

UNIVERZITET U BEOGRADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET

Anđelka B. Prokić

Xanthomonas arboricola pv. *corylina* -
IDENTIFIKACIJA PATOGENA I
BIODIVERZITET POPULACIJE

doktorska disertacija

Beograd, 2014

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF AGRICULTURE

Andelka B. Prokić

Xanthomonas arboricola pv. *corylina* -
IDENTIFICATION OF THE PATHOGEN
AND POPULATION BIODIVERSITY

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2014

Komisija za ocenu i odbranu:

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

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

dr Milan Ivanović, docent
Univerzitet u Beogradu - Poljoprivredni fakultet

dr Čedo Oparnica, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu - Poljoprivredni fakultet

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

Datum odbrane: _____

Zahvalnica

Ova doktorska disertacija realizovana je u Laboratoriji za fitobakteriologiju Poljoprivrednog fakulteta u Beogradu, u okviru projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije III46008: "Razvoj integrisanih sistema upravljanja štetnim organizmima u biljnoj proizvodnji sa ciljem prevazilaženja rezistentnosti i unapređenja kvaliteta i bezbednosti hrane" čiji je rukovodilac prof. dr Aleksa Obradović.

Ovom prilikom želim da se zahvalim svom mentoru profesoru dr Aleksi Obradoviću na predloženoj temi disertacije, na nesebično prenetom znanju i dragocenim savetima u toku izrade ovog rada, kao i na podršci tokom doktorskih studija.

Zahvaljujem se članovima komisije dr Veljku Gavriloviću i prof. dr Čedi Oparnici na saradnji i savetima tokom izrade disertacije.

Posebno se zahvaljujem kolegama iz Laboratorije za fitopatobakteriologiju Poljoprivrednog fakulteta u Beogradu, dr Milanu Ivanoviću, dr Katarini Gašić, dr Nemanji Kuzmanoviću i dipl. inž. Neveni Blagojević na nesebičnoj pomoći i podršci.

Takođe, zahvaljujem se svim kolegama sa Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo u Beogradu, Instituta za zaštitu bilja i životnu sredinu u Beogradu, kao i Instituta za histologiju, Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, koji su mi pomogli oko realizacije dela istraživanja.

Zahvaljujem Ministarstvu nauke, prosvete i tehnološkog razvoja za stipendiranje mojih doktorskih studija.

Svojim roditeljima, sestri, suprugu Nebojši i ćerki Tamari od srca hvala za sve.

Xanthomonas arboricola pv. *corylina* - IDENTIFIKACIJA PATOGENA I
BIODIVERZITET POPULACIJE

REZIME

Bakteriozna plamenjača leske, čiji je prouzrokovatelj fitopatogena bakterija *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina* (Xac), najznačajnije je bakteriozno oboljenje ove jezgraste voćke u svetu. U našoj zemlji bolest je prvi put uočena 50-ih godina prošlog veka, nakon čega nije bilo daljih proučavanja ovog patogena.

U periodu 2008 - 2011. godine, u nekoliko rejona gajenja leske u Srbiji uočena je pojava simptoma pegavosti lišća, nekroze i uvelosti pupoljaka i letorasta, koji su ukazivali na moguću bakterioznu prirodu oboljenja. Simptomatični uzorci obolelih biljaka prikupljeni su sa različitih lokaliteta u našoj zemlji sa ciljem utvrđivanja etiologije oboljenja.

Iz zaraženog biljnog tkiva izolovani su Gram i oksidaza negativni, katalaza-pozitivni aerobni sojevi bakterija žute boje kolnija na HA podlozi. Za dalji rad odabrano je ukupno 47 reprezentativnih sojeva, koji su proučeni primenom standardnih i savremenih metoda. U istraživanja su uključeni i sojevi poreklom iz Poljske, kao i referentni sojevi Xac poreklom iz međunarodnih kolekcija. Detaljno su proučene morfološke, patogene, biohemijsko-fiziološke, serološke i genetičke odlike sojeva, na osnovu kojih su svi proučavani sojevi identifikovani kao *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina*.

Na podlozi od hranljivog agara (HA) formirane su sitne i sjajne kolonije, dok su one na podlozi obogaćenoj glukozom (GYCA) bile krupne, sluzaste i ispupčene. Svi proučavani sojevi hidrolizuju škrob, želatin i eskulin, koriste glukozu, maltozu, saharozu kao izvor ugljenika, ali ne i sorbitol, metabolišu kvinate, razvijaju se pri 35°C i u prisustvu 2% NaCl.

Sojevi su prouzrokovali hipersenzitivnu reakciju na listovima duvana i paradajza i mahunama boranije. Patogenost sojeva potvrđena je testom patogenosti na domaćinu i reprodukcijom simptoma prirodne infekcije.

Na osnovu Biolog testa utvrđena je raznovrsnost proučavanih sojeva čiji su metabolički profili bili specifični za rod *Xanthomonas*.

Serološke metode (ELISA i IF test) ukazale su na sličnost seroloških karakteristika među proučavanim sojevima, kao i sa kontrolnim sojem Xac.

Taksonomska pripadnost sojeva do nivoa vrste potvrđena je primenom dve molekularne PCR metode. Korišćenjem prajmera specifičnih za 16S RNK gen utvrđena je pripadnost rodu *Xanthomonas*. Ovi rezultati potvrđeni su filogenetskom analizom parcijalne sekvence 16S rRNK gena soja KFB 275. Detekcijom sekvence *qumA* gena kod svih proučavanih sojeva ustanovljena je pripadnost vrsti *X. arboricola*.

Molekularna karakterizacija izvršena primenom rep-PCR i PFGE metoda ukazala je na značajan genetički diverzitet među proučavanim sojevima. Nakon PFGE analize dobijeni su jedinstveni genetički profili za većinu reprezentativnih sojeva, čime je potvrđena heterogenost populacije. Uočen je visok stepen korelacije između rep-PCR grupa i PFGE DNK profila.

Sekvencionom analizom konstitutivnog *rpoD* gena određena je genotipska srodnost sojeva poreklom iz naše zemlje sa proučavanim sojevima iz inostranstva. Takođe, izvršena je diferencijacija Xac od drugih predstavnika vrste *X. arboricola*.

Prajmeri AN10-F/AN10-R dizajnirani u ovom istraživanju pogodni su za detekciju *Xanthomonas* sojeva poreklom iz leske, ali ne i za diferencijaciju od srodnih *Xanthomonas* patogena prema kojima su, takođe ispoljili specifičnost umnožavanjem ciljanog DNK fragmenta.

Proučavanjima dejstva baktericida na razvoj bakterijskih ćelija u *in vitro* uslovima nije ustanovljena rezistentnost sojeva, što ukazuje da njihova primena u kontroli bakterijske plamenjače leske može biti i dalje efikasna. Razlike u osetljivosti sojeva uočene u eksperimentu ukazuju na mogućnost razvoja otpornosti Xac na pojedina jedinjenja bakra.

Ključne reči: *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina* (Xac), bakterijska plamenjača leske, bakteriološke odlike, identifikacija, Biolog test, serologija, PCR, genetički diverzitet

Naučna oblast: Biotehničke nauke

Uža naučna oblast: Fitopatologija

UDK: 632.35:634.54 (043.3)

***Xanthomonas arboricola* pv. *corylina* - IDENTIFICATION OF THE PATHOGEN AND POPULATION BIODIVERSITY**

ABSTRACT

Bacterial blight of hazelnut, caused by *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina* (Xac), is the most important bacterial disease of this nut crop worldwide. In our country, after the disease was initially described in the 1950s, there were no further data about the research of this pathogen.

During the growing season of 2008-2011, symptoms of leaf spots, bud and twig necrosis and dieback, suggesting bacterial infection, were observed on hazelnut plants in several localities in Serbia. In order to study etiology of disease, symptomatic samples of diseased hazelnut plants were collected from different hazelnut-growing regions in the country.

Isolations from the diseased tissue resulted in Gram and oxidase negative, catalase-positive, aerobic yellow bacterial colonies. Total of 47 representative strains were selected for further study. Strains isolated from hazelnut in Poland and various reference strains of Xac originating from international collections were also included in research. Based on their morphological, pathogenic, biochemical, physiological, serological and genetic characteristics tested strains were identified as *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina*.

Bacterial colonies formed on NA medium were small and glistening and on glucose amended GYCA medium large, mucous and domed. All strains hydrolyzed starch, gelatin and esculin, used glucose, maltose, sucrose as a carbon source, but not sorbitol, metabolized quinates, developed at 35 °C in the presence of 2% NaCl.

The strains induced hypersensitive reaction of tobacco, tomato leaves and bean pods. Pathogenic nature of the strains was confirmed in pathogenicity test on host plants by reproduction of symptoms similar to natural infection.

Based on carbon source utilization, metabolic diversity of investigated strains was confirmed. Strain's metabolic profiles were specific for *Xanthomonas* genus.

Serological methods (ELISA i IF test) indicated similarity in serological characteristics among the studied strains, as well as the control Xac strain.

Taxonomic position of studied strains to species level was further confirmed using two molecular PCR based methods. Primers specific for the 16S RNA gene identified the bacterium to the genus level. Results obtained by PCR method were supported by phylogenetic analysis based on partial sequence of 16S rRNA gene of the strain KFB 275. Amplification of *qumA* gene sequence in all investigated strains confirmed that strains belong to species *X. arboricola*.

Molecular characterization and genetic diversity of Xac strains studied by rep-PCR and PFGE DNA fingerprinting techniques indicated significant genetic diversity among strains. Unique genetic profiles of representative strains were obtained by PFGE analysis confirming the heterogeneity of the population. Clear correlation between the rep-PCR group and PFGE DNA profiles was determined.

Sequence analysis of housekeeping *rpoD* gene revealed genotypic relatedness of strains originating from Serbia with referent Xac strains. In addition, all Xac strains were differentiated and separated in a distinct genetic group from other representative *X. arboricola* species, confirming taxonomic position of this pathogen.

Investigation of the effects of bactericides on the development of bacterial cells *in vitro* showed that all strains were sensitive, indicating their efficacy in controlling the pathogen. However, differences in the susceptibility of strains observed in the experiment suggest possible resistance development to copper compounds.

Key words: *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina* (Xac), hazelnut bacterial blight, bacteriological characteristics, identification, Biolog test, serology, PCR, genetic diversity

Scientific field: Biotechnical Science

Scientific discipline: Phytopathology

UDC: 632.35:634.54 (043.3)

SADRŽAJ:

1. UVOD.....	1
2. PREGLED LITERATURE	2
2.1 Poreklo, rasprostranjenost i biologija leske (<i>Corylus</i> sp.).....	2
2.2 Značaj i proizvodnja leske u svetu	2
2.3 Rasprostranjenost bakterioza leske i ekonomski značaj	4
2.4 Bakteriozna plamenjača leske	5
2.5 Suzbijanje bakteriozne plamenjače leske.....	12
2.5.1 Pojava rezistentnosti na baktericide	13
2.6 Opšte karakteristike i taksonomija <i>Xanthomonas</i> spp.....	13
2.7 Detekcija, identifikacija i genetički diverzitet Xac	15
2.7.1 Izolacija patogena.....	16
2.7.2 Morfološke i odgajivačke odlike.....	17
2.7.3 Biohemijsko-fiziološke odlike	17
2.7.4 Biolog test	18
2.7.5 Serološke odlike	19
2.7.6 PCR analiza.....	20
2.7.7 Genetički diverzitet Xac.....	21
2.7.7.1 Rep-PCR	22
2.7.7.2 Makrorestrikciona analiza i elektroforeza u pulsirajućem električnom polju.....	23
2.7.8 Sekvenciona analiza 16S rRNK i konstitutivnih gena	25
3. RADNA HIPOTEZA	27
3.1 CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	28
4. MATERIJAL I METODE	29
4.1 Izolacija patogena.....	29
4.1.1 Održavanje i čuvanje bakterija u kolekciji.....	33
4.2 Patogene odlike proučavanih sojeva	33
4.2.1 Hipersenzitivna reakcija (HR).....	33
4.2.2 Test patogenosti na biljci domaćinu.....	34

4.2.2.1 Inokulacija pupoljaka	34
4.2.2.2 Inokulacija pupoljaka i stabla.....	34
4.3. Morfološke i odgajivačke odlike.....	35
4.3.1. Razlikovanje bakterija po Gramu.....	35
4.3.2 Transmisiona elektronska mikroskopija (TEM)	35
4.3.3 Izgled i razvoj kolonija na hranljivim podlogama	36
4.3.4 Maksimalna temperatura razvoja	36
4.3.5 Tolerantnost prema 2 i 5% NaCl.....	37
4.4 Biohemijsko-fiziološke odlike	37
4.4.1 Aktivnost oksidaze	37
4.4.2. Aktivnost katalaze	38
4.4.3 Oksidativno-fermentativni metabolizam glukoze (O/F test).....	38
4.4.4 Korišćenje različitih izvora ugljenika	38
4.4.5 Hidroliza skroba	39
4.4.6 Redukcija nitrata	39
4.4.7 Hidroliza eskulina	40
4.4.8 Hidroliza želatina	40
4.5 Biolog test	40
4.6 Serološke odlike	42
4.6.1 DAS-ELISA test.....	42
4.6.2 IF test.....	43
4.7 Proučavanje osetljivosti sojeva prema baktericidima	44
4.8 Molekularne metode proučavanja patogena.....	44
4.8.1 Ekstrakcija DNK	44
4.8.2 Detekcija proučavanih sojeva primenom metode lančanog umnožavanja	46
fragmenta nukleinske kiseline – PCR	46
4.8.3 Sekvenciona analiza 16S rRNK gena	48
4.8.4 Proučavanje genetičkog diverziteta.....	49
4.8.4.1 REP-PCR analiza	49
4.8.4.2 Makrorestrikciona analiza i elektroforeza u pulsirajućem električnom polju - PFGE	51
4.8.5. Dizajn prajmera	54

4.8.5.1 Ekstrakcija i prečišćavanje DNK fragmenata iz agaroznog gela i ugradnja u vektor.....	54
4.8.5.2 Transformacija <i>E. coli</i> kompetentnih ćelija toplotnim šokom ("Heat shock").....	55
4.8.5.4 Umnožavanje i sekvenciranje kloniranog DNK fragmenata.....	56
4.8.6 Analiza <i>rpoD</i> gena	57
5. REZULTATI	59
5.1 Simptomi bolesti i izolacija patogena	59
5.2 Bakteriološke karakteristike sojeva.....	60
5.2.1 Patogene odlike proučavanih sojeva	60
5.2.1.1 Hipersenzitivna reakcija.....	60
5.2.1.2 Test patogenosti	61
5.2.2 Morfološke i odgajivačke odlike.....	63
5.2.3 Biohemijsko-fizološke odlike	65
5.3 Biolog test	70
5.4 Serološke metode identifikacije	74
5.5 Osetljivost prema baktericidima.....	75
5.6 Molekularna identifikacija i karakterizacija.....	78
5.6.1 Detekcija proučavanih sojeva primenom PCR metode.....	78
5.6.2 Sekvenciona analiza 16S rRNK gena	79
5.6.3 Rep-PCR	81
5.6.4 Restrikciona analiza i elektroforeza u pulsirajućem električnom polju	85
5.6.5 Dizajn prajmera i razvoj PCR metode za detekciju Xac sojeva.....	88
5.6.6 Analiza <i>rpoD</i> gena	89
6. DISKUSIJA	92
6.1 Izolacija bakterija	92
6.2 Proučavanje bakterioloških i patogenih odlika	93
6.3 Biolog test	96
6.4 Serološke metode identifikacije	97
6.5 Osetljivost prema baktericidima.....	98
6.6 PCR analiza	99
6.7 Sekvenciona analiza 16S rRNA gena.....	100

6.8 Genetički diverzitet proučavanih sojeva	101
6.9 Dizajn prajmera	102
6.10 Analiza <i>rpoD</i> gena	103
7. ZAKLJUČAK.....	105
8. LITERATURA	107

1. UVOD

Leska (*Corylus sp.*) predstavlja jednu od najznačajnijih vrsta jezgrastih voćaka zastupljenih u ljudskoj ishrani, čija je upotreba u stalnom porastu (Mitrović, 2002). Pojava štetnih organizama neretko predstavlja ograničavajući faktor savremene i intenzivne proizvodnje ove biljke jer dovodi do smanjenja prinosa i pogoršanja kvaliteta plodova, dok najveće ekonomske štete nastaju usled skraćanja eksploatacije zasada. Osim fitopatogenih gljiva i virusa, kao prepreka uspešnom gajenju leske mogu se pojaviti bolesti prouzrokovane fitopatogenim bakterijama (Obradović i sar., 2009). U zemljama sa dugom tradicijom u gajenju ovog voća veoma je rasprostranjena pojava prevremenog sušenja i izumiranja pojedinih delova ili celih biljaka usled štetne aktivnosti ovih patogena (Moore, 2002b; Moore i Psalidas, 2002; Scortichini i sar., 2002).

Privredni značaj i stalan porast potražnje i potrošnje lešnika na međunarodnom tržištu doprineli su sve intenzivnijem gajenju leske i u našoj zemlji (Korać i Cerović, 2001; Mitrović, 2002). Značaj i širenje plantaža pod ovim voćem poslednjih godina u Srbiji, kao i intenzivan promet i uvoz vegetativnog sadnog materijala iz zaraženih područja, značajno povećavaju rizik od češće i masovnije pojave bakterioza i nastanka šteta jačeg intenziteta (Obradović i sar., 2009).

Xanthomonas arboricola pv. *corylina*, prouzrokovatelj bakteriozne plamenjače leske, opisana je kao ekonomski značajna fitopatogena bakterija u svetu (Anonymous, 2004; Miller i sar., 1949; Moore, 2002a; Scortichini i sar., 2002). Kod nas je prisustvo bakterije prvi put utvrđeno pre 58 godina na teritoriji tadašnje Jugoslavije, kada nisu zabeležene značajnije štete (Šutić, 1956). Nakon toga, usledio je period bez podataka o rasprostranjenosti i štetnosti ove bakterioze u nas. Nizak intenzitet simptoma, sporadična pojava, ali i nedovoljno interesovanje za fitopatološke probleme ove biljne vrste, razlog su slabog poznavanja pomenute problematike kod nas. Obzirom na sve veći značaj i učestalu pojavu simptoma bakteriozne plamenjače poslednjih godina u našoj zemlji, ukazala se potreba za sveobuhvatnim proučavanjem ovog problema, koji bi mogao da ugrozi novozasnovane plantaže leske, posebno u povoljnim uslovima za nastanak infekcije.

2. PREGLED LITERATURE

2.1 Poreklo, rasprostranjenost i biologija leske (*Corylus* sp.)

Leska pripada botaničkoj porodici breza (fam. *Betulaceae*, red *Fagales*), rodu *Corylus* L. koji obuhvata oko 25 opisanih vrsta, sa nizom različitih divljih i gajenih varijeteta (Molnar, 2011). Predstavnici ovog roda prirodno su rasprostranjeni u šumskim sastojinama severne hemisfere, prostirući se duž umerenog pojasa Evrope, Severne Amerike, Azije i Afrike (Lagerstedt, 1975). Prema većini teorija o starosti i poreklu *Corylus* vrsta, postojbinom leske smatraju se Mala i Istočna Azija odakle je biljka preneti u Evropu, a potom na Američki kontinent (Lagerstedt, 1975, Korać, 2000). Vrste *C. americana* i *C. cornuta* (sin. *C. rostrata*) sreću se u severnim delovima Sjedinjenih Američkih Država (SAD), dok je *C. colurna* autohtona vrsta u današnjoj Turskoj, Aziji i na Balkanskom poluostrvu. Evropska leska (*Corylus avellana* L.) poreklom iz umerenih zona Evrope, Afrike i Azije, ima najveći značaj, jer su njenom selekcijom stvorene najvažnije plemenite sorte (Thompson i sar., 1996).

Vrste roda *Corylus* su višegodišnje biljke u obliku žbuna ili uspravnog stabla koje dostiže i do 40 metara visine. Biljke su jednodome i stranooplodne sa jednopolnim cvetovima. Muški cvetovi su grupisani u obliku resa, dok su ženski zatvoreni u vidu pupoljka iz kojeg se u toku oprašivanja pojavljuje tučak svetlo crvene boje. Glavna odlika po kojoj se razlikuju od ostalih voćnih vrsta je period cvetanja koji se odvija tokom zime, pre pojave listova. Sve vrste formiraju jestive plodove koji se razvijaju u grupama od 1 do 4 i sazrevaju tokom jeseni. Među vrstama postoji velika raznovrsnost u izgledu ploda i plodovog omotača (Korać, 2000; Lagerstedt, 1975; Thompson i sar., 1996).

2.2 Značaj i proizvodnja leske u svetu

Upotreba jezgrastog ploda leske u ishrani ljudi datira iz perioda praistorije (Lagerstedt, 1975; Thompson i sar., 1996). Ova biljka ubraja se među najstarije vrste voćaka koje su uvedene u kulturu pre oko 2.000 godina (Veličković, 2002). Ekonomski

značaj gajenja leske zasniva se na proizvodnji ploda koji predstavlja biološki vrednu namirnicu veoma cenjenu na domaćem i svetskom tržištu. Najveću primenu ima pre svega u konditorskoj industriji, dok se manja količina koristi za potrošnju u svežem stanju kao i za potrebe kozmetičke i farmaceutske industrije. Jezgro lešnika u hemijskom pogledu predstavlja izvor velikog broja vrlo korisnih jedinjenja, kao što su ulja, belančevine, ugljeni hidrati, mineralne materije, (naročito Ca, Fe, Mg, K, Zn), vitamini (B₁, B₂, B₆, E) i druge bioaktivne materije.

Biljke leske rano stupaju u period plodonošenja i imaju dug eksploatacioni period koji iznosi 25-30 godina. Dubokim, razgranatim korenom vezuju čestice zemljišta sprečavajući na taj način pojavu erozije, a neke vrste predstavljaju vredan izvor drveta. Takođe, zbog dekorativnog izgleda i razgranate krune leska se koristi i kao ukrasna biljka u pejzažnoj arhitekturi (Thompson i sar., 1996). Gajena leska je tolerantna prema različitim uslovima spoljne sredine. Zahvaljući jakom korenovom sistemu može dobro da uspeva i na zemljištima koja su relativno siromašna hranljivim materijama. Ipak, najbolji uslovi za njeno gajenje su predeli prohladne i vlažne kontinentalne klime, gde je danas najvećim delom koncentrisana komercijalna proizvodnja. Leska se najviše gaji u blizini velikih vodenih površina, kao što su obala Crnog mora, mediteranski deo Evrope (Italija i Španija) i Vilamet dolina u Oregonu na pacifičkom severozapadu SAD (Lagerstedt, 1975; Thompson i sar., 1996).

Leska se ubraja među najznačajnije vrste jezgrastih voćaka čija prosečna svetska proizvodnja iznosi oko 742.000 tona (FAO, 2011). Najveći proizvođač lešnika u svetu je Turska sa oko 430.000 t, zatim sledi Italija sa oko 128.000 t. Među 10 najvećih proizvođača lešnika u svetu ubrajaju se: SAD (oko 35.000 t), Azerbejdžan (33.000 t), Džordžija (31.000 t), Kina (22.000 t), Iran (21.500 t), Španija (17.500 t), Francuska (7.300 t) i Kazahstan (3.700 t) (FAO, 2011). Proizvodnja lešnika u svetu predstavlja deficitarnu poljoprivrednu delatnost. Dominantni izvoznik je Turska sa oko 80% ukupnog svetskog izvoza, dok su većina evropskih zemalja uvoznici lešnika (Korać i Cerović, 2001).

Gajenje leske je tokom proteklih decenija bilo slabo zastupljeno u Srbiji. Proizvodnja ove biljne vrste izrazito je niska, uglavnom ekstenzivnog tipa, ograničena na manje površine ili pojedinačna stabla u okviru okućnica. Obim proizvodnje, koji, prema raspoloživim nezvaničnim podacima iznosi oko 1.500 tona na godišnjem nivou,

ne zadovoljava ni 10% potreba tržišta, pa je stoga leska veoma deficitarna voćna vrsta u nas (Šoškić, 2007). Preostalih 90% potreba zadovoljava se iz uvoza. Zahvaljujući povoljnim agroekološkim uslovima za rast i plodonošenje leske, kao i konstantnoj potražnji za visoko kvalitetnim plodovima, poslednjih godina beleži se rast proizvodnje u našoj zemlji (Mitrović, 2002). Od nedavno se novi zasadi podižu sadnicama kalemljenim na sejancima mečije leske (*C. colurna*), čime se sprečava pojava brojnih izdanaka u prizemnom delu stabla. Uglavnom je zastupljen italijanski sortiment (Korać i Cerović, 2001).

2.3 Rasprostranjenost bakterioza leske i ekonomski značaj

Među prouzrokovateljima bolesti leske važno mesto zauzimaju fitopatogene bakterije (Scortichini, 2000; Schortichini i Lazzari, 1996; Scortichini i sar., 2000a; 2000b; 2002a; 2002b; 2002c; 2005; Moore i Psallidas, 2002). Kao značajni patogeni leske do sada su opisane četiri vrste bakterija: *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina* - prouzrokovatelj bakteriozne plamenjače, *Pseudomonas avellanae* - prouzrokovatelj bakterioznog raka leske, *Pseudomonas syringae* pv. *coryli* - prouzrokovatelj bakterioznog uvenuća grana i letorasta i *Agrobacterium tumefaciens* - prouzrokovatelj bakterioznog raka korenovog vrata (Miller i sar., 1949; Moore, 2002b; Scortichini i sar., 2000; Psallidas, 1987; 1993; Psallidas i Panagopoulos, 1979). Pomenute vrste iz rodova *Pseudomonas* i *Xanthomonas* usko su specijalizovane i parazitiraju samo biljke iz roda *Corylus*, pre svega gajene, ali i divlje vrste iz spontane flore (Scortichini i sar., 2000a), dok je *A. tumefaciens* izraziti polifag, parazit velikog broja biljaka (Moore i Psallidas, 2002).

Ekonomski značaj bakterioza posebno je veliki u komercijalnim zasadima, gde intenzivna tehnologija gajenja doprinosi značajnijoj pojavi i širenju bolesti (Cirvilleri i sar., 2006). U oblastima gde se leska intenzivno gaji na velikim površinama, često se beleže štetni efekti usled pojave bolesti bakteriozne prirode. Na severozapadu SAD velike probleme prouzrokuje plamenjača leske (Moore i Psallidas, 2002), dok se na evropskom kontinentu beleže sve veće posledice pojave bakterioznog raka, koji je u nekim delovima Italije i severne Grčke uslovio krčenje čitavih plantaža, a ugrožavajući proizvodnju i u drugim oblastima gajenja leske (Psallidas, 1987; 1993; Psallidas i

Panagopoulos, 1979; Scortichini i Tropiano, 1994). U zemaljama u kojima je proizvodnja lešnika slabo razvijena, i uglavnom ograničena na manje zasade od nekoliko hektara, bakterioze leske nisu dovoljno izučavane. Uglavnom je konstantovana pojava bakterijske plamenjače (Velika Britanija, Slovenija, Australija, Novi Zeland, Nemačka, Čile i dr.) (Anonymous, 2005; Locke i Barns, 1979; Wimalajeewa i Washington, 1980; Poschenrieder i Theil, 2005). Usled manjeg intenziteta pojave, kao i nedovoljnog poznavanja simptomatologije oboljenja, infekcije leske fitopatogenim bakterijama često ostaju nezabeležene.

U našoj zemlji, takođe, ova problematika nije bila predmet intenzivnih proučavanja. Do sada je zabeleženo prisustvo *X. a. pv. corylina* (Šutić, 1956; Čalić i sar., 2009), dok o drugim vrstama nije bilo podataka kao parazitima leske u Srbiji (Arsenijević, 1997; Obradović i sar., 2009).

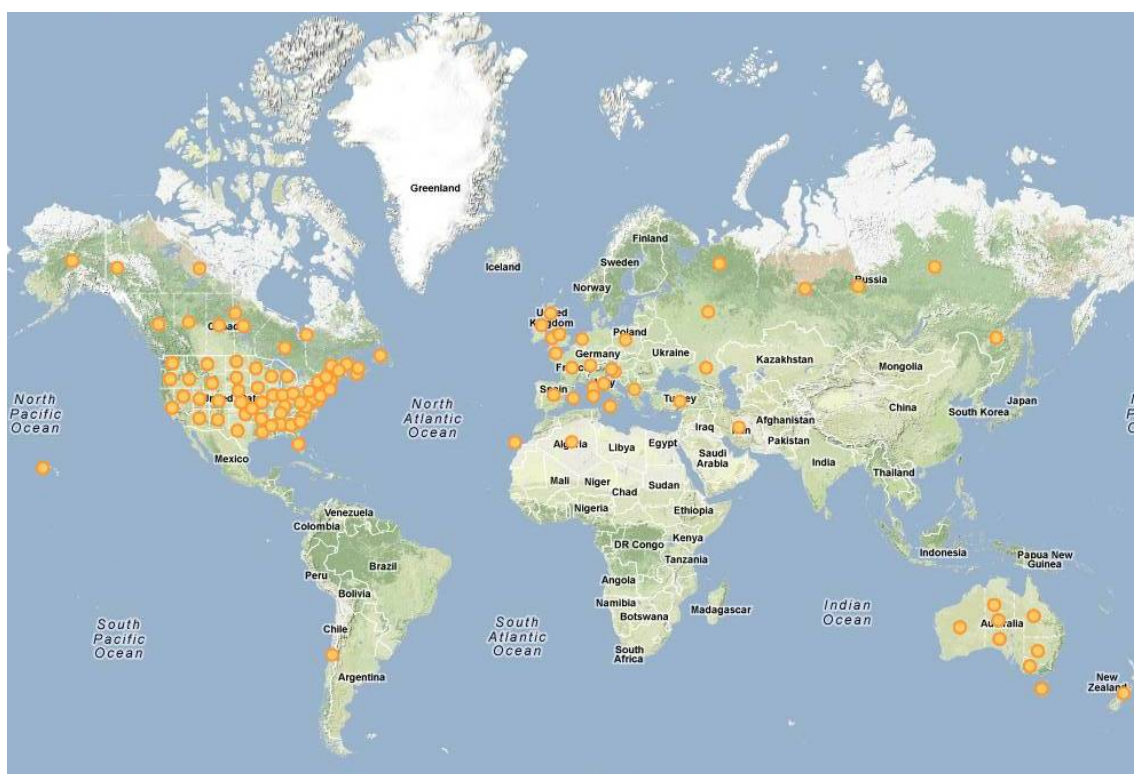
2.4 Bakterijska plamenjača leske

Istorijat pojave, rasprostranjenost i ekonomski značaj.- Bakterijska plamenjača leske je, po rasprostranjenosti i štetnosti, najznačajnije oboljenje bakterijske prirode na gajenoj leski u svetu (Anonymous, 2004; Moore i Psallidas, 2002). Prisustvo bolesti prvi put je zabeleženo 1913. godine u SAD, u državi Oregon, na autohtonoj vrsti *Corylus maxima* kada je i dokazana bakterijska priroda oboljenja (Barss, 1913; loc. cit. Miller i sar., 1949). Bakterija prouzrokovatelj prvobitno je opisana kao *Phytophthora corylina* Miller i sar. Nakon preimenovanja roda (Dowson, 1939) prihvaćen je novi binominalni naziv bakterije *Xanthomonas corylina* ((Miller i sar.) Starr et Burkholder, 1942). Potom je, sa uvođenjem koncepta "pathovar" u biljnu patologiju (Dye, 1978), bakterija svrstana unutar zbirne (tipske) vrste *X. campestris*, kao patogeni varijetet *corylina*. Poslednjom reklasifikacijom roda (Vauterin i sar., 1995) bakterija je svrstana unutar nove vrste kao *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina* (u daljem tekstu Xac) (Miller, Bollen, Simmons, Gross i Barss 1940, Smith) Vauterin, Hoste, Kersters i Swings 1995).

Pretpostavlja se da je sa američkog kontinenta patogen sadnim materijalom prenet i raširen u druge delove sveta (Anonymous, 2004). Rasprostranjenost unutar EPPO regiona i dalje je ograničena, pa se, stoga, ovaj patogen nalazi na EPPO A2 listi karantinskih organizama (Slika 1). Riziku su posebno izložene zemlje u kojima još uvek

nije utvrđeno njeno prisustvo (Anonymous, 2004). Prisustvo Xac do sada je potvrđeno na teritoriji bivše Jugoslavije (Šutić, 1956), u Italiji (Noviello, 1969), Francuskoj (Prunier i sar., 1976; loc.cit. Anonymous, 2004), Holandiji (1992), južnim delovima Rusije (Koval, 1978, loc cit. Anonymous, 2004), Švajcarskoj (Anonymous, 2004), Turskoj (Alay i sar., 1973), Velikoj Britaniji (Locke i Barnes, 1979), Nemačkoj (Poschenrieder i Theil, 2005) i Poljskoj (Pulawska i sar., 2010). Van evropskog kontinenta pojava bakterije zabeležena je u Alžiru (Gardan, 1982), SAD (Oregon, Washington), Kanadi (Britanska Kolumbija), Čileu (1987), Australiji (Wimalajeewa i Washington, 1980), Novom Zelandu (2003) i Iranu (Ali i sar., 2006).

Xac parazitira gajene i divlje predstavnike roda *Corylus* spp. (Scortichini, 2002b). Najznačajnije gubitke prouzrokuje na sortama evropske leske, ali su štete zabeležene i na vrstama *C. pontica*, *maxima* i *colurna* (Anonymous, 2004). Štete nastaju usled redukcije lisne mase i uvenuća rodniha grana i grančica, koji se odražavaju na dalji razvoj biljaka, umanjujući prinos i kvalitet plodova. Dugoročne posledice su gubitak vitalnosti i rodnosti ili potpuno izumiranje biljke domaćina. Infekcija može biti jačeg ili slabijeg intenziteta, u zavisnosti od uslova sredine kao i starosti biljke domaćina. Bolest je naročito štetna u rasadnicima i zasadima starosti od 1-4 godine, gde često dolazi do izumiranja mladih biljaka, posebno ukoliko je njihova vitalnost dodatno oslabljena nedovoljnom ishranom ili drugim faktorima. Iako biljke starije od 4 godine ređe izumiru, one slabije plodonose zbog izumiranja rodniha grana (Miller i sar., 1949; Moore, 2002a). Jače zaraze dovode do pojave rak-rana na debljim granama ili deblu, kada izumiru stabla od 8 do 10 godina starosti (Moore, 2002a). Prosečni gubici prinosa od ove bolesti variraju od nekoliko procenata do 10-25%, ali su zabeležene štete i od 90-100% (Miller i sar., 1949; Moore, 2002a; EPPO Bulletin, 1986; Pulawska, 2010; Lamichhane i sar., 2012).



Slika 1. Rasprostranjenost *X. arboricola* pv. *corylina* u svetu (EPPO Datasheet, 2012; <http://gd3.eppo.int/organism.php/XANTCY/map>)

Simptomi bolesti.- Bolest se ispoljava na svim nadzemnim delovima obolelih biljaka leske: pupoljcima, lišću, letorastima, stablu i plodovima (Anonymous, 2004) (Slika 2). Prema navodima Milera i saradnika (1949) ređe se zapaža pojava simptoma na plodovima, dok je korenov sistem retko zahvaćen. Prvi simptomi uočavaju se tokom proleća na pupoljcima koji mogu biti potpuno ili delimično zaraženi. Zaraženi pupoljci se ne otvaraju, ili se ubrzo nakon početnog razvoja suše i izumiru (Gardan, 1983; Slika 2i). U slučaju lokalizovane infekcije površinskog tkiva, pupoljci se delimično ili potpuno razvijaju, ali su razvijeni izbojci najčešće zaraženi (Anonymous, 2004; Scortichini, 2002b; Moore, 2002a). U pojedinim slučajevima nekroza zahvata pupoljke u središnjem delu, dok su u osnovi i pri vrhu grane normalno razvijeni (Ćalić i sar., 2009; Slika 2e i 2h).

Na obolelom lišću uočavaju se pege nepravilnog oblika, ograničene nervima (Slika 2a). One su u početku razvoja sitne, žuto-zelene boje, vlažnog izgleda, dok kasnije postaju suve, nekrotične, crvenkasto-mrke, okružene oreolom žuto-zelene boje. Ukoliko su povoljni uslovi temperature i vlažnosti, pege se šire i spajaju, a obolelo tkivo

u okviru pege izumire, dobijajući mrku boju sa tamnom ivicom. U daljem razvoju, spajanjem pega formiraju se veće nekrotične zone nepravilnog oblika (Slika 2b), ponekad okružene hlorotičnim oreolom. Neretko se ove nekrotične površine obrazuju po ivici lista, na mestima gde se zadržavaju kapljice vode tokom kišnog perioda (Miller i sar., 1949; Moore, 2002a). Obolele liske se suše, cepaju i često ostaju slepljene za letoraste tokom zime. Zbog nastalih promena biljke izgledaju kao da su plamenom spaljene, otuda bolest dobija karakter plamenjače (Miller i sar., 1949; Arsenijević, 1997). Oboleli mladi listovi uglavnom su deformisani usled neravnomernog porasta zdravog i tkiva zahvaćenog pegama, dok sa starenjem lišće postaje manje osetljivo.

Sitne okrugle pege vlažnog izgleda koje kasnije postaju suve i blago ulegnute, mrke ili tamne boje, mogu se pojaviti na omotaču i ljusci (egzokarpu) ploda (Slika 2d i 2f). Obzirom na sporadičnost pojave, kao i činjenicu da veoma retko zahvataju unutrašnja tkiva i jezgro, infekcije ploda nisu od većeg ekonomskog značaja (Miller, 1949).

