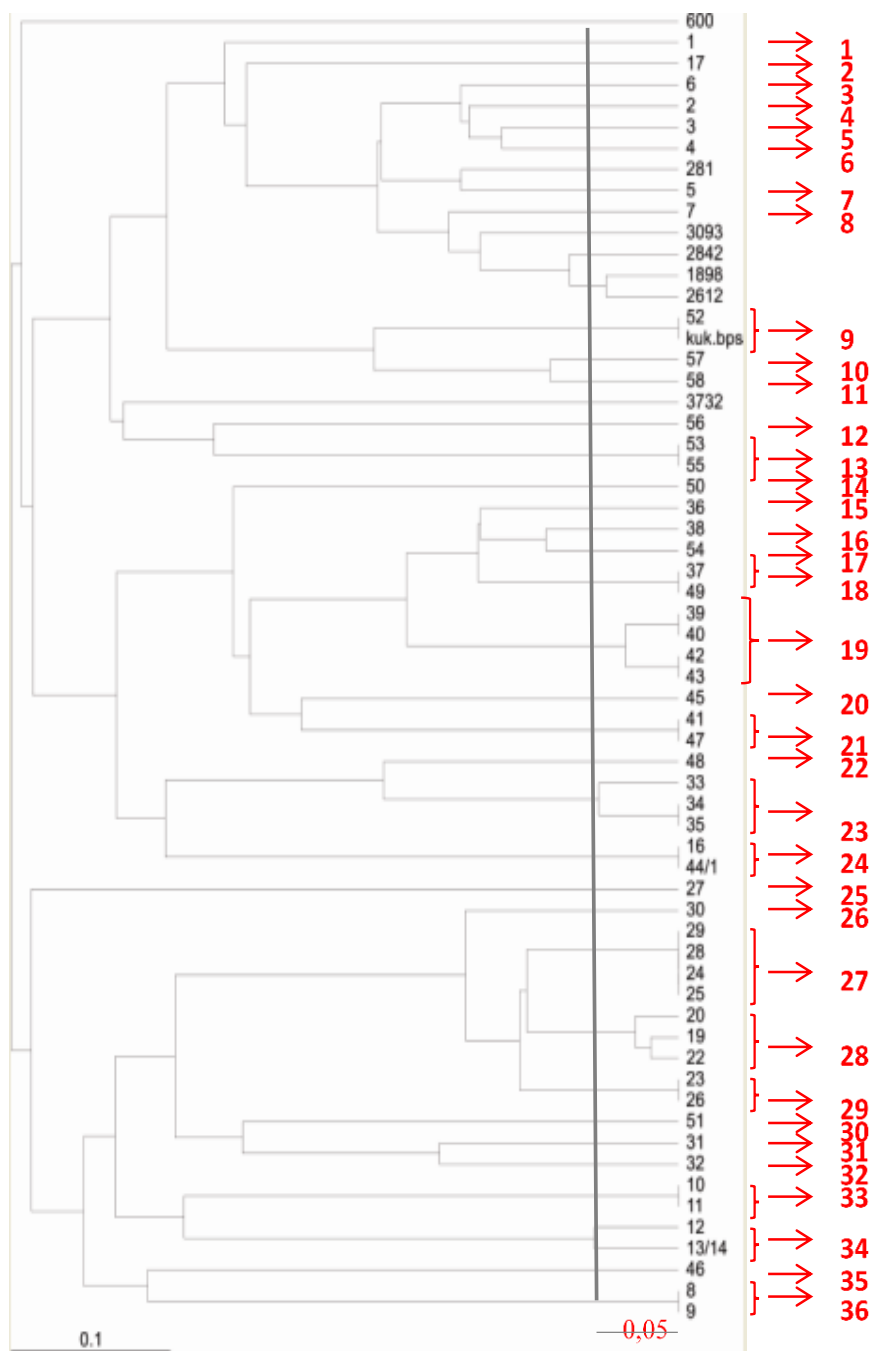
За разлику од типских и патотипских сојева патовара који припадају геномоврсти 1, филогрупи 2, а који су испољили генетичку хомогеност групишући се у један мањи кластер, проучавани сојеви су груписани у 2 велика кластера, од којих се један грана на два мања и садржи две трећине проучаваних сојева.

За раздвајање генетичких профила проучаваних сојева коришћена је удаљеност од 0,05, због тога што су типски и патотипски сојеви који припадају геномоврсти 1, филогрупи 2 међусобно раздвојени тек на удаљености од 0,1. На овај начин је добијено 36 група генетичких профила (табела 17) које чини по: 1 сој (23 групе), 2 соја (9 група), 3 соја (2 групе) и највише 4 соја (2 групе). Појединачне профиле су формирали сојеви: 1тк, 2тк, 3тк, 4тк, 5тк, 6тк, 7тк, 17тк, 27тк, 30тк, 31тк, 32тк, 36тк, 38тк, 45тк, 46тк, 48тк, 50тк, 51тк, 54тк, 56тк, 57тк и 58тк. Осим сојева 12тк и 13/14тк који су се груписали на генетичкој удаљености од 0,05, идентичне профиле су делила 4 соја (24тк, 25тк, 28тк и 29тк) и следећи парови сојева: 8тк и 9тк, 10тк и 11тк, 23тк и 26тк, 16тк и 44/1тк, 37тк и 49тк, 41тк и 47тк, 53тк и 55тк, као и 52тк и 59тк. На веома малој удаљености су формиране две групе од 3 соја (једна група 19тк, 20тк и 22тк и друга група 33тк, 34тк и 35тк) и парови сојева 39тк и 40тк, као и 42тк и 43тк.



**Слика 35.** гер-PCR генетички профил проучаваних сојева у агарозном гелу добијен коришћењем REP1 и REP2 прајмера показује изражену генетичку хетерогеност геномске ДНК проучаваних сојева, где је већа хомогеност уочена код типских и патотипских сојева *P. s. pv. syringae* (NCPPB 281 и NCPPB 2842), *P. s. pv. atrofaciens* (NCPPB 2612), *P. s. pv. japonica* (NCPPB 3093), *P. s. pv. striafaciens* (NCPPB 1898) и *P. fuscovaginae* (NCPPB 3732) него код проучаваних сојева, како у односу на њих, тако и међусобно; У првој и последњој колони сваког гела је 1-kb маркер GeneRuler DNA Ladder Mix (#SM0333; Thermo Scientific, Vilnius, Lithuania), док су шифре сојева (без ознаке тк) изнад одговарајуће колоне, а изузетно сој 59тк означен је као „кук“; приказано као негатив слике агарозног гела обојеног у раствору етидијум бромидом.





**Слика 36.** Дендрограм конструисан поређењем *rep*-PCR генетичких профила добијених коришћењем REP1 и REP2 прајмера код проучаваних сојева, као и типских и патотипских сојева означених само шифрама сојева *P. s. pv. syringae* (NCPBV 281 и NCPBV 2842), *P. s. pv. atrofaciens* (NCPBV 2612), *P. s. pv. japonica* (NCPBV 3093), *P. s. pv. striafaciens* (NCPBV 1898), *P. s. pv. coronafaciens* (NCPBV 600) и *P. fuscovaginae* (NCPBV 3732) (UPGMA анализа, Nei и Li коефицијент сличности); Групе *rep*-PCR генетичких профила означене су бројевима од 1 - 36 са десне стране дендрограма; конструкција дендрограма изведена коришћењем TreeView програма

Табела 17. Приказ група гер-PCR генетичких профила проучаваних сојева

гер PCR група	шифра соја <sup>a</sup>	биљна врста	сорта	биљни део	локалитет	година изолације
1	<b>1 тк</b>	овас	Колекција 975	лист	Римски Шанчеви	2009
2	<b>17 тк</b>	пшеница	Самоникла	доњи део стабла	Б. Петрово Село	2014
3	<b>6 тк</b>	јечам	НС 565	доњи део стабла	Сомбор	2011
4	<b>2 тк</b>	тритикале	Тријумф	лист	Ниш- Алексинац	2009
5	<b>3 тк</b>	тритикале	Одисеј	лист	Крагујевац	2009
6	<b>4 тк</b>	јари јечам	Непозната	лист	Панчево	2009
7	<b>5 тк</b>	тритикале	Непозната	доњи део стабла	Ниш- Алексинац	2011
8	<b>7 тк</b>	јечам	НС 565	семе, плева	Сомбор	2011
9	<b>52 тк</b>	овас	Јадар	семе плеве	Сомбор	2014
9	59 тк	кукуруз	Непозната	лист	Б. Петрово село	2014
10	<b>57 тк</b>	пшеница	Рапсодија	доњи део стабла	Римски Шанчеви	2014
11	<b>58 тк</b>	пшеница	Победа	доњи део стабла	Сомбор	2014
12	<b>56 тк</b>	тритикале	Непозната	семе	Крагујевац	2014
13	53 тк	овас	Јадар	семе	Сомбор	2014
13	<b>55 тк</b>	раж	Pallazio	семе	Сомбор	2014
14	<b>50 тк</b>	пшеница	Непозната	семе	Б. Петрово Село	2014
15	<b>36 тк</b>	тритикале	Тријумф	лист	Сомбор- Билић	2014
16	<b>38 тк</b>	кукуруз	Непозната	лист	Сомбор	2014
17	<b>54 тк</b>	јечам	Двореди	семе	Крагујевац	2014
18	<b>37/1 тк</b>	раж	Непозната	лист	Сомбор	2014
18	49 тк	јечам	Шестореди	семе	Крагујевац	2014
19	39 тк	овас	Непозната	лист	Сомбор- Билић	2014
19	40 тк	овас	Непозната	лист	Сомбор	2014
19	<b>42 тк</b>	овас	Абел	лист	Сомбор	2014
19	43 тк	овас	Абел	стабло	Сомбор	2014
20	<b>45 тк</b>	тритикале	Тријумф	лист	Крагујевац	2014
21	41 тк	дурум	Дурумко	лист	Сомбор	2014
21	<b>47 тк</b>	овас	Јадар	семе	Римски Шанчеви	2014
22	<b>48 тк</b>	раж	Саво	семе	Сомбор	2014
23	<b>33 тк</b>	овас	Непозната	лист	Б. Петрово Село	2014
23	34 тк	раж	Саво	лист	Сомбор	2014
23	35 тк	раж	Pallazio	лист	Сомбор Билић	2014

<sup>a</sup> сојеви одабрани за филогенетску идентификацију коришћењем парцијалне сенвенце *rpoD* гена за *RNK* полимераза  $\sigma$  фактор су означени „bold”

Наставак на следећој страни

гер PCR група	шифра соја <sup>a</sup>	биљна врста	сорта	биљни део	Локалитет	година изолатије
24	<b>16 тк</b>	овас	Дунав	лист	Римски Шанчеви	2009
24	44 тк	овас	Непозната	стабло	Б. Петрово Село	2014
25	<b>27 тк</b>	овас	Јадар	лист	Римски Шанчеви	2014
26	<b>30 тк</b>	јечам	Шестореди	лист	Крагујевац	2014
27	<b>24 тк</b>	јечам	Шестореди	лист	Крагујевац	2014
27	25 тк	тритикале	Непозната	лист	Крагујевац	2014
27	28 тк	јечам	Шестореди	лист	Крагујевац	2014
27	29 тк	јечам	Шестореди	семе	Крагујевац	2014
28	19 тк	јечам	Непозната	лист	Сомбор- Билић	2014
28	<b>20 тк</b>	пшеница	самоникла	лист	Сомбор- Билић	2014
28	22 тк	пшеница	Колекција 11186	лист	Сомбор	2014
29	23 тк	раж	НС/КГ1/502	лист	Сомбор	2014
29	<b>26 тк</b>	пшеница	Колекција 11191	лист	Сомбор	2014
30	<b>51 тк</b>	пшеница	Победа	семе	Чачак	2014
31	<b>31 тк</b>	овас	Јадар	лист	Римски Шанчеви	2014
32	<b>32 тк</b>	пшеница	НС Рапсодија	лист	Римски Шанчеви	2014
33	10 тк	раж	Ф6	глава корена	Крагујевац	2012
33	<b>11 тк</b>	раж	Ф6	глава корена	Крагујевац	2012
34	<b>12 тк</b>	раж	Ф6	коренчићи	Крагујевац	2012
34	<b>13/14 тк</b>	тритикале	КГ20	лист	Крагујевац	2009
35	46 тк	овас	Ловћен	лист	Крагујевац	2014
36	8 тк	раж	Ф6	доњи део стабла	Крагујевац	2012
36	<b>9 тк</b>	раж	Ф6	доњи део стабла	Крагујевац	2012
/	<b>21 тк</b>	пшеница	Колекција 11191	лист	Сомбор	2014

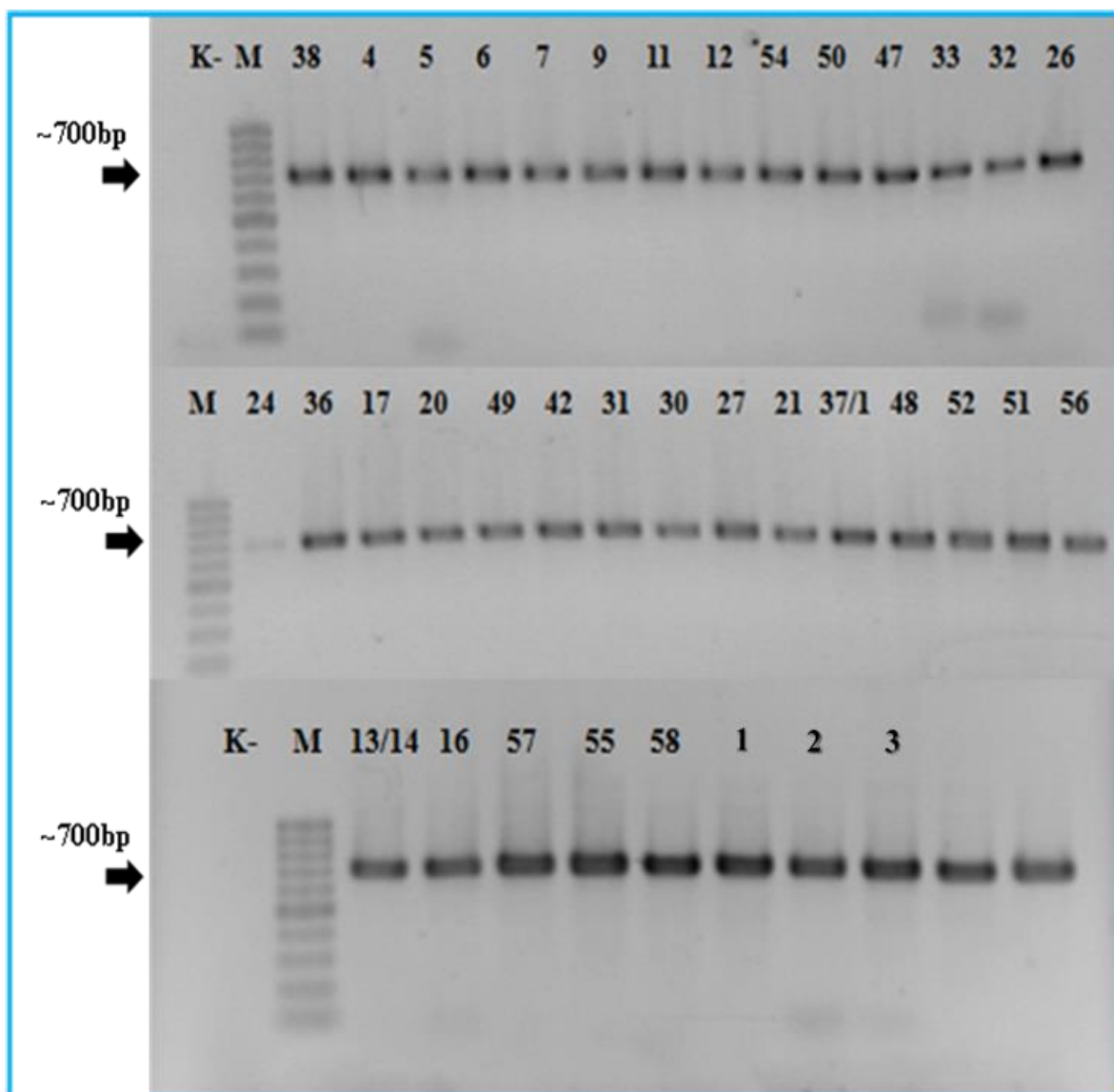
<sup>a</sup> сојеви одабрани за филогенетску идентификацију коришћењем парцијалне сенвенце *proD* гена за *RNK* полимераза  $\sigma$  фактор су означени „bold”

#### 5.4.3. Филогенетска анализа проучаваних сојева коришћењем 578bp локуса *proD* гена

За филогенетску анализу сојева коришћењем секвенце 578bp локуса *proD* гена су изабрани представници сваке од 36 група (Bull and Koike, 2015): 1тк, 2тк, 3тк, 4тк, 5тк, 6тк, 7тк, 9тк, 11тк, 12тк, 13/14тк, 16тк, 17тк, 20тк, 21тк, 24тк, 26тк, 27тк, 30тк, 31тк, 32тк, 33тк, 36тк, 37тк, 38тк, 42тк, 45тк, 47тк, 48тк, 50тк, 51тк, 52тк, 54тк, 55тк, 56тк, 57тк и 58тк. Из групе 35 је искључен сој 46тк чије су фенотипске карактеристике биле веома варијабилне, али је даљим анализама прикључен сој 21тк који није увршћен у гер-PCR. Иако сојеви 12тк и 13/14тк формирају групу на удаљености мањој од 0,05 у даље анализе су укључена оба, те је за филогенетску анализу изабрано укупно 37 сојева.

Фрагменти *groD* гена величине око 700bp су умножени применом конвенционалне PCR методе са *PsrpoDFnp1* и *PsrpoDnp rrcr1* прајмерима код 37 сојева и секвенционирани (Macrogen Inc. Europe, Amsterdam, Netherlands).

С обзиром да приликом секвенционирања за сој 32тк није произведен хроматограм погодан за анализу, овај сој је искључен из даље анализе.



**Слика 37.** Фрагменти величине око 700bp умножени применом конвенционалне PCR методе са *PsrpoDFnp1* и *PsrpoDnp rrcr1* прајмерима. К-;М, marker (MassRuler LowRange DNALadder, Fermentas, Lithuania); шифра проучаваних сојева (без ознаке тк) се налази изнад одговарајуће колоне; приказано као негатив слике гела обојеног у раствору етидијум бромида; 24тк је накнадно поновљен због бољег приноса добијеног фрагмента

### 5.4.3.1. Таксономска позиција проучаваних сојева *P. syringae* комплекса врста према Parkinson et al. (2011)

**Сврставање (класификација) сојева у филогрупе.** Екстраховане секвенце типских и патотипских сојева представника филогрупа према Parkinson et al. (2011) су приказане у табели 18.

**Табела 18.** Преглед типских и патотипских сојева врста/патовара који су коришћени као представници филогрупа према Parkinson et al. (2011)

сој патовара/врсте	домаћин	филогрупа <sup>а)</sup>	секвенца	приступни број у NCBI
<i>P. avellanae</i> NCPPB3487 T	<i>Olea europaea</i>	1	578 bp <i>rpoD</i>	FN433209.1
<i>P. s. pv. syringae</i> PDDCC 3023 T, PT	<i>Syringa vulgaris</i>	2	578 bp <i>rpoD</i>	FN433217.1
<i>P. savastanoi</i> NCPPB 639 T, PT	<i>Olea europaea</i>	3	578 bp <i>rpoD</i>	FN433216.1
<i>P. s. pv. porri</i> NCPPB 3364 PT	<i>Allium ampeloprasum</i>	4	578 bp <i>rpoD</i>	FN433262.1
<i>P. cannabina</i> NCPPB 1437 T	<i>Cannabis sativa</i>	5	578 bp <i>rpoD</i>	FN433211.1
<i>P. caricaparayaе</i> NCPPB 1873 T	<i>Carica papaya</i>	6	578 bp <i>rpoD</i>	FN433212.1
<i>P. viridiflava</i> PDDCC 2848 T	<i>Phaseolus</i> sp.	7	578 bp <i>rpoD</i>	FN433219.1
<i>P. cichorii</i> NCPPB 9436 <sup>б)</sup> T	<i>Cichorium endivia</i>	-	578 bp <i>rpoD</i>	FN433220.1

<sup>а)</sup> филогрупе према Parkinson et al. (2011)

<sup>б)</sup> *P. cichorii* од стране Berge et al. (2014) сврстан у филогрупу 11

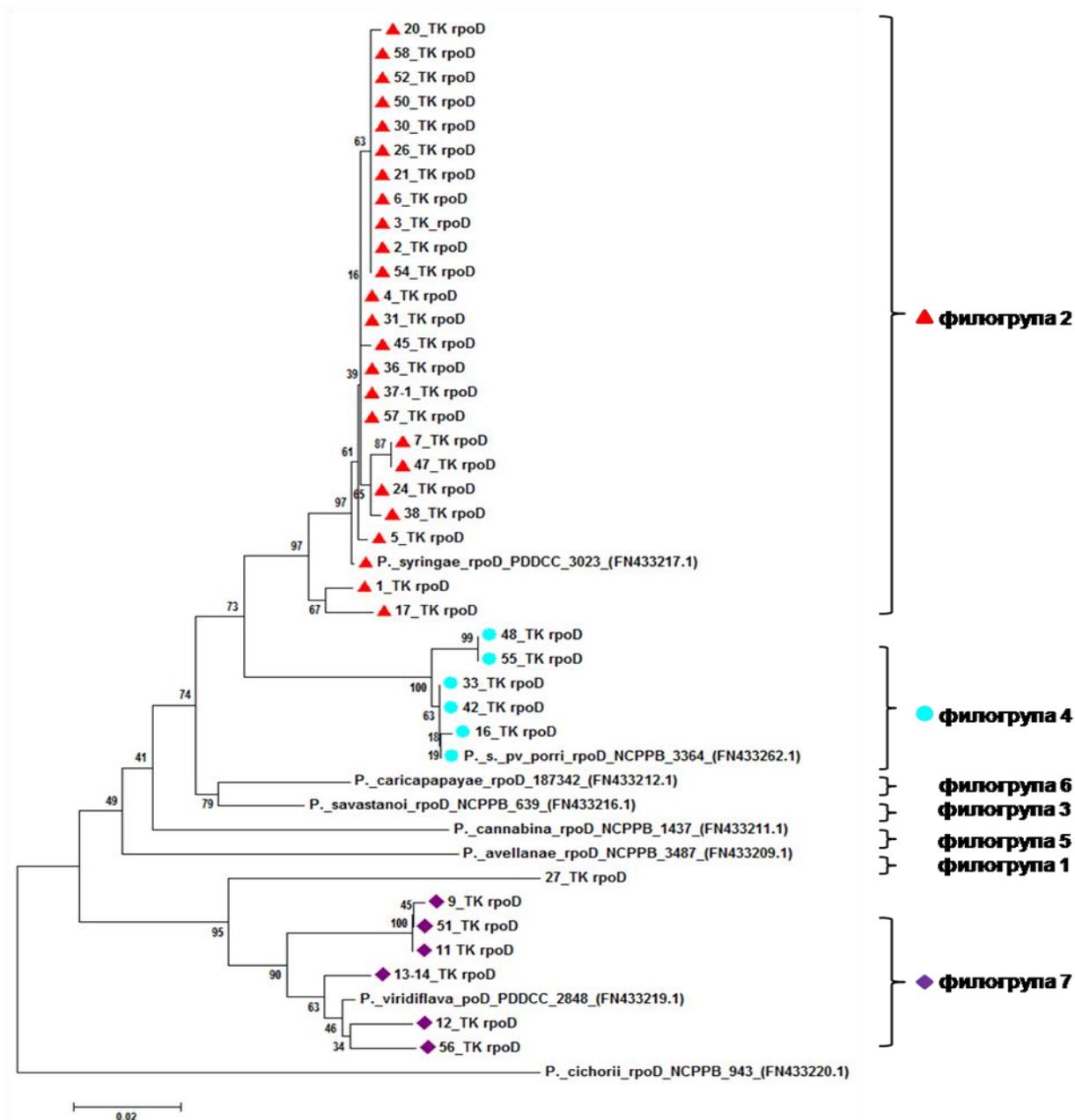
Консензус секвенце *rpoD* гена 36 проучаваних сојева и секвенце типских и патотипских сојева представника филогрупа су поравнате коришћењем Clustal W алгоритма на најмању заједничку дужину од 509 нуклеотида, што је било условљено дужином најкраћих консензус секвенци неких типских сојева (*P. viridiflava* (PDDCC 2848) и *P. savastanoi* (NCPPB 639)). На добијеном филогенетском стаблу на основу секвенци *rpoD* гена, раздвајање сојева представника филогрупа дефинисаних од стране Parkinson et al. (2011) подржано је високим “bootstrap” вредностима (95-100%) за филогрупе 2, 4 и 7, нешто ниже за филогрупе 3 и 6 (79%) и средње за филогрупе 1 и 5 (41 односно 49%) (слика 38).

Сви проучавани сојеви, осим соја 27тк, груписали су се са представницима 3 филогрупе према Parkinson et al. (2011), односно 3 геномоврсте Gardan et al. (1999) (табеле 19 и 20):

- **Филогрупа 2, геномоврста 1 са 24 проучавана соја:** 1тк, 2тк, 3тк, 4тк, 5тк, 6тк, 7тк, 17тк, 20тк, 21тк, 24тк, 26тк, 30тк, 31тк, 36тк, 37тк, 38тк, 45тк, 47тк,

50тк, 52тк, 54тк, 57тк и 58тк, где се генетичка удаљеност у односу на представника типског/патотипског соја врсте *P. syringae* (PDDCC 3023) креће између 0,2 и 1,6%

- **Филогрупа 4, геномоврста 4 са пет проучаваних сојева:** 16тк, 33тк, 42тк, 48тк и 55тк, где се генетичка удаљеност у односу на представника патотипског соја патовара *P. s. pv. porri* (NCPPB 3364) креће између 0 и 1%;
- **Филогрупа 7, геномоврста 6 са шест проучаваних сојева:** 9тк, 11тк, 12тк, 13/14тк, 51тк и 56тк, где се генетичка удаљеност у односу на представника типског соја врсте *P. viridiflava* (PDDCC 2848) креће између 1,6 и 3,9%.
- **Сој 27тк** се не класификује ни у једну филогрупу према Parkinson et al. (2011), јер се генетичка удаљеност између њега и свих представника креће од 9,2-18,3% и на филогенетском стаблу се одваја у посебну групу повезану са *P. viridiflava*.



**Слика 38.** Дендрограм конструисан на основу секвенци 578bp локуса *rpoD* гена коришћењем NJ методе приказује везу између проучаваних сојева и секвенци типских и патотипских сојева представника филогрупа према Parkinson et al. (2011). Припадност сваког од проучаваних сојева одређеној филогрупи је посебно назначена: црвени троугао (филогруппа 2), плави круг (филогруппа 4) и љубичасти квадрат (филогруппа 7). Проучавани сојеви су означени шифрама (број и ознака тк), док су типски и патотипски сојеви означени приступним бројем у бази података NCBI, именом и NCPPB шифром соја. Уз чворишта су назначене „bootstrap” вредности на основу 500 понављања. Дужина грана одговара стопи супституција базних парова. Филогенетско стабло је укоренењем коришћењем *rpoD* секвенце типског соја врсте *P. cichorii* (NCPPB 943)

Табела 19. Матрикс генетичке удаљености између *rpoD* секвенци проучаваних сојева и представника филогрупа према Parkinson et al. (2011) (филогрупа 2, означено црвеном)

назив соја	генетичка удаљеност између секвенци (pairwise distance) <sup>a</sup>																																					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32						
1TK <i>rpoD</i>	1																																					
2TK <i>rpoD</i>	2	0.020																																				
3TK <i>rpoD</i>	3	0.020	0.000																																			
4TK <i>rpoD</i>	4	0.018	0.002	0.002																																		
5TK <i>rpoD</i>	5	0.020	0.004	0.004	0.002																																	
6TK <i>rpoD</i>	6	0.020	0.000	0.000	0.002	0.004																																
7TK <i>rpoD</i>	7	0.024	0.008	0.008	0.006	0.008	0.008																															
17TK <i>rpoD</i>	8	0.014	0.024	0.024	0.022	0.020	0.024	0.028																														
20TK <i>rpoD</i>	9	0.022	0.002	0.002	0.004	0.006	0.002	0.010	0.026																													
21TK <i>rpoD</i>	10	0.020	0.000	0.000	0.002	0.004	0.000	0.008	0.024	0.002																												
24TK <i>rpoD</i>	11	0.020	0.004	0.004	0.002	0.004	0.004	0.004	0.024	0.006	0.004																											
26TK <i>rpoD</i>	12	0.020	0.000	0.000	0.002	0.004	0.000	0.008	0.024	0.002	0.000	0.004																										
30TK <i>rpoD</i>	13	0.020	0.000	0.000	0.002	0.004	0.000	0.008	0.024	0.002	0.000	0.004	0.000																									
31TK <i>rpoD</i>	14	0.018	0.002	0.002	0.000	0.002	0.002	0.006	0.022	0.004	0.002	0.002	0.002	0.002																								
36TK <i>rpoD</i>	15	0.018	0.002	0.002	0.000	0.002	0.002	0.006	0.022	0.004	0.002	0.002	0.002	0.002	0.000																							
37/1TK <i>rpoD</i>	16	0.018	0.002	0.002	0.000	0.002	0.002	0.006	0.022	0.004	0.002	0.002	0.002	0.002	0.000	0.000																						
38TK <i>rpoD</i>	17	0.022	0.006	0.006	0.004	0.006	0.006	0.006	0.026	0.008	0.006	0.002	0.006	0.006	0.004	0.004	0.004																					
45TK <i>rpoD</i>	18	0.020	0.004	0.004	0.002	0.004	0.004	0.008	0.024	0.006	0.004	0.004	0.004	0.004	0.002	0.002	0.002	0.002																				
47TK <i>rpoD</i>	19	0.024	0.008	0.008	0.006	0.008	0.008	0.000	0.028	0.010	0.008	0.004	0.008	0.008	0.006	0.006	0.006	0.006	0.008																			
50TK <i>rpoD</i>	20	0.020	0.000	0.000	0.002	0.004	0.000	0.008	0.024	0.002	0.000	0.004	0.000	0.000	0.002	0.002	0.002	0.006	0.004	0.008																		
52TK <i>rpoD</i>	21	0.020	0.000	0.000	0.002	0.004	0.000	0.008	0.024	0.002	0.000	0.004	0.000	0.000	0.002	0.002	0.002	0.006	0.004	0.008	0.000																	
54TK <i>rpoD</i>	22	0.020	0.000	0.000	0.002	0.004	0.000	0.008	0.024	0.002	0.000	0.004	0.000	0.000	0.002	0.002	0.002	0.006	0.004	0.008	0.000	0.000																
57TK <i>rpoD</i>	23	0.018	0.002	0.002	0.000	0.002	0.002	0.006	0.022	0.004	0.002	0.002	0.002	0.002	0.000	0.000	0.000	0.004	0.002	0.006	0.002	0.002	0.002															
58TK <i>rpoD</i>	24	0.020	0.000	0.000	0.002	0.004	0.000	0.008	0.024	0.002	0.000	0.004	0.000	0.000	0.002	0.002	0.002	0.006	0.004	0.008	0.000	0.000	0.000	0.002														
<i>P. avellanae rpoD</i> NCPPB 3487 (FN433209.1)	25	0.101	0.111	0.111	0.108	0.111	0.111	0.113	0.101	0.113	0.111	0.108	0.111	0.111	0.108	0.108	0.108	0.111	0.111	0.113	0.111	0.111	0.111	0.108	0.111													
<i>P. cannabina rpoD</i> NCPPB 1437 (FN433211.1)	26	0.102	0.096	0.096	0.094	0.096	0.096	0.099	0.099	0.099	0.096	0.096	0.096	0.096	0.094	0.094	0.094	0.098	0.096	0.099	0.096	0.096	0.096	0.094	0.096	0.132												
<i>P. caricapapaya rpoD</i> 187342 (FN433212.1)	27	0.053	0.062	0.062	0.060	0.057	0.062	0.066	0.051	0.064	0.062	0.062	0.062	0.060	0.060	0.060	0.064	0.062	0.066	0.062	0.062	0.062	0.062	0.062	0.060	0.062	0.101	0.092										
<i>P. savastanoi rpoD</i> NCPPB 639 (FN433216.1)	28	0.051	0.053	0.053	0.051	0.053	0.053	0.053	0.049	0.055	0.053	0.053	0.053	0.053	0.051	0.051	0.055	0.053	0.053	0.053	0.053	0.053	0.051	0.053	0.094	0.085	0.041											
<i>P. s. pv. syringae rpoD</i> PDDCC 3023 (FN433217.1)	29	0.016	0.004	0.004	0.002	0.004	0.004	0.008	0.020	0.006	0.004	0.004	0.004	0.004	0.002	0.002	0.002	0.006	0.004	0.008	0.004	0.004	0.004	0.002	0.004	0.111	0.096	0.062	0.053									
<i>P. viridiflava rpoD</i> PDDCC 2848 (FN433219.1)	30	0.110	0.105	0.105	0.102	0.100	0.105	0.102	0.107	0.107	0.105	0.102	0.105	0.105	0.102	0.102	0.102	0.105	0.105	0.102	0.105	0.105	0.105	0.102	0.105	0.122	0.127	0.095	0.095	0.105								
<i>P. s. pv. porri rpoD</i> NCPPB 3364 (FN433262.1)	31	0.061	0.061	0.061	0.058	0.061	0.061	0.063	0.058	0.063	0.061	0.061	0.061	0.061	0.058	0.058	0.058	0.063	0.061	0.063	0.061	0.061	0.061	0.058	0.061	0.107	0.102	0.088	0.070	0.056	0.105							
<i>P. cichorii rpoD</i> NCPPB 943 (FN433220.1)	32	0.170	0.163	0.163	0.160	0.163	0.163	0.163	0.170	0.166	0.163	0.163	0.163	0.163	0.160	0.160	0.160	0.165	0.163	0.163	0.163	0.163	0.163	0.160	0.163	0.190	0.165	0.174	0.159	0.163	0.181	0.184						

<sup>a</sup> Генетичка удаљеност између парова секвенци представља број супституција база по месту између секвенци. Анализа извршена према Тајима-Неи моделу (сојеви сврстани у филогрупу 2 означени светлоцрвеном бојом)



Табела 20. Матрикс генетичке удаљености између *rpoD* секвенци проучаваних сојева и представника филогрупа према Parkinson et al. (2011) (филогрупа 4 означена плавом и филогрупа 7 означена љубичастом бојом)

назив соја	генетичка удаљеност између секвенци (pairwise distance) <sup>a</sup>																				
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
16 TK <i>rpoD</i>	1																				
33 TK <i>rpoD</i>	2	0.002																			
9 TK <i>rpoD</i>	3	0.111	0.108																		
11 TK <i>rpoD</i>	4	0.108	0.106	0.002																	
12 TK <i>rpoD</i>	5	0.111	0.108	0.037	0.035																
13-14 TK <i>rpoD</i>	6	0.107	0.105	0.047	0.045	0.028															
42 TK <i>rpoD</i>	7	0.002	0.000	0.108	0.106	0.108	0.105														
48 TK <i>rpoD</i>	8	0.012	0.010	0.118	0.116	0.118	0.115	0.010													
55 TK <i>rpoD</i>	9	0.012	0.010	0.118	0.116	0.118	0.115	0.010	0.000												
51 TK <i>rpoD</i>	10	0.108	0.106	0.002	0.000	0.035	0.045	0.106	0.116	0.116											
56 TK <i>rpoD</i>	11	0.117	0.115	0.041	0.039	0.024	0.020	0.115	0.125	0.125	0.039										
27 TK <i>rpoD</i>	12	0.136	0.134	0.090	0.088	0.090	0.090	0.134	0.142	0.142	0.088	0.095									
<i>P. avellanae rpoD</i> NCPPB 3487 (FN433209.1)	13	0.109	0.107	0.125	0.122	0.130	0.117	0.107	0.117	0.117	0.122	0.126	0.149								
<i>P. cannabina rpoD</i> NCPPB 1437 (FN433211.1)	14	0.104	0.102	0.130	0.128	0.128	0.132	0.102	0.110	0.110	0.128	0.137	0.150	0.132							
<i>P. caricapapayae rpoD</i> 187342 (FN433212.1)	15	0.090	0.088	0.108	0.105	0.105	0.093	0.088	0.097	0.097	0.105	0.107	0.128	0.101	0.092						
<i>P. savastanoi rpoD</i> NCPPB 639 (FN433216.1)	16	0.072	0.070	0.098	0.096	0.103	0.105	0.070	0.077	0.077	0.096	0.105	0.132	0.094	0.085	0.041					
<i>P. s. pv. syringae rpoD</i> PDDCC 3023 (FN433217.1)	17	0.058	0.056	0.119	0.116	0.120	0.107	0.056	0.063	0.063	0.116	0.119	0.139	0.111	0.096	0.062	0.053				
<i>P. viridiflava rpoD</i> PDDCC 2848 (FN433219.1)	18	0.108	0.105	0.039	0.036	0.018	0.016	0.105	0.115	0.115	0.036	0.014	0.092	0.122	0.127	0.095	0.095	0.105			
<i>P. s. pv. porri rpoD</i> NCPPB 3364 (FN433262.1)	19	0.002	0.000	0.108	0.106	0.108	0.105	0.000	0.010	0.010	0.106	0.115	0.134	0.107	0.102	0.088	0.070	0.056	0.105		
<i>P. cichorii rpoD</i> NCPPB 943 (FN433220.1)	20	0.187	0.184	0.181	0.181	0.182	0.184	0.184	0.187	0.187	0.181	0.189	0.183	0.190	0.165	0.174	0.159	0.163	0.181	0.184	

<sup>a</sup>Генетичка удаљеност између парова секвенци представља број супституција база по месту између секвенци. Анализа извршена према Тајима-Неи моделу. (филогрупа 4 означена плавом бојом и филогрупа 7 означена љубичастом бојом)

#### 5.4.3.1.1. Филогенетска идентификација проучаваних сојева, представника филогрупе 2 према Parkinson et al. (2011)

У табели 21 су приказане *rpoD* секвенце типских и патотипских сојева филогрупе 2, екстраховане из базе NCBI, обезбеђене (скоро све) од стране Parkinson et al. (2011). Коришћењем BLAST је утврђено да *rpoD* секвенца патотипског соја *P. s. pv. aptata* (NCPPB 871, приступни број NCBI је FN433227.1) показује висок степен нуклеотидне сличности са представницима филогрупе 1, уместо филогрупе 2, па је у даљим анализама уместо ове коришћена *rpoD* секвенца патотипског соја *P. s. pv. aptata* (LMG 5059, приступни број у NCBI је JX867852.1) величине 807bp која обухвата и локус 578bp *rpoD* гена, а која је обезбеђена од стране Carrión et al. (2013). Из конкатиноване секвенце сржног генома патотипског соја *P. s. pv. coryli* (NCPPB 4273, приступни број у NCBI је NZ\_AWQP01000045.1), припадника филогрупе 2 према Bull et al. (2011), екстрахована је секвенца која обухвата 578bp локуса *rpoD* гена величине 1851bp.

**Табела 21.** Преглед типских и патотипских сојева филогрупе 2 према Parkinson et al. (2011)

назив соја	филогрупа	биљка домаћин	секвенца	приступни број у NCBI
<i>P. s. pv. atrofaciens</i> NCPPB 2612 PT	2	<i>Triticum aestivum</i>	578 bp <i>rpoD</i>	FN433228.1
<i>P. s. pv. syringae</i> PDDCC 3023 T, PT	2	<i>Syringa vulgaris</i>	578 bp <i>rpoD</i>	FN433217.1
<i>P. s. pv. pisi</i> NCPPB 2585 PT	2	<i>Pisum sativum</i>	578 bp <i>rpoD</i>	FN433260.1
<i>P. s. pv. aptata</i> LMG 5059 <sup>a)</sup> PT	2	<i>Beta vulgaris</i>	807 bp <i>rpoD</i>	JX867852.1
<i>P. s. pv. lapsa</i> NCPPB 2096 PT	2	<i>Zea mays</i>	578 bp <i>rpoD</i>	FN433248.1
<i>P. s. pv. japonica</i> NCPPB 3093 PT	2	<i>Hordeum vulgare</i>	578 bp <i>rpoD</i>	FN433246.1
<i>P. s. pv. papulans</i> NCPPB 2848 PT	2	<i>Malus sylvestris</i>	578 bp <i>rpoD</i>	FN433255.1
<i>P. s. pv. disoxyli</i> NCPPB 225 PT	2	/	578 bp <i>rpoD</i>	FN433241.1
<i>P. s. pv. solidagae</i> ICMP 16925 PT	2	<i>Solidago altissima</i>	578 bp <i>rpoD</i>	FN433266.1
<i>P. s. pv. aceris</i> NCPPB 958 PT	2	/	578 bp <i>rpoD</i>	FN433221.1
<i>P. s. pv. coryli</i> NCPPB 4273 PT	2	<i>Corylus avellana</i>	секвенца сржног генома 1851bp	NZ_AWQP01000045.1

<sup>a)</sup> патотипски сој *P. s. pv. aptata* LMG 5059 је у колекцији NCPPB означен као NCPPB 871

Коришћењем Clustal W алгоритма *rpoD* секвенце 24 проучавана соја претходно сврстана у филогрупу 2 (табела 19) су поравнате са *rpoD* секвенцама типских и патотипских сојева филогрупе 2 (табела 21), на најмању заједничку величину од 578bp. У филогенетској анализи „neighbour-joining“ методом према Tajima&Nei моделу је

изведено филогенетско стабло (слика 39) и матрикс генетичке удаљености (табела 22). Анализом топологије *rpoD* филогенетског стабла је утврђено да се и поред веома малих вредности генетичке удаљености, сви патотипски сојеви патовара филогрупе 2 међусобно раздвајају, осим патовара *P. s. pv. lapsa* (NCPPB 2096, приступни број у NCBI је FN433248.1) и *P. s. pv. aptata* (LMG 5059 (NCPPB 871), приступни број у NCBI је JX867852.1) чије су секвенце 578bp локуса *rpoD* гена идентичне.

Применом филогенетске идентификације према Parkinson et al. (2011) секвенце 578bp локуса *rpoD* гена следећих сојева су идентичне са патотипским сојем *P. s. pv. atrofaciens* (NCPPB 2612): 2тк, 3тк, 6тк, 21тк, 26тк, 30тк, 50тк, 52тк, 54тк и 58тк.

Сојеви 4тк, 31тк, 36тк, 37тк и 57тк деле *rpoD* секвенцу са патотипским сојевима *P. s. pv. lapsa* (NCPPB 2096) и *P. s. pv. aptata* (LMG 5059 (NCPPB 871)).

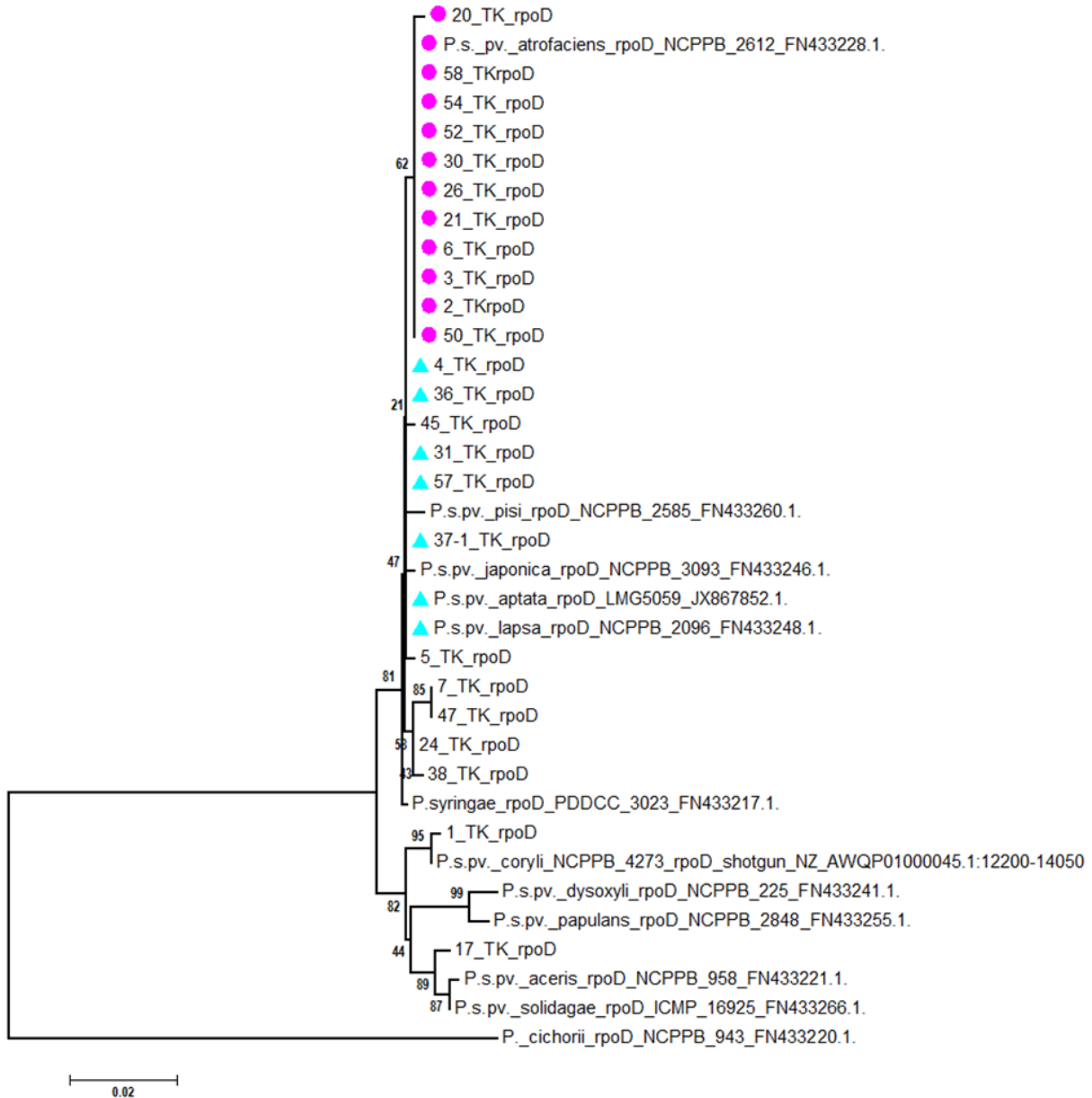
Остали одабрани сојеви су блиско сродни са неким од патотипских сојева филогрупе 2 у Банци гена NCBI (табела 22) и то:

- сој 1тк са патотипским сојем *P. s. pv. coryli* (NCPPB 4273) (генетичка удаљеност 2%),

- сој 17тк са патотипским сојевима *P. s. pv. solidagae* (ICMP 16925) (генетичка удаљеност 5%) и *P. s. pv. aceris* (NCPPB 958) (генетичка удаљеност 7%).

- сој 20тк са патотипским сојем *P. s. pv. atrofaciens* (генетичка удаљеност 2%), али и патотипским сојевима *P. s. pv. lapsa* и *P. s. pv. aptata* (генетичка удаљеност 3%), с тим што се сходно топологији филогенетског стабла увек групише са *P. s. pv. atrofaciens*,

- сојеви 5тк, 7тк, 24тк, 38тк, 45тк и 47тк са патотипским сојевима *P. s. pv. lapsa/ aptata* (генетичка удаљеност 2%) и типским и патотипским сојевима *P. s. pv. syringae/atrofaciens/japonica* (генетичка удаљеност 2%), с тим што се сходно топологији филогенетског стабла увек групишу са *P. s. pv. lapsa/ aptata*.



**Слика 39.** Дендрограм конструисан на основу секвенци 578bp локуса *rpoD* гена коришћењем NJ методе приказује везу између проучаваних сојева и секвенци типских и патотипских сојева чланова филогрупе 2 према Parkinson et al. (2011). *rpoD* секвенце проучаваних сојева идентичне са секвенцама чланова филогрупе 2 су посебно назначене: сојеви идентични са патотипским сојем *P. s. pv. atrofaciens* (NCPPB 2612) означени су розе бојом, идентични са типским сојевима *P. s. pv. lapsa* (NCPPB 2096) и *P. s. pv. aptata* (LMG 5059 (NCPPB 871) означени су плавом бојом. Проучавани сојеви су означени шифрама (број и ознака тк), док су типски и патотипски сојеви означени приступним бројем у бази података NCBI, именом и NCPPB шифром соја. Уз чворишта су назначене “bootstrap” вредности (500 понављања). Дужина грана одговара стопи супституција базних парова. Филогенетско стабло је укорењено коришћењем секвенци типског соја *P. cichorii* (NCPPB 943).



#### 5.4.3.1.2. Филогенетска идентификација проучаваних сојева, представника филогрупе 4 према Parkinson et al. (2011)

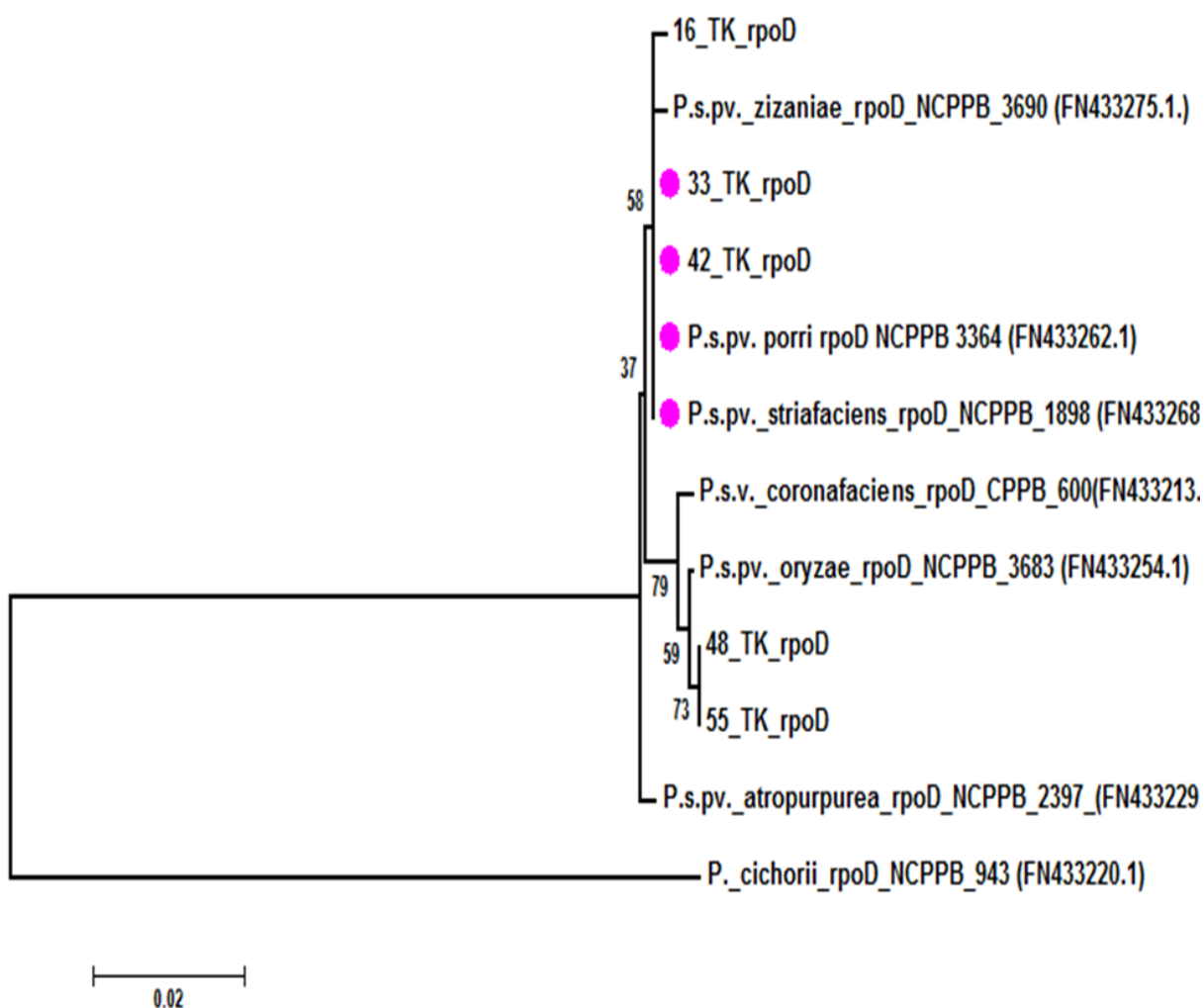
У табели 23 су приказане *rpoD* секвенце патотипских сојева филогрупе 4, екстраховане из базе NCBI за коју су обезбеђене од стране Parkinson et al. (2011) и заједно са консензус секвенцама проучаваних сојева, претходно сврстаних (класификованих) у филогрупу 4 (16тк, 33тк, 42тк, 48тк и 55тк), поравнате на најмању заједничку величину од 578bp.