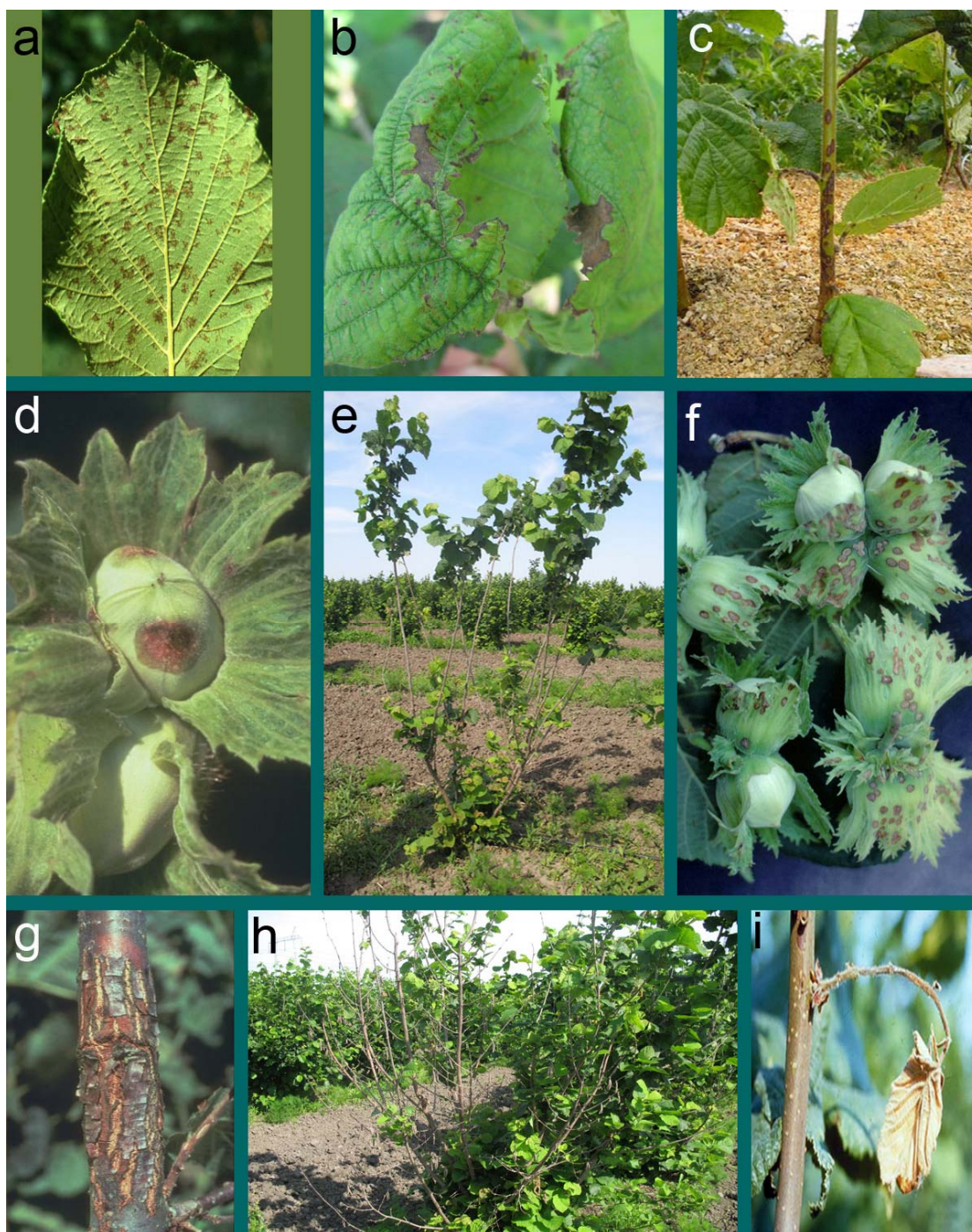
Infekcija letorasta i mlađih grana ima najveći ekonomski značaj. Bolest najčešće zahvata mlade izbojke i grane starosti do tri godine na koje patogen dospeva kroz ozleđena mesta, ili sa zaraženih pupoljaka. Na mladim neodrvenelim izbojcima uočava se pojava izduženih pega koje su prvo vlažnog izgleda, tamnozeleno boje, a potom postaju crvenkasto-mrke i nekrotične. Prstenasto širenje pega često prouzrokuje sušenje delova izbojaka iznad mesta infekcije ili pucanje mladih grančica na mestu formiranja lezije (Miller, 1949; Moore, 2002a).

Promene na drvenastim delovima voćaka najčešće zahvataju tkivo kore, dok je ksilem ređe napadnut (Moore, 2002a). Spoljašnje promene teško se uočavaju, posebno na starijim granama. Tkivo kore u okviru rane obično dobija crvenkasto-smeđu nijansu ili je samo neznatno tamnije od boje zdravog tkiva. Međutim, nakon odstranjivanja obolele kore, zapaža se mestimična pojava vlažnih lezija i tamno mrka obojenost kambijalnog tkiva (Miller, 1949). Intenzivnim porastom okolnog zdravog tkiva tokom vegetacije, na kori se u početku pojavljuju ulegnuća, a kasnije se u centru ili po ivicama lezije formiraju uzdužne pukotine u vidu rak-rana (Slika 2g). Zaraženo tkivo može prstenasto obuhvatiti granu, pri čemu se biljno tkivo iznad mesta infekcije suši i izumire. Jače zaraze dovode do pojave rak-rana na debljim granama ili deblu koje su često destruktivne za biljku, prouzrokujući njeno potpuno izumiranje (Moore, 2002a).

Ove promene ponekad se pripisuju drugim bolestima ili abiotskim faktorima, kao što su ožegotine nastale usled insolacije (Miller i sar., 1949).

Pod uticajem visoke temperature i drugih faktora tokom leta aktivni porast biljnog tkiva se zaustavlja, što za posledicu ima sušenje rak-rana i izumiranje bakterija. Samo u nekim slučajevima manji broj bakterija zadržava vitalnost i prezimjava u obolelim organima, predstavljajući izvor zaraze tokom jeseni i proleća (Miller i sar., 1949).

Pri vlažnom i kišovitom vremenu, na obolelim organima, u okviru pega, pojavljuju se kapi žućkastog bakterijskog eksudata sluzaste konzistencije, koji se vremenom suši i dobija izgled sjajne skrame. Tokom vegetacije, eksudat se prenosi kapima kiše i dospevajući na razne biljne organe omogućava sekundarne infekcije (Miller i sar., 1949; Arsenijević, 1997).



Slika 2. Simptomi bakteriozne plamenjače leske. Pegavost i nekroza listova, stabla i plodova (a, b, c, d, f); nekroza i izumiranje pupoljaka, 1 i 2-godišnjih grana i izdanaka i (e,h, i); nekroza i rak-rane na kori (g). (Foto: a, d, f - www.atlasplantpathogenicbacteria; d, g, i - L. Gardan, izvor: <http://www.forestryimages.org>; c - M. Redpath, Waitrata, izvor: Forest Farm, New Zealand; b, e, h - A. Obradović).

Epidemiologija patogena.- Prouzrokovatelj bakteriozne plamenjače leske dospeva u zasad putem zaraženog sadnog materijala. Bakterija se intenzivno umnožava na površini listova i drugih nadzemnih organa biljke domaćina, gde se održava u vidu epifitne populacije. Tokom vegetacije bakterija se raznosi kišnim kapima, vetrom ili kontaminiranim alatom za rezidbu (Anonymous, 2004; Miller i sar., 1949). U literaturnim podacima navodi se i mogućnost prenošenja bakterije insektima kao i putem zaraženog polena (Anonymous, 2004). Prenosjenje patogena na veća rastojanja obavlja se zaraženim sadnim materijalom. Infekcija biljaka ostvaruje se u proleće ili jesen kroz stomine otvore na listovima, pupoljcima, plodovima, zelenim mladima ili stablu, i kroz razne mehaničke povrede. Biljke su najosetljivije tokom jeseni i početkom zime, kada su pupoljci skoro potpuno formirani. Iako su pupoljci podložni infekciji tokom cele godine, ona se najčešće ostvaruje u jesen, za vreme ili pred opadanje lišća, a manjim delom u prvom delu vegetacije u proleće i početkom leta, kada dolazi do infekcije listova, grana, plodova i letorasta. Po ostvarenoj infekciji, bakterija se dalje umnožava u međućelijskom prostoru, a zatim se sistemski širi kroz biljku (Anonymous, 2004; Miller i sar., 1949). Prvi simptomi zaraze uočavaju se u martu ili aprilu naredne godine, dok su promene najizraženije sredinom leta. Suvo i toplo vreme tokom leta ne pogoduje infekciji i razvoju bolesti. Osnovni izvor inokuluma predstavljaju zaraženi pupoljci i rane na granama i stablu, u kojima patogen prezimljava. Bakterija se održava i na opalom lišću na površini zemljišta nekoliko meseci (Gardan i Deveau, 1987). Smatra se da zemljište ne predstavlja mesto prezimljavanja bakterije, obzirom da do sada nisu uspešno izolovane iz uzoraka supstrata (Miller, 1949; Gardan i Deveau, 1987). Epifitna faza ima veliki značaj u životnom ciklusu patogena jer predstavlja značajan izvor inokuluma za infekcije grančica tokom jeseni. Pruvost i Gardan (1988) su utvrdili da se bakterija intenzivno umnožava i održava u visokoj koncentraciji (10^6 - 10^7 cfu/ml) na površini listova leske. U početku su bakterijske ćelije raspoređene po celoj površini lista, dok se kasnije grupišu u vidu sluzaste mase u udubljenjima duž nerava, a u nekim slučajevima i na lisnoj ploči (Pruvost i Gardan, 1988). Kišovito vreme i temperature od oko 20°C povoljne su za nastanak infekcije (Anonymous, 2004; Miller i sar., 1949).

2.5 Suzbijanje bakteriozne plamenjače leske

Usled dugog eksploatacionog perioda i malog broja efikasnih metoda, uspešna zaštita višegodišnjeg zasada leske od fitopatogenih bakterija predstavlja veliki izazov i prvenstveno se zasniva na preventivnim merama. U cilju sprečavanja pojave i širenja bolesti preporučuju se karantinske i fitosanitarne mere, dok najznačajniju meru u prevenciji bolesti predstavlja izbor zdravog sadnog materijala (Arsenijević, 1997). Ukoliko je bolest već prisutna u zasadu, suzbijanje bolesti vrši se sasecanjem i uništavanjem obolelih biljnih delova, dezinfekcijom alata za orezivanje i kalemljenje, primeni hemijskih mera i gajenju manje osetljivog sortimenta.

Izbor hemijskih supstanci efikasnih u suzbijanju bakterioznih oboljenja veoma je ograničen. Najznačajniji i najefikasniji baktericidi su jedinjenja bakra i antibiotici, dok sve veću primenu u borbi protiv fitopatogenih bakterija imaju i biopesticidi (Arsenijević, 1997; Agrios, 2005; Alabouvette i sar., 2006). U našoj poljoprivrednoj praksi u upotrebi su isključivo bakarni preparati, obzirom da antibiotici nisu registrovani za primenu u zaštiti bilja kod nas (Obradović i Ivanović, 2007). O rezultatima primene i efikasnosti baktericida u suzbijanju bakteriozne plamenjače leske ima malo podataka u literaturi. Zadovoljavajući nivo kontrole bolesti Miler i sar. (1949) postigli su korišćenjem jedinjenja bakra kao što su bordovska čorba i bakar oksid. Bakar deluje kao nespecifičan protektivni fungicid, sprečavajući nastanak infekcije biljaka. Zbog toga je od izuzetnog značaja da se prvi tretmani primene neposredno pre pojave bolesti, kao i u odgovarajućim intervalima u toku osetljivog perioda vegetacije (Copper Development Association, 1972; Ritchie, 2004). Obzirom da previsoka koncentracija slobodnih jona (Cu^{2+}) može biti fitotoksična, posebno u ranim fazama razvoja, tretiranje biljaka preporučuje se u fazi mirovanja, ili u jesen nakon opadanja lišća (Janjić, 2005).

Primena bakarnih preparata u zaštiti leske od bakteriozne plamenjače zasniva se na preventivnom prskanju nadzemnih delova biljke u najosetljivijim fenofazama. Efikasna zaštita pri normalnim uslovima može se postići jednokratnim tretiranjem biljaka krajem leta (tokom avgusta), pre pojave obilnih padavina, čime se spečava ostvarenje infekcije u jesen. U povoljnim uslovima za ostvarenje infekcije, kao što su velika količina padavina tokom proleća, jeseni i zime, preporučuju se tri tretmana:

krajem leta, kasno u jesen kada je opalo 75% listova i rano u proleće u vreme otvaranja pupoljaka (Miller i sar., 1949; Moore, 2002b).

2.5.1 Pojava rezistentnosti na baktericide

Jedna od poteškoća vezanih za upotrebu baktericida odnosi se na učestalu pojavu sojeva patogena koji su otporni na dejstvo ovih jedinjenja. Selekcija rezistentnih ili virulentnijih sojeva u populaciji patogena nastaje kao posledica dugotrajne i jednolične primene baktericida. Pojava rezistentnosti na antibiotike u populaciji fitopatogenih bakterija zabeležena je ubrzo nakon početka njihove primene u zaštiti bilja, 60-ih godina prošlog veka (Jones, 1982; Burr i Norelli, 1990). Takođe, zabeležena je i rezistentnost sojeva na jedinjenja bakra (Marco i Stall, 1983; Adaskaveg i sar., 1985; Loper et al., 1991; Sundin i Bender, 1993; Scheck and Pscheidt, 1998; Vanneste i sar., 2005; Ritchie i Dittapongpitch, 1991). Pojava rezistentnosti danas je rasprostranjena u populaciji mnogih ekonomski značajnih vrsta, uključujući *Xanthomonas* spp. (Loper i sar., 1991; Ritchie i Dittapongpitch, 1991; Sundin i Bender, 1993; McManus, 2000; McManus i sar., 2002; Vanneste i sar., 2005;). Različita osetljivost Xac sojeva prema baktericidima nije do sada zabeležena u literaturi. Stepem osetljivosti sojeva prema baktericidima može se utvrditi u laboratorijskim uslovima merenjem koncentracije jedinjenja potrebnog za inhibiciju rasta bakterije (Zevenhuizen i sar., 1979; Burr i Norelli, 1990; Obradović i sar., 2004).

2.6 Opšte karakteristike i taksonomija *Xanthomonas* spp.

Rod *Xanthomonas* pripada razdelu *Proteobacteria*, klasi γ (*Gammaproteobacteria*), redu *Xanthomonadales*, familiji *Xanthomonadaceae* (Saddler i Bradbury, 2005). Bakterije iz roda *Xanthomonas* (Dowson, 1939), široko su rasprostranjene u prirodi, većinom kao biljni patogeni, ali i kao epifiti na nadzemnoj flori ne prouzrokujući vidljive promene na biljci domaćinu (Hayward, 1993). Sve vrste roda su Gram negativne, obligatno aerobne, asporogene, štapićaste bakterije, veličine oko 0.8–2.0 μm x 0.4–0.6 μm (Saddler i Bradbury, 2005). Pokretne su pomoću pojedinačnih polarnih flagela. Većina se odlikuje stvaranjem žutog pigmenta-

ksantomonadina na veštačkoj hranljivoj podlozi (Arsenijević, 1997; Saddler i Bradbury, 2005; Swings i sar., 1993).

Prema najnovijoj klasifikaciji roda iz 1995. godine (Vauterin i sar., 1995; Vauterin i Swings, 1997) zasnovanoj na utvrđivanju procentualne sličnosti molekula DNK (eng. DNK-DNK homology) utvrđene metodom hibridizacije nukleinskih kiselina, analizi sastava masnih kiselina i ćelijskih proteina i sposobnosti razgradnje ugljenikovih jedinjenja, unutar roda *Xanthomonas* izdvojeno je 20 homolognih DNK grupa. Pomenuta sistematika, rezultirala je podelom roda na 20 vrsta i 62 patovara, pri čemu je najbrojnija vrsta *X. campestris*, podeljena na 16 genetičkih grupa (Young i sar., 2008). Pored razlika u fiziološko-biohemijskim i serološkim osobinama, podela unutar vrste, u većini slučajeva, zasnovana je na patogenim odlikama i specifičnosti prema odgovarajućoj biljci domaćinu (Vauterin i sar., 1995).

Do sada je u svetu opisano oko 25 *Xanthomonas* vrsta koje zaražavaju blizu 400 gajenih, ukrasnih i biljaka iz spontane flore. Mnogi predstavnici vrsta i patogenih varijeteta mogu prouzrokovati veoma destruktivna oboljenja i velike gubitke prinosa gajenih biljaka (Starr, 1983; Leyns i sar., 1984; loc.cit., Rademaker i sar., 2005).

X. arboricola je ekonomski značajna i kompleksna vrsta koja pripada DNA homolognoj grupi 4. Sastavljena je pretežno od patogena drvenastih biljaka, odgovornih za pojavu novih oboljenja u Evropi (Cirvilleri i sar., 2006; Hajri i sar., 2011; Pulawska i sar., 2010). Na osnovu specijalizacije prema biljci domaćinu izvršena je podela vrste na 7 patogenih varijeteta: *pruni* (*Prunus* sp., koštičavo voće), *corylina* (*Corylus* sp., leska), *juglandis* (*Juglans* sp., orah), *populi* (*Populus* sp., topola), *poinsetticola* (*Poinsettia* sp., poinsecija), *celebensis* (*Musa* sp., banana) i *fragariae* (*Fragaria* sp., jagoda) (Dye i sar., 1980; Janse i sar., 2001, Vauterin i sar., 1995). Krug domaćina ovih patogena ograničen je na jednu ili nekoliko biljnih vrsta, što ukazuje na visoku specijalizaciju i adaptaciju prema domaćinu. Usled široke rasprostranjenosti i karantinskog statusa u mnogim zemljama, navedeni patogeni oraha, leske i koštičavih voćaka predstavljaju ekonomski najznačajnije predstavnike vrste *X. arboricola* (Hajri i sar., 2012, Vauterin i sar., 1995; Rademaker i sar., 2005).

Uzimajući u obzir značaj i kosmopolitsku rasprostranjenost bakteriozne plamenjače leske, ovo oboljenje i bakterija prouzrokovatelj nisu u dovoljnoj meri proučeni u svetu. Malobrojna istraživanja posvećena ovoj problematici odnosila su se na

proučavanje glavnih karakteristika patogena, simptomatologije, epidemiologije i mera zaštite (Miller i sar., 1949; Gardan i Deveaux, 1987; Scortichini i sar., 2002; Čalić i sar., 2009; Pulawska i sar., 2010; Lamichhane i Varvaro, 2013).

2.7 Detekcija, identifikacija i genetički diverzitet *Xac*

Pouzdana detekcija i identifikacija patogena predstavljaju osnovni preduslov za uspešnu prevenciju i kontrolu bolesti. U ove svrhe u početku su korišćene isključivo tradicionalne metode, dok su u današnje vreme sve više zastupljene molekularne metode, posebno reakcije lančanog umnožavanja fragmenata DNK - PCR (Schaad, 2001; Schaad i sar., 2001; Ward i sar., 2004). Trenutno, najveća pouzdanost i preciznost dijagnoze bolesti postiže se kombinacijom različitih klasičnih, imunodijagnostičkih, automatizovanih i molekularnih metoda (Krieg, 2005).

Uprkos napretku u detekciji mnogih fitopatogenih bakterija, dijagnoza bakterijske plamenjače leske još uvek se zasniva pretežno na klasičnim bakteriološkim metodama, kao što su posmatranje simptoma bolesti, izolacija bakterije i proučavanje morfoloških, biohemijskih i patogenih odlika (Anonymous, 2004; Janse, 2010). Nedovoljna proučenost oboljenja i bakterije prouzrokovala ogleđa se u nedostatku specifičnih metoda i standardizovanih protokola za rutinsku i brzu detekciju patogena (Anonymous, 2004; Janse, 2010). Bakterija nije do sada proučavana automatizovanim metodama kao što su analiza sadržaja masnih kiselina (FAME) i korišćenje različitih izvora ugljenika specifičnih za određene taksone (Biolog sistem). Takođe, ne postoje razvijeni i standardizovani protokoli za rutinsku detekciju patogena iz simptomatičnog ili latentno zaraženog biljnog materijala putem seroloških ili molekularnih (PCR, Real-time PCR) metoda.

Klasične bakteriološke metode dosta su zahtevne u pogledu intenzivnog laboratorijskog rada i vremena potrebnog za identifikaciju uzročnika oboljenja. Rezultati dobijeni ovim testovima mogu biti nedosledni, a fenotipske odlike koje se proučavaju, često nisu dovoljne za razlikovanje *Xac* od srodnih *Xanthomonas* sojeva. Zbog toga se konačna potvrda identiteta do nivoa patovara postiže reprodukcijom simptoma prirodne infekcije na biljci domaćinu (Schaad i sar., 2001; Anonymous, 2004;). Obzirom na sve intenzivniju razmenu sadnog materijala kojim se patogen širi,

neophodno je poboljšanje postojećih i razvoj efikasnih i brzih metoda za identifikaciju ovog karantinskog patogena.

2.7.1 Izolacija patogena

Početni korak u identifikaciji patogena predstavlja izolacija bakterija iz obolelog tkiva na veštačku hranljivu podlogu. Osnovni nedostatak standardnih podloga ogleda se u njihovoj neselektivnosti i mogućnosti razvoja velikog broja saprofitnih bakterija. Stoga, uspešnost izolacije patogena može se povećati korišćenjem selektivnih podloga gde se selektivnost postiže korišćenjem odgovarajućih jedinjenja kao selektivnih agenasa ili dodatkom određenih antibiotika. Nekoliko poluselektivnih podloga koje sadrže kvašćev ekstrakt, glukozu i kalcijum karbonat (GYCA, YDC, YPGA) navode se i preporučuju u literaturi za bržu i efikasniju izolaciju vrsta roda *Xanthomonas* (Klement i sar., 1990; Lelliot i Stead, 1987; Schaad i sar., 2001).

Gajenje bakterija na podlozi obogaćenoj glukozom ima praktični značaj u diferencijaciji bakterija žute boje kolonija koje mogu biti saprofitnih ili parazitnih osobina. Vrste roda *Xanthomonas* proizvode žuti pigment i obilje polisaharidne sluzi na ovoj poluselektivnoj podlozi, po čemu se mogu razlikovati od drugih izolata dobijenih u kulturi. Janse navodi Vilbrinkovu podlogu (Wilbrink's medium, Sands i sar., 1986) kao pogodnu za uspešnu izolaciju i kultivisanje čistih kultura, jer usled stvaranja manje količine kiseline, omogućava brži rast i bolju vitalnost ćelija (lična komunikacija). Za bolji porast Xac kolonija Pulawska i sar., (2010) preporučuju podlogu sa dodatkom ekstrakta od kvasca (YNA).

Druge podloge koje omogućavaju selektivnu izolaciju *Xanthomonas* spp. su podloge sa dodatkom skroba ili tween-a (brilliant cresyl-blue starch-BS, modifikovana Tween podloga, ili SX agar) (Mulrean i Schroth, 1981; Scortichini, 2002; Schaad i sar., 2001). Njihova selektivnost zasniva se na sposobnosti ćelija da razlažu skrob ili tween formirajući pri tom karakteristične prosvetljene zone u podlozi oko razvoja kolonije. Na ovaj način Xac sojevi mogu se razlikovati od žuto obojenih saprofita ili drugih izolovanih bakterija koje ne razlažu komponente podloge ili imaju slabiji porast na njima (Scortichini i sar, 2002; Anonymous, 2004).

2.7.2 Morfološke i odgajivačke odlike

Morfološke odlike prouzrokovaca bakterijske plamenjače leske prvi je proučavao i opisao američki bakteriolog Miller, 1939. godine. Bakterija je Gram-negativna, aerobna, štapićasta sa zaobljenim krajevima, prosečnih dimenzija 1.1-3.8 x 0.5-0.7µm, često pojedinačna ili u paru, a ponekad u obliku kratkih lanaca (Miller i sar., 1949). Kretanje omogućava prisustvo jedne polarne flagele, formira kapsulu sastavljenu od polisaharida, i ne formira endospore (Miller, 1949; Anonymous, 2004; Saddler i Bradbury, 2005). Odgajivačke odlike kolonija zajedničke su sa drugim srodnim *Xanthomonas* vrstama (Saddler i Bradbury, 2005). Na hranljivoj podlozi Xac sojevi obrazuju okrugle, ispupčene, prozirne kolonije žute boje, sjajne i glatke površine, sluzastog izgleda. Stvaraju karakterističan pigment ksantomonadin i ekstracelularni kiseli heteropolisaharid ksantan, od kojeg potiče sluzasta i lepljiva konzistencija kolonija. Na podlogama sa glukozom, kvašćevim ekstraktom i kalcijum karbonatom (glucose-yeast-carbonate agar, GYCA; yeast-dextrose-carbonate agar, YDC) kolonije su krupne, ispupčene, sjajne i sluzaste nakon tri do pet dana razvoja pri temperaturi od 25-28°C. Na podlozi obogaćenoj glukozom bakterije formiraju povećanu količinu sluzastog polisaharida koji omogućava detekciju *Xanthomonas* vrsta i razlikovanje od saprofita poreklom sa biljke domaćina (Anonymous, 2004).

2.7.3 Biohemijsko-fiziološke odlike

Sojevi Xac poseduju sledeće biohemijsko-fiziološke karakteristike: glukozu razlažu oksidativnim putem, stvaraju ferment katalazu, ali ne i oksidazu, stvaraju levan, hidrolizuju eskulin, želatin i skrob. Bakterija ne stvara indol i ne redukuje nitrate, obrazuje sumpor vodonik iz cisteina (Miller i sar., 1949; Bradbury, 1986; Lelliott i Stead, 1987; Schaad i sar., 2001; Anonymous, 2004). Kiselinu proizvodi iz: galaktoze, glukoze, laktoze, maltoze, manoze, saharoze, trehaloze, ksiloze i manita; ne stvara je iz: ramnoze, adonita, inozita, sorbita, inulina i salicina (Wimalajeewa i Washington, 1980; Anonymous, 2004).

Optimalna temperatura za razvoj bakterije kreće se od 28-32°C, maksimalna je minimalna 5-7°C, dok je letalna granica između 53-57°C. Tolerantnost prema NaCl

iznosi 3%, dok koncentracija trifeniltetrazolijumhlorida od 0.1% inhibira razvoj bakterije (Saddler i Bradbury, 2005). Svi sojevi bakterije razlažu kvinat na SQ podlozi pomoću enzima sukcinat dehidrogenaze, što predstavlja diferencijalnu karakteristiku vrste *X. arboricola* u odnosu na druge predstavnike roda *Xanthomonas* (Lee i sar., 1992; 1999). Ova osobina determinisana je *qumA* genom koji predstavlja važan molekularni marker za determinaciju vrste (Lee i sar., 1992; 1999).

2.7.4 Biolog test

Pored klasičnih biohemijskih testova, za proučavanje razgradnje i korišćenja organskih jedinjenja kao izvora ugljenika i energije dostupne su i različite automatizovane tehnike. Proučavanje metabolizma širokog spektra ugljenikovih jedinjenja pomoću Biolog sistema (Biolog, Inc., Hayward, CA) do sada je korišćeno u identifikaciji i karakterizaciji različitih vrsta fitopatogenih bakterija, među kojima su i bakterije iz roda *Xanthomonas* (Jones i sar., 1993; Verniere i sar., 1993; Bouzar i sar., 1994; Balaž i sar., 1997; Norman i sar., 1999; Obradović, 1999; Ivanović i sar., 2012).

Jones i sar. (1993) ukazali su na pogodnost metode za identifikaciju i svrstavanje nepoznatih sojeva u određene taksonomske grupe. Proučavanjem metaboličke aktivnosti *X. campestris* pv. *citri* korišćenjem Biolog sistema, Verniere i saradnici (1993) su izvršili diferencijaciju sojeva na dve grupe koje prouzrokuju različite vrste simptoma na domaćinu. Norman i sar. (1999) su na osnovu razlika u metaboličkoj aktivnosti diferencirali sojeve *X. campestris* pv. *hederae* prema biljci domaćinu iz koje su izolovani, dok su Khatri-Chhetri i sar. (2003) ukazali na mogućnost karakterizacije, grupisanja i razlikovanja sojeva *X. campestris* pv. *vignicola* prema geografskom poreklu.

Kao glavni nedostatak Biolog testa navodi se nedovoljna preciznost prilikom identifikacije, kako zbog nedovoljnog broja sojeva deponovanih u bazi, tako i usled heterogenosti populacije unutar mnogih *Xanthomonas* vrsta (Jones i sar., 1993; Verniere i sar., 1993; Norman i sar., 1999). Sposobnost Xac sojeva da koriste različita organska jedinjenja do sada nije proučavana Biolog testom, što smanjuje mogućnost precizne identifikacije patogena na osnovu ovog sistema.

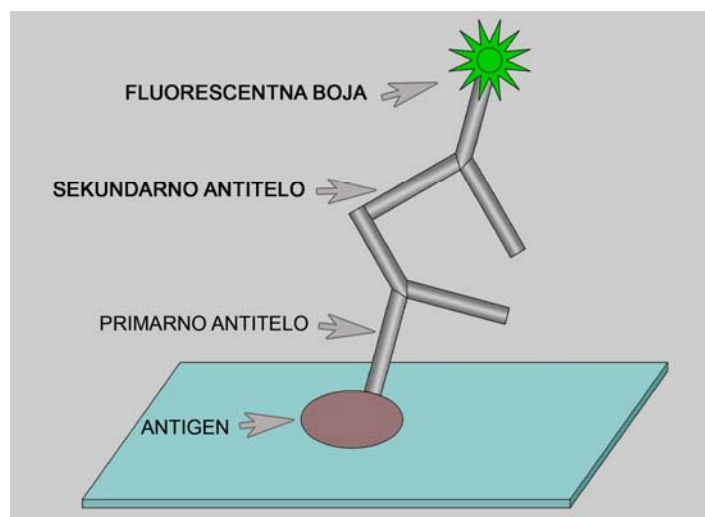
2.7.5 Serološke odlike

Primena serologije u determinaciji fitopatogenih bakterija datira sa početka XX veka, kada su započeta i proučavanja seroloških odlika *Xanthomonas* vrsta (Schaad, 1979). Prva serološka istraživanja zasnivala su se na identifikaciji i diferencijaciji sojeva metodom aglutinacije pomoću koje su diferencirani i grupisani predstavnici roda poreklom sa različitih domaćina (Elrod i Braun, 1947).

Korišćenjem specifičnih antitela, primenom testa aglutinacije Miller i sar. (1949) ukazali su na serološku heterogenost *Xanthomonas* sojeva poreklom iz leske i diferencijaciju u odnosu na sojeve iz oraha. Kasnije su razvijeni različiti serološki testovi za preliminarnu identifikaciju i potvrdu identiteta izolovanih *Xanthomonas* spp., primenom poliklonalnih i monoklonalnih antitela (Anderson i Nameth, 1990; Lemmatre i sar., 1992; Jones i sar., 1997).

Najzastupljenije serološke metode su metod aglutinacije (*Agglutination test*), enzimsko-imunoadsorpcioni (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*, ELISA) test i metoda imunofluorescencije (*Immunofluorescence test*, IF) (Hampton i sar., 1993). Sojevi Xac mogu biti identifikovani serološkim metodama prema procedurama opisanim u EPPO protokolu (Anonymous, 2009, 2010) ili odgovarajućem postupku proizvođača komercijalnog kompleta. Poliklonalna antitela za ELISA i / ili test imunofluorescencije (IF) dostupna su od Loewe Biochemica GmbH (Nemačka).

Najčešći problem korišćenja imunoloških testova u rutinskoj detekciji patogena je nedovoljna specifičnost i/ili osetljivost testa i pojava unakrsnih seroloških reakcija sa drugim vrstama. Iz tog razloga, pozitivan rezultat dobijen ovim metodama potrebno je potvrditi dodatnim testovima. U ovom radu proučena je mogućnost detekcije čistih kultura proučavanih sojeva iz leske primenom DAS - ELISA testa i indirektna IF metode.



Slika 3. Šematski prikaz indirektne metode imunofluorescence na IF pločici (Orig.)

2.7.6 PCR analiza

Upotreba molekularnih metoda zasnovanih na hibridizaciji ili amplifikaciji DNK, poboljšala je specifičnost i osjetljivost dijagnoze bolesti prouzrokovanih različitim *Xanthomonas* patogenima. Posljednjih godina razvijene su PCR metode kojima se detektuje postojanje različitih genskih lokusa, specifičnih sekvenci ili polimorfnih regiona u genomu *Xanthomonas* spp., što omogućava brzu i pouzdanu detekciju i identifikaciju vrsta ovog roda, kao i nižih taksonomskih kategorija (Leite i sar., 1994; Stead i sar., 1998; Lopez i sar., 2003; Alvarez, 2004; Louws i sar., 1999; Palacio- Bielsa i sar., 2009).

Umnožavanje i sekvenciranje 16S rDNA ili *hrp* genskog lokusa *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* i poređenje sa sekvencama iz baze podataka omogućava identifikaciju *Xanthomonas* patogena do nivoa roda (Maes, 1993; Leite i sar., 1994). Konzervativni gen *estA*, odgovoran za hidrolizu jedinjenja tween 80, iskorišćen je kao marker za detekciju sojeva roda *Xanthomonas*, kombinacijom metoda izolacije na poluselektivnu podlogu i PCR analize (Lee i sar., 2009).

Visoko specifične i osjetljive PCR metode za *X. arboricola* patovare, takođe su opisane u literaturi (Pagani, 2004; Palasio - Bielsa i sar , 2011; Pothier i sar., 2011). Međutim, pouzdane molekularne dijagnostičke metode za detekciju Xac sojeva do nivoa patogenog varijeteta nisu dostupne. Ipak, za detekciju bakterije iz zaraženog biljnog materijala, ili preliminarnu identifikaciju čistih kultura, mogu se koristiti molekularni dijagnostički protokoli razvijeni za srodne *Xanthomonas* patogene. Patogen

se može detektovati korišćenjem prajmera specifičnih za *Xanthomonas* rod (Maes i sar., 1993) kao i za vrstu *X. arboricola* (Pothier i sar., 2011).

Pothier i sar. (2011) dizajnirali su prajmere za detekciju *X. a. pv. pruni* (XapY17-F/ XapY17-R) i utvrdili da se ciljani fragment *ftsX* gena umnožava i kod svih testiranih *corylina* sojeva, te da se može uspešno koristiti za njihovu identifikaciju. Isti autori razvili su duplex PCR reakciju sa dva seta prajmera, od kojih prvi (XarbQ-F/ XarbQ-R) umnožava sekvencu *qumA* gena specifičnu za *X. arboricola*, dok je drugi par (XapY17-F/ XapY17-R) specifičan za *ftsX* gen, čime se istovremeno detektuju oba regiona u *pruni* i *corylina* genotipovima (Pagani i sar., 2004; Pulawska i sar., 2010; Pothier i sar., 2011).

2.7.7 Genetički diverzitet Xac

Proučavanje genetičkih varijacija u populaciji od značaja je za bolje razumevanje taksonomije, epidemiologije i interakcije između patogena i biljke domaćina (Milgroom, 2001). Ova proučavanja doprinela su ubrzanom razvoju i promenama u taksonomiji *Xanthomonas* patogena, ali i novim saznanjima o evoluciji i geografskom poreklu, filogenetskim odnosima unutar i između različitih vrsta, pravcima i načinu širenja bolesti (Vautein i sar., 1995; Radermarker i sar., 2005; Parkinson i sar., 2009). Takođe, poređenje genetičkih profila sa drugim srodnim bakterijama može ukazati na postojanje polimorfni regiona unutar DNK i specifičnih sekvenci od značaja za detekciju patogena.

Studije koje su se bavile proučavanjem varijabilnosti populacije *X. arboricola* patogena ukazale su na različit stepen diverziteta (Radermarker i sar., 2005; Vauterin i sar., 1995; Scortichini i sar., 2002). Genetički diverzitet utvrđen među sojevima patovara *juglandis* veoma je značajan, a moguće je i grupisanje sojeva na osnovu geografskog porekla (Scortichini i sar., 2002). Nasuprot tome, populaciju sojeva koji parazitiraju *Prunus* vrste odlikuje nizak stepen polimorfizma, odnosno homogena struktura (Zaccardelli i sar., 1999; Bouden i sar., 2005). Hipotezu da *pruni* sojevi pripadaju jednoj populaciji sa veoma niskim genetičkim diverzitetom Hajri i saradnici (2012) objasnili su distribucijom istog sortimenta u svim oblastima gajenja, kao i veoma ograničenim genetičkim diverzitetom domaćina. Sa druge strane, kultivacija *Juglans*

regia bazira se uglavnom na lokalnim sadnicama koje su, prilagođene specijalnom okruženju, omogućile selekciju različitih lokalnih populacija patogena. Ukazano je i na heterogenu genetičku strukturu populacije Xac (Radermarker i sar., 2005; Vauterin i sar., 1995; Scortichini i sar., 2002). Pri tom, zabeležene su razlike u genetičkim i patogenim odlikama između sojeva izolovanih iz različitih *Corylus* vrsta (Scortichini i sar., 2002b).

2.7.7.1 Rep-PCR

Genom prokariota i eukariota sadrži specifične ponavljajuće nukleotidne sekvence umetnute između dužih jedinstvenih DNA regiona. Ovi nekodirajući, relativno kratki elementi rasprostranjeni su duž molekula DNK bakterija, čineći znatan deo njihovog genoma (Versalovic i sar., 1991; 1994). Postoji više familija ovih sekvenci od kojih su najviše proučene REP (Repetitive Extragenic Palindromic), ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) i BOX elementi (Versalovic i sar., 1991; 1994). Upotreba specifičnih prajmera koji omogućavaju umnožavanje delova genoma zastupljenih između ovih elemenata u PCR reakciji naziva se rep-PCR analiza.

Nakon izvođenja metode, dobija se veći broj DNK fragmenata različite veličine koji nakon elektroforetskog razdvajanja na agaroznom gelu formiraju specifičan genetički otisak. Raspored ponavljajućih sekvenci u genomu bakterija predstavlja značajan pokazatelj genetičkog diverziteta i varijacija unutar vrste (Louws i Cupples, 2001; Rademaker i sar., 2005).

Primena ove metode omogućava proučavanje polimorfizma i diverziteta na nivou i unutar vrste, podvrste i patogenog varijeteta (Rademaker i sar., 2005). Takođe, umnoženi produkti nakon kloniranja i sekvenciranja mogu predstavljati genetičke markere i izvor genetičke informacije (Versalovic, 1991). Step genetičkog diverziteta može da varira u značajnoj meri u zavisnosti od vrste ili patogenog varijeteta. U nekim slučajevima sojevi mogu imati skoro identične profile, dok se neki patogeni varijeteti odlikuju izraženim polimorfizmom unutar populacije, pri čemu pored zajedničkih amplikona sojevi sadrže i veći broj specifičnih DNK fragmenata (haplotipovi, linije). Identifikacija jednog ili nekoliko patogena ovom metodom zasniva se na vizuelnom upoređivanju otisaka nepoznatih sojeva sa otiskom pozitivne kontrole uključene u

analizu. U slučaju proučavanja različitih patogena, dobijeni otisci mogu se analizirati upotrebom softvera i formiranjem baze podataka na osnovu koje se utvrđuje identitet nepoznatog soja.

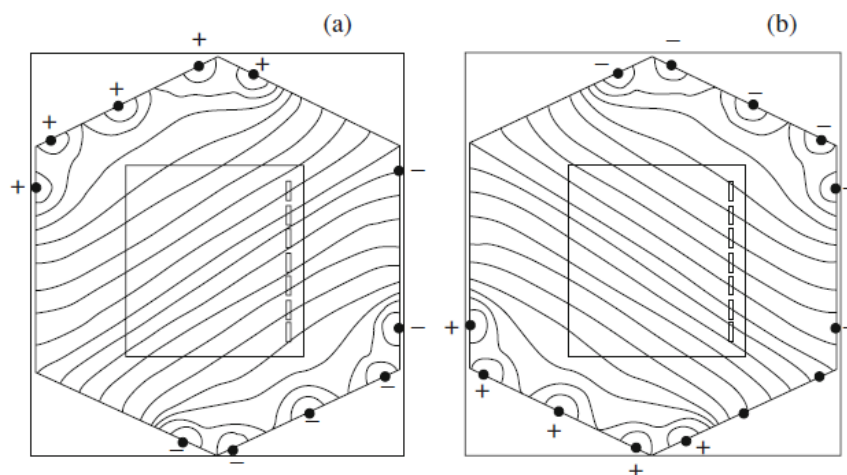
Obzirom na sličnost fenotipskih odlika, proučavanje genetičke raznovrsnosti *Xanthomonas* vrsta na osnovu ponavljajućih elemenata i utvrđivanje varijacija u populaciji, omogućava jednostavnu i brzu klasifikaciju i diferencijaciju sojeva (Louws i sar., 1994; Pooler i sar., 1996; Scortichini i Rossi, 2003; Rademaker i sar., 2005). Na osnovu profila dobijenih rep-PCR analizom različiti sojevi *Xanthomonas* svrstani su u grupe saglasno grupisanjem pomoću kompleksnije metode DNK-DNK hibridizacije (Rademaker i sar., 1997; 2000). Polimorfizam Xac sojeva utvrdili su Scortichini i saradnici (2002). Razlike među proučavanim sojevima nisu bile u korelaciji sa geografskim poreklom i stepenom virulentnosti, za razliku od sojeva *X. a. pv. juglandis* koji su formirali grupe u skladu sa poreklom (Scortichini i sar., 2001b). Proučavanja strukture populacije *X. a. pv. pruni* primenom ove metode ukazala su na homogenost i mali diverzitet sojeva ovog patovara (Boudon i sar., 2005).

2.7.7.2 Makrorestrikciona analiza i elektroforeza u pulsirajućem električnom polju

Elektroforeza u pulsirajućem električnom polju (eng. pulsed field gel electrophoresis, PFGE) predstavlja noviju metodu gel elektroforeze sa mogućnošću razdvajanja DNK fragmenata veličine do 10 miliona baznih parova (megabaza, Mb). Razvojem ove metode, sredinom osamdesetih godina, postignut je veliki napredak na polju genetskih proučavanja, jer je omogućena analiza celih hromozoma prokariota i eukariota (Nassonova, 2008; Joppa i sar., 1992). Izvođenje metode podrazumeva kombinaciju novih tehnika, kao što su ekstrakcija intaktne hromozomske DNK u agaroznim blokovima, restrikciona analiza i elektroforeza sa promenljivim kretanjem električnog polja. Zbog velike molekulske mase, razdvajanje fragmenata nakon restrikcione analize postiže se u pulsirajućem električnom polju u kojem su molekuli DNK primorani na promenu pravca prilikom kretanja kroz gel. Brzina kojom molekuli menjaju pravac kretanja zavisi od njihove veličine, pri čemu je kretanje većih DNK fragmenata sporije i duže od migracije kraćih molekula kroz pore gela. U poređenju sa

stanardnom elektroforezom, gde je pravac struje jednosmeran i konstantan, u PFGE elektroforezi orijentacija električnog polja periodično se menja u tri pravca: jedan je duž glavne ose gela, dok su druga dva pravca struje usmerena pod uglom od 60 stepeni sa obe strane. Na ovaj način, pažljivim usmeravanjem električnog polja u zavisnosti od veličine fragmenata, moguće je razdvajanje i poređenje linearnih DNK fragmenata od 10 kb do 10 Mb. Period trajanja pulsa, nakon koga se menja pravac kretanja struje, naziva se pulsno vreme i iznosi od 1 do 100 s u zavisnosti od veličine molekula. S obzirom da veći fragmenti sporije menjaju pravac kretanja, u cilju njihovog boljeg razdvajanja dužina trajanja pulsa se u toku procesa elektroforeze linearno povećava. Ceo postupak traje duže u odnosu na standardnu tehniku zbog veličine fragmenata i činjenice da se DNK ne kreće pravolinijski kroz gel (Nassonova, 2008).

Poređenjem dobijenih makrorestrikcionih profila, PFGE omogućava mapiranje megabaznih regiona eukariotskih hromozoma i celih genoma prokariota, proučavanje strukture i organizacije cirkularnog DNK molekula bakterija, određivanje veličine DNK, konstruisanje makrorestrikcionih mapa i formiranje baze podataka. Primena PFGE pokazala se kao jedna od najpouzdanijih metoda za proučavanje populacije različitih bakterija, utvrđivanje sličnosti i razlika među sojevima, kao i utvrđivanje porekla i pravca širenja pojedinih bakterioza (Cooksey i Graham, 1989; Egel i sar., 1991; Zhang i Geider, 1997; Zhang i sar. 1998; Jones i sar, 2000, Chan i Goodwin, 1999; Lee i sar., 2006; Jock i sar., 2013). Upoređivanjem restrikcionih fragmenata sojeva *E. amylovora* iz Srbije sa sojevima iz okruženja, utvrđeni su putevi migracije i pravac širenja bakterije u našu zemlju (Ivanović i sar., 2012).



Slika 4. Šematski prikaz pulsirajućeg električnog polja kod CHEF instrumenta. Dva alternativna pravca kretanja struje (a) i (b). (Gene Navigator system, user manual).

2.7.8 Sekvenciona analiza 16S rRNK i konstitutivnih gena

Ribozomalne RNA važni su genetički elementi esencijalni za postojanje bakterijske ćelije. Zbog očuvane funkcije, kao i lakoće dobijanja sekvence, analiza genskih sekvenci rRNA operona predstavlja standardnu metodu za identifikaciju bakterija. Proučavanja 16S rRNK gena kod mnogih *Xanthomonas* spp. pokazala su da ovaj genetički marker ne poseduje dovoljan stepen diskriminacije za razlikovanje vrsta koje imaju identičan gen za 30S ribozomalnu subjedinicu (Hauben i sar., 1997). Noviji pristup pogodan za identifikaciju i diferencijaciju usko povezanih vrsta i proučavanje filogenetskih i evolutivnih odnosa je analiza konstitutivnih ("housekeeping") gena koji su, odgovorni za sintezu proteina od vitalnog značaja za funkcionisanje svake ćelije (Parkinson 2007; 2009). Varijacije u sekvenci ovih gena nastaju relativno sporo, što ih čini pogodnim za dugoročne epidemiološke studije. Obzirom da su varijacije veće u odnosu na 16S rRNK region, sekvencionom analizom ovih gena može se postići pouzdana i brza identifikacija sojeva bakterija do nivoa vrste i podvrste (Parkinson i Elphinstone, 2010).

Proučavanja konstitutivnih gena *Xanthomonas* spp. ukazala su da unutar vrste *X. arboricola* postoje jasno definisane grupe koje odgovaraju fitopatogenoj specijalizaciji, kao i na veću genetičku srodnost patovara *pruni*, *corylina* i *juglandis* u odnosu na ostale

pripadnike vrste (Parkinson, 2009; Vauterin i sar., 1995; Scortichini i Rosi, 2003; Rademarker i sar., 2005; Hajri i sar., 2012). Sekvenciona analiza *gyrB* i *rpoD* gena pokazala se korisnom u proučavanju filogenetske pozicije patogena leske u odnosu na druge *Xanthomonas* patogene, ali i u identifikaciji Xac sojeva, poređenjem sa sekvencama dostupnim u NCBI bazi podataka (Parkinson, 2009; Hajri i sar., 2012; Pulawska i sar., 2010).

3. RADNA HIPOTEZA

Kao mogući prouzrokovatori oboljenja leske, u literaturi se navodi nekoliko vrsta fitopatogenih bakterija koje svojom aktivnošću pričinjavaju velike štete intenzivnoj proizvodnji ove biljne vrste. Polazna pretpostavka u ovom istraživanju je da *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina*, prouzrokovatelj bakterijske plamenjače leske, može ugroziti proizvodnju gajene leske i umanjiti njen ekonomski efekat. Pretpostavlja se da je Xac potencijalno značajan i još uvek nedovoljno proučen patogen, čiji karantinski status nameće potrebu za detaljnim istraživanjima. Takođe, pretpostavlja se da će proučavanja genetičkih karakteristika populacije ukazati na njenu heterogenost, ali i na postojanje jedinstvenih regiona DNK koji se mogu upotrebiti za brzu i pouzdanu detekciju ovog patogena.

3.1 CILJEVI ISTRAŽIVANJA

- ✦ Naučni cilj ove disertacije je doprinos proučavanju populacije bakterije *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina*, koja nije bila predmet intenzivnih proučavanja u Srbiji dugi niz godina.
- ✦ Primenom standardnih i savremenih metoda naučnog rada biće detaljno proučene patogene, biohemijsko-fiziološke, serološke i genetičke odlike sojeva. Neke od tih karakteristika biće proučene po prvi put, ne samo kod nas, već i u svetu.
- ✦ Identifikacija i karakterizacija odabranih sojeva osim tradicionalnim, obaviće se i savremenim dijagnostičkim tehnikama koje odlikuje brzina, osetljivost i pouzdanost. Primenom molekularnih i drugih metoda, koje su danas nezaobilazne u proučavanju fitopatogenih bakterija, unaprediće se metode detekcije i identifikacije neophodne za pouzdanu i pravovremenu dijagnozu oboljenja.
- ✦ Planiranim istraživanjem proučiće se diverzitet *X. a.* pv. *corylina* sojeva. Ovi podaci ukazaće na stepen varijabilnosti populacije, omogućiti grupisanje sojeva i doprineti boljem poznavanju biodiverziteta, filogenetske pozicije i porekla odabranih sojeva.
- ✦ Utvrđivanje prisustva jedinstvenih regiona u genomu proučavanih sojeva omogućiće unapređenje i razvoj metoda za specifičnu molekularnu detekciju patogena i diferencijaciju od srodnih fitopatogenih vrsta.
- ✦ Osetljivost sojeva prema pojedinim baktericidima proučiće se u cilju utvrđivanja eventualne pojave rezistentnih sojeva, kao i mogućnosti primene pojedinih supstanci za suzbijanje patogena.

4. MATERIJAL I METODE

4.1 Izolacija patogena

Uzorci obolelih biljaka gajene leske sa simptomima pegavosti i plamenjače lišća i nekroze i uvelosti pupoljaka i letorasta, prikupljeni su u periodu 2008 - 2011. godine sa više lokaliteta u Srbiji (Tabela 1). U cilju izolacije fitopatogenih bakterija biljni materijal je obrađen u Laboratoriji za fitobakteriologiju Poljoprivrednog fakulteta u Beogradu. Izolacija bakterija izvršena je iz nadzemnih delova biljaka sa izraženim simptomima bolesti. Uzorci su ispirani pod mlazom česmenske vode, kako bi se otklonile nečistoće, a potom površinski dezinfikovani 95% alkoholom i prosušeni na filter-papiru. Sitni fragmenti biljnog tkiva uzeti na prelazu zdravog u obolelo tkivo isecani su sterilnim sklapelom i macerirani u nekoliko kapi sterilne destilovane vode. Nakon nekoliko minuta, kap macerata zasejavana je razmazom pomoću bakteriološke petlje, na podlogu od hranljivog agara (HA, hranljivi bujon 23,0 g; agar 15,0 g; destilovana voda do 1,0 L) u Petri-kutijama. Pojava karakterističnih kolonija praćena je narednih 3-4 dana.

Nakon 3 dana razvoja pri temperaturi 26-27°C, prihvaćene su pojedinačne kolonije žute boje i presejane na novu HA podlogu u cilju izdvajanja čistih kultura. Potom su pojedinačne kolonije presejane na GYCA poluselektivnu podlogu (glukoza 10,0 g; kvašćev ekstrakt 5,0 g; kalcijum karbonat 30,0 g; agar 20,0 g; destilovana voda do 1,0 L) radi odabira sojeva za dalja proučavanja. Pored 39 sojeva iz Srbije, u istraživanja je uključeno 7 sojeva izolovanih u fitobakteriološkoj laboratoriji dr. Joane Pulavske, poreklom iz Poljske. Takođe, u svim eksperimentima korišćen je kontrolni soj NCPPB 3037, iz Nacionalne kolekcije fitopatogenih bakterija u Velikoj Britaniji (National Collection of Plant Pathogenic Bacteria - NCPPB).

Tabela1. Proučavani sojevi bakterija izolovani iz biljaka leske

R.br.	KFB	Radna šifra	Ostale šifre	Biljni organ	Lokalitet	Datum izolacije
1.	275	RKFB 117	Le – D 1	list	Petrovčić	09.7.2008.
2.	276	RKFB 118	Le – D 2	list	Petrovčić	09.7.2008.
3.	277	RKFB 119	Le – D 3	list	Petrovčić	09.7.2008.
4.	278	RKFB 120	Le – D 4	list	Petrovčić	09.7.2008.
5.	279	RKFB 121	Le – D 5	list	Petrovčić	09.7.2008.
6.	280	RKFB 122	Le – D 6	list	Petrovčić	09.7.2008.
7.	281	RKFB 125	Le – Mirko	list	NP ¹	10.7.2008
8.	282	RKFB 141	Le 7	list	Topola	2009.
9.	283	RKFB 146	LP62	list	Petrovčić	02.9.2008.
10.	284	RKFB 147	LP63	list	Petrovčić	02.9.2008.
11.	285	RKFB 148	LP64	list	Petrovčić	02.9.2008.
12.	0128	RKFB 315	RIPF X09	NP	Poljska	2007.
13.	0130	RKFB 316	RIPF X12	NP	Poljska	2007.
14.	0132	RKFB 318	RIPF X14	NP	Poljska	2007.
15.	0134	RKFB 319	RIPF X18	NP	Poljska	2009.
16.	0135	RKFB 320	RIPF X19	NP	Poljska	2009.
17.	0136	RKFB 321	RIPF X20	NP	Poljska	2009.
18.	0137	RKFB 322	RIPF X21	NP	Poljska	2009.
19.	286	RKFB 323	G4	grana	Deč	11.5.2010.
20.	287	RKFB 324	L12/1	list	Deč	11.5.2010.
21.	288	RKFB 325	L12/2	list	Deč	11.5.2010.
22.	289	RKFB 328	L2/1b	list	Deč	27.5.2010.
23.	290	RKFB 329	L3/1	list	Deč	27.5.2010.
24.	291	RKFB 330	L3/2	list	Deč	27.5.2010.
25.	292	RKFB 331	L3/3	list	Deč	27.5.2010.
26.	293	RKFB 332	L4/1a	list	Deč	27.5.2010.
27.	294	RKFB 333	L4/1b	list	Deč	27.5.2010.
28.	295	RKFB 334	L4/2a	list	Deč	27.5.2010.
29.	296	RKFB 335	L4/2b	list	Deč	27.5.2010.
30.	297	RKFB 336	L5	list	Deč	27.5.2010.
31.	298	RKFB 337	G1P4/4	pupoljak	Deč	27.5.2010.
32.	299	RKFB 338	G2P1	pupoljak	Deč	27.5.2010.
33.	300	RKFB 339	G4P	pupoljak	Deč	27.5.2010.
34.	301	RKFB 340	G1/1	grana	Deč	27.5.2010.
35.	302	RKFB 341	G1/2	grana	Deč	27.5.2010.
36.	303	RKFB 342	G/1	grana	Deč	27.5.2010.
37.	304	RKFB 343	G/2	grana	Deč	27.5.2010.
38.	305	RKFB 372	3E/1	list	Erdevik	31.9.2010.
39.	306	RKFB 373	3E/2	list	Erdevik	31.9.2010.
40.	307	RKFB 374	4E/1	pupoljak	Erdevik	31.9.2010.
41.	308	RKFB 375	4E/2	pupoljak	Erdevik	31.9.2010.
42.	309	RKFB 376	5E/1	l.drška	Erdevik	31.9.2010.
43.	310	RKFB 377	5E/2	l.drška	Erdevik	31.9.2010.
44.	311	RKFB 378	7E/1	list	Erdevik	31.9.2010.
45.	312	RKFB 380	7E/3	list	Erdevik	31.9.2010.
46.	313	RKFB 381	7E/4	list	Erdevik	31.9.2010.
47.	314	RKFB 443	Le7/2	list	Požarevac	28.6.2011.

Legenda: NP, nije poznato

Tabela 2. Kontrolni sojevi bakterija korišćeni u proučavanju bakterioloških odlika

Soj	Bakterija	Test	Izvor ¹
B 122	<i>Bacillus pumilus</i>	Reakcija po Gramu (K ⁻)	KFB
KFB 148	<i>Erwinia amylovora</i>	Stvaranje levana (K ⁺)	KFB
KFB 85	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	Pektolitička aktivnost (K ⁺) O/F test (K ⁺) Stvaranje vodonik-sulfida Tolerantnost prema NaCl (K ⁺)	KFB
KFB 013	<i>Dickeya chrysanthemi</i>	Razvoj pri 36°C (K ⁺) Tolerantnost prema NaCl (K ⁻)	NCPPB
B 130	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Reakcija po Gramu (K ⁺) Redukcija nitrata (K ⁺) Aktivnost oksidaze (K ⁺)	KFB
KFB 145	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	Hidroliza eskulina (K ⁻)	
KFB 189	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>	Aktivnost oksidaze (K ⁻) Hidroliza želatina (K ⁺) Hidroliza skroba (K ⁺)	KFB
KFB 0103	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	HR duvana (K ⁺) Aktivnost oksidaze (K ⁻) Aktivnost katalaze (K ⁺) Fluorescentnost na KB (K ⁺) Redukcija nitrata (K ⁻) O/F test (K ⁺) Hidroliza eskulina (K ⁺) Hidroliza skroba (K ⁻)	KFB
E-3	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>	Osetljivost na antibiotike i CuSO ₄	Jeffrey B. Jones

¹Poreklo kontrolnih sojeva: Kolekcija fitopatogenih bakterija, Poljoprivredni fakultet, Zemun; National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, York, UK. K⁺, pozitivna kontrola; K⁻, negativna kontrola.

Tabela 3. Kontrolni sojevi *Xanthomonas* spp. korišćeni u istraživanjima

Bakterija ¹	Ostale šifre	Geograf. poreklo	Godina izolacije	Biljka domaćin
<i>X. arboricola</i> pv. <i>corylina</i>				
RIPF (n=7)		Poljska	2009	<i>Corylus avellana</i>
NCPPB 935	KFB 0124	SAD	1939	<i>Corylus maxima</i>
CRF Xac 9	KFB 0125	Nemačka	1999	<i>Corylus avellana</i>
NCPPB 3870	KFB 0127	Italija	1991	<i>Corylus avellana</i>
NCPPB 3339	KFB 0126	Francuska	1984	<i>Corylus avellana</i>
NCPPB 3037	KFB 0114	V. Britanija	1977	<i>Corylus avellana</i>
<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>				
69VR		Italija	/	<i>Prunus persica</i>
ICMP51 ^T	NCPPB 416	Holandija	1953	<i>Prunus salicina</i> (Japanese plum)
IPV-BO ⁴ 1192		Italija	/	/
IPV-BO 2959		Italija	/	<i>Prunus laurocerasus</i> 'Rotundifolia'
IPV-BO 5910		Italija	/	/
IPV-BO 7333		Italija	/	<i>Juglans regia</i>
GBBC ⁵ 808		Italija	1996	<i>Prunus persica</i>
GBBC 953		Holandija	2009	<i>Prunus laurocerasus</i> 'Otto Luyken'
GBBC 954		Belgija	2009	<i>Prunus laurocerasus</i> 'Rotundifolia'
GBBC 955		Holandija	2009	<i>Prunus laurocerasus</i> 'Otto Luyken'
GBBC 956		Holandija	2009	<i>Prunus laurocerasus</i> 'Otto Luyken'
GBBC 957		Holandija	2009	<i>Prunus laurocerasus</i> 'Rotundifolia'
<i>X. arboricola</i> pv. <i>juglandis</i>				
NCPPB 411	KFB 0115	N.Zeland	1957	<i>Juglans regia</i>
<i>X. arboricola</i> pv. <i>celebensis</i>				
NCPPB 1832		N.Zeland	1966	<i>Musa</i> sp.
<i>X. arboricola</i> pv. <i>fragariae</i>				
NCPPB 4182		Italija	2000	<i>Fragaria</i> (x) <i>ananassa</i>
<i>X. arboricola</i> pv. <i>populi</i>				
NCPPB 2987		V. Britanija	1977	<i>Populus koreana trichocarpa</i>
<i>X. vesicatoria</i>				
KFB 1		Srbija	1996	<i>Capsicum annuum</i>
<i>X. gardneri</i>				
NCPPB 881	KFB 0110	Srbija	1953	<i>Lycopersicon esculentum</i>
<i>X. perforans</i>				
KFB 0109	NCPPB 4321	SAD	1991	<i>Lycopersicon esculentum</i>
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vitians</i>				
KFB031, GSPB ⁶ 2666		Italija	NP	<i>Lactuca sativa</i>

Legenda: ¹Poreklo kontrolnih sojeva: Research Institute of Pomology and Floriculture, Skierniewice, Poland; National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, York, UK. Kolekcija fitopatogenih bakterija, Poljoprivredni fakultet, Zemun (kurator prof. dr. A. Obradović); IPV-BO, Istituto Patologia Vegetale - Bologna, Italy (kurator dr. E. Biondi); Institute for Agricultural and Fisheries Research-ILVO, Merelbeke, Belgium; Göttinger Sammlung Phytopathogener Bakterien, Institut für Pflanzenpathologie und Pflanzenschutz, Göttingen, Deutschland, (kurator dr. A. Mavridis). NP, nije poznato.

4.1.1 Održavanje i čuvanje bakterija u kolekciji

Bakterijske kulture korišćene u testovima održavane su periodičnim presejavanjem, svakih 7 dana, na standardnu bakteriološku podlogu od hranljivog agara. Za kratkoročno čuvanje bakterija tokom nekoliko meseci, pripremljena je radna kolekcija tako što je pun zahvat kolonije starosti 24 h suspendovan u sterilnoj česmenskoj vodi u mikroeprijetama i čuvan pri sobnoj temperaturi (Klement i sar., 1990). Na duži vremenski period sojevi bakterija čuvani su pri temperaturi -80°C, u podlozi od hranljivog bujona sa 30% glicerola u krioepruetama (Schaad i sar., 2001), u kolekciji fitopatogenih bakterija (KFB) Instituta za fitomedicinu Poljoprivrednog fakulteta u Beogradu. Pri izvođenju oglada korišćene su sveže kulture gajene 24-48 h u termostatu pri 26-27°C.

4.2 Patogene odlike proučavanih sojeva

4.2.1 Hipersenzitivna reakcija (HR)

Sposobnost sojeva da prouzrokuju hipersenzitivnu reakciju proverena je na biljkama duvana sorte Samsun i paradajza sorte Novosadski jabučar u fazi razvoja 5-6 stalnih listova, kao i na mahunama boranije u fazi tehnološke zrelosti. Korišćena je suspenzija bakterija u sterilnoj destilovanoj vodi, koncentracije oko 10^8 cfu/ml. Inokulacija duvana i paradajza izvršena je infiltracijom suspenzije između dva lisna nerva sa naličja listova pomoću medicinskog šprica bez igle. Inokulacija tkiva mahune izvršena je infiltracijom suspenzije medicinskim špricom sa iglom. Kao pozitivna kontrola korišćen je soj bakterije *P. s. pv. syringae* KFB 0103, a kao negativna sterilna destilovana voda. Inokulisane biljke održavane su u laboratorijskim uslovima, a inokulisane mahune u plastičnim posudama sa vlažnim filter papirom radi održavanja

povišene vlažnosti, pri sobnoj temperaturi. Rezultati su očitani nakon 1-2 dana, a pojava nekroze tkiva na mestu inokulacije nakon 24-48 h znak je pozitivne reakcije, odnosno patogenosti bakterije (Arsenijević, 1997).

4.2.2 Test patogenosti na biljci domaćinu

Patogenost sojeva prema biljci domaćinu proučena je korišćenjem jednogodišnjih i dvogodišnjih sadnica leske sorte Tonda Gentile de la Lange gajenih u tresetnom supstratu u saksijama prečnika 15 cm. Eksperiment je izveden u uslovima veštačke inokulacije u stakleniku Poljoprivrednog fakulteta u Zemunu. Biljke su obilno zalivene 1 dan pre inokulacije i prekrivene PVC folijom kako bi se obezbedili uslovi povišene vlažnosti vazduha. Inokulum je pripremljen suspendovanjem bakterija gajenih 48 h na HA pri 27°C u sterilnoj destilovanoj vodi, do koncentracije približno 10^8 cfu/ml ($OD_{600}=0.3$). Primenjene su dve tehnike inokulacije koje su modifikovane u odnosu na standardnu metodu Gardan i Devaux-a (1987).

4.2.2.1 Inokulacija pupoljaka

Pupoljci na mladim bočnim izdancima inokulisani su ubodom pomoću medicinskog šprica i igle, pri čemu je infiltrirano oko 0,5 ml bakterijske suspenzije (10^8 cfu/ml) u tkivo pupoljka koje je pritom natopljeno suspenzijom. Svakim sojem ponaosob inokulisana su po tri pupoljka. Tretirane biljke prekrivene su PVC folijom koja je uklonjena nakon 48 h i potom gajene u uslovima staklenika do pojave karakterističnih simptoma bolesti.

4.2.2.2 Inokulacija pupoljaka i stabla

Neposredno pre inokulacije izvršeno je povređivanje biljnog tkiva stabla i pupoljaka sterilnim skalpelom, tako što su na gornjoj polovini jednogodišnjih sadnica visine 100 cm napravljena dva reza dubine oko 0,5 mm na stablu, kao i uzdužni rez na tri slučajno odabrana pupoljka. Zatim je povređeni deo biljke potapan u inokulum. Kao pozitivna i negativna kontrola korišćene su biljke inokulisane referentnim sojem

KFB0114, odnosno sterilnom vodom. Po tri biljke inokulisane su svakim sojem ponaosob. Pojava simptoma praćena je tokom 6 meseci od inokulacije, nakon čega je izvršena reizolacija bakterija.

4.3. Morfološke i odgajivačke odlike

4.3.1. Razlikovanje bakterija po Gramu

Prema građi ćelijskog zida sve bakterije su podeljene na Gram-pozitivne i Gram-negativne. Ova diferencijalna karakteristika proučena je korišćenjem metode sa 3% KOH. Pun zahvat bakterijske kolonije stare 24 h homogenizovan je pomoću drvene čačkalice u kapi 3% rastvora KOH u staklenoj Petri kutiji. Pod uticajem baze dolazi do razgradnje ćelijskog zida Gram-negativnih bakterija i oslobađanja nukleinske kiseline, što se ispoljava pojavom sluzaste konzistencije. Usled toga, podizanjem čačkalice u vis formira se elastična nit, što je znak pozitivne reakcije, odnosno lizisa ćelijskog zida. U slučaju Gram-pozitivnih bakterija ne dolazi do lizisa i promene konzistencije kapi baze u kojoj su suspendovane bakterijske ćelije (Arsenijević, 1997, Schaad i sar., 2001). Kao pozitivna kontrola korišćen je soj *Pseudomonas fluorescens* (B-130), a kao negativna kontrola Gram-pozitivna bakterija *Bacillus pumilus* (B122) (Schaad i sar., 2001).

4.3.2 Transmisiona elektronska mikroskopija (TEM)

Morfološke karakteristike bakterijskih ćelija proučene su posmatranjem pomoću transmisionog elektronskog mikroskopa (eng. transmission electron microscope, TEM). Za pripremu uzorka korišćena je kultura soja KFB 275, gajena u hranljivom bujonu tokom 24h, pri 27°C. Priprema preparata obavljena je tehnikom negativnog bojenja bakterijskih ćelija koja se najčešće koristi za proučavanje oblika i veličine bakterijskih ćelija i virusnih čestica (Brajušković, 2005; Ayache i sar., 2010). Po 10 µl suspenzije bakterija u sterilnoj destilovanoj vodi, koncentracije oko 10^8 cfu/ml ($OD_{600}=0.3$), naneto je pomoću mikropipete na formvarom obloženu bakarnu mrežicu za elektronsku mikroskopiju sa 200 polja. Neposredno nakon evaporacije kapi sa površine mrežice (oko 1 min) vršeno je kontrastiranje uzorka 2% vodenim rastvorom fosfotungstične

kiseline (pH 7.3) u trajanju 30 sekundi. Višak tečnosti sa ruba mrežice uklonjen je pomoću filter papira, nako čega je preparat osušen na vazduhu u trajanju oko 1h. Bakterije su posmatrane transmisivnim elektronskim mikroskopom (FEI Morgagni 268D) na Institutu za histologiju, Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, pod rukovodstvom prof. dr Vladimira Bumbaširevića. Veličina bakterija i dužina flagela utvrđene su kod 10 pojedinačnih ćelija.

4.3.3 Izgled i razvoj kolonija na hranljivim podlogama

Razvoj proučavanih sojeva i izgled pojedinačnih kolonija posmatrani su gajenjem bakterija na standardnoj podlozi od hranljivog agara, hranljivoj podlozi obogaćenoj sa 5% saharoze (NAS) i podlozi sa glukozom, kvašćevim ekstraktom i CaCO_3 (GYCA) (Lelliott i Stead, 1987; Schaad i sar., 2001). Proučavani sojevi zasejavani su metodom razmaza pomoću bakteriološke petlje po površini podloge u Petri kutijama i inkubirani 3 dana u termostatu pri 27°C (Arsenijević, 1997). Razvoj krupnih, ispupčenih, okruglastih i sjajnih kolonija na NAS podlozi posle 2 do 3 dana inkubacije znak je sinteze levana. Kao pozitivna kontrola korišćen je soj *E. amylovora* (KFB 148), a kao negativa, soj *Pseudomonas cichorii* (KFB 026) (Schaad i sar., 2001). Razvoj kripnih, sluzastih kolonija žute boje nakon 3-5 dana razvoja na podlozi sa glukozom, znak je sinteze sluzastog polisaharida karakterističnog za *Xanthomonas* spp. (Lelliott i Stead, 1987; Arsenijević, 1997). Kao pozitivna kontrola u ovom testu korišćen je soj Xac, KFB 0114.

4.3.4 Maksimalna temperatura razvoja

Razvoj bakterija pri 35 i 36°C proučen je u tečnoj podlozi s kvašćevim ekstraktom i neorganskim solima (YS) (Dye, 1962, loc. cit. Schaad i sar., 2001). Epruvete sa sterilisanom podlogom postavljene su u vodeno kupatilo pri 35°C i zasejane pipetiranjem po 100 µl suspenzije bakterija u dva ponavljanja. Razvoj bakterija u vidu zamućenja podloge, posmatran je tokom 7 dana nakon zasejavanja (Arsenijević, 1997). Kao negativna kontrola korišćena je nezasejana podloga, a kao pozitivna kontrola soj *Dickeya chrysanthemi* (KFB 013).

4.3.5 Tolerantnost prema 2 i 5% NaCl

Proučavani sojevi zasejavani su pipetiranjem po 100 µl suspenzije bakterija koncentracije oko 10^8 cfu/ml u podlogu od kvašćevog ekstrakta i neorganskih soli (YS) sa različitim koncentracijama NaCl (2 i 5%) (Fahy i Hayward, 1983, loc. cit. Arsenijević, 1997). Tolerantnost bakterija ocenjivana je zamućenjem podloge posle 14 dana razvoja pri 27°C. Ukoliko podloga ostaje bistra, reakcija je negativna. Kao negativna kontrola korišćen je soj *D. chrysanthemi* (KFB 013), a kao pozitivna kontrola soj *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (KFB 85).

4.4 Biohemijsko-fiziološke odlike

U cilju determinacije sojeva proučene su sledeće biohemijske i fiziološke karakteristike: aktivnost oksidaze i katalaze, korišćenje ugljenikovih jedinjenja, razgradnja glukoze, hidroliza skroba, želatina i eskulina, korišćenje azotnih jedinjenja (redukcija nitrata, stvaranje vodonik-sulfida iz peptona) (Lelliott i Stead, 1987; Arsenijević, 1997; Klement i sar., 1990).

4.4.1 Aktivnost oksidaze

Za određivanje prisustva citohrom oksidaze u respiratornom lancu bakterija primenjen je Kovačev metod (Kovacs, 1956., loc. cit. Arsenijević, 1997) korišćenjem sveže pripremljenog 1% (w/v) rastvora N,N,N',N'- tetra-metil-p-fenilendiamin dihidrohlorida (TMPD, Kovačev reagens). Test je izveden nanošenjem nekoliko kapi reagensa na filter papir na koji se potom prenosi i razmazuje sveža bakterijska kultura pomoću sterilne drvene čačkalice. Ukoliko bakterija poseduje enzim dolazi do oksidacije reagensa i pojave plavo-ljubičaste boje kolonije nakon 5-10 sekundi. Slabo pozitivna reakcija javlja se posle 30-40 sekundi. Pri negativnoj reakciji nema promene boje, ili se pojavljuje žuta ili svetlo siva boja kolonije. Kao pozitivna kontrola korišćen je soj *P. fluorescens* (B 130), a kao negativna kontrola soj *X. euvesicatoria* (KFB 189).

4.4.2 Aktivnost katalaze

Prisustvo fermenta katalaze koja katalizuje razgradnju toksičnog vodonik peroksida proučeno je homogenizacijom male količine bakterijske kulture stare 24 h u kapi 3% (v/v) H_2O_2 u sterilnoj Petri šolji. U prisustvu enzima katalaze dolazi do oslobađanja mehurića slobodnih molekula kiseonika, dok odsustvo ove pojave ukazuje na odsustvo enzima kod proučavanog soja (Arsenijević, 1997). Kao pozitivna kontrola korišćen je soj *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (KFB 0103).

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

Bakterije se mogu razlikovati prema načinu na koji razlažu glukozu. Sposobnost razlaganja glukoze oksidativnim ili fermentativnim putem proučena je korišćenjem Hugh-Leifson-ove podloge (1953, loc. cit. Lelliott i Stead, 1987) u koju je nakon sterilizacije i hlađenja do 50°C, dodat filterom sterilisan 10% rastvor glukoze do konačne koncentracije 1%. Čiste kulture bakterija zasejane su ubodom pomoću igle u po dve podloge u epruvetama od kojih je u jednu epruvetu sa inokulisanom podlogom dodato oko 2 ml sterilnog parafina radi stvaranja anaerobnih uslova. Inokulisana podloga inkubirana je pri temperaturi 27°C. Rezultati testa očitani su nakon 4 i 7 dana, a reakcija je praćena do 14 dana. Pozitivna reakcija očitava se promenom boje podloge iz plave u žutu, što ukazuje na razgradnju glukoze i promenu pH podloge usled stvaranja kiseline. Bakterije sa oksidativnim metabolizmom glukoze stvaraju kiselinu samo u aerobnim uslovima, što se ispoljava promenom boje podloge u gornjem sloju (Arsenijević, 1997). Kao pozitivne kontrole, u testu su korišćeni sojevi *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (KFB 85), koji razlaže glukozu oksidativno i fermentativno i *P. s.* pv. *syringae* (KFB 0103) koji ima oksidativan metabolizam glukoze. Kao negativna kontrola korišćene su nezasejane epruvete.