**Табела 23.** Преглед патотипских сојева филогрупе 4 према Parkinson et al. (2011)

назив соја	филогрупа	биљке домаћини	секвенца	приступни број у NCBI
<i>P. s. pv. porri</i> NCPPB 3364 PT	4	<i>Allium ampeloprasum</i>	578 bp <i>rpoD</i>	FN433262.1
<i>P. s. pv. striafaciens</i> NCPPB 1898 PT	4	-	578 bp <i>rpoD</i>	FN433268.1
<i>P. s. pv. zizaniae</i> NCPPB 3690 PT	4	<i>Zizania aquatica</i>	578 bp <i>rpoD</i>	FN433275.1
<i>P. s. pv. oryzae</i> NCPPB 3683 PT	4	<i>Oryza sativa</i>	578 bp <i>rpoD</i>	FN433254.1
<i>P. s. pv. coronafaciens</i> NCPPB 600 PT	4	<i>Avena sativa</i>	578 bp <i>rpoD</i>	FN433213.1
<i>P. s. pv. atropurpurea</i> NCPPB 2397 PT	4	<i>Lolium multiflorum</i>	578 bp <i>rpoD</i>	FN433229.1

Резултат филогенетске анализе извршене „neighbour-joining“ методом према Тајима&Неи моделу је приказан на слици 40 (изведено филогенетско стабло) и у табели 24 (матрикс генетичке удаљености). Иако су се патотипски сојеви *P. s. pv. porri* (NCPPB 3364), *P. s. pv. zizaniae* (NCPPB 3690) и *P. s. pv. striafaciens* (NCPPB 1898) груписали у један, а *P. s. pv. oryzae* (NCPPB 3683) и *P. s. pv. coronafaciens* (NCPPB 600) у други кластер, њихово раздвајање је подржано малом „bootstrap“ вредношћу (37%). *P. s. pv. porri* (NCPPB 3364) и *P. s. pv. striafaciens* (NCPPB 1898) имају идентичне секвенце 578bp локуса *rpoD* гена.

У генетички профил филогрупе 4 уклопили су се и проучавани сојеви 16тк, 33тк, 42тк, 48тк и 55тк. Применом филогенетске анализе према Parkinson et al. (2011) је утврђено да су сојеви 33тк и 42тк идентични са патотипским сојевима *P. s. pv. striafaciens* (NCPPB 1898) и *P. s. pv. porri* (NCPPB 3364), а сој 16тк као блиско сродан њима. Сојеви 48тк и 55тк су блиско сродни са *P. s. pv. oryzae* (NCPPB 3683) (генетичка удаљеност 2%) и *P. s. pv. coronafaciens* (NCPPB 600) (генетичка удаљеност 5%).



**Слика 40.** Дендрограм конструисан на основу секвенци 578bp локуса *rpoD* гена коришћењем NJ методе приказује везу између проучаваних сојева и секвенци патотипских сојева чланова филогрупе 4 према Parkinson et al. (2011). *rpoD* секвенце проучаваних сојева које су идентичне са секвенцама чланова филогрупе 4 су посебно назначене: сојеви идентични са патотипским сојевима *P. s. pv. porri* (NCIPPB 3364) и *P. s. pv. striafaciens* (NCIPPB 1898) су означени розе бојом. Проучавани сојеви су означени шифрама (број и ознака тк), док су патотипски сојеви патовара означени приступним бројем у бази података NCBI, именом и NCIPPB шифром соја. Уз чворишта су назначене “bootstrap” вредности (500 понављања). Дужина грана одговара стопи супституција базних парова. Филогенетско стабло је укоренењено коришћењем секвенци типског соја *P. cichorii* (NCIPPB 943).

**Табела 24.** Матрикс генетичке удаљености између *rpoD* секвенци проучаваних сојева и патотипских сојева филогрупе 4 према Parkinson et al. (2011)

назив соја	генетичка удаљеност између секвенци (pairwise distance) <sup>a</sup>											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
16TK <i>rpoD</i>	1											
33TK <i>rpoD</i>	2	0.002										
42TK <i>rpoD</i>	3	0.002	0.000									
48TK <i>rpoD</i>	4	0.011	0.009	0.009								
55TK <i>rpoD</i>	5	0.011	0.009	0.009	0.000							
<i>P. s. pv. porri rpoD</i> NCPPB 3364 (FN433262.1)	6	0.002	0.000	0.000	0.009	0.009						
<i>P. s. pv. atropurpurea rpoD</i> NCPPB 2397 (FN433229.1)	7	0.005	0.003	0.003	0.009	0.009	0.003					
<i>P. s. pv. coronafaciens rpoD</i> CPPB 600 (FN433213.1)	8	0.009	0.007	0.007	0.005	0.005	0.007	0.011				
<i>P. s. pv. oryzae rpoD</i> NCPPB 3683 (FN433254.1)	9	0.009	0.007	0.007	0.002	0.002	0.007	0.011	0.003			
<i>P. s. pv. striafaciens rpoD</i> NCPPB 1898 (FN433268.1)	10	0.002	0.000	0.000	0.009	0.009	0.000	0.003	0.007	0.007		
<i>P. s. pv. zizaniae rpoD</i> NCPPB 3690 (FN433275.1)	11	0.003	0.002	0.002	0.011	0.011	0.002	0.005	0.009	0.009	0.002	
<i>P. cichorii rpoD</i> NCPPB 943 (FN433220.1)	12	0.179	0.176	0.176	0.179	0.179	0.176	0.177	0.182	0.182	0.176	0.179

<sup>a</sup>Генетичка удаљеност између парова секвенци представља број супституција база по месту између секвенци. Анализа извршена према Тајима-Неи моделу. Сојеви идентични са патотипским сојевима *P. s. pv. porri* NCPPB 3364 и 3690 и *P. s. pv. striafaciens* су означени розе бојом, док су сви блиско сродни сојеви означени плавом бојом

#### 5.4.3.1.3. Филогенетска идентификација проучаваних сојева, представника филогрупе 7 према Parkinson et al. (2011)

У табели 25 су приказане *rpoD* секвенце патотипских сојева филогрупе 7, екстраховане из NCBI базе, за коју су обезбеђене од стране Parkinson et al. (2011) и заједно са консензус секвенцама проучаваних сојева, претходно сврстаних (класификованих) у филогрупу 7 (9тк, 11тк, 12тк, 13/14тк, 51тк и 56тк), поравнате на најмању заједничку величину од 578bp.

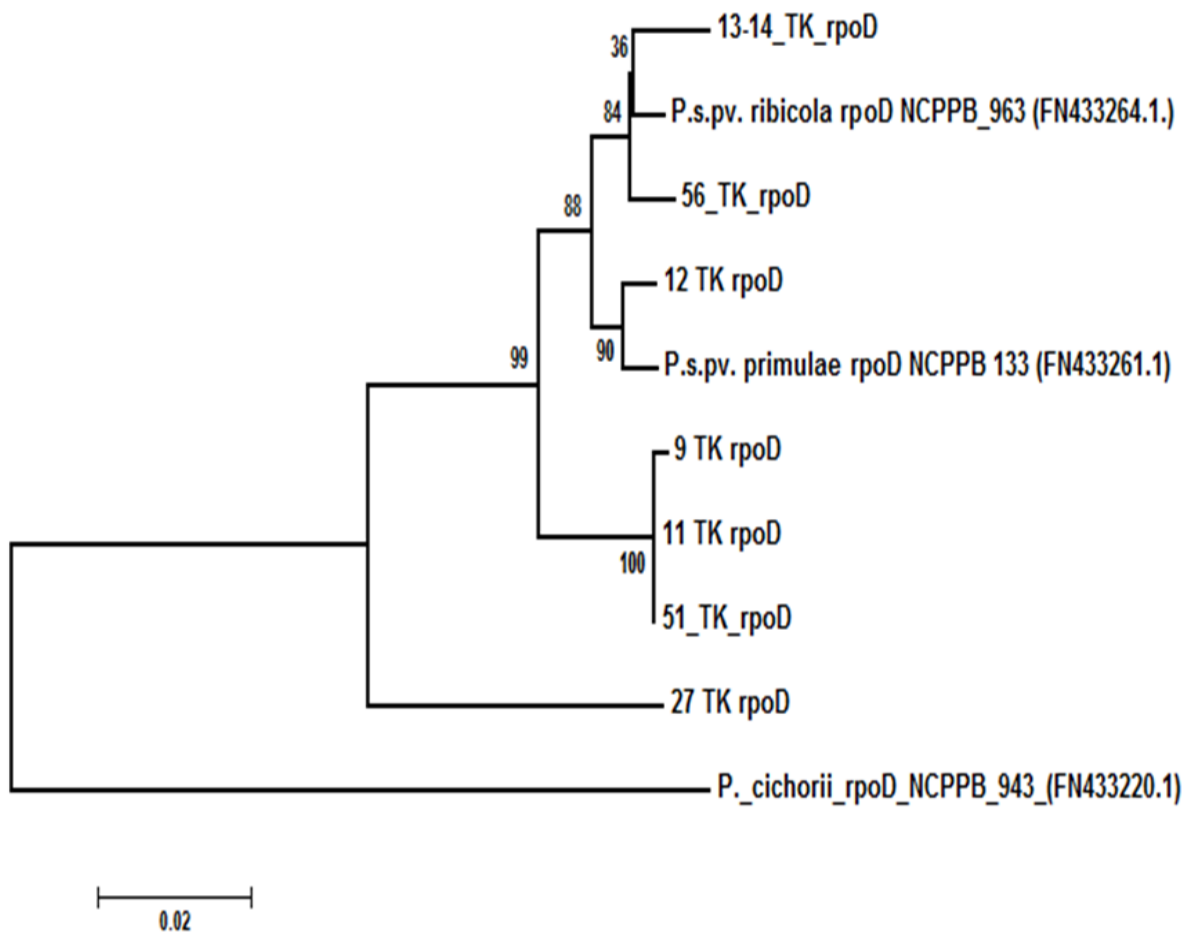
**Табела 25.** Преглед патотипских сојева филогрупе 7 према Parkinson et al. (2011)

назив соја	филогрупа	биљка домаћин	секвенца	приступни број у NCBI
<i>P. s. pv. primulae</i> NCPPB 133 PT	7	<i>Primula sp.</i>	578bp <i>rpoD</i>	FN433261.1
<i>P. s. pv. ribicola</i> NCPPB 963 PT	7	<i>Ribes aureum</i>	578bp <i>rpoD</i>	FN433264.1

У филогенетској анализи „neighbour-joining“ методом према Тајима & Неи моделу је изведено филогенетско стабло (слика 41) и матрикс генетичке удаљености (табела 26).



Једина два патотипска соја члана ове филогрупе су раздвојена коришћењем 578bp локуса *rpoD* гена. Толопогија изведеног филогенетског стабла указује на генетичку хетерогеност проучаваних сојева, што је подржано високим „bootstrap“ вредностима (84-100%). Сојеви 13/14тк и 56тк су блиско сродни са *P. s. pv. ribicola* (NCPPB 963), а 12тк са *P. s. pv. primulae* (NCPPB 133). Сој 9тк је блиско сродан сојевима 11тк и 51тк који деле идентичну 578bp *rpoD* секвенцу, али су истовремено генетички удаљени (3-3,2%) од оба патовара из ове филогрупе.



**Слика 41.** Дендрограм конструисан на основу секвенци 578bp локуса *rpoD* гена коришћењем NJ методе приказује везу између проучаваних сојева и секвенци патотипских сојева чланова филогрупе 7 према Parkinson et al. (2011). Проучавани сојеви су означени шифрама (број и ознака тк), док су патотипски сојеви патовара означени приступним бројем у бази података NCBI, именом и NCPPB шифром соја. Уз чворишта су назначене “bootstrap” вредности (500 понављања). Дужина грана одговара стопи супституција базних парова. Филогенетско стабло је укоренењено коришћењем секвенци типског соја *P. cichorii* (NCPPB 943).

**Табела 26.** Матрикс генетичке удаљености између *rpoD* секвенци проучаваних сојева и патотипских сојева филогрупе 7 према Parkinson et al. (2011)

назив соја	генетичка удаљеност између секвенци (pairwise distance) <sup>a</sup>									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
9 ТК <i>rpoD</i>	1									
11 ТК <i>rpoD</i>	2	0,002								
12 ТК <i>rpoD</i>	3	0,032	0,030							
13-14 ТК <i>rpoD</i>	4	0,041	0,039	0,025						
51 ТК <i>rpoD</i>	5	0,002	0,000	0,030	0,039					
56 ТК <i>rpoD</i>	6	0,034	0,032	0,019	0,016	0,032				
27 ТК <i>rpoD</i>	7	0,078	0,076	0,079	0,078	0,076	0,080			
<i>P. s. pv. ribicola rpoD</i> NCPPB 963 (FN433264.1)	8	0,034	0,032	0,016	0,014	0,032	0,010	0,080		
<i>P. s. pv. primulae rpoD</i> NCPPB 133 (FN433261.1)	9	0,030	0,028	0,009	0,027	0,028	0,018	0,072	0,018	
<i>P. cichorii rpoD</i> NCPPB 943 (FN433220.1)	10	0,175	0,175	0,175	0,177	0,175	0,179	0,176	0,174	0,180

<sup>a</sup> Генетичка удаљеност између парова секвенци представља број супституција база по месту између секвенци. Анализа извршена према Тајима- Неј моделу. Блиско сродан сој са *P. s. pv. primulae* (NCPPB 133) означен љубичастом бојом, сојеви блиско сродни са *P. s. pv. ribicola* (NCPPB 963) означени плавом бојом

#### 5.4.3.2. Таксономска позиција у односу на диверзитет сојева *P. syringae* комплекса врста из спољашње средине према Berge et al. (2014)

*Сврставање (класификација) проучаваних сојева у подгрупе у оквиру филогрупа.* Проучавани сојеви су прво сврстани (класификовани) у филогрупе 2, 4 и 7 према Berge et al. (2014), а потом и у њихове подгрупе. Међу ове три филогрупе једино филогрупа 4 нема подгрупе, док филогрупа 2 има пет (2а, 2б, 2с, 2д и 2е), а филогрупа 7 има две (7а и 7б) подгрупе.

##### 5.4.3.2.1. Сврставање (класификација) проучаваних сојева у подгрупе у оквиру филогрупе 2 према Berge et al. (2014)

За потребе даље класификације проучаваних сојева филогрупе 2 у подгрупе према Berge et al. (2014), анализирана су 24 проучавана соја претходно сврстана у ову филогрупу (1тк, 2тк, 3тк, 4тк, 5тк, 6тк, 7тк, 17тк, 20тк, 21тк, 24тк, 26тк, 30тк, 31тк, 36тк, 37тк, 38тк, 45тк, 47тк, 50тк, 52тк, 54тк, 57тк и 58тк). Иако су биле доступне секвенце L19 локуса *rpoD* гена представника подгрупа 2а, 2с и 2д у оквиру филогрупе

2 према Berge et al. (2014) у бази PAMBD, коришћене су секвенце сржног генома екстраховане из базе NCBI због боље покривености секвенце 578 локуса *rpoD* гена (табела 27). За једина два позната соја подгрупе 2е (*P. s. pv. syringae* (USA0035) и *P. s. pv. syringae* (USA0050)) доступна је само *rpoD* секвенца соја USA 0035 (PAMDB 1314). Међутим, коришћењем BLAST је утврђено да је ова *rpoD* секвенца блиско сродна (98%) *rpoD* секвенци соја *P. s. pv. syringae* USA0053 који се према Berge et al. (2014) сврстава у филогрупу 9а, што је чини недовољно поузданом као представника подгрупе 2е, због чега је изузета из даљих разматрања.

**Табела 27.** Преглед представника подгрупа у оквиру филогрупе 2 према Berge et al. (2014)

назив соја	филогрупа/ подгрупа	биљка домаћин	секвенца	приступни број у NCBI
<i>P. syringae</i> Cit7	2а	<i>Citrus sinensis</i>	секвенца сржног генома	CP073636.1 <sup>а</sup>
<i>P. syringae</i> CC1458	2b	<i>Dodecaten pulchellum</i>	секвенца сржног генома	NZ_AVEN02000300.1 <sup>а</sup>
<i>P. syringae</i> CC1543	2b	језерска вода	секвенца сржног генома	NZ_AVEJ02000122.1 <sup>а</sup>
<i>P. s. pv. syringae</i> 642	2c	Биљка	секвенца сржног генома	NZ_ADGB01000033.1 <sup>б</sup>
<i>P. s. pv. syringae</i> B728A	2d	<i>Phaseolus vulgaris</i>	секвенца сржног генома	NZ_QJTV01000024.1 <sup>б</sup>
<i>P. aeruginosa</i> PAO1				AE004091.2

Секвенце сржног генома које садрже *rpoD* секвенцу (1851 bp) обезбедили у бази NCBI:

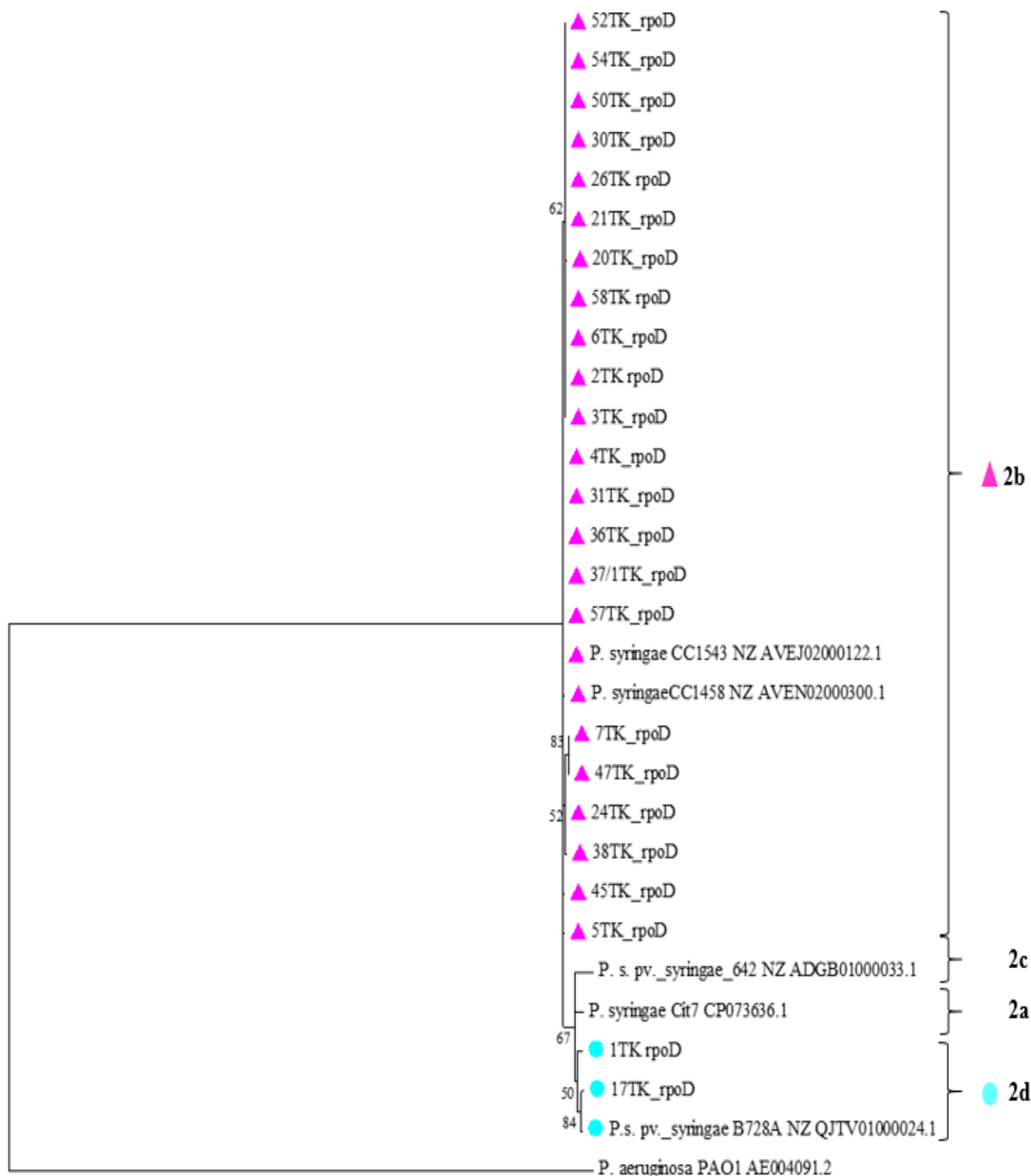
<sup>(а)</sup> Baltrus et al. (2014)

<sup>(б)</sup> Clarke et al. (2010)

<sup>(в)</sup> Payne, (2018) (необјављени подаци)

Након што су *rpoD* секвенце проучаваних сојева претходно сврстаних у филогрупу 2 и *rpoD* секвенце представника подгрупа 2а, 2b, 2c и 2d поравнате на минималну заједничку величину 578bp, извршено је њихово раздвајање „maximum likelihood“ методом према Kimura – 2 моделу (Berge et al., 2014). Раздвајање представника подгрупа 2а, 2b, 2c и 2d у оквиру филогрупе 2 према Berge et al. (2014) на филогенетском стаблу подржано је “bootstrap” вредностима од 67-84%) (слика 42). Средња генетичка удаљеност соја Cit7 као представника подгрупе 2а од сојева представника подгрупе 2b је 2,2%, 2c је 2,9%, док је од 2d удаљен 1,6% (табела 28), што је мање од 1,9% генетичке удаљености коју су Berge et al., (2014) одредили за сврставање у подгрупе када се користи *rpoD* ген из Morris MLTS шеме.

Проучавани сојеви 2тк, 3тк, 4тк, 5тк, 6тк, 7тк, 20тк, 21тк, 24тк, 26тк, 30тк, 31тк, 36тк, 37тк, 38тк, 45тк, 47тк, 50тк, 52тк, 54тк, 57тк и 58тк су класификовани у подгрупу 2b што је подржано високим “bootstrap” вредностима (83%) (слика 42). Сој 17тк се у филогенетској анализи коришћењем *proD* гена класификује у подгрупу 2d, што је, такође, подржано високом “bootstrap” вредношћу (84%). Сој 1тк у односу на подгрупу 2d има мању генетичку удаљеност 1,2%, него у односу на подгрупу 2a (1,8%). Овај сој је уједно сходно топологији филогенетског стабла ближи подгрупи 2d, у коју је и сврстан на основу изведене филогенетске анализе.



**Слика 42.** Дендрограм конструисан на основу 578bp локуса *rpoD* гена проучаваних сојева и секвенци сојева представника подгрупа у оквиру филогрупе 2 према Verge et al. (2014) („maximum likelihood“ метода). Проучавани сојеви су означени шифрама (број и ознака тк), док су сојеви представника подгрупа означени именом и шифром приступним бројем у бази података NCBI и ознаком подгрупе у оквиру филогрупе 2. Сојеви сврстани у подгрупу 2b су означени розе бојом, а сојеви сврстани у подгрупу 2d су означени плавом бојом. Филогенетско стабло је укорењено коришћењем секвенци соја врсте *P. aeruginosa* (PA01).

**Табела 28.** Матрикс генетичке удаљености између *rpoD* секвенци проучаваних сојева и представника погрупа 2а, 2b, 2с и 2d у оквиру филогрупе 2 према Verge et al. (2014) (сојеви сврстани у подгрупу 2b су означени розе бојом, а сојеви сврстани у подгрупу 2d су означени плавом бојом)

назив соја	генетичка удаљеност између секвенци (pairwise distance) <sup>а</sup>																												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	
2TK <i>rpoD</i>	1																												
3TK <i>rpoD</i>	2	0,000																											
4TK <i>rpoD</i>	3	0,002	0,002																										
5TK <i>rpoD</i>	4	0,004	0,004	0,002																									
6TK <i>rpoD</i>	5	0,000	0,000	0,002	0,004																								
20TK <i>rpoD</i>	6	0,002	0,002	0,004	0,006	0,002																							
21TK <i>rpoD</i>	7	0,000	0,000	0,002	0,004	0,000	0,002																						
24TK <i>rpoD</i>	8	0,004	0,004	0,002	0,004	0,004	0,006	0,004																					
26TK <i>rpoD</i>	9	0,000	0,000	0,002	0,004	0,000	0,002	0,000	0,004																				
30TK <i>rpoD</i>	10	0,000	0,000	0,002	0,004	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000																			
31TK <i>rpoD</i>	11	0,002	0,002	0,000	0,002	0,002	0,004	0,002	0,002	0,002	0,002																		
36TK <i>rpoD</i>	12	0,002	0,002	0,000	0,002	0,002	0,004	0,002	0,002	0,002	0,002	0,000																	
37/1TK <i>rpoD</i>	13	0,002	0,002	0,000	0,002	0,002	0,004	0,002	0,002	0,002	0,002	0,000	0,000																
38TK <i>rpoD</i>	14	0,006	0,006	0,004	0,006	0,006	0,008	0,006	0,002	0,006	0,006	0,004	0,004	0,004															
45TK <i>rpoD</i>	15	0,004	0,004	0,002	0,004	0,004	0,006	0,004	0,004	0,004	0,004	0,002	0,002	0,002	0,006														
47TK <i>rpoD</i>	16	0,009	0,009	0,006	0,009	0,009	0,011	0,009	0,004	0,009	0,009	0,006	0,006	0,006	0,006	0,009													
50TK <i>rpoD</i>	17	0,000	0,000	0,002	0,004	0,000	0,002	0,000	0,004	0,000	0,000	0,002	0,002	0,002	0,006	0,004	0,009												
52TK <i>rpoD</i>	18	0,000	0,000	0,002	0,004	0,000	0,002	0,000	0,004	0,000	0,000	0,002	0,002	0,002	0,006	0,004	0,009	0,000											
54TK <i>rpoD</i>	19	0,000	0,000	0,002	0,004	0,000	0,002	0,000	0,004	0,000	0,000	0,002	0,002	0,002	0,006	0,004	0,009	0,000	0,000										
57TK <i>rpoD</i>	20	0,002	0,002	0,000	0,002	0,002	0,004	0,002	0,002	0,002	0,002	0,000	0,000	0,000	0,004	0,002	0,006	0,002	0,002	0,002									
58TK <i>rpoD</i>	21	0,000	0,000	0,002	0,004	0,000	0,002	0,000	0,004	0,000	0,000	0,002	0,002	0,002	0,006	0,004	0,009	0,000	0,000	0,000	0,002								
1TK <i>rpoD</i>	22	0,022	0,022	0,019	0,022	0,022	0,024	0,022	0,022	0,022	0,022	0,019	0,019	0,019	0,024	0,022	0,026	0,022	0,022	0,022	0,019	0,022							
17TK <i>rpoD</i>	23	0,024	0,024	0,022	0,019	0,024	0,026	0,024	0,024	0,024	0,024	0,022	0,022	0,022	0,026	0,024	0,028	0,024	0,024	0,024	0,022	0,024	0,013						
<i>P. s. pv. syringae</i> 642 L19 <i>rpoD</i> (PAMDB 224)	24	0,033	0,033	0,030	0,033	0,033	0,035	0,033	0,033	0,033	0,033	0,030	0,030	0,030	0,035	0,033	0,037	0,033	0,033	0,033	0,030	0,033	0,028	0,028					
<i>P. s. pv. syringae</i> B728A L19 <i>rpoD</i> (PAMDB 72)	25	0,026	0,026	0,024	0,022	0,026	0,028	0,026	0,026	0,026	0,026	0,024	0,024	0,024	0,028	0,026	0,031	0,026	0,026	0,026	0,024	0,026	0,013	0,004	0,031				
<i>P. syringae</i> CC1458 (NCBINZ AVEN02000300.1.)	26	0,004	0,004	0,002	0,004	0,004	0,006	0,004	0,004	0,004	0,004	0,002	0,002	0,002	0,006	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,002	0,004	0,022	0,024	0,033	0,026			
<i>P. syringae</i> CC1543 (NCBINZ AVEJ02000122.1.)	27	0,002	0,002	0,000	0,002	0,002	0,004	0,002	0,002	0,002	0,002	0,000	0,000	0,000	0,004	0,002	0,006	0,002	0,002	0,002	0,000	0,002	0,019	0,022	0,030	0,024	0,002		
<i>P. syringae</i> Cit7 L19 <i>rpoD</i> (NCBI63)	28	0,024	0,024	0,022	0,024	0,024	0,026	0,024	0,024	0,024	0,024	0,022	0,022	0,022	0,026	0,024	0,028	0,024	0,024	0,024	0,022	0,024	0,015	0,015	0,028	0,015	0,024	0,022	
<i>P. aeruginosa</i> PAO1 (NCBIAE004091.2.)	29	0,536	0,536	0,529	0,521	0,536	0,542	0,536	0,536	0,536	0,536	0,529	0,529	0,529	0,543	0,529	0,536	0,536	0,536	0,536	0,529	0,536	0,520	0,512	0,514	0,513	0,536	0,529	0,506

<sup>а</sup>Генетичка удаљеност између парова секвенци представља број супституција база по месту између секвенци. Анализа извршена према Kimura – 2 моделу („maximum likelihood“ метод)(сојеви сврстани у подгрупу 2b су означени розе бојом, а сојеви сврстани у подгрупу 2d су означени плавом бојом)

#### 5.4.3.2.2. Сврставање (класификација) проучаваних сојева у подгрупе у оквиру филогрупе 7 према Berge et al. (2014)

За потребе даље класификације проучаваних сојева у подгрупе 7а и 7б, шест проучаваних сојева претходно сврстаних у филогрупу 7 (9тк, 11тк, 12тк, 13/14тк, 51тк и 56тк) анализирано је поравнањем њихових *rpoD* секвенци са *rpoD* секвенцама представника подгрупа 7а и 7б према Berge et al. (2014), екстрахованим из доступних база (табела 29) на минималну заједничку величину 455bp (што је условљено секвенцом коришћеном за укоречавање дендрограма), а потом је извршено и њихово раздвајање „maximum likelihood“ методом према Kimura – 2 моделу (Berge et al., 2014).

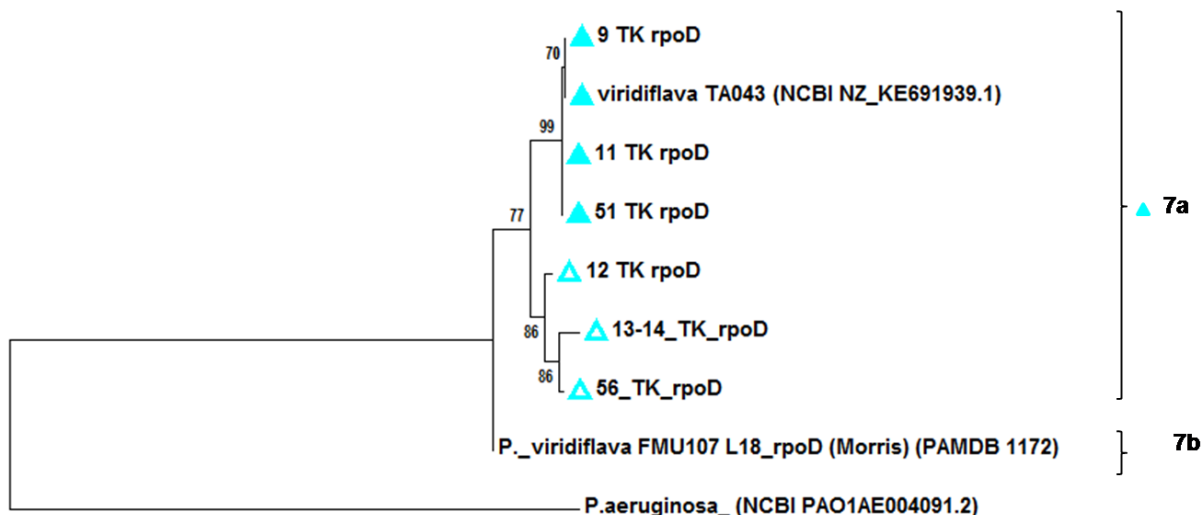
**Табела 29.** Преглед представника подгрупа у оквиру филогрупе 7 према Berge et al. (2014)

Назив соја	Филогрупа/ подгрупа	Билјка домаћин	<i>rpoD</i> секвенца	Пристапни број
<i>P.viridiflava</i> TA043	7а	<i>Primula sp</i>	whole genome shotgun sequence <sup>a</sup>	NCBI NZ_KE691939.1
<i>P.viridiflava</i> FMU107	7б	<i>Brassica rapa subsp. pekinensis</i>	L18 <i>rpoD</i> <sup>b</sup>	PAMDB 1172

<sup>(a)</sup> Секвенце сржног генома које садрже *rpoD* секвенцу (1851 bp) обезбедио у бази NCBI Valtrus et al. (2013) (необјављени подаци)

<sup>(b)</sup> L18 *rpoD* Morris MLST шема; секвенца дужине 449 bp; није била доступна секвенца сржног генома

Раздвајање представника подгрупа 7а и 7б у оквиру филогрупе 7 према Berge et al. (2014) подржано је топологијом филогенетског стабла (слика 43) и њиховом међусобном генетичком удаљеношћу (табела 30). Средња генетичка удаљеност проучаваних сојева у односу на представника подгрупе 7а TA043 је 2,8%, а у односу на представника филогрупе 7б FMU107 је 4,7%. Свих 6 сојева (9тк, 11тк, 12тк, 13/14тк, 51тк и 56тк) припадају кластеру 7а сходно топологији филогенетског стабла. Ипак, између сојева постоји значајна генетичка удаљеност и то 9тк, 11тк и 51тк у односу на 12тк, 13/14тк и 56тк.



**Слика 43.** Дендрограм конструисан на основу 578bp локуса *rpoD* гена проучаваних сојева и секвенци сојева представника подгрупа у оквиру филогрупе 7 према Berge et al. (2014) („maximum likelihood“ метода). Проучавани сојеви су означени шифрама (број и ознака тк), док су сојеви представника подгрупа означени именом и шифром (приступним бројем у бази података NCBI односно PAMDB) и ознаком подгрупе у оквиру филогрупе 7. Филогенетско стабло је укорењено коришћењем секвенци соја врсте *P. aeruginosa* (PA01).

**Табела 30.** Матрикс генетичке удаљености између *rpoD* секвенци проучаваних сојева и представника подгрупа а и б у оквиру филогрупе 7 према Berge et al. (2014)

назив соја	генетичка удаљеност између секвенци (pairwise distance) <sup>a</sup>									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
9TK <i>rpoD</i>	1									
11TK <i>rpoD</i>	2	0.002								
51TK <i>rpoD</i>	3	0.002	0.000							
12TK <i>rpoD</i>	4	0.040	0.038	0.038						
13/14TK <i>rpoD</i>	5	0.056	0.053	0.053	0.030					
56TK <i>rpoD</i>	6	0.040	0.038	0.038	0.018	0.016				
<i>P. viridiflava</i> TA043 (NCBI NZ KE691939.1)	7	0.000	0.002	0.002	0.040	0.056	0.040			
<i>P. viridiflava</i> FMU107 L18 <i>rpoD</i> (Morris) (PAMDB 1172)	8	0.051	0.048	0.048	0.040	0.051	0.051	0.051		
<i>P. aeruginosa</i> PA01 (NCBI AE004091.2)	9	0.493	0.500	0.500	0.506	0.498	0.512	0.493	0.468	

<sup>a</sup>Генетичка удаљеност између парова секвенци представља број супституција база по месту између секвенци. Анализа извршена према Kimura – 2 моделу („maximum likelihood“ метод)



### 5.4.3.2.3. Сврставање (класификација) проучаваних сојева у филогрупу 8 према Berge et al. (2014)

Посебан изузетак чини сој 27тк за који није утврђена припадност филогрупама према Parkinson et al. (2011), а који испољава највише сличности (93%) са патотипским сојем *P. s. pv. primulae* (NCPFB 133) у Банци гена NCBI. BLAST анализом базе PAMDB је утврђен висок степен нуклеотидне сличности *rpoD* секвенце соја 27тк са секвенцама L18 локуса *rpoD* гена (Morris MLST шема) сојева *P. viridiflava* CMO0085 и CST0099 (99% односно 98% сличности). Ови сојеви који су изоловани из кишнице у Француској (табела 31) су према истраживањима Berge et al. (2014) сврстани у филогрупу 8, а сличност је утврђена и са другим сојевима *P. viridiflava* изолованим из кишнице (LYR0041) и воде за наводњавање (GAW0203, GAW0197) који су сврстани у филогрупу 8.

С обзиром да је сој 27тк делио најмању генетичку удаљеност са филогрупом 7, за филогенетску анализу је изабран и сој TA043 који су Berge et al. (2014) користили као представника ове филогрупе (приступни број *rpoD* секвенце сржног генома соја *P. viridiflava* TA043 у Банци гена NCBI је NZ\_KE691939.1, а секвенцу су обезбедили Baltrus et al., 2014).

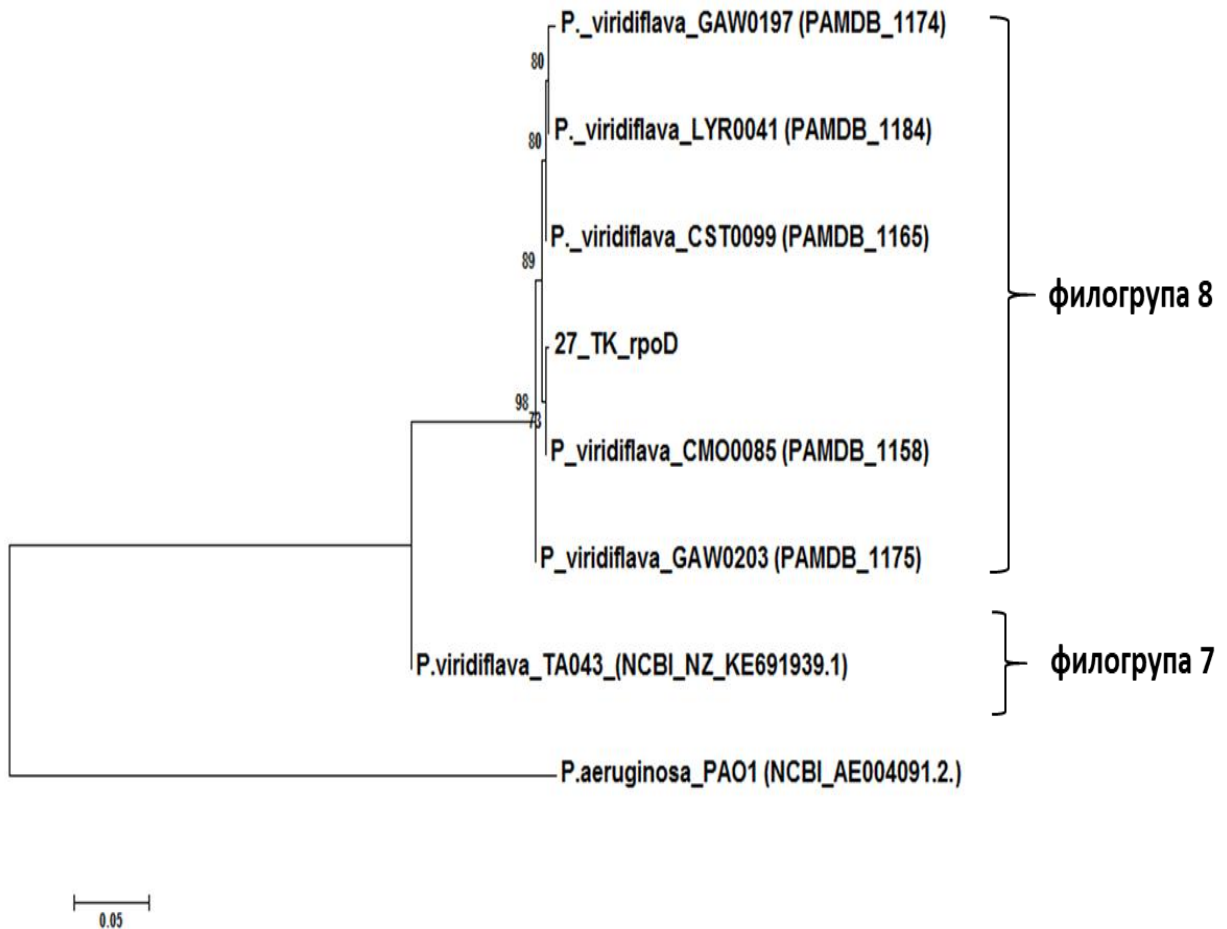
Табела 31. Преглед сојева у бази PAMDB који су блиско сродни соју 27тк

назив соја	ознака соја	биљка домаћин	земља порекла	секвенца <sup>а</sup>	филогрупа	приступни број
<i>P. viridiflava</i>	CMO0085	кишница	Француска	L18 <i>rpoD</i>	8	PAMDB 1158
<i>P. viridiflava</i>	CST0099	кишница	Француска	L18 <i>rpoD</i>	8	PAMDB 1165
<i>P. viridiflava</i>	GAW0203	вода за наводњавање	Француска	L18 <i>rpoD</i>	8	PAMDB 1175
<i>P. viridiflava</i>	GAW0197	вода за наводњавање	Француска	L18 <i>rpoD</i>	8	PAMDB 1174
<i>P. viridiflava</i>	LYR0041	кишница	Француска	L18 <i>rpoD</i>	8	PAMDB 1184
<i>P. viridiflava</i>	TA043	<i>Primula</i> sp.	Француска	Секвенца сржног генома	7	NCBI NZ_KE691939.1
<i>P. aeruginosa</i>	PAO1			комплетан геном		NCBI AE004091.2

<sup>а</sup> L18 *rpoD* Morris MLST шема; све секвенце дужине 449 bp

Секвенце L18 *rpoD* локуса (Morris MLST шема) које су блиско сродне са *rpoD* секвенцом соја 27тк су екстраховане из базе PAMDB (табела 31) и поравнате заједно са

*rpoD* секвенцом соја 27тк и соја *P.viridiflava* TA043 на најмању заједничку дужину 455bp коришћењем Clustal W алгоритма (што је условљено секвенцом коришћеном за укоренавање дендрограма). Топологија изведеног филогенетског стабла према Kimura–2 моделу (слика 44) и вредности генетичке удаљености (табела 32) потврђују класификовање соја 27тк у филогрупу 8.



**Слика 44.** Дендрограм конструисан на основу 578bp локуса *rpoD* гена соја 27тк, секвенци представника филогрупе 7 и секвенци сродних сојева чланова филогрупе 8 према Berge et al. (2014) („maximum likelihood“ метода). Сој представника филогрупе 7 и секвенце сродних сојева чланова филогрупе 8 су означени именом и шифром и приступним бројем у бази података NCBI односно PAMDB. Филогенетско стабло је укорено коришћењем секвенци соја врсте *P. aeruginosa* (PA01).

**Табела 32.** Матрикс генетичке удаљености између *rpoD* секвенце соја 27тк, представника филогрупе 7 и чланова филогрупе 8 према Berge et al. (2014)

назив соја	матрикс генетичке удаљености (pairwise distance) <sup>a</sup>								
		1	2	3	4	5	6	7	8
27ТК <i>rpoD</i>	1								
<i>P. viridiflava</i> СМО0085 L18 <i>rpoD</i> (Morris)(1158)	2	0.002							
<i>P. viridiflava</i> CST0099 L18 <i>rpoD</i> (Morris)(1165)	3	0.007	0.004						
<i>P. viridiflava</i> GAW0203 L18 <i>rpoD</i> (Morris)(1175)	4	0.009	0.007	0.007					
<i>P. viridiflava</i> GAW0197 L18 <i>rpoD</i> (1174)	5	0.014	0.011	0.007	0.014				
<i>P. viridiflava</i> LYR0041 L18 <i>rpoD</i> (Morris) (1184)	6	0.009	0.007	0.002	0.009	0.004			
<i>P. viridiflava</i> TA043 <i>rpoD</i> (NZ KE691939.1)	7	0.095	0.091	0.091	0.083	0.100	0.094		
<i>P. aeruginosa</i> PAO1 <i>rpoD</i> (AE004091.2.)	8	0.525	0.531	0.538	0.552	0.550	0.537	0.493	

<sup>a</sup>Генетичка удаљеност између парова секвенци представља број супституција база по месту између секвенци  
Анализа извршена према Kimura – 2 моделу.

#### 5.4.3.3. Утврђивање генетичког диверзитета и еволутивних веза проучаваних сојева и сојева *P. syringae* изолованих са стрних жита

**Генетички диверзитет.** Секвенце L19 локуса *rpoD* гена (Hwang MLST шема) сојева *P. syringae* изолованих са стрних жита (табела 33) су екстраховане из базе RAMDB (величина 495 bp) и заједно са консензус секвенцама проучаваних сојева поравнате на најмању заједничку дужину 481bp.

У филогенетској анализи „neighbour-joining“ методом према Tajima&Nei моделу је изведено филогенетско стабло (слика 45) и матрикс генетичке удаљености (табела 34 и табела 35).

Филогенетско стабло (приказано у кружној форми) је идентичне топологије као и филогенетско стабло изведено према Parkinson et al. (2011) које је коришћено у класификацији проучаваних сојева (слика 39). Вредности матрикса генетичких удаљености између проучаваних сојева и сојева *P. syringae* изолованих са стрних жита у већој мери показују поклапање са резултатима филогенетске идентификације према Parkinson et al. (2011).

Анализом топологије филогенетског стабла се уочава да се проучавани сојеви највећим делом уклапају у постојећи диверзитет сојева *P. syringae* изолованих са стрних жита и сврстаних у филогрупе 2 и 4. Сојеви 2тк, 3тк, 6тк, 21тк, 26тк, 30тк, 50тк, 52тк, 54тк и 58тк су идентични са патотипским сојем *P. s. pv. atrofaciens* (BS2457=

LMG 5095=NCPPB 2612), а сојеви 4тк, 31тк, 36тк, 37тк и 57тк са патотипским сојем *P. s. pv. lapsa* (BS2737=LMG 2206=NCPPB 2096), али и *P. s. pv. japonica* (M301072). Сојеви 7тк и 47тк су блиско сродни са сојем *P. s. pv. syringae* (B64) изолованим са пшенице у САД.

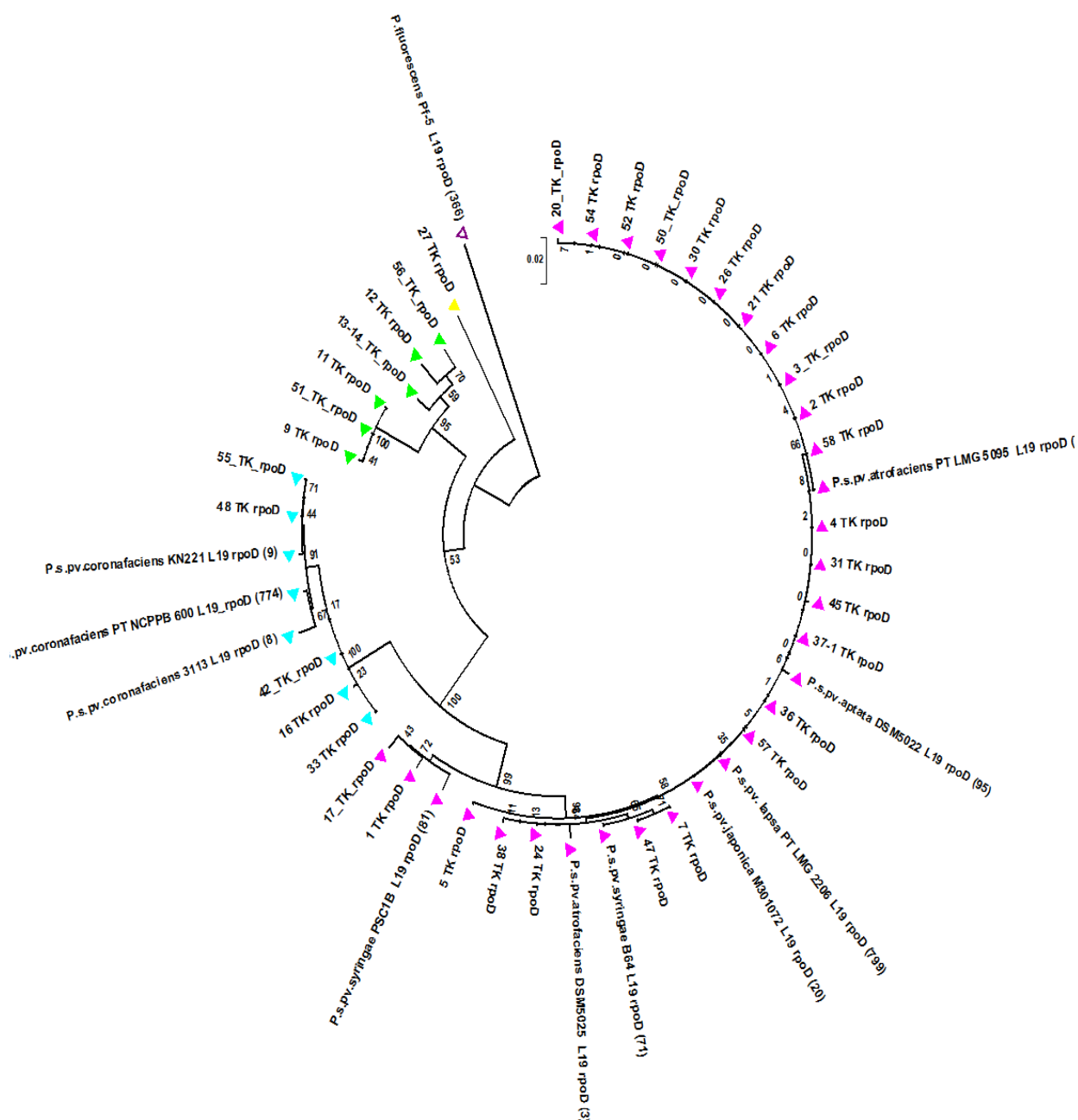
**Табела 33.** Сојеви *P. syringae* са стрних жита достављени у базу PAMDB

патовар	назив соја	домаћин	земља и година изолације	секвенца	приступни број у PAMDB
<i>P. s. pv. syringae</i>	B64	<i>Triticum aestivum</i>	САД	L19 <i>rpoD</i>	71
<i>P. s. pv. syringae</i>	PSC1B	<i>Zea mays</i>	САД	L19 <i>rpoD</i>	81
<i>P. s. pv. atrofaciens PT</i>	BS2457 (LMG 5095)	<i>Triticum aestivum</i>	Канада, 1968	L19 <i>rpoD</i>	794
<i>P. s. pv. atrofaciens</i>	DSM 5025	<i>Triticum aestivum</i>	Непозната	L19 <i>rpoD</i>	3
<i>P. s. pv. aptata</i>	DSM 5022	<i>Triticum aestivum</i>	Непозната	L19 <i>rpoD</i>	95
<i>P. s. pv. japonica R</i>	M301072	<i>Hordeum vulgare</i>	Јапан, 1951	L19 <i>rpoD</i>	20
<i>P. s. pv. lapsa PT</i>	BS2737 (LMG 2206)	<i>Zea mays</i>	Непозната	L19 <i>rpoD</i>	799
<i>P. s. pv. coronafaciens PT</i>	ICMP 3113	<i>Avena sativa</i>	В.Британија, 1958	L19 <i>rpoD</i>	8
<i>P. s. pv. coronafaciens R</i>	KN221 (MAFF302787)	<i>Avena sativa</i>	1984	L19 <i>rpoD</i>	9
<i>P. s. pv. coronafaciens PT</i>	BS165 (NCPPB 600)	<i>Avena sativa</i>	1958	L19 <i>rpoD</i>	774
<i>P. fluorescens</i>	<i>Pf-5</i>			L19 <i>rpoD</i>	366

Сојеви 5тк и 45тк су блиско сродни са *P. s. pv. lapsa* BS2737 (LMG 2206) и *P. s. pv. japonica* M301072, с тим што се сој 5тк на филогенетком стаблу позиционира одвојено од свих других сојева. Најмања сродност сојева је утврђена у односу на сојеве *P. s. pv. atrofaciens* (DSM5025) и *P. s. pv. aptata* (DSM5022) који су изоловани са пшенице (вредност генетичке удаљености се креће између 0,5 и 1,1%). У оквиру филогрупе 2 једино сојеви 1тк и 17тк немају идентичне и блиско сродне сојеве међу патогенима стрних жита филогрупе 2.

Сојеви 16тк, 33тк и 42тк се и у овој анализи позиционирају у филогрупи 4, али нису идентични нити блиско сродни ни са једним од сојева филогрупе 4 изолованих са стрних жита за које су у ранијим истраживањима обезбеђене секвенце *rpoD* гена. За разлику од њих сојеви 48тк и 55тк су блиско сродни са сва три позната соја *P. s. pv. coronafaciens* од којих је један и патотипски (NCPPB 600).

Разлику у односу на до сада познат диверзитет сојева *P. syringae* са стрних жита представљају сојеви 9тк, 11тк, 12тк, 13/14тк, 27тк, 51тк и 56тк за које не постоје сојеви са стрних жита са којима би се груписали у филогрупи 7.



**Слика. 45.** Дендрограм приказан у кружној форми је изведен поређењем секвенци *rpoD* гена проучаваних сојева и секвенци L19 локуса *rpoD* гена Hwang MLST шеме сојева *P. syringae* изолованих са стрних жита и поравнатих на дужину од 481bp („Neighbour-joining“ метода). Проучавани сојеви су означени шифрама (број и ознака тк), док су сојеви *P.syringae* изоловани са стрних жита означени називом патовара, шифром и приступним бројем у бази PAMDB. Филогенетско стабло је укорешено коришћењем *rpoD* секвенце соја *P. fluorescens* Pf5 (NCPPB 3364).