4.4.4 Korišćenje različitih izvora ugljenika

Fitopatogene bakterije koriste različita jedinjenja (šećere, alkohole i glikozide) kao izvore ugljenika i energije. Produkti njihovog razlaganja najčešće su organske

kiseline, koje se dalje mogu razložiti do CO_2 i H_2O . Za ovaj test korišćena je osnovna podloga Ayers-a i sar. (1919; loc. cit. Lelliott i Stead, 1987) u koju je nakon sterilizacije i razlivanja u epruvete aseptično dodat filterom sterilisan vodeni rastvor (10% w/v) odgovarajućeg izvora ugljenika do konačne koncentracije od 1% (w/v). Proučena je mogućnost korišćenja glukoze, manoze, saharoze, maltoze i sorbitola. Zasejavana je podloga ubodom bakteriološkom iglom prethodno uronjenom u koloniju bakterija starosti 24h, u dva ponavljanja. Razlaganje jedinjenja prouzrokuje smanjenje pH, usled stvaranja kiseline u podlozi, što se dokazuje promenom boje odgovarajućeg indikatora. Promena boje podloge u žutu (u potpunosti ili delimično), koja ukazuje na pozitivnu reakciju, očitavana je nakon 7,14 i 21 dan. Kao negativna kontrola korišćena je nezasejana podloga, a kao pozitivna odgovarajući kontrolni soj (Tabela 2).

4.4.5 Hidroliza skroba

Sposobnost hidrolize skroba proučena je na podlozi od hranljivog agara sa 0.2% rastvorljivog skroba (Lelliot i Stead, 1987). Bakterije su zasejavane bakteriološkom petljom u vidu linije po površini podloge. Nakon pet dana razvoja u termostatu pri 27°C , podloga je prelivena rastvorom Lugola (J_2 , 1g, KJ, 2g, sterilna destilovana voda, 300 ml). Pojava prozirne zone oko razvoja bakterije predstavlja znak hidrolize skroba tj. pozitivne reakcije. Nerazloženi skrob boji se plavom bojom. Kao pozitivna kontrola korišćen je soj bakterije *X. arboricola* pv. *corylina* (KFB 0114), a kao negativna soj *P. s. pv. syringae* (KFB 0103).

4.4.6 Redukcija nitrata

Ovim biohemijskim testom proučena je sposobnost sojeva da vrše redukciju nitrata (NO_3) u nitrite (NO_2). Podloga koja se sastojala od hranljivog bujona i 1% (w/v) NaNO_3 (Šutić i Panić, 1969) razlivanja je u epruvete po 5 ml i zasejavana sa 100 μl suspenzije bakterija. Nakon 10 dana razvoja pri 27°C u epruvete su redom dodati reagensi: 1 ml 0.5% rastvora skroba i 0.4% KJ i 5 ml 50% H_2SO_4 . Trenutna pojava tamnomrke, ćilibarne boje nakon dodavanja reagensa znak je pozitivne reakcije, odnosno prisustva nitrita u podlozi. Kao pozitivna kontrola korišćen je soj *P.*

fluorescens (B 130), a kao negativna, nezasejana podloga i soj *P. s. pv. syringae* (KFB 0103).

4.4.7 Hidroliza eskulina

Korišćenje glukozida eskulina proučeno je zasejavanjem kultura pipetiranjem 50 µl suspenzije bakterija u tečnu hranljivu podlogu sa 10% eskulina. Promena boje u tamnomrku ili crnu nakon 7-14 dana inkubacije znak je pozitivne reakcije. Kao pozitivna kontrola korišćen je soj *P. s. pv. syringae* (KFB 0103), a kao negativna *P. s. pv. tomato* (KFB 145) i nezasejana podloga.

4.4.8 Hidroliza želatina

Sposobnost sojeva da vrše razlaganje želatina proučena je u podlozi koja se sastojala od 200 g čistog želatina rastvorenog u 800 ml destilovane vode. Nakon inkubacije u vodenom kupatilu pri 50-60°C, podloga je razlivena u epruvete i sterilisana u autoklavu pri temperaturi 121°C u trajanju 15 min. Podloge su zasejavane ubodom, pri čemu su za svaki soj korišćene po dve test epruvete. Reakcija je ocenjivana nakon 4, 7, 14 i 21 dan razvoja pri 27°C. Topljenje podloge posmatrano je nakon postavljanja inokulisanih podloga u frižider pri 4°C u trajanju od 30 min (Lelliott i Stead, 1987). Kao pozitivna kontrola korišćen je soj *X. euvesicatoria* KFB 189, a kao negativna kontrola nezasejane podloge.

4.5 Biolog test

Bakterije se mogu razlikovati prema sposobnosti korišćenja različitih izvora ugljenika kao što su ugljeni hidrati, organske kiseline, aminokiseline, masne kiseline, alkoholi i dr. Biolog test omogućavaistovremeno izvođenje 95 različitih biohemijskih reakcija na jednoj mikrotitrskoj ploči sa 96 bunarčića (Biolog, Inc. 2001). Dobijeni raspored ljubičastih bunarčića predstavlja jedinstveni metabolički otisak za svaki proučavani soj. Identifikacija proučavanog soja obavlja se automatski, na osnovu dobijenog metaboličkog otiska koji se poredi sa otiscima sojeva koji se nalaze u

MicroLog kompjuterskoj bazi podataka (Biolog, Inc. 2001). Sojeve sa profilima najbližim proučavanom soju program prikazuje po rangiranom redosledu sa odgovarajućim indeksima sličnosti.

Razgradnja ugljenikovih jedinjenja iz različitih biohemijskih grupa primenom Biolog testa proučena je kod 18 reprezentativnih Xac sojeva, koji su prema rep-PCR analizi imali različite genetičke profile, kao i referentnog soja KFB 0114. (Tabela 10). S obzirom da se u bazi podataka sistema ne nalazi vrsta *X. arboricola*, primarni cilj ovih istraživanja bio je proučavanje metaboličke aktivnosti sojeva i dobijanje informacija o diverzitetu populacije i korišćenju pojedinih izvora ugljenika od potencijalnog značaja za identifikaciju bakterija.

U testu su korišćene GN2 mikrotitarske ploče (GN Microplate; BIOLOG, Hayward, Calif.) sa 95 jedinjenja karakterističnih za determinaciju aerobnih Gram-negativnih bakterija. Svaki bunarčić sadrži hranljivu podlogu, redoks indikator tetrazolijum ljubičasta i različit izvor ugljenika, izuzev kontrolnog, koji umesto ugljenikovog jedinjenja sadrži vodu. U bunarčiće mikroploče pipetirano je po 150 µl bakterijske suspenzije prethodno pripremljene prema uputstvu proizvođača (Biolog, Inc.). Inokulisane mikroploče inkubirane su u termostatu pri 28°C tokom 24 h. Pojava ljubičaste boje u bunarčiću znak je pozitivne reakcije, odnosno oksidacije supstrata od strane proučavanog soja i redukcije bezbojnog indikatora u ljubičasti formazan (Jones i sar., 1993). Ukoliko proučavani soj ne koristi ugljenik iz nekog od supstrata, bunarčić ostaje bezbojan.

Očitavanje rezultata sa mikrotitarske ploče vršeno je merenjem apsorpcije pomoću spektrofotometra na 590 nm i upoređivanjem dobijene vrednosti za svaki bunarčić sa negativnom kontrolom. Identifikacija sojeva obavljena je pomoću softverskog paketa MicroLog 4.20, upoređivanjem dobijenih profila sa metaboličkim otiscima poznatih bakterija deponovanih u Biolog GN bazi podataka (verzija 4.0). Program Biolog sistema za klaster analizu u formi dendrograma korišćen je za utvrđivanje međusobne sličnosti sojeva. Priprema uzoraka, kao i identifikacija sojeva pomoću MicroLogTM baze podataka izvedena je u Fitobakteriološkoj laboratoriji Univerziteta Florida u Gejnsvilu, SAD, pod rukovodstvom prof. dr J. Jones-a.

4.6 Serološke odlike

Detekcija prouzrokovaca bakterijske plamenjace leske izvršena je primenom direktne imunoenzimske metode na ploči (Double Antibody Sandwich-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, DAS-ELISA) i indirektne metode imunofluorescencije. U testovima su korišćene čiste kulture bakterija gajene 24 h na podlozi od hranljivog agara pri 27°C. Metode su izvedene prema uputstvu proizvođača (Loewe Biochemica GmbH, Nemačka).

4.6.1 DAS-ELISA test

Kulture bakterija suspendovane su i razređene u odgovarajućem puferu u odnosu 1:20 do koncentracije oko 1×10^8 cfu/ml. Za izvođenje testa korišćena su komercijalno dostupna poliklonalna antitela (IgG) specifična za detekciju Xac i sekundarna antitela konjugovana enzimom (IgG-AP-konjugat). Pre upotrebe napravljeno je radno razređenje antitela 1:200 u odgovarajućem puferu. Test je izveden na polistirenskim mikrotitarskim pločama sa svojstvom vezivanja proteina. U prvom koraku bunarčići su obloženi nanošenjem po 200 µl specifičnih antitela nakon čega su ploče postavljene u kutiju sa vlažnim papirom u termostatu na 37 °C tokom 4 časa. Sadržaj bunarčića ispražnjen je okretanjem mikrotitarske ploče na dole, a preostale kapi u potpunosti su odstranjene snažnim istresanjem ploče po upijajućem papiru na čvrstoj podlozi. Nakon toga, bunarčići su ispirani puferom za ispiranje 4 puta po 3 minuta radi uklanjanja nevezanih molekula. Na kraju svakog ciklusa ispiranja sadržaj ploče je u potpunosti ispražnjen na prethodno opisan način. Potom je dodato 200 µl suspenzije bakterija, u dva ponavljanja za svaki soj, kao i pozitivna i negativna kontrola. Nakon inkubacije preko noći pri 4°C, sadržaj iz bunarčića je odstranjen opisanim postupkom, a zatim je u svaki dodato po 200 µl antitela povezanih sa enzimom, nakon čega su ploče postavljene u inkubator pri 37°C u trajanju 4 časa. U poslednjem koraku, nakon ispiranja u bunarčiće je uneto po 200 µl sveže pripremljenog rastvora supstrata (p-nitrofenil-fosfat). Pojava i intenzitet enzimske reakcije očitani su nakon 1 i 2 sata inkubacije na tamnom mestu, pri sobnoj temperaturi merenjem apsorpcije pomoću spektrofotometra pri talasnoj dužini 405 nm. Izračunate su srednje vrednosti dva ponavljanja i dva

očitanja. Sve vrednosti, dva puta veće od onih u bunarčićima negativne kontrole, predstavljaju pozitivnu reakciju.

4.6.2 IF test

Za izvođenje testa korišćena je suspenzija bakterija u sterilnoj destilovanoj vodi koncentracije oko 10^6 cfu/ml, komercijalno dostupna specifična poliklonalna antitela i sekundarna antitela konjugovana fluorescentnom bojom (eng. fluorescein isothiocyanate anti-rabbit immunoglobulin conjugate, FITC) (Loewe Biochemica GmbH, Nemačka). Pre upotrebe, napravljena su radna razređenja specifičnog antiseruma (1:600) i konjugata (1:100) u PBS puferu. U svako polje na mikroskopskoj pločici za IF test naneto je 20 μ l bakterijske suspenzije. Nakon inkubacije i sušenja uzorka preko noći pri sobnoj temperaturi, izvršeno je fiksiranje bakterija prevlačenjem pločice u tri pokreta iznad plamenika. Na sva polja mikroskopske pločice, osim prvog, pomoću mikropipete naneto je po 20 μ l razređenja seruma. Prvo polje (br. 1) predstavlja negativnu kontrolu i na njega se ne nanosi antiserum. Pločice su pažljivo postavljene na vlažan filter papir i inkubirane 25 minuta (+/- 5 min) pri sobnoj temperaturi, u mračnoj komori kako bi se izbegla evaporacija i uticaj svetlosti na uzorak. Potom, pločice su ispirane 5 minuta u PBS Tween puferu, a zatim još 5 minuta sa svežim PBS puferom. Na svako polje prethodno prosušene pločice, uključujući i polje koje predstavlja negativnu kontrolu, a u cilju provere nespecifičnog vezivanja konjugata i bakterije, naneto je po 20 μ l konjugata, nakon čega je ponovljen prethodno opisan postupak inkubacije i ispiranja pločica. Na kraju je naneto po 5-10 μ l glicerizovanog pufera na polja pločice koja su, zatim, prekrivena dugim pokrovnim staklom. Prisustvo fluorescentno obojenih bakterijskih ćelija posmatrano je pomoću svetlosnog mikroskopa Olympus BX 51 (100x/1.25 imerzioni objektiv) sa specijalnim filterima za posmatranje obojenih objekata i izvorom svetla koji omogućava iluminaciju uzorka u opsegu talasnih dužina ultravioletne svetlosti (480 nm) i emisiju vidljivog spektra svetlosti zeleno-žute boje (560 nm). Posmatranje i slikanje uzoraka obavljeno je na Institutu za zaštitu bilja i životnu sredinu u Beogradu.

4.7 Proučavanje osetljivosti sojeva prema baktericidima

Osetljivost izolovanih sojeva prema baktericidima proučena je na podlozi sa saharozom i peptonom (SPA) (Lelliot i Stead, 1987) u koju su nakon sterilizacije i hlađenja do 48°C aseptično dodate odgovarajuće količine baktericida. Proučeno je dejstvo 25 i 50 ppm streptomycin-sulfata, 50 i 100 ppm kasugamicina, 100 i 200 ppm bakar-sulfata (CuSO_4) tj. komercijalnih formulacija bakar-hidroksida, $\text{Cu}(\text{OH})_2$ (Kocide 2000; Du Pont) i bakar-oksihlorida, $\text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}$ (Cuprozin 35-WP, Galenika Fitofarmacija).

Bakterije su zasejavane pipetiranjem 3 μl suspenzije koncentracije približno 10^7 cfu/ml na površinu podloge. Ogled je izveden u tri ponavljanja. Osetljivost sojeva ocenjena je posmatranjem porasta bakterija na podlozi 72 h nakon inkubacije pri 27°C. Soj *X. euvesicatoria* (E-3, KFB 062), rezistentan na pomenute koncentracije baktericida, korišćen je kao pozitivna kontrola, a zasejana podloga bez dodataka ovih jedinjenja kao negativna kontrola. Razvoj bakterija na podlozi ukazuje da je soj rezistentan na korišćenu koncentraciju baktericida, dok je, ukoliko nema razvoja, bakterija osetljiva. Pojava pojedinačnih kolonija ili razvoja u vidu granulirane konzistencije na mestu nanošenja suspenzije označena je kao slab razvoj.

4.8 Molekularne metode proučavanja patogena

4.8.1 Ekstrakcija DNK

Ukupna DNK proučavanih sojeva izolovana je iz čistih kultura bakterija, gajenih 24-48 h na HA podlozi, pri 27°C korišćenjem dve metode ekstrakcije: 1) prema proceduri Smith i sar., (1995) modifikovane od strane Scortichini i sar. (2002) i 2) korišćenjem komercijalnog kompleta za ekstrakciju DNK.

Prva metoda korišćena je za ekstrakciju DNK korišćene prilikom izvođenja standardne i dupleks PCR metode. Izvedena je na sledeći način: nekoliko pojedinačnih kolonija gajenih 24 h na podlozi od hranljivog agara zahvaćeno je petljom i suspendovano u sterilnom 0.85% (w/v) rastvoru NaCl u mikroepruветama zapremine 1.5 ml. Nakon centrifugiranja suspenzije na 10 000 g tokom 2 min. talog je resuspendovan u rastvoru

NaCl (0.85%) do optičke gustine koja odgovara koncentraciji oko 10^8 cfu/ml ($OD_{600}=0.3$). Suspenzije bakterija postavljene su u ključalu vodu u trajanju od 10 min., a zatim su brzo ohlađene na ledu tokom 20 min. Ekstrakti bakterijske DNK čuvani su pri temperaturi -20°C do upotrebe.

Za izvođenje rep-PCR metode i umnožavanje konstitutivnih gena korišćen je ekstrakt genomske DNK dobijen pomoću komercijalno dostupnog kompleta DNAasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Postupak ekstrakcije izveden je prema uputstvu proizvođača. Bakterijska kultura gajena je u HB preko noći. Pun zahvat petlje bakterija u *log* fazi porasta prenet je u mikroepruvete (1,5 ml) u koje je prethodno dodato 400 μl AP1 pufera i 3 μl RNase A (stock solution, 100mg/ml) i suspendovano intenzivnim mešanjem na vorteks mešalici. Smeša je inkubirana postavljanjem u vodeno kupatilo pri 65°C u trajanju od 10 minuta pri čemu je sadržaj povremeno izmešan (2-3x) manuelnim okretanjem mikroepruvete.

Zatim je u dobijeni lizat pipetirano 130 μl AP2 pufera, sadržaj je izmešan i inkubiran na ledu 5 minuta, nakon čega je izvedeno centrifugiranje 5 min. na 20 000 g (14000 rpm). U ovom koraku dolazi do taloženja deterdženta, proteina i polisaharida. Supernatant je zatim pipetiran u QIAamp Mini spin kolonu postavljenu u kolekcionoj mikroepruveti i centrifugiran 2 minuta na 20.000 g (14 000 rpm) u cilju uklanjanja istaloženih materija. Tečnost iz kolekcione tube prenet je u novu mikroepruvetu od 1.5 μl u koju je dodat AP3/E pufer u količini 1.5 u odnosu na zapreminu lizata nakon čega je sadržaj izmešan pomoću nastavka pipete. Zatim je 650 μl smeše pipetirano u DNase Mini spin kolonu postavljenu u kolekcionoj tubi od 2 ml, a potom centrifugirano 1 min na 6 000 g. Nakon što je tečnost iz kolektorske tubice odbačena, postupak je ponovljen sa ostatkom uzorka. Potom, u kolone je dodato 500 μl AW pufera, izvedeno je centrifugiranje 1 min na 6 000 g (8 000 rpm) i odbacivanje tečnosti iz kolektorske tubice. Zatim je pipetirano 500 μl AW pufera nakon čega je centrifugiranjem 2 min pri 20 000 g (14 000 rpm), izvršeno dodatno ispiranje ostataka etanola sa membrane kolone. DNase Mini spin kolone prebačene su u nove mikroepruvete od 1.5 μl radi prihvatanja DNK. Rastvaranje prečišćene DNK vezane za membranu kolone izvedeno je pipetiranjem 50-100 μl AE pufera direktno na membranu. Nakon inkubacije na sobnoj temperaturi 5 min, izdvajanje rastvorene DNK u mikroepruvetu postignuto je centrifugiranjem 1 min na 6 000 g (8 000 rpm).

Za postizanje optimalnih rezultata preporučuje se ponavljanje postupka elucije. Takođe, korišćenjem 50 µl pufera za rastvaranje postiže se veća koncentraciju DNK u rastvoru, ali se istovremeno smanjuje celokupan prinos dobijene DNK. Kvalitet i prinos ekstrahovane DNK utvrđeni su gel elektroforezom 1 µl uzorka DNK u 1% agaroznom gelu. Dobijeni ekstrakt čuvan je pri -20°C.

4.8.2 Detekcija proučavanih sojeva primenom metode lančanog umnožavanja fragmenta nukleinske kiseline – PCR

Specifičnost molekularnih metoda zasnovanih na PCR reakciji zavisi od specifičnosti prajmera primenjenih u analizi. U ovom radu identifikacija proučavanih sojeva izvršena je korišćenjem prajmera za umnožavanje dela sekvence 16S rRNK gena specifične za rod *Xanthomonas* (Maes i sar., 1993), kao i umnožavanjem *qumA* gena specifičnog za predstavnike vrste *X. arboricola* (Pothier i sar., 2011). Prajmeri dizajnirani za *X. arboricola* pv. *pruni* (XapY17-F/XapY17-R) korišćeni su za specifičnu detekciju i identifikaciju proučavanih sojeva, obzirom da je iz literature poznato da ispoljavaju visoku specifičnost prema *corylina* sojevima (Pothier i sar., 2011). Kombinacijom navedenih prajmera u dupleks PCR reakciji postignuta je veća pouzdanost testa putem istovremene detekcije dva ciljane gena (Pagani i sar., 2004; Pothier i sar., 2011; Pulawska i sar., 2010). Nazivi i oligonukleotidne sekvence prajmera i izvor literature sumirani su u Tabeli 4.

Detekcija i identifikacija proučavanih sojeva do nivoa roda izvršena je korišćenjem para prajmera X1/X2 (Tabela 4) i umnožavanjem fragmenta veličine 480 bp. Reakciona smeša za PCR sastojala se od: 2,5 µl 10 x PCR pufera (sadrži KCl, Tris-HCl i 15 mM MgCl₂; Fermentas, Litvanija), 0,5 µl 10 mM dNTPs, 1.25 µl prajmera X1 i X2, 0,3 µl 5U/µl enzima *Taq* polimeraze i 18,2 µl sterilne destilovane vode. U 24 µl pripremljene reakcione smeše dodato je 1 µl bakterijske DNK, tako da je ukupna zapremina PCR smeše iznosila 25 µl po uzorku. PCR reakcija se odvijala po sledećem programu: početna denaturacija pri temperaturi 93°C u trajanju 2 minuta koju sledi 29 ciklusa denaturacije pri 95°C u trajanju 45 sekundi, vezivanje prajmera pri 37°C za 60 sekundi i sinteza pri 62°C u trajanju 2 minuta. Finalna ekstenzija odvijala se pri 62°C tokom 10 minuta. PCR reakcije izvedene su u aparatu Thermal Cycler 2720 (Applied

Biosystems, SAD). Proizvodi PCR reakcije razdvojeni su elektroforezom u 1.5% agaroznom gelu i $0,5 \times$ Tris-acetat-EDTA (TAE) puferu, pri konstantnom naponu od 80 V, a zatim obojeni potapanjem gela u rastvor etidijum-bromida (0,01g/ml, w/v) u trajanju od 20 min. Fragmenti su posmatrani pod UV svetlom na transiluminatoru i fotografisani pomoću Doc Print sistema (Vilber Lourmat, Francuska).

Detekcija segmenta *ftsX* gena, odgovornog za sintezu transmembranskog proteina kod vrste *X. arboricola* pv. *pruni*, kod svih proučavanih sojeva poreklom sa leske izvršena je pomoću prajmera XapY17-F/XapY17-R (Tabela 4; Pagani i sar., 2004; Pothier i sar., 2011). PCR reakcija, finalne koncentracije 25 μ l izvedena je sa: 0,5 μ l 10mM dNTPs, 2,5 μ l svakog prajmera ponaosob, 2,5 μ l 10 $\times$ PCR pufera, 2 μ l 25mM $MgCl_2$, 0,24 μ l *Taq* polimeraze i 1 μ l uzorka DNA. Program se sastojao od početne denaturacije pri 95°C u trajanju 4 min, 30 ciklusa pri 92°C u trajanju 60 s, 53°C u trajanju 60 s i 72°C u trajanju 2 min, praćeno finalnom ekstenzijom pri 72°C tokom 5 minuta. Ekstrakti DNK sojeva KFB 0104 i KFB 0114 korišćene su kao pozitivna kontrola, dok je uzorak bez DNK predstavljao negativnu kontrolu. Proizvodi PCR analize analizirani su pomoću gel elektroforeze nakon bojenja sa etidijum bromidom na prethodno opisan način.

Dupleks PCR izveden je kombinovanjem navedena dva para prajmera u jednoj reakciji, čime se omogućava istovremena detekcija *qum A* i *ftsX* gena. Reakciona smeša konačne zapremine 20 μ l sadržala je: 2 μ l 10 $\times$ *Taq* pufera (sadrži KCl, Tris-HCl i 15 mM $MgCl_2$); 0,4 μ l $MgCl_2$ (25mM), 0,4 μ l dNTPs (0,2 mM); 1 μ l prajmera (10 μ M); 1,2 U *Taq* DNK polimeraze; 4% (v/v) DMSO i 10,2 μ l vode (nuclease free water, Fermentas, Litvanija) i 1 μ l DNK ekstrakta. Program reakcije odvijao se na sledeći način: početna denaturacija pri temperaturi 95°C u trajanju 15 minuta, koju sledi 30 ciklusa denaturacije pri 95°C u trajanju 30 sekundi, vezivanje prajmera pri 55°C tokom 30 sekundi i sinteza pri 72°C u trajanju 60 sekundi. Finalna ekstenzija odvijala se pri 72°C tokom 7 minuta. Produkti PCR-a razdvojeni su procesom elektroforeze i posmatrani na prethodno opisan način.

Tabela 4 . PCR metode i prajmeri korišćeni u detekciji i genotipizaciji proučavanih sojeva

PCR metoda	Naziv i sekvenca prajmera (5'-3')	Veličina fragmenta	Literatura
<i>Xanthomonas</i> spp.	X1: AAGGATCGGGTATT'AAAC X2: AGAGTTTGATCITGGCTCAG	480 bp	Maes i sar., 1993
<i>X. arboricola</i>	XarbQ-F: GCGAGATCAATGCGACCTCGTC XarbQ-R: GGTGACCACATCGAACCGCGCA	402 bp	Pothier i sar., 2011
<i>X. a. pv. pruni</i>	XapY17-F: CGTGGTGATCAGCGAGTCATTC XapY17-R: GACGTGGTGATGATGATCTGC	943 bp	Pothier i sar., 2011
16S r DNK	fD1: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG rP2: ACGGCTACCTTGTACGACTT	~1450 bp	Weisburg i sar., 1991
<i>rpoD</i>	rpoD1F: ATGGCCAACGAACGTCCTGC rpoD1R: AACTTGTAACCGCGACGGTATTCG	1310 bp	Hajri i sar., 2009
Rep PCR	BoxA1R:CTACGGCAAGGCGACGCTGACG Rep1R-1: III ICG ICG ICA TCI GGC Rep2-1: ICG ICTTATCIGGCCTAC Eric1R: ATGTAAGCTCCTGGGGATTACAC Eric2: AAGTAAGTGAAGTGGGGTGAGCG	Fragmenti različite veličine	Versalovic i sar., 1991;1994.

4.8.3 Sekvenciona analiza 16S rRNK gena

Za sekvencionu analizu 16S rRNK gena proizvoljno je odabran soj KFB 275. Parcijalna sekvenca ribozomalnog gena dužine oko 1500 bp umnožena je korišćenjem univerzalnih prajmera fD1/rP2 (Weisburg i sar., 1991; Tabela 4). Reakciona smeša konačne zapremine 50 µl sadržala je: 1× *Taq* pufer sa KCl i 15 mM MgCl₂ (Fermentas, Litvanija), 0,3 mM dNTPs, 0,16 µM prajmera, 1,1 U DreamTaq DNK polimeraze (Fermentas, Litvanija) i 3 µl uzorka DNK. Reakcija se odvijala prema sledećem programu: početna denaturacija pri temperaturi 95°C 5 min; 35 ciklusa denaturacije pri 94°C u trajanju 1 min, vezivanja prajmera pri 55°C u trajanju 1 min i ekstenzije pri 72°C u trajanju 1,5 min; poslednji ciklus ekstenzija 5 minuta pri 72°C. Kvantifikacija i kvalitet PCR proizvoda koji je poslat na sekvenciranje određeni su pomoću gel

elektroforeze, posmatranjem intenziteta dobijene trake u gelu i poređenjem sa markerom MassRuler DNA Ladder Mix (Fermentas, Litvanija).

Dobijeni hromatogrami vizuelizovani su korišćenjem softvera Finch TV 1.4.0 (Geospiza, Inc., Seattle, WA, USA; <http://www.geospiza.com>). Sekvence ("forward" i "reverse") su obrađene korišćenjem softverskog paketa MEGA 5.1 (Tamura i sar., 2011), nakon čega je određena konsenzus nukleotidna sekvenca ukupne dužine 1364 bp. U cilju identifikacije sojeva (Hauben i sar., 1997) dobijena sekvenca upoređena je sa sekvencama dostupnim u NCBI bazi podataka pomoću "BLASTN" programa (Basic Local Alignment Search Tool; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Poravnanje sekvenci gena za 16S rRNK kod srodnih *Xanthomonas* sojeva iz baze i soja KFB 275 izvršeno je korišćenjem CLUSTAL W algoritma, a dalja analiza pomoću softvera MEGA 5.1. Filogenetska analiza izvedena je primenom "neighbor-joining" (NJ) metode (Saitou i Nei, 1987), sa genetičkom udaljenošću između sekvenci izračunatoj prema Kimura-2 modelu (Kimura, 1980). Statistička značajnost testirana je "bootstrap" analizom sa 1000 ponavljanja. Filogenetsko stablo ukorenjeno je korišćenjem sekvence 16S rRNK gena tipskog soja vrste *Stenotrophomonas maltophilia* (LMG 958).

4.8.4 Proučavanje genetičkog diverziteta

Molekularna karakterizacija i genetički diverzitet Xac sojeva proučeni su primenom rep-PCR metode pomoću BOX, ERIC i REP prajmera i makrorestrikcione PFGE analize molekula DNK korišćenjem restrikcionog enzima *SpeI*. Specifične nukleotidne sekvence za dizajniranje specifičnih PCR prajmera identifikovane su putem ERIC-PCR metode, a potom iskorišćene za razvoj standardne PCR protokola.

4.8.4.1 REP-PCR analiza

Rep-PCR analiza izvedena je prema protokolu Shaad i sar. (2001). Umetnute ponavljajuće sekvence kod proučavanih sojeva umnožene su izvođenjem tri PCR reakcije: BOX PCR, korišćenjem BOXA1R prajmera, ERIC PCR, sa prajmerima ERIC1R i ERIC2 i REP PCR pomoću para prajmera Rep1R-1 i Rep2-1 (Tabela 4). Umnožavanje fragmenata DNK vršeno je u 25 µl reakcione smeše koja je sadržala: 12,5

μl 2xPCR master mix-a, 4μg BSA, 10% DMSO, 3,75 μl svakog prajmera ponaosob i 1,3 μl vode za REP i ERIC PCR i 5.05 μl za BOX PCR. Po 24 μl master miksa, pripremljenog na ledu u sterilnoj mikroepruveti raspoređeno je u PCR tubice u koje je dodato 1μl uzorka. Kao pozitivna kontrola korišćen je referentni soj *X. a. pv. corylina* (KFB 0114), a kao negativna kontrola sterilna destilovana voda. U cilju provere ponovljivosti metode, rep-PCR analiza reprezentativnih sojeva izvedena je u tri ponavljanja. Program i uslovi PCR reakcije navedeni su u tabeli 4.

Tabela 5. Program Rep-PCR analiza korišćenjem tri vrste prajmera

Rep-PCR	BOX-PCR	ERIC-PCR	REP-PCR	
Korak reakcije	Temperatura-vreme	Temperatura-vreme	Temperatura-vreme	Broj ciklusa
početna denaturacija	95°C - 2 min	95°C - 2 min	95°C - 2 min	1 ciklus
denaturacija	94°C - 3 s	94°C - 3 s	94°C - 3 s	
denaturacija	92°C - 30 s	92°C - 30 s	92°C - 30 s	35 ciklusa
vezivanje prajmera	50°C - 60 s	50°C - 60 s	40°C - 60 s	
sinteza	65°C - 8 min	65°C - 8 min	65°C - 8 min	
finalna ekstenzija	65°C - 8 min	65°C - 8 min	65°C - 8 min	1 ciklus

Analiza 5 μl PCR proizvoda obavljena je nakon razdvajanja u 1.5% agaroznom gelu i 0.5×TAE puferu (Tris, EDTA, pH 8.0) korišćenjem horizontalne elektroforeze (10×10 cm) pri konstantnom naponu od 80 V pri 4 °C tokom 3 h. Fragmenti su obojeni potapanjem gela u rastvor etidijum-bromida (1 μg/ml) u trajanju 20 min., posmatrani pod UV svetlom na transiluminatoru i fotografisani pomoću Doc Print sistema za dokumentaciju (Vilber Lourmat, Francuska).

Rezultati rep-PCR analize standardizovani su pretvaranjem dobijenih profila u binarni zapis sa vrednostima (0) i (1). Sa vrednošću (1) označeno je prisustvo, a sa (0) odsustvo umnoženog fragmenta odgovarajuće veličine. Za fragmente iste dužine smatrano je da su identični. Potom je statistička obrada podataka izvršena multivarijacionom tehnikom klaster analize u programu FreeTree (Hampl i sar., 2001). Matrica bliskosti konstruisana je korišćenjem koeficijenta sličnosti Nei i Lija (1979) zasnovanog na proporciji zajedničkih DNK fragmenata. Za povezivanje sojeva u grupe korišćena je metoda prosečnog povezivanja između grupa (eng. unweighted pair-group method using arithmetic averages, UPGMA). Statistička značajnost testirana je sa 1000

“bootstrap” ponavljanja. Dendrogram je konstruisan pomoću programa Tree View (Page, 1996).

4.8.4.2 Makrorestrikciona analiza i elektroforeza u pulsirajućem električnom polju - PFGE

Iz svake genetičke grupe utvrđene rep-PCR analizom odabrana su po dva soja koja su analizirana primenom makrorestrikcione PFGE analize. Metoda pripreme uzorka za PFGE i razdvajanje velikih restrikcionih fragmenata u pulsirajućem električnom polju izvedena je prema proceduri Kojića i sar. (2005).

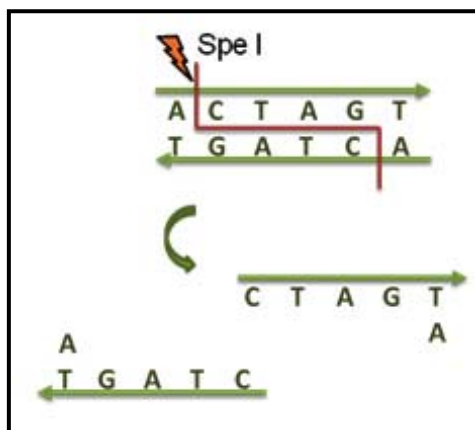
4.8.4.2.1 In situ izolacija DNK bakterija

S obzirom da je molekul DNK veoma osetljiv na oštećenja, ekstrakcija celokupne neoštećene DNK i restrikciona analiza obavljaju se *in situ* u protektivnom agaroznom matriksu. Za ekstrakciju DNK korišćene su kulture bakterija u *log* fazi porasta ($OD_{600}=0,3-0,4$) gajene u tečnoj podlozi od hranljivog bujona (HB) pri 27°C. Čelije su prečišćene centrifugiranjem pri 4 500 rpm u trajanju 5 minuta i resuspendovanjem istaloženih ćelija u 1 ml EET pufera (100 mM EDTA, 10 mM EGTA, 10 mM Tris-HCl, pH 8,0). Nakon centrifugiranja pri 13 000 g, 1 min, supernatant je odbačen, a bakterije su resuspendovane u 50 µl EET pufera. Rastvor ćelija zagrevan je u vodenom kupatilu pri 42°C, u trajanju 5-10 minuta, nakon čega je rastvoru dodat ista zapremina (50 µl) 2% agaroze (InCert, FMC Corp., USA) koja je prethodno otopljena i ohlađena na 42°C. Za PFGE analizu koristi se agaroz visokog stepena čistoće i niske temperature topljenja ($\leq 65^{\circ}\text{C}$), koja omogućava odvijanje enzimatske reakcije. Dobijena smeša je pipetiranjem razlivena u kalupe dimenzija 4×10×2 mm koji su postavljeni u frižider pri 4°C radi polimerizacije agaroze. Nakon 20 min agarozni blokovi tretirani su rastvorom za liziranje ćelija tako što su istisnuti iz kalupa u prethodno obeležene falkon tube u koje je dodato po 500 µl rastvora za liziranje ćelija (EET sa 0.5% SDS i 1 mg/ml proteinaze K) tokom 24 h u vodenom kupatilu pri 50°C. Lizis bakterijske ćelije i uklanjanje ćelijskih komponenata (proteina, masti i dr.) može se vizuelno detektovati gubitkom bele boje agaroznog bloka koji

postaje proziran. Inaktivacija proteinaze K, prečišćavanje DNK (uklanjanje proteina i drugih materija vezanih za DNK) obavljena je tretiranjem blokčića sa 10 ml 0,5 mM rastvora PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride) 2×30 min pri čemu su falkon tube postavljene na rotacionu mešalicu. Potom su blokovi isprani još dva puta u sterilnoj vodi u trajanju 30 minuta. Agarozni blokovi sa prečišćenom DNK korišćeni su za dalju analizu ili su do upotrebe čuvani u TE puferu ili vodi pri +4°C.

4.8.4.2.2 Restrikciona analiza prečišćene genomske DNK u agaroznim blokovima

Restrikcioni enzimi su specifične endonukleaze bakterija, koje seku DNK molekul na manje ili veće fragmente. Poznato je više stotina restrikcioni enzima koji prepoznaju različita restrikciona mesta tj. kratke sekvence od 4-8 nukleotida na lancu DNK na kojima vrše raskidanje nukleotidnih veza. U zavisnosti od učestalosti javljanja restrikcionog mesta duž ciljane DNK, enzim može presecati DNK više puta ili nijednom. U PFGE analizi koriste se enzimi koji prepoznaju relativno mali broj mesta, pa se nakon presecanja dobija 15-20 fragmenata pogodnih za dalju analizu. U cilju digestije DNK proučavanih sojeva, agarozni blokovi su isečeni pomoću pokrovnog stakla na četiri jednaka dela radi veće dostupnosti materijala i ponovljivosti elektroforeze. Delovi blokova postavljeni su u mikroepruvete i preinkubirani (ekvilibrisani) sa 300 µl 1× pufera 30 min pri sobnoj temperaturi. Na ovaj način odstranjena je EDTA koja može inhibirati delovanje enzima. Nakon odlivanja pufera u mikroepruvete je dodato 100 µl prethodno pripremljenog rastvora pufera i restrikcionog enzima *SpeI* (20U/uzorku) i postavljeno na inkubaciju tokom 3 h pri 37°C. Enzimska reakcija prekinuta je odlivanjem pufera za digestiju i dodavanjem 100 µl po blokčiću „stop PFGE“ pufera (40% m/v saharoza, 100 mM EDTA i 0.002% (m/v) bromfenol plavo, pH 8,0). Uzorci DNK čuvani su pri 4°C do izvođenja PFGE analize.