Табела 34. Генетички диверзитет проучаваних сојева сврстаних у филогрупу 2 у односу на патоваре *P. syringae* са стрних жита

назив соја	генетичка удаљеност између секвенци (pairwise distance) <sup>a</sup>																																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33				
1TK rpoD	1																																				
2TK rpoD	2	0.021																																			
3TK rpoD	3	0.021	0.000																																		
4TK rpoD	4	0.019	0.002	0.002																																	
5TK rpoD	5	0.021	0.004	0.004	0.002																																
6TK rpoD	6	0.021	0.000	0.000	0.002	0.004																															
7TK rpoD	7	0.026	0.008	0.008	0.006	0.008	0.008																														
17TK rpoD	8	0.013	0.024	0.024	0.021	0.019	0.024	0.028																													
20TK rpoD	9	0.024	0.002	0.002	0.004	0.006	0.002	0.011	0.026																												
21TK rpoD	10	0.021	0.000	0.000	0.002	0.004	0.000	0.008	0.024	0.002																											
24TK rpoD	11	0.021	0.004	0.004	0.002	0.004	0.004	0.004	0.023	0.006	0.004																										
26TK rpoD	12	0.021	0.000	0.000	0.002	0.004	0.000	0.008	0.024	0.002	0.000	0.004																									
27TK rpoD	13	0.136	0.144	0.144	0.141	0.138	0.144	0.147	0.134	0.147	0.144	0.144	0.144																								
30TK rpoD	14	0.021	0.000	0.000	0.002	0.004	0.000	0.008	0.024	0.002	0.000	0.004	0.000	0.144																							
31TK rpoD	15	0.019	0.002	0.002	0.000	0.002	0.002	0.006	0.021	0.004	0.002	0.002	0.002	0.141	0.002																						
36TK rpoD	16	0.019	0.002	0.002	0.000	0.002	0.002	0.006	0.021	0.004	0.002	0.002	0.002	0.141	0.002	0.000																					
37/1TK rpoD	17	0.019	0.002	0.002	0.000	0.002	0.002	0.006	0.021	0.004	0.002	0.002	0.002	0.141	0.002	0.000	0.000																				
38TK rpoD	18	0.023	0.006	0.006	0.004	0.006	0.006	0.006	0.026	0.008	0.006	0.002	0.006	0.147	0.006	0.004	0.004	0.004																			
45TK rpoD	19	0.021	0.004	0.004	0.002	0.004	0.004	0.008	0.023	0.006	0.004	0.004	0.004	0.144	0.004	0.002	0.002	0.002	0.006																		
47TK rpoD	20	0.026	0.008	0.008	0.006	0.008	0.008	0.000	0.028	0.011	0.008	0.004	0.008	0.147	0.008	0.006	0.006	0.006	0.006	0.008																	
50TK rpoD	21	0.021	0.000	0.000	0.002	0.004	0.000	0.008	0.024	0.002	0.000	0.004	0.000	0.144	0.000	0.002	0.002	0.002	0.006	0.004	0.008																
52TK rpoD	22	0.021	0.000	0.000	0.002	0.004	0.000	0.008	0.024	0.002	0.000	0.004	0.000	0.144	0.000	0.002	0.002	0.002	0.006	0.004	0.008	0.000															
54TK rpoD	23	0.021	0.000	0.000	0.002	0.004	0.000	0.008	0.024	0.002	0.000	0.004	0.000	0.144	0.000	0.002	0.002	0.002	0.006	0.004	0.008	0.000	0.000														
57TK rpoD	24	0.019	0.002	0.002	0.000	0.002	0.002	0.006	0.021	0.004	0.002	0.002	0.002	0.141	0.002	0.000	0.000	0.000	0.004	0.002	0.006	0.002	0.002	0.002													
58TK rpoD	25	0.021	0.000	0.000	0.002	0.004	0.000	0.008	0.024	0.002	0.000	0.004	0.000	0.144	0.000	0.002	0.002	0.002	0.006	0.004	0.008	0.000	0.000	0.000	0.002												
<i>P. s. pv. atrofaciens</i> PT LMG 5095 L19 rpoD (794)	26	0.021	0.000	0.000	0.002	0.004	0.000	0.008	0.024	0.002	0.000	0.004	0.000	0.144	0.000	0.002	0.002	0.002	0.006	0.004	0.008	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000											
<i>P. s. pv. atrofaciens</i> DSM5025 L19 rpoD (3)	27	0.028	0.011	0.011	0.008	0.011	0.011	0.011	0.026	0.013	0.011	0.006	0.011	0.146	0.011	0.008	0.008	0.008	0.008	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.008	0.011	0.011									
<i>P. s. pv. aptata</i> DSM5022 L19 rpoD (95)	28	0.023	0.006	0.006	0.004	0.006	0.006	0.011	0.026	0.008	0.006	0.006	0.006	0.146	0.006	0.004	0.004	0.004	0.008	0.006	0.011	0.006	0.006	0.006	0.004	0.006	0.006	0.006	0.013								
<i>P. s. pv. lapsa</i> PT LMG 2206 L19 rpoD (799)	29	0.019	0.002	0.002	0.000	0.002	0.002	0.006	0.021	0.004	0.002	0.002	0.002	0.141	0.002	0.000	0.000	0.000	0.004	0.002	0.006	0.002	0.002	0.002	0.002	0.000	0.002	0.002	0.008	0.004							
<i>P. s. pv. japonica</i> M301072 L19 rpoD (20)	30	0.019	0.002	0.002	0.000	0.002	0.002	0.006	0.021	0.004	0.002	0.002	0.002	0.141	0.002	0.000	0.000	0.000	0.004	0.002	0.006	0.002	0.002	0.002	0.002	0.000	0.002	0.002	0.008	0.004	0.000						
<i>P. s. pv. syringae</i> B64 L19 rpoD (71)	31	0.024	0.006	0.006	0.004	0.006	0.006	0.002	0.026	0.008	0.006	0.002	0.006	0.147	0.006	0.004	0.004	0.004	0.004	0.006	0.002	0.006	0.006	0.006	0.004	0.006	0.006	0.008	0.008	0.004	0.004						
<i>P. s. pv. syringae</i> PSC1B L19 rpoD (81)	32	0.015	0.024	0.024	0.021	0.024	0.024	0.028	0.015	0.026	0.024	0.023	0.024	0.136	0.024	0.021	0.021	0.021	0.026	0.023	0.028	0.024	0.024	0.024	0.021	0.024	0.024	0.030	0.026	0.021	0.021	0.026					
<i>P. fluorescens</i> PF-5 L19 rpoD (366)	33	0.202	0.206	0.206	0.203	0.203	0.206	0.209	0.205	0.209	0.206	0.206	0.206	0.188	0.206	0.203	0.203	0.203	0.209	0.206	0.209	0.206	0.206	0.206	0.203	0.206	0.208	0.208	0.203	0.203	0.209	0.199					

<sup>a</sup> Генетичка удаљеност између парова секвенци представља број супституција база по месту између секвенци. Анализа извршена према Тајјима & Неј моделу („neighbour-joining“ метод); сојеви идентични са патотипским сојем *P. s. pv. atrofaciens* BS2457 (LMG 5095) означени љубичастом бојом, сојеви идентични са патотипским сојем *P. s. pv. lapsa* BS2737 (LMG 2206) сивом бојом и сојевиидентични са сојем *P. s. pv. syringae* B64 (означени зеленом бојом)

**Табела 35.** Генетички диверзитет проучаваних сојева сврстаних у филогрупу 4 и 7 у односу на патоваре *P. syringae* са стрних жита

назив соја	генетичка удаљеност између секвенци (pairwise distance) <sup>a</sup>																
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
16ТК <i>rpoD</i>	1																
33ТК <i>rpoD</i>	2	0.002															
42ТК <i>rpoD</i>	3	0.002	0.000														
48ТК <i>rpoD</i>	4	0.013	0.011	0.011													
55ТК <i>rpoD</i>	5	0.013	0.011	0.011	0.000												
9ТК <i>rpoD</i>	6	0.106	0.103	0.103	0.114	0.114											
11ТК <i>rpoD</i>	7	0.103	0.101	0.101	0.112	0.112	0.002										
12 ТК <i>rpoD</i>	8	0.106	0.103	0.103	0.114	0.114	0.039	0.037									
13/14ТК <i>rpoD</i>	9	0.100	0.098	0.098	0.108	0.108	0.048	0.046	0.028								
51ТК <i>rpoD</i>	10	0.103	0.101	0.101	0.112	0.112	0.002	0.000	0.037	0.046							
56ТК <i>rpoD</i>	11	0.108	0.105	0.105	0.116	0.116	0.039	0.037	0.021	0.019	0.037						
27ТК <i>rpoD</i>	12	0.133	0.131	0.131	0.139	0.139	0.097	0.094	0.097	0.094	0.094	0.097					
<i>P. s. pv. coronafaciens</i> 3113 L19 <i>rpoD</i> (8)	13	0.017	0.015	0.015	0.013	0.013	0.121	0.119	0.121	0.115	0.119	0.124	0.149				
<i>P.s.pv.coronafaciens</i> KN221 L19 <i>rpoD</i> (9)	14	0.011	0.009	0.009	0.002	0.002	0.114	0.111	0.114	0.108	0.111	0.116	0.142	0.011			
<i>P. s. pv. coronafaciens</i> PT NCPPB 600 L19 <i>rpoD</i> (774)	15	0.011	0.009	0.009	0.006	0.006	0.109	0.106	0.109	0.108	0.106	0.116	0.142	0.011	0.004		
<i>P. fluorescens</i> Pf-5 L19 <i>rpoD</i> (366)	16	0.203	0.200	0.200	0.206	0.206	0.201	0.197	0.186	0.183	0.197	0.192	0.183	0.215	0.206	0.206	

<sup>a</sup>Генетичка удаљеност између парова секвенци представља број супституција база по месту између секвенци. Анализа извршена према Тајјима & Неи моделу („neighbour-joining“ метод)(сојеви блискородни са сојем *P. s. pv. coronafaciens* KN221 означени са сивом бојом)

*Проучавање еволутивних веза коришћењем UPGMA методе.* UPGMA метод је коришћен у циљу утврђивања еволутивних веза између проучаваних сојева сврстаних у филогрупу 2 и 4 и сојева *P. syringae* изолованих са стрних жита чије су *rpoD* секвенце обезбеђене у бази RAMDB (табела 33). За сваку од филогрупа изведен је посебан дендрограм.

*Филогрупа 2.* Изведени дендрограм (слика 46) није показивао одступања у односу на раније изведена филогенетска стабла за филогрупу 2 (слика 39 и слика 45). На изведеном дендрограму се уочава груписање сојева у три већа кластера. 11 сојева (2тк, 3тк, 6тк, 21тк, 26тк, 30тк, 50тк, 52тк, 54тк и 58тк и са њима сој 20тк) груписани су са патотипским сојем *P. s. pv. atrofaciens* (BS2457=LMG 5095) у један кластер. Сојеви 4тк, 31тк, 36тк, 37тк и 57тк заједно са сродним сојевима 5тк и 45тк груписани око патотипских сојева *P. s. pv. lapsa* (BS 2737=LMG 2206) и *P. s. pv. japonica* M301072 чине други кластер, док су сојеви 7тк, 24тк, 38тк и 47тк груписани око соја *P. s. pv. syringae* (B64) чине трећи кластер.

Утврђено је да се идентичност сојева 2тк, 3тк, 6тк, 21тк, 26тк, 30тк, 50тк, 52тк, 54тк и 58тк са патотипским сојем *P. s. pv. atrofaciens* задржала у свим обављеним филогенетским анализама, те су они и идентификовани као *P. s. pv. atrofaciens*, а генетички диверзитет ових сојева који одсликава и неке фенотипске карактеристике је означен као Тип 1. Иако не 100% идентичан, сој 20тк је идентификован као блиско



сродан са *P. s. pv. atrofaciens*, јер се у свим изведеним анализама увек групише заједно са патотипским сојем овог патовара. Сојеви 4тк, 31тк, 36тк, 37тк и 57тк су идентични са секвенцама *rpoD* гена патовара *P. s. pv. lapsa* и *P. s. pv. aptata*, па је њихов генетички диверзитет који одсликава и неке фенотипске карактеристике означен са Тип 2. Овом типу припадају и њима блиско сродни сојеви 5тк и 45тк. Сојеви 7тк, 24тк, 38тк и 47тк су блиско сродни свим наведеним патотипским сојевима подгрупе 2b филогрупе 2, али је њихов генетички диверзитет који одсликава и неке фенотипске карактеристике означен са Тип 3, јер испољавају блиску сродност са секвенцама *rpoD* гена соја *P. s. pv. syringae* са пшенице.

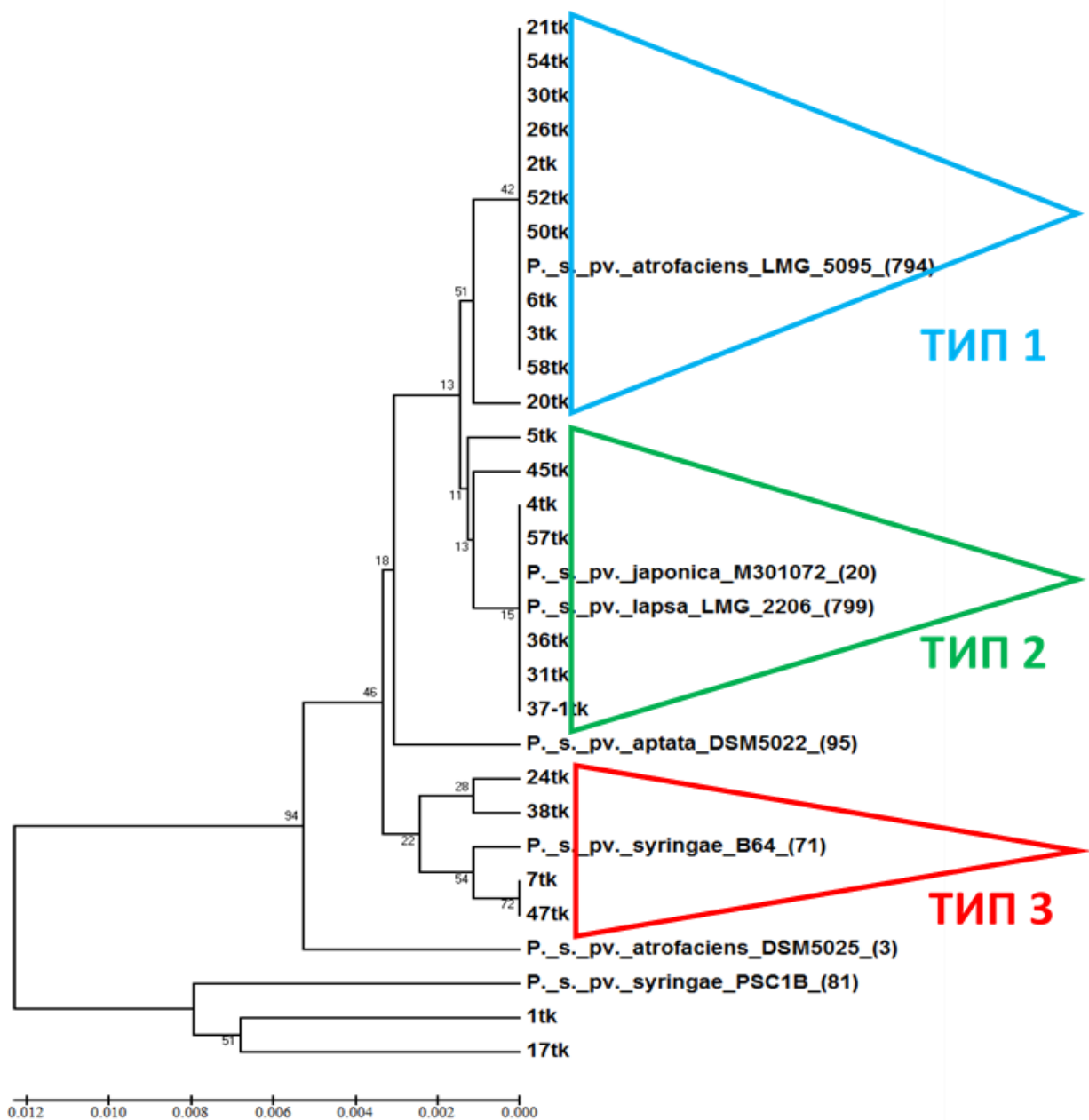
Као и код филогенетске анализе изведене „neighbour-joining“ методом према Тајима&Неи моделу, сојеви са стрних жита слични сојевима 1тк и 17тк нису познати.

Филогрупа 4. Такође, UPGMA метод је коришћен и у циљу утврђивања еволутивних веза између проучаваних сојева класификованих у филогрупу 4 и сојева филогрупе 4 *P. syringae* познатих патогена стрних жита, чије су секвенце обезбеђене у бази RAMDB. Изведени дендрограм (слика 47) није показивао одступања у односу на раније изведена филогенетска стабла за филогрупу 4 (слика 40 и слика 45).

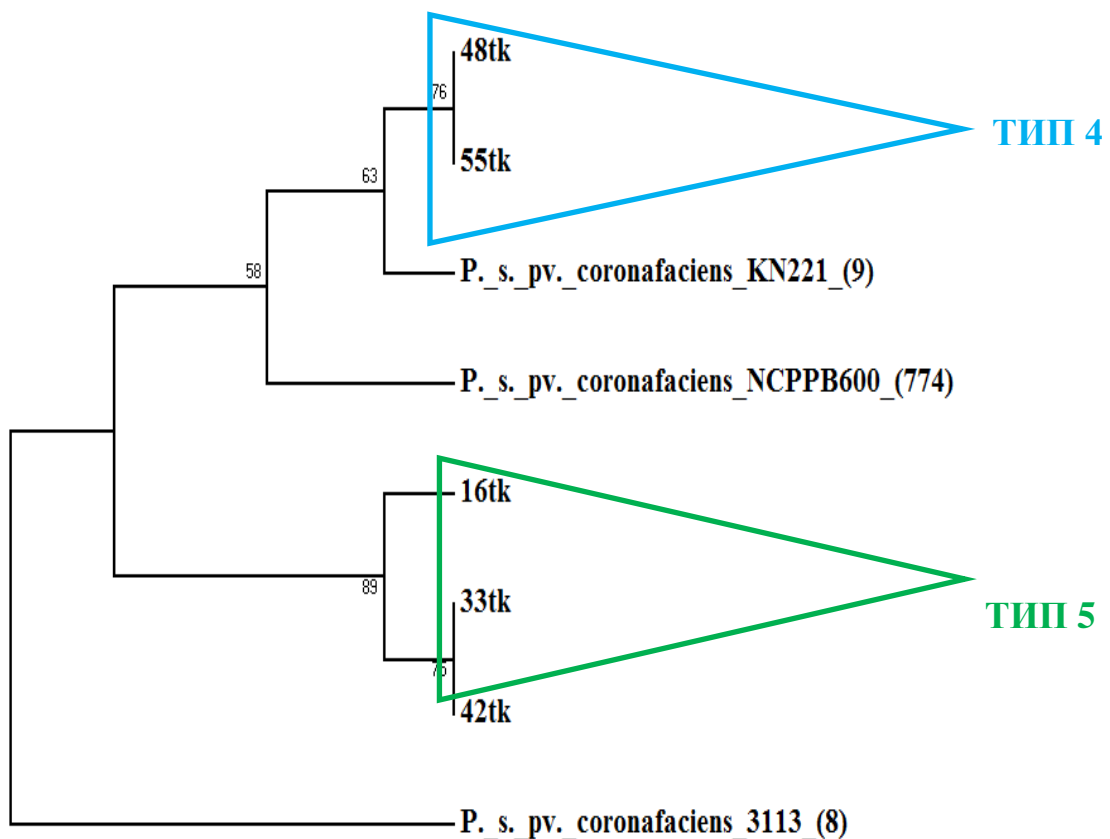
На изведеном дендрограму се уочава груписање сојева филогрупе 4 у два већа кластера. Сојеви 48тк и 55тк чине један кластер заједно са патотипским сојем *P. s. pv. coronafaciens* (NCPPB 600), док сојеви 16тк, 33тк и 42тк чине други кластер који није повезан са сојевима филогрупе 4 *P. syringae* познатих патогена стрних жита чије су секвенце доступне у бази RAMDB. Наиме, то су сојеви који су у филогенетској анализи према Parkinson et al. (2011) били блиско сродни са типским сојевима *P. s. pv. striafaciens* (NCPPB 1898) и *P. s. pv. porri* (NCPPB 3364).

Генетички диверзитет који одсликава и неке фенотипске карактеристике сојева 48тк и 55тк је означен као Тип 4, а сојева 16тк, 33тк и 42тк као Тип 5.





**Слика 46.** Дендрограм конструисан поређењем секвенци *rpoD* гена проучаваних сојева из филогрупе 2 и секвенци L19 локуса *rpoD* гена Hwang MLST шеме сојева *P. syringae* изолованих са стрних жита и поравнатих на дужину од 478bp (UPGMA метода). Проучавани сојеви су означени шифрама (број и ознака тк), док су сојеви *P. syringae* изоловани са стрних жита означени називом патовара, шифром и приступним бројем у бази RAMDB. Филогенетско стабло је неукорењено.



**Слика 47.** Дендрограм конструисан поређењем секвенци *rpoD* гена проучаваних сојева класификованих у филогрупу 4 и секвенци L19 локуса *rpoD* гена Hwang MLST шеме сојева филогрупе 4 *P. syringae* познатих патогена стрних жита и поравнатих на дужину од 478bp (UPGMA метода). Сојеви проучавани у овим испитивањима су означени шифрама, док су сојеви *P. syringae* идентификовани као патогени стрних жита који припадају филогрупи 4 означени називом патовара, шифром и приступним бројем у бази RAMDB. Филогенетско стабло је неукорењено.

\*\*\*

Преглед резултата сврставања (класификације) и идентификације свих проучаваних сојева у овом истраживању је дат у табели 36, осим за сој 32tk за који у процесу секвенционирања није био произведен хроматограм погодан на анализу, па је овај сој искључен из даље филогенетске анализе и за њега није могуће до краја одредити припадност једној од група приказаних у табели 36. За проучавани сој 32tk се на основу резултата приказаних у табелама 14, 15, 16 и 17 (уз слику 36) са сигурношћу може претпоставити једино да припада филогрупи 2 (највероватније подгрупе 2b).

Табела 36. Преглед резултата сврставања (класификације) и идентификације свих проучаваних сојева

филогрупа (Parkinson): <b>2</b> подгрупа (Berge): <b>2b</b> идентификација: <i>P. s. pv. atrofaciens</i> UPGMA: Тип 1						
шифра соја <sup>a</sup>	гер РСР група	биљна врста	сорта	биљни део	локалитет	година изолације
<b>2тк</b>	4	тритикале	Тријумф	Лист	Ниш- Алексинац	2009
<b>3тк</b>	5	тритикале	Одисеј	Лист	Крагујевац	2009
<b>6тк</b>	3	јечам	НС 565	доњи део стабла	Сомбор	2010
19тк <sup>b</sup>		јечам	непозната	Лист	Сомбор- Билић	2014
<b>20тк<sup>b</sup></b>	28	пшеница	самоникла	Лист	Сомбор- Билић	2014
22тк <sup>b</sup>		пшеница	колекција 11186	Лист	Сомбор	2014
<b>21тк</b>	/	пшеница	колекција 11191	Лист	Сомбор	2014
23тк	29	раж	НС/КГ1/502	Лист	Сомбор	2014
<b>26тк</b>		пшеница	колекција 11191	Лист	Сомбор	2014
<b>30тк</b>	26	јечам	шестореди	Лист	Крагујевац	2014
<b>50тк</b>	14	пшеница	непозната	Семе	Б. Петрово Село	2014
<b>52тк</b>	9	овас	Јадар	семе плеве	Сомбор	2014
59тк		кукуруз	непозната	Лист	Б. Петрово Село	2014
<b>54тк</b>	17	јечам	двореди	Семе	Крагујевац	2014
<b>58тк</b>	11	пшеница	Победа	доњи део стабла	Сомбор	2014

<sup>a</sup> сојеви означени у „bold“ и црвено обојени су одабрани за филогенетску анализу

<sup>b</sup> сојеви блиско сродни са *P. s. pv. atrofaciens* (генетичка удаљеност 2%), али сродан и са *P. s. pv. lapsa* и *P. s. pv. aptata* (генетичка удаљеност 3%), али се по топологији филогенетског групнише стабла увек групишу са *P. s. pv. atrofaciens*

Наставак на следећој страни

филогрупа (Parkinson): **2**, подгрупа (Berge): **2b**  
 идентификација: *P. s. pv. aptata/P. s. pv. lapsa*  
 UPGMA: Тип 2

шифра соја <sup>a</sup>	гер PCR група	биљна врста	сорта	биљни део	локалитет	година изолације
<b>4тк</b>	6	јари јечам	непозната	лист	Панчево	2009
<b>5тк<sup>b</sup></b>	7	тритикале	непозната	доњи део стабла	Ниш- Алексинац	2011
<b>31тк</b>	31	овас	Јадар	лист	Римски Шанчеви	2014
<b>36тк</b>	15	тритикале	Тријумф	лист	Сомбор- Билић	2014
<b>37тк</b>	18	раж	непозната	лист	Сомбор	2014
49тк		јечам	шестореди	семе	Крагујевац	2014
<b>45тк<sup>b</sup></b>	20	тритикале	Тријумф	лист	Крагујевац	2014
<b>57тк</b>	10	пшеница	Рапсодија	доњи део стабла	Римски Шанчеви	2014

<sup>a</sup> сојеви означени у „bold“ и црвено обојени су одабрани за филогенетску анализу

<sup>b</sup> сојеви блиско сродни са *P. s. pv. aptata/lapsa* (генетичка удаљеност 2%) и *P. s. pv. syringae/atrofaciens/japonica* (генетичка удаљеност 2%) али се по топологији филогенетског групише стабла увек групишу са *P. s. pv. aptata/lapsa*

филогрупа (Parkinson): **2**, подгрупа (Berge): **2b**  
 идентификација: *P. s. pv. syringae/ aptata/atrofaciens/lapsa/japonica*  
 UPGMA: Тип 3

шифра соја <sup>a</sup>	гер PCR група	биљна врста	сорта	биљни део	Локалитет	година изолације
<b>7тк</b>	8	јечам	НС 565	семе	Сомбор	2011
<b>24тк</b>	27	јечам	шестореди	лист	Крагујевац	2014
25тк		тритикале	непозната	лист	Крагујевац	2014
28тк		јечам	шестореди	лист	Крагујевац	2014
29тк		јечам	шестореди	семе	Крагујевац	2014
<b>38тк</b>		16	кукуруз	непозната	лист	Сомбор
41тк	21	дурум	Дурумко	лист	Сомбор	2014
<b>47тк</b>		овас	Јадар	семе	Римски Шанчеви	2014

<sup>a</sup> сојеви означени у „bold“ и црвено обојени су одабрани за филогенетску анализу

<sup>b</sup> сојеви блиско сродни са *P. s. pv. aptata/syringae atrofaciens/japonica* (7тк и 47тк са генетичком удаљеношћу 5-7% и 24тк и 38тк са генетичком удаљеношћу 2-3%), али се по топологији филогенетског стабла увек налазе у кластеру који је раздвојен од патотипских сојева филогрупе 2

Наставак на следећој страни

филогрупа (Parkinson): **2**  
 подгрупа (Berge): **2d**  
 идентификација: *P. s. pv. coryli*  
 UPGMA: /

шифра соја <sup>a</sup>	гер PCR група	биљна врста	сорта	биљни део	Локалитет	година изолације
<b>1тк<sup>b</sup></b>	1	овас	колекција 975	лист	Римски Шанчеви	2009

<sup>a</sup> сојеви означени у „bold“ и црвено обојени су одабрани за филогенетску анализу

<sup>b</sup> сој блиско сродан са *P. s. pv. coryli* (генетичка удаљеност 2%)

филогрупа (Parkinson): **2**  
 подгрупа (Berge): **2d**  
 идентификација: *P. s. pv. aceris/solidagae*  
 UPGMA: /

шифра соја <sup>a</sup>	гер PCR група	биљна врста	сорта	биљни део	Локалитет	година изолације
<b>17тк<sup>b</sup></b>	<b>2</b>	пшеница	самоникла	доњи део стабла	Б. Петрово Село	2014

<sup>a</sup> сојеви означени у „bold“ и црвено обојени су одабрани за филогенетску анализу

<sup>b</sup> сој блиско сродан са *P. s. pv. solidagae* (генетичка удаљеност 5%) и *P. s. pv. aceris/solidagae* (генетичка удаљеност 7%)

филогрупа (Parkinson): **4**, подгрупа (Berge): /  
 идентификација: *P. s. pv. oryzae/coronafaciens*  
 UPGMA: тип 4

шифра соја <sup>a</sup>	гер PCR група	биљна врста	сорта	биљни део	Локалитет	година изолације
<b>48тк<sup>b</sup></b>	22	раж	Саво	семе	Сомбор	2014
53тк <sup>b</sup>	13	овас	Јадар	семе	Сомбор	2014
<b>55тк<sup>b</sup></b>		раж	Pallazio	семе	Сомбор	2014

<sup>a</sup> сојеви означени у „bold“ и црвено обојени су одабрани за филогенетску анализу

<sup>b</sup> сојеви блиско сродни са *P. s. pv. oryzae* (генетичка удаљеност 2%), *P. s. pv. coronafaciens* (генетичка удаљеност 5%), а по топологији филогенетског стабла се увек групише са *P. s. pv. oryzae*

Наставак на следећој страни

филогрупа (Parkinson): 4, подгрупа (Berge): /  
идентификација: *P. s. pv. porri/striafaciens*  
UPGMA: тип 5

шифра соја <sup>a</sup>	гер PCR група	биљна врста	сорта	биљни део	локалитет	година изолације
<b>16тк<sup>б</sup></b>	24	овас	Дунав	лист	Римски Шанчеви	2009
44тк <sup>б</sup>		овас	непозната	стабло	Б. Петрово Село	2014
<b>33тк</b>	23	овас	непозната	лист	Б. Петрово Село	2014
34тк		раж	Саво	лист	Сомбор	2014
35тк		раж	Pallazio	лист	Сомбор- Билић	2014
39тк	19	овас	непозната	лист	Сомбор- Билић	2014
40тк		овас	непозната	лист	Сомбор	2014
<b>42тк</b>		овас	Абел	лист	Сомбор	2014
43тк		овас	Абел	стабло	Сомбор	2014

<sup>a</sup> сојеви означени у „bold“ и црвено обојени су одабрани за филогенетску анализу

<sup>б</sup> сојеви блиско сродни са *P. s. pv. porri/striafaciens* (генетичка удаљеност 2%)

филогрупа (Parkinson): 7; подгрупа (Berge): 7a  
идентификација: *P. viridiflava*  
UPGMA: /

шифра соја <sup>a</sup>	гер PCR група	биљна врста	сорта	биљни део	локалитет	година изолације
8тк	36	раж	Ф6	доњи део стабла	Крагујевац	2012
<b>9тк</b>		раж	Ф6	доњи део стабла	Крагујевац	2012
10тк	33	раж	Ф6	глава корена	Крагујевац	2012
<b>11тк</b>		раж	Ф6	глава корена	Крагујевац	2012
<b>12тк</b>	34	раж	Ф6	коренчићи	Крагујевац	2012
<b>13/14тк</b>		тритикале	КГ20	лист	Крагујевац	2009
<b>51тк</b>	30	пшеница	Победа	семе	Чачак	2014
<b>56тк</b>	12	тритикале	непозната	семе	Крагујевац	2014

<sup>a</sup> сојеви означени у „bold“ и црвено обојени су одабрани за филогенетску анализу

<sup>б</sup> сојеви блиско сродни са патотипским сојевима *P. viridiflava*

Наставак на следећој страни

филогрупа (Parkinson): **8**, подгрупа (Berge): /  
идентификација: *P. viridiflava* СМО0085  
UPGMA: /

шифра соја <sup>a</sup>	гер PCR група	биљна врста	сорта	биљни део	локалитет	година изолације
<b>27тк<sup>b</sup></b>	25	овас	Јадар	лист	Римски Шанчеви	2014

<sup>a</sup> сојеви означени у „bold“ и црвено обојени су одабрани за филогенетску анализу

<sup>b</sup> сој блиско сродан са *P. viridiflava* СМО0085 (генетичка удаљеност 1%) изолованим из кишнице у Француској

## 5.5. Патогене одлике проучаваних сојева

Патогеност проучаваних сојева је потврђена репродукцијом карактеристичних симптома инокулацијом биљака домаћина из којих су изоловани, осим у случају сојева 1тк и 17тк, изолованим из овса (1тк) и пшенице (17тк) за које је провера патогености рађена и на биљкама ражи (1тк) и на биљкама јечма, овса, тритикалеа и ражи (17тк).

### Сојеви идентификовани као *P. s. pv. atrofaciens*, филогрупа 2b

Реакција биљака пшенице на инокулацију сојевима: 20тк, 21тк, 26тк, 50тк, 58тк (слике 48 и 49)

После 7-10 дана од инокулације, на листовима пшенице се могу уочити пеге разне величине, од појединачних (пречника неколико милиметара), до пега у оквиру којих је ткиво или некротирало или га скоро и нема. Око пега долази до тамне (смеђе) обојености. Пеге које ствара сој 20тк (слика 48, а) испољавају интензивнију некрозу и подсећају на оне које стварају сојеви идентичне *rhoD* секвенце са *P. s. pv. lapsa/aptata*, такође класификовани у филогрупу 2b. Пеге које стварају сојеви 21тк (слика 48, б) и 26тк су нешто другачије, тамније у средини и са јачим хлоротичним ореолом. Сој 58тк ствара карактеристичне пеге са тамно смеђом ивицом, а хлоротична површина негде прстенасто захвата лист, због чега долази до сушења његових вршних делова (слика 49, а), а ова појава се уочава и код соја 20тк (слика 49, б, в).

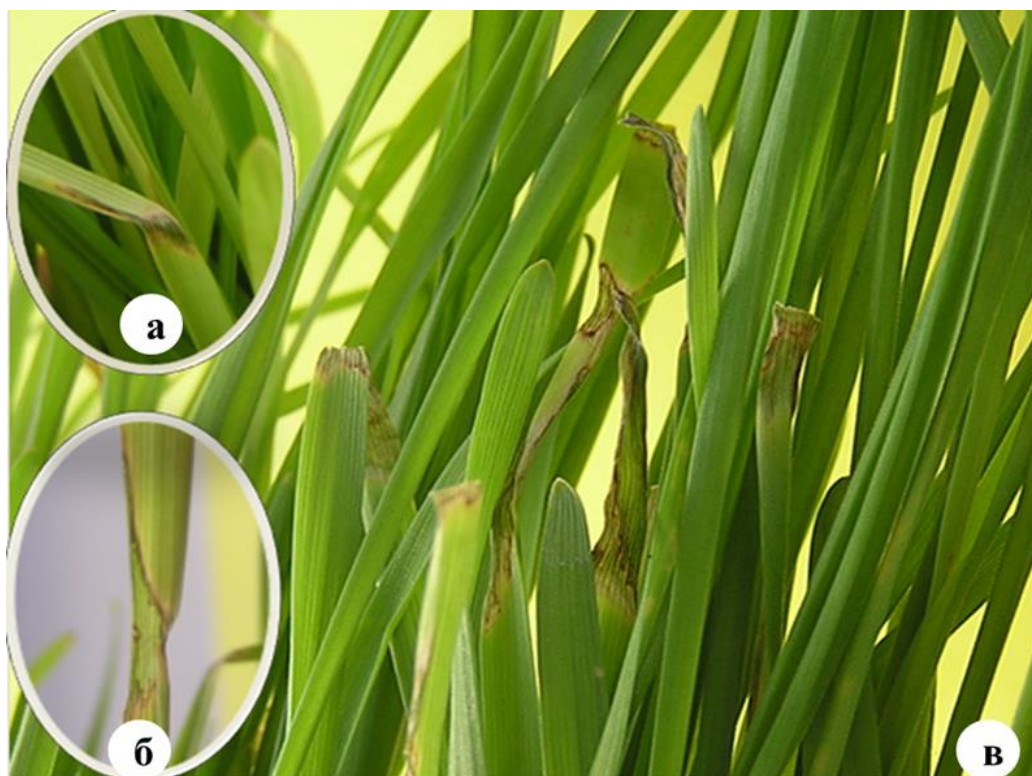
Реакција биљака јечма на инокулацију сојевима: 6тк, 30тк, 54тк (слика 50)

Интензитет појаве пега на листовима јечма варира у зависности од агресивности соја, тако да је најмањи број некротичних пега са јасном маргином тамно смеђе боје уочен код соја 6тк (б), нешто већи број листова са пегамма са слабије израженом маргином, али већом некротичном површином је уочен код соја 30тк (а), док је сој 54тк (в) проузроковао појаву најинтензивнијих некротичних пега са јасном маргином на највећем броју листова.





**Слика 48.** Провера патогености сојева идентификованих као *P. s. pv. atrofaciens* на пшеници: појава пега у оквиру којих је ткиво или некротирало или га скоро и нема, а око пега се јавља тамно смеђе обезбојење - сој 20тк (а), а пеге могу бити тамније у средини са јачим хлоротичним ореолом - сој 21тк (б).



**Слика 49.** Провера патогености сојева идентификованих као *P. s. pv. atrofaciens* на пшеници: пеге прстенасто захватају лист и долази до сушења вршних делова листа - сој 58тк (а) и сој 20тк (б, в).



**Слика 50. Провера патогености сојева идентификованих као *P. s. pv. atrofaciens* на јечму: појава некротичних пега са тамно браон маргином (сој 6тк, б) или са слабије израженом маргином, али већом некротичном површином (сој 30тк, а) или веома интензивне некротичне пеге са јасном маргином на највећем броју листова (сој 54тк, в)**

Реакција биљака овса на инокулацију сојем 52тк и биљака тритикалеа на инокулацију сојевима: 2тк и 3тк (слика 51)

На тритикалеу се појављују само појединачне пеге пречника неколико mm, које понекад прстенасто захватају лист, што доводи до сушења делова изнад некротичног прстена, а потом и сушења читавог листа (сој 2тк, основна слика, сој 3тк, детаљи у кругу). На листовима овса (сој 52тк, б) се уочавају некротичне површине различитих димензија са тамном ивицом, у чијој унутрашњости ткиво некротира и остају често само нерви; на већем броју листова, велике некротичне површине потпуно суше лист.



**Слика 51. Провера патогености сојева идентификованих као *P. s. pv. atrofaciens* на тритикалеу и овсу: (тритикале) (а) појава некротичних пега пречника неколико милиметара које некад и прстенасто захватају лист и доводе до сушења његових вршних делова (сој 2тк, основна слика, сој 3тк, детаљ у кругу); (овас) (б) појава некротичних површина различитих димензија са тамном ивицом, а касније долази до некрозе ткива у унутрашњости пега (сој 52тк)**

**Сојеви блиско сродни са *P. s. pv. syringae/aptata/atrofaciens/lapsa/japonica*, класификовани у филогрупу 2б**

Реакција биљака јечма на инокулацију сојевима 7тк и 24тк; биљака кукуруза на инокулацију сојем 38тк и биљака овса на инокулацију сојем 47тк (слика 52)

На листовима јечма инокулисаног са сојевима 7тк и 24тк се уочавају појединачне хлоротичне пеге које се потом спајају, ткиво унутар њих изумире, а интензитет некроза око којих се уочава ореол светло смеђе боје указује на агресивност патогена (7тк, а и 24тк, б). На кукурузу сој 38тк проузрокује правилне пеге са избелим центром и без тамних ивица, које се не шире. На овсу (сој 47тк, в) се на појединим листовима појављују пеге са смеђом пигментацијом, а око пресечених делова листова се формира некроза јачег интензитета.





**Слика 52.** Провера патогености сојева блиско сродних *P. s. pv. syringae/ aptata/atrofaciens/lapsa/japonica*, класификованих у филогрупу 2b на јечму и овсу: (јечам) (а, б) на листовима се уочавају појединачне хлоротичне површине које се спајају и ткиво унутар њих пропада, док се око некроза уочава нешто шири ореол браон боје (сој 7тк, а и сој 24тк, б); (овас) појава пеге са браон пигментацијом (сој 47тк, в)

**Сојеви идентичне и блиско сродне *proD* секвенце са *P. s. pv. lapsa/aptata*, класификовани у филогрупу 2b**

Реакција биљака пшенице на инокулацију сојем 57тк; биљака јечма на инокулацију сојем 4тк; биљака овса на инокулацију сојем 31тк, биљака ражи на инокулацију сојем 37тк; и биљака тритикалеа на инокулацију сојем 36тк (слика 53) и сојевима 5тк и 45тк (слика 54)

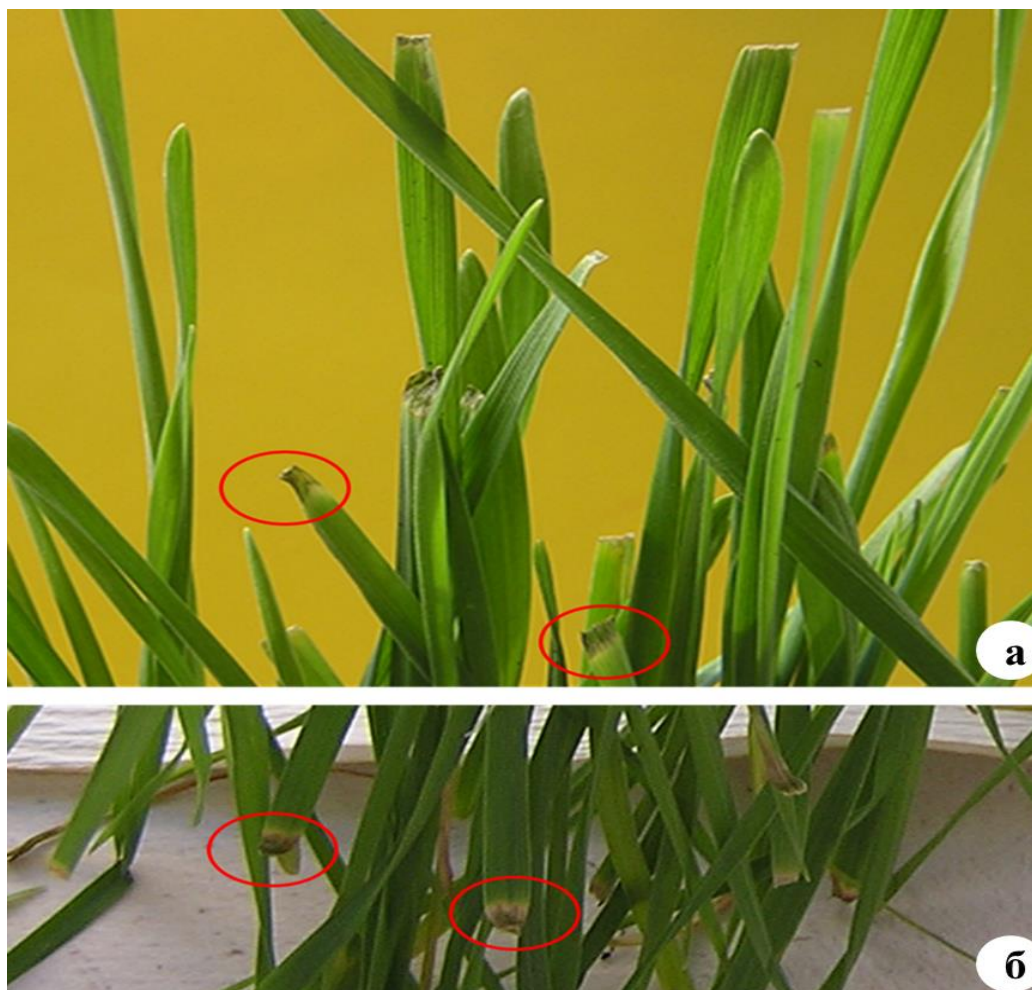
Симптоми које на биљкама домаћинима проузрокују сојеви 4тк, 31тк, 36тк, 37тк и 57тк (слика 53) су слични онима које проузрокује *P. s. pv. atrofaciens*, али се због јачине некроза стиче утисак да се у овом случају ради о агресивнијим/вирулентнијим сојевима од оних који су идентификовани као *P. s. pv. atrofaciens*. На пшеници се јављају појединачне или спојене пеге, јак интензитет некрозе са тамнијим ивицама, по целом листу (сој 57тк, а). На јечму се у оквиру пеге уочавају нерви, док је остатак ткива испео (сој 4тк, б). Више од пола листова ражи је осушено јер су почетне пеге прстенасто захватиле лист, чији се врх потом осушио (сој 37тк), а исти симптом се јавља и код

тритикалеа (сој 36тк, в). На листовима овса се појављују појединачне пеге са нешто тамнијим ореолом, у оквиру којих ткиво изгледа као "поједено", а симптом је интензиван јер има доста прстенасто захваћених и осушених листова (сој 31тк).

На тритикалеу сојеви 5тк (слика 54) и 45тк проузрокују формирање пега са карактеристичним ореолом само на појединим листовима неповређених биљака, а често долази и до прстеновања листова и сушења њихових врхова (сој 5тк, б). Део око пресека (повреде) на листу изгледа некротирано и изрецкано (сој 5тк, а).



**Слика 53. Провера патогености сојева који деле *gpoD* секвенцу са *P. s. pv. lapsa/aptata*, класификованих у филогрупу 2b на пшеници, јечму и тритикалеу: (пшеница): појединачне и спојене пеге на листу и на његовом врху, јак интензитет некрозе и тамније ивице, а некад и хлоротични ореол (сој 57тк, а); (јечам): јаче некрозе и испадање ткива у оквиру пега у којима остају само нерви (сој 4тк, б); (тритикале): појава пега које прстенују и суше врхове, а потом и целе листове (сој 36тк, в).**



**Слика 54.** Провера патогености сојева који деле *groD* секвенцу са *P. s. pv. lapsa/aptata*, класификованих у филогрупу 2b на тритикалеу: на пресеку (повреди) листа се уочавају тамне некрозе и рецкавост листа (а), а негде и изражено сушење листова од врха (б) – сој 5тк

Сојеви блиско сродни са *P. s. pv. coryli* (сој 1тк, слика 55) и *P. s. pv. aceris/solidagae* (сој 17тк, слика 56), класификовани у филогрупу 2d

Реакција биљака ражи на инокулацију сојем 1тк (слика 55); и биљака пшенице, јечма, овса и тритикалеа на инокулацију сојем 17тк (слика 56)

За разлику од овса, на коме сој 1тк проузрокује само промену боје око пресечених врхова листова, на листовима ражи се уочава појава карактеристичних пега, прстенасто захватање и сушење врхова, а потом и целог листа (слика. 55).

Сој 17тк (слика 56) на пшеници ствара симптоме слабијег интензитета, то јест појаву округластих или издужених пега смеђе боје. Карактеристичне симптоме (пеге)



средњег до јаког интензитета овај сој проузрокује на јечму (а), овсу (б), а на тритикалеу долази и до некрозе и сушења врхова листова (в).



**Слика 55.** Провера патогености соја који је блиско сродан са *P. s. pv. coryli* класификованих у филогрупу 2d на ражи: појава карактеристичних пега, прстенасто захватање и сушење врхова, а потом и целог листа – сој 1тк



**Слика 56.** Провера патогености соја који је блиско сродан *P. s. pv. aceris/solidagae* класификован у филогрупу 2d: пеге средњег до јачег интензитета се испољавају на јечму (а) и овсу (б), док на тритикалеу (в) долази и до јачег сушења листова - сој 17тк

**Сојеви блиско сродни *P. s. pv. coronafaciens/oryzae/porri/striafaciens*,  
класификовани у филогрупу 4**

Реакција биљака овса на инокулацију сојевима 16тк, 33тк, 42тк и 48тк и биљака  
ражи на инокулацију сојем 55тк (слика 57)

Пеге које проузрокују сојеви 16тк, 33тк, 42тк и 48 тк на овсу су локализоване и појединачне, са јасном тамнијом ивицом, а понеки листови су и прстенасто захваћени (сој 42тк, слика 57). На листовима ражи (сој 55тк) се развијају интензивнији симптоми, пеге су појединачне или у групама, неке изгледају и као ореолна пегавост ("halo blights"), док се при пажљивом посматрању пега са мале раздаљине уочава се да им је центар беж, а ореол тамније боје облика танке црте.



**Слика 57. Провера патогености сојева блиско сродних *P. s. pv. coronafaciens/oryzae/porri/striafaciens*, класификованих у филогрупу 4 на овсу: појава локализованих и тамних пега са јасном ивицом, а понеки листови су прстенасто захваћени- сој 42 тк**

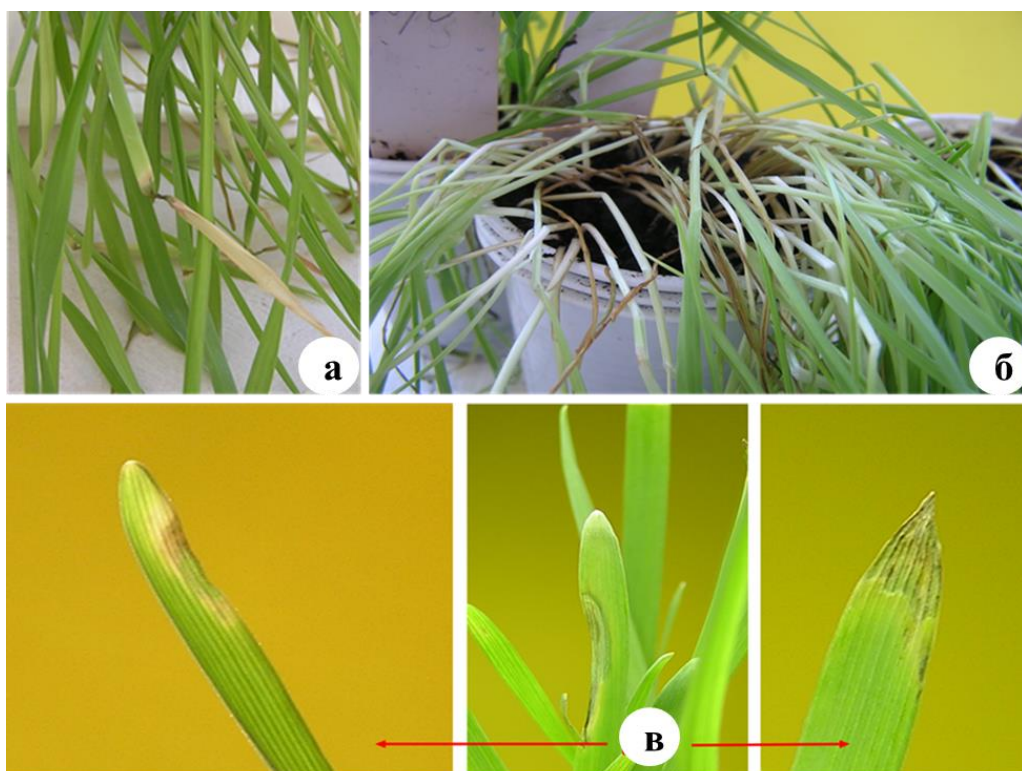


## Сојеви идентификовани као *P. viridiflava*, филогрупе 7а и 8

Реакција биљака пшенице на инокулацију сојем 51тк; биљака овса на инокулацију сојем 27тк; биљака ражи на инокулацију сојевима 9тк, 11тк и 12тк и биљака тритикалеа на инокулацију сојевима 13/14тк и 56тк (слике 58 и 59)

На пшеници, сој 51тк проузрокује појаву појединачних пега са браон ореолом, које само понегде прстенасто захватају лиску, а не уочава се некроза доњег дела стабла као код осталих сојева. Међу сојевима изолованим са ражи, најинтензивније симптоме испољава сој 12тк, који проузрокује и појаву тамњења/некрозе доњег дела стабла (слика 58, б), карактеристичног симптома за *P. viridiflava*. Пеге прстенасто обухватају лист и суше га (слика 58, а), док се на местима пресека врхова листова уочавају просветљене зоне црне боје које изгледају као да су посуте пепелом. Сојеви 13/14 (слика 58, в) и 56тк проузрокују на листу тритикалеа пеге тамно зелене боје, сомотастиг изгледа, величине 0.5-1cm које на више места прстенасто захватају лиске, па листови изгледају као да су на тим местима стиснути. Сој 27тк на овсу (слика 59) проузрокује пеге које прстенасто захватају лист и суше врхове листова изнад некрозе.

Карактеристике реизолата добијених поступком реизолације из инокулисаних биљака, потврђене су употребом стандардних бактериолошких метода.



**Слика 58. Провера патогености сојева идентификованих као *P.viridiflava*, филогрупа 7 на ражи и тритикалеу: (раж) прстенасто сушење листова (а) и појава тамњења/некрозе доњег дела стабла (б) – сој 12тк, (тритикале): пеге које прстенасто захватају лист на више места тако да листови изгледају као стиснути – сој13/14тк (в).**



**Слика 59. Провера патогености сојева идентификованих као *P.viridiflava*, филогрупа 8 на овсу: пеге које прстенасто захватају лист и суше га – сој 27тк.**

## 5.6. Осетљивост сортимента-инфекциони одговор сорти пшенице и јечма на одабране сојеве *P. syringae* и *P. viridiflava*

### 5.6.1. Сорте пшенице

У табели 37 и на сликама 60-64 су приказани инфекциони одговори одабраних сорти пшенице, оцењени према скали Sellam и Wilcoxson-a (1976). У почетку развоја симптома се формирају воденасте пеге 1-3mm у пречнику које се шире, постају некротичне и мењају боју из зелене или светло зелене у светло беж. Ове пеге се могу спајати у неправилне траке или мрље, у кратком временском периоду. Неке од сорти су после појаве пега реаговале сушењем вршних делова или целих листова, што подсећа на симптом природног старења листова.

Сој у односу на који су сорте пшенице испољиле најинтензивнији инфекциони одговор (оцена 3-осетљиве сорте) је сој 12тк (слика 64), за којим следе сојеви 36тк (слика 62) и 20тк (слика 60), док је испољени степен осетљивости најнижи у односу на сојеве 7тк (слика 61) и 42тк (слика 63). Сорте Победа, Ренесанса, НС 40С, Apache, Симонида, Звездана и Европа 90 су у односу на све проучаване сојеве на листовима испољиле уједначене инфекционе одговоре (умерено осетљиве (оцена 2) до осетљиве (оцена 3)). Сорте ССВ Ingenio, Балатон, Sirtaki и Рапсодија су испољиле различите инфекционе одговоре у зависности од соја којим су инокулисане, па је тако сорта ССВ Ingenio у случају инокулације са сојевима 20тк, 36тк и 12тк имала већи број листова са некротичним површинама на више од 25% (оцена 3) а у случају инокулације са сојевима 7тк и 42тк, мале пеге на око 5-10% површине листа (оцена 1) (табела 37).

Међу сортама су уочене разлике не само у инфекционом одговору (процент захваћене површине листа, оцењен према скали Sellam и Wilcoxson (1976)), него и у дистрибуцији напада (број листова у бусену на коме су се појавили карактеристични симптоми). Најосетљивија према свим одабраним сојевима у фази сејанаца старих 12 дана и у односу на интензитет напада и дистрибуцију напада у бусену је била сорта Европа 90, а потом Симонида, Ренесанса и Звездана, док је највећу отпорност исказану кроз најслабији инфекциони одговор испољила сорта Sirtaki.

Табела 37. Инфекциони одговор одабраних сорти пшенице

сорта	ОЦЕНА*				
	сој 20 тк <sup>1)</sup>	сој 7тк <sup>2)</sup>	сој 36тк <sup>3)</sup>	сој 42тк <sup>4)</sup>	сој 12тк <sup>5)</sup>
Победа	2	3	2	3	3
Ренесанса	3	3	3	3	3
НС 40С	3	2	3	2	3
Араче	2	3	3	2	3
Симонида	3	3	3	3	3
ССВ Ingenio	3	1	3	1	3
Balaton	3	1	2	1	2
Звездана	3	3	3	3	2
Европа 90	3	3	3	3	3
Sirtaki	1	0	1	2	2
Рапсодија	2	2	3	1	3

\* скала за оцењивање према Sellam и Wilcoxson (1976): (0) Отпорна – нема ни пега ни трагова инфекције; (1) Умерено отпорна- мале пеге на око 5-10% површине листа; (2) Умерено осетљива-некротичне површине различите величине са понеким спајањем, захваћено 10-15% површине листа; (3) Осетљива- некротичне површине захватају више од 25% листа

<sup>1)</sup> сој 20тк (идентификован као *P. s. pv. atrofaciens*, филогрупа 2b)

<sup>2)</sup> сој 7тк (блиско сродан *P. s. pv. syringae/aptata/atrofaciens/lapsa/japonica*, класификован у филогрупу 2b)

<sup>3)</sup> сој 36тк (дели *rpoD* секвенцу са *P. s. pv. lapsa/aptata*, класификован у филогрупу 2b)

<sup>4)</sup> сој 42тк (блиско сродан *P. s. pv. porri/striafaciens*, класификован у филогрупу 4)

<sup>5)</sup> сој 12тк (идентификован као *P. viridiflava*, филогрупа 7a).

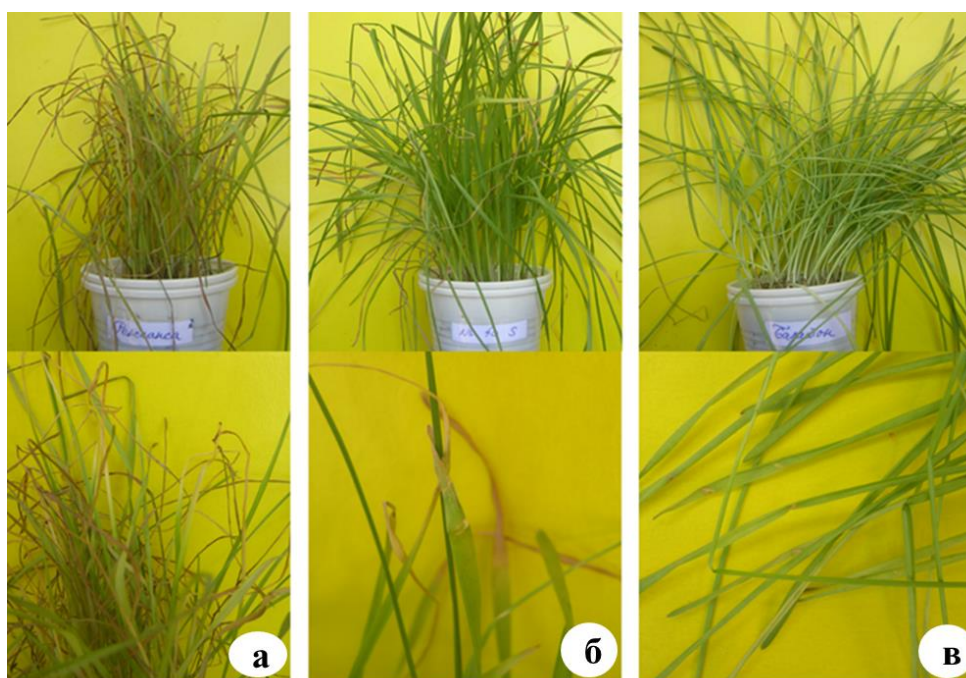


Слика 60. Инфекциони одговор сорти пшенице на сој 20тк (идентификован као *P. s. pv. atrofaciens*, филогрупа 2b), после 14 дана: сорте Европа 90 (оцена 3, а), НС 40 С (оцена 3, б, са мањим бројем листова са симптомима) и Араче (оцена 2, в, са малим бројем листова са симптомима)





**Слика 61.** Инфекциони одговор сорти пшенице на *сој 7тк* (блиско сродан *P. s. pv. syringae/aptata/atrofaciens/lapsa/japonica*, класификован у филогрупу 2b), после 14 дана: сорте Звездана (оцена 3, а), Рапсодија (оцена 2, б, са више заражених листова) и HC 40 C (оцена 2, в, са мање заражених листова)



**Слика 62.** Инфекциони одговор сорти пшенице на *сој 36тк* (дели *proD* секвенцу са *P. s. pv. lapsa/aptata*, класификован у филогрупу 2b), после 14 дана: сорте Ренесанса (оцена 3, а, са више заражених листова), HC 40 C (оцена 3, б, са мање заражених листова) и Balaton (оцена 2, в)



**Слика 63.** Инфекциони одговор сорти пшенице на сој *42тк* (блиско сродан *P. s. pv. porri/striaefaciens*, класификован у филогрупу 4), после 14 дана: сорте Ренесанса (оцена 3, а, са више заражених листова), Симонида (оцена 3, б, са мање заражених листова) и Valaton (оцена 1, в)



**Слика 64.** Инфекциони одговор сорти пшенице на сој *12 тк* (идентификован као *P. viridiflava* филогрупа 7а), после 14 дана: сорте Европа 90 (оцена 3, а) Победа (оцена 3, са мањим бројем заражених листова) и Valaton (оцена 2, в, са малим бројем заражених листова)



## 5.6.2. Сорте јечма

У табели 38 и на сликама 65-69 су приказани инфекциони одговори одабраних сорти јечма, оцењени према скали Sellam и Wilcoxson (1976).

Инфекциони одговор одабраних сорти јечма на сојеве *P. syringae* и *P. viridiflava* је уједначен (умерено осетљиве (оцена 2) и осетљиве (оцена 3) сорте). Пеге су се најпре појавиле на вршним деловима листа и шириле се наниже ка средини листа. За разлику од пшенице, у испитивањима инфекционог одговора сорти јечма није дошло до појаве сушења листова. Код неких сорти (НС 525, НС 565 и Гранд) око пега које су проузроковали сојеви 20тк, 7тк и 36тк, дошло је до појаве карактеристичног мркољубичастог до браон ореола. Појава ореолних пега није уочена код сорти Нониус и НС Марко, а благи и понеки тамнији браон ореол је уочен код сорте Нектариа.

Најосетљивије су биле сорте Нониус и НС 565 које су инфекциони одговор осетљиве сорте (оцена 3 - некротичне површине захватају више од 25% листа) испољиле скоро према свим сојевима, а најмање осетљиве сорте Нектариа и НС 525 које су инфекциони одговор умерено отпорних сорти (оцена 2 - некротичне површине различите величине са понеким спајањем, захваћено 10-15% површине листа) испољиле у односу на све одабране сојеве.

**Табела 38.** Инфекциони одговор одабраних сорти јечма

сорте	ОЦЕНА*				
	сој 20тк <sup>1)</sup>	сој 7тк <sup>2)</sup>	сој 36тк <sup>3)</sup>	сој 42тк <sup>4)</sup>	сој 12тк <sup>5)</sup>
Нектариа	2	2	2	2	2
Нониус	3	3	2	3	3
НС 525	2	2	2	2	2
НС 565	3	3	3	2	2
Гранд	3	3	2	2	3
НС Марко	2	3	3	2	2

\* скала за оцењивање према Sellam и Wilcoxson (1976): (0) Отпорна – нема ни пега ни трагова инфекције; (1) Умерено отпорна- мале пеге на око 5-10% површине листа; (2) Умерено осетљива-некротичне површине различите величине са понеким спајањем, захваћено 10-15% површине листа; (3) Осетљива- некротичне површине захватају више од 25% листа

<sup>1)</sup> сој 20тк (идентификован као *P. s. pv. atrofaciens*, филогрупа 2b)

<sup>2)</sup> сој 7тк (блиско сродан *P. s. pv. syringae/aptata/atrofaciens/lapsa/japonica*, класификован у филогрупу 2b)

<sup>3)</sup> сој 36тк (дели *rhoD* секвенцу са *P. s. pv. lapsa/aptata*, класификован у филогрупу 2b)

<sup>4)</sup> сој 42тк (блиско сродан *P. s. pv. porri/striafaciens*, класификован у филогрупу 4)

<sup>5)</sup> сој 12тк (идентификован као *P. viridiflava*, филогрупа 7a).





**Слика 65.** Инфекциони одговор сорти јечма на *сој 20тк* (идентификован као *P. s. pv. atrofaciens*, филогрупа 2b), после 7 дана: сорте Нониус (а) и НС 565 (б) (оцена 3); сорте НС 525 (в) и НС Марко (г) (оцена 2)



**Слика 66.** Инфекциони одговор сорти јечма на *сој 7тк* (блиско сродан *P. s. pv. syringae/aptata/atrofaciens/lapsa/japonica*, класификован у филогрупу 2b), после 7 дана: сорта Гранд (а) и сорта НС 565 (б) (оцена 3); сорта Нектариа (в) и НС 525 (г) (оцена 2)



**Слика 67.** Инфекциони одговор сорти јечма на *сој 36тк* (дели *groD* секвенцу са *P. s. pv. lapsa/aptata*, класификован у филогрупу 2b), после 7 дана: сорте НС 565 (а) и НС Марко (б) (оцена 3); сорте НС 525 (в) и Нониус (г) (оцена 2)



**Слика 68.** Инфекциони одговор сорти јечма на *сој 42тк* (блиско сродан *P. s. pv. porri/striafaciens*, класификован у филогрупу 4), после 7 дана: сорте Нониус (а) и Гранд (б) (оцена 3); сорта НС 525 (в) и сорта Нектариа (г) (оцена 2)





**Слика 69.** Инфекциони одговор сорти јечма на *сој 12тк* (идентификован као *P. viridiflava*, филогрупа 7а): сорте Нониус (а) и Гранд (б) (оцена 3) и сорте Нектариа (в) и НС 565 (г) (оцена 2)

## 6. ДИСКУСИЈА

*Разумевање значаја диверзитета патогена једне биљне врсте* је од фундаменталног значаја и за проучавање њихове епидемиологије и економског значаја, као и за осмишљавање циљаних и дуготрајних стратегија сузбијања болести. Резултати наших истраживања указују на то да је један од основних фактора који могу имати негативне последице за сагледавање диверзитета бактерија, проузроковача болести стрних жита превазиђеност појма патовара и то пре свега због неодрживости коришћења недовољно познатог спектра домаћина и фенотипских особина које немају диференцијални карактер, као унапред задатих карактеристика у складу са којима се дефинишу и начини и резултати истраживања у овој области. Поред овога, ограничавајући фактори су и уобичајени начин избора материјала у истраживањима, уобичајени начин диференцијације сојева бактерија применом LOPAT теста, слабо проучена и веома честа појава фенотипске конверзије представника рода *Pseudomonas*, као и изостанак разматрања синергистичких интеракција патогена који проузрокују болест, чему иде у прилог и уобичајени начин провере Кохових постулата. Оно што карактерише резултате истраживања дефинисане напред споменути ограничавајућим факторима је одабир само оних сојева који одговарају унапред задатим карактеристикама и одбацивање оних који не одговарају, што даље повлачи и погрешну слику о реалном диверзитету и погрешну поставку ионако малобројних епидемиолошких студија. Најновија истраживања епидемиологије патогена излазе из оквира сојева присутних у агроекосистему и фокус стављају на њихове метапопулације из спољашње средине, које представљају основ диверзификације сојева и настајања клонова одговорних за све чешће епидемије.

Развој и примена метода за добијање генетичких и филогенетских информација (упоређивање генетичке сличности, упоређивање са типским сојевима, утврђивање клонских веза и сродности) које омогућавају стављање проучаваних сојева како у контекст типских и референтних сојева из агроекосистема, тако и сојева из метапопулације спољашње средине пружа могућност за нове увиде и проширење до сада познатог диверзитета бактерија, патогена гајених биљака, укључујући и стрна жита, што потврђују и резултати наших истраживања.

Познато је да оно што ће бити резултат истраживања диверзитета патогена неке биљне врсте умногоме зависи од система тријаже, тачније од метода које се током процеса детекције и идентификације користе. Иако је значајан део дискусије посвећен

управо диференцијалним карактеристикама ових метода (укључујући и случајеве у којима уобичајено примењиване методе представљају уједно и ограничавајући фактор доласку до правих података о диверзитету бактерија као патогена једне биљне врсте), њихово разматрање започињемо дискусијом методе за проверу патогености, за коју се са сигурношћу може рећи да се не може заобићи, јер се за све добијене сојеве мора доказати и да су патогени.

**Провера патогености.** Патогеност неког соја се утврђује на основу инокулације чисте културе у биљку домаћина и интензитета развоја симптома, што искључује увид у могуће синергистичке интеракције које могу довести и до појаве интензивнијих симптома. У неким случајевима где је неки штетни организам могао проузроковати болест само у синергистичкој интеракцији са другим штетним организмом, Кохови постулати се не могу увек применити. У оваквим случајевима, само постојање комплекса микроорганизама који проузрокују болест указује на неопходност дефинисања новог Коховог постулата који узима у обзир и интеракције између микроорганизама које су у позитивној корелацији са појавом болести или интензитетом њене појаве.

Провери патогености проучаваних сојева и утврђивању инфекционог одговора претходило је дефинисање услова потребних за репродукцију симптома. За добијање типичног симптома приликом провере патогености потребно је дефинисати услове како у вези са биљкама (одговарајућа врста, сорта, ткиво и орган, одговарајућа фаза развоја и одговарајући услови спољашње средине), тако и у вези са бактеријама чија се патогеност утврђује (одређена концентрација бактеријске суспензије и начин остваривања инфекције сличан оном у природним условима, услове спољашње средине (температура, светлост, влага) који одговарају бактерији да би извршила инфекцију). Иста метода инокулације биљака је коришћена и у тестовима провере патогености и у тестовима утврђивања инфекционог одговора сорти пшенице и јечма на одабране сојеве бактерија, а њени основни параметри су дефинисани у прелиминарним истраживањима.

За проверу патогености у овом истраживању су коришћене биљне врсте, односно сорте из којих су изоловани проучавани сојеви, јер се подразумева да је на тај начин испољена и њихова осетљивост према овој групи патогена. Иако су подаци о осетљивости/отпорности ткива различитих биљних врста у различитим фазама развоја често опречни, а проучавани сојеви потичу и из различитих биљних органа различитих врста стрних жита, одређено је да се биљке током провере патогености инокулишу у

фази сејанаца старости 7-12 дана (у зависности од брзине пораста биљака), што је у складу са наводима да је осетљивост према бактеријама уско повезана са младим ткивима пшенице, овса и јечма, те да, како ткива постају старија, листови могу развити одређену отпорност која се испољава слабијим развојем симптома (Hagborg, 1974).

Као одговарајући поступак за инокулацију, који подсећа на остварење инфекције у природним условима, изабрано је потапање биљака у суспензију бактерија, којој је додат оквашивач (Силвет, у концентрацији 0.025%). Према наводима Hirano и Urrer (2000) и Lamichhane et al. (2015) овим бактеријама је за остварење инфекције потребан филм воде на површини биљног органа. Коришћење концентрације  $10^6$  cfu/ml проучаваних сојева је условило испољавање карактеристичних симптома код осетљивих сорти, што указује на погодност ове концентрације за ову врсту истраживања и у складу је са резултатима Smith и Mansfield (1981).

У нашим истраживањима утврђено је да су, поред одговарајуће биљке домаћина и осетљиве сорте, критични услови за остварење инфекције и појаву симптома примена одговарајуће концентрације бактеријске суспензије, примена оквашивача и константна влажност од преко 95% и то како пре, тако и после инокулације.

Најбржи развој карактеристичних симптома уочен је на јечму, овсу и ражи, већ после три до четири дана од инокулације, а најспорији на пшеници и тритикалеу (после 7-10 дана). Јечам је погодан домаћин за проверу патогености пре свега сојева из филогрупе 2b, јер брзо реагује појавом карактеристичних симптома. Симптом на овсу је једнако упечатљив као и на јечму, с том разликом што су листови овса осетљивији и брже долази до њиховог старења, па је у неким случајевима тешко утврдити да ли је сушење листа последица агресивног дејства патогена или природног старења. Најинтензивнији симптоми су они које су проузроковали сојеви 36тк (тритикале) и 37тк (раж), а могући разлози су вирулентност ових сојева који деле *rpoD* секвенцу *P. s. pv. lapsa* и *P. s. pv. aptata*, као и осетљивост сорти тритикалеа и ражи. Такође, могуће је и да агресивно прстеновање узаних листова ових биљних врста доприноси утиску јачег интензитета симптома.

Одступање од критичних услова за остварење инфекције, тј, примена ниже концентрације суспензије бактерија и изостанак константне изложености сејанаца условима високе (95%) влажности резултира одсуством појаве симптома на биљкама пшенице и 21 дан после инокулације. То се може објаснити појединачним или заједничким деловањем фактора као што су quorum sensing ефекат, утицај влаге на отварање стома и висок % силицијума у превлаци листова пшенице.

У нашим истраживањима је примећено и то да је у случајевима где су биљке пре инокулације повређиване сечењем врхова листова, дошло до развоја некроза искључиво око места пресецања, док појава пега и некротичних површина као на листовима који нису претходно повређени у потпуности изостаје. На основу овог запажања може се закључити да је повреда биљног ткива примарно место уласка ових бактерија, тј да се у присуству повреда бактерије усмеравају ка њима, а не ка природним отворима, за продор кроз које им је највероватније потребно више енергије.

У литератури се наводе још два начина диференцијације патовара *P. s. pv. syringae* и *P. s. pv. atrofaciens*, а то су појава карактеристичних "holcus spot" пега (пега са светлим центром и љубичастом маргином) на сирку и тест који наводи Toben (1989), а на основу којег је могуће одвојити сојеве са семена (*atrofaciens*) у односу на оне који нису (*syringae*), тако што *P. s. pv. syringae* изазива овај симптом, а *P. s. pv. atrofaciens* не. Ови тестови су примењени и у нашим истраживањима, али због варијабилности и неконзистентности добијених резултата у односу на наводе аутора (раздвајање патовара *syringae* и *atrofaciens* као патовара са семена и патовара са листа) нису приказани. Међутим, иако се на основу овога може закључити да представљена оригинална поставка аутора опредељује методе као непогодне за диференцијацију утврђеног диверзитета бактерија као патогена стрних жита у Србији, мишљења смо да је примена самих метода погодна, али да у даљим истраживањима треба порадити на томе у којим случајевима испољавање ових симптома има и диференцијални карактер. Наиме, већина сојева у оквиру филогрупе 2b реагују појавом "holcus spot" пега на 1-2 листа сирка и појавом тамних кругова око места убода на два до четири дана старим сејанцима пшенице и јечма. Сојеви из филогрупе 4 не стварају никакве симптоме на сирку, а сојеви идентификовани као *P. viridiflava* на сирку проузрокује црну трулеж око повреда, а уочава се и црна трулеж доњих делова стабла.

**Хетерогеност популације бактерија као патогена стрних жита у Србији.** Међу бактерије, до сада описане као патогене за стрна жита, спадају врсте/патовари родова *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Bacillus*, *Clavibacter*, *Erwinia* и *Pectobacterium*. У оквиру рода *Pseudomonas*, познатом диверзитету бактерија као патогена стрних жита припадају патовари који чине онај део *P. syringae* комплекса означен као *P. syringae sensu stricto* (*P. syringae* у ужем смислу или некадашња "збирна" врста, односно валидно описана врста *P. syringae* (Gardan et al., 1999): *P. s. pv. syringae*, *P. s. pv. atrofaciens*, *P. s. pv. japonica*, *P. s. pv. coronafaciens* и *P. s. pv. striafaciens*, од којих су на територији Србије забележени само *P. s. pv. coronafaciens* на овсу (Шутић, 1956) и *P. s.*



pv. *syringae* на пшеници (Арсенијевић, 1986; Арсенијевић и Балаж, 1986; Арсенијевић и Костић, 1989).

Од 55 проучаваних сојева бактерија, изолованих из различитих врста стрних жита, из више локалитета у Србији, у периоду од 2009-2014 године, 15 сојева је идентификовано као *P. s. pv. atrofaciens*, класификовано у геномоврсту 1, филогрупу 2b. Ово је први налаз *P. s. pv. atrofaciens* у Србији и то на различитим биљним деловима пшенице и јечма (лист, доњи део стабла, семе), овса (семе), ражи (лист), тритикалеа (лист) и кукуруза (лист). Шест сојева који деле *rpoD* секвенце са *P. s. pv. lapsa/aptata* и који су класификовани у филогрупу 2b, проузрокују симптоме на биљним врстама: пшеница (доњи део стабла), јечам (лист, семе), овас (лист), раж (лист) и тритикале (лист). Ни један од ова два патовара (*P. s. pv. aptata* и *P. s. pv. lapsa*) није до сада идентификован као патоген стрних жита у Србији, а такође и података о њиховој појави као патогена стрних жита у свету скоро да и нема. Пронађен је податак о првом налазу *P. s. pv. lapsa* као патогена пшенице у Ирану (Amanifar, 2019), код којег је ова идентификација урађена на основу основних биохемијских карактеристика и 98% сличности секвенце за *syrB* ген са овим секвенцама 3 соја *P. s. pv. lapsa* у Банци гена NCBI, док се *P. s. pv. aptata* као патоген стрних жита (пшенице) помиње само у условима вештачке инокулације (Morris et al., 2000).

Међу проучаваним сојевима, осам сојева је идентификовано као *P. viridiflava* и класификовано у геномоврсту 6, филогрупу 7a, док је сој 27тк класификован у филогрупу 8. Према нашим сазнањима, ово је први налаз *P. viridiflava* у свету на стрним житима уопште и то на овсу (лист), ражи (доњи део стабла, глава корена и коренчићи) и тритикалеу (лист, семе). У својим истраживањима генетичког диверзитета *Pseudomonas* сојева изолованих са стрних жита у Русији, Matveeva et al. (2008) су изоловали 5 оксидазно негативних сојева са пектолитичком активношћу за које су навели да су према LOPAT карактеристикама слични *P. viridiflava* које су описали Gonzalez et al, (2003), али ову констатацију није пратила даља идентификација. *P. viridiflava* испољава висок степен адаптације и као сапрофит и као патоген (Bartoli et al., 2014). Забележена је као патоген парадајза, блитве, и патлиџана (Goumans и Chatzaki, 1998; loc.cit. Bartoli et al., 2014), кивија (Conn and Gubler, 1993), пасуља и салате (Gonzalez et al., 2003), босиљка (Végh et al., 2012), различитих дивљих трава (Goss et al., 2005), *Arabidopsis thaliana* (Jackson et al., 1999; Goss et al., 2005) и других биљака (Lipps and Samac, 2022). Појава *P. viridiflava* као епифита, ендифита, сапрофита и патогена забележена је на различитим пољопривредним биљкама и

дивљим врстама биљака домаћина, а често је изолована и из извора који не спадају у пољопривредни екосистем (Bartoli et al., 2014). *P. viridiflava* спада у геномоврсту 6 (Gardan et al., 1999) којој одговара филогрупа 7 (Parkinson et al., 2011), док, према Berge et al. (2014), поред филогрупе 7, *P. viridiflava* чини и филогрупа 8, са којом заједно формира монофилетски кластер у филогенетском стаблу *P. syringae* комплекса.

На основу секвенци 578bp локуса *rpoD* гена, одређени број сојева се није могао идентификовати као један од познатих патовара, али су дефинисани као блиско сродни (99%) одређеним патоварима и класификовани у филогрупе 2b и 2d, 4 и 8. Тако 10 сојева који су сродни са *P. s. pv. syringae/aptata/atrofaciens/lapsa/japonica* и класификовани у исту филогрупу 2b, проузрокује симптоме на биљним врстама: јечам (лист, семе), овас (семе), тритикале (лист, доњи део стабла), дурум (лист) и кукуруз (лист).

Од два соја класификована у филогрупу 2d, сој 1тк је блиско сродан *P. s. pv. coryli* и проузрокује симптоме на овсу (лист), а сој 17тк је блиско сродан *P. s. pv. aceris/P. s. pv. solidagae* и проузрокује симптоме на доњем делу стабла пшенице. Према нашим сазнањима, ни један од поменутих патовара није до сада идентификован као патоген стрних жита у свету. Основне карактеристике сојева *P. s. pv. coryli* изолованих са лешника наводе Scortichini et al. (2005), а његову припадност геномоврсти 1 наводе Loreti et al. (2008). *P. s. pv. solidagae* је један од новијих *P. syringae* патовара, изолован са биљака коровске врсте *Solidago altissima* L. чији су назив предложили Sato et al. (2001). Као најближи, али не и идентични сојевима *P. s. pv. aceris* и *P. s. pv. solidagae* у оквиру геномоврсте 1 (Bull et al., 2011) забележен су и сојеви флуоресцентних бактерија изоловани из лисних пега лубенице (стаклара) и диње (поље) (Rubio et al., 2012), као и из симптома који нису претходно забележени на биљкама црвене малине (*Rubus idaeus* var. *strigosus*) (Koike et al., 2014).

Три соја који су блиско сродни *P. s. pv. coronafaciens/oryzae*, проузрокују симптоме на овсу и ражи (семе) и девет сојева блиско сродних *P. s. pv. porri/striafaciens* проузрокују симптоме на овсу (лист, стабло) и ражи (лист) и класификовани су у филогрупу 4. Ово је први налаз патовара из филогрупе 4 на ражи у Србији, док су на овсу такође први пут у Србији пронађени и патовари *P. s. pv. porri* и *P. s. pv. striafaciens*.

На основу резултата наших истраживања, познати диверзитет бактерија као патогена стрних жита се проширује на нове патоваре у оквиру *P. syringae sensu stricto* и

на нову врсту (*P. viridiflava*) у оквиру *P. syringae sensu lato* (*P. syringae* у ширем смислу (Bull et al., 2011) или *P. syringae* филогенетски комплекс (Parkinson et al., 2011; Berge et al., 2014) или *P. syringae* комплекс врста (Bartoli et al., 2014; Lamichhane et al., 2015).

**Диференцијални значај симптома.** Препознавање симптома је почетни корак у постављању одговарајуће дијагнозе, те њихово непознавање може да доведе до читавог низа проблема, укључујући и потцењивање штета које настају услед присуства патогена. Доступност литературних података, а нарочито разноврсних фотографија у вези са симптомима које бактерије проузрокују на стрним житима је оскудна, те подаци о биљним врстама и деловима биљака на којима су проучавани сојеви проузроковали симптоме (наведени у првом делу дискусије), као и опис и фотографије ових симптома приказани у поглављу 5. (Резултати, сл. 6-17) могу да послуже као допринос оскудним литературним подацима и фото галеријама у вези са симптомима ове групе патогена.

Уочено је да међу сојевима класификованим у филогрупу 2b симптоме јачег интензитета проузрокују неки од сојева који деле *rpoD* секвенцу са *P. s. pv. lapsa/aptata* и сојеви блиско сродни *P. s. pv. syringae/aptata/atrofaciens/lapsa/japonica*, него сојеви идентификовани као *P. s. pv. atrofaciens*. Интензивније некрозе настају спајањем пега и захватају већу површину листа, а унутар неких долази до цепања листових дуж нерава, тако да је лист често раздвојен на уздужне траке. Сојеви класификовани у филогрупу 2d, блиско сродни *P.s. pv coryli* и *P. s. pv. aceris/P. s. pv. solidagae* проузрокују симптоме слабијег интензитета у поређењу са симптомима које проузрокују сојеви класификовани у филогрупу 2b. Иако се почетни развој симптома на листовима у облику малих пега које окружују стеме може уочити на озимим усевима већ у рано пролеће, на почетку вегетације, карактеристични симптоми спајања некротичних површина и појаве тамних светлијих и тамнијих ореола око некроза се најбоље уочава непосредно пред или у време класања и то после обилнијих киша, те је ово и најбољи период за узимање узорака са карактеристичним симптомима који се због разлика у фенофазама биљних врста прво најбоље уочавају на биљкама јечма, а после и на осталим стрним житима. Временски период у коме се могу узети добри узорци листових јечма је због вегетације саме биљне врсте веома кратак. Симптоми на класу се најбоље уочавају у периоду воштане зрелости. Симптом на семену се испољава и као појава карактеристичних тамнијих површина на доњој трећини семена, посебно добро видљивих са унутрашње стране плева и као појава смежураних, тамнијих и штурних зрна. Ови резултати су у сагласности са наводима бројних аутора

(Toben, 1989; Diekmann and Putter, 1995; Duveiller et al., 1997; Afonin et al., 2008; Пасичник et al., 2011).

Код сојева блиско сродних *P. s. pv. coronafaciens/oryzae/porri/striafaciens*, класификованих у филогрупу 4 се уочава присуство читавог спектра симптома који се испољавају и као јасне, округле пеге по којима је *P. s. pv. coronafaciens* добио назив и као некротичне површине недефинисаног облика или некротичне површине које се визуелно "сливају" низ лист и које су карактеристичне за *P. s. pv. striafaciens*. На разноликост симптома које проузрокују сојеви представника филогрупе 4 указали су и Cunfer и Schaad (1976), Cunfer et al. (1978), као и Barta и Willis (2005).

Симптоми проучаваних сојева идентификованих као *P. viridiflava* су се на доњем делу стабла, глави корена и коренчићима ражи испољавали као симптоми типичне трулежи стабла, карактеристичне за *P. viridiflava*. На листовима овса, симптом из којег су изоловани сојеви 27тк (идентификован као *P. viridiflava*, филогрупа 8) и 31тк (дели *rpoD* секвенцу са *P. s. pv. aptata/lapsa*) карактерише појава интензивних некроза око веома истањених и исцепаних површина које окружују лисне нерве. Иако је у нашем истраживању уочено да сојеви који деле *rpoD* секвенцу са *P. s. pv. lapsa aptata* на биљкама изазивају симптоме јачег интензитета од других утврђених патогена стрних жита, у овом случају описани симптом који одликује високи интензитет некрозе може бити резултат синергистичког деловања ова два соја. Изражени потенцијал за синергистичко деловање *P. viridiflava* наводе Lamichane и Venturi (2015) и Lipps и Samac (2022).

Иако постоје разлике у интензитету испољених симптома између сојева који спадајају у филогрупу 2 (на пример јачи интензитет симптома које испољавају сојеви деле *rpoD* секвенцу са *P. s. pv. lapsa/aptata* у односу на сојеве идентификоване као *P. s. pv. atrofaciens*), а и неки од симптома које на овсу и ражи проузрокују сојеви из филогрупе 4 (попут некротичних површина које се визуелно "сливају" низ лист и које су карактеристичне за *P. s. pv. striafaciens*) могу имати и диференцијални карактер, ипак се не може рећи да су симптоми поуздан критеријум за постављање дијагнозе. У овој фази истраживања није могуће са сигурношћу констатовати да ли су уочене разлике у интензитету симптома последица разлика у осетљивости биљних врста и сорта или разлика у вирулентности проучаваних сојева.

**Диференцијални карактер различитих типова колонија и појава фазне варијације фенотипа или фенотипске конверзије.** Приликом изолације фитопатогених бактерија рода *Pseudomonas*, главни изазов је раздвојити потенцијалног

патогена од превалентних их сапрофита из спољашње средине који га приликом изолације прате на подлози и чије су колоније понекад веома сличне колонијама патогена. У прелиминарним истраживањима је утврђено да је модификована Кингова подлога Б довољно селективна за сапрофите и да на њој долази до развоја циљаних бактерија (Morris et al., 2007, 2008), па је изабрана за изолацију патогена из биљних ткива у даљим истраживањима.

У нашим истраживањима, сојеве патогена је било лакше издвојити из надземних делова биљака и из биљних ткива где је у вишој концентрацији (стадијум максималног развоја симптома) него из корена и биљних делова где је у у нижој концентрацији.

Иако се колоније на модификованој Кинговој подлози Б уочавају већ после 24 до 36 часова, карактеристичан изглед на основу којег је могуће проценити да се ради о колонијама представника рода *Pseudomonas*, добијају између 48-72 часа од засејавања, што је у складу са наводима Sellam и Willcoxson (1976), Peters et al. (1983) и Mohan и Schaad (1987).

**Tun 1 u tun 2** колонија стварају проучавани сојеви класификовани у филогрупе 2 и 4. **Tun 1** колонија (слика 20) стварају сви сојеви филогрупе 2b, сој 17тк из филогрупе 2d, као и неколико сојева из филогрупе 4. У зависности од количине слузасте материје коју стварају, колоније могу имати мање или више слузаст изглед – примећено је да мање слузасте колоније стварају сојеви *P. s. pv. atrofaciens* и неколико сојева (5тк, 38тк, 41тк и 47тк) блиско сродних *P. s. pv. syringae/aptata/atrofaciens/lapsa/japonica*, као и неки (16тк, 44тк, 33тк, 34тк, 35тк) од блиско сродних сојева *P. s. pv. porri/striafaciens*, класификованих у филогрупу 4. Колоније са више слузасте материје стварају преостали сојеви блиско сродни *P. s. pv. syringae/aptata/atrofaciens/lapsa/japonica* и сојеви који деле *rpoD* секвенцу *P. s. pv. lapsa/aptata*, класификовани у филогрупу 2b. Изглед слузасте капи беле боје припада соју 17тк који је блиско сродан *P. s. pv. aceris/solidagae* и класификован у филогрупу 2d. **Tun 2** колонија (слика 21) ствара сој 1тк, блиско сродан *P. s. pv. coryli* и класификован у филогрупу 2d и преостали сојеви (39тк, 40тк, 42тк и 43тк) блиско сродни *P. s. pv. porri/striafaciens* и сојеви (48тк, 53тк и 55тк) блиско сродни *P. s. pv. coronafaciens/oryzae*, класификовани у филогрупу 4. Могући разлог због којег сојеви 5тк, 38тк, 41тк и 47тк имају тип мање слузасте, а не више слузасте колоније као остали сојеви блиско сродни *P. s. pv. syringae/aptata/atrofaciens/lapsa/japonica* је њихова потенцијална припадност патовару *atrofaciens*. Слично важи и за различитост типова колонија у оквиру филогрупе 4.

**Tun 3** колонија стварају сојеви идентификовани као *P. viridiflava* и класификовани у филогрупе 7а и 8. На модификованој Кинговој подлози Б се уочава полиморфизам колонија, тако да се појављују и колоније које су светло зелене и пљоснате (сојеви 8тк, 11тк, 51тк) и колоније које су жуте, испупчене и са мање (27тк) или више (56тк) слузасте материје (слика 22), а код неких изолата (на пример 9тк, слика 23) се уочава појава оба типа колонија, што је у складу са наводима Bartoli et al. (2014) који појаву оваква два типа колонија код *P. viridiflava* називају фазном варијацијом фенотипа.

Развој две врсте колонија истог соја бактерија (једна је пљосната, светлије зелена и више провидна, а друга је испупченија, мукоидна и непровидна) на модификованој Кинговој подлози Б се запажа као стабилна карактеристика и код неких сојева класификованих у филогрупу 2, као што су сојеви 37тк и 41тк (слика 21). Постојање различитих морфолошких типова код колонија истог соја *Pseudomonas* образлажу и Barta и Willis (2005) у вези са 2 различита типа колонија *P. s. pv. striafaciens* и *P. s. pv. garcae*. Због оскудних литературних података потребна су додатна истраживања којима би се могло утврдити да ли је ова појава иста врста фазне варијације фенотипа као код *P. viridiflava*. Такође, примећено је да проучавани сојеви пореклом са овса и ражи (класификовани у филогрупу 4) у неким пресејавањима стварају мрки пигмент (слика 21), што је у складу са наводима Schaad и Cunfer (1979) који су утврдили да сојеви *P. s. pv. coronafaciens* и *P. s. pv. striafaciens* стварају мрки пигмент меланин.

Услови-узрок појаве. Појава и опис фазне варијације фенотипа или фенотипске конверзије уочене код неких од проучаваних сојева у овом истраживању се слажу са наводима Gadewar et al. (1993), Denny et al. (1993), Yakovleva et al. (2002), Konovalova (loc.cit. Yakovleva et al., 2002), Barta и Wilis (2005) и Bartoli et al. (2014). За фазну варијацију фенотипа се сматрало да је средство бактерије да регулише патогеност преко избегавања одговора домаћина (Dubnau and Losick, 2006). Међутим, према наводима Bartoli et al. (2014) фазна варијација код *P. viridiflava* мења фенотипске особине као што су покретљивост, стварање капсуларног материјала и метаболички капацитети, а такође може допринети и преживљавању у сапрофитној фази и умножавању. Код *P. viridiflava* мукоидни варијетети могу имати предност у погледу патогености јер егзополисахариди које стварају ови варијетети могу повећати толерантност на одбрамбене механизме биљке и зато јер пектолитичка способност мукоидних варијетета може имати важну улогу у ослобађању шећера који олакшава процес колонизације биљака.

Због значаја који *R. solanacearum* има у фитосанитарној регулативи, најчешће проучавана је управо фенотипска конверзија колонија ове бактерије која се, према

Denny et al. (1993) препознаје по томе што су колоније ове бактерије на TTZ агару округле, тамно црвене или скоро бордо боје, што је у супротности са родитељским колонијама које су нерегуларног облика, мукоидне, розе и/или беле. Још пре 6 деценија је утврђено да *R. solanacearum* спонтано прелази из мукоидне у немуктоидну форму колонија, што за собом повлачи губитак способности проузроковања увелости биљака, али не и њихов даљи развој у биљкама и проузроковање симптома болести као што су патуљавост, некроза стабла, пролиферација адвентивних коренова (Denny and Baek, 1991; Denny et al., 1988; Husain и Kelman, 1958; loc. cit. Denny et al., 1988). До преласка једне форме колонија *R. solanacearum* у другу долази у различитим условима. У лабораторији то може бити продужено гајење и засејавање на подлози, а у природи боравак у увелим биљкама (Denny et al., 1993). До умањеног стварања егзополисахарида као узрока промене боје колонија настаје услед редукције у транскрипцији гена који кодирају стварање фактора вирулентности, а не услед мутације или брисања ових гена, што показује да *R. solanacearum* може да контролише своју вирулентност и у одређеним условима фаворизује стварање више или мање вирулентних типова колонија. Ово реверзибилно пребацивање између слабо и високо вирулентног типа колонија настаје делимично и као одговор на густину ћелија, јер појединачне колоније кооперативно делују и сазревају раније ако је густина колонија већа.

Колоније грубог типа. Осим појаве колонија различитих морфолошких карактеристика у оквиру истог соја, приликом гајења култура проучаваних сојева у нашим истраживањима на неселективним подлогама попут Кингове подлоге Б, у оквиру колонија глатког типа примећена је и појава колонија или сектора колонија грубог типа, што је према наводима Otta (1976) повезано са стварањем филаментозних ћелија дужине 0.8 до 176  $\mu\text{m}$  (максимална дужина ћелија код глатког типа је 4  $\mu\text{m}$ ). Такође, до појаве грубих колонија је долазило и приликом гајења колонија преузетих после изолације са модификоване Кингове подлоге Б на неселективној хранљивој подлози NA. Могући фактор стварања колонија грубог типа на Кинговој подлози може бити висока концентрација магнезијума (Otta, 1976) који је есенцијалан за нормалну деобу ћелија бактерија у комплексним подлогама, те се она у условима његовог недостатка или сувишка инхибира и могу настати филаментозне ћелије (Webb, 1954).

Диференцијација помоћу LOPAT карактеристика. Сви проучавани сојеви из овог истраживања класификовани у филогрупу 2b и филогрупу 4 припадају LOPAT Ia групи (L[+],O[-],P[-],A[-],T[+]), што је у корелацији са наводима Арсенијевић (1997), Schaad



et al. (2001) и Berge et al. (2014). До испољавања варијабилне хиперсензитивне реакције дувана сојева 39тк, 40тк, 42тк, 43тк и 45тк долази највероватније услед пресејавања, јер су у процесу тријаже сви проучавани сојеви изабрани на основу позитивне ХР дувана.

Сој 1тк блиско сродан *P. s. pv. coryli*, класификован у 2d филогрупу, према нашим резултатима припада LOPAT Ib групи (L[-],O[-],P[-],A[-],T[+]), што је супротно наводима Schorticcini et al. (2005) који кажу да сој изолован са лешника и идентификован као *P. s. pv. coryli* припада LOPAT Ia групи. Сој 17тк блиско сродан *P. s. pv. aceris/solidagae*, класификован у филогрупу 2d такође припада LOPAT Ia групи, што се слаже са наводима аутора Koike et al. (2014) да сој бактерије изолован са малине у Калифорнији који је на основу MLSA анализе најближи *P. s. pv. aceris* и *P. s. pv. solidagae* има карактеристике LOPAT Ia групе, док Sato et al. (2001) наводе да *P. s. pv. solidagae*, изолован са коровске врсте *Solidagae altissima* припада LOPAT Ib групи.

Код сојева идентификованих као *P. viridiflava* (8тк, 9тк, 10тк, 11тк, 12тк, 13/14тк, 27тк, 51тк и 56тк) се према познатој шеми не може са сигурношћу одредити LOPAT група, јер позитивне реакције стварања левана, пектолитичку активност на кришкама кромпира и хиперсензитивну реакцију дувана испољавају само понекад (варијабилно).

Имајући у виду да су према резултатима гер-PCR сојеви 8тк и 9тк генетички идентични, као и сојеви 10тк и 11тк, а да су морфолошки сличне колоније 8тк и 10тк (светло зелене, прозирне, пљоснате) и 9тк и 11тк (мукоидне, жуте колоније), може се закључити да се ради о фазној варијацији фенотипа сојева *P. viridiflava*, тј да су сојеви 8тк и 10тк немукоидни, а сојеви 9тк и 11тк мукоидни типови истих колонија. Ово је у складу са наводима Bartoli et al. (2014) који кажу да колоније различитог фенотипа имају исти генетички профил, а њихову фазну варијацију фенотипа потврђује и њихова реакција у LOPAT тесту. Међутим, резултати наших истраживања указују на то да становиште (Bartoli et al., 2014, 2015; Lipps and Samac, 2022), да постоје 2 врсте колонија жута, мукоидна, леван позитивна форма и провидна, равна леван негативна форма колоније, чије су и друге карактеристике попут пектолитичке активности и патогене способности тако јасно подељене на ове две форме колонија (немукоидне не стварају леван, немају пектолитичку способност и не испољавају патогеност) није до краја одржива. Наиме, примећено је да код пресејавања немукоидна форма углавном остаје таква и њене карактеристике углавном подржавају ово становиште, али и то да слузаста форма (на пример сој 9тк, слика 23) често испољава полиморфизам, то јест да се у Петри кутијама могу наћи обе форме ове бактерије, те да углавном мукоидни

сојеви имају варијабилну реакцију левана, трулежи кромпира и ХР дувана. Ово указује на постојање бар две могућности – да постоји механизам који једну форму претвара у другу, или да мукоидни тип вероватно у себи садрже и немуктоидни тип који се због велике количине мукоидне материје тешко издваја при пресејавању и пречишћавању сојева, али доприноси испољавању варијабилних фенотипских карактеристика.

Ови резултати наших истраживања су у складу са резултатима Bartoli et al. (2014) који наводе да на изражену фенотипску хетерогеност сојева филогрупе 7 и 8 утиче скоро универзална појава фазне варијације фенотипа која утиче на испољавање разних својстава, укључујући и стварање левана, проузроковање трулежи кромпира и ХР дувана, као и порекло сојева. Исти аутори су утврдили да од укупно 59 сојева *P. viridiflava* изолованих из различитих станишта, само 37% сојева показује LOPAT профил типичан за *P. viridiflava* (одсуство стварања левана, изазивања трулежи кромпира и позитивне ХР дувана), 56% сојева ствара леван, 8% сојева нема способност проузроковања трулежи кромпира од којих је 2 соја припадало филогрупи 7, а три филогрупи 8, док је 27% сојева константно негативно, а 18% варијабилно у односу на ХР дувана.

Gonzalez et al. (2003) описују појаву сојева *P. viridiflava* са атипичним LOPAT профилем као нови тип *P. viridiflava* који је тада по први пут у свету описан као патоген биљака и то веома агресиван патоген 3 значајне гајене врсте (пасуљ, киви, салата) у Шпанији. Из чињенице да ове сојеве означавају као "атипичне" се види да ови аутори нису разматрали појам фазне варијације фенотипа код *P. viridiflava*, али се из описаних карактеристика ових сојева по питању стварања левана, трулежи кромпира и ХР дувана уочава да је овде реч управо о типовима колонија у фазној варијацији фенотипа. Ови аутори наводе да атипични сојеви на подлози богатој сахарозом стварају конвексне колоније са некарактеристичним жућкастим мукоидним материјалом који није детектован на подлогама које немају сахарозу, а да је њихова пектолитичка активност мања од оне коју показују референтни сојеви типичних *P. viridiflava*. Такође, карактеристика ових сојева је и та да способност изазивања хиперсензитивне реакције дувана, као и жути мукус могу изгубити после низа пресејавања сојева, али се ова својства увек враћају после инокулације биљке домаћина и поновне реизолације. Према овим ауторима остаје нејасно да ли су леван негативни *P. viridiflava* сојеви у скорије време добили способност стварања егзополисахарида на подлози од сахарозе као допринос виталности своје епифитне фазе или чак и као фактор вирулентности или су до сада због лоше лабораторијске интерпретације резултата теста стварања левана неки *P. viridiflava* завршили као *P. syringae*.

Имајући у виду да се, после изолације и детекције, даља идентификација до врсте код флуоресцентних представника рода *Pseudomonas* углавном заснива на утврђивању LOPAT карактеристика (Lelliot et al, 1966), као и чињеницу да у нашим истраживањима код одређеног броја сојева *P. viridiflava* ни једна од поменутих карактеристика (стварање левана, способност изазивања трулежи кромпира, изазивање хиперсензитивне реакције дувана) није у складу са до сада употребљаваном LOPAT шемом, закључујемо да се коришћење ове шеме као традиционалног дијагностичког средства доводи у питање, барем у случају деференцијације *P. viridiflava* до нивоа врсте, што потврђују и резултати Gonzalez et al. (2003) и Bartoli et al. (2014).

**Анализа биохемијско-физиолошких одлика.** Резултати наших истраживања потврђују наводе бројних аутора да биохемијско-физиолошке карактеристике нису поуздан критеријум за раздвајање патовара у оквиру филогрупе 2b. Помоћу њих није било могуће извршити ни диференцијацију патовара проузроковача болести стрних жита из различитих филогрупа (2 и 4). Према наводима Schaad (1979), ни сви сојеви истог организма не дају исте резултате у овим тестовима, што је потврђено и у нашим истраживањима.

Сви проучавани сојеви хидролизују ескулин и разлажу глукозу у аеробним условима, а не разлажу скроб и не редукују нитрате, што је у складу са подацима Bergey и Holt (1994), Schaad et al. (2001), Sarris et al. (2012) и Berge et al. (2014).

Већина проучаваних сојева користи манитол, сорбитол, инозитол и еритритол, што одговара наводима Bergey и Holt (1994), Schaad et al. (2001), Sarris et al. (2012). Изузетак су сојеви *P. viridiflava* 27тк и 56тк који не користе сорбитол и инозитол (27тк) и еритритол (56тк), супротно од навода Sarris et al. (2012) да *P. viridiflava* користи ова С једињења.

Хидролиза желатина спада у високо варијабилне тестове који нису одговарајући за шеме идентификације јер не дају поновљиве резултате (Otta and English, 1971; Bergey and Holt, 1994). С обзиром да је сама активност хидролизе желатина понекад јако спора, до делимичног разлагања желатина долази и после 7 и више дана инкубације и не може се повући јасна граница између сојева који разлажу и не разлажу желатин (Bergey and Holt, 1994). Чак се ни резултати разлагања желатина у случају типског (NCPPB 281) и референтног соја (NCPPB 2842) *P. syringae* не слажу са резултатима из табеле 7. Такође, резултати проучаваних сојева су разнолики, тако да чак и сојеви са идентичним генетичким профилима попут 8тк и 9тк имају различите резултате разлагања желатина. Међу сојевима идентификованим или блиско сродним са неким

од патовара *P. syringae* који спадају у филогрупу 2b има и оних који разлажу желатин у периоду до 4 дана и оних који испољавају одложеноу реакцију разлагања, али и сојева који желатин не разлажу ни после 21 дан. Међу сојевима који су класификовани у филогрупу 4 нема сојева који разлажу желатин у периоду до 4 дана, али га разлажу у одложеним реакцијама или га не разлажу ни после 21 дан. Код одређеног броја сојева из филогрупа 2 и 4, укључујући и сојеве 1тк и 17тк који су као блиско сродни *P. s. pv. coryli* и *P. s. pv. aceris/solidagae* класификовани у филогрупу 2d долази до варијабилне реакције у два понављања истог теста. У првом понављању разлажу, док у другом не разлажу желатин и обратно. Најстабилније карактеристике у разлагању желатина испољавају сојеви идентификовани као *P. viridiflava* и класификовани у 7a и 8 филогрупе који већином разлажу желатин у периоду до 4 дана, што одговара наводима Bergey и Holt (1994) и Sarris et al. (2012), док сојеви 51тк и 13/14тк разлажу желатин у одложеној реакцији, а само сој 8тк није разложио желатин ни после 21 дан.

Што се тиче коришћења угљеникових једињења, јасна реакција стварања базе из Д-винске киселине (тартарата), која се испољава плавом бојом подлоге, уочена је само код сојева *P. viridiflava* 8тк, 9тк, 10тк, 11тк, 12тк, 13/14тк и 27тк, док су сојеви 7тк и 17тк испољили јасну негативну реакцију, која се испољава зеленом бојом подлоге. Коришћење Д (-) тартарата од стране *P. viridiflava* потврђују и Bergey и Holt (1994), Sarris et al. (2012) и Berge et al. (2014). Код осталих проучаваних сојева делимична промена боје подлоге из зелене у плаву се не може са сигурношћу означити ни као позитивна ни као негативна реакција, из чега проистиче да овај метод није одговарајући за утврђивање коришћења Д (-) тартарата од стране припаданика *P. syringae* комплекса, класификованих у филогрупе 2b и 2d, као и у филогрупу 4. Јасна реакција стварања базе из Д-хининске киселине која се испољава појавом плаве боје подлоге испољена је код сојева 8тк, 9тк, 16тк, 25тк, 26тк, 30тк и 33тк и контролних сојева *P. s. pv. syringae* (NCPPB 281) и *P. s. pv. japonica* (NCPPB 3093), док је само контролни сој *P. fuscovaginae* (NCPPB 3732) испољио јасну негативну реакцију. Код свих осталих контролних и проучаваних сојева дошло је до делимичне промене боје подлоге из зелене у плаву тако да се овај резултат не може са сигурношћу означити ни као позитивна ни као негативна реакција. С обзиром да Cintas et al. (2002) метод утврђивања коришћења Д (-) тартарата и других извора угљеникових једињења путем развоја бактерија на подлози која их садржи наводе као ефикасан тест за разликовање *P. s. pv. coronafaciens*, *P. s. pv. syringae* и *P. s. pv. maculicola*, у будућа истраживања биохемијско-физиолошких карактеристика сојева бактерија, патогена стрних жита, треба укључити овај тест.