Slika 5. Šematski prikaz restrikcionog mesta na molekulu DNK za enzim *SpeI*

4.8.4.2.3 Elektroforeza u pulsirajućem električnom polju

Nakon restrikcione analize uzorci DNK u vidu agaroznog bloka postavljeni su u bunarčiće gela pomoću špatule nakon čega su bunarčići zaliveni rastopljenom agarozom kako bi bili istisnuti mehurići vazduha. DNK fragmenti razdvojeni su u 1,2 % agaroznom gelu (m/v) u 0,5 TBE puferu (45 mM Tris base, 45 mM borna kiselina i 1 mM EDTA, pH 8,0). Elektroforeza je izvršena pomoću specijalne aparature sa sistemom za održavanje konstantne temperature i kontrolisanu promenu električnog polja korišćenjem CHEF (Contour-clamped Homogeneous Electric Field) tehnike koja šalje električne impulse pod uglom od 120°, u pravilnim vremenskim intervalima. Korišćena je elektroforetska jedinica 2015 Pulsator unit (LKB Instruments, Broma, Švedska) sa heksagonalnim položajem elektroda u trajanju od 18 h pri naponu od 300 V i temperaturi 9°C. Period električnog impulsa podešen je ručno i regulisan pomoću jedinice za kontrolu impulsa. Trajanje električnog impulsa stepenasto se povećavao od 8 do 19 s tokom elektroforeze. Kao molekularni marker korišćena je DNK Lambda faga dobijena prema proceduri Waterbury i Lane (1987). Fragmenti DNK obojeni su rastvorom etidijum-bromida i posmatrani pod UV svetlom na transiluminatoru. Broj, veličina i raspored DNK fragmenata u agaroznom gelu određeni su manuelno posmatranjem dokumentovanih fotografija gela. Na osnovu vizuelnog beleženja prisustva (1) i odsustva (0) fragmenata u gelu konstruisan je dendrogram proučavanih

sojeva u programu Free Tree, korišćenjem UPGMA metode (Hampl i sar., 2001). Dendrogrami su vizuelizovani u kompjuterskom programu Tree View (Page, 1996). Restrikciona analiza i elektroforeza u pulsirajućem električnom polju obavljena je u Laboratoriji za molekularnu genetiku industrijskih organizama pod rukovodstvom dr Milana Kojića, na Institutu za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo u Beogradu.

4.8.5. Dizajn prajmera

Jedan od ciljeva ove disertacije bio je detekcija specifičnih i jedinstvenih DNK sekvenci i razvoj PCR protokola za detekciju *Xanthomonas* patogena. Odabir specifičnih prajmera izveden je na osnovu polimorfnihi sekvenci utvrđenih pomoću ERIC-PCR analize, obzirom da PFGE metodom nisu detektovani zajednički fragmenti kod svih proučavanihi sojeva. Potom je upoređivano prisustvo dobijenih linearnih fragmenata kod proučavanihi sojeva u odnosu na fragmente umnožene kod drugih referentnih *Xanthomonas* sojeva uključenih u analizu. Za dalju analizu odabrana su dva DNK fragmenta različite veličine od kojih je jedan bio prisutan samo kod *corylina* sojeva, dok je drugi umnožen i kod referentnih sojeva *X. a. pv. pruni* i *p. juglandis*. Kriterijumi za izbor sekvence bili su: odsustvo sekundarnih bendova i pozitivno umnožavanje sa svim analiziranim Xac sojevima. U cilju sekvenciranja odabranihi nukleotidnih sekvenci primenjen je sledeći postupak: 1) izolacija i prečišćavanje željenih PCR produkata, 2) ugradnja izolovanog fragmenta u vektor i kloniranje, 3) unošenje hibridnog konstrukta u bakterijsku ćeliju-transformacija, 4) dobijanje klonova-transformisanihi ćelija i selekcija ćelija koje sadrže fragment DNK i 5) izolacija ugrađenog DNK fragmenta.

4.8.5.1 Ekstrakcija i prečišćavanje DNK fragmenata iz agaroznog gela i ugradnja u vektor

Ekstrakcija i prečišćavanje fragmenata umnoženih ERIC-PCR metodom obavljena je tako što je nakon elektroforeze isečen deo agaroznog gela u okviru koga se nalazio fragment DNK željene dužine, i prenet u mikroepruvete. Za ekstrakciju

fragmenata iz gela korišćen je komercijalni komplet QIAquick Gel extraction kit/250 po protokolu za „MiniElute Gel Extraction“ (QIAGEN GmbH, Hilden, Nemačka).

Dobijeni PCR fragmenti klonirani su u pPCR-ScriptAmpSK(+) vektor (Agilent Technologies, SAD). Ligacija DNK skevenci (Maniatis i sar., 1982) izvedena je mešanjem DNK fragmenta i vektora sa komplementarnim lepljivim krajevima u ligacionom puferu (50 mM Tris-HCl, pH7,5, 10 mM MgCl₂, 10 mM dithiothreitol, 1 mM ATP) sa 1 U T4 DNK ligaze (Agilent Technologies, SAD) u odgovarajućem odnosu u finalnoj zapremini od 20 µl i inkubiranjem 16 h pri 16°C.

4.8.5.2 Transformacija *E. coli* kompetentnih ćelija toplotnim šokom ("Heat shock")

Kompetentne ćelije *E. coli* prethodno pripremljene po modifikovanoj metodi sa rubidijum hloridom (Hanahan, 1985) i čuvane pri -20°C, otapane su na ledu, nakon čega je u mikroepruvete sa 200 µl suspenzije ćelija dodat uzorak nakon ligacije (ligaciona smeša) u zapremini do 20 µl. Suspenzija je inkubirana na ledu 60 min uz povremeno mešanje. Nakon inkubacije ćelije su izlagane temperaturnom šoku (42°C) u trajanju od 90 s, a zatim su inkubirane još 5 min na ledu. Posle tretmana, u ćelijske suspenzije dodato je 300 µl LB tečne podloge za regeneraciju, nakon čega je smeša inkubirana 60 min pri 37°C uz aeraciju. Zatim je zasejano po 50, 100 i 150 µl regenerisane transformacione smeše pomoću štapića na odgovarajuće čvrste selektivne LB podloge u Petri šoljama koje su inkubirane pri 37°C do pojave transformanata (prosečno nakon 24 sata inkubacije). Nakon selekcije na čvrstoj LB podlozi sa dodatkom ampicilina (100 µg/ml), odabrane su pojedinačne kolonije koje su zasejane u tečnu podlogu i inkubirane pri 37°C uz aeraciju.

4.8.5.3 Izolacija plazmida iz *E. coli* i restrikciona analiza plazmidne DNK

Za izolaciju plazmida iz transformisanih ćelija *E. coli* korišćena je modifikacija "JETstar" protokola. Zasejane kulture u log fazi porasta prenete su u mikroepruvete i istaložene centrifugiranjem. Nakon uklanjanja supernatanta talog ćelija je opran u TEN puferu i resuspendovan u 200 µl E1 rastvora (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA

pH 8,0) sa RNazom (finalne koncentracije 100 µg/ml) i lizozimom u finalnoj koncentraciji od 4 mg/ml. Odmah nakon dodavanja E1 ćelije su lizirane dodavanjem 200 µl rastvora E2 (200 mM NaOH, 1% SDS), uz lagano mešanje do homogenizacije lizata, u trajanju 2 do 5 min. Nakon homogenizacije izvedena je neutralizacija dodavanjem 200 µl rastvora E3 (3,1 M K-acetat pH 5,5) uz intenzivno mešanje. Smeša je zatim centrifugirana na 13 000 rpm, 10 min, nakon čega je 600 µl supernatanta pipetirano u nove mikrotepruvete sa 200 µl smeše fenol-hloroforma uz intenzivno mešanje u trajanju od 1 min. Posle centrifugiranja na 13 000 rpm tokom 2 min, gornja faza je prebacivana u nove mikrotepruvete, a DNK je iz rastvora precipitirana dodavanjem jedne zapremine izopropanola i centrifugiranjem 20 min na 13 000 rpm. Nakon odlivanja supernatanta, uzorak je ispiran sa 500 µl hladnog etanola (75%, -20°C) i centrifugiran na 13 000 rpm, 5 min. Nakon odstranjivanja etanola talog je sušen u Speed Vac-u 5-10 min i resuspendovan u 20 µl bidestilovane H₂O. RNK je odstranjivana inkubacijom uzorka sa 1 µl RNaze (10 mg/ml) na 37°C u trajanju 30 min. Plazmidna DNK analizirana je na 1% agaroznom gelu nakon čega su odabrani uzorci za restrikcionu analizu. Sečenje je izvedeno sa restrikcionim enzimima *Pst*I/*Not*I (Maniatis i sar., 1982) u 10×Orange puferu. Uslovi restrikcione analize, količina enzima, pufer i temperatura inkubacije, određivani su prema uputstvu proizvođača (Fermentas, Litvanija).

4.8.5.4 Umnožavanje i sekvenciranje kloniranog DNK fragmenata

Za umnožavanje DNK fragmenta PCR metodom korišćeni su prajmeri M3F/M3R koji se vezuju uz klonirani region u pGEM-T easy vektoru. Pripremljena reakciona smeša sadržala je: 1 × reakcioni KAPA *Taq* Buffer pufer sa 1,5 mM MgCl₂, u koji je dodata dNTP smeša (svaki dNTP po 200 µM), prajmeri (svaki po 2,5 µM) i 1U KAPA *Taq* DNA polimeraze (Kapa Biosystems, Inc., Boston, MA, SAD). Količina DNK matrice iznosila je 1 ng (2µl). Nakon umnožavanja, PCR proizvodi prečišćeni su propuštanjem kroz kolone primenom kompleta „QIAquick PCR Purification KIT/250“ (QIAGEN GmbH, Hilden, Nemačka) i poslati na sekvenciranje u servis za sekvenciranje Macrogen (Amsterdam, Holandija). Dobijene sekvence upoređivane su uz pomoć NCBI baze podataka, "BLAST" programom za pretraživanje homologe

nukleotidne sekvence (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Dobijene sekvence poravnate su sa dostupnim sekvencama iz baze podataka korišćenjem CLUSTAL W algoritma. Razlike u nukleotidima među sekvencama utvrđene su vizuelno, nakon čega su odgovarajući regioni odabrani za dizajn prajmera. Specifičnost prajmera proverena je testiranjem kolekcije reprezentativnih *corylina* sojeva različitih po poreklu i genetičkim odlikama. Kolekcija srodnih *Xanthomonas* vrsta i patogenih varijeteta takođe je uključena u test specifičnosti (Tabela 3).

4.8.6 Analiza *rpoD* gena

U ovom radu, filogenetska pozicija sojeva unutar vrste *X. arboricola* proučena je sekvencionom analizom *rpoD* gena koji je ranije korišćen u proučavanju *Xanthomonas* vrsta (Young i sar., 2008; Hajri i sar., 2009). Mogućnost identifikacije proučavanih sojeva na osnovu ovog gena izvršena je poređenjem dobijenih sekvenci sa poznatim sekvencama dostupnim u NCBI bazi, korišćenjem BLAST programa.

Parcijalne sekvence gena analizirane su kod 17 reprezentativnih Xac sojeva poreklom iz Srbije koji su pripadali različitim rep-PCR i PFGE grupama. U analizu su uključena i 4 referentna Xac soja poreklom iz Nemačke, Francuske, Italije i Velike Britanije (Tabela 3). DNK fragmenti umnoženi su primenom PCR metode, korišćenjem prajmera koje su dizajnirali Hajri i sar. (2009) (Tabela 4) na osnovu *rpoD* sekvence soja *X. campestris* pv. *campestris* CFBP 5241 (GenBank pristupni broj: NP639081). PCR reakcija izvedena je u reakcionoj smeši konačne zapremine 50 µl koja je sadržala: 1× Taq pufer sa KCl i 15 mM MgCl₂ (Fermentas, Litvanija), 0,2 mM dNTPs, 0,5 µM prajmera *rpoD1F/rpoD1R*, 0,4 % DMSO, 1,5 U DreamTaq DNK polimeraze (Fermentas, Litvanija) i 2 µl uzorka DNK. Reakcija se odvijala prema sledećem programu: početna denaturacija pri temperaturi 95°C u trajanju 3 min; 35 ciklusa denaturacije pri 94°C u trajanju 45 s, vezivanja prajmera pri 67°C u trajanju 45 s i ekstenzije pri 72°C u trajanju 45 s. Završna ekstenzija odvijala se pri 72°C u trajanju 10 minuta. Prisustvo umnoženih PCR proizvoda detektovano je pomoću gel elektroforeze.

Ciljani fragmeti izdvojeni su iz gela i prečišćeni korišćenjem QIAquick kompleta (Quiagen, Nemačka), nakon čega su poslani na uslužno sekvenciranje (Macrogen Europe, Amsterdam, Holandija). Fragmenti su sekvencirani istim

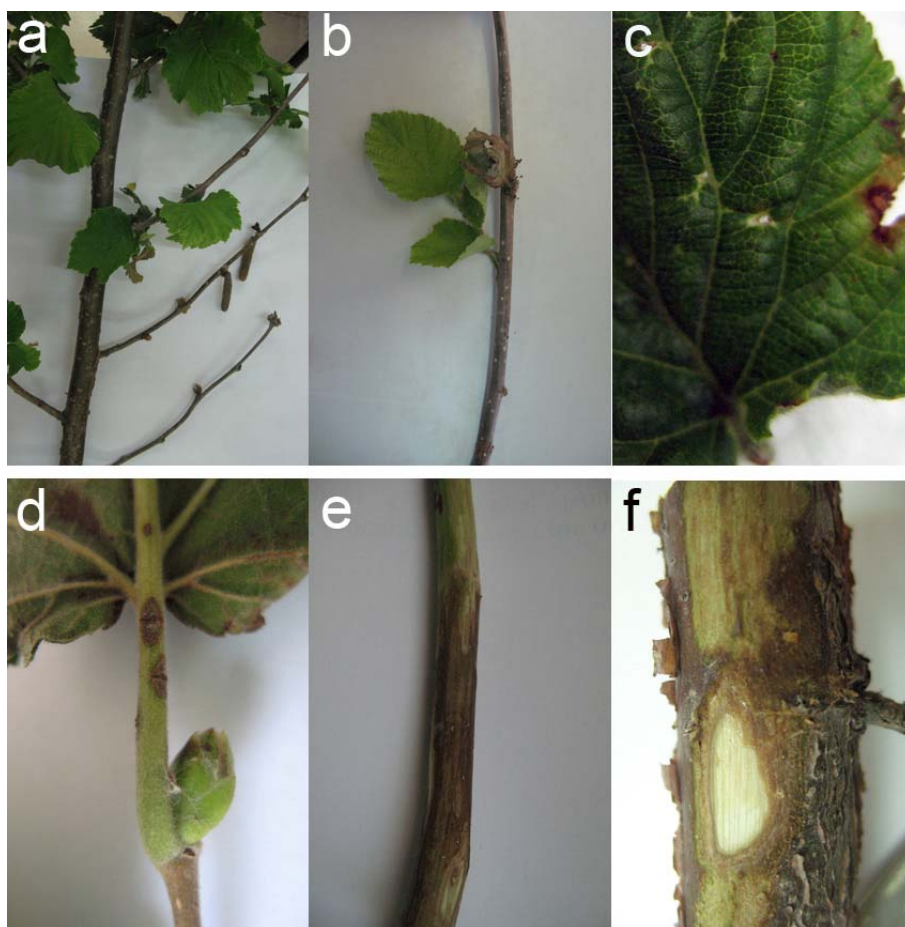
prajmerima koji su korišćeni za umnožavanje. Vizuelizacija hromatograma, obrada i određivanje konsenzus sekvenci izvršeni su korišćenjem istih programa kao i u slučaju analize 16S rRNK regiona. Konsenzus sekvence dostavljene su banci gena, nakon čega im je dodeljen pristupni broj.

Genske sekvence proučavanih sojeva korišćene su za filogenetsku analizu i poređenje sa sekvencama *X. arboricola* patovara *corylina*, *pruni*, *juglandis*, *celebensis*, *poinsettiicola*, *fragariae* i *populi*, koje su preuzete iz NCBI banke gena. Filogenetska analiza izvedena je primenom “neighbor-joining” (NJ) metode (Saitou i Nei, 1987), sa evolucionom udaljenošću između nukleotidnih sekvenci izračunatoj prema Kimura-2 modelu (Kimura, 1980). Statistička značajnost testirana je “bootstrap” analizom sa 1000 ponavljanja. Filogenetsko stablo ukorenjeno je korišćenjem sekvence *rpoD* gena vrste *Xanthomonas populi* (CFBP 6294).

5. REZULTATI

5.1 Simptomi bolesti i izolacija patogena

Iz uzoraka obolelih biljaka leske prikupljenih tokom 2008-2011. godine, standardnim postupkom izolacije bakterija na hranljivu podlogu, izolovan je veći broj sojeva bakterija, od kojih je 39 odabrano za dalji rad. Prisustvo okruglih, sjajnih i ispupčenih kolonija žute boje karakterističnih za rod *Xanthomonas*, utvrđeno je u različitim biljnim organima, pri čemu je uspešnost izolacije zavisila od vrste prikupljenih uzoraka, tipa simptoma i faze razvoja bolesti. Najveći procenat uspešne izolacije postignut je iz listova sa simptomima pegavosti (oko 70%), dok su ostali sojevi izolovani iz lisne peteljke, uvelih pupoljaka, nekrotiranog tkiva kore grana (Slika 6). Sveži uzorci biljnog tkiva u fazi intenzivnog porasta i u ranoj fazi razvoja bolesti, bili su najpogodniji za izolaciju patogena.



Slika 6. *X. a. pv. corylina*: Biljni materijal korišćen za izolaciju: a) i b) uveli pupoljci na mladim jednogodišnjim izbojcima; c) i d) nekrotične pege na listovima i lisnoj dršci; e) i f) nekrotično tkivo sekundarnog kambijuma grane (prirodna infekcija).

5.2 Bakteriološke karakteristike sojeva

Preliminarna identifikacija, kao i odabir izolovanih sojeva za dalja proučavanja, izvršeni su na osnovu izgleda kolonija na hranljivim HA i GYCA podlogama, hipersenzitivnosti biljaka duvana, paradajza, kao i nekoliko preliminarnih bakterioloških testova (Tabela 6).

Tabela 6. Rezultati preliminarnih testova za identifikaciju proučavanih sojeva

Bakteriološki test	Proučavani sojevi (n=46)	Kontrolni soj KFB 0114	Literatura:
Razvoj na NA, GYCA (YNA, YDC, YPGA)			Schaad i sar., 2001 Lelliott i Stead, 1987
Reakcija po Gramu	-	-	Schaad i sar., 2001
Aktivnost oksidaze	-	-	
Rast na GYCA podlozi	+	+	Anonymous, 2004
Metabolizam glukoze	(O)	(O)	Lelliot i Stead, 1987
Hipersenzitivna reakcija			
Duvan	V	V	
Paradajz	+	+	Lelliott i Stead, 1987
Mahune boranije	+	+	

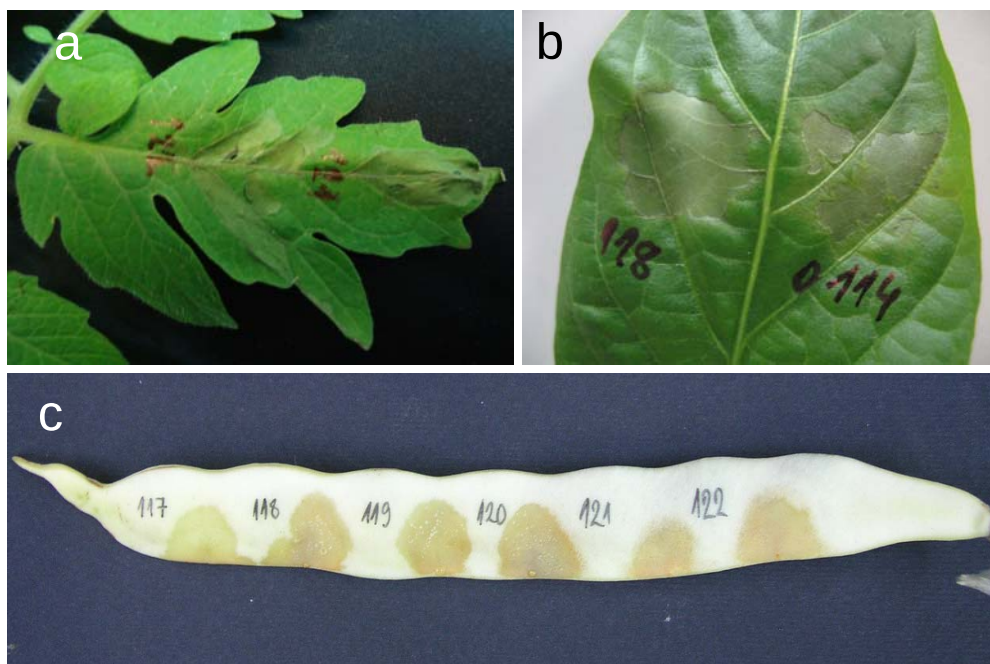
Legenda: n, broj sojeva; +, pozitivna reakcija; - , negativna reakcija, (O), slabo oksidativni metabolizam ; V- varijabilna reakcija

5.2.1 Patogene odlike proučavanih sojeva

5.2.1.1 Hipersenzitivna reakcija

Pojava tipične nekroze i izumiranja tkiva na biljkama duvana, zabeleženi su nakon 24-48h od inokulacije. Međutim, uočena je različita reakcija u vidu pojave žutila i hloroze na mestu infiltracije bakterijske suspenzije, koja je varirala među različitim

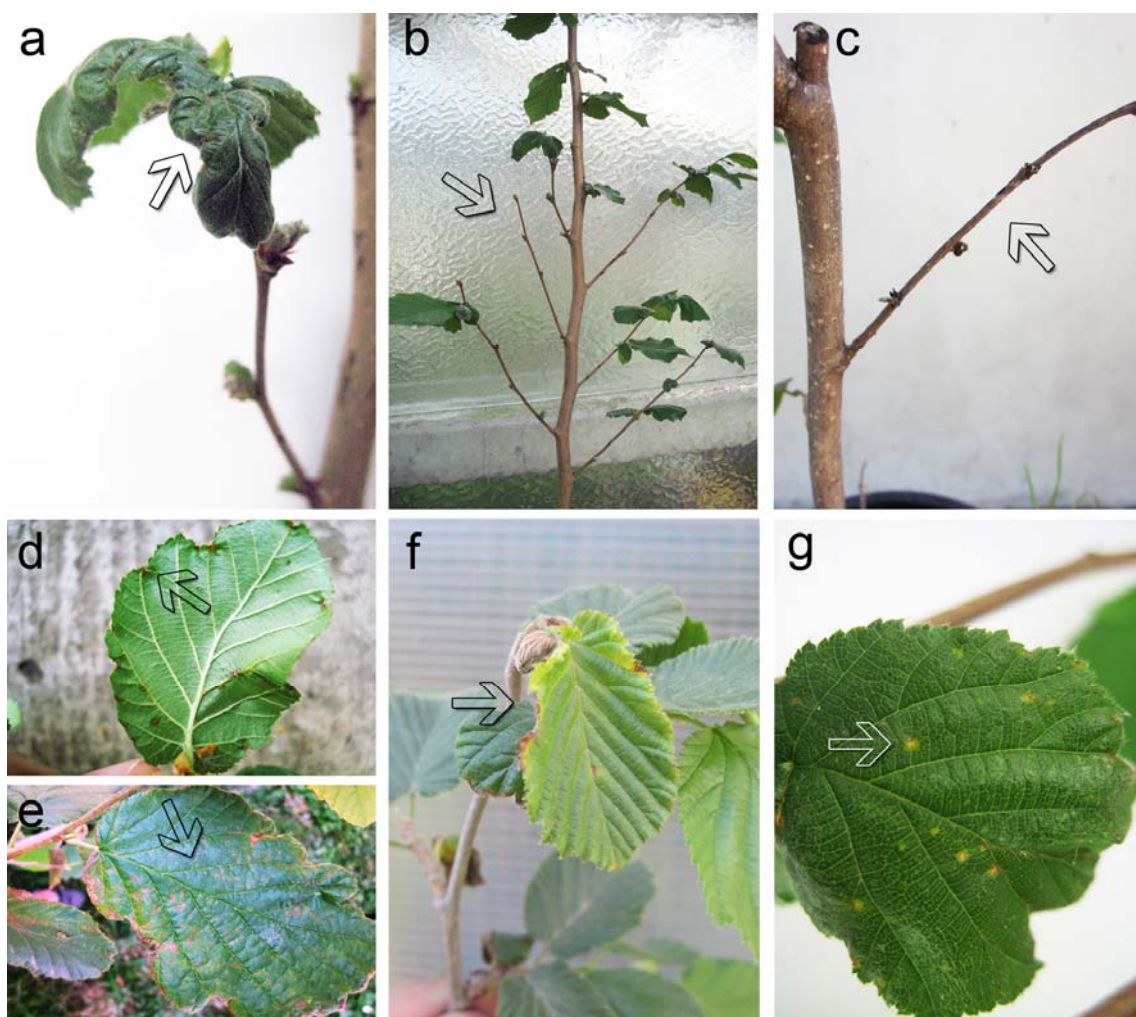
ponavljanjima. Korišćenjem mladih biljaka paradajza, svi proučavani sojevi prouzrokovali su pozitivnu hipersenzitivnu reakciju 24 časa nakon inokulacije. Na mladim inokulisanim mahunama boranije, u zoni inokulisanog tkiva, nakon 3-5 dana, pojavile su se tamno braon nekrotične pege kao znak pojave HR (Slika 7).



Slika 7. *X. a. pv. corylina*: Provera patogenosti na a) paradajzu, b) duvanu i c) mahunama boranije. Nekrotična zona na mestu infiltracije suspenzije bakterija uočena nakon 24-48 h predstavlja znak pozitivne reakcije.

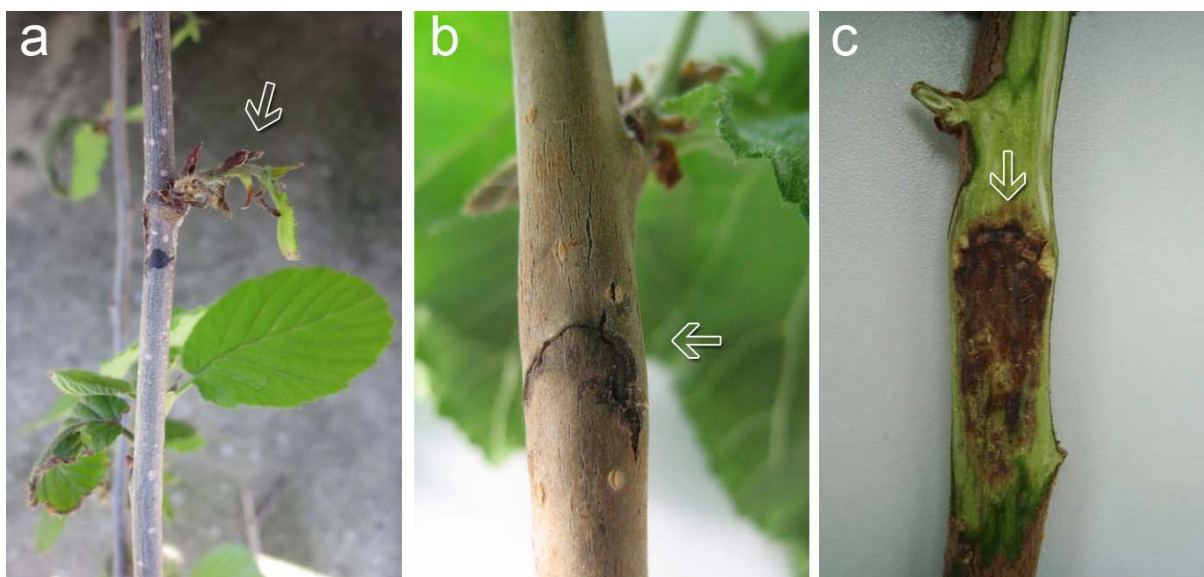
5.2.1.2 Test patogenosti

Patogenost sojeva potvrđena je reprodukcijom simptoma bolesti veštačkom inokulacijom sadnica leske (cv. Tonda Gentile delle Langhe). U cilju utvrđivanja najpouzdanije metode za izvođenje testa, primenjena su dva načina inokulacije biljaka, pri čemu su uočene razlike u izgledu i dinamici ispoljenih simptoma. Metoda inokulacije pupoljaka pokazala se uspešnijom u reprodukciji tipičnih simptoma bolesti u kraćem vremenskom periodu. Biljke inokulisane ovom metodom ispoljile su karakteristične simptome infekcije u vidu pegavosti listova i uvelosti i nekroze inokulisanih pupoljaka oko mesec dana nakon inokulacije (Slika 8).



Slika 8. *X. a. pv. corylina* - Simptomi na inokulisanim biljkama leske: a) i b) pegavost listova razvijenih iz zaraženog pupoljka i nekroza lisnih pupoljaka; c) nekroza grančice; d) vlažne pege na naličju lista; e), f) i g) nekroza i pegavost listova i vršnog izbojka iznad mesta inokulacije.

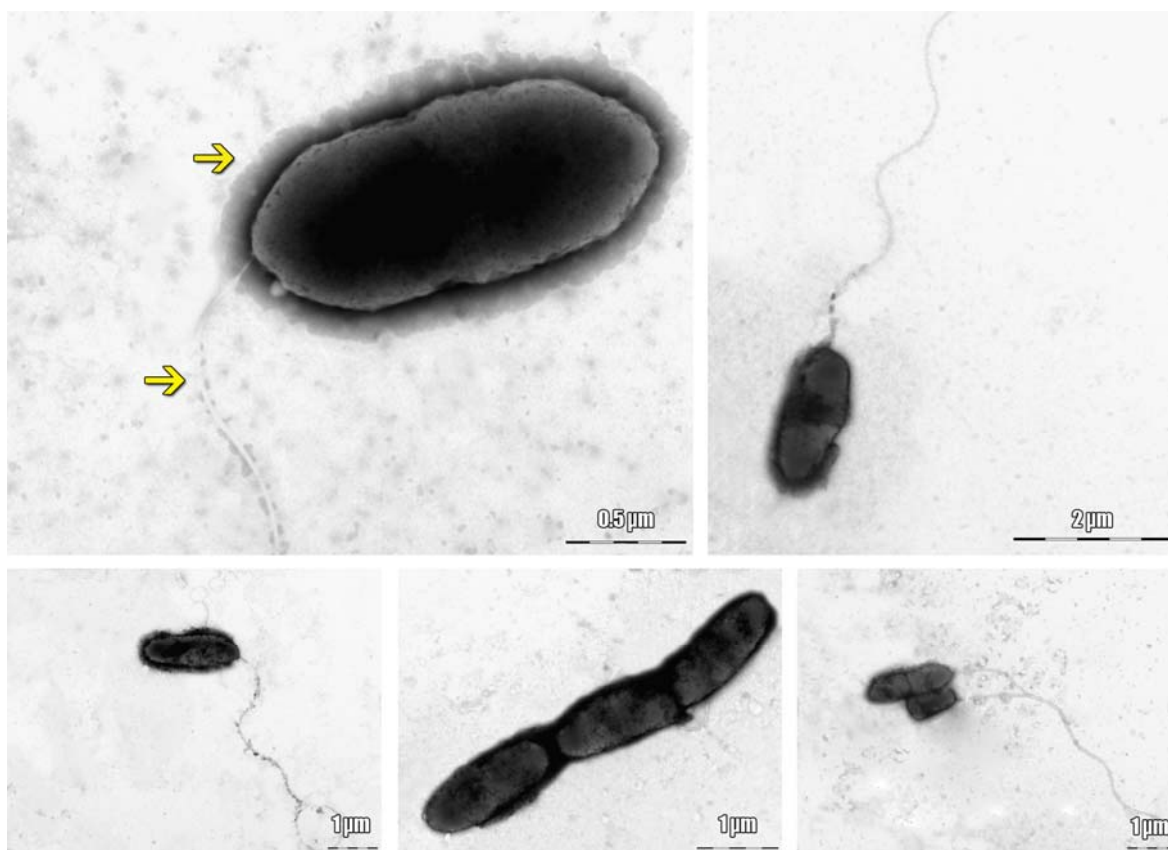
Metodom potapanja, promene u vidu nekroze na mestu povređivanja biljnog tkiva uočene su nakon 3 meseca (Slika 9). U oba slučaja promene su bile lokalnog karaktera, pri čemu nije došlo do izumiranja delova biljaka udaljenih od mesta infekcije, koji nisu bili izloženi povređivanju neposredno pre inokulacije. Iz inokulisanih biljaka nakon perioda inkubacije, izvršena je uspešna reizolacija bakterija čiji je identitet potvrđen korišćenjem nekoliko preliminarnih testova.



Slika 9. *X. a. pv. corylina* - Inokulacija pupoljaka i glavnog stabla metodom potapanja: a) izumiranje novog prirasta razvijenog iz inokulisanog pupoljka; b) vlažna nekroza tkiva stabla na mestu povređivanja; c) uzdužni presek stabla - lokalni razvoj nekroze oko mesta povrede.

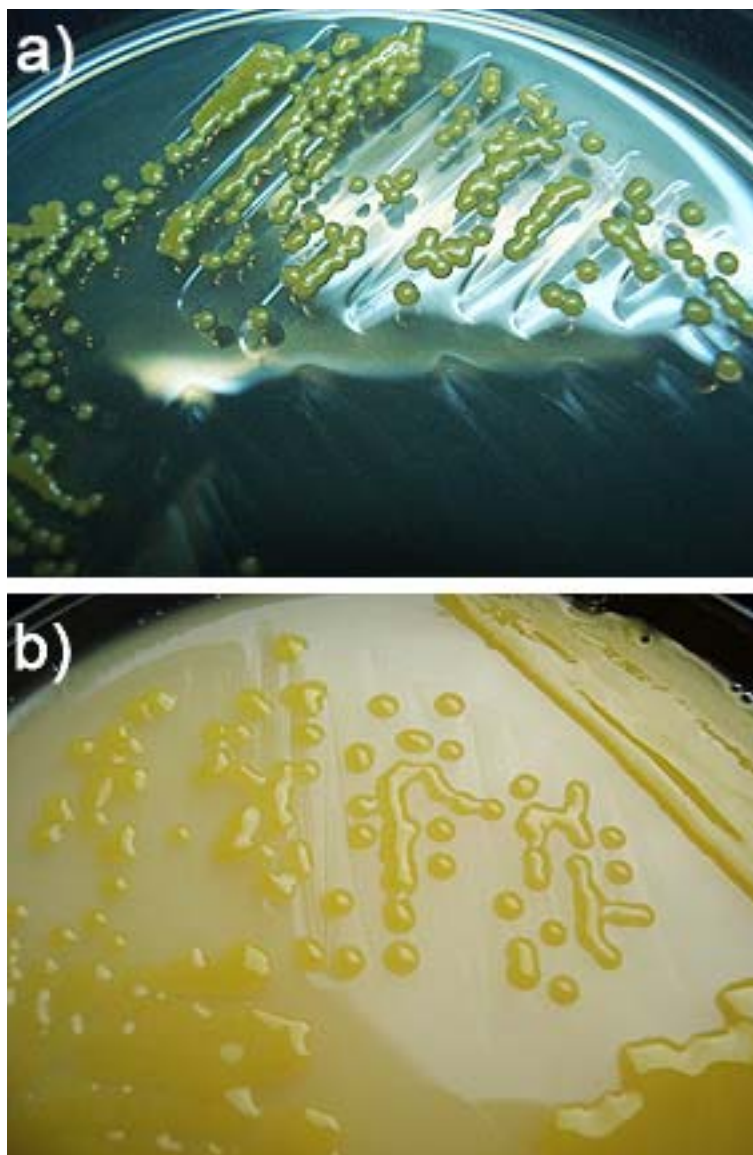
5.2.2 Morfološke i odgajivačke odlike

Posmatranjem čistih kultura izolovanih bakterija pod transmisionim elektronskim mikroskopom uočene su ćelije štapićastog oblika sa zaobljenim ivicama, prosečne veličine $1.6 \times 0.6 \mu\text{m}$. Bakterije imaju jednu polarno raspoređenu flagelu prosečne dužine $5,6 \mu\text{m}$ i širine $0,2 \mu\text{m}$, asporogene su i pojavljuju se pojedinačno ili u parovima. Okružene su sluzastim omotačem od polisaharida (Slika 10).



Slika 10. *X. a. pv. corylina*: Elektronski snimak soja KFB 275. Štapićast oblik bakterijske ćelije sa sluzastim omotačem od polisaharida i jednom polarnom flagelom (označeno strelicom, x 28 000).

Svi proučavani sojevi su Gram i oksidaza negativni, katalaza-pozitivni, stvaraju pigment žute boje i sluzasti polisaharid na hranljivoj podlozi. Na podlozi od hranljivog agara, tri dana nakon zasejavanja, sojevi formiraju okrugle, ispupčene i sjajne kolonije ravnog oboda, svetlo žute boje, prečnika 1-2 mm (Slika 11a). Manje razlike uočene su u pogledu veličine, izgleda i konzistencije kolonija na istoj hranljivoj podlozi. Od ukupno 46 sojeva, njih 19 (KFB: 0128, 0130, 0132, 0134-0137, 305-311, 312-313) stvaralo je krupnije kolonije koje su nakon nekoliko dana razvoja ispoljile više sluzastu konzistenciju, dok su preostali sojevi zadržali kompaktan izgled na podlozi. Na GYCA podlozi sa dodatkom glukoze nakon tri dana razvoja formirane su sjajne i ispupčene kolonije krem žute boje, sluzaste konzistencije (Slika 11b).