Међу сојевима идентификованим или блиско сродним са неким од патовара *P. syringae* који спадају у филогрупу 2b, сојеви **стварају честице леда** моментално или у одложеној реакцији, а има и сојева који не стварају честице леда. Сојеви 1тк и 17тк који су као блиско сродни *P. s. pv. coryli* и *P. s. pv. aceris/solidagae*, класификовани у филогрупу 2d стварају честице леда. Ове резултате потврђују и Berge et al. (2014) према којима већина (85%) сојева филогрупе 2 ствара честице леда. Сви сојеви класификовани у филогрупу 4 стварају честице леда, како наводе и Berge et al. (2014). Неки сојеви (9тк, 10тк, 12тк) идентификовани као *P. viridiflava* и класификовани у 7a филогрупу стварају честице леда у одложеној реакцији, док неки сојеви (8тк, 11тк, 13/14тк, 51тк и 56 тк) не стварају честице леда. Према Berge et al. (2014) више од половине сојева (67%) филогрупе 7a не ствара честице леда. Супротно наводима истих аутора да сојеви филогрупе 8 не стварају честице леда, проучавани сој 27тк класификован у ову филогрупу их ствара.

Mittelstadt и Rudolph (1998) су утврдили да сојеви *P. s. pv. syringae* са листова житарица у већем проценту стварају честице леда него сојеви *P. s. pv. atrofaciens*, из чега се може закључити да је ово чешћа карактеристика сојева *P. s. pv. syringae* који теже остварују инфекцију и не стварају дефинисане лезије на листовима житарица него сојева *P. s. pv. atrofaciens* који их стварају и лакше проузрокују болест (Toben et al., 1991; von Kietzell и Rudolph, 1997). С обзиром да су бактерије које стварају честице леда углавном становници филосфере, ова карактеристика највероватније има позитиван утицај на степен колонизације лисне површине, јер је епифитним бактеријама које не могу да изврше инфекцију ткива путем неких од специфичних патогених принципа потребан други механизам отпуштања биљних хранљивих материја из биљке, што може бити и цурење супстанци које проузрокују краткотрајни и мразеви средње дужине.

**Стварање токсина** је добра полазна основа за диференцијацију различитих геномоврста/филогрупа, наравно уколико их проучавани сојеви уопште и стварају. Новији литературни подаци указују на то да сојеви могу, али не морају да стварају токсине, а патогеност ових сојева не зависи од присуства токсина.

Сви проучавани сојеви идентификовани или блиско сродни са неким од *P. syringae* патовара који спадају у филогрупу 2b стварају сирингомицин, као и сој 17тк који је блиско сродан са *P. s. pv. aceris/solidagae* и класификован у филогрупу 2d. Сој 1тк који је као блиско сродан *P. s. pv. coryli* такође класификован у филогрупу 2d не ствара сирингомицин. Ни један од ових сојева не ствара коронатин. Ови резултати потврђују наводе Bender et al. (1999) који кажу да сирингомицин стварају патовари

*syringae*, *aptata* и *atrofaciens*, као и наводе Hwang et al. (2005). Такође, према Berge et al. (2014) 90% сојева филогрупе 2 ствара сирингомицин, док и већина проучаваних сојева у нашим истраживањима ствара сирингомицин и припада филогрупи 2, али је њихово даље раздвајање у оквиру ове филогрупе на основу присуства/одсуства токсина немогуће. Према наводима истих аутора сојеви ове филогрупе, поред сојева филогрупе 10 имају најмање T3SS ефектор гена, али са друге стране имају бројне гене за фитотоксине као што су сиринголин, сирингопептин и сирингомицин. Такође, сој *P. s. pv. striafaciens* (NCPPB 1898) је у нашим истраживањима испољио неуобичајену карактеристику стварања сирингомицина, што доводи у сумњу аутентичност соја и отвара могућност његове контаминације или погрешне идентификације.

Проучавани сојеви класификовани у филогрупу 4 не стварају ни сирингомицин, ни коронатин, што је у складу са наводима Bender et al. (1999) и Berge et al. (2014). Међутим, супротан овим налазима је резултат нашег истраживања у коме је код патотипског соја *P. s. pv. coronafaciens* (NCPPB 600) утврђено присуство *Cfl* гена који учествује у синтези коронатина, што се слаже са наводима из табеле 5 (Bull, персонална комуникација) да *P. s. pv. coronafaciens* може и не мора стварати коронатин.

Сојеви идентификовани као *P. viridiflava* и класификовани у 7a филогрупу не стварају ни сирингомицин ни коронатин што је такође у складу са наводима у литератури (Berge et al. 2014) где није утврђено да сојеви филогрупе 7a стварају токсине, док сојеви филогрупе 8 стварају широк опсег токсина. Сој 27тк класификован у филогрупу 8 је био негативан у PCR тесту на присуство *syrB1* гена. Bartoli et al. (2014) наводе да су сојеви филогрупе 8 позитивни у биотесту стварања сирингомицина, али су у PCR били позитивни само на присуство *syrB2*, а не и на присуство *syrB1* и *syrC* гена.

Услед чињенице да још увек не постоји сагласност око њиховог укупног значаја у патогенези (Hwang et al., 2005), фитопатолози су као критеријуме за проучавање повезаности токсина са болестима биљака дефинисали изазивање симптома на биљкама пречишћеним токсинима, корелацију између количине створеног токсина и патогености, стварање токсина током активног пораста у биљци и редуковање или недостатак вирулентности код сојева који не производе токсине, па су ово ипотенцијални правци даљих истраживања у овој области.

**Диференцијација помоћу гер-PCR отиска.** За детаљније утврђивање сродности сојева једне филогрупе, користе се технике стварања генетичких профила попут гер-

PCR методе (Gutiérrez-Barranquero et al., 2013), због чега је ова техника коришћена и у нашим истраживањима. За наша истраживања су одабрани REP прајмери, јер истраживања истих аутора указују да су у утврђивању генетичког диверзитета неких патовара *P. syringae* (*P. s. pv. phaseolicola*, *P. savastanoi pv. savastanoi* и *P. s. pv. tomato*) они кориснији од BOX и ERIC прајмера. Наиме, према Gutiérrez-Barranquero et al. (2013) *P. syringae* геном садржи велики број копија REP елемената повезаних са „insertion sequence elements“ (ISI), те се њиховим умножавањем стварају генетички профили са израженијим полиморфизмом, односно већим бројем фрагмената, док BOX елементи имају конзервиранију природу у геному *P. syringae* и показују слабији полиморфизам, а ERIC елементи вероватно ни не постоје код ових патовара *P. syringae*, јер њиховом применом није дошло до амплификације ниједног фрагмента ДНК.

У нашим истраживањима, гер-PCR генетички профили проучаваних сојева садрже 6-19 производа умножавања (делова ДНК видљивих у виду трака у гелу), различите величине, што је према Versalovic et al. (1991) прихватљиво за даље поређење. Насупрот овоме, у истраживањима диверзитета *Pseudomonas spp.* као патогена стрних жита у Русији, Matveeva et al. (2008) наводе да су само коришћењем прајмера за BOX елементе добијени генетички профили са малим бројем трака, док REP- и ERIC-PCR нису дали профиле који су се могли користити за даље анализе.

Применом гер-PCR методе у оба истраживања је утврђено да сојеви *P. syringae* групе изоловани са стрних жита и у Србији и у Русији показују висок ниво генетичког диверзитета, што је у сагласности са резултатима Stead et al. (2003) који су тестирањем примене гер-PCR методе у циљу класификације већине валидно објављених патовара и врста *Pseudomonas sp.* утврдили изражен генетички диверзитет патогена пшенице, на основу њихове појаве у различитим кластерима гер-PCR дендрограма.

Иако су наши проучавани сојеви који су међусобно филогенетски идентични у секвенцама 578bp локуса *rpoD* гена истовремено и генетички веома хетерогени и расути у сваком од већих и мањих кластера гер-PCR дендрограма, они се у својим кластерима групишу са блиско сродним сојевима филогрупе 2 на удаљености између 0,1 и 0,15. Ова појава је уочена у 4 од 7 кластера гер-PCR дендрограма у којима се јављају сојеви класификовани у филогрупу 2b. Сојеви 2тк, 3тк и 6тк идентификовани као *P. s. pv. atrofaciens* деле исти кластер са сојем 4тк који деле *rpoD* секвенцу са *P. s. pv. lapsa/aptata*. Слично је са кластером који деле сојеви идентификовани као *P. s. pv. atrofaciens* (52тк, 58тк и 59тк) и сој 57тк који деле *rpoD* секвенцу са *P. s. pv. lapsa/aptata*, односно кластером који деле сојеви блиско сродни са *P. s. pv.*



*syringae/aptata/atrofaciens/lapsa/japonica* (24тк, 25тк, 28тк и 29тк) и сој 30тк идентификован као *P. s. pv. atrofaciens*. Ова хетерогеност посебно долази до изражаја у кластеру у ком су груписани сојеви са различитих биљних врста, биљних делова и локалитета који су идентификовани као *P. s. pv. atrofaciens* (54тк) и сојеви (сојеви 36тк, 37тк и 49тк) који деле *rpoD* секвенцу са *P. s. pv. lapsa/aptata* или сојеви (38тк) блиско сродни са *P. s. pv. syringae/aptata/atrofaciens/lapsa/japonica*. Подаци о генетичкој хетерогености сојева геномоврсте 1 филогрупе 2, као и тенденцији груписања у кластере су у сагласности са резултатима Stead et al. (2003) који наводе да су и *P. syringae* (означава само геномоврсту 1 филогрупу 2) и *P. viridiflava* (поред *P. cichorii*, *P. savastanoi*, *P. marginalis* и *P. caricaparayae*) генетски хетерогене врсте, а да је међу патоварима који показују највећу генетску хетерогеност и патовар *atrofaciens* (поред патовара *actinidiae*, *berberidis*, *lachymans*, *passiflorae*, *phaseolicola*, *pisi*, *ribicola*, *sesame* и *viburni*). Чињеница да се сојеви идентификовани као *P. s. pv. atrofaciens* налазе у 5 различитих кластера потврђује наводе Cintas et al. (2002) да сојеви истог патовара могу створити генетички различите профиле.

Rep-PCR профили у оквиру филогрупе 2b. Мали број проучаваних сојева (2тк, 3тк, 4тк, 5тк, 6тк и 7тк) дели исти кластер са референтним изолатима патогена са стрних жита и сви су изоловани до 2011. године и припадају филогрупи 2b. С обзиром да су проучавани сојеви пореклом са различитих биљних врста, делова и локалитета и да је само заједнички период у коме су изоловани, овај резултат се може тумачити у складу са резултатима истраживања Vinatzer (2010), који је на бази сојева *P. s. pv. tomato* прикупљених у периоду 1948-2008. године утврдио да је у протеклих неколико деценија дошло до измена популација овог патогена у развијеним земљама, док су у неразвијеним земљама популације патогена остале непромењене. С обзиром да се ова промена може приписати утицају фактора који карактеришу интензивну производњу у развијеним земљама, потребно је утврдити који су фактори у Србији могли утицати на промену популације после 2011. године.

За остале сојеве који су у овим истраживањима класификовани као чланови филогрупе 2b је уочена одређена правилност у груписању, пре свега у односу на локалитет са којег су изоловани или у односу на локалитет са којег потиче основни генетички материјал. Према локалитету се групишу сојеви у 2 кластера и то: 24тк, 25тк, 28тк, 29тк и 30тк изоловани на локалитету Крагујевац и 19тк, 20тк, 22тк, 23тк и 26тк изоловани на локалитету Сомбор. С друге стране, сојеви 52тк, 58тк и 59тк и сој 57тк су изоловани са различитих биљних врста, биљних делова и локалитета (52тк са семена/плева овса у Сомбору, 57тк и 58тк са доњег дела стабла пшенице са Римских

Шанчева и 59тк са листа кукуруза у Бачком Петровом Селу), али их повезује исто порекло генетичког материјала (Институт за ратарство и повртарство Нови Сад), што прати и груписање у један кластер на гер-PCR дендрограму.

Иако сојеви 36тк, 37тк, 38тк, 49тк, 50тк и 54тк имају веома сличне гер-PCR генетичке профиле, што одсликава њихово груписање на малој удаљености (1,5), није уочена правилност у односу на биљну врсту, биљни део, локалитет или порекло.

Гер-PCR профили у оквиру филогрупе 2d. Сојеви класификовани у филогрупу 2d (1тк (изолован 2009. године) и 17тк (изолован 2014. године)), међусобно су генетички удаљени и налазе се у групи сојева изолованих до 2011. године (2тк, 3тк, 4тк, 5тк, 6тк и 7тк).

Гер-PCR профили у оквиру филогрупе 4. Сојеви филогрупе 4 (16тк, 33тк, 34тк, 35тк, 39тк, 40тк, 42тк, 43тк, 44тк и 48тк) су хомогени, груписани у јединствени кластер гер-PCR дендрограма, осим соја 55тк који се у филогенетској идентификацији показао идентичним са сојем 48тк, а оба соја су изолована са семена две сорте ражи са истог локалитета. При томе, сојеви 16тк, 33тк, 34тк, 35тк, 44тк и 48тк формирају једну, а сојеви 39тк, 40тк, 42тк, 43тк формирају другу подгрупу у оквиру овог кластера.

Да се ради о генетички хомогеним сојевима указује покатак да се групишу према локалитету и то: сојеви 39тк, 40тк, 42тк и 43тк изоловани на локалитету Сомбор, као и сојеви 33тк, 34тк, 35тк и 48тк, такође изоловани на локалитету Сомбор. Хомогеност сојева ове филогрупе су потврдили и резултати филогенетске анализе где највећа генетичка удаљеност утврђена између сојева износи 1,3% (сојеви 48тк и 55тк у односу на остале сојеве ове филогрупе). Ови резултати везани за хомогеност и тенденцију груписања сојева геномврсте 4/филогрупе 4 су у складу са истраживањима Stead et al. (2003).

Гер-PCR профили у оквиру филогрупае 7a и 8. Иако су сојеви 8тк, 9тк, 10тк, 11тк, 12тк, 13/14тк и 51тк идентификовани у овим истраживањима као *P. viridiflava* и класификовани у филогрупу 7a груписани у већи кластер на дендрограму конструисаном поређењем гер-PCR генетичких профила, између њих је утврђена велика филогенетска удаљеност. Исте гер-PCR генетичке профиле деле сојеви 8тк и 9тк као пар, као и 10тк и 11тк, док су сојеви 12тк и 13/14тк груписани у мањи кластер на удаљености 0,5. Иако сојеви 12тк и 13/14тк припадају филогрупи 7a и међусобно су према гер-PCR генетичком профили блиски, они су према резултатима филогенетске анализе удаљени (генетичка удаљеност 2,6 %). С обзиром да су сојеви 12тк и 13/14тк

изоловани са различитих биљних врста и делова, а да им је заједнички локалитет са којег су изоловани, блискост њихових генетичких профила је вероватно условљена неком од карактеристика локалитета, што је у складу са делом навода Gutiérrez-Barranquero et al. (2013) који каже да су се сојеви *P. s. pv. syringae* са манга груписали на добијеном гер-PCR генетичком профилу између осталог и према локалитету на коме су изоловани. Насупрот овоме, сој 13/14тк је према резултатима филогенетске анализе најближи соју 56тк (генетичка удаљеност 2 %), али ови сојеви, иако деле биљну врсту (тритикале) и локалитет (Крагујевац) са којих су изоловани, припадају удаљеним кластерима на дендрограму конструисаном поређењем гер-PCR генетичких профила, што вероватно указује на њихово различито клонско порекло.

Податак да су сојеви 8тк и 9тк, 10тк и 11тк, као и 12тк и 13/14тк идентификовани као *P. viridiflava*, филогрупа 7а, сви пореклом са истог локалитета (Крагујевац) и изоловани са различитих биљних делова ражи 2012. године (осим соја 13/14тк који је изолизован са листа тритикалеа 2009. године) међусобно генетички удаљени сходно својим генетичким профилима и филогенетској анализи, је сагласан са подацима које о диверзитету *P. viridiflava* наводе Stead et al. (2003), Sarris et al. (2012) и Bartoli et al. (2014). Такође, податак да су два пара сојева идентичних генетичких профила (8тк и 9тк, 10тк и 11тк) филогенетски најсличнији соју 51тк, а различити од соја 12тк, иако су сви изоловани из различитих биљних делова исте биљке ражи (глава корена, корен и коренчићи), указује на комплексну природу болести коју проузрокују на биљкама.

Иако се сој 27тк групише у основи кластера који чини већина *P. viridiflava*, генетски је удаљен од њих, а филогенетска удаљеност износи 8-9%, што је очекивана удаљеност између две филогрупе.

Насупрот нашим резултатима који говоре у прилог томе да се сојеви из истог локалитета групишу према сличности својих генетичких профила, постоје у нашим истраживањима и примери да су сојеви пореклом са исте биљке или из истог усева (значи и из истог локалитета) значајно удаљени сходно својим генетичким и филогенетским профилима, што код различитих генетичких профила указује на њихово различито клонско порекло, а код различитих филогенетских профила на то да је болест коју проузрокују деловање комплекса патогена.

**Филогенетска анализа.** Прве филогенетске анализе *P. syringae* групе су биле засноване на коришћењу 16S rDNA. После закључивања Yamamoto et al. (2000) да „housekeeping“ *rpoD* и *gyrB* гени еволуирају брже од гена одговорног за rDNA чиме обезбеђују високу резолуцију погодну за анализу варијабилности унутар врсте, коришћење „housekeeping“ гена у филогенетским анализама *P. syringae* групе је

посебно интензивирано увођењем у примену MLST и то прво развојем шеме са 7 (Sarkar et al., 2006), да би у широј употреби остале шеме са 4 „housekeeping“ гена, као што су Hwang et al. (2005) и Morris et al. (2008) MLST шеме. Секвенце добијене применом ових шема су обезбеђене у PAMDB бази података микроорганизама везаних за биљке и из животне средине (<http://genome.ppws.vt.edu/cgi-bin/MLST/home.pl>).

За рутинско класификовање сојева *P.syringae* комплекса врста у филогрупе, Parkinson et al. (2011) су развили метод у коме користе само један „housekeeping“ ген и то 578bp локус *rpoD* гена (енг. single locus sequence) који обухвата и L19 локус (Sarkar и Guttman, 2004; Sarkar et al., 2006) коришћен у Hwang MLST шеми, али и L18 локус (Yamamoto et al., 2000)., коришћен у Morris MLST шеми, па се поравнањем секвенце 578bp локус *rpoD* гена проучаваног соја са секвенцама сојева које су обухватале или L19 или L18 *rpoD* гена добија консензус секвенца веће дужине, што умањује одступања (“discrepancies”) у разврставању сојева. Тиме је спектар поређења са већом поузданошћу проширен не само на сојеве чије су секвенце 578bp локус *rpoD* гена обезбеђене од стране Parkinson et al. (2011) и других аутора у Банци гена (енг. GenBank) Националног центра за биотехнолошке информације (енг. National Center for Biotechnology Information, NCBI) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), него и на сојеве чије су секвенце *rpoD* гена из Hwang MLST или Morris MLST шема обезбеђене у PAMDB бази података.

За разлику од Parkinson et al. (2011) који су диверзитет сојева *P. syringae* комплекса врста одређивали у односу на познате патогене гајених биљака из агроекосистема и њихове типске и патотипске сојеве, Verge et al. (2014) су истраживали укупни диверзитет сојева овог комплекса, укључујући и сојеве из животне средине и за потребе њиховог рутинског класификовања предложили коришћење само *cts* гена уместо целе Morris MLST шеме. Исти аутори су потврдили 7 филогрупа претходно описаних од стране Parkinson et al. (2011), али описали и нове филогрупе (8, 9, 10, 11, 12 и 13), а у оквиру неких филогрупа су потврдили и подгрупе, као што је филогрупа 2 подељена на пет, а филогрупа 7 на две подгрупе.

Због погодности универзалне примене 578bp локус *rpoD* гена у биномној класификацији валидно описаних врста и патовара (јер су обезбеђене *rpoD* секвенце типских и патотипских сојева валидно описаних врста и патовара), као и сврставању у геномоврсте и филогрупе, филогенетска анализа проучаваних сојева извршена је коришћењем секвенци 578bp локус *rpoD* гена проучаваних сојева добијених на начин описан од стране Parkinson et al. (2011).

У даљој филогенетској анализи 578bp локуса *rpoD* гена проучаваних сојева за потребе њиховог сврставања (класификације) у филогрупе према Parkinson et al. (2011) и даље идентификације у односу на валидно описане врсте и патоваре у оквиру филогрупа у које су претходно сврстане коришћене су доступне секвенце 578bp локус *rpoD* гена типских и патотипских сојева представника филогрупа према Parkinson et al. (2011), које су за NCBI базу обезбедили исти аутори.

У циљу поређења диверзитета проучаваних сојева са диверзитетом сојева *P. syringae* комплекса из спољашње средине описаним у истраживањима Berge et al. (2014), извршена је даља класификација проучаваних сојева у подгрупе филогрупа које су описали ови аутори, а у које су претходно сврстани проучавани сојеви (филогрупе 2 и 7 имају, а филогрупа 4 нема подгрупе). Због чињенице да су за своја истраживања користили *cts* умест *rpoD* гена, *rpoD* секвенце представника подгрупа 2a, 2b, 2c и 2d у оквиру филогрупе 2 и подгрупа 7a и 7b у оквиру филогрупе 7 према Berge et al. (2014) су екстраховане из доступних база (NCBI и PAMDB), било као L18 или L19 локуси, било као секвенце сржног генома (из којих су екстраховане *rpoD* секвенце) представника подгрупа. Један од критеријума за одабир секвенци за филогенетску анализу је био да се доступне секвенце L18 и L19 локуса *rpoD* гена сојева који би се могли користити за даље сврставање никада не користе истовремено (јер би коришћењем CLUSTAL W алгоритма биле поравнате на заједничку дужину мању од 350bp што повећава одступања (“discrepancies”), а самим тим и ризик од погрешног сврставања), него као један од та два локуса у комбинацији са секвенцом сржног генома, чија је доступност на крају условила и коначни одабир сојева за разврставање. Према другом критеријуму, где год је то било могуће, коришћене су секвенце сржног генома, јер оне покривају целу дужину секвенце 578 локуса *rpoD* гена и овај критеријум је због доступности секвенци искоришћен код даљег сврставања у подгрупе филогрупе 2. Спроведена филогенетска анализа је показала да су се представници подгрупа 2b, 2c и 2d правилно сврстали у своје подгрупе (генетичка удаљеност већа од 1,9%), да је представник подгрупе 2a, иако генетички удаљен 1,6% од представника подгрупе 2d, по топологији филогенетског стабла није сврстан у ову подгрупу. Према овим резултатима секвенца 578 локуса *rpoD* гена се може користити за сврставање сојева у подгрупе према Berge et al. (2014), супротно наводима ових аутора који су у те сврхе користили првенствено *cts* ген.

За потребе поређења диверзитета одабраних проучаваних сојева и сојева *P. syringae* комплекса изолованих са стрних жита искоришћене су постојеће секвенце L19 локуса *rpoD* гена из Hwang MLST шеме ових сојева, које су обезбеђене у бази PAMDB.

На овај начин су коришћењем комбиновања у том моменту доступних података сви проучавани сојеви класификовани у одговарајуће филогрупе (по Parkinson et al. (2011) и Berge et al. (2014)) и њихове подгрупе (по Berge et al. (2014)), а утврђен је и њихов диверзитет у односу на диверзитет сојева изолованих са стрних жита чије су *rpoD* секвенце (неки од локуса *rpoD* гена или секвенца *rpoD* гена коју је потребно претходно екстраховати из сржног генома) доступне у некој од поменутих база. 33 соја изолована у овом истраживању су се класификовала у филогрупу 2, од чега 31 сој у подгрупу 2b и 2 соја у подгрупу 2d, док се 12 сојева класификовало у филогрупу 4, а 8 сојева у филогрупу 7, подгрупа 7a и један сој у филогрупу 8. Сој 32тк је дао консензус секвенцу дужине око 200bp и није могао бити коришћен у филогенетској анализи.

Извршена је идентификација 12 проучаваних сојева филогрупе 2 као *P. s. pv. atrofaciens* (2тк, 3тк, 6тк, 21тк, 23тк, 26тк, 30тк, 50тк, 52тк, 54тк, 58тк и 59тк), док су сојеви 19тк, 20тк и 22тк класификовани у исту филогрупу као блиско сродни (99%) *P. s. pv. atrofaciens*. Такође, у овом истраживању је утврђено да се филогенетском анализом 578 локуса *rpoD* гена не раздвајају патотипски сојеви *P. s. pv. lapsa* (пореклом из NCPPV колекције) и *P. s. pv. aptata* (пореклом из LMG колекције), тако да за 6 проучаваних сојева (4тк, 31тк, 36тк, 37тк, 49тк и 57тк) који са њима деле *rpoD* секвенцу, није могуће потврдити са којим од ових патовара су међусобно идентични.

Уједно, утврђено је да се коришћењем 578bp локуса *rpoD* гена између сојева *P. s. pv. atrofaciens*, *P. s. pv. lapsa*, *P. s. pv. aptata*, *P. s. pv. japonica* и *P. s. pv. syringae* јавља мала генетичка удаљеност (0,2- 0,3%), због чега није могуће идентификовати одређене сојеве (5тк, 7тк, 24тк, 25тк, 28тк, 29тк, 38тк, 41тк, 45тк и 47тк) који не деле 100% идентичну секвенцу ни са једним од ових патотипских сојева, па је једино што их у овом истраживању прецизно одређује припадност филогрупи 2b. Ови резултати потврђују констатацију Bull et al. (2011) да коришћење само једног гена уопште некад није довољно да би се сојеви идентификовали у односу на патотипске сојеве.

У односу на сличности сојева у филогенетској анализи коришћењем UPGMA методе, издвојена су три типа сојева у оквиру подгрупе 2b: тип 1, 2 и 3 (слика 46) који одговарају испољеним морфолошким карактеристикама колонија и уоченој агресивности сојева у провери патогености. Тако тип 1 чине сојеви идентификовани као *P. s. pv. atrofaciens* који имају тип колонија 1- мање слузаве и мање су агресивни од осталих сојева филогрупе 2b, тип 2 чине сојеви који деле *rpoD* секвенцу *P. s. pv. lapsa* и *P. s. pv. aptata*, имају тип колонија 1 - више слузасте и испољавају већу агресивност при провери патогености, док тип 3 чине сојеви који су блиско сродни *P. s. pv. atrofaciens*, *P. s. pv. lapsa*, *P. s. pv. aptata*, *P. s. pv. japonica* и *P. s. pv. syringae* са којима

не деле 100% идентичну *rpoD* секвенцу, а агресивност у провери патогености им варира од соја до соја. Позиција соја попут 20тк на прелазу између група 1 и 2 одговара утврђеном податку да је овај сој класификован у 2b филогрупу као блиско сродан *P. s. pv. atrofaciens*.

Уочена ограничења филогенетске анализе у идентификацији патотипских сојева у филогрупи 2 се јављају и код филогрупе 4. Идентичне секвенце 578bp локус *rpoD* гена деле сојеви *P. s. pv. porri* и *P. s. pv. striafaciens*, као и сојеви 16тк, 33тк, 34тк, 35тк, 39тк, 40тк, 42тк, 43тк и 44тк, док сојеви 48тк, 53тк и 58тк испољавају највише сличности са секвенцом соја *P. s. pv. oryzae* (2 %).

Сојеви филогрупе 7 су у овим истраживањима показали изражену хетерогеност у филогенетској анализи *rpoD* гена, као и сојеви које су Berge et al. (2014) користили у својим истраживањима. Између сојева је уочена генетичка удаљеност која превазилази лимите који одвајају подгрупе (за MLST је то 2,2%, а за *rpoD* ген је 1,9%).

Поред истраживања Parkinson et al. (2011) и Berge et al. (2014) која су показала да се сврставања разних сојева врста *P. syringae* комплекса патогених за биљке и из спољашње средине у филогрупе и њихове подгрупе може изводити коришћењем једног „housekeeping“ гена (single locus секвенце) једнако успешно као и кад се примењује MLST, до сличних закључака у својим истраживањима долазе и Girard et al. (2020) у којима је такође показано да коришћење једног „housekeeping“ гена, у овом случају 650bp локуса *rpoD* гена омогућава успешну класификацију сојева рода *Pseudomonas* из спољашње средине међу познате врсте и да представља одлично прво дијагностичко средство за идентификацију нових врста рода *Pseudomonas*.

**Здружена инфекција – Комплекс патогена.** Биљне болести у чије је настајање укључено више од једног патогена се често означавају као комплекси и резултат су „умрежавања“ које укључује широк опсег микробиолошких интеракција. Према резултатима наших истраживања, биљне болести које на стрним житима у Србији проузрокују бактерије су резултат интеракција најмање две валидно описане врсте бактерија (*P. syringae* и *P. viridiflava*) које спадају у *P. syringae sensu lato* или *P. syringae* комплекс врста, али и различитих патовара/филогенетски удаљених популација у оквиру *P. syringae sensu stricto*, односно "збирне врсте *P. syringae*".

**Различите врсте.** Из три узорка овса сорте Јадар (14/19, 30, 31) из истог поља овса на Римским Шанчевима су изоловани: са листа сојеви 27тк (идентификован као *P. viridiflava*, класификован у филогрупу 8) и 31 тк (дели *rpoD* секвенцу *P. s. pv.*



*lapsa/aptata*, класификован у филогрупу 2b), а са семена сој 47тк (блиско сродан *P. s. pv. syringae/ aptata/atrofaciens/lapsa/ japonica*, класификован у филогрупу 2b).

Различити патовари из различитих филогрупа исте врсте. Из истог узорка овса сорте Јадар, из локалитета Сомбор, са плева су изоловани сој 52тк (идентификован као *P. s. pv. atrofaciens*, класификован у филогрупу 2b) и са семена сој 53тк (блиско сродан *P. s. pv. coronafaciens/oryzae*, класификован у филогрупу 4).

Различити филогенетски кластери исте групе патовара исте филогрупе исте врсте. Са листова и семена две сорте ражи које на локалитету Сомбор-колекција расту једна поред друге, изоловани су: из сорте Саво сојеви 34тк (лист) и 48тк (семе) и сорте Pallazio сојеви 35тк (лист) и 55тк (семе), међу којима су сојеви 34тк и 35тк блиско сродни *P. s. pv. porri/striafaciens*, а сојеви 48тк и 55тк блиско сродни *P. s. pv. coronafaciens/oryzae*, сви класификовани у филогрупу 4. Сојеви 34тк и 35тк изоловани са листа ових сорти су према резултатима гер-PCR генетичких профила идентични, а самим тим и филогенетски идентични, док су сојеви 48тк и 55тк изоловани са семена наведених сорти према резултатима гер PCR генетичких профила међусобно различити, али филогенетски идентични. Иако ово показује да болест различитих биљних делова на биљкама једне сорте могу проузроковати филогенетски удаљени сојеви исте врсте бактерија (*P. syringae*), што је још једна потврда комплексне природе болести, ови резултати на две суседне сорте ражи указују на то да се филогенетска сличност односила на биљни орган са којег су изоловани. То наводи на закључак да одређени делови популације могу бити специјализовани за одређени биљни орган, док међусобна идентичност (34тк и 35тк) или различитост (48тк и 55тк) сојева према резултатима гер-PCR генетичких профила указује на утицај њиховог клонског порекла. Такође и податак да су два пара сојева *P. viridiflava* идентичних генетичких профила (8тк и 9тк, 10тк и 11тк) филогенетски најсличнији соју 51тк, а различити од соја 12тк, са којим су изоловани из различитих биљних делова истог узорка биљака ражи (глава корена, корен и коренчићи) говори у прилог томе да су болести стрних жита које проузрокују бактерије последица и међусобних интеракција различитих филогенетски удаљених популација исте врсте.

Према наводима Lamichhane и Venturi (2015), најзначајнији пример синергистичких интеракција неколико фитопатогених бактерија је некроза сржи парадајза коју могу проузроковати укупно 8 врста бактерија појединачно или у међусобној асоцијацији: *P. cichorii*, *P. corrugate*, *P. viridiflava*, *P. mediterranea*, *P. fluorescens*, *Pectobacterium atrosepticum*, *Pectobacterium carotovorum* и *Dickeya chrysanthemi*. У случају заједничке

инфекције са једном или више врста бактерија се значајно повећао интензитет болести, што се посебно испољава у случајевима заједничке инфекције *P. corrugate* – *P. marginalis* или *P. corrugate* – *P. mediterranea*. Слично овоме, влажна трулеж или трулеж главе броколија представља други комплекс болести који проузрокује неколико бактерија (*Pectobacterium carotovorum*, *P. marginalis*, *P. fluorescens* и *P. viridiflava*) (Canaday et al., 1991) које могу изазвати трулеж и неоштећеног броколија ако се врши заједничка инокулација, али је механизам ове кооперативности непознат. Сигнализација између различитих врста бактерија врло вероватно има важну улогу у синхронизацији понашања као и испољавања фактора вирулентности у мешаним популацијама.

Неколико истраживања заснованих на коришћењу традиционалних метода показују да се многе биљне врсте могу заразити са неколико патогених организама у исто време (Fitt et al., 2006; loc. cit. Lamichhane и Venturi, 2015); у многим случајевима, инфекција изазвана чистом културом једног патогена не мора довести до значајније појаве симптома док у заједничкој инфекцији са другим врстама штетних организама може доћи до појаве болести већег интензитета због синергистичких интеракција. Синергистичка патоген - патоген интеракција често доводи до повећаног интензитета болести и олакшава разумевање епидемиологије и контроле бројних комплекса болести.

**Осетљивост сортимената.** Овим истраживањима је добијен инфекциони одговор одабраних сорти пшенице и јечма, који указује на интензитет реакције тј. типове симптома који се могу јавити на њиховим сејанцима инокулисаним одабраним сојевима *P. syringae* и *P. viridiflava*.

Утицај квалитативних и квантитативних разлика у вирулентности сојева бактерија на истраживање отпорности гермплазме у контролисаним условима (Maraite et al., 2007) условљава посвећивање посебне пажње одабиру сојева за истраживање. У нашим истраживањима је одабир сојева извршен на основу интензитета симптома које су представници сваке од идентификованих/блиско сродних патовара класификованих у једну од 4 филогрупе проузроковали на биљкама домаћинима у тесту провере патогености. Ипак, мора се узети у обзир и чињеница да је у овој фази тешко утврдити да ли је разлика у реакцијама биљака домаћина последица разлике у реакцијама биљних врста, као што је у нашим истраживања показано да јечам реагује развојем много интензивнијих симптома него пшеница, или разлике у агресивности проучаваних сојева. Matveeva et al. (2008) су утврдили висок степен варирања *P.*

*syringae* у вирулентности у односу на различите биљне врсте (јечам, пшеница, раж) и генотипове стрних жита у Русији.

Иако је скала коју су развили Vassilev et al. (1995) једина позната скала за оцену инфекционог одговора сејанаца стрних жита на патоваре *atrofaciens* и *syringae*, у овим истраживањима је коришћен поступак који описују Sellam и Wilcoxson (1976). Разлог одабира је метод инокулације (прскање биљака ваздушном четком током кога долази до финог повређивања ткива) који је приближан методу инокулације коришћеном у овим истраживањима (потапање биљака са целим и засеченим листовима у суспензију бактерије са оквашивачем). Vassilev et al. (1995) наводе специфичан метод инокулације убодом, где се оцењује величина пеге око места убода, па је због тога ова метода оцењена као мање погодна за оцену осетљивости сејанаца сорти стрних жита.

Duveiller (1994a) наводи предуслове потребне за развој објективног кључа/скале за оцењивање: идентификован проузроковач, праћење симптома на већем броју сорти свих стрних жита дужи временски период, позната епидемиологија у мери потребној да се процени одакле се на листу болест шири и у које делове, познавање разлика у географским подручјима и момента максималног испољавања симптома. У нашим условима је у вези са сваком од поменутих тачака потребно додатно истраживање како би се развио објективан кључ/скала за оцењивање. Један од основних недостатака скале Sellam и Wilcoxson (1976) је тај што покрива само интензитет напада на листу, али не и дистрибуцију напада у бусену. У случајевима када су одабрани сојеви фолијарни патогени чија су епидемиологија и максимално испољавање симптома везани за лист, скалу за сејанце чини објективном комбинација процене интензитета напада на листу и броја листова који су захваћени пегамма (интензитет инфекције). Једно од могућих решења за ову врсту недостатака скале за оцењивање дали су Duveiller et al. (2005) који су за процену интензитета фолијарних болести пшенице које проузрокују гљиве *Cochliobolus sativus* и *Pyrenophora tritici repentis* користили двоцифрену (00-99) модификовану скалу Saari и Prescott (1975), где прва цифра указује на прогресирање болести у бусену од нивоа земље ка врху (D1), а друга се односи на интензитет болести који се мери оболелом површином листа (D2). Принцип двоцифрене скале су користили и Kandel et al. (2012) приликом процене отпорности гермплазме јаре пшенице на отпорност према *X. t. pv. translucens*.

Природна инфекција у пољу. Оскудна истраживања отпорности сортимената су већином везана за инокулацију и гајење биљака у условима коморе/стакларе (Hagborg, 1970; Otta, 1974; Sellam and Wilcoxson, 1976; Peters et al., 1983; Shane and Baumer, 1987). У једном од ретких истраживања отпорности генотипова јечма према *P. s. pv.*

*syringae* у пољским условима, Martinez-Miller et al. (1997) су утврдили да је критичан период за инфекцију од касне фазе млечне зрелости до почетка технолошке зрелости јечма и да је висока влажност неопходна током инфекције и развоја болести. Ови аутори наводе да би природне пољске инфекције потпомогнуте наводњавањем у фази млечне зрелости јечма могле бити погодне за тријажу генотипова у оплемењивачким програмима.

Међутим, патогени идентификовани током истраживања у Србији показују да се ради о недовољно познатом комплексу организама још мање познате епидемиологије, који имају значајну епифитну и ендофитну фазу, а у агроекосистеме вероватно долазе диверзификовани у другим суровијим стаништима (*P. viridiflava*) (Monteil et al., 2013), па је праћење осетљивости сорти у пољу, у условима природне инфекције, стављено у други план све док не буде довољно познат диверзитет и епидемиологија бактерија патогена стрних жита у Србији и остварен развој адекватне скале за оцењивање. Уједно, питање отпорности у будућим истраживањима не треба везивати само за актуелне сорте које су у производњи у Србији и свету, него изворе отпорности треба тражити и у дивљим популацијама *Triticum* и старим/аутохтоним сортама, јер је реч о организмима са све учесталијом појавом на стрним житима.

\*\*\*

Из резултата наших истраживања проистиче да филогенетска анализа представља основни метод за диференцијацију сојева бактерија патогена стрних жита, што доказује и пример сврставања проучаваног соја 32тк. Наиме, овај сој није могао бити укључен у филогенетску анализу јер у процесу секвенционирања није за њега добијен одговарајући хроматограм погодан за анализу и због тога за њега није могуће до краја одредити припадност једној од група приказаних у табели 36. На основу резултата приказаних у табелама 14 (припадност LOPAT Ia групи - L[+],O[-],P[-],A[-],T[+]), 15 (остале биохемијско-физиолошке одлике карактеристичне за филогрупу 2) и 16 (утврђено присуство *surB1* гена за стварање сирингомицина) се за овај сој са сигурношћу може рећи једино да припада филогупи 2, док се на основу типа његових симптома (изразитих некроза са цепањем листова, слика 7), затим колонија (тип 1-више слузаста) и груписања генетичког профила приказаног на слици 36 и у табели 17, додатно може претпоставити да спада у подгрупу 2b као блиско сродан *P. s. pv. lapsa/aptata*. Међутим, поуздана класификација захтева и филогенетску анализу.

У даљим истраживањима диверзитета бактерија као патогена стрних жита потребно је дефинисати тестове који се у будућности, поред филогенетске анализе могу

користити за њихову диференцијацију. Поред свих претходно образложених резултата наших истраживања, у томе могу да послуже и следећа сазнања:

Спектар домаћина као основ за диференцијацију патовара *P.syringae* као патогена стрних жита. На стрним житима су од патовара збирне врсте *P. syringae* описани патовари *syringae*, *atrofaciens*, *japonica*, *coronafaciens* и *striafaciens*. Првобитно дефинисање патовара *syringae* и *atrofaciens* се заснивало на делу биљке на коме ови патогени живе, међутим овај приступ је после побијан различитим образложењима. Иако се првобитно сматрало да сојеви *P. syringae* који проузрокују бактериозну пегавост основе класака (плева) пшенице и других стрних жита припадају хомогеној групи сојева *P. s. pv. atrofaciens* која је готово искључиво патоген стрних жита (Wilkie, 1973; Vasillev and Karev, 1982; loc. cit. Duveiller et al., 1997; Toben et al., 1991), док они који изазивају симптоме бактериозне пламењаче листа припадају изразито хетерогеној групи сојева *P. s. pv. syringae* са широком кругом домаћина (Otta, 1977; Fryda and Otta, 1978; Арсенијевић, 1986; Duveiller et al., 1997; Valencia-Botin and Cisneros-Lopes, 2012), уочено је да су симптоме трулежи основе плева проузроковали и сојеви *P. s. pv. syringae* изоловани са јоргована, бораније и *Pennisetum* (von Kietzell, 1995; loc.cit. Duveiller et al., 1997), док су истраживања Alexandrova et al. (1995) показала да и сојеви *P. s. pv. atrofaciens* могу да на јорговану проузрокују исте симптоме као *P. s. pv. syringae*. Утврђена је и патогеност *P. s. pv japonica* на пшеници, јечму, ражи, пиринчу, просу, *Setaria*, *Chenopodium* и парадајзу (Mukoo, 1955; loc.cit. Duveiller et al., 1997), али није познато да ли проузрокује симптоме сличне *P. s. pv. syringae* или *P. s. pv. atrofaciens*. Патовари *coronafaciens* и *striafaciens* се могу наћи и на листу и семену овса и ражи, али и на другим биљним врстама, те је њихова диференцијација на основу спектра домаћина немогућа. С обзиром да *P. viridiflava* није до сада описана као патоген стрних жита, нема литературних података о томе да ли се и који спектар домаћина из ове групе гајених биљака може користити за диференцијацију сојева. Из свега наведеног се закључује да овако постављен спектар домаћина не може бити основ за диференцијацију сојева патогена стрних жита.

Фенотипске и друге карактеристике као основ за диференцијацију сојева. Stead et al. (2003) наводе да је пшеница у групи оних биљних врста чији се патогени буквално не могу раздвојити. Тако различити аутори наводе да ни тестови патогености на различитим биљкама домаћина (von Kietzell et al., 1994; loc.cit. Duveiller et al., 1997), ни серолошки и физиолошки тестови (Otta, 1977; Smith и Hattingh, 1991; Alexandrova et al., 1995) не могу да покажу конзистентну и јасну разлику између патовара *syringae* и

*atrofaciens*. Young и Triggs (1994) и Hu et al. (1998) (loc.cit. Young, 2010) наводе да би патовари *aptata*, *atrofaciens* и *lapsa* могли бити синоними за *P. s. pv. syringae*, а Toben et al. (1991) сматрају да је диференцијација патовара *atrofaciens* и *syringae* тешка и само од академског значаја. Young (1992) сматра да нема довољно података који би оправдали класификацију *P. s. pv. japonica* као посебног патовара и закључује да је *P. s. pv. japonica* млађи синоним *P. s. pv. syringae*. Резултати истраживања Barta и Willis (2005) показују да се сојеви *P. s. pv. striafaciens* и *P. s. pv. coronafaciens* разликују само по питању стварања табтоксина, што утиче и на разлике у симптомима које на овсу ови патовари проузрокују. Уношење плаزمида (*космида rRTBL823*) који ствара могућност за стварање табтоксина у *P. s. pv. striafaciens* резултира формирањем лезија на листу овса које се не могу разликовати од оних које производи *P. s. pv. coronafaciens* (Barta and Willis, 2005). Неодрживост класификације ових патогена као засебних патовара наводе и Schaad и Cunfer (1979). Dutta et al. (2018) су утврдили да патотипски сој за *P. s. pv. coronafaciens* (CFBP 2216=NCPPB 600) испољава мање од 35% сличности са типским сојем *P. s. pv. syringae* (CFBP 1392=NCPPB 281), а преко 90% са новим сојевима који су проузороковали жутило пупољка лука. После обимних вишефазних истраживања предложено је да се *P. s. pv. coronafaciens* са нивоа патовара издигне на ниво врсте, а за њене патоваре одреде нови проузороковачи жутила пупољка лука. У њиховим истраживањима је показано и то да сојеви који су проузороковали типичне симптоме ореолне пегавости овса, ражи и италијанског љуља нису довели до појаве симптомима на луку и обратно.

И резултати нашег истраживања доказују да се ради о патогенима који могу заражавати различите биљне врсте и њихове делове: нпр. сојеви 24тк, 25тк, 28тк и 29тк су идентични, а изоловани су са листа и семена јечма и листа тритикалеа; сој 26тк је изолован са листа пшенице и идентичан је соју 23тк који је изолован са листа ражи, а нпр. изолат 41тк који је изолован са листа дурума је идентичан изолату 47тк изолованом са семена овса.

Morris et al. (2000) наводе да раздвајање патовара *P. s. pv. atrofaciens*, *P. s. pv. lapsa*, *P. s. pv. aptata* и *P. s. pv. syringae* није омогућила комбинација тестова којима се утврђују биохемијске и серолошке особине, стварање сирингомицина и BOX-PCR генетички профили, него тестови патогености на 18 биљних врста из спектра домаћина у којима је утврђено да је укупни обим круга домаћина пропорционалан агресивности на врсти диње под називом канталупе. Berge et al. (2014) такође користе тест патогености на дињи канталупе за дефинисање укупног круга домаћина сојева 13 дефинисаних филогрупа, укључујући и 4 филогрупе којима припадају и наши

проучавани сојеви. Поред овог теста патогености, Berge et al. (2014) наводе да и друге карактеристике (попут LOPAT теста, ХР дувана, стварања честица леда, стварања сириномицина, теста сахарозе и д-тартарата) представљају готово униформан фенотип за сваку од 13 филогрупа.

У новије време развијено је неколико алатки за брзо разврставање сојева *P. syringae* комплекса врста као патогена стрних жита. Guilbaud et al. (2016) су развили универзалан ДНК маркер и тзв. Psy-PCR метод за одабир *P. syringae sensu lato* колонија приликом изолације, док су Borschinger et al. (2016) развили сет од 7 парова прајмера и multiplex PCR метод који омогућавају детекцију и карактеризацију у 9 од 13 филогрупа *P. syringae* комплекса (1, 2, 3, 4, 9, 10 и 13), док су парове прајмера за филогрупе 7 и 8 развили Bartoli et al. (2014). Конкретну примену ових алатки на разврставању сојева *P. syringae* комплекса који проузрокују рак кајсије образлажу Parisi et al. (2019).

**Утврђени диверзитет бактерија као патогена стрних жита у контексту категорија штетних организама у фитосанитарном систему.** Основне категорије штетних организама дефинисане међународним фитосанитарним стандардима су категорије карантинског штетног организма (енг. Quarantine pest) и регулисаног некарантинског штетног организма (енг. Regulated non-quarantine pest) (ISPM 16 – Регулисани некарантински организми – концепт и примена). Са становишта фитосанитарног система једне државе, карантински штетни организам је одсутан или му је присуство веома ограничено и подразумева примену фитосанитарних мера за било који пут уношења, економски значај се предвиђа (није познат), а уколико се утврди његово присуство спроводи се службена контрола која за циљ има ерадикацију штетног организма. За разлику од овога, регулисани некарантински штетни организам је присутан (може бити и широко распрострањен), спровођење фитосанитарних мера се односи само на материјал за репродукцију (у случају стрних жита – семе), економски значај је познат, а спровођење службене контроле се односи само на семенски материјал и има за циљ сузбијање штетног организма.

У односу на утврђени диверзитет бактерија као патогена стрних жита у нашим истраживањима и постојећу фитосанитарну регулативу, *P. s. pv. atrofaciens* као припадник филогрупе 2b и *P. s. pv. coronafaciens* као припадник филогрупе 4 су регулисани некарантински штетни организми за чије је присуство одређена толеранција од 1% на семену стрних жита. Сви остали представници филогрупа 2, 4, 7 и 8 нису регулисани као патогени стрних жита, јер већина њих до сада и није



представљала познати диверзитет патогена стрних жита. За све категорије штетних организама у оквиру једног фитосанитарног система се предузимају различити типови прегледа (надзора) са различитим циљем, у зависности од њиховог статуса у моменту предузимања прегледа. Тако је на почетку наших истраживања за све потенцијално присутне бактерије (то јест познати диверзитет бактерија као патогена стрних жита) одређен тип прегледа детекција (табела 10), с обзиром да је до тада у Србији забележено само присуство *P. s. pv. coronafaciens* на овсу и *P. s. pv. syringae* на пшеници. Имајући у виду резултате нашег истраживања, за сваки од патогена који је у овом кораку детектован се у следећем кораку предузима преглед за утврђивање ареала распрострањења, а у каснијим фазама и за мониторинг популације. Циљ овако спроведених прегледа је прикупљање што већег броја података о бактеријама као патогенима стрних жита, њиховој распрострањености и епидемиологији који треба да послуже као основ за процену економских штета и дефинисање могућих начина за њихово сузбијање.

Познати диверзитет бактерија као патогена стрних жита укључује и карантинског патогена (за Србију и велики број других земаља) *X. t. pv. translucens*. Иако у нашим истраживањима диверзитета бактерија као патогена стрних жита у Србији присуство овог патогена није утврђено, процењује се да је ризик од његовог уношења и ширења висок <sup>(1)</sup>.

*X. t. pv. translucens* се преноси семеном, тако да међународна трговина семеном највероватније представља основни пут уласка у нова подручја, а нарочито размена материјала за селекцију, али и као семе за сетву и зрно у сточној исхрани. У промету преко државне границе ризик од присуства недетектованих зараза са *X. t. pv. translucens* увек постоји, чак и поред постојања фитоцертификата којим земља извозница гарантује његово одсуство у пошиљци, нарочито из разлога јер овај патоген није регулисан у оквиру било које од директива или сертификационих шема које дефинишу процес производње семена стрних жита (EU Regulation 2016/2031 везана за здравље биља, Council Directive 66/402/ЕЕС везана за производњу и промет семена у ЕУ, OECD сертификациона шема и сл.), сходно чему у већини земаља (и извозница и

---

<sup>(1)</sup> Оцена ризика од појаве и ширења *X. t. pv. translucens* као карантинског штетног организма израчуната је у складу са препорукама документа Америчког Министарства Пољопривреде (USDA- United States Department of Agriculture): Шема процене ризика од појаве и ширења штетних организама, верзија 5.2. (енг. *USDA Pest Risk Assessment Process Flowchart version 5.2.*). У оцењивању су коришћени и елементи ЕРРО стандарда РМ 5/5(1). Ризик од појаве и ширења *X. t. pv. translucens* оцењен је као висок (кумулативна вредност оцене 28-29) и то на основу збира оцена потенцијала (вредност 16) и последица уношења (вредност 12-13).

увозница) није прописан ни специфични инспекцијски преглед ни дијагностичко тестирање, што повећава ризик од његовог уношења у нова подручја.

Посебан ризик представља увоз семена стрних жита из земаља у којима је *X. t. pv. translucens* већ утврђен и распрострањен (Румунија, Украјина, Русија).

Ризик од уношења *X. t. pv. translucens* је висок, јер обједињује: довољан обим (камиони, барже) транспорта током којег постоје одговарајући услови који омогућавају преживљавање штетног организма, непостојање одговарајућих третмана којима би се могла изложити евентуално заражена роба и погодност свих географских локација потенцијалних тржишта у Србији за преживљавање патогена.

Висок потенцијал за даље ширење овог патогена условљен је чињеницом да су у обе зоне отпорности биљака које постоје у Србији <sup>(1)</sup> присутне и биљке домаћини и погодни климатски услови. У поређењу са климатским карактеристикама подручја у којима је већ утврђен (делови САД, Русија, Украјина и Румунија у којима влада континентална клима специфична по веома топлим летима и изузетно хладним зимама) и климатске карактеристике Србије (умерено-континентална клима са мање или више израженим локалним карактеристикама (Смаилагић и сар., 2014)) су веома повољне за развој и одржавање овог патогена.

С обзиром да патоген презимљава у биљкама (озимим житима), ниске зимске температуре у Србији не би представљале лимитирајући фактор за његов опстанак. Такође, патогену у време класања стрних жита погодује топло време, па судећи према просеку средњих дневних температурама месеца маја може да се развија у скоро свим подручјима у Србији, а пре свега на северу који представља главни регион гајења стрних жита.

У оцени потенцијала за даље ширење *X. t. pv. translucens*, потенцијали његовог расејавања, изазивања економске и/или штете у животној средини и утицаја на животну средину нису толико изражени као потенцијали које обезбеђује присуство биљака домаћина и погодни климатски услови. Иако *X. t. pv. translucens* има висок репродуктивни потенцијал (у повољним условима трајање циклуса може бити краће од 10 дана), нема и способност брзог ширења, јер се током вегетације на мања растојања од око 30 m<sup>2</sup> шири кишним капима, росом, контактом између биљака и инсектима који

---

<sup>(1)</sup> Зоне отпорности биљака се базирају на средњим годишњим минималним зимским температурама које се очекују на датој локацији и могу имати пресудну улогу у способности преживљавања биљке домаћина у датом региону. Србија се према мапи Корпен-Geiger климатске класификације „Зона отпорности биљака за Европу“ (енг. "Plant Hardiness Zones for Europe") налази у зони 6 (делови северне Србије) и зони 7 (подручје централне и јужне Србије) у којима се успешно гаје озима стрна жита, јер на пример озима пшеница добро подноси зимске температуре и до -20°C (Acevedo et al., 2002).

преносе лепљиви бактеријски ексудат (Boosalis, 1952; Mehta, 1990). Такође, патоген изазива две (од три) врсте штета: смањење приноса биљака домаћина и губитак страних и нових тржишта због присуства новог карантинског организма, које је могуће проценити као вредност извоза која се губи у трговинској размени са земљама у којима је штетни организм регулисан као карантински. Посебан проблем представља поузданост података о економским штетама које *X. t. pv. translucens* проузрокује јер сви потичу само из САД, али не и других подручја његове распрострањености (DEFRA Plant Health PRA Team, 2015).

У случају уноса *X. t. pv. translucens*, постојећи законски оквир омогућава предузимање активности дефинисаних у ISPM 9 (Водич за ерадикацију штетних организама) и EPPO pm 9/18 (Шема подршке одлучивању у дефинисању приоритета активности током појаве штетног организма). Такође, статус штетног организма се утврђује према ISPM 8 (Одређивање статуса штетног организма у подручју) и извештава се о његовој појави. С обзиром да се на процедуру Извештавања односе делови три ISPM стандарда 6, 8 и 17 (Извештавање о појави ш.о), униформна форма записа Извештавања се добија њиховим комбиновањем.

Висок ризик од уношења и ширења штетног организма условљава увођење и спровођење специјалних фитосанитарних мера, што у првој фази подразумева развој метода детекције и идентификације за рутинску употребу у фитосанитарним регулаторним процесима, израду и спровођење протокола инспекције семена стрних жита, а на првом месту пошиљки семена стрних жита у промету преко државне границе из земаљама у којима је патоген присутан; затим спровођење надзора (посебних прегледа) у циљу праћења појаве штетног организма у институцијама која се у Србији баве оплемењивањем стрних жита и размењују генетички материјал са земљама у којима је патоген присутан, и на крају увођење редовног система надзора и реализацију истраживања као што су осетљивост сортимената, методе сузбијања и сл.

## 7. ЗАКЉУЧАК

Прегледом усева стрних жита, у периоду од 2009 - 2014 године, на више локалитета у Републици Србији, утврђена је појава симптома налик променама бактериозне природе.

Анализом прикупљених узорака утврђено је да су на оболелим биљкама присутне бактерије као потенцијални проузроковачи уочених симптома.

Симптоми нису поуздан критеријум за постављање дијагнозе. Након обављених истраживања није могуће са сигурношћу закључити колико су уочене разлике у интензитету симптома последица разлика у осетљивости биљних врста и сортимента, разлика у вирулентности проучаваних сојева или утицаја фактора спољне средине.

У циљу идентификације изолованих сојева примењене су класичне методе проучавања патогених и биохемијско-физиолошких одлика бактерија, али и новије молекуларне методе анализе ДНК, чиме је по први пут детаљније окарактерисана популација ових патогена у Србији.

Од 55 проучаваних сојева, изолованих из различитих врста стрних жита, 15 сојева је идентификовано као *P. s. pv atrofaciens* и класификовано у геномоврсту 1, филогрупу 2b. Ово је први налаз *P. s. pv atrofaciens* у Србији и то на различитим биљним деловима пшенице (лист, семе), јечма (лист, доњи део стабла), овса (семе), ражи (лист), тритикалеа (лист) и кукуруза (лист).

Утврђено је да шест сојева који проузрокују симптоме на пшеници (лист), јечму (лист, семе), овсу (лист), ражи (лист), тритикалеу (лист), деле *rpoD* секвенце са *P. s. pv lapsa/aptata* и класификовани су у филогрупу 2b. Ни један од ова два патовара није до сада идентификован као патоген стрних жита у Србији, а такође и података о њиховој појави као патогена стрних жита у свету скоро да и нема.

Међу проучаваним сојевима, осам сојева је идентификовано као *P. viridiflava* и класификовано у геномоврсту 6, филогрупу 7a, док је сој 27тк класификован у филогрупу 8. Према нашим сазнањима, ово је први налаз *P. viridiflava* у свету на стрним житима уопште и то на овсу (лист), ражи (доњи део стабла, глава корена и коренчићи) и тритикалеу (лист, семе).

На основу секвенци 578bp локуса *rpoD* гена, одређени број сојева се није могао идентификовати као један од познатих патовара, али су дефинисани као блиско сродни

(99%) одређеним патоварима и класификовани у филогрупе 2b и 2d, 4 и 8. Тако 10 сојева који су сродни са *P. s. pv. syringae/aptata/atrofaciens/lapsa/japonica* и класификовани у исту филогрупу 2b, проузрокује симптоме на биљним врстама: јечам (лист, семе), овас (семе), тритикале (лист, доњи део стабла), дурум (лист) и кукуруз (лист).

Од два соја класификована у филогрупу 2d, сој 1тк је блиско сродан *P. s. pv. coryli* и проузрокује симптоме на овсу (лист), а сој 17тк је блиско сродан *P. s. pv. aceris/P. s. pv. solidagae* и проузрокује симптоме на доњем делу стабла пшенице. Према нашим сазнањима, ни један од поменутих патовара није до сада идентификован као патоген стрних жита у свету.

Три соја који су блиско сродни *P. s. pv. coronafaciens/oryzae*, проузрокују симптоме на овсу и ражи (семе) и девет сојева блиско сродних *P. s. pv. porri/striafaciens* проузрокују симптоме на овсу (лист, стабло) и ражи (лист) и класификовани су у филогрупу 4. Ово је први налаз патовара из филогрупе 4 на ражи у Србији, док су на овсу такође први пут у Србији пронађени и патовари *P. s. pv. porri* и *P. s. pv. striafaciens*.

На основу резултата наших истраживања, познати диверзитет бактерија као патогена стрних жита се проширује на нове патоваре у оквиру *P. syringae sensu stricto* или некадашњу "збирну врсту *P. syringae*" познату и као *P. syringae* комплекс и на нову врсту (*P. viridiflava*) у оквиру *P. syringae sensu lato* или *P. syringae* комплекс врста.

Резултати наших истраживања потврђују да биохемијско-физиолошке карактеристике нису поуздан критеријум за диференцијацију бактерија припадника популације патогена стрних жита у Србији.

Постојање полиморфизма, то јест више од једног типа колонија истог соја је посебно изражено код представника *P. viridiflava* где је означено и као фенотипска конверзија или фазна варијација фенотипа која утиче и на испољавање разних других својстава, укључујући и стварање левана, проузроковање трулежи кромпира и хиперсензитивне реакције дувана, чиме се доводи у питање и коришћење LOPAT шеме као традиционалног дијагностичког средства, бар за диференцијацију *P. viridiflava* до нивоа врсте.

Стварање токсина, с друге стране може имати диференцијални карактер, али само у карактеризацији сојева из филогрупе 2 и то оног дела популације који ствара сириngoмицин.

Применом гер-PCR методе је утврђено да проучавани сојеви *P. syringae* комплекса врста изоловани са стрних жита у Србији показују висок ниво генетичког диверзитета.

Такође, резултати показују и да су болести које биљне болести на стрним житима у Србији проузрокују бактерије резултат интеракција најмање две валидно описане врсте бактерија (*P. syringae* и *P. viridiflava*) које се налазе у склопу *P. syringae sensu lato*, али и различитих патовара/филогенетски удаљених популација у оквиру *P. syringae sensu stricto*, што указује и на неопходност дефинисања новог Коховог постулата који узима у обзир и позитивну корелацију интеракције између микроорганизама и појаве болести (или разлике у њеном интензитету).

Прилагођавањем метода коришћених у дијагнози и диференцијацији бактерија патогена стрних жита потребама анализа у фитосанитарном систему обезбеђује се и практичан значај наведеним истраживањима.

## 8. ЛИТЕРАТУРА

- Aagot, N., Nybroe, O., Nielsen, P. and Johnsen, K. (2001): An altered *Pseudomonas* diversity is recovered from soil by using nutrient- poor *Pseudomonas* selective soil extract media. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67(11): 5233-5239.
- Acevedo, E., Silva, P. and Silva, H. (2002): Wheat growth and physiology. In *Bread Wheat Improvement and Production*. B.C. Curtis, S. Rajaram and H. Gomez Macpherson, Eds. FAO, Rome. pp. 39-70.
- Adhikari, T.B., Hanse'n, J.M., Gurung, S. and Bonman, J. M. (2012): Pathogenic and genetic diversity of *Xanthomonas translucens* pv. *undulosa* in North Dakota. *Phytopathology*, 102:390-402.
- Afonin, A., Greene, S., Dzyubenko, N. and Frolov, A. (2008): Interactive Agricultural Ecological Atlas of Russia and Neighboring Countries. Economic Plants and their Diseases, Pests and Weeds [Online]. Доступно на: <http://www.agroatlas.ru>.
- Agrios, G. N. (2005): *Plant pathology*, 5th ed. Academic Press, San Diego, CA. USA. 922 pp.
- Akhtar, A., M., Hamid, S. J. and Aslam, M. (1986): Evaluation of resistance of wheat to bacterial leafblight. *Pakistan J. Agric. Res.*, 7 (3): 168-170.
- Alexandrova, M., Zaccardelli, M., Stefani, E. and Bazzi, C. (1995): Testing for *Pseudomonas syringae* pv. *atropaciens* and *Xanthomonas campestris* pathovars on cereals in Italy. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 25: 437-448.
- Alizadeh, A. and Rahimian, H. (1989): Bacterial leaf strike of Graminea in Iran. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 19: 113-117.
- Almeida, N.F., Yan, S., Cai, R., Clarke, C. R., Morris, C. E., Schaad, N. W., Schuenzel, E. L., Lacy, G. H., Sun, X., Jones, J. B., Castillo, J. A., Bull, C. T., Leman, S., Guttman, D. S., Setubal, J. C. and Vinatzer, B. A. (2010): PAMDB, a multilocus sequence typing and analysis database and website for plant-associated microbes. *Phytopathology*, 100(3): 208-215.
- Alvarez, A. M. (2004): Integrated approaches for detection of plant pathogenic bacteria and diagnosis of bacterial diseases. *Annual Review Phytopathology* 42: 339–366.



- Amanifar, Naser. (2019): First Report of *Pseudomonas syringae* pv. *lapsa* Causing Leaf Streak and Black Chaff of Winter Wheat in Southwest Iran. *Plant Disease*. 104 (1): 276-276.
- An, J. H., Noh, Y. H., Kim, Y. E., Lee, H. I. and Cha J. S. (2015): Development of PCR and TaqMan PCR assays to detect *Pseudomonas coronafaciens* a causal agent of halo blight of oats. *The Plant Pathology Journal*, 31(1): 25-32.
- Andrade, C. C. L., Resende, R. S., Rodrigues, F. A., Ferraz, H. G. M., Moreira, W. R., Oliviera, J. R. and Mariano, R. L. R. (2013): Silicon reduces bacterial speck development on tomato leaves. *Trop Plant Pathol* 38: 436–442.
- Arrebola, E., Carrion, V. J., Murillo, J., de Vicente, A. and Cazorla, F. M. (2010): Unravelling molecular aspects of mangotoxin, a virulence factor produced by the phytopathogenic strain *Pseudomonas syringae* pv *syringae*. 8<sup>th</sup> International Conference on *Pseudomonas syringae* and related pathogens. Oxford, 31<sup>st</sup> August-3<sup>rd</sup> September 2010. Book of abstracts, 29.
- Арсенијевић, М. (1986): *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* van Hall као паразит пшенице. *Заштита биља*, 37 (1): бр. 175: 67- 78.
- Arsenijević, M. (1991): Bacterial sheath brown rot of rice, wheat, maize and sorghum plants. *Savremena Poljoprivreda*, 1991, 39 (1): pp 66-71.
- Arsenijevic, M. (1995): Plant pathogenic bacteria pathogens of small grain cereals. *Zastita Bilja*. 46 (4): 239-247.
- Арсенијевић, М. (1997): Бактериозе биљака. S-print, Нови Сад, 1997, треће измењено и допуњено издање.
- Арсенијевић, М. и Балаж, Ј. (1986): Пшеница (*Triticum aestivum* ssp. *vulgare* /Vill. Host/ Мас Кеу) као тест патогености *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* van Hall. Посебан отисак из часописа *Заштита биља*, 37 (3): бр.177.
- Арсенијевић, М. и Костић, Б. (1989): Бактериозна пегавост класова пшенице. Посебан отисак из часописа *Заштита биља*, 40 (1): бр. 187.
- Ashraf, M., M. Ahmad, S. A., Öztürk, M. and Aksoy, A. (2012): Crop improvement through different means, pp. 1-15. In: Ashraf, et al (ed), *Crop Production for Agricultural Improvement*. Springer.

- Audy, P., Braat, C. E., Saindon, G., Huang, H. C. and Laroche, A. (1996): A rapid and sensitive PCR-based assay for concurrent detection of bacteria causing common and halo blights in bean seed. *Phytopathology* 86: 361–366.
- Azad, H. and Schaad, N. W. (1988a): Serological relationships among membrane proteins of strains of *Xanthomonas campestris* pv. *translucens*. *Phytopathology*, 78 (3): 272-277.
- Azad, N. and Schaad, N. W. (1988b): The relationship of *Xanthomonas campestris* pv. *translucens* to frost and the effect of frost on black chaff development in wheat. *Phytopathology*, 78: 95-100.
- Bugwood Wiki (n. d.): Bacterial Stripe Blight (barley): доступно на: <http://wiki.bugwood.org>
- Balestra, G. M., Heydari, A., Ceccarelli, D., Ovidi, E. and Quattrucci, A. (2009): Antibacterial effect of *Allium sativum* and *Ficus carica* extracts on tomato bacterial pathogens. *Crop Protection* 28: 807–811.
- Baltrus, D. A., Yourstone, S., Lind, A., Guilbaud, C., Sands, D. C., Jones, C. D., Morris, C. E. and Dangl, J. L. (2014): Draft genome sequences of a phylogenetically diverse suite of *Pseudomonas syringae* strains from multiple source populations. *Genome Announc.* 2 (1): e01195-13.
- Bamberg, R.H. (1936): Black chaff disease of wheat. *Journal of Agricultural Research* 52: 397-417.
- Barta, T.M. and Willis, D.K. (2005): Biological and molecular evidence that *Pseudomonas syringae* pathovars *coronafaciens*, *striaefaciens* and *garcae* are likely the same pathovar. *J. Phytopathology*, 153: 492-499.
- Bartoli, C., Berge, O., Monteil, C. L., Guilbaud, C., Balestra, G. M., Varvaro, L., Jones, C., Dangl, J. L., Baltrus, D. A., Sands, D. C. and Morris, C. E. (2014): The *Pseudomonas viridiflava* phylogroups in the *P. syringae* species complex are characterized by genetic variability and phenotypic plasticity of pathogenicity-related traits. *Environ Microbiol*: 16 (7): 2301- 15.
- Bartoli, C., Lamichhane, J. R., Berge O., Guilbaud, C., Varvaro, L., Balestra, G. M., Vinatzer, B. A. and Morris, C. E. (2015): A framework to gauge the epidemic potential of plant pathogens in environmental reservoirs: the example of kiwifruit canker. *Molecular Plant Pathology* 16 (2): 137–149.

- Bashan, Y. and De-Bashan, L. E. (2002): Reduction of bacterial speck (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) of tomato by combined treatments of plant growth-promoting bacterium, *Azospirillum brasilense*, streptomycin sulfate, and chemo-thermal seed treatment. *Eur. J. Plant Pathol.* 108: 821–829.
- Bender, C. L., Alarcón-Chaidez, F. and Gross, D. C. (1999): *Pseudomonas syringae* phytotoxins: Mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases. *Microbiology and molecular biology reviews*, 63 (2): 266- 292.
- Bergey, D. H. and Holt, J. G. (1994): *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th Edition, Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland.
- Bereswill, S., Bugert, P., Volksch, B., Ullrich, M., Bender, C. and Geider, K. (1994): Identification and relatedness of coronatine- producing *Pseudomonas syringae* pathovars by PCR analyses and sequence determination of the amplification products. *Applied and Environmental Microbiology*, 60 (8): 2924-2930.
- Berge, O., Monteil, C. L., Bartoli, C., Chandeysson, C., Guilbaud, C., Sands, D. C. and Morris, C. (2014): A user's guide to a data base of the diversity of *Pseudomonas syringae* and its application to classifying strains in this phylogenetic complex. *PLoS ONE* 9 (9): e105547.
- Boosalis, M., G. (1952): The epidemiology of *Xanthomonas translucens* (J. J. and R.) Dowson on cereals and grasses. *Phytopathology*, 42: 382-395.
- Borschinger, B., Bartoli, C., Chandeysson, C., Guilbaud, C., Parisi, L., Bourgeay, J.F., Buisson, E. and Morris, C. (2016): A set of PCRs for rapid identification and characterization of *Pseudomonas syringae* phylogroups. *Journal of Applied Microbiology*, 121; 903.
- Bowden, R. L. and Stromberg, E.L. (1982): Chocolate Spot of Corn in Minnesota. *Plant Disease*, 66 (8): 744.
- Bradbury, J. F. (1970): Isolation and preliminary study of bacteria from plants. *Rev. Pl. Path.*, 49 (5): 213-218.
- Bradbury, J. F. (1986): *Guide to Plant Pathogenic Bacteria*. CAB International Mycological Institute, Farnham House, Slough, UK. 332pp.

- Bragard, C. and Verhoyen, M. (1993): Monoclonal antibodies specific for *Xanthomonas campestris* bacteria pathogenic on wheat and other small grains, in comparison with polyclonal antisera. *Journal of Phytopathology*, 139: 217-228.
- Bragard, C., Mehta, Y.R. and Maraite, H. (1993): Serodiagnostic assays vs. the routine techniques to detect *Xanthomonas campestris* pv. *undulosa* in wheat seeds. *Journal of Phytopathology* 18: 42-50.
- Bragard, C., Verdier, V. and Maraite, H. (1995): Genetic diversity among *Xanthomonas campestris* strains pathogenic for small grains. *Applied and Environmental Microbiology*, 61 (3): 1020-1026.
- Bragard, C., Singer, E., Alizadeh, A., Vautrin, L., Maraite, H. and Swings, J. (1997): *Xanthomonas translucens* from small grains: Diversity and phytopathological relevance. *Phytopathology*, 87: 1111-1117.
- Braun-Kiewnick, A., Jacobsen, B. and Sands, D. C. (2000): Biological control of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, the causal agent of basal kernel blight of barley, by antagonistic *Pantoea agglomerans*. *Phytopathology*, 90: 368-375.
- Bull, C. T., De Boer, S. H. Denny, T.P., Firrao, G., Fischer-Le Saux, M., Saddler, G. S., Scortichini, M., Stead D. E. and Takikawa, Y. (2010): Comprehensive list of names of plant pathogenic bacteria, 1980-2007. *Journal of Plant Pathology*, 92 (3): 551-592.
- Bull, C. T., Clarke, C. R., Cai, R., Vinatzer, B., A., Jardini, T., M. and Koike, S., T. (2011): Multilocus sequence typing of *Pseudomonas syringae* sensu lato confirms previously described genomospecies and permits rapid identification of *P. syringae* pv. *coriandricola* and *P. syringae* pv. *apii* causing bacterial leaf spot on parsley. *Phytopathology*, 101: 847-858.
- Bull, C, T. and Koike, S. T. (2015): Practical Benefits of Knowing the Enemy: Modern Molecular Tools for Diagnosing the Etiology of Bacterial Diseases and Understanding the Taxonomy and Diversity of Plant-Pathogenic Bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 53 (1): 157-180.
- Bultreys, A. and Gheysen, I. (1999): Biological and molecular detection of toxic lipodepsipeptide-producing *Pseudomonas syringae* strains and PCR identification in plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 1904-1909.

- Butsenko, L., Pasichnik, L., Kolomiets, Y., Kalinichenko, A., Suszanowicz, D., Sporek, M. and Patyka, V. (2020): Characteristic of *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* Isolated from Weeds of Wheat Field. *Applied Sciences*. 11. 286.
- CABI (2015): *Crop Protection Compendium*. Wallingford, UK: CAB International, Доступно на: [www.cabi.org/cpc](http://www.cabi.org/cpc).
- Canaday, C. H., Wyatt, J. E. and Mullins, J. A. (1991): Resistance in broccoli to bacterial soft rot caused by *Pseudomonas marginalis* and fluorescent *Pseudomonas* species. *Plant Disease* 75: 715–20.
- Carlson, R., R. and Vidaver, A. K. (1982): Bacterial mosaic, a new corynebacterial disease of wheat. *Plant disease*, 66: 76-79.
- Carrión, V. J., Gutiérrez-Barranquero, J. A., Arrebola, E., Bardaji, L., Codina, J. C., de Vicente, A., Cazorla, F. M. and Murillo, J. (2013): The mangotoxin biosynthetic operon (mbo) is specifically distributed within *Pseudomonas syringae* genomospecies 1 and was acquired only once during evolution. *Applied and Environmental Microbiology* 79: 756-767.
- Carotenuto, F., Georgiadis, T., Gioli, B., Leyronas, C., Morris, C. E., Nardino, M., Wohlfahrt, G. and Miglietta, F. (2017): Measurements and modeling of surface–atmosphere exchange of microorganisms in Mediterranean grassland. *Atmospheric Chemistry and Physics*, European Geosciences Union, 17: 14919-14936.
- Cepni, E. and Gurel F. (2012): Variation in extragenic repetitive DNA sequences in *Pseudomonas syringae* and potential use of modified REP primers in the identification of closely related isolates. *Genetics and Molecular Biology*, 35 (3): 650-656.
- Chang, R. J., Ries, S. M. and Hewings, A. D. (1990): Bacterial mosaic of wheat in Illinois. *Plant Disease*: 1037.
- Cho, M. S. , Jeon, Y. H., Kang, M. J., Ahn, H. I., Baek, H. J., Na, Y. W., Choi, Y. M., Kim, T. S. and Park, D. S. (2009): Sensitive and specific detection of phaseolotoxigenic and nontoxigenic strains of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* by TaqMan real-time PCR using site-specific recombinase gene sequences. *Microbiol. Res.* 165: 565–572.
- CIMMYT (n.d.): Basal Glume Rot: *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* (McCulloch 1920) Young et al. 1978: доступно на: <http://wheatdoctor.org/basal-glume-rot>.

- Cintas, N. A., Koike, S. T. and Bull, C. T. (2002): A new pathovar, *Pseudomonas syringae* pv. *alisalensis* pv.nov., proposed for the causal agent of bacterial blight of broccoli and broccoli raab. *Plant Disease*, 86 (9): 992-998.
- Claflin, L. E. (2003): Control of *Pseudomonas syringae* pathovars. In: "*Pseudomonas* and related pathogens- biology and genetics" edited by Nicola Sante Iacobellis, Alan Collmer, Steven W. Hutcheson, John W. Mansfield, Cindy E. Morris, Jesus Murillo, Norman W. Schaad, David E. Stead, Giuseppe Surico, Matthias S. Ullrich, Kluwer academic publishers, Dordrecht, the Netherlands, 423- 430.
- Claflin, L. E. and Ramundo, B. A. (1987): Evaluation of the DOT-Immunobinding assay for detecting phytopathogenic bacteria in wheat seeds. *Journal of Seed Technology*, 11: 53-61.
- Clarke, C., Cai, R., Studholme, D., Guttman, D. and Vinatzer B. A. (2010): *Pseudomonas syringae* strains naturally lacking the classical *P. syringae* *hrp/hrc* locus are common leaf colonizers equipped with an atypical type III secretion system. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 23 (2): 198- 210.
- Colin, J., Bragard, C. and Maraite, H. (1990): A detached leaf inoculation technique for pathogenicity testing of *Xanthomonas campestris* on cereals. *Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent*, 55 (3a): 1125-1131.
- Cook, R. J. and Veseth, R. J. (1991): *Wheat health management*. APS Press.
- Council Directive 66/402/EEC of 14 June 1966 on the marketing of cereal seed (1966): *Official Journal European Union* L125, 2309– 2319, доступно на: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/en/ALL/?uri=CELEX:31966L0402>
- Council Regulation (EU) 2016/2031 of the European Parliament of the Council of 26 October 2016 on protective measures against pests of plants, amending Regulations (EU) No 228/2013, (EU) No 652/2014 and (EU) No 1143/2014 of the European Parliament and of the Council and repealing Council Directives 69/464/EEC, 74/647/EEC, 93/85/EEC, 98/57/EC, 2000/29/EC, 2006/91/EC and 2007/33/EC. Доступно на: <http://data.europa.eu/eli/reg/2016/2031/oj>
- Conn, K. E. and Gubler, W. D. (1993): Bacteria blight of kiwi fruit in California. *Plant Disease* 7: 228- 230.

- Cunfer, B., M. and Schaad N.W. (1976): Halo blight of rye. *Plant Disease Reporter*, 60: 61-64.
- Cunfer, B.M. and Youmans, J. (1978): Effect of irradiance upon the population of *Pseudomonas coronafaciens* in leaves and symptom expression of halo blight of rye. *Can. J. Microbiol.*, 25: 163- 166.
- Cunfer, B., M. and Scolari, B. (1982): *Xanthomonas campestris* pv. *translucens* on triticale and other small grains. *Phytopathology*, 72 (6): 683-686.
- Cunfer, B., M., Schaad N.W. and Morey D.D. (1978): Halo Blight of Rye: Multiplicity of symptoms under field conditions. *Phytopathology*, 68 (11): 1545-1548.
- Cupples, D. A. (1983): Isolation and characterization of phages useful for identifying *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Phytopathology* 73:1376–1381.
- DEFRA Plant Health PRA Team (2015): Rapid Pest Risk Analysis (PRA) for: *Xanthomonas translucens* pathovar *translucens*. Department for Food, Environment and Rural Affairs, Room 11G35, Sand Hutton, York, YO41 1LZ. Доступно на: <https://secure.fera.defra.gov.uk/phiw/riskRegister>
- Demba, D. M., Monteil, C. L., Vinatzer, B. A., Clarke C. R., Glaux, C., Guilbaud, C., Desbiez, C. and Morris, C. E. (2012): *Pseudomonas syringae* naturally lacking the canonical type III secretion system are ubiquitous in nonagricultural habitats, are phylogenetically diverse and can be pathogenic. *The ISME Journal*: 6: 1325–1335.
- Denny, T. P. and Baek, S. (1991): Genetic evidence that extracellular polysaccharide is a virulence factor of *Pseudomonas solanacearum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 4: 198–206.
- Denny, T. P., Gilmour, M. N. and Selander, R. K. (1988): Genetic diversity and relationships of two pathovars of *Pseudomonas syringae*. *Journal of general microbiology*, 134 (7): 1949–1960.
- Denny, T. P., Brumbley, S. M., Carney, B. F., Clough, S. J. and Schell, M. A. (1993): Regulation of virulence in *Pseudomonas solanacearum*. In *Bacterial Wilt. Proceedings of an international conference held at Kaohsiung, Taiwan, 28–31 October 1992*. ACIAR Proceedings no. 45. Hartman, G.L., and Hayward, A.C. (eds): Canberra, Australia: Australian Centre for International Agricultural Research, pp. 252–256.



- Diekmann, M. and Putter, C. A. J. (1995): Small grain temperate cereals. FAO IPGRI Technical guidance for the safe movement of germplasm, no. 14.
- Dorati, F., Sanchez-Contreras, M., Arnold, D.L., Waterfield, N.R. and Jackson, R.W. (2010): *Pseudomonas* interactions with other organisms: survival mechanisms for the environment. 8<sup>th</sup> International Conference on *Pseudomonas syringae* and related pathogens. Oxford, 31<sup>st</sup> August-3<sup>rd</sup> September 2010. Book of abstracts, 31.
- Dubnau, D. and Losick, R. (2006): Bistability in bacteria. *Mol Microbiol.* 61: 564–572.
- Dudnik, A. and Dudler, R. (2014): Genomics-based exploration of virulence determinants and host-specific adaptations of *Pseudomonas syringae* strains isolated from grasses. *Pathogens* 2014, 3: 121- 148.
- Dutta, B., Gitaitis, R., Agarwal, G., Coutinho, T. and Langston, D. (2018): *Pseudomonas coronafaciens* sp. nov., a new phyto-bacterial species diverse from *Pseudomonas syringae*. *PloS one*, 13 (12): e0208271.
- Duveiller, E. (1989): Research on “*Xanthomonas translucens*” of wheat and triticale at CIMMYT. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 19: 97- 103.
- Duveiller, E. (1990): A seed detection of *Xanthomonas campestris* pv. *undulosa* using a modification of Wilbrink's agar medium. *Parasitica*, 46 (1): 3- 17.
- Duveiller, E. (1994a): A pictorial series of disease assesment keys for bacterial leaf streak of cereals. *Plant Disease*, 78 (2): 137-141.
- Duveiller, E. (1994b): A study of *Xanthomonas campestris* pv. *undulosa* populations associated with symptomless wheat leaves. *Parasitica*, 50 (3-4): 109-117.
- Duveiller, E. (1994c): Bacterial leaf strike or black chaff of cereals. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 24: 135-157.
- Duveiller E. and Maraite, H. (1990): Bacterial sheath rot of wheat caused by *Pseudomonas fuscovaginae* in the highlands of Mexico. *Plant Disease* 74: 932– 935.
- Duveiller, E. and Bragard, C. (1992): Comparison of immunofluorescence and two assays for detection of *Xanthomonas campestris* pv. *undulosa* in seeds of small grains. *Plant Disease*, 76: 999-1003.

- Duveiller, E. and Maraite, H. (1993a): Study on yield loss due to *Xanthomonas campestris* pv *undulosa* in wheat under high rainfall temperate conditions. *Journal of Plant Diseases and Protection* 100: 453-459.
- Duveiller, E. and Maraite, H. (1993b): *Xanthomonas campestris* pathovars on cereals: Leaf streak or black chaff diseases. In: Ch. 1 of *Xanthomonas*. J. Swings, ed. Chapman and Hall, London, UK, pp. 76-79.
- Duveiller, E. and Maraite, H. (1995): Effect of temperature and air humidity on multiplication of *Xanthomonas campestris* pv. *undulosa* and symptom expression in susceptible and field-tolerant wheat genotypes. *J. Phytopathology*, 143: 227-232.
- Duveiller E, Snacken F, Maraite H. (1989): First detection of *Pseudomonas fuscovaginae* on maize and sorghum in Burundi. *Plant Dis.* 73: 514–517.
- Duveiller, E.; Bragard, C. and Maraite, H. (1991): Bacterial diseases of wheat in the warmer areas - reality or myth? In: *Wheat for the Nontraditional Warm Areas. Proceedings of the International Conference, Iguazu Falls, Brazil*, D. Saunders, ed. Mexico, D. F.: CIMMYT. pp. 189-202.
- Duveiller, E., Fucikovsky, L. and Rudolph, K., (eds.) (1997): *The bacterial disease of wheat: Concepts and methods of disease management*. CIMMYT, Mexico.
- Duveiller, E., Kandel, Y. R., Sharma R. C. and Shrestha, S. M. (2005): Epidemiology of foliar blights (spot blotch and tan spot) of wheat in the plains bordering the Himalayas disease assessment. *Phytopathology*, 95 (3): 248- 256.
- Ђуровић, В. (2021): Антибактеријска и фитохемијска својства пшеничних клијанаца и њихов утицај на квалитет кекса, докторска дисертација, Агрономски факултет у Чачку Универзитета у Крагујевцу.
- El Attari H., Sarrafi A., Alizadeh A., Dechamp-Guillaume, G. and Barrault G. (1996a): Genetic analyses of partial resistance to bacterial leaf streak (*Xanthomonas campestris* pv. *cerealis*) in wheat. *Plant Pathology* 45: 736-741.
- El Attari, H., Sarrafi, A., Garrigues, S., Dechamp-Guillaume, G. and Barrault, G. (1996b): Diallel analysis of partial resistance to an Iranian strain of bacterial leaf streak (*Xanthomonas campestris* pv. *cerealis*) in wheat. *Plant Pathology*, 45: 1134-1138.

- El- Banoby, F. E. and Rudolph, K. W. E. (1989): Multiplication of *Xanthomonas campestris* pv. *secalis* and *translucens* in host and non-host plants (rye and barley) and development of water soaking. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 19: 105-111.
- El- Sadek, S., A., M., Abdel- Latif, M., R., Abdel-Gawad, T., I. and Nussein, N. A. (1992): Bacterial leaf blight disease of wheat in Egypt. Egypt. J. Microbiol., 27: 177-196.
- EPPO (1997): Data sheets on quarantine pests. *Xanthomonas translucens* pv. *translucens*, доступно на: <https://www.eppo.int>
- EPPO PM 5/5 (1) (2012): Decision-support scheme for an Express Pest Risk Analysis. EPPO Bulletin 42 (3): 457–462.
- EPPO PM 9/18 (2014): Decision support scheme for prioritizing action during outbreaks. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 44 (3), 443–456.
- EPPO PM 1/2 (30) (2021): EPPO A1 and A2 list of pest recommended for regulation as quarantine pests, доступно на: <https://gd.eppo.int/standrds/pm1/>
- Failor, K. C, Schmale, D. G. 3rd, Vinatzer, B. A. and Monteil, C. L. (2017): Ice nucleation active bacteria in precipitation are genetically diverse and nucleate ice by employing different mechanisms. ISME Journal 11 (12):2740-2753.
- Falahi Charkhabi, N., Shams-bakhsh, M. and Rahimian, H. (2015): Reaction of Iranian Cereal Genotypes to Multiple Strains of *Xanthomonas translucens* pv. *cerealis*. Journal of Agricultural Science and Technology 17: 241-248.
- Fanelli, V., Cariddi, C. and Finetti-Sialer, M. (2007): Selective detection of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* using dot blot hybridization and real-time PCR. Plant Pathology 56:683–691.
- Fang, C. T., Allen, O. N., Riker, A. J. and Dickson, J. G. (1950): The pathogenic, physiological and serological reactions of the form species of *Xanthomonas translucens*. Phytopathology, 40: 44-64.
- FAOSTAT (2021): Crops and livestock products, доступно на: <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>
- Flaherty JE, Jones JB, Harbaugh BK, Jackson LE (2000): Control of bacterial spot on tomato in the greenhouse and field with H-mutant bacteriophages. HortScience 35: 882– 884.

- Forster, R. L. and Schaad, N., W. (1988): Control of black chaff of wheat with seed treatment and a foundation seed health program. *Plant Disease*, 72: 935- 938.
- Forster, R.L. and Schaad, N. W. (1990): Longevity of *Xanthomonas campestris* pv. *translucens* in wheat seeds under storage conditions. In: Proceedings of the 7th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria Vol. 1, pp. 329- 331. Akademiai Kiadó, Budapest, Hungary.
- Forster, R.L. and Bradbury, J., F. (1990): Pink seed of wheat caused by *Erwinia rhapontici* in Idaho. *Plant Disease*, *Plant Disease* 74: 81.
- Fourest, E., Rehms, L. D., Sands, D. C., and Bjarko, M. (1990): Eradication of *Xanthomonas campestris* pv. *translucens* from barley seed with dry heat treatments. *Plant Disease*, 74: 816-818.
- Frommel, M. I. and Pazos, G. (1994): Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *undulosa*-infested wheat seeds by combined liquid medium enrichment and ELISA. *Plant Pathology* 43, 589- 596.
- Fryda, S., J. and Ota, J., D. (1978): Epiphytic movement and survival of *Pseudomonas syringae* on spring wheat. *Phytopathology*, 68: 1064- 1067.
- Gadewar, A. V., Shekhawat, G. S. and Chakbarti, S. K. (1993): Antibiotic-induced virulence and changes in colony morphology of *Pseudomonas solanacearum*. Pp 261- 268. In: Bacterial wilt (Hartman GL and Hayward AC, Eds): ACIAR Proc. No 45, pp 261- 268.
- Gardan, L., Shafik, H., Belouin, S., Broch, R., Grimont, F. and Grimont, P. A. D. (1999): DNA relatedness among the pathovars of *Pseudomonas syringae* and description of *Pseudomonas tremae* sp. nov. and *Pseudomonas cannabina* sp. nov. (ex Sutic and Dowson): *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49: 469- 478.
- Gašić, K., Prokić, A., Ivanović, M., Kuzmanović, N. and Obradović, A. (2012): Differentiation of *Pseudomonas syringae* pathovars originating from stone fruits. *Pesticides and Phytomedicine* 27 (3): 219-229.
- Guilbaud, C., Morris, C.E., Barakat, M., Ortet, P. and Berge, O. (2016): Isolation and identification of *Pseudomonas syringae* facilitated by a PCR targeting the whole *P. syringae* group. *FEMS microbiology ecology*, 92(1): fiv146.

- Girard, L., Lood, C., Rokni-Zadeh, H., van Noort, V., Lavigne, R. and De Mot, R. (2020): Reliable Identification of Environmental *Pseudomonas* Isolates Using the *rpoD* Gene. *Microorganisms*, 8 (8): 1166.
- Glinushkin, A., Beloshapkina, O., Solovykh, A., Sudarenkov, G. and Molnár, J. (2016): Bacterial Diseases of Wheat in the Southern Ural: Manifestations, Biological Characteristics and Monitoring Features. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*. 51: 57-67.
- Gonzalez, A. J., Rodicio M. R. and Mendoza M. C. (2003): Identification of an emergent and atypical *Pseudomonas viridiflava* lineage causing bacteriosis in plants of agronomic importance in a Spanish region. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (5): 2936–2941.
- Goss, E. M., Kreitman, M. and Bergelson, J. (2005): Genetic Diversity, Recombination and Cryptic Clades in *Pseudomonas viridiflava* Infecting Natural Populations of *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, 169 (1): 21–35.
- Gouk, S. C., Mace, E. and Byrne, L. (2010): Profiling copper and antibiotic resistant *Pseudomonas* spp. from Australian pome and stone fruit blossoms. 8<sup>th</sup> International Conference on *Pseudomonas syringae* and related pathogens. Oxford, 31<sup>st</sup> August-3<sup>rd</sup> September 2010. Book of abstracts, 34.
- Gnanamanickam, S. and Immanuel, J. (2007): Epiphytic bacteria, their ecology and functions. In *Plant-Associated Bacteria*; Gnanamanickam, S., Ed.; Springer: Dordrecht, The Netherlands, pp. 131-154.
- Greenberg, J., Jelenska, J. and Lee, J. (2010): *Pseudomonas syringae* type III effector roles and host responses. 8<sup>th</sup> International Conference on *Pseudomonas syringae* and related pathogens. Oxford, 31<sup>st</sup> August-3<sup>rd</sup> September 2010. Book of abstracts, 18.
- Grimault, V., Germain, R. and Politikou, A. (2012): Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *psii* on *Pisum sativum* (pea) seed. International Seed Testing Association (ISTA) Zürichstr, Switzerland, p 12.
- Gutiérrez-Barranquero, J. A., Carrión, V. J., Murillo, J., Arrebola, E., Arnold, D. L., Cazorla, F. M. and de Vicente, A. (2013): A *Pseudomonas syringae* diversity survey reveals a differentiated phylotype of the pathovar *syringae* associated with the mango host and mangotoxin production. *Phytopathology* 103: 1115- 1129.

- Hagborg, W. A. F. (1970): Carboxanilide systemic chemicals in the control of leaf and stem rusts of wheat. *Canadian Journal of Plant Science*, 50 (6): 631-641.
- Hagborg, W. A. F. (1974): Notes on bacterial diseases of cereals and some other crop plants. *Canadian Plant Disease Survey* 54: 129-151.
- Hall, V. N., Kim, H.K. and Sands, D.C. (1981): Transmission and epidemiology of *Xanthomonas translucens*. *Phytopathology* 71: 878.
- Hampl, V., Pavlicek, A. and Flegr, J. (2001): Construction and bootstrap analysis of DNA fingerprinting-based phylogenetic trees with the freeware program FreeTree: Application to trichomonad parasites. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51: 731-735.
- Hauben, L., Vauterin, L., Swings, I. and Moore, E. (1997): Comparison of 16S rDNA sequences of all *Xanthomonas* species. *International Journal of Systemic Bacteriology* 47: 328-335.
- Heredia-Ponce, Z., de Vicente, A., Cazorla, F. M. and Gutiérrez-Barranquero, J. A. (2021): Beyond the Wall: Exopolysaccharides in the Biofilm Lifestyle of Pathogenic and Beneficial Plant-Associated *Pseudomonas*. *Microorganisms* 2021, 9: 445.
- Hirano, S. S. and Upper, C. D. (1983): Ecology and epidemiology of foliar bacterial plant pathogens. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 21: 243-269.
- Hirano, S. S. and Upper, C. H. (2000): Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae*-a pathogen, ice nucleus and epiphyte. *Microbiology and molecular biology reviews*, MMBR, 64 (3): 624-653.
- Hofte, M. and De Vos, P. (2007): Plant pathogenic *Pseudomonas* species. In: *Plant Associated Bacteria*. Edited by Gnanamanickam, S. S.: 507- 533.
- Hosford, R., M., Jr. (1982): White blotch in wheat by *Bacillus megaterium* pv. *cerealis*. *Phytopathology*, 72 (11): 1453-1459.
- Huang, H. C., Hsieh, T. F. and Erickson, R. S. (2003): Biology and epidemiology of *Erwinia rhapontici*, causal agent of pink seed and crown rot of plants. *Plant Pathology Bulletin* 12: 69-76.

- Hwang, M. S. H., Morgan, R., L., Sarkar, S. F., Wang, P. W. and Guttman, D. S. (2005): Phylogenetic characterization of virulence and resistance phenotypes of *Pseudomonas syringae*. *Applied Environmental Microbiology*, 71 (9): 5182-5191.
- Iacobellis, N. S. and Lo Cantore, P. (2010): Potential use of essential oils in bacterial disease control. 8<sup>th</sup> International Conference on *Pseudomonas syringae* and related pathogens. Oxford, 31<sup>st</sup> August-3<sup>rd</sup> September 2010. Book of abstracts, 34.
- Inoue Y. and Takikawa Y. (2000): *Pseudomonas syringae* strains are classified into five groups by comparing DNA homology at the *hrp* neighbouring regions. *J. Gen. Plant Pathol.*, 66: 238-241.
- ISPM 5. (2021): Glossary of phytosanitary terms. Rome, IPPC, FAO.
- ISPM 6. (2018): Surveillance. Rome, IPPC, FAO.
- ISPM 8. (2021): Determination of pest status in an area. Rome, IPPC, FAO.
- ISPM 9. (1998): Guidelines for pest eradication programmes. Rome, IPPC, FAO.
- ISPM 16. (2002): Regulated non-quarantine pests: concept and application, IPPC, FAO.
- ISPM 17. (2002): Pest reporting. Rome, IPPC, FAO.
- Ивановић, М. (2010): Диференцијација сојева *Erwinia amylovora* пореклом из Србије класичним, аутоматизованим и молекуларним методама, докторска дисертација, Пољопривредни факултет Универзитета у Београду.
- Jackson, R. W., Athanassopoulos, E., Tsiamis, G., Mansfield, J. W., Sesma, A., Arnold, D. L., Gibbon, M. J. Murillo, J., Taylor, D. and Vivian, A. (1999): Identification of a pathogenicity island, which contains genes for virulence and avirulence, on a large native plasmid in the bean pathogen *Pseudomonas syringae* pathovar phaseolicola. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96 (19): 10875–10880.
- Janse, J. D. (2005): *Phytobacteriology: Principles and practice*. CAB International, Wallingford, Oxfordshire OX10 8DE, UK: CABI Publishing.
- Jimenez-Sanchez, C., & Hanlon, R., Aho, K., Powers, C., Morris, C. and Schmale, D. (2018): Diversity and Ice Nucleation Activity of Microorganisms Collected With a Small Unmanned Aircraft System (sUAS) in France and the United States. *Frontiers in Microbiology*. 9: 1667.



- Jones, J. B., Jackson, L. E., Balogh, B., Obradovic, A., Iriarte, F. B. and Momol, M. T. (2007): Bacteriophages for plant disease control. *Annual Review of Phytopathology*, 45: 245–262 .
- Kandel, Y.R., Osborne, L.E., Glover, K.D. and Tande, C.A. (2011): Yield loss in spring wheat due to disease caused by *Xanthomonas campestris* pv. *translucens*. *Phytopathology*. 101: S87-S87.
- Kandel, Y. R., Glover, K. D. and Tande, C. A. (2012): Evaluation of spring wheat germplasm for resistance to bacterial leaf streak caused by *Xanthomonas campestris* pv. *translucens*. *Plant Disease*, 96 (12): 1743 – 1748.
- Kayali, M., El- Ahmed, A., Debs, B., Makkouk, K. M., Asaad, S., Kumari, S. G. and Attar, N. (2004): Production of specific antiserum to *Xanthomonas translucens* pv. *undulosa* the 13 causal organism of bacterial stripe on wheat in Syria. *Arab Journal of Plant Protection*. 22:72-76.
- Kazempour, M., N., Kheyrghoo, M., Pedramfar, H. and Rahimian, H. (2010): Isolation and identification of bacterial glum blotch and leaf blight on wheat (*Triticum aestivum* L.) in Iran. *African Journal of Biotechnology*, 8 (20): 2860-2865.
- Kelpsiene, J., Sneideris, D., Burokiene, D. and Suproniene, S. (2021): The presence of pathogenic bacteria *Pseudomonas syringae* in cereals in Lithuania. *Zemdirbyste-Agriculture*. 108: 291-296.
- Kerstens, K., Pot, B., Hoste, B., Gillis, M. and De Ley, J. (1989): Protein electrophoresis and DNA: DNA hybridizations of xanthomonads from grasses and cereals. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 19: 51-55.
- Kim, H. K., Sasser, M. and Sands, D. C. (1982): Selective medium for *Xanthomonas campestris* pv. *translucens*. *Phytopathology*, 72 (7): 936 (abstract).
- Kim, H. K., Orser, C., Lindow, S. E. and Sands, D. C. (1987): *Xanthomonas campestris* pv. *translucens* strains active in ice nucleation. *Plant Disease*, 71: 994-997.
- Kimura, M. (1980): A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of molecular evolution* 16 (2): 111-120.
- Klement, Z., Rudolph, K. and Sands, D. C. (1990): *Methods in Phytobacteriology*. Akademiai Kiado, Budapest, Hungary.

- Кнежевић, Т., Копривица, М., Јевтић, Р. и Обрадовић, А. (2016): Бактериозе стрних жита. Биљни лекар 44 (5-6): 478-486.
- Koike, S. T., Bolda, M. P. and Bull, C. T. (2014): *Pseudomonas* Blight Caused by *Pseudomonas syringae* on Raspberry in California. *Plant Disease*, 98 (8): 1151-1151.
- Kotlyarov, V. V. and Kotlyarov, D. V. (2010): Control of pathogenicity of *Pseudomonas syringae* spp. by disorganization of their community and increasing of plant metabolism. 8<sup>th</sup> International Conference on *Pseudomonas syringae* and related pathogens. Oxford, 31<sup>st</sup> August-3<sup>rd</sup> September 2010. Book of abstracts, 40.
- Кузмановић, Н. (2013): Идентификација, карактеризација и генетички диверзитет сојева *Agrobacterium* spp., проузроковача бактериозног рака винове лозе, докторска дисертација, Пољопривредни факултет Универзитета у Београду
- Lamichhane, J. R. and Venturi, V. (2015): Synergisms between microbial pathogens in plant disease complexes: a growing trend. *Frontiers in plant science* 6: 385.
- Lamichhane, J. R., Messéan, A. and Morris, C. E. (2015): Insights into epidemiology and control of diseases of annual plants caused by the *Pseudomonas syringae* species complex. *J. Gen. Plant Pathol.*, 81 (5): 331-350.
- Langlois P. A., Snelling J., Hamilton J. P., Bragard J. P., Koebnik R., Verdier V., Triplett L.R., Blom J., Tisserat N.A. and Leach J.E. (2017): Characterization of the *Xanthomonas translucens* Complex Using Draft Genomes, Comparative Genomics, Phylogenetic Analysis, and Diagnostic LAMP Assays. *Phytopathology*, 107: 519–527.
- Latorre, B. A. and Jones, A. L. (1979): Evaluation of weeds and plant refuse as potential sources of inoculum of *Pseudomonas syringae* in bacterial canker of cherry. *Phytopathology*, 69: 1122- 1125.
- Latorre, B. A., Gonzales, J. A., Cox, J. E. and Vial, F. (1985): Isolation of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* from cankers and effect of free moisture on its epiphytic populations on sweet cherry trees. *Plant Disease*, 69: 409-412.
- Laue H., Schenk, A., Li, H., Lambertsen, L., Neu, T. R., Molin, S. and Ullrich, M. S. (2006): Contribution of alginate and levan production to biofilm formation by *Pseudomonas syringae*. *Microbiology (Reading, England)*: 152: 2909-2918.

- Lelliott, R. A. and Stead, D. E. (1987): Methods for the Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants. Oxford, UK: Blackwell Scientific Publications.
- Lelliott, R. A., Billing, E. and Hayward, A. C. (1966): A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonads. *Journal of Applied Bacteriology* 29: 470–489.
- Lewis, J. D., Guttman, D. S. and Desveaux, D. (2010): High-throughput identification of *Arabidopsis thaliana* proteins interacting with HopZ family of *Pseudomonas syringae* type III effector proteins. 8<sup>th</sup> International Conference on *Pseudomonas syringae* and related pathogens. Oxford, 31<sup>st</sup> August-3<sup>rd</sup> September 2010. Book of abstracts, 18.
- Lipps, S. and Samac, D.(2022): *Pseudomonas viridiflava*: An internal outsider of the *Pseudomonas syringae* species complex. *Molecular Plant Pathology*. 23: 3-15.
- Lo Cantore, P., Iacobellis, N. S., Senatore, F. and Capasso, F. (2003): Preliminary results on the antibacterial activity of essential oils on some pathovars of *Pseudomonas syringae*. In: "*Pseudomonas* and related pathogens- biology and genetics" edited by Nicola Sante Iacobellis, Alan Collmer, Steven W. Hutcheson, John W. Mansfield, Cindy E. Morris, Jesus Murillo, Norman W. Schaad, David E. Stead, Giuseppe Surico, Matthias S. Ullrich, Kluwer academic publishers, Dordrecht, the Netherlands.
- Loreti, S., Gervasi, F., Gallelli, A. and Scortichini, M. (2008): Further molecular characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *coryli*. *Journal of Plant Pathology*, 90 (1): 57-64.
- Louws, F. J., Wilson, M., Campbell, H. L., Cuppels, D. A., Jones, J. B., Shoemaker, P. B., Sahin, F. and Miller, S. A. (2001): Field control of bacterial spot and bacterial speck of tomato using a plant activator. *Plant Disease* 85: 481–488.
- Lydon, J. and Patterson, C. D. (2001): Detection of tabtoxin-producing strains of *Pseudomonas syringae* by PCR. *Letters in Applied Microbiology*, 32: 166-170.
- Maes, M. and Garbeva, P. (1994): Detection of bacterial phytopathogens based on nucleic acid technology. *Parasitica*, 59 (1-2): 75-80.
- Maes, M., Garbeva, P., Virgula, A. and Crepel, C. (1994): Direct detection of bacterial phytopathogens in plant extracts. *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent*, 59/3b: 1193-1200.