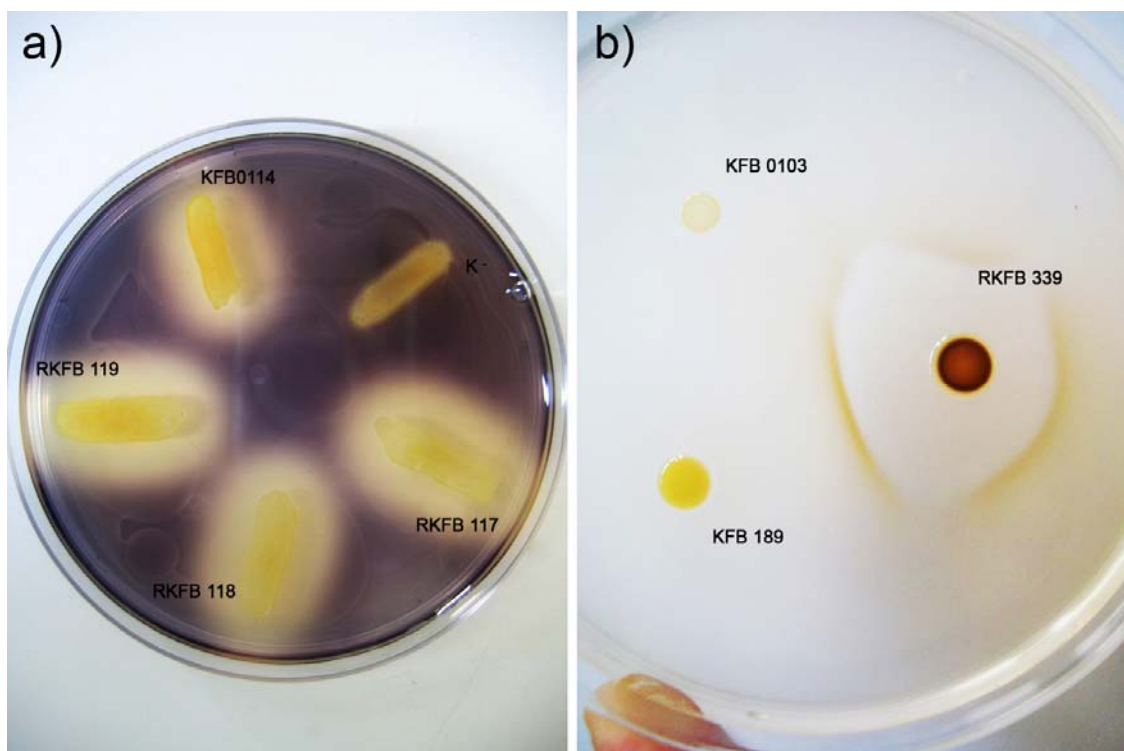


Slika 11. *X. a. pv. corylina* - Izgled kolonija na različitim hranljivim podlogama, soj KFB 304: a) izgled na HA podlozi nakon 72 h; b) sluzast razvoj na GYCA podlozi nakon 72 h inkubacije

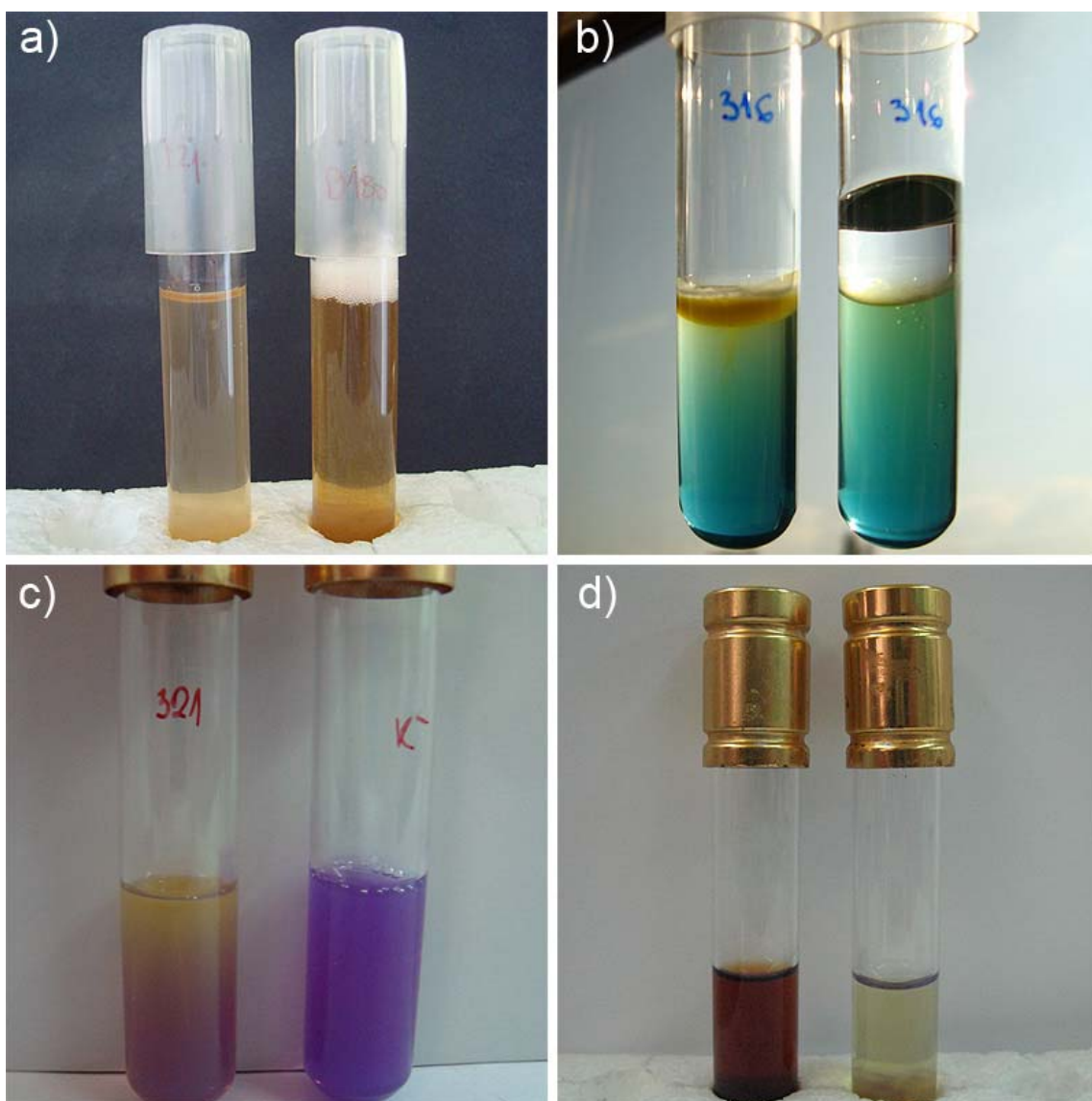
5.2.3 Biohemijsko-fizološke odlike

Na osnovu rezultata istraživanja proučavani sojevi bili su homogeni u pogledu biohemijsko-fizioloških karakteristika (Tabela 7). Svi sojevi imaju slabo oksidativan metabolizam glukoze, stvaraju katalazu, ali ne i oksidazu i pektolitičke fermente; hidrolizuju škrob, želatin i eskulin, metabolišu kvinat, vrše hidrolizu vodonik sulfida i ne poseduju sposobnost redukcije nitrata. Kao izvore ugljenika koriste glukozu, laktozu

i saharozu, ali ne i sorbitol (Slika 12 i 13). Diferencijacija sojeva i određena odstupanja od podataka iz literature uočena su u pogledu razlaganja maltoze. Kod sojeva KFB 286-288 ispoljena je negativna reakcija u ovom testu, dok je kod kontrolnog soja KFB 0114 reakcija ocenjena kao slabo pozitivna. Svi sojevi razvijali su se u tečnoj YS podlozi pri 35°C i u prisustvu 2% NaCl. Međutim, razvoja nije bilo pri temperaturi 36°C i 5% NaCl.



Slika 12. *X. a. pv. corylina* - Biohemijsko-fiziološke karakteristike proučavanih sojeva: a) hidroliza skroba: pozitivna reakcija-prisustvo prozirne zone oko razvoja bakterije, proučavani sojevi RKFB: 117, RKFB 118, RKFB 119, KFB 0114 (K^+), K^- , negativna reakcija. b) Razgradnja kvinata: pojava mrke boje i formiranje prosvetljene zone u podlozi oko razvoja kolonije usled razgradnje kvinata: pozitivna reakcija - soj RKFB 339; K^- , negativna kontrola: *X. euvesicatoria*, KFB 13 i *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, KFB 0103.



Slika 13. *X. a. pv. corylina* - a) Redukcija nitrata: pojava tamnomrke, čilibarne boje nakon dodavanja reagensa znak je pozitivne reakcije (desno), negativna reakcija (levo); b) OF test: razvoj bakterije u podlozi sa glukozom (levo), izostanak razvoja u epruveti zalivenoj sa parafinom (desno), c) korišćenje saharoze: promena boje podloge u žute znak je pozitivne reakcije (levo), negativna reakcija (desno); d) hidroliza eskulina: pozitivna reakcija - promena boje podloge u tamno mrku (levo), negativna reakcija (desno).

Tabela 7. Biohemijsko-fiziološke karakteristike proučavanih sojeva

Soj KFB	Hidroliza			Razlaganje kvinata	Razlaganje H ₂ S	Redukcija nitrata	Razlaganje				Razvoj pri			
	želatina	eskulina	skroba				glukoze	saharoze	maltoze	laktose	35°C	36°C	2%NaCl	5%NaCl
275	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-
276	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-
277	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-
278	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-
279	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-
280	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-
281	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-
282	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-
283	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-
284	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-
285	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-
0128	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-
0130	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-
0132	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-
0134	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-
0135	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-
0136	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-
0137	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-
286	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-
287	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-
288	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-
289	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-
290	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-
291	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-
292	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-

Soj KFB	Hidroliza			Razlaganje kvinata	Razlaganje H ₂ S	Redukcija nitrata	Razlaganje				Razvoj pri			
	želatina	eskulina	skroba				glukoze	saharoze	maltoze	laktose	35°C	36°C	2%NaCl	5%NaCl
(Nastavak na sledećoj strani)														
293	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-
294	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-
295	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-
296	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-
297	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-
298	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-
299	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-
300	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-
301	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-
302	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-
303	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-
304	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-
305	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-
306	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-
307	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-
308	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-
309	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-
310	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-
311	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-
312	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-
313	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-
0114	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-

5.3 Biolog test

Rezultati Biolog testa analizirani su nakon 24 h inkubacije. Dobijeni metabolički profili bili su specifični za rod *Xanthomonas*, i nisu pokazali veliku sličnost sa predstavnicima drugih rodova. Pomoću Biolog baze, 15 proučavanih sojeva determinisano je kao *X. campestris*, sa indeksom sličnosti od 0,561 do 0,939. Preostala dva soja identifikovana su samo do nivoa roda, jer je u oba slučaja indeks sličnosti sa prvim izborom iz baze podataka, vrstom *X. campestris* pv. *juglandis* bio manji od 0,5 (0,457 i 0,436). Najveći broj izolata, ukupno četiri (27,7%,) identifikovani su kao *X. c.* pv. *malvacearum* i pv. *juglandis*, 2 soja ispoljila su najveću sličnost sa *X. c.* pv. *vesicatoria*, dok je 1 soj identifikovan kao *X. c.* pv. *campestris*. Kontrolni Xac soj ispoljio je najveću sličnost sa *X. c.* pv. *juglandis* sojevima iz baze (0,586), dok je kontrolni soj *X. a.* pv. *pruni* identifikovan kao *X.c.* pv. *malvacearum* (ID= 0,647). Obzirom da raspoloživa baza podataka ne sadrži referentne Xac sojeve, pouzdana identifikacija ovog patogena korišćenjem Biolog testa trenutno nije moguća.

U pogledu korišćenja ugljenikovih jedinjenja, utvrđena je metabolička raznovrsnost proučavanih sojeva (Tabela 9). Jedan ili više proučavanih sojeva, vršili su oksidaciju 45 od ukupno 95 različitih ugljenikova jedinjenja. Svi sojevi koristili su sledećih 20 jedinjenja: dekstrin, tween 40, N-acetil-D-glukozamin, D-celobiozu, D-fruktozu, D-galaktozu, α -D-glukozu, D-manozu, D-melibiozu, saharozu, D-trehalozu, metil estar piruvične kiseline, mono-metil estar sukcinjske kiseline, sirćetnu kiselinu, α -keto glutarnu kiselinu, sukcinjsku kiselinu, bromo-sukcinjsku kiselinu, L-glutaminsku kiselinu, L-serin i glicerol. Većina sojeva metabolisala je sledećih 7 supstrata: genciobiozu, laktulozu, cis-akonitnu kiselinu, α -keto buternu kiselinu, alanin-amid, L-alanin i L-alanil-glicin. Korišćenje preostalih 15 jedinjenja bilo je varijabilno (Tabela 9). Ni jedan proučavani soj nije razlagao sledećih 52 supstrata: α -ciklodekstrin, N-acetil-D-galaktozamin, adonitol, L-arabinozu, D-arabitol, i-eritritol, m-inozitol, α -D-laktozu, D-manitol, β -metil-D-glukozid, D-psikozu, D-rafinozu, L-ramnozu, D-sorbitol, turanozu, ksilitol, mravlju kiselinu, D-lakton galaktonske kiseline, D-galakturonsku kiselinu, D-glukonsku kiselinu, D-glukozaminsku kiselinu, D-glukuronsku kiselinu, β -hidroksibuternu kiselinu, γ -hidroksibuternu kiselinu, p-hidroksi fenil-sirćetnu kiselinu, itakonsku kiselinu, α -keto valerijansku kiselinu, kviničnu kiselinu, D-šećernu kiselinu,

sebacinsku kiselinu, glukuron-amid, L-asparagin, glicil L- aspartičnu kiselinu, L-histidin, L-leucin, L-ornitin, L-fenil- alanin, L-piroglutaminsku kiselinu, D-serin, D,L-karnitin, γ -amino buternu kiselinu, inozin, uridin, timidin, feniletil-amin, putrescin, 2-amino etanol, 2,3-butandiol, α -D-glukozo-1-fosfat, D-glukozo-6-fosfat.

Tabela 9. Metabolički profil proučavanih Xac sojeva dobijeni primenom Biolog GN softvera Microlog 4.20. Procenat sojeva sa pozitivnom reakcijom.

Supstrat	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	0	100	23	100	12	0	100	0	0	0	100
B	0	100	35	100	82	100	0	0	94	53	0	100
C	100	0	0	0	0	0	100	100	0	0	100	100
D	100	88	18	0	0	0	0	0	0	41	0	0
E	0	0	76	100	0	41	6	6	0	0	0	100
F	100	41	0	82	65	82	82	0	0	100	0	47
G	0	6	0	0	0	35	0	0	100	12	0	0
H	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0

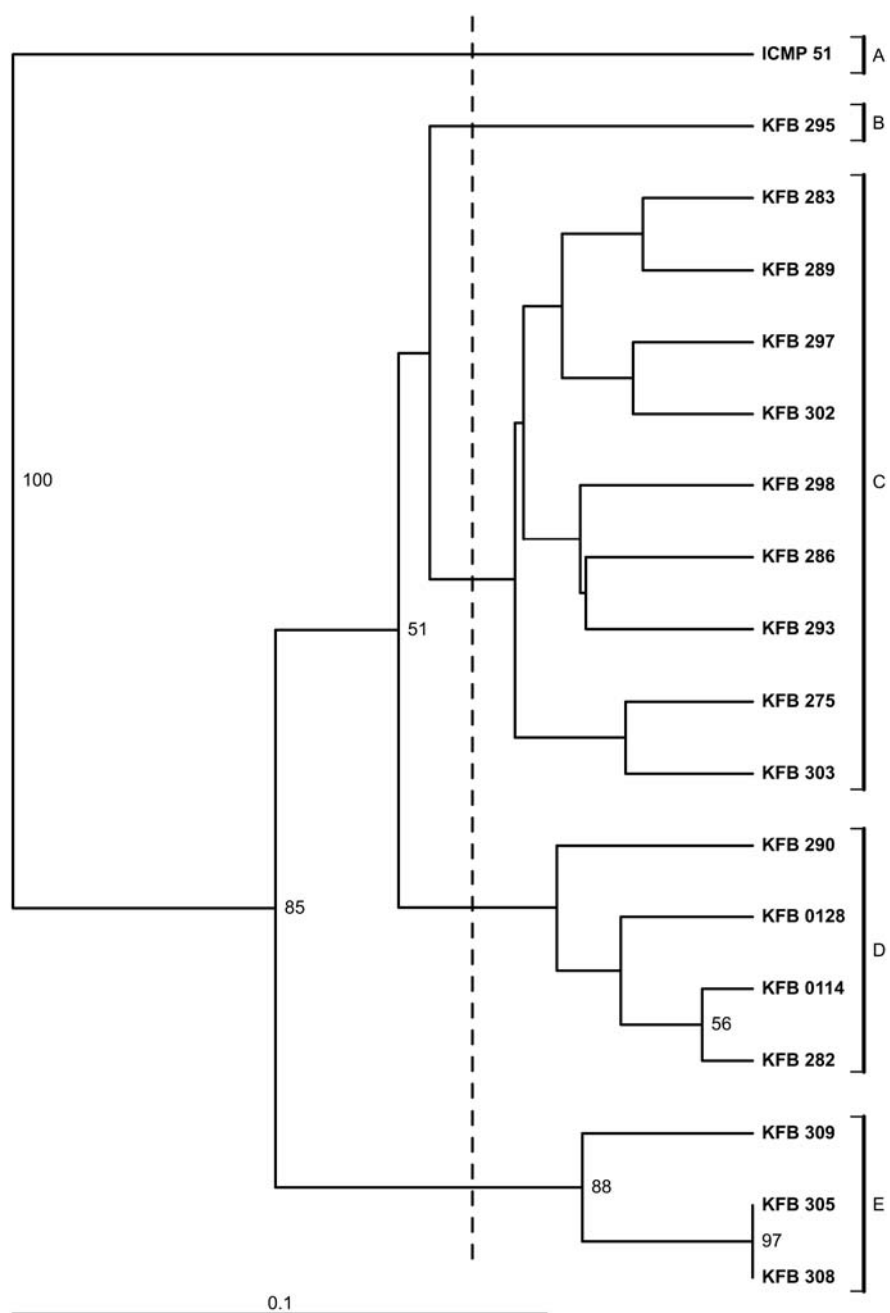
Legenda: A4=glikogen; A6= tween 80; B3=L-fukoza; B10=maltoza; D3=limunska kiselina, D10= α - hidroksi-buterna kiselina; E6=D,L-mlečna kiselina, E7=malonska kiselina; E8=propionska kiselina; F2=sukcinaminska kiselina; F5=D-alanin; F12=glicil-L-glutaminska kiselina.

Najveću aktivnost ispoljiili su sojevi KFB 295, KFB 289 i KFB 283 koji su koristili 40, 37 i 36 jedinjenja, ponaosob. Hidroksi-L-prolin koristio je samo soj KFB 289, dok je malonsku i propionsku kiselinu razlagao jedino soj KFB 295. Po dva soja su koristila L-treonin (KFB 295 i KFB 302) i tween 80 (KFB 293 i KFB 295).

Rezultati klaster analize ukazali su da svi proučavani Xac sojevi formiraju jednu grupu A, u odnosu na referentni soj *X. arboricola* pv. *pruni* ICMP 51, koji je izdvojen u B grupu. U okviru grupe A formirane su 4 podgrupe sojeva (Slika14). Podgrupu 1 formirao je soj KFB 295 koji je ispoljio najveću metaboličku aktivnost, korišćenjem ukupno 40 izvora ugljenika. Jedini je razlagao malonsku i propionsku kiselinu, dok je u odnosu na većinu sojeva koristio i treonin, tween 80, glikogen i limunsku kiselinu. Najveći broj sojeva (devet) svrstan je u podgrupu 2 koji su razlagali u proseku 33 jedinjenja, dok je pogrupa 3 bila sastavljena od 4 soja koja su u proseku razlagala 26

jedinjenja. Sojevi koji su formirali podgrupu 4 bili su najmanje metabolički aktivni, pri čemu jedini nisu razlagali genciobiozu, alaninamid, L-alanin i L-alanil- glicin. Pored veće metaboličke aktivnosti, Xac sojevi su se razlikovali u odnosu na referentni patovar *pruni* u korišćenju D-galaktoze, D-melibioze, sirćetne kiseline i N-acetil-D-glukozamina, ali ne i D-psikoze.

Odstupanja rezultata Biolog testa u odnosu na rezultate dobijene pomoću klasičnih metoda proučavanja zabeležena su u slučaju metabolizma maltoze. Biolog metodom sposobnost razgradnje maltoze ispoljilo je 9 od 17 proučavanih sojeva (53%), dok je u podlozi sa dodatkom maltoze 93% sojeva koristilo ovaj šećer. Odstupanja su zabeležena jedino kod sojeva KFB 286 KFB 287 i KFB 288.

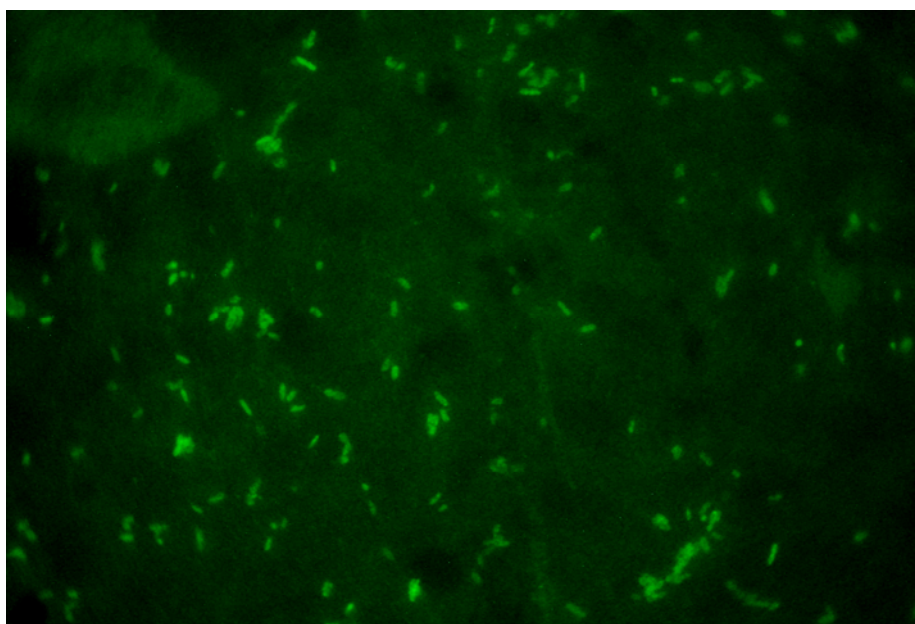


Slika 14. Dendrogram konstruisan na osnovu razlika proučavanih sojeva u korišćenju 95 ugljenikovih jedinjenja u Biolog testu. Koeficijent sličnosti naznačen je ispod dendrograma.

5.4 Serološke metode identifikacije

Primenom indirektnog DAS ELISA testa, potvrđeno je da svi proučavani sojevi bakterija poreklom iz leske pripadaju bakteriji *X. arboricola* pv. *corylina*, jer su kao i kontrolni soj KFB 0114, reagovali sa specifičnim poliklonalnim antitelima proizvedenim za ovu bakteriju. Reakcija testa ocenjena je merenjem apsorpcije u svakom bunarčiću mikrotitarske ploče pomoću spektrofotometra pri talasnoj dužini 405 nm. Uzorci su ocenjeni kao pozitivni na osnovu srednje vrednosti apsorpcije dva bunarčića istog uzorka koje su bile dva ili više puta veće od srednje vrednosti apsorpcije očitane u negativnoj kontroli.

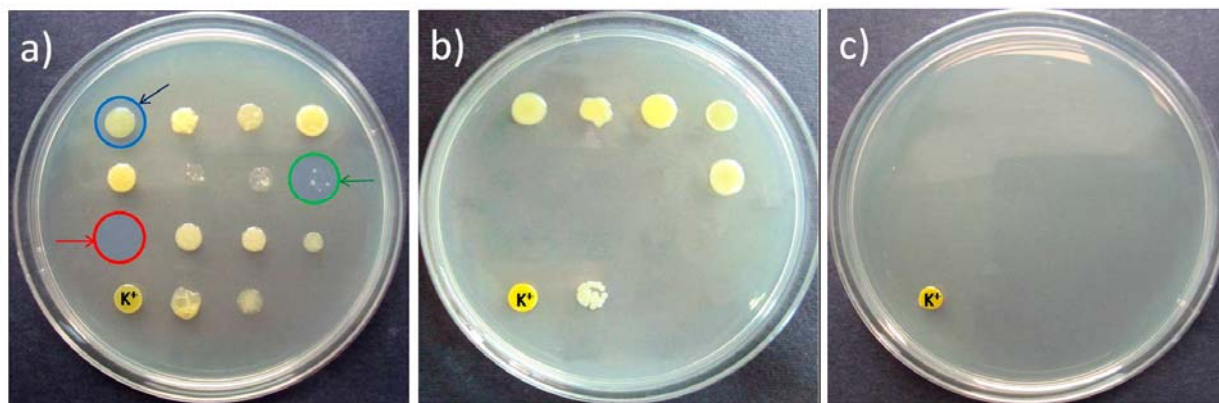
Primenom indirektne metode imunofluorescencije kolonije proučavanih bakterija specifično su obojene pomoću antitela kovalentno vezanih sa fluoroforom, i posmatrane pomoću UV mikroskopa pod imerzionim objektivom pri uvećanju 100 puta (Slika15). Svi proučavani sojevi, kao i kontrolni soj KFB 0114, reagovali su sa specifičnim antiserumom.



Slika 15. *X. a. pv. corylina*. Test imunofluorescencije. Fluorescentno obojene ćelije soja KFB 275; $\times 100$.

5.5 Osetljivost prema baktericidima

Na SPA podlozi bez dodatka baktericida svi proučavani sojevi obrazovali su krupne, sluzaste i ispušćene kolonije žute boje i pravilnog oboda. Na podlozi sa različitim koncentracijama baktericida uočene su razlike među sojevima u pogledu razvoja, izgleda i veličine kolonija (Slika 16). U pogledu osetljivosti prema jedinjenjima bakra, izvesne razlike među sojevima uočene su na podlozi sa 100 ppm aktivne supstance, pri čemu se 8 sojeva (KFB: 276, 304, 305, 306, 310-315) nije razvilo u podlozi sa bakar-sulfatom, dok su bakar-oksihlorid i bakar-hidroksid inhibirali razvoj 11 tj. 9 proučenih sojeva. (Tabela 8). Svi sojevi bili su osetljivi na 200 ppm navedenih formulacija bakra, izuzev kontrolnog soja KFB 062. Na podlozi sa antibioticima svi proučavani sojevi ispoljili su osetljivost prema 25 ppm i višoj koncentraciji streptomycin-sulfata. Kasugamicin, koncentracije 50 ppm, inhibirao je razvoj dva soja (KFB 311 i KFB 312), dok su se preostala 44 razvijala različitim intenzitetom. Dva puta veća koncentracija ovog baktericida zaustavila je razvoj 35 sojeva, a preostalih 11 razvijalo se usporeno.



Slika 16. *X. a. pv. corylina* - Razvoj proučavanih sojeva na podlozi sa baktericidima. a) bakar sulfat – 100 ppm; b) bakar-oksihlorid – 100 ppm; c) streptomycin-sulfat – 25 ppm. K⁺ - pozitivna kontrola. Strelicama su obeleženi: izostanak razvoja (crvena) i razvoj sojeva različitim intenzitetom (zelena i plava)

Br.	Šifra	Streptomycin sulfat		Kasumin (Kasugamicin 2%)		Bakar sulfat		Cuprozine (a.m.bakar oksihlorid)*		Kocide 2000 (am. Bakar hidroksid)*		Kontrola (SPA)
		25 ppm	50 ppm	50 ppm	100 ppm	100 ppm	200 ppm	100ppm	200ppm	100ppm	200 ppm	
1.	KFB 275	-	-	+	-	+	-	(+)	-	(+)	-	+
2.	KFB 276	-	-	+	-	-	-	-	-	(+)	-	+
3.	KFB 277	-	-	+	-	+	-	(+)	-	(+)	-	+
4.	KFB 278	-	-	+	-	+	-	(+)	-	(+)	-	+
5.	KFB 279	-	-	+	-	+	-	(+)	-	(+)	-	+
6.	KFB 280	-	-	+	-	+	-	(+)	-	(+)	-	+
7.	KFB 281	-	-	+	+	+	-	(+)	-	(+)	-	+
8.	KFB 282	-	-	(+)	-	+	-	+	-	+	-	+
9.	KFB 283	-	-	+	(+)	+	-	+	-	+	-	+
10.	KFB 284	-	-	+	(+)	+	-	(+)	-	+	-	+
11.	KFB 285	-	-	+	(+)	+	-	(+)	-	(+)	-	+
12.	KFB 0128	-	-	(+)	-	+	-	+	-	+	-	+
13.	KFB 0130	-	-	(+)	-	+	-	+	-	+	-	+
14.	KFB 0132	-	-	(+)	-	+	-	+	-	+	-	+
15.	KFB 0134	-	-	(+)	-	+	-	+	-	+	-	+
16.	KFB 0135	-	-	(+)	-	+	-	(+)	-	-	-	+
17.	KFB 0136	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
18.	KFB 0137	-	-	(+)	-	+	-	+	-	+	-	+
19.	KFB 286	-	-	+	(+)	+	-	(+)	-	(+)	-	+
20.	KFB 287	-	-	(+)	-	+	-	+	-	+	-	+
21.	KFB 288	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
22.	KFB 289	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
23.	KFB 290	-	-	+	+	+	-	-	-	(+)	-	+
24.	KFB 291	-	-	+	+	+	-	(+)	-	(+)	-	+
25.	KFB 292	-	-	+	(+)	+	-	(+)	-	(+)	-	+
26.	KFB 293	-	-	(+)	(+)	+	-	+	-	+	-	+
27.	KFB 294	-	-	(+)	-	+	-	+	-	+	-	+
28.	KFB 295	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
29.	KFB 296	-	-	+	(+)	+	-	+	-	+	-	+
30.	KFB 297	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
31.	KFB 298	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+

(Nastavak na sledećoj strani)

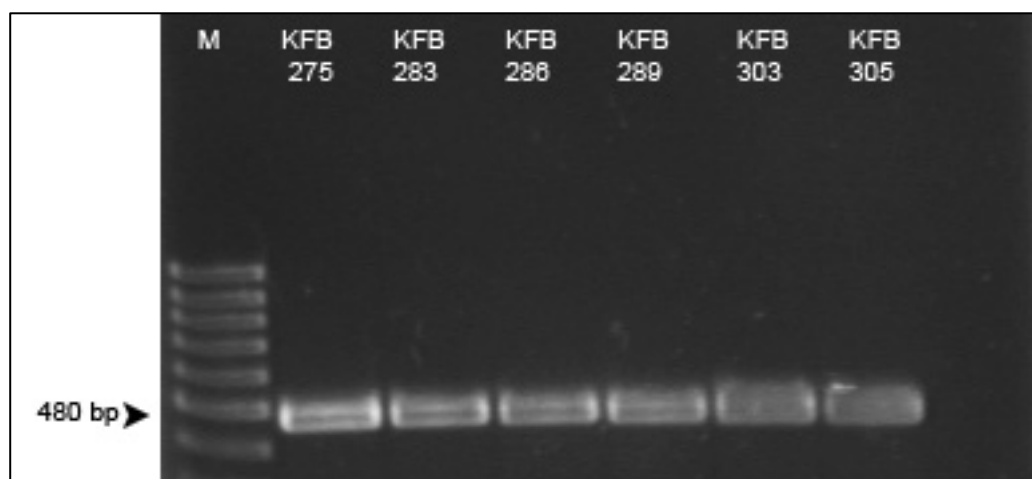
Br.	Šifra	Streptomycin sulfat		Kasumin (Kasugamicin 2%)		Bakar sulfat		Cuprozine (a.m.bakar oksiklorid)*		Kocide 2000 (am. Bakar hidroksid)*		Kontrola (SPA)
		25 ppm	50 ppm	50 ppm	100 ppm	100 ppm	200 ppm	100ppm	200ppm	100ppm	200 ppm	
32.	KFB 299	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
33.	KFB 300	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
34.	KFB 301	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
35.	KFB 302	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
36.	KFB 303	-	-	+	(+)	+	-	+	-	+	-	+
37.	KFB 304	-	-	(+)	-	-	-	+	-	+	-	+
38.	KFB 305	-	-	(+)	-	-	-	-	-	-	-	+
39.	KFB 306	-	-	(+)	-	-	-	-	-	-	-	+
40.	KFB 307	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+
41.	KFB 308	-	-	+	-	(+)	-	-	-	-	-	+
42.	KFB 309	-	-	+	-	(+)	-	-	-	-	-	+
43.	KFB 310	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
44.	KFB 311	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
45.	KFB 312	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
46.	KFB 313	-	-	+	-	-	-	-	-	(+)	-	+
47.	E-3	+	+	+	(+)	+	+	+	+	+	+	+

Legenda: +, normalan razvoj bakterija na podlozi; (+), slab, usporen razvoj na podlozi; -, bakterija se ne razvija na podlozi. Preparati: Cuprozin 35W; aktivna materija: bakar oksiklorid - $\text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}$. Sastav: 350+/- 17,5 g a.m/kg. Koncentracija primene 0,35% (1225ppm). U eksperimentu je korišćena koncentracija aktivne supstance od 100 i 200 ppm. Kocide 2000; aktivna materija: bakar hidroksid- $\text{Cu}(\text{OH})_2$, Sastav: 53,8% (538g a.m/kg). Koncentracija primene: 0,2% (1076 ppm). U eksperimentu je korišćena koncentracija aktivne supstance od 100 i 200 ppm.

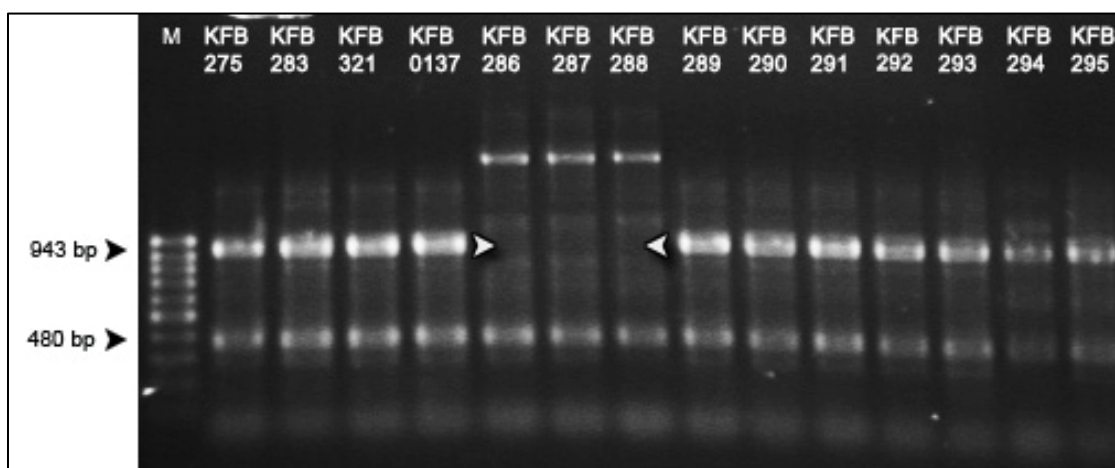
5.6 Molekularna identifikacija i karakterizacija

5.6.1 Detekcija proučavanih sojeva primenom PCR metode

Korišćenjem para prajmera koje su Maes i sar. (1993) dizajnirali na osnovu sekvence 16S RNK gena, umnoženi su fragmenti veličine 480 bp kod svih proučavanih sojeva (Slika 17). Na ovaj način sojevi su identifikovani kao *Xanthomonas* spp. Dalja PCR analiza izvedena je korišćenjem prajmera XarbQ-F/XarbQ-R za detekciju sekvence *qumA* gena koja je specifična za sve pripadnike *X. arboricola* DNK homologne grupe. Kod svih proučavanih sojeva detektovan je očekivani DNK fragment veličine 402 bp, čime je ustanovljena pripadnost vrsti *X. arboricola*. U našim istraživanjima, primenom dupleks PCR metode, prajmerima XarbQ-F/XarbQ-R, detektovana je sekvenca *qumA* gena kod svih proučavanih sojeva. Drugim parom prajmera (Y17-F/XapY17-R) fragment *ftsX* gena od 943 bp umnožen je kod 38 sojeva, kao i pozitivne kontrole KFB 0114. Međutim kod tri soja (KFB 286, 287 i 288) nije umnožen fragment očekivane veličine (Slika 18).