- Maes, M., Garbeva, P. and Kamoen, O. (1996): Recognition and detection in seed of the *Xanthomonas* pathogens that cause cereal leaf streak using rDNA spacer sequences and polymerase chain reaction. *Phytopathology*, 86: 63-69.
- Manceau, C. and Horvais, A. (1997): Assessment of genetic diversity among strains of *Pseudomonas syringae* by PCR- restriction fragment length polymorphism analyses of rRNA operons with special emphasis on *P. syringae* pv. *tomato*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63 (2): 498-505.
- Mansvelt, E. L. and Hattingh, M. J. (1988): Resident populations of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* on leaves, blossoms, and fruits of apple and pear trees. *Journal of Phytopathology*, 121 (2): 135-142.
- Maraite, H., Bragard, C and Duveiller, E (2007): The status of resistance to bacterial diseases of wheat. In: Wheat production in stressed environments. Proceedings of the 7th International Wheat Conference, 27 November - 2 December 2005, Mar Del Plata, Argentina, H.T. Buck, J.E. Nisi & N. Salomón. (Ed.), 37-49, Springer, Netherlands (UE).
- Марић, А. и Јевтић, Р. (2005): Атлас болести ратарских биљака (II издање): Пољопривредни факултет, Нови Сад, Научни институт за ратарство и повртарство, Нови Сад, Школска књига, Нови Сад, стр. 1-197.
- Martinez-Miller, C., A., Braun, S., L. , Siemsen, S., L. and Sands, D., C. (1997): Etiology of basal kernel blight of barley caused by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 19: 337-346.
- Matveeva, E. V., Polityko, V. A., Ignatov, A. N., Nikolaeva, E. V., Pekhtereva, E. S. and Schaad, N. W. (2002): Bacterial pathogens on cereals in the Russian federation. *Phytopathology*, 92: S52.
- Matveeva, I. E. V., Pekhtereva, E. S. H., Polityko, V. A., Ignatov, A. N., Nikolaeva, E. V. and Schaad, N. W. (2003): Distribution and virulence of *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*, causal agent of basal glume rot in Russia. In: "*Pseudomonas* and related pathogens- biology and genetics" edited by Nicola Sante Iacobellis, Alan Collmer, Steven W. Hutcheson, John W. Mansfield, Cindy E. Morris, Jesus Murillo, Norman W. Schaad, David E. Stead, Giuseppe Surico, Matthias S. Ullrich, Kluwer academic publishers, Dordrecht, the Netherlands, pp 97-105.

- Matveeva, E. V., Ignatov A. N., Bobrova, V. K., Milyutina, I. A., Troitsky, A. V., Polityko, V. A. and Schaad, N. W. (2008): Genetic Diversity Among Pseudomonad Strains Associated with Cereal Diseases in Russian Federation. In: “*Pseudomonas syringae* Pathovars and Related Pathogens – Identification, Epidemiology and Genomics”, Editors: M'Barek Fatmi, Alan Collmer, Nicola Sante Iacobellis, John W. Mansfield, Jesus Murillo, Norman W. Schaad, Matthias Ullrich, Kluwer academic publishers, Dordrecht, the Netherlands, pp 337-345.
- McBeath J.H. and Adelman M. (1986a): Detection of *Corynebacterium michiganensis* subsp. *tesselarius* in seeds and wheat plants. *Phytopathology*, 76: 1098 (abstract)
- McBeath J. H. and Adelman, M. (1986b): Halo blight (*Pseudomonas syringae* pv. *coronafaciens*) on grasses in interior Alaska. *Plant Disease*, 70: 801.
- McManus, P.S., Stockwell, V. O., Sundin, G.W. and Jones A. L. (2002): Antibiotic use in plant agriculture. *Annual Review of Phytopathology*, 40: 443- 465.
- Mehta, Y.R. (1986a): Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *undulosa* in field conditions. In: Reunião Nacional de Pesquisa em Trigo, p. 55. Londrina, Brazil.
- Mehta, Y.R. (1986b): Effects of guazatin plus to control *Xanthomonas campestris* pv. *undulosa* in wheat. In: Reunião Nacional de Pesquisa em Trigo, p. 56. Londrina, Brazil.
- Mehta, Y., R. (1990): Management of *Xanthomonas campestris* pv. *undulosa* and *hordei* cereal seed testing. *Seed Science and Technology*, 18: 467-476.
- Mehta, Y. R. and Bassoi, M. C. (1993): Guazatine Plus as a seed treatment bactericide to eradicate *Xanthomonas campestris* pv. *undulosa* from wheat seed. *Seed Science and Technology*, 21: 9-24.
- Mehta, Y. R., Riede, C. R., Campos, L. A. C. and Kohli, M. M. (1992): Integrated management of major wheat diseases in Brazil: an example for the Southern Cone region of Latin America. *Crop Protection*, 11 (6): 517–524.
- Menkissoglu, O. and Lindow, S. E. (1991): Chemical form of copper on leaves in relation to the bactericidal activity of cupric hydroxide deposits on leaves. *Phytopathology* 81: 1263–1270.
- Milus, E. A. and Kirkpatrick, T. L. (1990): Epidemiology of seedborne *Xanthomonas campestris* pv. *translucens* in winter wheat. *Phytopathology*, 80: 966.

- Milus, E. A. and Mirlohi, A. F. (1994): Use of disease reactions to identify resistance in wheat to bacterial streak. *Plant Disease*, 78: 157-161.
- Milus, E. A. and Chalkeley, D. B. (1994): Virulence of *Xanthomonas campestris* pv. *translucens* on selected wheat cultivars. *Plant Disease*, 78 (6): 612- 615.
- Milus, E. A. and Mirlohi, A. F. (1995): Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *translucens* between successive wheat crops in Arkansas. *Plant Disease*, 79: 263-265.
- Milus, E. A., Duveiller, E., Kirkpatrick, T. L. and Chalkley, D. B. (1996): Relationships between disease reactions under controlled conditions and severity of wheat bacterial streak in the field. *Plant disease*, 80: 726-730.
- Misas-Villamil, J. C., Kolodziejek, I., Kaschani, F. Schellenberg, B., Shindo, T., Dudler, R. and van der Horn, R. A. L. (2010): Proteasome inhibitor Syringolin A suppresses ETI and promote distant colonization. 8<sup>th</sup> International Conference on *Pseudomonas syringae* and related pathogens. Oxford, 31<sup>st</sup> August-3<sup>rd</sup> September 2010. Book of abstracts, 36.
- Mittelstadt, H. and Rudolph, K. (1998): Ice nucleation activity of strains from *Pseudomonas syringae* pathovars *atrofaciens* and *syringae*, mainly isolated from cereals. *Journal of Phytopathology*, 146: 581-586.
- Mohan, S., K. and Schaad, N., W. (1987): An improved agar plating assay for detecting *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and *P. s.* pv. *phaseolicola* in contaminated bean seed. *Phytopathology*, 77: 1390- 1395.
- Mohan, S., K. Bijman, V., P. and St. John, L. (2001): Bacterial leaf stripe caused by *Xanthomonas translucens* pv. *cerealis* on intermediate wheatgrass in Idaho. *Plant Disease*, 85 (8): 921.
- Mokryakova, M. V., Ignato, A. N. and Piruzian, E. S. (2010): Probability of horizontal transgenesis genes among bacterium *Xanthomonas*. 8<sup>th</sup> International Conference on *Pseudomonas syringae* and related pathogens. Oxford, 31<sup>st</sup> August-3<sup>rd</sup> September 2010. Book of abstracts, 47.
- Monier, J. M. and Lindow, S. E. (2003): Exploring *Pseudomonas syringae* ecology via direct microscopic observations of the leaf surface. In: "*Pseudomonas* and related pathogens- biology and genetics" edited by Nicola Sante Iacobellis, Alan Collmer, Steven W. Hutcheson, John W. Mansfield, Cindy E. Morris, Jesus Murillo, Norman

- W. Schaad, David E. Stead, Giuseppe Surico, Matthias S. Ullrich, Kluwer academic publishers, Dordrecht, the Netherlands, pp 29-49.
- Monteil, C. L., Guilbaud, C., Glaux, C., Lafolie, F., Soubeyrand, S. and Morris, C. E. (2012): Emigration of the plant pathogen *Pseudomonas syringae* from leaf litter contributes to its population dynamics in alpine snowpack. *Environmental Microbiology* 14 (8): 2099- 2112.
- Monteil, C. L., Cai, R., Lui, H., Mechan Llontop, M. E., Leman, S., Studholme, D. J., Morris, C. E. and Vinatzer, B A. (2013): Non-agricultural reservoirs contribute to emergence and evolution of *Pseudomonas syringae* crop pathogens. *New Phytologist*, 199 (3): 800-811.
- Morris, C. E., Monier J. M. and Jacques, M. A. (1997): Methods for observing microbial biofilms directly on leaf surfaces and recovering them for isolation of culturable microorganisms. *Applied and environmental microbiology* 63 (4): 1570– 1576.
- Morris, C. E., Monier, J.-M. and Jacques, M. A. (1998): A Technique To Quantify the Population Size and Composition of the Biofilm Component in Communities of Bacteria in the Phyllosphere. *Applied and Environmental microbiology*, 64 (12): 4789–4795.
- Morris, C. E., Glaux, C., Latour, X., Gardan, L., Samson, R. and Pitrat, M. (2000): The relationship of host range, physiology, and genotype to virulence on cantaloupe in *Pseudomonas syringae* from cantaloupe blight epidemics in France. *Phytopathology*, 90 (6): 636–646.
- Morris, C. E., Georgakapolous, D. and Sands, D. C. (2004): Ice nucleation active bacteria and their potential role in precipitation. *Journal de Physique*, 121: 87–103.
- Morris, C. E, Kinkel, L. L., Xiao, K., Prior, P. and Sands, D. C. (2007): Surprising niche for the plant pathogen *Pseudomonas syringae*. *Infection, genetics and evolution: Journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 7 (1): 84–92.
- Morris, C. E., Sands, D. C., Vinatzer, B. A., Glaux, C., Guilbaud, C., Buffière, A., Yan, S., Dominguez, H. and Thompson, B. M. (2008): The history of the plant pathogen *Pseudomonas syringae* is linked to the water cycle. *The ISME Journal* 2 (3): 321-334.

- Morris, C. E., Sands, D. C., Vanneste, J. L., Montarry, J., Oakley, B., Guilbaud, C. and Glaux, C. (2010): Inferring the evolutionary history of the plant pathogen *Pseudomonas syringae* from its biogeography in headwaters of rivers in North America, Europe, and New Zealand. *mBio* 1 (3): e00107-10.
- Morris, C.E., Barny, M.-A., Berge, O., Kinkel, L.L. and Lacroix, C. (2017), *Frontiers for research on the ecology of plant-pathogenic bacteria: fundamentals for sustainability. Molecular Plant Pathology*, 18: 308-319.
- Mulet, M., Lalucat, J. and Garcia-Valdes E. (2010): DNA sequence-based analysis of the *Pseudomonas species*. *Environmental microbiology*, 12 (6): 1513–1530.
- Murray, T., D. and Maloy, O., C. (1990): First report of black chaff of wheat caused by *Xanthomonas campestris* pv. *translucens* in Washington State. *Plant Disease*, 74: 183.
- Najafi Pour, G. and Taghavi, S. M. (2011): Comparison of *P. syringae* pv. *syringae* from different hosts based on pathogenicity and BOX-PCR in Iran. *Journal of Agricultural Science and Technology*. 13.
- Najafi Pour, G. and Taghavi, S. M. (2014): Discrimination of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* isolates from different hosts in Iran using pathogenicity tests and RAPD. *International Journal of AgriScience*, 4 (1): 16- 27.
- Nei, M. and Li, W. H. (1979): Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76: 5269-5273.
- Obradovic, A., Jones, J. B., Minsavage, G. V., Dickstein, E. R. and Momol, T. M. (2003): *Pseudomonas huttiensis* associated with leaf necrosis and blighting of tomato seedlings in the greenhouse. In: "*Pseudomonas* and related pathogens- biology and genetics" edited by Nicola Sante Iacobellis, Alan Collmer, Steven W. Hutcheson, John W. Mansfield, Cindy E. Morris, Jesus Murillo, Norman W. Schaad, David E. Stead, Giuseppe Surico, Matthias S. Ullrich, Kluwer academic publishers, Dordrecht, the Netherlands, pp 627-630.
- Otta, J. D. (1974): *Pseudomonas syringae* incites a leaf necrosis on spring and winter wheats in South Dakota. *Plant Disease Reporter* 58: 1061-1064.
- Otta, J. D., (1976): *Pseudomonas syringae*: Rough colony type mutants and filamentous cells. *Phytopathology*, 66: 249-252.



- Otta, J. D. (1977): Occurrence and characteristics of isolation of *Pseudomonas syringae* on winter wheat. *Phytopathology*, 67: 22-26.
- Otta, J. D. and English, H. (1971): Serology and pathology of *Pseudomonas syringae*. *Phytopathology*. 61: 443–452.
- Ovod, V., Ashorn, P., Yakovieva, L. and Krohn, K. (1995): Classification of *Pseudomonas syringae* with monoclonal antibodies against the core and O-site chains of the lipopolysaccharide. *Phytopathology*, 85: 226-232.
- Page, R. D. (1996): TreeView: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences: CABIOS* 12(4): 357-358.
- Palacio- Bielsa, A., Cambra, M. A. and López, M. A. (2009): PCR detection and identification of plant- pathogenic bacteria: Updated review of protocols (1989-2007): *Journal of Plant Pathology*, 91 (2): 249- 297.
- Parisi, L., Morgaint, B., Blanco-Garcia, J., Guilbaud, C., Chandeysson, C. Bourgeay, J. F., Moronvalle, A., Brun, L., Brachet, M. L. and Morris, C. (2019): Bacteria from four phylogroups of the *Pseudomonas syringae* complex can cause bacterial canker of apricot. *Plant Pathol*, 68: 1249-1258.
- Parkinson, N., Cowie, C., Heeney, J. and Stead, D. (2009): Phylogenetic structure of *Xanthomonas* determined by comparison of *gyrB* sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59: 264-274.
- Parkinson, N., Bryant, R., Bew, J. and Elphinstone, J. (2011): Rapid phylogenetic identification of members of the *Pseudomonas syringae* species complex using *rpoD* locus. *Plant Pathology*, 60: 338-344.
- Parte, A. C. (2014): LPSN—list of prokaryotic names with standing in nomenclature. *Nucleic Acids Research*, 42: 613- 616.
- Пасичник, Л., А. (1996): *Pseudomonas fluorescens*- новий возбудитель захворювання ржи. *Мікробіол. Журн.* 57 (2): 3-7.
- Пасичник, Л., А. (1999): Епіфітна фаза існування *Pseudomonas syringae* pv. *coronafaciens*- збудника ореольного бактеріозу вівса. *Мікробіол. Журн.* 61(6): 9- 14.

- Pasichnik, L. (2016): The Spectrum of Weed Phytopathogens in Wheat Agrophytocenosis. *Mikrobiolohichniy zhurnal* (Kiev, Ukraine : 1993): 78 (6): 19-28.
- Пасичник, Л., А. и Королева, И. Б. (1991): *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* - возбудитель бактериальной пятнистости ржи на Украине. *Микробиол. Журн.* 53 (2): 49- 55.
- Pasichnik L.A. and Khodos, S. F. (1996): Heterogeneity of natural population of *Pseudomonas syringae* pv. *coronafaciens*. *Микробиол. Журн.* 58 (4): 3- 6.
- Пасичник, Л., А., Королева, И., и Гвоздяк, Б. (1991): Серологические свойства возбудителя бактериоза ржи *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*. *Микробиол. Журн.* 53 (6): 82–87.
- Pasichnik L. A., Yakovleva L. M., Grozdyak R. I. and Vassilev V. I. (2003): The serological heterogeneity of *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* strains and their ecological niches. *Mikrobiologiya*, 72 (6): 828–833.
- Пасичник, Л. А., Ходос, С., Буценко, Л. и Патыка, В. (2011): Бактериальные болезни пшеницы. *Зерно*, 2.
- Pavlova-Ivanova, L. K. (1989): Morphological variation of colonies of *Pseudomonas syringae* pv. *coronafaciens* causing halo burn of oats. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya*, 1989 (1): 103-106.
- Pereira, M. G., de Oliveira, L. O. and Lee, M. (2000): QTL mapping and disease resistance in cereals. *Journal of new seeds*, 2 (2): 1-21.
- Pernezny, K., Kudela, V., Kokoshova, B. and Hlatka, 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.
- Peters, R. A. Timian, R. G. and Wesenberg, D. (1983): A bacterial kernel spot of barley caused by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Plant Disease*, 67 (4): 435-438.
- Piening, L., J. and MacPherson, D., J. (1985): Stem melanosis, a disease of spring wheat caused by *Pseudomonas cichorii*. *Canadian Journal of Plant Pathology-revue Canadienne De Phytopathologie*, 7: 168-172.
- Правилник о здравственом прегледу усева и објеката за производњу семена, расада и садног материјала и здравственом прегледу семена, расада и садног материјала

("Сл. лист СРЈ", бр. 66/99 и 13/2002, "Сл. лист СЦГ", бр. 10/2003 и 13/2003 и "Сл. гласник РС", бр. 39/2006, 59/2006, 115/2006, 119/2007 и 107/2008).

Правилник о утврђивању листе економски штетних организама („Службени гласник РС“, бр. 25/2008).

Правилник о листама штетних организама и листама биља, биљних производа и прописаних објеката ("Службени гласник РС бр. ", 7/10).

Пољопривредна саветодавна и стручна служба Сомбор (2014): Годишњи извештај о атестираним количинама семена и садног материјала у 2013/2014 години. ПССС Сомбор д.о.о., Сомбор.

Rademaker, J. L. W., Norman, D. J., Forster, R. L., Louws, F. J., Schultz, M. H. and de Bruijn, F. J. (2006): Classification and identification of *Xanthomonas translucens* isolates, including those pathogenic to ornamental asparagus. *Phytopathology*, 96 (8): 876- 884.

Riley, I. T. and Reardon, T. B. (1995): Isolation and characterization of *Clavibacter tritici* associated with *Anguina tritici* in wheat from Western Australia. *Plant Pathology*, 44 (5): 805- 810.

Roberts, P. (1974): *Erwinia rhapontici* (Millard) Burkholder associated with pink grain of wheat. *The Journal of applied bacteriology*, 37 (3): 353–358.

Romero, A. M., Kousik, C. S. and Ritchie, D. F. (2001) Resistance to bacterial spot in bell pepper induced by acibenzolar-S-methyl. *Plant Disease* 85 (2): 189–194.

Roos, I. M. M., and Hattingh, M. J. (1986): Weeds in orchards as potential source of inoculum for bacterial canker of stone fruit. *Phytophylactica*, 18: 5-6.

Rubio, I., Bourzar, H., Jardini, T.M., Koike, S.T. and Bull, C.T. (2012): Novel *Pseudomonas syringae* strains associated with leaf spot diseases on watermelon (*Citrullus lanatus*) and squash (*Cucurbita pepo*) in California. *Phytopathology*. 102: S4.103.

Saari E.E. and Prescott J.M. (1975): A scale for appraising the foliar intensity of winter wheat diseases. *Plant Disease Report*, 59: 337–380.

Saitou, N. and Nei, M. (1987): The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4 (4): 406-425.

- Sands, D.C. (1990): Physiological criteria - determinative tests. In: Methods in Phytobacteriology. Eds. Klement, Z., Rudolph, K., Sands, D.C. Akademiai Kiado, Budapest, Hungary, pp. 133-143.
- Sands, D., C. and Fourest, E. (1989): *Xanthomonas campestris* pv. *translucens* in North and south America and in the Middle East. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 19: 127-130.
- Sands, D. S. Mizrak, G. Hall, V. N., Kim, H.K., Bockelman, H.E. and Golden, M.J. (1986): Seed-transmitted bacterial diseases of cereals: epidemiology and control. Arab Journal of Plant Protection 4: 127-125.
- Sarkar, S. F. and Guttman, D. S. (2004): Evolution of the core genome of *Pseudomonas syringae*, a highly clonal, endemic plant pathogen. Applied and Environmental Microbiology 70 (4): 1999–2012.
- Sarkar, S. F., Gordon, S. J., Martin, G. B. and Guttman, D.S. (2006): Comparative genomics of host-specific virulence in *Pseudomonas syringae*. Genetics 174 (2): 1041–1056.
- Sarris, P. F., Trantas, E. A., Mpalantinaki, E., Ververidis, F. and Goumas, D. E. (2012): *Pseudomonas viridiflava*, a multi host plant pathogen with significant genetic variation at the molecular level. PLoS ONE 7 (4): e36090.
- Sato, M., Watanabe, K. and Sato, Y. (2001): *Pseudomonas syringae* pv. *solidagae* pv. nov., the causal agent of bacterial leaf spot of tall goldenrod *Solidago altissima* L. Journal of General Plant Pathology, 67 (4): 303-308.
- Schaad, N. W. (1979): Serological identification of plant pathogenic bacteria. Annual Review of Phytopathology, 17: 123-147.
- Schaad, N.W. and Cunfer, B.M. (1979): Synonymy of *Pseudomonas coronafaciens*, *Pseudomonas coronafaciens* pathovar *zeae*, *Pseudomonas coronafaciens* subsp. *atropurpurea*, and *Pseudomonas striafaciens*. International Journal of Systematic Bacteriology, 29 (3): 213-221.
- Schaad, N. W. and Forster, R. L. (1985): A semiselective agar medium for isolating *Xanthomonas campestris* pv. *translucens* from wheat seeds. Phytopathology, 75: 260-263.
- Schaad, N. W. and Forster, R. L. (1989): Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *translucens* in wheat. In: Detection of bacteria in seed and other planting material. A.

- W. Saettler, N. W. Schaad., and D. A. Roth, eds. APS Press, St Paul, MN, USA, pp. 41-44.
- Schaad, N.W., Gabrielson, R.L and Mulanase, M.W. (1981): Hot acidified cupric acetate soaks for eradication of *Xanthomonas campestris* from crucifer seeds. *Applied and Environmental Microbiology* 39 (4): 803-807.
- Schaad, N. W., Vidaver, A. K., Lacy, G. H., Rudolph, and Jones, J. B. (2000): Evaluation of proposed amended names of several *Pseudomonads* and *Xanthomonads* and recommendations. *Phytopathology*, 90 (3): 208-213.
- Schaad, N. W., J. B. Jones and Chun, W., Eds. (2001): Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria (3rd ed.): St. Paul, MN: APS Press.
- Scharen, A., L., Bergman, J., W. and Burns, E., E. (1976): Leaf diseases of winter wheat in Montana and losses from them in 1975. *Plant Disease Reporter*, 60 (8): 686-690.
- Schellenberg, B. and Dudler, R. (2010): Syringolin A counteracts stomatal immunity by proteasome inhibition. 8<sup>th</sup> International Conference on *Pseudomonas syringae* and related pathogens. Oxford, 31<sup>st</sup> August-3<sup>rd</sup> September 2010. Book of abstracts, 19.
- Scortichini, M., Rossi, M. P., Loreti, S., Bosco, A., Fiori, M., Jackson, R. W., Stead, D. E., Aspin, A., Marchesi, U., Zini, M. and Janse, J.D. (2005): *Pseudomonas syringae* pv. *coryli*, the causal agent of bacterial twig dieback of *Corylus avellana*. *Phytopathology*, 95 (11): 1316- 1324.
- Sellam, M., A. and Wilcoxson, D. (1976): Bacterial leaf blight of wheat in Minnesota. *Plant Disease Report*, 60 (3): 242-245.
- Shane, W., W. and Baumer, J., S. (1987): Population dynamics of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* on spring wheat. *Phytopathology*, 77: 1399-1405.
- Shane, W., W., Baumer, J., S. and Teng, P. S. (1987): Crop losses caused by *Xanthomonas* streak on spring wheat and barley. *Plant disease*, 71: 927-930.
- Shila, S. J., Islam, M. R., Ahmed, N. N., Dastogeer, K. M. G. and Meah, M. B. (2013): Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* associated with the seeds of cucurbits. *Universal Journal of Agricultural Research* 1: 1–8.
- Schultz, D. and Ronald D. F. (2008): Basal Glume Rot: доступно на: <http://amarillo.tamu.edu/files/2010/11/Ba2salGlumeRot.pdf>

- Silva, I. T., Rodrigues, F. A., Oliveira, J. R., Pereira, S. C., Andrade, C. C. L. , Silveira, P. R. and Conceição, M.M. (2010): Wheat resistance to bacterial leaf streak mediated by silicon. *Journal of Phytopathology* 158: 253-262.
- Slovarova, O. (2020): Detection and identification of wheat and barley phytopathogens in the Russian Federation. *Microbiology Independent Research journal*. 7 (1): 13-23.
- Смаилагић, Ј., Савовић, А., Марковић, Д., Нешић, Д., Дракула, Б., Миленковић, М. и Здравковић С. (2014): Климатске карактеристике Србије. Билтен Републичког хидрометеоролошког завода за 2013. годину. Доступно на: <https://www.hidmet.gov.rs/data/klimatologija>
- Smith, J. and Hattingh, M. J. (1991): Fluorescent *Pseudomonas* associated with diseases of wheat in South Africa. *J. Phytopathology*, 133: 36-48.
- Smith, J., J. and Mansfield, J., W. (1981): Interactions between pseudomonads and leaves of oats, wheat and barley. *Physiological Plant Pathology*, 18(3): 345-356.
- Sobiczewski P. (1984): Etiology of sour cherry bacterial canker in Poland. *Fruit Science Reports* 11(4): 169–179.
- Sorensen, K. N., Kim, K. H. and Takemoto, J. Y. (1998): PCR detection of cyclic lipodepsinonapeptide- producing *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and similarity of strains. *Applied Environmental Microbiology*, 64 (1): 226-230.
- Stauber, J. L. and Schechter, L. M. (2010): Cell density regulation of type III secretion gene expression in *Pseudomonas syringae* pathovar *tomato* DC 3000. 8<sup>th</sup> International Conference on *Pseudomonas syringae* and related pathogens. Oxford, 31<sup>st</sup> August-3<sup>rd</sup> September 2010. Book of abstracts, 14.
- Stead, D. E. (1989): Grouping of *Xanthomonas campestris* pathovars of cereals and grasses by fatty acid profiling. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 19: 57-68.
- Stead, D. E., Simpkins, S. A., Weller, S. A., Hennessy, J., Aspin, A., Stanford, H., Smith, N. C. and J. G. Elphinstone (2003): Classification and identification of plant pathogenic *Pseudomonas* species by REP- PCR derived genetic fingerprints. In: "*Pseudomonas* and related pathogens- biology and genetics" edited by Nicola Sante Iacobellis, Alan Collmer, Steven W. Hutcheson, John W. Mansfield, Cindy E. Morris, Jesus Murillo, Norman W. Schaad, David E. Stead, Giuseppe Surico, Matthias S. Ullrich, Kluwer academic publishers, Dordrecht, the Netherlands, 411- 422.

- Stockwell, V. O. and Duffy, B. (2012): Use of antibiotics in plant agriculture. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 31(1): 199–210.
- Stopelli, E., Conen, F., Guilbaud, C., Zopfi, J., Alewell, C. and Morris, C. (2017): Ice nucleators, bacterial cells and *Pseudomonas syringae* in precipitation at Jungfraujoch. *Biogeosciences*. 14: 1189-1196.
- Stromberg, K. D., Kinkel, L. L. and Leonard, K. J. (1999): Relationship between phyllosphere population sizes of *Xanthomonas translucens* pv. *translucens* and bacterial leaf streak severity on wheat seedlings. *Phytopathology*, 89 (2): 131-135.
- Stromberg, K. D., Kinkel, L. L. and Leonard, K. J. (2000): Interactions between *Xanthomonas translucens* pv. *translucens*, the causal agent of bacterial leaf strike of wheat, and bacterial epiphytes in the wheat phyllosphere. *Biological Control*, 17: 61-72.
- Stubbs, R. W., Prescott, J. M., Saari, E. E. and Dubin, H. J. (1986): Cereal disease methodology manual. CYMMYT, Mexico.
- Sundin, G. W. (2003): Stress resistance in *Pseudomonas syringae*: mechanisms and strategies. In: "*Pseudomonas* and related pathogens- biology and genetics" edited by Nicola Sante Iacobellis, Alan Collmer, Steven W. Hutcheson, John W. Mansfield, Cindy E. Morris, Jesus Murillo, Norman W. Schaad, David E. Stead, Giuseppe Surico, Matthias S. Ullrich, Kluwer academic publishers, Dordrecht, the Netherlands, 41-49.
- Sundin, G. W., Castiblanco, L. F., Yuan, X., Zeng, Q. and Yang, C. H. (2016): Bacterial disease management: challenges, experience, innovation and future prospects: Challenges in Bacterial Molecular Plant Pathology. *Molecular plant pathology*, 17 (9): 1506–1518.
- Suslow, T. V., Schroth, M. N. and Isaka, M. (1982): Application of rapid method for Gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. *Phytopathology* 72: 917-918.
- Шутић, Д. (1956): Ореолна пегавост овса. Зборник радова Пољопривредног факултета, Београд, год IV, 12: 1-10.
- Tajima, F. and Nei, M. (1984): Estimation of evolutionary distance between nucleotide sequences. *Molecular Biology and Evolution* 1 (3): 269–85.

- Tamura, K., Peterson D, Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S. (2011): MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28 (10): 2731–2739.
- Thompson D. C., Schaad N. W. and Forster R. L. (1989): New perennial hosts of epiphytic populations of *Xanthomonas campestris* pv. *translucens*, *Phytopathology*, 79: 1168 (abstract).
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. J. (1994): CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22 (22), 4673–4680.
- Tian, D.H, Stead, D. E. and Coutts, R. H. A. (2003): Diversity of epiphytic *Pseudomonads* on grass and other plant species. In: "*Pseudomonas* and related pathogens- biology and genetics" edited by Nicola Sante Iacobellis, Alan Collmer, Steven W. Hutcheson, John W. Mansfield, Cindy E. Morris, Jesus Murillo, Norman W. Schaad, David E. Stead, Giuseppe Surico, Matthias S. Ullrich, Kluwer academic publishers, Dordrecht, the Netherlands, 51- 60.
- Tillman, B. L. and Harrison, S. A. (1996): Heritability of resistance to bacterial streak in winter wheat. *Crop Sci.*, 36: 412-418.
- Tillman, B. L., Harrison, S. A., Clark, C. A., Milus, E. A. and Russin, J. S. (1996a): Evaluation of bread wheat germplasm for resistance to bacterial streak. *Crop Science*, 36: 1063-1068.
- Tillman, B., L., Harrison, S., A., Russin, J., S. and Clark, C., A. (1996b): Relationship between bacterial streak and black chaff symptoms in winter wheat. *Crop Science*, 36: 74-78.
- Tillman, B.L., Kursell, W.S., Harrison, S.A. and Russin, J.S. (1999): Yield loss caused by bacterial streak in winter wheat. *Plant Disease*, 83 (7): 609-614.
- Timmer, L. W., Marois, J. J. and Achor, D. (1987): Growth and survival of xanthomonads under conditions non- conducive to disease development. *Phytopathology*, 77: 1341-1345.



- Toben, H., Mavridis, A. and Rudolph, K. (1989): Basal glume rot (*Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*) on wheat and barley in FRG and resistance screening of wheat. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 19: 119-125.
- Toben, H., Mavridis, A. and Rudolph, K. (1991): On the occurrence of basal glume rot of wheat and barley caused by *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* in West Germany. Journal of Plant Diseases and Protection, 98: 225-235.
- Tubajika, K., M., Tillman, B. L., Russin, J., S., Clark, C. A. and Harrison, S., A. (1998): Relationship between flag leaf symptoms caused by *Xanthomonas translucens* pv. *translucens* and subsequent seed transmission in wheat. Plant Disease, 82: 1341-1344.
- Tubajika, K., M., Russin, J., S. and Harrison, S., A. (1999): Analysis of bacterial leaf streak epidemics on winter wheat in Louisiana. Plant Disease, 83 (6): 541-548.
- United States Department of Agriculture (n. d.): *USDA Pest Risk Assessment Process Flowchart version 5.2.* Доступно на: <http://www.aphis.usda.gov/ppq/pru/>
- NSHS (2019): Phytosanitary Field Inspection Procedures, version 1.3, доступно на: <http://www.seedhealth.org/>
- Valencia-Botin, A.J. and Cisneros-Lopes, M.E. (2012): A review of the Studies and Interactions of *Pseudomonas syringae* pathovars on wheat. International Journal of Agronomy, vol. 2012, Article ID 692350, 5 pages.
- Вакуленко, А. К., Куликовская, М. Д., Голик, Г. А. и Лозинский М., О. (1993): Поиск новых средств защиты растений против возбудителей бактериальных болезней. Микробиол. Журн. 53 (2): 55- 59.
- Vandamme P., Pot B., Gillis M., De Vos P., Kersters K. and Swings J. (1996): Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. Microbiological reviews 60 (2): 407-438.
- Vanneste, J. L., Cornish, D. A., Yu, J. and Morris, C. E. (2009): The application of polymerase chain reaction for characterising of *Pseudomonas syringae* isolated from New Zealand rivers. New Zealand Plant Protection 62: 256-261.
- van Stan J. T., Morris C. E., Aung K., Kuzyakov Y., Magyar D., Rebollar E.A., Remus-Emsermann M., Uroz S. and Vandenkoornhuyse P. (2020): “Precipitation partitioning—hydrologic highways between microbial communities of the plant

- microbiome?,” in *Precipitation Partitioning by Vegetation*, eds J. Van Stan II, E. Gutmann and J. Friesen (Cham: Springer), 229–252.
- Vassilev, V., Kolev, K., Zaharieva, M. and Sevov, V. (1995): Resistance of *Aegilops*, maize and wheat genotypes to *Pseudomonas syringae* pathovars *atrofaciens* and *syringae*. *Agronomie, DP Sciences* 15 (1): 25-29.
- Vassilev, V., Lavermicocca, P., Di Giorgio, D. and Iacobellis, N. S. (1996): Production of syringomycins and syringopeptins by *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*. *Plant Pathology*, 45 (2): 316-322.
- Vauterin, L., Yang, P., Hoste, B., Pot, B. Swings, J. and Kersters, K. (1992): Taxonomy of xanthomonads from cereals and grasses based on SDS-PAGE of proteins, fatty acid analysis and DNA hybridization. *Journal of general microbiology* 138 (7): 1467-1477.
- Vauterin, L., Hoste, B., Kersters, K. and Swings, J. (1995): The relationships within the genus *Xanthomonas* and a proposal for a new classification. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45: 472–489.
- Vegh, A., Hevesi, M., Némethy, Zs. and Palkovics, L. (2012): First Report of Bacterial Leaf Spot of Basil Caused by *Pseudomonas viridiflava* in Hungary. *Plant Disease* 2012 96 (1): 141-141.
- Versalovic, J., Koeuth, T. and Lupski, J.R. (1991): Distribution of repetitive DNA-sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research* 19 (24): 6823-6831.
- Versalovic, J., Schneider, M., de Bruijn, F.J. and Lupski, J.R. (1994): Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular and Cellular Biology* 5: 25-40.
- Vidaver A. K. (2002): Uses of Antimicrobials in Plant Agriculture. *Clinical Infectious Diseases*, 34 (3): S107–S110.
- Vinatzer, B. (2010): The power of many: comparing over 100 almost identical strains of *Pseudomonas syringae* pv *tomato* gives new insight into microevolution and plant-pathogen interactions. 8<sup>th</sup> International Conference on *Pseudomonas syringae* and related pathogens. Oxford, 31<sup>st</sup> August-3<sup>rd</sup> September 2010. Book of abstracts, 27.
- Völksch, B. and May, R. (2001): Biological control of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* by epiphytic bacteria under field conditions. *Microb Ecol*, 41 (2): 132-139.

- von Kietzell, J. and Rudolph, K. (1997): "Epiphytic occurrence of *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*," in *Pseudomonas syringae* Pathovars and Related Pathogens, K. Rudolph, T. J. Burr, J. Mansfield, D. Stead, A. Vivian, and J. von Kietzell, Eds., Kluwer Academic, Dodrecht, The Netherlands, pp. 29–34.
- Wallin, J. R. (1946): Seed and seedling infection of barley, bromegrass, and wheat by *Xanthomonas translucens* var. *cerealis*. *Phytopathology*, 46: 446-457.
- Webb, M. (1954): The influence of magnesium on cell division. *Journal of general microbiology* 3 (3): 418–424.
- Wegulo, S. (2006): Black Chaff of Wheat, доступно на: <https://extensionpublications.unl.edu/assets/pdf/g1672.pdf>
- Weingart, H. and Volksch, B. (1997): Genetic fingerprinting of *Pseudomonas syringae* pathovars using ERIC-, REP- and IS50-PCR. *Journal of Phytopathology*, 145: 339-345.
- Weller, S. A., Aspin, A. and Stead, D. E. (2000): Classification and identification of plant-associated bacteria by fatty acid profiling. *OEPP/EPPO, Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 30 (3/4): 375-380.
- Wensing, A., Braun, S.D., Spitteller, D., Ullrich, M.S., Volksch, B. and Weingart, H. (2010): Suppression mechanism involved in the antagonistic activity of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strain 22d/93 against the soybean pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. 8<sup>th</sup> International Conference on *Pseudomonas syringae* and related pathogens. Oxford, 31<sup>st</sup> August-3<sup>rd</sup> September 2010. Book of abstracts, 53.
- Wiese, M., V. (1987): *Compendium of wheat diseases*. 2nd ed. St Paul, MN, USA, APS Press, American Phytopathological Society.
- Wilkie, J., P. (1972): Halo blight of oats in New Zealand. *N. Z. Journal of Agricultural Research*, 15: 461-468.
- Wilkie, J., P. (1973): Basal glume rot of wheat in New Zealand. *N.Z. Journal of Agricultural Research*, 16: 155-160.
- Willems, A. and P. Vandamme (2003): Phytopathogenic "*Pseudomonas*" species: a taxonomic overview. In: "*Pseudomonas* and related pathogens- biology and genetics" edited by Nicola Sante Iacobellis, Alan Collmer, Steven W. Hutcheson, John W. Mansfield, Cindy E. Morris, Jesus Murillo, Norman W. Schaad, David E. Stead,

- Giuseppe Surico, Matthias S. Ullrich, Kluwer academic publishers, Dordrecht, the Netherlands, 653- 665.
- Wilson, M., Campbell, H. .L, Ji, P., Campbell, H. L. and Cuppels, D. A. (2002): Biological control of bacterial speck of tomato under field conditions at several locations in North America. *Phytopathology* 92 (12): 1284–1292.
- Xing, K., Zhu, X., Peng, X. and Qin, S. (2015): Chitosan antimicrobial and eliciting properties for pest control in agriculture: a review. *Agron. Sustain. Dev.* 35, 569–588.
- Yakovleva, L.M., Zdrovenko, G.M. and Gvozdyak, R.I. (2002): Some characteristics of *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* dissociants. *Mikrobiologiya*, 71 (2): 240–246.
- Yamamoto, S., Kasai, H., Arnold, D., Jackson, R., Vivian, A. and Harayama, S. (2000): Phylogeny of the genus *Pseudomonas*: intrageneric structure reconstructed from the nucleotide sequences of *gyrB* and *rpoD* genes. *Microbiology* 146:2385–94.
- Yang, P., Vauterin, L., Vancanneyt, M., Swings, J. and Kersters, K. (1993): Application of fatty acid methyl-esters for the taxonomic analysis of the genus *Xanthomonas*. *Syst. Appl. Microbiol.* 16: 47-71.
- Young, J. M. (1992): *Pseudomonas syringae* pv. *japonica* (Mukoo 1955) Dye et al. 1980 is a junior synonym of *Ps. syringae* pv. *syringae* van Hall 1902. *Letters in Applied Microbiology* 15:129-130.
- Young, J.M. (2010): Taxonomy of *Pseudomonas syringae*. *Journal of Plant Pathology*, 92: S5-S114.
- Young, J. M., Saddler, G., Takikawa, Y., De Boer, S.H., Vauterin, L., Gardan, L., Gvozdyak, R. I. and Stead, D. E. (1996): Names of plant pathogenic bacteria 1864–1995. Review of *Plant Pathology*, 75: 721–763. Online database [http://www.isppweb.org/names\\_bacterial.asp](http://www.isppweb.org/names_bacterial.asp)
- Young, J. M., Park, D. C., Shearman, H. M. and Fargier, E. (2008): A multilocus sequence analysis of the genus *Xanthomonas*. *Systematic and applied microbiology*, 31(5): 366–377.
- Zgurskaya, H.I., Evtushenko, L.I., Akimov, V.N. and Kalakoutskaa, L.V. (1993): *Rathayibacter tritici* comb. nov. *Rathayibacter iranicus* comb. nov. and six strains from annual grasses. *International Journal of Systematic Bacteriology* 43: 143-149;

Zhao, Y., Damicone, J. P. and Bender, C. L. (2002): Detection, survival, and sources of inoculum for bacterial diseases of leafy crucifers in Oklahoma. *Plant Disease* 86: 883-888.

Zillinsky, F., J. (1983): *Common Diseases of Small Grain Cereals: A Guide to Identification*. CYMMYT, Mexico.

## Биографија кандидата

Мр Татјана Кнежевић је рођена 27. 05. 1969. године у Београду, где је завршила основну и средњу школу као носиоц Вукове дипломе. Пољопривредни факултет у Земуну, Одсек за заштиту биља и прехранбених производа, завршила је са просечном оценом студирања 9.83, одбранивши дипломски рад под називом: "Пољски глодари и њихово сузбијање". Магистарске студије завршила је 1999. год. на Пољопривредном факултету Нови Сад, одсек Фитопатологија, са просечном оценом студирања 10, одбранивши магистарску тезу: "Антагонистичко дејство сапрофитних бактерија према *Helminthosporium* spp. паразита стрних жита". На Институту за заштиту биља и животне средине у Београду, ангажована је у периоду 1995-2000. као стипендиста Министарства за науку и технологију и потом као истраживач сарадник. На Пољопривредном факултету Нови Сад, Департман за заштиту биља и животне средине, радила је од 2000. до 2006. године као асистент на наставним предметима Бактериозе биљака и Микозе биљака. Током редовних студија провела је годину дана у САД, на међународном Interexchange програму, док је на Програму размене младих научника (Young Scientist Exchange Program/Norman Borlough Fellows Program) боравила у два наврата (2003. и 2005. године) у фитопатолошкој лабораторији проф. др Mark Gleason-а на Универзитету у Ајови, САД.

Од ових програма своје активности је усмерила на примену међународних знања и стандарда у различите активности развоја фитосанитарног система Србије, а пре свега успостављање националног дијагностичког сервиса у чему је активно учествовала у периоду од 2005-2014. године са позиција: консултанта за фитосанитарна питања (ЕРРО групе и скупови) и координатора развоја пет Регионалних фитосанитарних лабораторија при Управи за заштиту биља, Министарства Пољопривреде, шумарства и водопривреде Србије, а потом и са позиције шефа лабораторије Регионалне лабораторије Ниш када је извршена потпуна реконструкција лабораторије према међународним стандардима и добијена позитивна оцена FVO (EU Food and Veterinary Office) мисије, а уследили су и налази карантинских штетних организама кромпира. Поред ових, радила је и на формирању услова за настанак и функционисање већих система подршке биљној производњи (као што су Формирање система за праћење појаве и ширења штетних организама и Интегрална производња поврћа) као неопходних предуслова за успостављање високих стандарда производње као што је Global GAP и сл. У овом раду примењена су знања стечена на међународним програмима у вези са инспекцијом и сертификацијом семенског кромпира (Холандија, Бугарска), у оквиру Твининг пројекта са Централном Научном Лабораторијом у Великој Британији и на програмима техничке сарадње са Америчким Министарством Пољопривреде и универзитетима у САД (Флорида, Охајо, Пенсилванија, Ајова, Висконсин) на којима је била вишегодишњи координатор и модератор.

У периоду од 2014-2021. године је радила као менаџер у семенској индустрији и прошла пут од формирања до активног учешћа лабораторије у утврђивању квалитета семена које из Србије у бројне земље Европе и света извози мултинационална компанија KWS.

Објавила је већи број радова из области фитопатологије и учествовала на више националних и међународних научних скупова. Говори енглески језик.

УНИВЕРЗИТЕТ У БАЊОЈ ЛУЦИ  
ФАКУЛТЕТ: ПОЉОПРИВРЕДНИ



УНИВЕРЗИТЕТ У БАЊОЈ ЛУЦИ  
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ  
Број: 10/3. 1219/22  
Датум: 29-04-2022

## ИЗВЈЕШТАЈ

*о оцјени урађене докторске тезе*

### ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ

Одлуком Наставно-научног већа Пољопривредног факултета Универзитета у Бањој Луци бр. 10/3.3734-5-11/21 од 10.12.2021. године именована је Комисија за оцјену и одбрану урађене докторске дисертације кандидата мр Татјане Кнежевић под насловом "Бактерије као патогени стрних жита у Србији" у саставу:

1. Др Војислав Тркуља, редовни професор, Пољопривредни факултет Универзитета у Бањој Луци, ужа научна област: Заштита здравља биљака и агроекономија - председник;
2. Др Алекса Обрадовић, редовни професор, Пољопривредни факултет Универзитета у Београду, ужа научна област: Фитопатологија - ментор;
3. Др Радивоје Јевтић, ванредни професор, Земјоделски факултет Универзитета "Гоце Делчев" Штип, Северна Македонија, ужа научна област: Микологија - члан;

Датум и орган који је именовао комисију. Састав комисије са знаком имена и презимена сваког члана, звање, назив уже научне области за коју је изабран у звање и назив универзитета и факултета у којој је члан комисије запослен.

### 1. УВОДНИ ДИО ОЦЈЕНЕ ДОКТОРСKE ТЕЗЕ

Докторска теза кандидата мр Татјане Кнежевић под насловом "Бактерије као патогени стрних жита у Србији" написана је ћиричним писмом, фонтом Times New Roman, величина 12 и проред 1,5. Дисертација је написана на 245 страница текста А4 формата и садржи следећа поглавља:

Увод (стр.1-4)

Преглед литературе (стр.5-61)

Радна хипотеза (стр.62)

Материјал и методе рада (стр. 63-83)

Резултати (стр.84-171)

Дискусија (стр. 172-206)

Закључак (стр. 207-209)

Литература (стр. 210-246)

Поглавља Преглед литературе, Материјал и методе и Резултати садрже више



потпоглавља. На крају дисертације налази се Биографија аутора, као и Изјаве дефинисане Правилником о садржају, изгледу и дигиталном репозиторијуму докторских дисертација на Универзитету у Бањој Луци. Дисертација садржи 38 табела и 69 слика. У дисертацији је наведено 363 референце (од којих 18 домаћих и 345 страних аутора) које представљају избор најзначајнијих радова објављених у овој области. Цитиране референце обухватају широк спектар извора литературе што указује на темељно проучену проблематику од стране кандидата. Избор литературних извора је актуелан, а цитирање је изведено на правилан начин (извод из литературе дат је у прилогу 1).

а) Истаћи основне податке о докторској тези: обим, број табела, слике, број цитиране литературе и навести поглавља.

## 2. УВОД И ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ

а) У Србији до данас нису предузимана опсежнија истраживања присуства и распрострањености бактерија патогена стрних жита, као и осетљивости сортирента биљака домаћина. Истраживања од пре неколико деценија показала су да су у нас присутна два патогена варијетета збирне врсте *P. syringae* и то: *P. s. pv. coronafaciens* на овсу и *P. s. pv. syringae* на пшеници. Циљ предложених истраживања је да се утврди присуство бактерија на стрним житима у Србији и опишу промене које проузрокују својом активношћу на различитим домаћинима. Такође, циљ је да се оптимизирају методе детекције и идентификације ових патогена како би се проучиле њихове бактериолошке карактеристике и утврдили критеријуми за њихову диференцијацију.

б) Преглед литературе приказан је у 7 потпоглавља, у оквиру којих понаособ има један, два или три наслова треће категорије где су представљени до сада објављени литературни подаци везани за предмет проучавања дисертације.

У првом потпоглављу указано је на познати диверзитет бактерија као патогена стрних жита за који је по родовима табеларно приказан назив са синонимима, типски и патотипски сој, народни назив, домаћини, распрострањеност и одговарајућа референца. Истакнуто је да је све до скора појава већих губитака насталих активношћу патовара збирне врсте *P. syringae* (пре свега *P. s. pv. atrofaciens*), бележена само спорадично, док се у последње две деценије, после опсежнијих истраживања у Русији и Украјини ови патогени означавају као растући проблем производње стрних жита, јер у условима повољним за развој могу бити присутни на 30-80% биљака и захватити 10-80% класова и појавити се и на семену. Даље се напомиње утицај на смањење висине биљака и биомасе већине органа, као и на смањење приноса семена, енергију и клијавост. Такође, утиче и на смањење квалитета зрна за производњу брашна, састав протеина и меласе јечма, те укус и арому пива и сл. Поред директног губитка приноса услед појаве *X. translucens*, који може бити и преко 40%, штета би настала и услед губитка домаћих и страних тржишта због присуства новог карантинског организма.

У другом потпоглављу описани су животни циклуси представника родова *Pseudomonas* и *Xanthomonas* као патогена стрних жита и то како у контексту агроекосистема, тако и у контексту новијих епидемиолошких истраживања која показују да су сојеви *P. syringae* распрострањени у широком спектру станишта и ван агроекосистема. У посебном наслову треће категорије образложени су фактори патогености и вирулентности које сојеви *P. syringae* користе приликом интеракција са биљком домаћином, као што су стварање фитотоксина (сирингомицин,



коронатин, табтоксин), егзополисахарида, пектолитичких ензима, честица леда и ауксина, као и систем за излучивање ефектора.

У трећем потпоглављу се истиче слаба и недовољна дефинисаност фитосанитарне регулативе и мера у односу на бактерије као патогене стрних жита, како на глобалном, тако и на нивоу Регионалне организације за заштиту биља и Републике Србије, што доприноси и несметаној дистрибуцији ових патогена семенским материјалом у међународној трговини. Такође, за патогене стрних жита ни у овину ISPM и EPPO стандарда, ни у оквиру организација које функционишу у склопу индустрије семена не постоји ни један важећи званични дијагностички протокол. У истом потпоглављу је истакнуто да се употребом различитих мера заштите не постиже одговарајући ниво контроле фитопатогених бактерија, због чега је веома изражена потреба за њиховом комбинованом применом у оквиру интегралне заштите биља. Докторант износи и основне литературне податке о мерама заштите попут коришћења здравог семена, примене агротехничких мера, отпорности биљака домаћина и биолошке заштите, док системски стечену отпорност, бактериофаге и хемијске активаторе разматра као стратегије са перспективом. На крају овог дела се истиче да је стратегија употребе јединих комерцијално доступних батерицида попут антибиотика и једињења на бази бакра све мање одржива због развоја резистентности како циљаних штетних организама, тако и хуманих патогена на које се преноси хоризонталним трансфером гена.

У четвртном потпоглављу приказан је детаљан опис симптома бактериоза стрних жита. Приказани су и моменти њиховог максималног испољавања и указано на време погодно за узимање узорака.

У петом потпоглављу обрађени су литературни подаци везани за изолацију патогена и методе којима се може извршити детекција и идентификација бактерија родова *Pseudomonas* и *Xanthomonas*, патогена стрних жита. Код флуоресцентних врста рода *Pseudomonas*, идентификација до врсте се углавном заснива на утврђивању ЛОПАТ карактеристика. Серолошке реакције се далеко чешће користе у идентификацији бактерија, него у класификацији, мада међу познатим поликлоналним и моноклоналним антисерумима доступним у различитим облицима нема оних произведених за бактерије патогене стрних жита. Технике за утврђивање молекуларних карактеристика сојева *P. syringae* брзо заузимају примат у односу на било коју другу врсту тестова за идентификацију бактерија као биљних патогена. Међу PCR техникама детекције развијеним за патогене који производе токсине, посебно се образлажу оне за лепидепсинопептиде (сирингомицин, сирингопептин), коронатин и табтоксин које производи већина сојева најчешће спомињаних патогена стрних жита *P. s. pv. atrofaciens*, *P. s. pv. syringae* и *P. s. pv. coronafaciens*. Међу методама проучавања генетичког диверзитета сојева, посебно је описано коришћење гер-PCR којима се врши анализа секвенци распоређених унутар геномске ДНК. Истиче се да је коришћење REP-PCR елемената корисније у утврђивању генетичког диверзитета *P. syringae* патовара јер се њиховим умножавањем стварају генетички профили са израженијим полиморфизмом. Методе за утврђивање филогенетских карактеристика ближе су образложене у потпоглављу 7.

Шесто потпоглавље односи се на приказ биљних врста за проверу патогености сојева бактерија изолованих са стрних жита, као и услова потребних за репродукцију симптома.

У седмом поглављу се наводе подаци о појму, историјату и актуелном стању *P.*



*syringae* комплекса који је послужио као посебан оквир за многа таксономска питања, због чега се и назив и садржај онога што чини овај комплекс мењао заједно са променом основног концепта у таксономији, па је од почетног комплекса патовара који чине "збирну врсту" или "*P. syringae* комплекс" увођењем коришћења генетичких и филогенетских истраживања проширио до данас актуелног назива *P. syringae* комплекса врста у који, између осталог, спадају и врсте *P. viridiflava* и *P. cichorii*.

в) Обрадом узорака са симптомима карактеристичним за бактериозе стрних жита, као и асимптоматског материјала, сакупљеног на различитим локалитетима у Србији, утврдиће се присуство и диверзитет бактерија, као и основне епидемиолошке карактеристике. Применом најновијих метода детекције и идентификације фитопатогених бактерија проучиће се карактеристике добијених изолата и тако дати нов допринос како унапређењу метода научно-истраживачког рада тако и бољем познавању популације патогена стрних жита у Србији. Истраживањима ће се утврдити вредност различитих метода у дијагнози и диференцијацији бактерија патогена стрних жита. Прилагођавање ових метода потребама анализа у фитосанитарном систему обезбеђује практичан значај наведеним истраживањима.