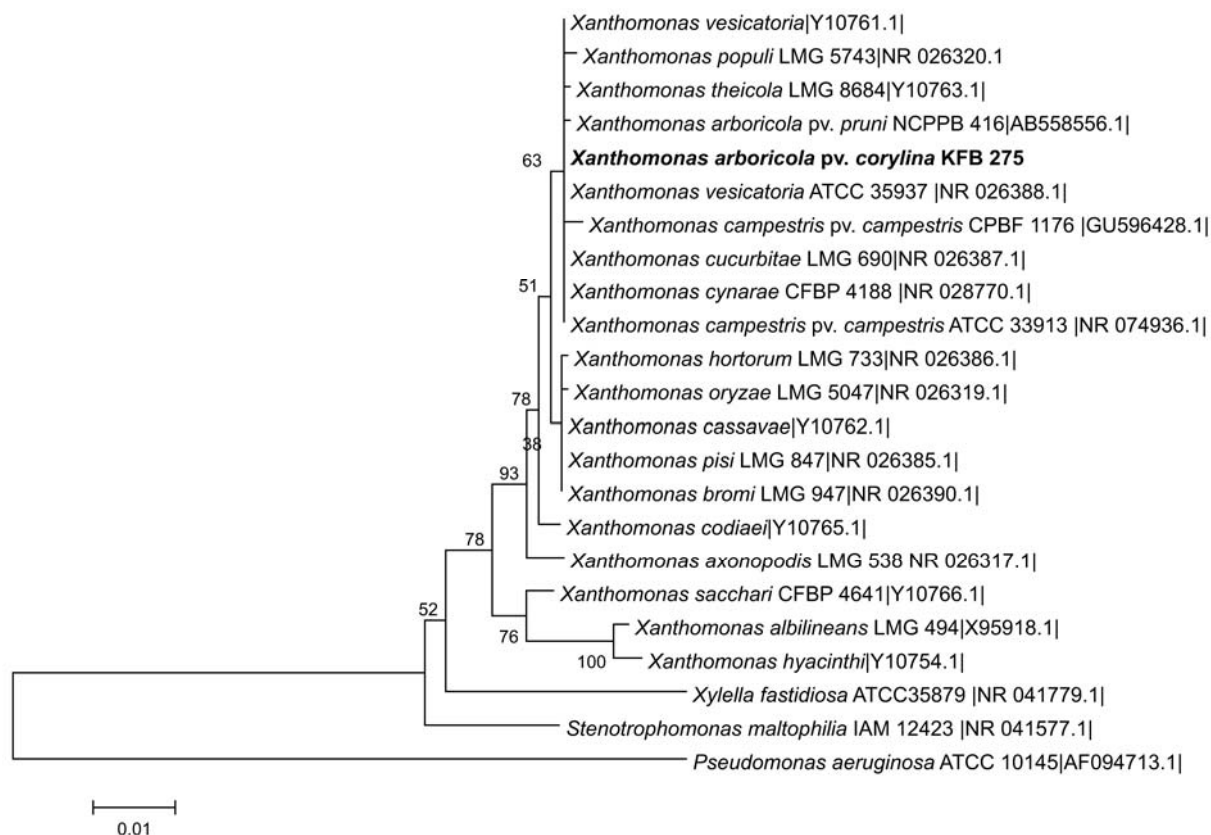
Slika 17. Fragment veličine 480 bp, specifičan za *Xanthomonas* spp. umnožen je kod svih proučavanih sojeva pomoću prajmera X1/X2. M - marker (MassRuler LowRange DNA Ladder, Fermentas, Litvanija); Linije: KFB 275, KFB 283, KFB 286, KFB 289, KFB 303-proučavani sojevi; KFB 0114, kontrolni soj *X. a. pv. corylina*; K⁻, negativna kontrola.



Slika 18. Dupleks PCR. Fragment veličine 480 bp umnožen je kod svih proučavanih sojeva. PCR produkt veličine 943 bp nije umnožen kod sojeva KFB 286, KFB 287 i KFB 288 (označeno strelicama). M - marker (MassRuler LowRange DNA Ladder, Fermentas, Litvanija).

5.6.2 Sekvenciona analiza 16S rRNK gena

Korišćenjem prajmera fD1/rP2 umnožena je parcijalna sekvenca 16S rDNA gena soja KFB 275. Nakon sekvenciranja umnoženog PCR produkta BLAST analizom utvrđena je sličnost sekvence sa odgovarajućim sekvencama *Xanthomonas* vrsta dostupnim u bazi podataka. Sličnost sa *X. hyacinthi*, *X. melonis*, *X. albilineans*, *X. translucens* i *X. sacchari* iznosila je 98%, dok je 100% identiteta sekvence utvrđeno sa *X. campestris* pv. *campestris*, *X. gardneri* i *X. cynarae*. Na dendrogramu konstruisanom na osnovu filogenetske analize, prikazano je grupisanje Xac soja KFB 275 sa referentnim *Xanthomonas* spp. (Slika 19).

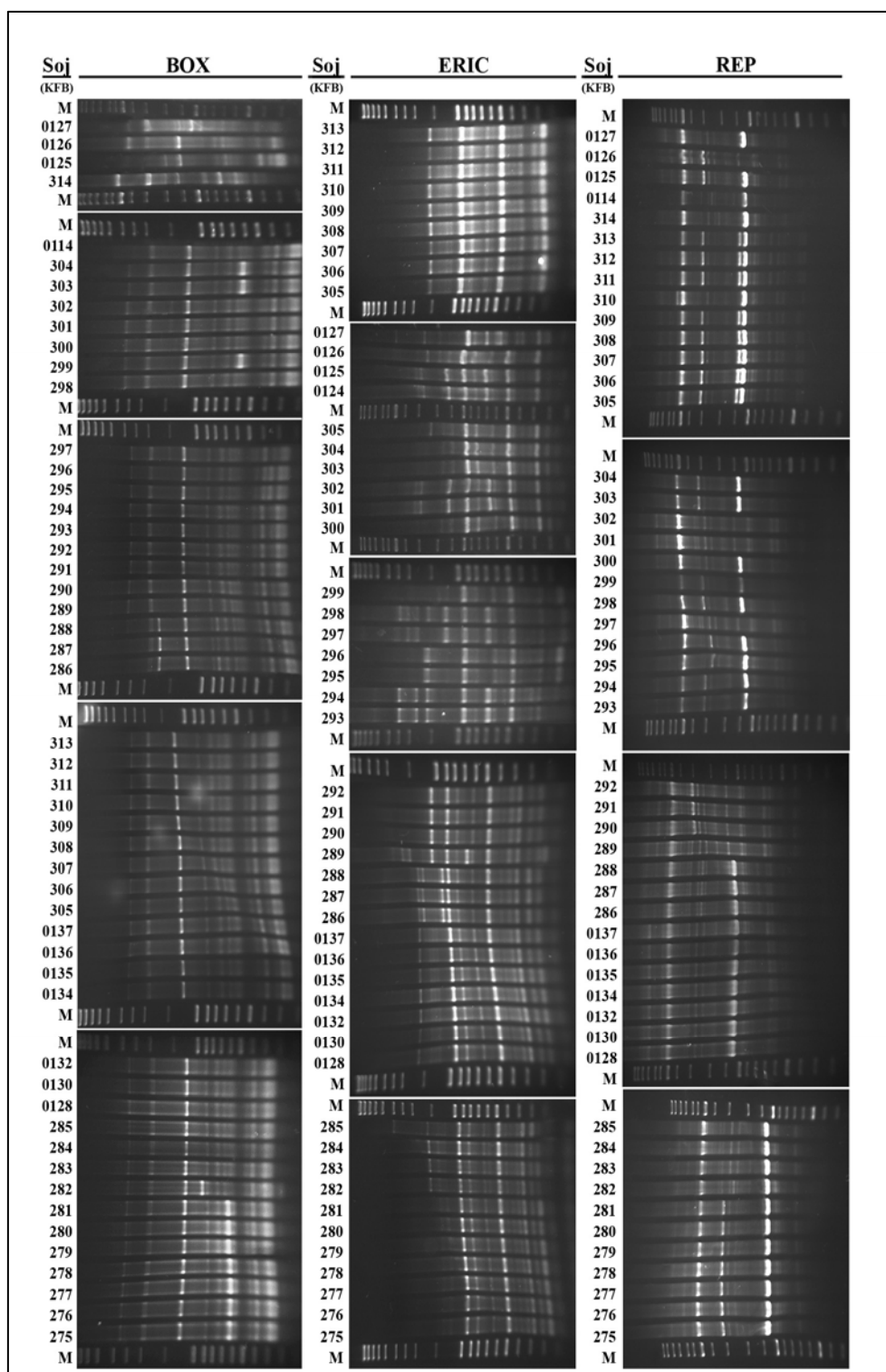


Slika 19. Dendrogram konstruisan na osnovu analize gena za 16S ribozomalnu RNK prikazuje filogenetsku povezanost soja KFB 275 i 19 tipskih *Xanthomonas* vrsta u odnosu na sojeve *Xylella fastidiosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* i *Pseudomonas aeruginosa*, predstavnike različitih rodova gama *Proteobacteria*.

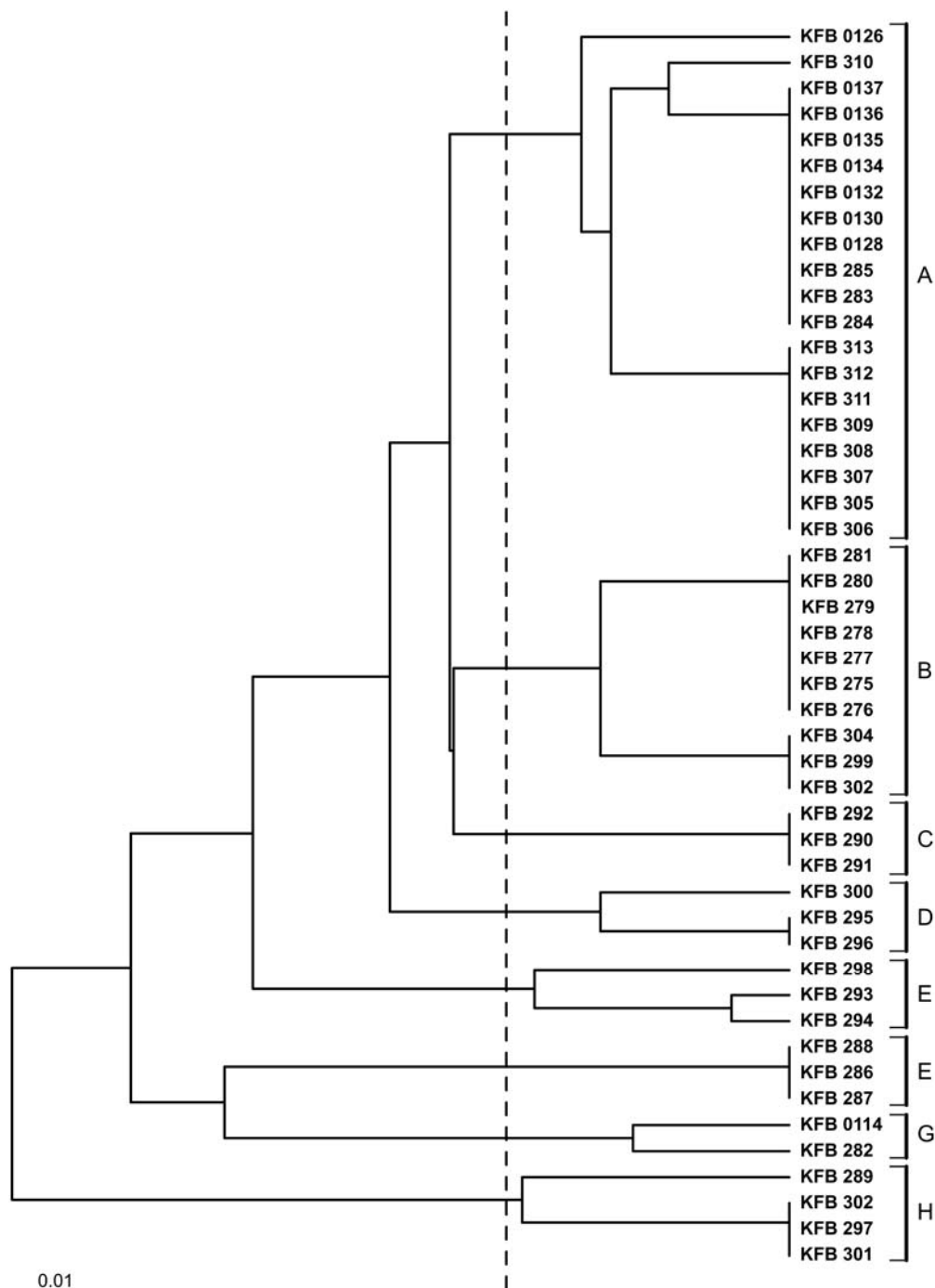
5.6.3 Rep-PCR

Rep-PCR metodom umnoženi su fragmenti DNK različite veličine čije je pozicioniranje na gelu ukazivalo na postojanje diverziteta među proučavanim sojevima (Slika 20). Vizuelnim beleženjem prisustva ili odsustva umnoženih fragmenata i poređenjem dobijenih rep-PCR otisaka, izvedeno je grupisanje sojeva prema sličnosti za svaki od prajmera ponaosob. Najveću moć diskriminacije pokazali su ERIC i REP prajmeri kojima je umnoženo oko 15 DNK fragmenata veličine od približno 100 do 5500 bp, i diferencirano 9 različitih profila, dok je BOX prajmerima izdvojeno 7 genetičkih grupa (Tabela 10).

Radi veće pouzdanosti filogenetske analize, kombinovani podaci dobijeni pomoću tri PCR analize (BOX-PCR, ERIC-PCR i REP-PCR) korišćeni su za konstrukciju filogenetskog stabla na osnovu čega je definisano ukupno 8 genetičkih grupa (A-H) na nivou sličnosti od 96% (Slika 21). Najbrojnija grupa A sastojala se od ukupno 20 proučavanih sojeva. Ovoj grupi, pored 12 sojeva poreklom iz Srbije, pripali su proučavani sojevi iz Poljske i kontrolni soj KFB 0126 iz Francuske. Grupi B pripalo je 10 sojeva, C, D, E i F grupama po 3, dok su grupe G i H imale po 2, odnosno 4 soja. Stepenn sličnosti između uočenih filogenetskih grupa bio je visok, i iznosio je 92-96%. Najveća bliskost (preko 95%) utvrđena je između sojeva A, B, C i D grupe. U odnosu na njih, najviše se razlikovala grupa H sastavljena od sojeva KFB 297, KFB 301, KFB 302 i KFB 289, a predstavnici grupe G koju čine referentni soj KFB 0114 i KFB 282 i grupe F sastavljene od sojeva KFB 286, KFB 287 i KFB 288, dok je nešto manja udaljenost izmerena za sojeve KFB 293, KFB 294 i KFB 298, pripadnike E grupe.



Slika 20. Rep-PCR profili dobijeni korišćenjem REP, ERIC i BOX prajmera. Oznake pored traka odgovaraju šiframa proučavanih sojeva i referentnih Xac sojeva KFB: 0114, 0125, 0126 i 0127. M, marker (MassRuler DNA Ladder Mix, Fermentas, Litvanija).



Slika 21. Dendrogram konstruisan na osnovu ERIC-, BOX- i REP-PCR profila proučavanih Xac sojeva. Sličnost između profila izračunata je korišćenjem UPGMA metode korišćenjem Dice-ovog koeficijenta. Presek dendrograma, označen isprekidanom linijom, izvršen je na nivou sličnosti od 96%.

Tabela 10. Grupisanje Xac sojeva na osnovu proučavanja genetičkih i metaboličkih profila

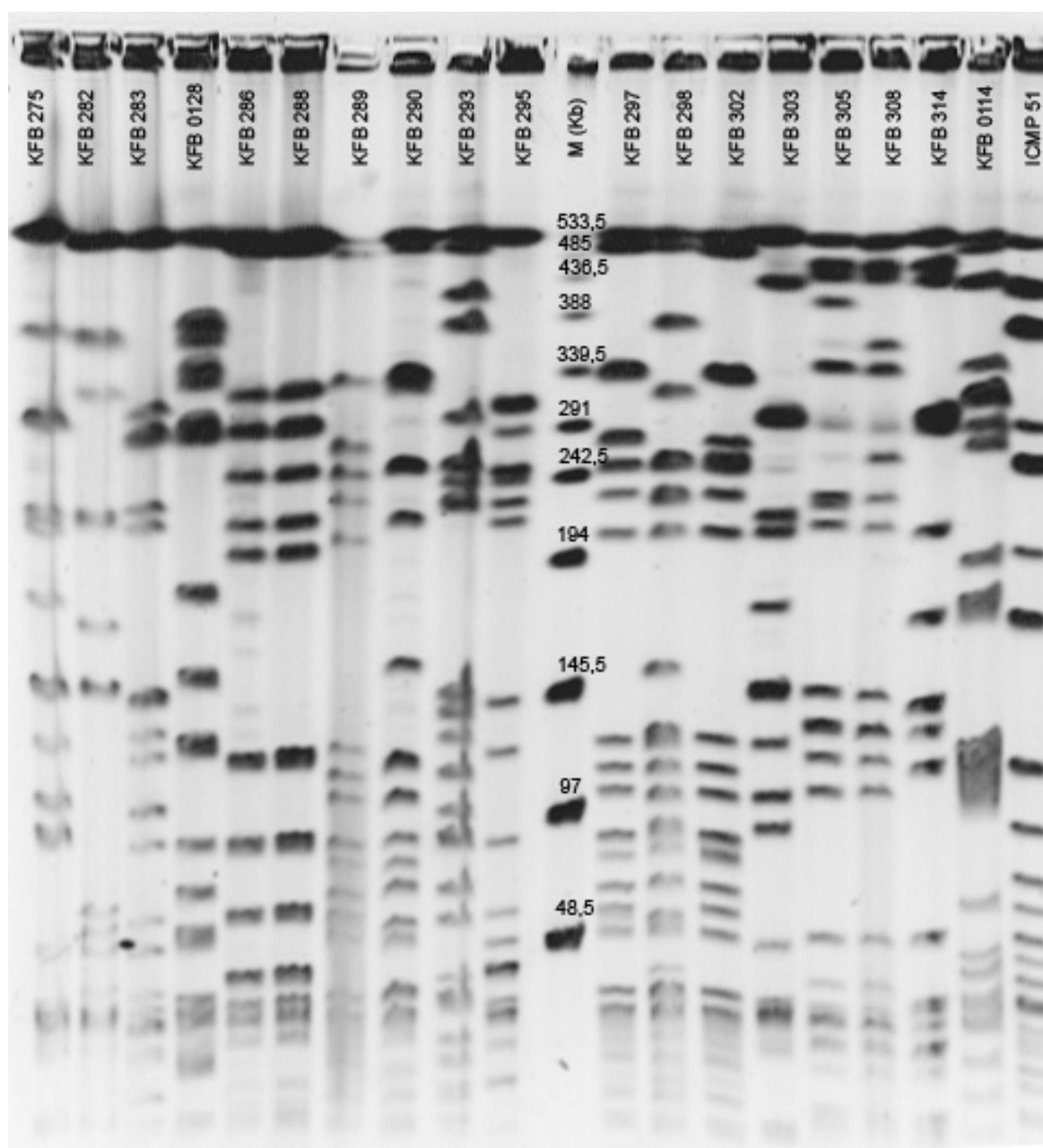
Šifra soja	Mesto izolacije	Lokalitet	Datum izolacije	Genetičke grupe			Rep-PCR	PFGE	BIOLOG
				BOX	ERIC	REP			
KFB 275	list	Petrovčić	7/2008.	I	I	I	B	F	B
KFB 276	list	Petrovčić	7/2008.	I	I	I	B	...	...
KFB 277	list	Petrovčić	7/2008.	I	I	I	B	...	...
KFB 278	list	Petrovčić	7/2008.	I	I	I	B	...	...
KFB 279	list	Petrovčić	7/2008.	I	I	I	B	...	...
KFB 280	list	Petrovčić	7/2008.	I	I	I	B	...	...
KFB 281	list	NP	7/2008.	I	I	I	B	...	...
KFB 282	list	Topola	2009.	II	II	II	G	E	C
KFB 283	list	Petrovčić	9/2008.	III	III	III	A	F	B
KFB 284	list	Petrovčić	9/2008.	III	III	III	A	...	...
KFB 285	list	Petrovčić	9/2008.	III	III	III	A	...	...
KFB 0128	NP	Poljska	2007.	III	III	III	A	A	C
KFB 0130	NP	Poljska	2007.	III	III	III	A	...	...
KFB 0132	NP	Poljska	2007.	III	III	III	A	...	...
KFB 0134	NP	Poljska	2009.	III	III	III	A	...	...
KFB 0135	NP	Poljska	2009.	III	III	III	A	...	...
KFB 0136	NP	Poljska	2009.	III	III	III	A	...	...
KFB 0137	NP	Poljska	2009.	III	III	III	A	...	...
KFB 286	grana	Deč	5/2010.	IV	IV	IV	F	D	B
KFB 287	list	Deč	5/2010.	IV	IV	IV	F	...	...
KFB 288	list	Deč	5/2010.	IV	IV	IV	F	D	...
KFB 289	list	Deč	5/2010.	III	V	V	H	B	B
KFB 290	list	Deč	5/2010.	III	VI	VI	C	B	C
KFB 291	list	Deč	5/2010.	III	VI	VI	C	...	...
KFB 292	list	Deč	5/2010.	III	VI	VI	C	...	...
KFB 293	list	Deč	5/2010.	III	VII	I	E	...	B
KFB 294	list	Deč	5/2010.	III	VII	I	E	...	...
KFB 295	list	Deč	5/2010.	V	VIII	VII	D	F	A
KFB 296	list	Deč	5/2010.	V	VIII	VII	D	...	...
KFB 297	list	Deč	5/2010.	VI	V	V	H	B	B
KFB 298	pupoljak	Deč	5/2010.	III	IX	I	E	B	B
KFB 299	pupoljak	Deč	5/2010.	I	I	I	B	...	...
KFB 300	pupoljak	Deč	5/2010.	III	I	I	D	...	...
KFB 301	grana	Deč	5/2010.	VI	V	V	H	...	B
KFB 302	grana	Deč	5/2010.	VI	V	V	H	B	...
KFB 303	grana	Deč	5/2010.	I	I	I	B	F	B
KFB 304	grana	Deč	5/2010.	I	I	I	B	...	...
KFB 305	list	Erdevik	9/2010.	III	III	VI	A	C	D
KFB 306	list	Erdevik	9/2010.	III	III	VI	A	...	...
KFB 307	pupoljak	Erdevik	9/2010.	III	III	VI	A	...	...
KFB 308	pupoljak	Erdevik	9/2010.	III	III	VI	A	C	D
KFB 309	l.drška	Erdevik	9/2010.	III	III	VI	A	...	D
KFB 310	l.drška	Erdevik	9/2010.	III	III	VIII	A	...	...
KFB 311	list	Erdevik	9/2010.	III	III	VI	A	...	...
KFB 312	list	Erdevik	9/2010.	III	III	VI	A	...	...
KFB 313	list	Erdevik	9/2010.	III	III	VI	A	...	...
KFB 314	list	Požarevac	6/2011.	VII	III	IX	...	C	...
KFB 0114				...	...	II	G	D	C
KFB 0126				...	...	...	A	...	...
KFB 0146				...	...	...	...	D	A

Legenda: Simboli: NP, nije poznato; ..., soj nije uključen u analizu.

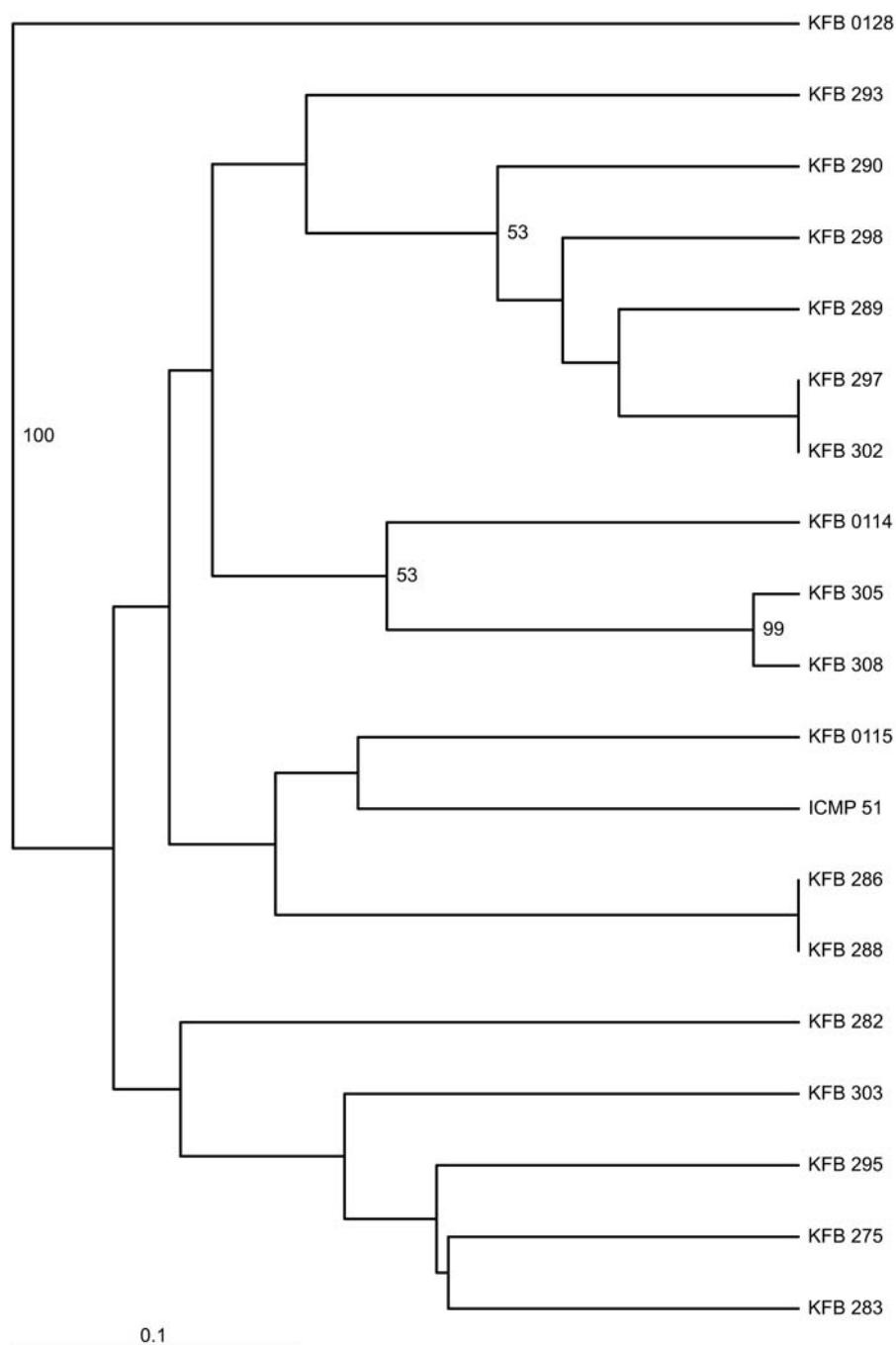
5.6.4 Restrikciona analiza i elektroforeza u pulsirajućem električnom polju

Genetički diverzitet 16 reprezentativnih Xac sojeva, diferenciranih na osnovu rep-PCR analize, proučen je primenom makrorestrikcione PFGE metode. Analizirani su i referentni sojevi Xac (KFB 0114), *X. a. pv. pruni*, (ICMP 51) i *X. a. pv. juglandis* (KFB 0115). Nakon digestije genomske DNK restrikcionim enzimom *SpeI* dobijeno je 12-15 fragmenata DNK čiji su veličina i položaj u gelu određeni upoređivanjem sa markerom. Dobijeni profili ukazali su na postojanje značajnog genetičkog diverziteta među proučavanim sojevima. Restrikcioni profili većinom su bili jedinstveni za svaki reprezentativni soj, što je bilo saglasno sa njihovom podelom u grupe na osnovu rep-PCR analize. Izuzetak su predstavljali sojevi KFB 305 i KFB 308 kod kojih je uočena razlika na nivou dva DNK fragmenta (Slika 22). Takođe, ustanovljene su razlike između sojeva KFB 283 i KFB 0128 koji su posedovali iste rep-PCR profile.

Na osnovu prisustva i odsustva dobijenih DNK fragmenata, prevođenjem podataka u binarnu matricu primenom UPGMA analize, sojevi su grupisani prema sličnosti. Na osnovu dobijenog dendrograma uočeno je 7 dominantnih klastera (A-G) sa indeksom sličnosti od 75 do 85% (genetička udaljenost od 0,15 do 0,25). U grupi A nalazio se samo jedan soj, KFB 0128 čiji se genetički profil najviše razlikovao od ostalih sojeva (0,25). Klaster B sačinjavalo je 6 sojeva (KFB 293, KFB 290, KFB 298, KFB 289, KFB 297, KFB 302), C grupa imala je 3 soja (KFB 0114, KFB 305 i KFB 308), u grupu D svrstani su kontrolni sojevi *X. a. pv. pruni* i *X. a. pv. juglandis* dok su dva soja (KFB 286 i KFB 288) činila grupu E. Soj KFB 282 izdvojen je u posebnu grupu F, a sojevi KFB 303, KFB 295, KFB 275 i KFB 283 svrstani su u poslednju G grupu. Test je izveden u dva ponavljanja na osnovu čega je potvrđena ponovljivost i pouzdanost rezultata dobijenih ovom metodom.



Slika 22. PFGE profili 16 reprezentativnih *Xac* sojeva dobijeni nakon digestije DNK sa *SpeI* endonukleazom i elektroforeze u pulsirajućem električnom polju. M – λ fag molekularni marker (Lambda phage concatemers, DNA molecular size marker); kontrolni sojevi: KFB 0114, *Xac*; KFB 0115, *X.a. pv. juglandis*; ICMP 51, *X.a. pv. pruni*. Veličine fragmenata označene su u kilobazama.



Slika 23. Dendrogram reprezentativnih *Xac* i referentnih sojeva KFB 0114, *Xac*; KFB 0115, *X.a. pv. juglandis* i ICMP 51, *X.a. pv. pruni* izveden na osnovu makrorestrikcionih PFGE profila korišćenjem UPGMA metode. Brojevi uz čvorišta predstavljaju “bootstrap” vrednosti za 1000 ponavljanja

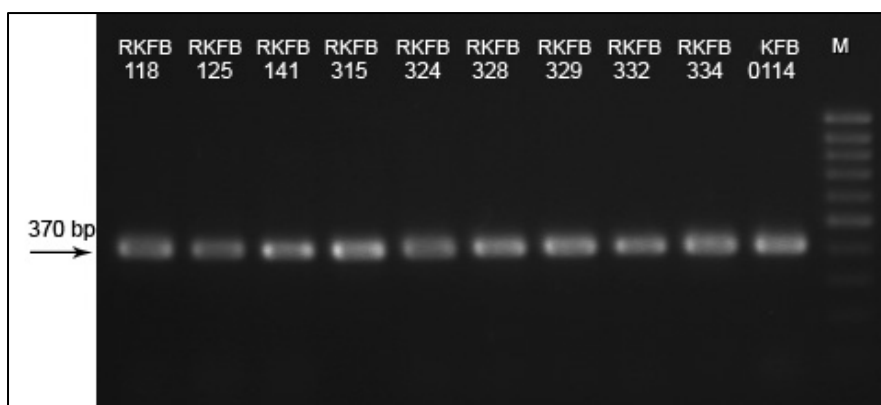
5.6.5 Dizajn prajmera i razvoj PCR metode za detekciju Xac sojeva

Specifični DNK fragmenti umnoženi ERIC-PCR analizom nakon kloniranja poslani su na sekvenciranje, nakon čega je utvrđena homogenost dobijenih sekvenci sa drugim sekvencama dostupnim u NCBI bazi gena. Nakon višestrukog poravnanja najbližnjih sekvenci iz baze, utvrđene su razlike među sekvencama i dizajnirana su tri para PCR prajmera koja su korišćena u PCR analizi. Pomoću dva seta, čije su karakteristike navedene u Tabeli 11, umnoženi su PCR produkti očekivane veličine kod svih proučavanih *corylina* sojeva. Treći set prajmera nije bio specifičan prema svim proučavanim sojevima, a takođe su umnoženi i brojni nespecifični fragmenti, te su isključeni iz dalje analize.

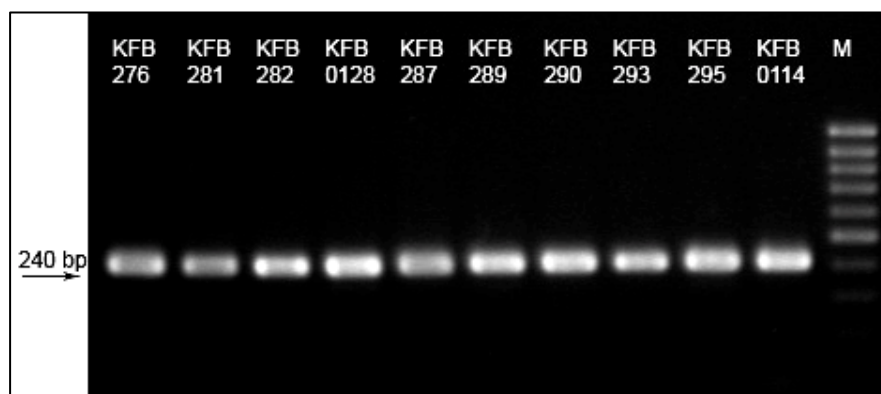
Tabela 11. Karakteristike prajmera dizajniranih za identifikaciju Xac sojeva

Prajmeri	Sekvenca	<i>T_m</i> (°C)	Dužina
AN10F	CCA CGT CGA CGA ACG GC	59.4	17
AN10R	CGG CGT CAA GGT GCC GG	62.8	17
AN7-300F	GTG ACT GGG GTG AGC GCA TCC	62.9	21
AN7-300R	GCG CGC GAT CAC CGC TTCC	64.9	19

Specifičnost prajmera analizirana je korišćenjem 46 proučavanih sojeva, pet kontrolnih Xac, kao i 20 referentnih sojeva, predstavnika *X. arboricola* i drugih *Xanthomonas* vrsta (Tabela 3). Korišćenjem para prajmera AN10R/AN10F dobijen je očekivani DNK fragment (Slika 23). U PCR reakciji sa AN7R/AN7F prajmerima umnožen je očekivani fragment veličine 300 bp kod svih 46 proučavanih sojeva, ali su umnoženi i brojni nespecifični fragmenti različite veličine (Slika 24). Međutim, i nakon optimizacije PCR reakcije, produkti DNK iste dužine i jačine signala dobijeni su i kod drugih *Xanthomonas* vrsta.



Slika 23. Umnoženi fragmenti kod proučavanih *Xac* sojeva primenom PCR metode sa prajmerima AN10F/AN10R. KFB 0114, referentni soj *Xac*. M, marker (MassRuler LowRange DNA Ladder, Fermentas, Litvanija).

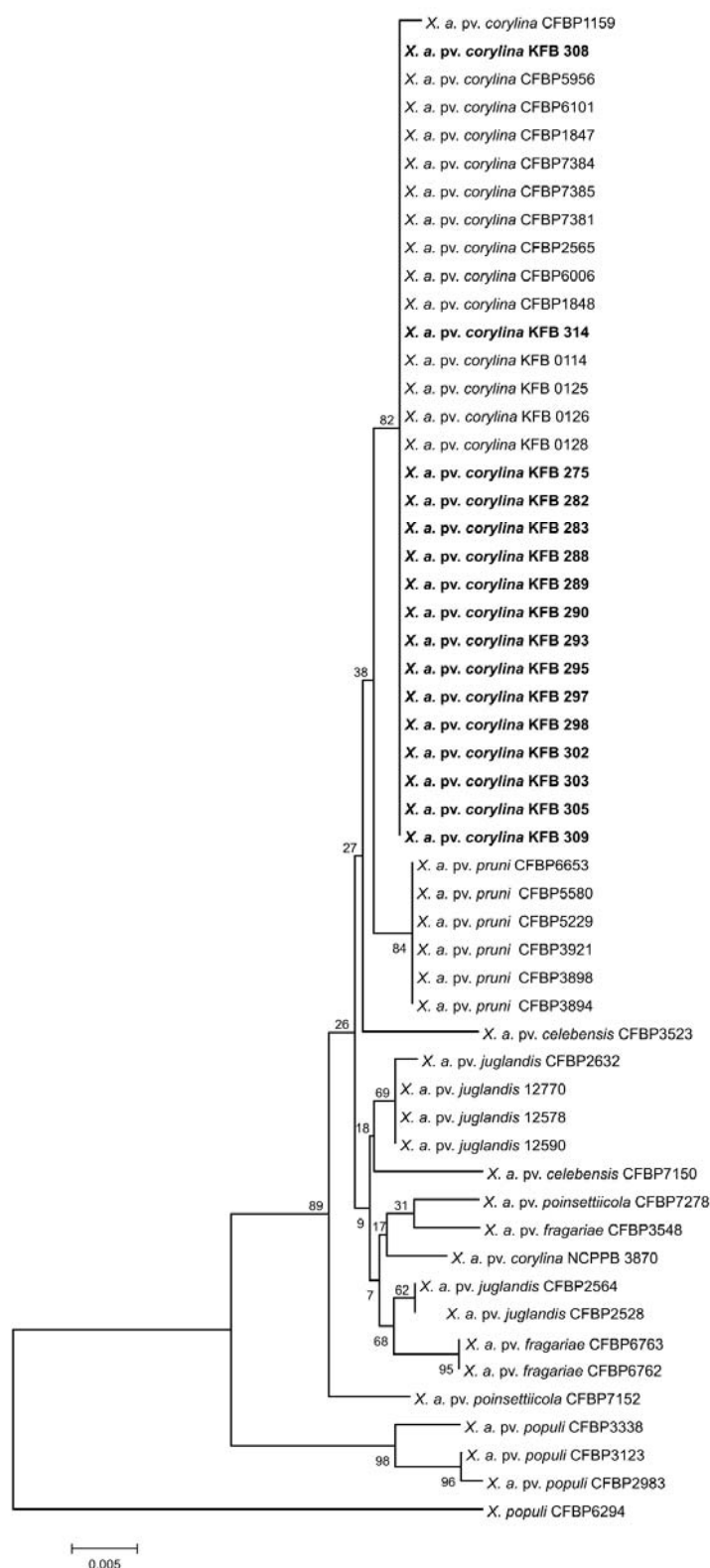


Slika 24. Umnoženi fragmenti kod proučavanih *Xac* sojeva primenom PCR metode sa prajmerima AN7F/AN7R. Referentni sojevi: KFB 0114, *Xac*, KFB 0156, *X. a. pv. celebensis* i KFB 0157, *X. a. pv. populi*. M, marker (MassRuler LowRange DNA Ladder, Fermentas, Litvanija).