Од изузетног значаја за будући научни рад је одређивање састава популације бактерија на стрним житима у нас и процена осетљивости сортимента водећих врста стрних жита гајених у Србији. Разлике у осетљивости сортимента указаће на ризик који носе осетљиви генотипови тј. њихово гајење и ширење у производњи. Осим доприноса познавању популације бактерија присутне на стрним житима у нас, добијени резултати ових истраживања могу послужити за планирање програма селекције, као и развој стратегија заштите стрних жита.

Стога се закључује да програм истраживања обухваћен овом дисертацијом квалитативно и квантитативно испуњава критеријуме научног рада неопходне за израду доктората и обезбеђује адекватан допринос домаћој науци, а такође и пракси.

- а) Укратко истаћи разлог због којих су истраживања предузета и циљ истраживања;
- б) На основу прегледа литературе сажето приказати резултате претходних истраживања у вези проблема који је истраживан;
- в) Навести допринос тезе у рјешавању изучаване проблематике;
- г) У прегледу литературе треба водити рачуна да обухвата најновија и најзначајнија сазнања из те области код нас и у свијету.

### 3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД РАДА

а) Прикупљање узорака извршено је у периоду 2009 – 2014. године. Основни критеријум за прикупљање већине узорака био је присуство карактеристичних симптома који подсећају на симптоме бактериоза стрних жита. Прикупљен је и мањи број узорака материјала без симптома.

Поред сојева изолованих у овом истраживању, у појединим експериментима коришћени су и типски, патотипски и референтни сојеви рода *Pseudomonas*, пореклом из стрних жита, добијени у размени са међународном колекцијом, као и детерминисани контролни сојеви Лабораторије за фитобактериологију Пољопривредног факултета у Београду коришћени у разним тестовима утврђивања биохемијско-физиолошких карактеристика проучаваних сојева.

б) Морфолошке, одгајивачке и биохемијско-физиолошке одлике сојева изолованих из узорака стрних жита у Србији проучене су коришћењем стандардних бактериолошких тестова. Одређена је реакција по Граму, а од одгајивачких одлика проучено је стварање флуоресцентног пигмента и изглед колонија на модификованој Кинговој подлози Б, као и развој бактерија при температури 37°C. Даље, проучено је и стварање левана, активност оксидазе, активност пектолитичких фермената, активност аргинин-дехидролазе, хиперсензитивна реакција дувана, хидролиза ескулина, способност разградње желатина, оксидативно ферментативни тест, способност разлагања скроба, коришћење манитола, сорбитола, еритритола и инозитола, стварање базе из тартарата и квината, редукција нитрата, стварање честица леда.

Извршена је молекуларна карактеризација и идентификација проучаваних сојева кроз детекцију присуства *sydB1* гена одговорног за синтезу синрингомицина и *Cfl* гена одговорног за синтезу коронатина применом методе ланчаног умножавања фрагмената нуклеинске киселине – PCR, затим проучавање генетичког диверзитета сојева коришћењем гер-PCR методе. Филогенетска анализа, у којој је 578bp локус *rpoD* гена проучаваних сојева умножен коришћењем специфичних прајмера и анализиран PCR методом и секвенцирањем, даље је обухватала одређивање таксономске позиције проучаваних сојева *P. syringae* комплекса врста и на крају утврђивање генетичког диверзитета и еволутивних веза проучаваних сојева са сојевима *P. syringae* изолованим са стрних жита.

Описане су методе проучавања патогености сојева изолованих у Србији. Патогеност сојева тестирана је на биљкама домаћинима стрних жита са којих су и изоловани, са изузетком 2 соја код којих је тестиран и шири круг домаћина који спадају у стрна жита.

Провера осетљивости сортимента извршена је применом исте методе као код провере патогености и то на неколико најзаступљенијих сорти пшенице и јечма изабраних на основу рангирања у склопу сертификације семена и садног материјала на територији Србије. За ову методу изабрани су сојеви који су се у тестовима провере патогености показали као највирулентнији представници сваке од група у коју су сврстани/класификовани.

в) Методе коришћене у истраживањима су адекватне и савремене и у моменту реализације истраживања представљале су актуелан начин карактеризације ове групе микоорганизама.

г) Истраживања су реализована према плану дисертације.

д) Добијени резултати су јасно приказани и представљају солидну основу за изведене закључке.

- а) објаснити материјал који је обрађиван, критеријуме који су узети у обзир за избор материјала;
- б) дати кратак увид у примјењени метод рада при чему је важно оцјенити сљедеће:
- в) да ли су примјењене методе адекватне, довољно тачне и савремене, имајући у виду достигнућа на том пољу у свјетским нивоима;
- г) да ли је дошло до промјене у односу на план истраживања који је дат приликом пријаве докторске тезе, ако јесте зашто;
- д) да ли испитивани параметри дају довољно елемената или је требало испитивати још неке, за



- поуздано истраживање;  
 е) да ли је статистичка обрада података адекватна;  
 ж) да ли су добивени резултати јасно приказани;

#### 4. РЕЗУЛТАТИ И НАУЧНИ ДОПРИНОС ИСТРАЖИВАЊА

а) Резултати истраживања представљени су у оквиру 6 потпоглавља. Приказани су јасно, уз сажета тумачења, прегледне табеле, слике и дендрограме који илуструју делове спроведених истраживања.

У првом потпоглављу је дат детаљан опис симптома уочених на оболелим биљкама стрних жита са којих су узети узорци. Забележен је изглед симптома на листу, стаблу, доњем делу стабла, кореновом врату, кореновима, на класу и зрну.

Из узорака биљног материјала изоловане су бактерије различитих типова колонија које су фенотипски одговарале изгледу контролих сојева *Pseudomonas* spp., које су стварале плаво-зелени флуоресцентни пигмент и проузроковале хоперсензитивну реакцију дувана. За даљи рад изабрано је 57 сојева.

Сви проучавани сојеви су Грам негативни. LOPAT групи Ia (L+,O-,P-,A-,T+), односно збирној врсти *P. syringae* припадају сви сојеви осим једног који припада групи Ib (L-,O-,P-,A-,T+) и 9 сојева који се не могу разврстати према именованој шеми. Сви проучавани сојеви разлажу ескулин, имају оксидативни метаболизам глукозе, не користе скроб и не редукују нитрате; већина проучаваних сојева користи манитол, сорбитол, инозитол и еритритол, осим једног соја који не користи сорбитол и инозитол и једног соја који не користи еритритол. Проучавани сојеви се разликују у односу на стварање честица леда тако што 27 сојева ствара честице леда, 12 сојева испољава одложено реакцију, док је 16 сојева негативно.

Применом конвенционалне PCR методе са B1 и B2 прајмерима код 33 проучавана соја детектовано је присуство *syrB1* гена који учествује у синтези сириномицина, док преостала 22 соја не поседују овај ген. Применом конвенционалне PCR методе, са Primer 1 и 2 прајмерима, ни код једног од проучаваних сојева није детектовано присуство *Sfl* гена који учествује у синтези коронатина. Умножавањем геномске ДНК коришћењем REP1 и REP2 прајмера, а касније и електрофорезом, код проучаваних сојева умножени су ДНК фрагменти различите величине, а добијени генетички профили су омогућили диференцијацију сојева и указали на њихову генетичку разноврсност. Проучавани сојеви су груписани у 2 велика кластера, од којих се један грана на два мања и садржи две трећине проучаваних сојева.

Филогенетска анализа секвенци 578bp локуса *rpoD* гена проучаваних сојева и поређење са доступним секвенцама типских и патотипских сојева представника филогрупа, указује да се проучавани сојеви највећим делом уклапају у постојећи диверзитет сојева *P. syringae* изолованих са стрних жита и сврстаних у филогрупе 2 и 4. Разлику у односу на до сада познат диверзитет сојева *P. syringae* са стрних жита представљају сојеви сврстани у филогрупу 2d и филогрупе 7 и 8 за које не постоје сојеви са стрних жита са којима би се груписали. Коришћењем UPGMA метода у циљу утврђивања еволутивних веза између проучаваних сојева сврстаних у филогрупе 2 и 4 и сојева *P. syringae* изолованих са стрних жита чије су *rpoD* секвенце обезбеђене у бази RAMDB дефинисано је постојање 3 типа генетичког



диверзитета који одсликава и неке фенотипске карактеристике у филогрупи 2, односно 2 типа у филогрупи 4. Овим типовима одговара груписање проучаваних сојева према одређеним типским и патотипским сојевима.

Патогеност проучаваних сојева је потврђена репродукцијом карактеристичних симптома инокулацијом биљака домаћина из којих су изоловани, осим у случају сојева класификованих у филогрупу 2d, изолованим из овса (1тк) и пшенице (17тк) за које је провера патогености рађена и на биљкама јечма, овса, тритикалеа и ражи. Реакција инокулисаних одабраних сорти пшенице и јечма, указује на разлике у осетљивости тј. типове симптома који се могу јавити на сејанцима инокулисаним одабраним сојевима *P. syringae* и *P. viridiflava*. Међу сортама су уочене разлике не само у инфективном одговору (процент захваћене површине листа, оцењен према скали Sellam и Wilcoxon (1976)), него и у дистрибуцији напада (број листова у бусену на коме су се појавили карактеристични симптоми).

б) Добијени резултати су правилно наведени, адекватно поређени и тумачени, чиме је створен основ за извођење адекватних закључака.

в) Од 55 проучаваних сојева, изолованих из различитих врста стрних жита, 15 сојева соја је идентификовано као *P. s. pv. atrofaciens* и класификовано у геномоврсту 1, филогрупу 2b. Ово је први налаз *P. s. pv. atrofaciens* у Србији и то на различитим биљним деловима пшенице (лист, семе), јечма (лист, доњи део стабла), овса (семе), ражи (лист), тритикалеа (лист) и кукуруза (лист). Утврђено је да шест сојева који проузрокују симптоме на пшеници (лист), јечму (лист, семе), овсу (лист), ражи (лист), тритикалеу (лист), деле *rpoD* секвенце са *P. s. pv. aptata/lapsa* и класификовани су у филогрупу 2b. Ни један од ова два патовара није до сада идентификован као патоген стрних жита у Србији, а такође и података о њиховој појави као патогена стрних жита у свету скоро да и нема. Међу проучаваним сојевима, осам сојева је идентификовано као *P. viridiflava* и класификовано у геномоврсту 6, филогрупу 7a, док је сој 27тк класификован у филогрупу 8. Према сазнањима докторанта, ово је први налаз *P. viridiflava* у свету на стрним житима уопште и то на овсу (лист), ражи (доњи део стабла, глава корена и коренчићи) и тритикалеу (лист, семе). На основу секвенци 578bp локуса *rpoD* гена, одређени број сојева се није могао идентификовати као један од познатих патовара, али су дефинисани као блиско сродни (99%) одређеним патоварима и класификовани у филогрупе 2b и 2d, 4 и 8.

Тако 10 сојева који су сродни са *P. s. pv. syringae/aptata/atrofaciens/lapsa/japonica* и класификовани у исту филогрупу 2b, проузрокује симптоме на биљним врстама: јечам (лист, семе), овас (семе), тритикале (лист), дурум (лист) и кукуруз (лист). Од два соја класификована у филогрупу 2d, један сој (сој 1тк) је блиско сродан *P. s. pv. coryli* и проузрокује симптоме на овсу (лист), а други сој (сој 17тк) је блиско сродан *P. s. pv. aceris/P. s. pv. solidagae* и проузрокује симптоме на доњем делу стабла пшенице. Према сазнањима аутора, ни један од поменутих патовара није до сада идентификован као патоген стрних жита у свету. Три соја који су блиско сродни *P. s. pv. coronafaciens/oryzae*, проузрокују симптоме на овсу и ражи (семе) и девет сојева блиско сродних *P. s. pv. porri/striaefaciens* проузрокују симптоме на овсу (лист, стабло) и ражи (лист) и класификовани су у филогрупу 4. Ово је први налаз патовара из филогрупе 4 на ражи у Србији, док су на овсу такође први пут у Србији пронађени и патовари *P. s. pv. porri* и *P. s. pv. striaefaciens*. На основу резултата ових



истраживања, познати диверзитет бактерија као патогена стрних жита се проширује на нове патоваре у оквиру *P. syringae sensu stricto* или збирне врсте *P. syringae* и на нову врсту (*P. viridiflava*) у оквиру *P. syringae sensu lato* или *P. syringae* комплекс врста.

Утврђено је да симптоми нису поуздан критеријум за постављање дијагнозе. Иако извесне разлике између група постоје, нарочито по питању интензитета испољавања симптома, на овом нивоу истраживања није могуће са сигурношћу закључити колико су уочене разлике последица разлика у осетљивости биљних врста и сортаменту, разлика у вирулентности проучаваних сојева или утицаја фактора спољне средине.

У овим истраживањима је потврђено да ни биохемијско-физиолошке карактеристике нису поуздан критеријум за диференцијацију бактерија припадника популације патогена стрних жита у Србији. Стварање токсина, с друге стране може имати диференцијални карактер, али само у карактеризацији сојева из филогрупе 2 и то оног дела популације који ствара сирингомицин, док се стварању токсина од стране представника филогрупе 4 и 7 мора посветити додатна пажња. Применом гер-PCR методе је утврђено да проучавани сојеви *P. syringae* комплекса врста изоловани са стрних жита у Србији показују висок ниво генетичког диверзитета.

- а) Укратко навести резултате до којих је кандидат дошао;
- б) Оцијенити да ли су добивени резултати правилно, логично и јасно тумачени, упоређујући са резултатима других аутора и да ли је кандидат при томе испољавао довољно критичности;
- в) Посебно је важно истаћи до којих нових сазнања се дошло у истраживању, који је њихов теоријски и практични допринос, као и који нови истраживачки задаци се на основу њих могу утврдити или назирати.

## 5. ЗАКЉУЧАК И ПРИЈЕДЛОГ

У циљу потврде претпоставке да су бактерије као патогени стрних жита присутне у Србији, докторант је приступио прикупљању узорака, изолацији и идентификацији изолованих сојева бактерија. Анализом прикупљених узорака утврђено је да су као потенцијални проузроковачи уочених симптома на оболелим биљкама присутне бактерије.

У циљу идентификације изолованих сојева, примењене су класичне методе проучавања патогених и биохемијско-физиолошких одлика бактерија, али и новије молекуларне методе анализе ДНК, чиме је по први пут детаљније окарактерисана популација ових патогена у Србији.

Примењене су савремене методе проучавања, чијим увођењем у лабораторијску праксу су створени услови за брзу и прецизну дијагнозу бактериоза стрних жита у нас. Од великог научног значаја је чињеница да је по први пут детектовано неколико различитих бактерија као патогена ове групе биљака. Такође, овим опсежним истраживањима потврђено је да карантински патоген *Xanthomonas translucens* није присутан у Србији.

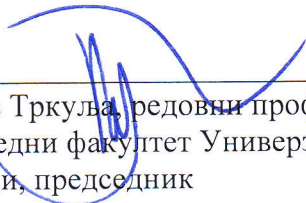
Докторант је овим истраживањима дао значајан допринос познавању популације бактерија патогена стрних жита не само домаћој већ и светској фитобактериологији.

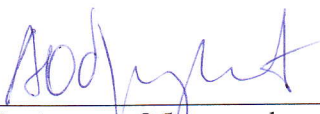
Стога комисија позитивно оцењује урађену докторску дисертацију кандидата мр Татјане Кнежевић и предлаже Наставно-научном већу Пољопривредног факултета Универзитета у Бањој Луци да кандидату одобри јавну одбрану.

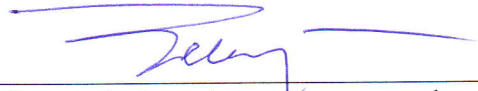
- а) Навести најзначајније чињенице што тези даје научну вриједност, ако исте постоје дати позитивну вриједност самој тези;
- б) Ако је приједлог негативан, треба дати опширније образложење и документовано указати на учињене пропусте, односно недостатке написане докторске тезе.

### ПОТПИС ЧЛАНОВА КОМИСИЈЕ

Датум: 28.04.2022.

1.  Др Војислав Тркуља, редовни професор, Пољопривредни факултет Универзитета у Бањој Луци, председник

2.  Др Алекса Обрадовић, редовни професор, Пољопривредни факултет Универзитета у Београду, ужа научна област: Фитопатологија, ментор

3.  Др Радивоје Јевтић, ванредни професор, Земјоделски факултет Универзитета "Гоце Делчев" Штип, Северна Македонија, члан

ИЗДВОЈЕНО МИШЉЕЊЕ: Члан комисије који не жели да потпише извјештај јер се не слаже са мишљењем већине чланова комисије, дужан је да унесе у извјештај образложење, односно разлог због којих не жели да потпише извјештај.



### ПРИЛОГ 1 . Извод из Литературе

- Adhikari, T.B., Hanse'n, J.M., Gurung, S. and Bonman, J. M. (2012): Pathogenic and genetic diversity of *Xanthomonas translucens* pv. *undulosa* in North Dakota. *Phytopathology*, 102:390-402.
- Afonin, A., Greene, S., Dzyubenko, N. and Frolov, A. (2008): Interactive Agricultural Ecological Atlas of Russia and Neighboring Countries. Economic Plants and their Diseases, Pests and Weeds [Online]. Доступно на: <http://www.agroatlas.ru>.
- Agrios, G. N. (2005): *Plant pathology*, 5th ed. Academic Press, San Diego, CA. USA. 922 pp.
- Alexandrova, M., Zaccardelli, M., Stefani, E. and Bazzi, C. (1995): Testing for *Pseudomonas syringae* pv. *atofaciens* and *Xanthomonas campestris* pathovars on cereals in Italy. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 25, 437-448.
- Almeida, N.F., Yan, S., Cai, R., Clarke, C. R., Morris, C. E., Schaad, N. W., Schuenzel, E. L., Lacy, G. H., Sun, X., Jones, J. B., Castillo, J. A., Bull, C. T., Leman, S., Guttman, D. S., Setubal, J. C. and Vinatzer, B. A. (2010): PAMDB, a multilocus sequence typing and analysis database and website for plant-associated microbes. *Phytopathology*, 100(3): 208-215.
- Alvarez, A. M. (2004): Integrated approaches for detection of plant pathogenic bacteria and diagnosis of bacterial diseases. *Annual Review Phytopathology* 42: 339–366.
- Amanifar, Naser. (2019): First Report of *Pseudomonas syringae* pv. *lapsa* Causing Leaf Streak and Black Chaff of Winter Wheat in Southwest Iran. *Plant Disease*. 104(1), 276-276.
- Арсенијевић, М. (1986): *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* van Hall као паразит пшенице. *Заштита биља*, 37 (1): бр. 175: 67- 78.
- Арсенијевић, М. и Костић, Б. (1989): Бактериозна пегавост класова пшенице. Посебан отисак из часописа *Заштита биља*, 40 (1): бр. 187.
- Baltrus, D. A., Yourstone, S., Lind, A., Guilbaud, C., Sands, D. C., Jones, C. D., Morris, C. E. and Dangl, J. L. (2014): Draft genome sequences of a phylogenetically diverse suite of *Pseudomonas syringae* strains from multiple source populations. *Genome Announc.*
- Bartoli, C., Berge, O., Monteil, C. L., Guilbaud, C., Balestra, G. M., Varvaro, L., Jones, C., Dangl, J. L., Baltrus, D. A., Sands, D. C. and Morris, C. E. (2014): The *Pseudomonas viridiflava* phylogroups in the *P. syringae* species complex are characterized by genetic variability and phenotypic plasticity of pathogenicity-related traits. *Environ Microbiol*: 16 (7): 2301- 15.
- Bartoli, C., Lamichhane, J. R., Berge O., Guilbaud, C., Varvaro, L., Balestra, G. M., Vinatzer, B. A. and Morris, C. E. (2015): A framework to gauge the epidemic potential of plant pathogens in environmental reservoirs: the example of kiwifruit canker. *Molecular Plant Pathology* 16(2), 137–149.
- Bender, C. L., Alasrcón-Chaidez, F. and Gross, D. C. (1999): *Pseudomonas syringae* phytotoxins: Mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases. *Microbiology and molecular biology reviews*, 63, 2: 266- 292;
- Bergey, D. H. and Holt, J. G. (1994): *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th Edition, Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland.
- Bereswill, S., Bugert, P., Volksch, B., Ullrich, M., Bender, C. and Geider, K. (1994): Identification and relatedness of coronatine- producing *Pseudomonas syringae* pathovars by PCR analyses and sequence determination of the amplification products. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(8): 2924-2930;
- Berge, O., Monteil, C. L., Bartoli, C., Chandeysson, C., Guilbaud, C., Sands, D. C. and Morris, C. (2014): A user's guide to a data base of the diversity of *Pseudomonas syringae* and its application to classifying strains in this phylogenetic complex. *PLoS ONE* 9(9): e105547;
- Borschinger, B., Bartoli, C., Chandeysson, C., Guilbaud, C., Parisi, L., Bourgeay, J.F., Buisson, E. and Morris, C. (2016): A set of PCRs for rapid identification and characterization of *Pseudomonas syringae* phylogroups. *Journal of Applied Microbiology*. 121, 903.
- Bull, C. T., De Boer, S. H. Denny, T.P., Firrao, G., Fischer-Le Saux, M., Sandler, G. S., Scortichini, M., Stead D. E. and Takikawa, Y. (2010): Comprehensive list of names of plant pathogenic bacteria, 1980-



2007. Journal of Plant Pathology, 92(3), 551-592.

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

Bull, C. T. and Koike, S. T. (2015): Practical Benefits of Knowing the Enemy: Modern Molecular Tools for Diagnosing the Etiology of Bacterial Diseases and Understanding the Taxonomy and Diversity of Plant-Pathogenic Bacteria. Annual Review of Phytopathology 2015 53:1, 157-180.

Bultreys, A. and Gheysen, I. (1999): Biological and molecular detection of toxic lipodepsipeptide-producing *Pseudomonas syringae* strains and PCR identification in plants. Applied and Environmental Microbiology, 65: 1904-1909;

Butsenko, L., Pasichnik, L., Kolomiets, Y., Kalinichenko, A., Suszanowicz, D., Sporek, M. and Patyka, V. (2020): Characteristic of *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* Isolated from Weeds of Wheat Field. Applied Sciences. 11. 286.

CABI (2015): Crop Protection Compendium. Wallingford, UK: CAB International, Доступно на: [www.cabi.org/cpc](http://www.cabi.org/cpc).

Çepni, E. and Gürel F. (2012): Variation in extragenic repetitive DNA sequences in *Pseudomonas syringae* and potential use of modified REP primers in the identification of closely related isolates. Genetics and Molecular Biology, 35(3): 650-656.

Cintas, N. A., Koike, S. T. and Bull, C. T. (2002): A new pathovar, *Pseudomonas syringae* pv. *alisalensis* pv.nov., proposed for the causal agent of bacterial blight of broccoli and broccoli raab. Plant Disease, 86(9): 992-998.

Council Directive 66/402/EEC of 14 June 1966 on the marketing of cereal seed (1966): Official Journal European Union L125, 2309– 2319, доступно на: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/en/ALL/?uri=CELEX:31966L0402>

Council Regulation (EU) 2016/2031 of the European Parliament of the Council of 26 October 2016 on protective measures against pests of plants, amending Regulations (EU) No 228/2013, (EU) No 652/2014 and (EU) No 1143/2014 of the European Parliament and of the Council and repealing Council Directives 69/464/EEC, 74/647/EEC, 93/85/EEC, 98/57/EC, 2000/29/EC, 2006/91/EC and 2007/33/EC. Доступно на: <http://data.europa.eu/eli/reg/2016/2031/oj>

Cunfer, B., M. and Scolari, B. (1982): *Xanthomonas campestris* pv. *translucens* on triticale and other small grains. Phytopathology, 72(6): 683-686.

Cunfer, B., M., Schaad N.W. and Morey D.D. (1978): Halo Blight of Rye: Multiplicity of symptoms under field conditions. Phytopathology, 68(11): 1545-1548.

DEFRA Plant Health PRA Team (2015): Rapid Pest Risk Analysis (PRA) for: *Xanthomonas translucens* pathovar *translucens*. Department for Food, Environment and Rural Affairs, Room 11G35, Sand Hutton, York, YO41 1LZ, доступно Diekmann, M. and Putter, C. A. J. (1995): Small grain temperate cereals. FAO IPGRI Technical guidance for the safe movement of germplasm, no. 14;

Dutta, B., Gitaitis, R., Agarwal, G., Coutinho, T. and Langston, D. (2018): *Pseudomonas coronafaciens* sp. nov., a new phyto-bacterial species diverse from *Pseudomonas syringae*. PloS one, 13(12), e0208271.

Duveiller, E. (1989): Research on “*Xanthomonas translucens*” of wheat and triticale at CIMMYT. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 19: 97- 103.

Duveiller, E. (1990): A seed detection of *Xanthomonas campestris* pv. *undulosa* using a modification of Wilbrink's agar medium. Parasitica, 46(1): 3- 17

Duveiller, E. (1994a): A pictorial series of disease assesment keys for bacterial leaf streak of cereals. Plant Disease, 78(2): 137-141;

Duveiller, E. (1994b): A study of *Xanthomonas campestris* pv. *undulosa* populations associated with symptomless wheat leaves. Parasitica, 50 (3-4): 109-117.

Duveiller, E. (1994c): Bacterial leaf strike or black chaff of cereals. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 24: 135-157.



- Duveiller E. and Maraite, H. (1990): Bacterial sheath rot of wheat caused by *Pseudomonas fuscovaginae* in the highlands of Mexico. *Plant Disease* 74:932– 935.
- Duveiller, E. and Bragard, C. (1992): Comparison of immunofluorescence and two assays for detection of *Xanthomonas campestris* pv. *undulosa* in seeds of small grains. *Plant Disease*, 76: 999-1003.
- Duveiller, E. and Maraite, H. (1993a): Study on yield loss due to *Xanthomonas campestris* pv *undulosa* in wheat under high rainfall temperate conditions. *Journal of Plant Diseases and Protection* 100: 453-459.
- Duveiller, E. and Maraite, H. (1993b): *Xanthomonas campestris* pathovars on cereals: Leaf streak or black chaff diseases. In: Ch. 1 of *Xanthomonas*. J. Swings, ed. Chapman and Hall, London, UK, pp. 76-79.
- Duveiller, E. and Maraite, H. (1995): Effect of temperature and air humidity on multiplication of *Xanthomonas campestris* pv. *undulosa* and symptom expression in susceptible and field-tolerant wheat genotypes. *J. Phytopathology*, 143: 227-232.
- Duveiller, E.; Bragard, C. and Maraite, H. (1991): Bacterial diseases of wheat in the warmer areas - reality or myth? In: *Wheat for the Nontraditional Warm Areas*. Proceedings of the International Conference, Iguazu Falls, Brazil, D. Saunders, ed. Mexico, D. F.: CIMMYT. pp. 189-202
- Duveiller, E., Fucikovsky, L. and Rudolph, K., (eds.) (1997): *The bacterial disease of wheat: Concepts and methods of disease management*. CIMMYT, Mexico.
- Duveiller, E., Kandel, Y. R., Sharma R. C. and Shrestha, S. M. (2005): Epidemiology of foliar blights (spot blotch and tan spot) of wheat in the plains bordering the Himalayas disease assessment. *Phytopathology*, Vol. 95, No. 3: 248- 256.
- EPPO (1997): Data sheets on quarantine pests. *Xanthomonas translucens* pv. *translucens*, доступно на: <https://www.eppo.int>
- EPPO PM 5/5 (1) (2012): Decision-support scheme for an Express Pest Risk Analysis. *EPPO Bulletin* 42(3): 457–462.
- EPPO PM 9/18 (2014): Decision support scheme for prioritizing action during outbreaks. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 44 (3), 443–456;
- EPPO PM 1/2 (30) (2021): EPPO A1 and A2 list of pest recommended for regulation as quarantine pests, доступно на: <https://gd.eppo.int/standrds/pm1/>
- FAOSTAT (2021): Crops and livestock products, доступно на: <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>
- Forster, R. L. and Schaad, N., W. (1988): Control of black chaff of wheat with seed treatment and a foundation seed health program. *Plant Disease*, 72: 935- 938.
- Fryda, S., J. and Otta, J., D. (1978): Epiphytic movement and survival of *Pseudomonas syringae* on spring wheat. *Phytopathology*, 68: 1064- 1067.
- Gadewar, A. V., Shekhawat, G. S. and Chakbarti, S. K. (1993): Antibiotic-induced virulence and changes in colony morphology of *Pseudomonas solanacearum*. Pp 261- 268. In: *Bacterial wilt* (Hartman GL and Hayward AC, Eds): ACIAR Proc. No 45, pp 261-268.
- Gardan, L., Shafik, H., Belouin, S., Broch, R., Grimont, F. and Grimont, P. A. D. (1999): DNA relatedness among the pathovars of *Pseudomonas syringae* and description of *Pseudomonas tremae* sp. nov. and *Pseudomonas cannabina* sp. nov. (ex Sutic and Dowson): *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49: 469- 478;
- Gašić, K., Prokić, A., Ivanović, M., Kuzmanović, N. and Obradović, A. (2012): Differentiation of *Pseudomonas syringae* pathovars originating from stone fruits. *Pesticides and Phytomedicine* 27(3):219-229.
- Guilbaud, C., Morris, C.E., Barakat, M., Ortet, P. and Berge, O. (2016): Isolation and identification of *Pseudomonas syringae* facilitated by a PCR targeting the whole *P. syringae* group. *FEMS microbiology ecology*, 92(1): fiv146.
- Girard, L., Lood, C., Rokni-Zadeh, H., van Noort, V., Lavigne, R. and De Mot, R. (2020): Reliable Identification of Environmental *Pseudomonas* Isolates Using the *rpoD* Gene. *Microorganisms*, 8(8),



1166.

Glinushkin, A., Beloshapkina, O., Solovykh, A., Sudarenkov, G. and Molnár, J. (2016): Bacterial Diseases of Wheat in the Southern Ural: Manifestations, Biological Characteristics and Monitoring Features. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*. 51, 57-67.

Gonzalez, A. J., Rodicio M. R. and Mendoza M. C. (2003): Identification of an emergent and atypical *Pseudomonas viridiflava* lineage causing bacteriosis in plants of agronomic importance in a Spanish region. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(5), 2936–2941.

Goss, E. M., Kreitman, M. and Bergelson, J. (2005): Genetic Diversity, Recombination and Cryptic Clades in *Pseudomonas viridiflava* Infecting Natural Populations of *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, 169(1), 21–35.

Gnanamanickam, S. and Immanuel, J. (2007): Epiphytic bacteria, their ecology and functions. In *Plant-Associated Bacteria*; Gnanamanickam, S., Ed.; Springer: Dordrecht, The Netherlands, pp. 131-154.

Gutiérrez-Barranquero, J. A., Carrión, V. J., Murillo, J., Arrebola, E., Arnold, D. L., Cazorla, F. M. and de Vicente, A. (2013): A *Pseudomonas syringae* diversity survey reveals a differentiated phylotype of the pathovar *syringae* associated with the mango host and mangotoxin production. *Phytopathology* 103: 1115- 1129.

Hampfl, V., Pavlicek, A. and Flegr, J. (2001): Construction and bootstrap analysis of DNA fingerprinting-based phylogenetic trees with the freeware program FreeTree: Application to trichomonad parasites. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51, 731-735.

Hauben, L., Vauterin, L., Swings, I. and Moore, E. (1997): Comparison of 16S rDNA sequences of all *Xanthomonas* species. *International Journal of Systemic Bacteriology* 47: 328-335.

Heredia-Ponce, Z., de Vicente, A., Cazorla, F. M. and Gutiérrez-Barranquero, J. A. (2021): Beyond the Wall: Exopolysaccharides in the Biofilm Lifestyle of Pathogenic and Beneficial Plant-Associated *Pseudomonas*. *Microorganisms* 2021, 9, 445.

Hirano, S. S. and Upper, C. H. (2000): Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae*-a pathogen, ice nucleus and epiphyte. *Microbiology and molecular biology reviews*, MMBR, 64(3): 624-653.

Hofte, M. and De Vos, P. (2007): Plant pathogenic *Pseudomonas* species. In: *Plant Associated Bacteria*. Edited by Gnanamanickam, S. S.: 507- 533.

Hwang, M. S. H., Morgan, R., L., Sarkar, S. F., Wang, P. W. and Guttman, D. S. (2005): Phylogenetic characterization of virulence and resistance phenotypes of *Pseudomonas syringae*. *Applied Environmental Microbiology*, 71(9): 5182-5191.

Inoue Y. and Takikawa Y. (2000): *Pseudomonas syringae* strains are classified into five groups by comparing DNA homology at the *hrp* neighbouring regions. *J. Gen. Plant Pathol.*, 66: 238-241;

ISPM 5. (2021): Glossary of phytosanitary terms. Rome, IPPC, FAO.

ISPM 6. (2018): Surveillance. Rome, IPPC, FAO.

ISPM 8. (2021): Determination of pest status in an area. Rome, IPPC, FAO.

ISPM 9. (1998): Guidelines for pest eradication programmes. Rome, IPPC, FAO.

ISPM 16. (2002): Pest reporting. Rome, IPPC, FAO.

ISPM 17. (2002): Pest reporting. Rome, IPPC, FAO.

Jones, J. B., Jackson, L. E., Balogh, B., Obradovic, A., Iriarte, F. B. and Momol, M. T. (2007): Bacteriophages for plant disease control. *Annual Review of Phytopathology*, 45:245–262

Kandel, Y.R., Osborne, L.E., Glover, K.D. and Tande, C.A. (2011): Yield loss in spring wheat due to disease caused by *Xanthomonas campestris* pv. *translucens*. *Phytopathology*. 101:S87-S87.

Kelpšienė, J., Sneideris, D., Burokienė, D. and Suproniene, S. (2021): The presence of pathogenic bacteria *Pseudomonas syringae* in cereals in Lithuania. *Zemdirbyste-Agriculture*. 108. 291-296.

Kimura, M. (1980): A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of molecular evolution* 16(2):111-120

Кнежевић, Т., Копривица, М., Јевтић, Р. и Обрадовић, А. (2016): Бактериозе стрних жита. *Билни лекар* 44 (5-6): 478-486.



- Koike, S. T., Bolda, M. P. and Bull, C. T. (2014): *Pseudomonas* Blight Caused by *Pseudomonas syringae* on Raspberry in California. *Plant Disease*, 98:8, 1151-1151.
- Кузмановић, Н. (2013): Идентификација, карактеризација и генетички диверзитет сојева *Agrobacterium* spp., проузроковача бактериозног рака винове лозе, докторска дисертација, Пољопривредни факултет Универзитета у Београду
- Lamichhane, J. R. and Venturi, V. (2015): Synergisms between microbial pathogens in plant disease complexes: a growing trend. *Frontiers in plant science* 6:385.
- Lamichhane, J. R., Messéan, A. and Morris, C. E. (2015): Insights into epidemiology and control of diseases of annual plants caused by the *Pseudomonas syringae* species complex. *J. Gen. Plant Pathol.*, Volume 81, Issue 5, pp 331-350.
- Langlois P. A., Snelling J., Hamilton J. P., Bragard J. P., Koebnik R., Verdier V., Triplett L.R., Blom J., Tisserat N.A. and Leach J.E. (2017): Characterization of the *Xanthomonas translucens* Complex Using Draft Genomes, Comparative Genomics, Phylogenetic Analysis, and Diagnostic LAMP Assays. *Phytopathology*, 107:519–527.
- Lelliott, R. A., Billing, E. and Hayward, A. C. (1966): A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonads. *Journal of Applied Bacteriology* 29, 470–489.
- Lipps, S. and Samac, D.(2022): *Pseudomonas viridiflava*: An internal outsider of the *Pseudomonas syringae* species complex. *Molecular Plant Pathology*. 23: 3-15.
- Maes, M., Garbeva, P. and Kamoen, O. (1996): Recognition and detection in seed of the *Xanthomonas* pathogens that cause cereal leaf streak using rDNA spacer sequences and polymerase chain reaction. *Phytopathology*, 86: 63-69.
- Марић, А. и Јевтић, Р. (2005): Атлас болести ратарских биљака (II издање): Пољопривредни факултет, Нови Сад, Научни институт за ратарство и повртарство, Нови Сад, Школска књига, Нови Сад, стр. 1-197.
- Matveeva, I. E. V., Pekhtereva, E. S. H., Polityko, V. A., Ignatov, A. N., Nikolaeva, E. V. and Schaad, N. W. (2003): Distribution and virulence of *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*, causal agent of basal glume rot in Russia. In: "*Pseudomonas* and related pathogens- biology and genetics" edited by Nicola Sante Iacobellis, Alan Collmer, Steven W. Hutcheson, John W. Mansfield, Cindy E. Morris, Jesus Murillo, Norman W. Schaad, David E. Stead, Giuseppe Surico, Matthias S. Ullrich, Kluwer academic publishers, Dordrecht, the Netherlands, pp 97-105.
- Matveeva, E. V., Ignatov A. N., Bobrova, V. K., Milyutina, I. A., Troitsky, A. V., Polityko, V. A. and Schaad, N. W. (2008): Genetic Diversity Among Pseudomonad Strains Associated with Cereal Diseases in Russian Federation. In: "*Pseudomonas syringae* Pathovars and Related Pathogens – Identification, Epidemiology and Genomics", Editors: M'Barek Fatmi, Alan Collmer, Nicola Sante Iacobellis, John W. Mansfield, Jesus Murillo, Norman W. Schaad, Matthias Ullrich, Kluwer academic publishers, Dordrecht, the Netherlands, pp 337-345.
- McManus, P.S., Stockwell, V. O., Sundin, G.W. and Jones A. L. (2002): Antibiotic use in plant agriculture. *Annual Review of Phytopathology*, 40: 443- 465.
- Mehta, Y., R. (1990): Management of *Xanthomonas campestris* pv. *undulosa* and *hordei* cereal seed testing. *Seed Science and Technology*, 18: 467-476.
- Mehta, Y. R., Riede, C. R., Campos, L. A. C. and Kohli, M. M. (1992): Integrated management of major wheat diseases in Brazil: an example for the Southern Cone region of Latin America. *Crop Protection*, 11(6): 517–524.
- Milus, E. A., Duveiller, E., Kirkpatrick, T. L. and Chalkley, D. B. (1996): Relationships between disease reactions under controlled conditions and severity of wheat bacterial streak in the field. *Plant disease*, 80: 726-730.
- Mohan, S., K. and Schaad, N., W. (1987): An improved agar plating assay for detecting *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and *P. s.* pv. *phaseolicola* in contaminated bean seed. *Phytopathology*, 77: 1390-1395.
- Monteil, C. L., Cai, R., Lui, H., Mechan Llontop, M. E., Leman, S., Studholme, D. J., Morris, C. E. and Vinatzer, B. A. (2013): Non-agricultural reservoirs contribute to emergence and evolution of *Pseudomonas syringae* crop pathogens. *New Phytologist*, 199(3): 800-811.
- Morris, C. E, Kinkel, L. L., Xiao, K., Prior, P. and Sands, D. C. (2007): Surprising niche for the plant



- pathogen *Pseudomonas syringae*. Infection, genetics and evolution: Journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases, 7(1), 84–92.
- Morris, C. E., Sands, D. C., Vinatzer, B. A., Glaux, C., Guilbaud, C., Buffière, A., Yan, S., Dominguez, H. and Thompson, B. M. (2008): The history of the plant pathogen *Pseudomonas syringae* is linked to the water cycle. The ISME Journal 2(3): 321-334.
- Morris, C. E., Sands, D. C., Vanneste, J. L., Montarry, J., Oakley, B., Guilbaud, C. and Glaux, C. (2010): Inferring the evolutionary history of the plant pathogen *Pseudomonas syringae* from its biogeography in headwaters of rivers in North America, Europe, and New Zealand. mBio 1(3): e00107-10.
- Morris, C.E., Barny, M.-A., Berge, O., Kinkel, L.L. and Lacroix, C. (2017), Frontiers for research on the ecology of plant-pathogenic bacteria: fundamentals for sustainability. Molecular Plant Pathology, 18: 308-319.
- Mulet, M., Lalucat, J. and Garcia-Valdes E. (2010): DNA sequence-based analysis of the *Pseudomonas species*. Environmental microbiology, 12(6), 1513–1530.
- Najafi Pour, G. and Taghavi, S. M. (2014): Discrimination of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* isolates from different hosts in Iran using pathogenicity tests and RAPD. International Journal of AgriScience, 4(1): 16- 27.
- Nei, M. and Li, W. H. (1979): Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 76, 5269-5273.
- Obradovic, A., Jones, J. B., Minsavage, G. V., Dickstein, E. R. and Momol, T. M. (2003): *Pseudomonas huttiensis* associated with leaf necrosis and blighting of tomato seedlings in the greenhouse. In: "Pseudomonas and related pathogens- biology and genetics" edited by Nicola Sante Iacobellis, Alan Collmer, Steven W. Hutcheson, John W. Mansfield, Cindy E. Morris, Jesus Murillo, Norman W. Schaad, David E. Stead, Giuseppe Surico, Matthias S. Ullrich, Kluwer academic publishers, Dordrecht, the Netherlands, pp 627-630.
- Otta, J. D., (1976): *Pseudomonas syringae*: Rough colony type mutants and filamentous cells. Phytopathology, 66: 249-252.
- Otta, J. D. (1977): Occurrence and characteristics of isolation of *Pseudomonas syringae* on winter wheat. Phytopathology, 67: 22-26.
- Page, R. D. (1996): TreeView: An application to display phylogenetic trees on personal computers. Computer Applications in the Biosciences: CABIOS 12(4): 357-358.
- Palacio- Bielsa, A., Cambra, M. A. and López, M. A. (2009): PCR detection and identification of plant-pathogenic bacteria: Updated review of protocols (1989-2007): Journal of Plant Pathology, 91 (2), 249-297.
- Parisi, L., Morgaint, B., Blanco Garcia, J., Guilbaud, C., Chandeysson, C. Bourgeay, J. F., Moronvalle, A., Brun, L., Brachet, M. L. and Morris, C. (2019): Bacteria from four phylogroups of the *Pseudomonas syringae* complex can cause bacterial canker of apricot. Plant Pathol, 68: 1249-1258.
- Parkinson, N., Cowie, C., Heeney, J. and Stead, D. (2009): Phylogenetic structure of *Xanthomonas* determined by comparison of *gyrB* sequences. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 59:264-274.
- Parkinson, N., Bryant, R., Bew, J. and Elphinstone, J. (2011): Rapid phylogenetic identification of members of the *Pseudomonas syringae* species complex using *rpoD* locus. Plant Pathology, 60: 338-344.
- Parte, A. C. (2014): LPSN—list of prokaryotic names with standing in nomenclature. Nucleic Acids Research, 42: 613- 616.
- Пасичник, Л., А. (1996): *Pseudomonas fluorescens*- новий возбудитель захворювання ржи. Микробиол. Журн. 57(2): 3-7.
- Пасичник, Л., А. (1999): Епіфітна фаза існування *Pseudomonas syringae* pv. *coronafaciens*- збудника ореольного бактеріозу вівса. Микробиол. Журн. 61(6), 9- 14.
- Pasichnik, L. (2016): The Spectrum of Weed Phytopathogens in Wheat Agrophytocenosis. Mikrobiolohichniy zhurnal (Kiev, Ukraine : 1993): 78(6): 19-28.
- Пасичник, Л., А. и Королева, И. Б. (1991): *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* - возбудитель



бактериальной пятнистости ржи на Украине. Микробиол. Журн. 53(2): 49- 55.

Pasichnik L.A. and Khodos, S. F. (1996): Heterogeneity of natural population of *Pseudomonas syringae* pv. *coronafaciens*. Микробиол. Журн. 58(4): 3- 6.

Пасичник, Л. А., Королева, И. Б., Гвоздяк (1991): Серологические свойства возбудителя бактериоза ржи *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*. Микробиол. Журн. 53(6): 82–87.

Pasichnik L. A., Yakovleva L. M., Grozdyak R. I. and Vassilev V. I. (2003): The serological heterogeneity of *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* strains and their ecological niches. Mikrobiologiya, 72(6), 828–833.

Пасичник, Л. А., Ходос, С., Буценко, Л. и Патыка, В. (2011): Бактериальные болезни пшеницы. Зерно, 2.

Rademaker, J. L. W., Norman, D. J., Forster, R. L., Louws, F. J., Schultz, M. H. and de Bruijn, F. J. (2006): Classification and identification of *Xanthomonas translucens* isolates, including those pathogenic to ornamental asparagus. Phytopathology, 96(8): 876- 884.

Rubio, I., Bourzar, H., Jardini, T.M., Koike, S.T. and Bull, C.T. (2012): Novel *Pseudomonas syringae* strains associated with leaf spot diseases on watermelon (*Citrullus lanatus*) and squash (*Cucurbita pepo*) in California. Phytopathology. 102:S4.103.

Saari E.E. and Prescott J.M. (1975): A scale for appraising the foliar intensity of winter wheat diseases. Plant Disease Report, 595: 337–380.

Saitou, N. and Nei, M. (1987): The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution 4(4): 406-425.

Sands, D.C. (1990): Physiological criteria - determinative tests. In: Methods in Phytobacteriology. Eds. Klement, Z., Rudolph, K., Sands, D.C. Akademiai Kiado, Budapest, Hungary, pp. 133-143.

Sarkar, S. F. and Guttman, D. S. (2004): Evolution of the core genome of *Pseudomonas syringae*, a highly clonal, endemic plant pathogen. Applied and Environmental Microbiology 70(4), 1999–2012.

Sarkar, S. F., Gordon, S. J., Martin, G. B. and Guttman, D.S. (2006): Comparative genomics of host-specific virulence in *Pseudomonas syringae*. Genetics 174(2), 1041–1056.

Sarris, P. F., Trantas, E. A., Mpalantinaki, E., Ververidis, F. and Goumas, D. E. (2012): *Pseudomonas viridiflava*, a multi host plant pathogen with significant genetic variation at the molecular level. PLoS ONE 7(4): e36090.

Sato, M., Watanabe, K. and Sato, Y. (2001): *Pseudomonas syringae* pv. *solidagae* pv. nov., the causal agent of bacterial leaf spot of tall goldenrod *Solidago altissima* L. Journal of General Plant Pathology, 67(4): 303-308.

Scortichini, M., Rossi, M. P., Loreti, S., Bosco, A., Fiori, M., Jackson, R. W., Stead, D. E., Aspin, A., Marchesi, U., Zini, M. and Janse, J.D. (2005): *Pseudomonas syringae* pv. *coryli*, the causal agent of bacterial twig dieback of *Corylus avellana*. Phytopathology, 95(11): 1316-1324.

Slovareva, O. (2020): Detection and identification of wheat and barley phytopathogens in the Russian Federation. Microbiology Independent Research journal. 7(1): 13-23.

Sorensen, K. N., Kim, K. H. and Takemoto, J. Y. (1998): PCR detection of cyclic lipodepsinonapeptide-producing *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and similarity of strains. Applied Environmental Microbiology, 64(1): 226-230.

Stead, D. E., Simpkins, S. A., Weller, S. A., Hennessy, J., Aspin, A., Stanford, H., Smith, N. C. and J. G. Elphinstone (2003): Classification and identification of plant pathogenic *Pseudomonas* species by REP-PCR derived genetic fingerprints. In: "*Pseudomonas* and related pathogens- biology and genetics" edited by Nicola Sante Iacobellis, Alan Collmer, Steven W. Hutcheson, John W. Mansfield, Cindy E. Morris, Jesus Murillo, Norman W. Schaad, David E. Stead, Giuseppe Surico, Matthias S. Ullrich, Kluwer academic publishers, Dordrecht, the Netherlands, 411- 422.

Stubbs, R. W., Prescott, J. M., Saari, E. E. and Dubin, H. J. (1986): Cereal disease methodology manual. CYMMYT, Mexico.

Sundin, G. W., Castiblanco, L. F., Yuan, X., Zeng, Q. and Yang, C. H. (2016): Bacterial disease management: challenges, experience, innovation and future prospects: Challenges in Bacterial Molecular

Plant Pathology. Molecular plant pathology, 17(9): 1506–1518.

Шутић, Д. (1956): Ореолна пегавост овса. Зборник радова Пољопривредног факултета, Београд, год IV, 12: 1-10.

Tajima, F. and Nei, M. (1984): Estimation of evolutionary distance between nucleotide sequences. *Molecular Biology and Evolution* 1(3): 269–85.

Tamura, K., Peterson D, Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S. (2011): MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28(10): 2731–2739.

Thompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. J. (1994): CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22(22), 4673–4680.

Toben, H., Mavridis, A. and Rudolph, K. (1991): On the occurrence of basal glume rot of wheat and barley caused by *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* in West Germany. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 98: 225-235.

United States Department of Agriculture (n. d.): *USDA Pest Risk Assessment Process Flowchart version 5.2.*, доступно на: <http://www.aphis.usda.gov/ppq/pr/>

NSHS (2019): Phytosanitary Field Inspection Procedures, version 1.3, доступно на: <http://www.seedhealth.org/>

Valencia-Botin, A.J. and Cisneros-Lopes, M.E. (2012): A review of the Studies and Interactions of *Pseudomonas syringae* pathovars on wheat. *International Journal of Agronomy*, vol. 2012, Article ID 692350, 5 pages.

Vanneste, J. L., Cornish, D. A., Yu, J. and Morris, C. E. (2009): The application of polymerase chain reaction for characterising of *Pseudomonas syringae* isolated from New Zealand rivers. *New Zealand Plant Protection* 62: 256-261.

Vassilev, V., Lavermicocca, P., Di Giorgio, D. and Iacobellis, N. S. (1996): Production of syringomycins and syringopeptins by *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*. *Plant Pathology*, 45(2): 316-322.

Versalovic, J., Schneider, M., de Bruijn, F.J. and Lupski, J.R. (1994): Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular and Cellular Biology* 5, 25-40.

Weingart, H. and Volksch, B. (1997): Genetic fingerprinting of *Pseudomonas syringae* pathovars using ERIC-, REP- and ISS0-PCR. *Journal of Phytopathology*, 145: 339-345.

Yakovleva, L.M., Zdorovenko, G.M. and Gvozdyak, R.I. (2002): Some characteristics of *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* dissociants. *Mikrobiologija*, 71(2), 240–246.

Yamamoto, S., Kasai, H., Arnold, D., Jackson, R., Vivian, A. and Harayama, S. (2000): Phylogeny of the genus *Pseudomonas*: intrageneric structure reconstructed from the nucleotide sequences of *gyrB* and *rpoD* genes. *Microbiology* 146, 2385–94.

Young, J.M. (2010): Taxonomy of *Pseudomonas syringae*. *Journal of Plant Pathology*, 92: S5-S114.

Young, J. M., Park, D. C., Shearman, H. M. and Fargier, E. (2008): A multilocus sequence analysis of the genus *Xanthomonas*. *Systematic and applied microbiology*, 31(5), 366–377.

Zillinsky, F., J. (1983): *Common Diseases of Small Grain Cereals: A Guide to Identification*. CYMMYT, Mexico.



Изјава 1

**ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ**

**Изјављујем  
да је докторска дисертација**

Наслов рада **"Бактерије као патогени стрних жита у Србији"**

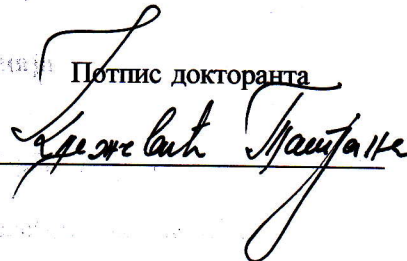
Наслов рада на енглеском језику **"Bacteria as pathogens of small grain cereals in Serbia"**

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да докторска дисертација, у цјелини или у дијеловима, није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

У Бањој Луци 03.06.22.

да је докторска дисертација

Потпис докторанта



## Изјава 2

### Изјава којом се овлашћује Универзитет у Бањој Луци да докторску дисертацију учини јавно доступном

Овлашћујем Универзитет у Бањој Луци да моју докторску дисертацију под насловом

#### "Бактерије као патогени стрних жита у Србији"

---

која је моје ауторско дјело, учини јавно доступном.

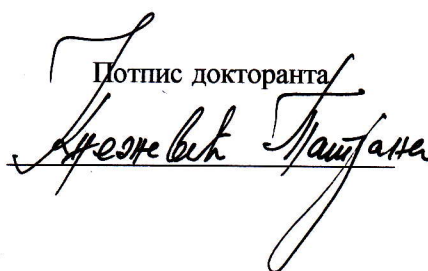
Докторску дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у дигитални репозиторијум Универзитета у Бањој Луци могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (*Цреативе Цоммонс*) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство – некомерцијално
3. **Ауторство – некомерцијално – без прераде**
4. Ауторство – некомерцијално – дијелити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – дијелити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

У Бањој Луци 03.06.22.

Потпис докторанта  


**Изјава 3**

**Изјава о идентичности штампане и електронске верзије  
докторске дисертације**

Име и презиме аутора **мр Татјана Кнежевић**

Наслов рада **"Бактерије као патогени стрних жита у Србији"**

Ментор **проф. др. Алекса Обрадовић**

Изјављујем да је штампана верзија моје докторске дисертације идентична електронској верзији коју сам предао/ла за дигитални репозиторијум Универзитета у Бањој Луци.

У Бањој Луци, 03.06.22.

Потпис докторанта  
*Татјана Кнежевић*