5.6.6 Analiza *rpoD* gena

PCR analizom umnoženi su fragmenti *rpoD* gena veličine oko 1300 bp kod ukupno 20 *Xac* sojeva, od kojih je 16 sojeva poreklom iz naše zemlje i 4 iz međunarodnih kolekcija. BLAST analizom utvrđena je 100% identičnost dobijenih sekvenci sa sekvencama *Xac* sojeva dostupnim u bazi. Izuzetak su predstavljala tri soja iz baze podataka, CFBP 1159, CFBP 1847 i NCPPB 3870, sa kojima je procenat sličnosti iznosio 99%. Prema sprovedenoj BLAST analizi, sličnost nukleotidne

sekvence gena *corylina* sojeva sa sekvencama patovara *juglandis* i *pruni* iznosila je 99%. Filogenetska analiza izvedena na osnovu sekvenci *rpoD* gena ukazala je na blisku filogenetsku srodnost unutar vrste *X. arboricola*. Na filogenetskom stablu (Slika 25) uočena je diferencijacija i grupisanje sojeva koje je uglavnom bilo u saglasnosti sa podelom vrste prema patogenoj specijalizaciji. Izdvojeno je ukupno 9 grupa, pri čemu su proučavani sojevi, kao i 11 referentnih Xac sojeva dostupnih u bazi gena, formirali jasno izdvojenu grupu. Izuzetak je predstavljao referentni soj NCPPB 3870 čija se sekvenca *rpoD* gena razlikovala u odnosu na ostale Xac sojeve. Ovaj soj je na filogenetskom stablu izdvojen u posebnu grupu zajedno sa sojevima *X. a. pv. poinsettiicola* CFBP 7278 i *X. a. pv. fragariae* CFBP 3548. Najveća sličnost utvrđena je između *rpoD* sekvenci Xac i *X. a. pv. pruni* sojeva.



Slika 25. Dendrogram konstruisan na osnovu analize sekvence *rpoD* gena korišćenjem NJ metode. Uz čvorišta su naznačene “bootstrap” vrednosti (1000 ponavljanja). Dužina grana odgovara stopi supstitucija baznih parova. Sojevi proučavani u ovom radu označeni su podebljano. Filogenetsko stablo ukorenjeno je korišćenjem sekvence soja *X. populi* CFBP 6294.

6. DISKUSIJA

Leska je višegodišnja biljna vrsta sa dugom tradicijom gajenja u svetu i u nas. Zbog uticaja na uspeh proizvodnje, od izuzetnog značaja je poznavanje fitopatoloških problema koji prate gajenje ove biljne vrste. Povećanje površina pod leskom u poslednjih nekoliko godina, kao i pojava simptoma karakterističnih za bakterioze leske bili su razlog da se istraži njihova etiologija i prouči biologija prouzrokovala.

Radi utvrđivanja prisustva fitopatogenih bakterija uzorci obolelih biljaka leske prikupljeni su sa različitih lokaliteta u Srbiji. Nakon toga, pristupilo se izolaciji bakterija i odabiru čistih kultura za dalja istraživanja. Pored sojeva izolovanih u ovom radu, u istraživanja je uključeno i 7 sojeva poreklom iz Poljske, kao i referentni sojevi različitog geografskog porekla. Primenom klasičnih i savremenih laboratorijskih metoda proučene su njihove morfološke i odgajivačke, biohemijsko-fiziološke, patogene, serološke i genetičke odlike. Po prvi put Xac sojevi poreklom iz leske analizirani su primenom Biolog testa i analizom restrikcionih fragmenata u pulsirajućem električnom polju.

6.1 Izolacija bakterija

Izolacija je vršena iz različitih organa obolelih biljaka, maceriranjem tkiva u sterilnoj destilovanoj vodi, a potom zasejavanjem na podlogu od hranljivog agara. Na ovaj način, iz većine uzoraka izolovane su patogene bakterije čije su morfološke odlike ukazivale na pripadnost rodu *Xanthomonas*. Iako se prema EPPO dijagnostičkom protokolu preporučuje korišćenje GYCA ili YPGA podloga koje omogućavaju selektivnost pri izolaciji, metod izolacije na HA primenjen u našem radu bio je pogodan za izolaciju i dobijanje čistih kultura patogena. Ipak, u nekim slučajevima, odabir bakterijskih kolonija sa standardne podloge otežavalo je prisustvo saprofitnih bakterija sličnih morfoloških odlika koje su izolovane iz uzoraka biljnog materijala. Takođe, porast sojeva na podlozi bio je relativno usporen, što može predstavljati problem u slučaju izolacije saprofitnih organizama, koji usled bržeg razvoja na podlozi, mogu da prerastu ili onemoguće rast patogenih bakterija. Kako bi se smanjila mogućnost prisustva kontaminanata prilikom izolacije na neselektivnu podlogu, pored adekvatne dezinfekcije, preporučljivo je korišćenje svežeg biljnog materijala. U suprotnom,

ukoliko se izolacija vrši iz uzoraka biljnog tkiva u pođmakloj fazi razvoja bolesti na kojima je došlo do razvoja saprofitnih bakterija, preporučuje se korišćenje poluselektivnih podloga.

U našim istraživanjima najuspešnija izolacija izvršena je iz svežih uzoraka listova sa simptomima pegavosti kao i zaraženog tkiva ispod kore grana u početnim fazama razvoja bolesti. Manji uspeh izolacije postignut je iz drvenastih delova kao i pupoljaka sa simptomima uvelosti, što se može objasniti odsustvom ili prisustvom malog broja bakterija u uzorku, koji često nije dovoljan za detekciju raspoloživim metodama. U ovom slučaju, u cilju povećanja efikasnosti izolacije, pravljeni su poduzorci poreklom sa više različitih delova biljke. Izolacija iz obolelih plodova leske nije bila uspešna. Imajući u vidu podatak iz literature da plodovi retko bivaju napadnuti ovom bakterijom, kao i da slične promene na plodovima mogu prouzrokovati drugi biotski i abiotski činioci (Miller i sar., 1949), moguće je da uočeni simptomi nisu bili od dijagnostičkog značaja niti prouzrokovani fitopatogenim bakterijama. Takođe, iz literature je poznato da je izolacija bakterija iz biljnog materijala moguća tokom cele godine, ali da se najveći uspeh postiže tokom jeseni i u proleće, dok se tokom leta brojnost patogena u obolelom tkivu smanjuje, često ispod praga detekcije, što su potvrdila i naša istraživanja.

6.2 Proučavanje bakterioloških i patogenih odlika

Preliminarna identifikacija izolovanih sojeva, izvedena je primenom klasičnih bakterioloških metoda koje su usled jednostavnosti izvođenja i efikasnosti, i dalje nezaobilazne u eksperimentalnim istraživanjima fitopatogenih bakterija (Ward i sar., 2004). Za preliminarnu determinaciju čistih bakterijskih kultura pokazala se pogodnom GYCA podloga sa 1% glukoze, koja se u literaturi preporučuje kako za izolaciju, tako i za proučavanje morfologije *Xanthomonas* bakterija (Shaad, 2001; Anonymous, 2004). Sluzast i obilan razvoj kolonija registrovan nakon 3-5 dana razvoja ukazao je na stvaranje polisaharida svojstvenog *Xanthomonas* patogenima, što se smatra diferencijalnom karakteristikom ovih bakterija. sojeva. Iako su uočene male razlike u veličini i konzistenciji kolonija među pojedinim sojevima, proučavani sojevi ispoljili su

većinom homogene fenotipske odlike koje su odgovarale odlikama kontrolnog soja kao i Xac sojeva opisanih u literaturi (Miller i sar., 1949; Anonymous, 2004).

Proučavanjem biohemijsko-fizioloških odlika sojeva od značaja za identifikaciju Xac utvrđeno je da proučavani sojevi ispoljavaju visok stepen homogenosti, kao i da među pojedinim sojevima postoje izvesne razlike u pogledu navedenih odlika. Svi proučavani sojevi posedovali su sledeće karakteristike: stvaraju katalazu, ali ne i oksidazu, imaju slabo oksidativan metabolizam glukoze, stvaraju redukujuće supstance iz glukoze, laktoze, saharoze, stvaraju levan i vodonik sulfid, dok ni jedan od proučavanih sojeva nije redukovao nitrata.

U testovima korišćenja ugljenih hidrata jedine razlike među sojevima ispoljene su pri korišćenju šećera maltoze. Iako se u literaturi razgradnja maltoze navodi kao odlika karakteristična za Xac (Anonymous, 2004), u našim istraživanjima tri soja ispoljila su negativnu reakciju u ovom testu. Kod kontrolnog soja reakcija je ocenjena kao slabo pozitivna. Podaci o korišćenju pojedinih ugljenikovih jedinjenja od strane Xac sojeva zabeleženi u literaturi nisu u potpunosti saglasni (Pulawska i sar., 2010). Ovakva zapažanja ukazuju na potrebu standardizacije metoda u pogledu načina izvodjenja i tumačenja dobijenih rezultata, ali i na heterogenost sojeva u pogledu proučenih karakteristika.

Bitna diferencijalna odlika većine pripadnika roda *Xanthomonas* je mogućnost hidrolize skroba koji može poslužiti za preliminarnu identifikaciju (Vauterin i sar., 1995). U ovom testu svi sojevi ispoljili su amilolitičku aktivnost. Ova odlika je diferencijalna i u odnosu na patogeni varijetet *pruni*, sa kojim *corylina* sojevi imaju veliki broj zajedničkih karakteristika (Vauterin i sar., 1995). Veoma koristan test koji omogućava identifikaciju svih predstavnika vrste *X. arboricola* je proučavanje razgradnje kvinata na SQ podlozi, obzirom da je metabolizam kvinata univerzalna odlika ove grupe patogena (Lee i sar., 1992) Budući da su ispoljili pozitivnu reakciju u ovom testu, svi sojevi proučavani u ovom radu su na ovaj način identifikovani do nivoa vrste.

Pojava hipersenzitivne reakcije proučena je korišćenjem tri test biljke: duvana, paradajza i mahuna boranije. Na listovima paradajza svi proučavani sojevi prouzrokovali su hipersenzitivnu reakciju posle 24 časa. Na biljkama duvana, pored tipične pozitivne reakcije, zabeležena je i varijabilna reakcija u vidu žutila inokulisanog

tkiva, ili izostanka pojave lokalizovane nekroze karakteristične za HR, među različitim ponavljanjima eksperimenta. Razlike u sposobnosti predstavnika fitopatogenih patogena da prouzrokuju HR opisane su u literaturi (Klement i sar., 1990; Arsenijević, 1997). Istraživanja drugih autora potvrdila su pojavu izostanka tipične HR kod srodne bakterije *X. a. pv. juglandis* (Giovanardi i Moragrega, lična komunikacija). Usled varijabilne reakcije, provera patogenosti na biljkama duvana ne može se smatrati pouzdanom metodom za utvrđivanje patogenosti *Xac* sojeva, već je u ove svrhe preporučljivo korišćenje mladih biljaka paradajza.

Za preciznu identifikaciju bakterija do nivoa vrste ili soja, putem klasičnih metoda, neophodno je izvođenje testa patogenosti na biljci domaćinu. Na ovaj način, reprodukcijom simptoma prirodne infekcije, postiže se potvrda patogene prirode bakterije. Pri tome, moguće je koristiti različite procedure čiji izbor zavisi od vrste biljnog materijala, kao i tipa i dinamike pojave simptoma na biljkama (Klement i sar., 1990; Arsenijević, 1997). U ovom radu, test patogenosti izveden je na mladim jednogodišnjim sadnicama leske korišćenjem dva načina inokulacije biljaka.

Patogenost proučavanih sojeva potvrđena je primenom obe metode, ali su uočene razlike u reakciji biljaka, izgledu i dinamici pojave simptoma. Nakon inokulacije lisnih pupoljaka i grančica infiltracijom bakterijske suspenzije, većina proučavanih sojeva prouzrokovala je simptome na mladim, tek formiranim listovima, na kojima je uočena pojava mrkih pega okruženih tamnozelenom zonom vlažnog izgleda. Površina zahvaćena pegama vremenom se širi dovodeći do žutila, nekroze i prevremenog opadanja zaraženih listova. Ovaj test pokazao se vremenski manje zahtevan i pouzdaniji u odnosu na drugi metod, pri čemu su se simptomi infekcije ispoljili oko mesec dana nakon inokulacije. Metodom potapanja, došlo je samo do razvoja lokalnih simptoma na mestu povređivanja tkiva, zbog čega se ovaj metod može smatrati manje pogodnim za proučavanje patogenih odlika.

Intenzitet simptoma bolesti razlikovao se među pojedinim sojevima, što je primećeno u oba testa kako unutar pojedinačnog oglada, tako i među različitim ponavljanjima. Mogući uzrok slabijeg intenziteta simptoma može se objasniti razlikama u virulentnosti među sojevima, nedovoljnom osetljivošću inokulisanog tkiva, uslovima spoljne sredine, kao i stepenom osetljivosti korišćenog sortimenta. Međutim, obzirom

da su pojava i intenzitet ispoljenih promena varirali prilikom ponavljanja eksperimenta, nije bilo moguće izvršiti pouzdanu diferencijaciju sojeva na osnovu virulentnosti.

Izvođenje testa patogenosti veštačkom inokulacijom višegodišnjih biljaka i drvenastog tkiva može biti dugotrajan proces povezan sa dosta poteškoća, pri čemu nije uvek moguće postići reprodukciju simptoma bolesti. Pojava simptoma može biti uslovljena faktorima spoljašnje sredine, periodom vegetacije i fenofazom razvoja, kao i fiziološkim stanjem biljke. Za ostvarenje infekcije potrebni su visoka vlažnost vazduha i posebni uslovi koji verovatno doprinose fitopatogenoj aktivnosti patogena u prirodi, na otvorenom polju. Različita osetljivost sortimenta, takođe, može doprineti odsustvu ili slabijoj pojavi bolesti.

6.3 Biolog test

Izuzev izvođenja svakog testa ponaosob standardnim biohemijskim metodama, postupak proučavanja metaboličke aktivnosti bakterija u novije vreme u velikoj meri je pojednostavljen primenom automatizovanih metoda.

Proučavanje sposobnosti razgradnje 95 različitih jedinjenja Biolog testom ukazalo je na raznolikost *Xanthomonas* sojeva poreklom iz leske, u pogledu korišćenja izvora ugljenika i azota. Na osnovu metaboličkih profila bilo je moguće determinisati supstrate koje su razlagali svi ili većina proučenih sojeva, kao i jedinjenja koja su bila svojstvena pojedinim sojevima. Međusobna sličnost ispoljena je u pogledu korišćenja 20 izvora ugljenika, dok je metabolička raznovrsnost ustanovljena u razlaganju 25 proučavanih jedinjenja. Pomoću ovog testa diferencirani su sojevi međusobno; takođe izvršeno je razdvajanje svih proučavanih sojeva od referentnog soja *X.a. pv. pruni* KFB 0104, čiji je profil izdvojen u zasebnu grupu. I u ovom testu potvrđeno je odstupanje u korišćenju disaharida maltoze kod soja KFB 286, u odnosu na ostale sojeve proučene ovom metodom. Informacije o korišćenju pojedinih izvora ugljenika od strane proučavanih sojeva, mogu se upotrebiti u dijagnostičke svrhe - za određivanje sastava selektivnih podloga. Takođe izvori ugljenika mogu predstavljati biohemijski marker za diferencijaciju sojeva unutar vrste ili genetičke grupe (Vauterin i sar., 1995).

Tačna i precizna identifikacija nepoznatih sojeva analiziranih ovom automatizovanim metodom zavisi u najvećoj meri od kvaliteta baze podataka koju

sistem koristi. Obzirom da Xac sojevi, koliko je nama poznato, nisu do sada proučavani ovim testom i da ovaj patogen nije obuhvaćen korišćenom bazom podataka, nije bilo moguće izvršiti tačnu identifikaciju proučavanih sojeva. Sojevi su identifikovani kao predstavnici 6 različitih patogenih varijeteta vrste *Xanthomonas campestris*. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da koeficijenti sličnosti omogućavaju poređenje sojeva sa vrstama iz baze podataka prema sličnosti profila, ali da se ne mogu smatrati pouzdanim pokazateljem identiteta.

Nizak procenat ispravne identifikacije sojeva Biolog testom navode i drugi autori (Jones i sar., 1993; Verniere i sar., 1993; Bouzer i sar., 1994) koji ukazuju da se procenat tačne identifikacije može povećati dopunjavanjem baze sa sojevima od interesa za istraživanja, kao i povećanje diverziteta proučavane grupe ili srodnih sojeva (Jones i sar., 1993). Istraživanja Vernier i saradnika (1993) i Bouzer i saradnika (1994) potvrdila su navedene nedostatke, ali su istovremeno ukazali na veliki potencijal metode u identifikaciji i razlikovanju *Xanthomonas* patogena nakon uključivanja profila sojeva proučavane vrste u bazu podataka. Pouzdanost i primenu Biolog testa u utvrđivanju identiteta *Xanthomonas* sojeva dodatno otežava činjenica da nazivi vrsta u bazi nisu usklađeni sa promenama u taksonomiji i najnovijoj klasifikaciji roda iz 1995. godine.

6.4 Serološke metode identifikacije

Brze i osetljive metode za detekciju, identifikaciju i kvantifikaciju patogena u biljnom tkivu od izuzetnog su značaja u primenjenoj biljnoj patologiji i kontroli bolesti. U ovom radu proučena je mogućnost detekcije i identifikacije čistih kultura sojeva izolovanih iz leske korišćenjem DAS ELISA i IF testa. Obe metode omogućile su brzu potvrdu identiteta sojeva Xac izolovanih iz leske.

U DAS - ELISA testu svi proučavani sojevi reagovali su sa primenjenim antiserumom za Xac, pri čemu su ispoljili iste antigene karakteristike kao i kontrolni soj Xac, KFB 0114. Prednosti ove metode su osetljivost i brzina izvođenja, dok je glavni nedostatak nedovoljna specifičnost, zbog upotrebe manje specifičnih poliklonalnih antitela. Međutim, obzirom na razlike u spektru domaćina Xac sa srodnim *Xanthomonas*, ali i nekim *Pseudomonas* patogenima sličnih seroloških odlika sa kojima antiserum reaguje, verovatnoća pogrešne dijagnoze je veoma mala.

Pored visoke osetljivosti, prednost testa imunofluorescencije je posmatranje fluorescentnih kolonija pod mikroskopom. Dobijeni rezultati IF testa bili su u saglasnosti sa prethodnim serološkim testom, čime je potvrđena antigena uniformnost proučavanih sojeva. Uprkos riziku od pojave ukrštene i lažno pozitivne serološke reakcije, pre svega prilikom detekcije bakterija iz biljnog materijala, ove metode mogu se preporučiti za rano otkrivanje patogena u uzorku i detekciju bakterija (Schaad, 1979; Hampton i sar., 1979). Ipak, razvoj monoklonalnih antitela doprineo bi povećanju specifičnosti i pouzdanosti seroloških metoda u identifikaciji Xac.

6.5 Osetljivost prema baktericidima

Osnovna mera kontrole bakterioznih oboljenja biljaka zasniva se na primeni jedinjenja bakra i antibiotika. Međutim, korišćenje navedenih jedinjenja u praksi često ne daje zadovoljavajuće rezultate, posebno u uslovima povoljnim za razvoj patogena. Jedan od razloga smanjene efikasnosti ovih agenasa je pojava rezistentnih sojeva patogena koja značajno smanjuje efekat zaštite (Marco i Stall, 1983; Adaskaveg i Hine, 1985). U ovom radu proučena je *in vitro* osetljivost proučavanih sojeva na bakarna jedinjenja najčešće korišćena u našoj poljoprivrednoj praksi, kao i na antibiotike koji nisu registrovani za primenu u našoj zemlji.

Pojava otpornosti na bakar uobičajena je među *Xanthomonas* sojevima poreklom sa različitih domaćina i područja gde je prisutna učestala primena bakarnih preparata za kontrolu bolesti (Adaskaveg i Hine, 1985; Sundin i Bender, 1993). U našim istraživanjima proučavani sojevi ispoljili su različitu osetljivost na jedinjenja bakra. Većina sojeva bila je otporna na 100 ppm, dok je inhibitorna koncentracija bakra za sve sojeve iznosila 200 ppm. Najveća tolerantnost ispoljena je prema bakar-sulfatu, zatim bakar-oksikloridu, a najmanja prema formulaciji bakar-hidroksida. Ipak, primenjene koncentracije bile su 10 i 5 puta niže u odnosu na količinu aktivne komponente preporučene za tretiranje nekih biljaka u polju (oko 1000 -1200 ppm) što ukazuje u populaciji Xac poreklom iz Srbije nije došlo do razvoja rezistentnosti i da primena ovih baktericida u kontroli bakteriozne plamenjače leske može biti efikasna. Ipak, razlike u osetljivosti sojeva uočene u eksperimentu ukazuju na mogućnost razvoja otpornosti Xac na pojedina jedinjenja bakra.

Primena antibiotika u biljnoj proizvodnji zabranjena je u većini evropskih zemalja, za razliku od SAD gde se oni uspešno primenjuju dugi niz godina. Kod nas nema registrovanih preparata na bazi antibiotika, ali se oni nezvanično koriste u zaštiti bilja (Obradović i Ivanović, 2007). Stoga postoji opasnost od pojave rezistentnosti tretiranih bakterija na antibiotike, pri čemu poseban problem predstavlja njihova nepravilna i nekontrolisana primena. Iako ne postoje podaci o korišćenju ovih supstanci u proizvodnji leske, u našim eksperimentima potvrđeno je da su svi proučavani sojevi osetljivi prema streptomycin sulfatu i kasugamicinu. Najveću efikasnost imao je streptomycin-sulfat koji je delovao baktericidno pri nižim koncentracijama (25 ppm) u odnosu na kasugamicin. Koncentracija kasugamicina od 50 ppm delovala je inhibitorno samo na dva soja, a povećanjem koncentracije na 100 ppm zaustavljen je rast većine proučavanih sojeva.

Povećana otpornosti sojeva na pesticide najčešće nastaje kao posledica česte i dugotrajne primene ovih jedinjenja. Da bi se usporio nastanak rezistentnosti i očuvala efikasnost baktericida u zaštiti od bakteriozne palmenjače, neophodna je njihova kontrolisana i racionalna primena u praksi. Obzirom na podatak da se pri višekratnoj izloženosti patogena navedenim baktericidima tolerantnosti sojeva povećava postoji potreba za kontinuiranim praćenjem pojave rezistentnih bakterija u populaciji patogena, posebno u zasadima gde se redovno primenjuju hemijske mere zaštite.

6.6 PCR analiza

Usled brojnih nedostataka koje prate primenu klasičnih metoda, ukazala se potreba za razvojem brzih i pouzdanih dijagnostičkih metoda visoke osetljivosti i specifičnosti. Iako su u detekciji fitopatogenih bakterija u novije vreme u velikoj meri zastupljene molekularne metode, to nije slučaj i sa prouzrokovačem bakteriozne palmenjače leske, jer ne postoji specifično molekularno sredstvo za detekciju ovog patogena (Anonymous, 2004. Janse, 2010). Ipak, neki od postojećih PCR protokola mogu biti korisni za rano otkrivanje prisustva patogena i potvrdu rezultata klasičnih metoda.

U ovom radu taksonomska pripadnost proučavanih sojeva rodu *Xanthomonas* potvrđena je primenom standardne PCR metode korišćenjem specifičnih prajmera za

detekciju dela 16S rRNK gena (Maes i sar., 1993). Ova metoda omogućila je uspešnu detekciju testiranih sojeva tako što je došlo do umnožavanja specifičnih fragmenata DNK. Pothier i sar.(2011) dizajnirali su prajmere XarbQF/XarbQR za detekciju sekvence *qumA* gena odgovornog za metabolizam kvinata svojstven *X. arboricola* patovarima. Karakteristična sekvenca ovog gena umnožena je kod svih proučavanih sojeva čime je potvrđena njihova pripadnost vrsti *X. arboricola*. Obzirom da su u istraživanjima Pothier i sar., (2011) prajmeri dizajnirani za detekciju *X. a. pv. pruni* (XapY17-F/XapY17-R), ispoljili visoku specifičnost prema Xac sojevima, u okviru ovog istraživanja izvedena je dupleks PCR analiza sa kombinacijom navedenih i *X. arboricola* specifičnih prajmera. Dok je sekvenca *qumA* gena umnožena kod svih 47 sojeva, sa prajmerima koji umnožavaju fragment *ftsX* gena, do specifičnog umnožavanja nije došlo kod 3 proučavana soja koji su se razlikovali od ostalih i u korišćenju šećera maltoze. Negativan rezultat kod ove grupe sojeva može se objasniti odsustvom ciljane sekvence, ili promenama u redosledu nukleotida DNK bakterije nastalim nekim tipom mutacije.

Ovi rezultati, kao i razlike među Xac sojevima u pogledu pojedinih fizioloških odlika, ukazuju na postojanje varijabilnosti unutar populacije patogena. Za potvrdu ove pretpostavke potrebno je sprovesti dodatna proučavanja većeg broja Xac sojeva različitog porekla. Nedostatak specifičnosti XapY17-F/ XapY17-F R prajmera prema svim proučavanim sojevima ukazuje na neophodnost iznalaženja visoko specifične i pouzdane PCR metode za detekciju Xac.

6.7 Sekvenciona analiza 16S rRNA gena

Nukleotidni sastav gena za 16S ribozomalnu subjedinicu (16SrRNK) predstavlja značajan parametar u savremenoj taksonomiji bakterija. Visoka homogenost sekvence 16S rRNK u okviru roda *Xanthomonas* (Hauben i sar., 1997) ukazuje da ovaj region nije dovoljan za definisanje odnosa između usko povezanih taksonomskih grupa. Kako bismo potvrdili ovu pretpostavku u slučaju Xac sojeva, analizirana je parcijalna nukleotidna sekvenca ovog genskog lokusa kod odabranog soja KFB 275. Obzirom da je uočen visok stepen nukleotidne sličnosti (98-100%) sa sekvencama drugih

Xanthomonas spp. dostupnih u banci gena diferencijacija je izvršena samo na nivou roda, čime su potvrđena istraživanja drugih autora.

6.8 Genetički diverzitet proučavanih sojeva

Fenotipske karakteristike sojeva od suštinskog su značaja za karakterizaciju fitopatogenih bakterija, ali su nedovoljne za diferencijaciju patogena do nivoa patovara ili soja. Stoga, pristupilo se istraživanjima genetičkog diverziteta populacije patogena koja doprinose razumevanju taksonomije, porekla i srodnosti sojeva, kao i dinamike populacije između različitih proizvodnih područja i regiona (Milgroom, 2001). Molekularna karakterizacija i analiza genetičkog diverziteta proučavanih sojeva izvršeni su primenom rep-PCR i PFGE metoda. Na osnovu dobijenih genetičkih profila utvrđene su varijacije unutar populacije i definisane klonalne grupe. Pored toga, krajnji cilj navedenih analiza bio je razvoj molekularnih markera za detekciju patogena putem PCR metode.

Studije koje su se bavile proučavanjem diverziteta populacije *X. arboricola* patogena ukazale su na različit stepen diverziteta. Genetički diverzitet utvrđen kod *juglandis* sojeva veoma je značajan, a moguće je i grupisanje sojeva na osnovu geografskog porekla (Scortichini i sar., 2002). Nasuprot tome, populaciju sojeva koji parazitiraju *Prunus* vrste odlikuje nizak stepen polimorfizma, odnosno homogena struktura (Zaccardelli i sar., 1999; Bouden i sar., 2005). Hipotezu da *X.a. pv. pruni* sojevi pripadaju jednoj populaciji sa veoma niskim genetičkim diverzitetom Hajri i saradnici (2011) objasnili su distribucijom istog sortimenta u svim oblastima gajenja, kao i veoma ograničenim genetičkim diverzitetom domaćina. Nasuprot tome, kultivacija *Juglans regia* bazira se uglavnom na lokalnim sadnicama koje su prilagođene specijalnom okruženju i omogućile selekciju različitih lokalnih populacija *X.a. pv. juglandis* patogena. Genetički diverzitet Xac je takođe visok, jer su zabeležene razlike u genetičkim i patogenim odlikama između sojeva izolovanih iz različitih *Corylus* vrsta (Scortichini i sar., 2002b).

Rep-PCR metodom, na osnovu dobijenih rep-PCR profila, utvrđeno je postojanje genetičkog diverziteta i izvršena diferencijacija proučavanih sojeva.

Izdvojeno je više klonalnih grupa, između kojih je maksimalna genetička udaljenost iznosila 96%, dok su sojevi unutar jedne grupe imali iste ili skoro identične profile.

PFGE analiza omogućila je detekciju genetičkih varijacija unutar Xac populacije. Dobijeni makrorestriktivni profili 16 reprezentativnih sojeva bili su različiti, sa veoma malim brojem zajedničkih fragmenata. Usled izraženog DNK polimorfizma, pomoću ove metode nije bilo moguće utvrditi fragmente DNK zajedničke svim proučavanim sojevima, koji bi poslužili kao potencijalni molekularni markeri.

Obe primenjene metode bile su pogodne za analizu genetičkog diverziteta i detekciju varijabilnosti među proučavanim sojevima. Međutim, PFGE metoda ispoljila je veću diskriminacionu moć, jer su ovom metodom ustanovljene razlike među sojevima koji su imali identične rep-PCR profile. Takođe, klonalne grupe utvrđene rep-PCR metodom, zasnovane su na manjem stepenu polimorfizma u odnosu na formirane PFGE grupe.

Stoga je neophodno u analizu uključiti veliki broj sojeva kako bi se povećala značajnost i pouzdanost formiranih grupa. PFGE analiza ispoljila je i veći stepen ponovljivosti (nije prikazano), ali glavni nedostaci metode u vidu zahtevnosti u posebnoj aparaturi i iskustvu izvođenja, čine je manje pogodnom i dostupnom za rutinsku primenu.

Postojanje diverziteta može ukazati na više različitih introdukcija patogena, verovatno putem sadnog materijala poreklom iz različitih geografskih područja. Međutim, za potvrdu ove pretpostavke, potrebno je analizirati veliki broj sojeva kako bi se utvrdilo postojanje haplotipova i značaja geografskog porekla za diverzitet sojeva.

6.9 Dizajn prajmera

Pouzdana i brza detekcija i identifikacija Xac sojeva bazirani su na klasičnim metodama iako je prouzrokovatelj bakteriozne plamenjače leske davno poznat i široko rasprostranjen patogen. Zbog toga je jedan od ciljeva u ovom radu bio razvoj molekularnih markera za detekciju patogena putem PCR metode.

U ovom istraživanju, dizajnirana su dva para prajmera na osnovu nukleotidni sekvenci umnoženih Rep-PCR metodom. Prajmeri AN10-F/AN10-R bili su pouzdani u detekciji kolekcije Xac sojeva različitog geografskog porekla, pri čemu je nakon

optimizacije PCR reakcije došlo do umnožavanja ciljanog DNK fragmenata. Iako su primenjeni različiti uslovi PCR reakcije u pogledu temperature vezivanja prajmera i modifikacije količine komponenti, prajmerima AN7-F/AN-R, pored specifičnih, umnoženi su i nespecifični DNK fragmenti slabijeg intenziteta, što je ukazalo na nedostatke dizajniranih sekvenci.

Proučavanja specifičnosti AN10-F/AN10 prajmera rezultirala su detekcijom DNK fragmenta iste dužine kod referentnih *Xanthomonas* i *X. arboricola* sojeva uključenih u analizu, što predstavlja znak nedovoljne specifičnosti. Stoga, njihova primena može biti pogodna za detekciju *Xanthomonas* kolonija poreklom iz leske, ali ne i za diferencijaciju od srodnih predstavnika ovog roda kod kojih, takođe, dolazi do umnožavanja ciljanog PCR fragmenta.

Poteškoće prilikom razvoja PCR metode za specifičnu detekciju *X. arboricola* patovara, već su opisani u literaturi od strane drugih autora (Pagani, 2004; Pothier i sar., 2011) što se može objasniti visokom genetičkom sličnošću sojeva iste vrste. U cilju diferencijacije *X. arboricola* sojeva, potrebno je primeniti različite molekularne metode koje omogućavaju veći stepen diskriminacije. Takođe, savremeni pristup koji podrazumeva sekvenciranje i uporednu analizu većeg dela ili celog genoma ovih bakterija, pogodan je za utvrđivanje prisustva/odsustva polimorfizma i otkrivanje specifičnih karakteristika na nivou patovara, na šta ukazuju istraživanja Hajri i sar., (2012).

6.10 Analiza *rpoD* gena

Konstitutivni geni podložniji su promenama koje se događaju u genomu bakterija tokom evolucije u odnosu na 16S rRNK region. Stoga predstavljaju pogodne genetičke markere pomoću kojih se mogu razlikovati i grupisati sojevi iste vrste. Filogenetska pozicija reprezentativnih sojeva izolovanih u ovom radu proučena je analizom *rpoD* gena, koji je već korišćen od strane drugih autora u proučavanju odnosa između *X. arboricola* patogena (Hajri i sar., 2012). Takođe, izvršeno je poređenje sa referentnim Xac sojevima različitog porekla, kao i sa drugim *X. arboricola* sojevima sličnih fenotipskih karakteristika.

Rezultati naših istraživanja u saglasnosti su sa istraživanjima Hajri i sar. (2012). Na filogenetskom stablu patogeni varijeteti vrste *X. arboricola*, većinom su formirali jasne genetičke gupe podržane visokim “bootstrap” vrednostima čime je potvrđeno da ovi patovari predstavljaju odvojene genetičke vrste. Svi Xac sojevi formirali su homogenu grupu, izuzev referentnog soja NCPPB 3870 poreklom iz Italije, što ukazuje na heterogenost sojeva unutar Xac populacije. Na osnovu sprovedene analize može se zaključiti da *rpoD* gen predstavlja informativan i pogodan genetički marker za proučavanje filogenetskih odnosa među *X. arboricola* patovarima.

7. ZAKLJUČAK

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

- ✦ Proizvodnju leske u našim uslovima ugrožava pojava fitopatogenih bakterija koje su u ovom radu identifikovane kao *X. arboricola* pv. *corylina*. Na osnovu proučavanja morfoloških, odgajivačkih i biohemijsko-fizioloških odlika izvršena je preliminarna identifikacija izolovanih sojeva čije su karakteristike odgovarale odlikama *Xac* sojeva opisanim u literaturi.
- ✦ Proučavanjem patogenih karakteristika i reprodukcijom simptoma prirodne infekcije na biljci domaćinu proučavani sojevi identifikovani su kao *X. a.* pv. *corylina*.
- ✦ Korišćenjem Biolog testa ustanovljene su razlike u metaboličkoj aktivnosti među proučavanim sojevima. Metabolički profili sojeva specifični su za bakterije roda *Xanthomonas*, i nemaju veliku sličnost sa predstavnicima drugih rodova.
- ✦ Primenom DAS-ELISA i IF testa potvrđeno je da svi proučavani sojevi poseduju zajedničke antigene karakteristike kao i kontrolni soj. Molekularne PCR metode pokazale su se pogodnim za identifikaciju proučavanih sojeva do nivoa vrste.
- ✦ Molekularna karakterizacija sojeva ukazala je na značajan genetički diverzitet i heterogenost proučavanih sojeva različitog geografskog porekla. Korišćenjem PFGE i rep-PCR metoda utvrđene su razlike u strukturi genoma i definisane genetičke grupe među proučavanim sojevima.
- ✦ Velika srodnost *Xanthomonas arboricola* patogena otežava razvoj molekularnih metoda za detekciju do nivoa patovara. Iako je postignuta uspešna detekcija svih proučavanih sojeva, specifičnost prajmera dizajniranih u ovom radu nije bila zadovoljavajuća, obzirom da je pozitivna reakcija u PCR testu zabeležena i kod nekih srodnih *Xanthomonas* vrsta i patogenih varijeteta.
- ✦ Eksperimentalna proučavanja *in vitro* ukazala su na osetljivost proučavanih sojeva na baktericide. Najveću osetljivost sojevi ispoljavaju na antibiotike, što je i

očekivano, obzirom da ovi preparati nisu registrovani za primenu u našoj zemlji. Različita osetljivost sojeva prema preparatima na bazi bakra ukazuje na mogućnost razvoja otpornosti Xac sojeva na pojedina jedinjenja bakra, te je, stoga neophodna njihova racionalna i kontrolisana primena.

8. LITERATURA:

- Adaskaveg, J.E., Hine, R.B. (1985): Copper tolerance and zinc sensitivity of Mexican strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, causal agent of bacterial spot of pepper. *Plant Disease* 69:993-996.
- Agrios, G.N. (1995): *Plant Pathology*. Elsevier Academic Press, Burlington, Massachusetts, USA.
- Alabouvette C., Olivain, C., Steinberg, C. (2006): Biological control of plant diseases: the European situation. *European Journal of Plant Pathology* 114:329–341.
- Alay, K., Altinyay, N., Hancioglu, O., Dundar, F., Unal, A. (1973): Studies on desiccation of hazelnut branches in the Black Sea region. *Bitiki Koruma Bulteni* 13: 202-213.
- Ali, B., Kazempour, M. N., Elahinia, S. A. (2006): Investigation of bacterial blight of hazelnut in Guilan province. *Iranian Journal of Plant Pathology* 42(3): 459-471.
- Anderson, M. J., Nameth, S. T. (1990): Development of a polyclonal antibody-based serodiagnostic assay for the detection of *Xanthomonas campestris* pv. *pelargonii* in geranium plants. *Phytopathology* 80: 357–360.
- Anonymous (2004): Diagnostic protocols for regulated pests PM 7/22(1). *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina*. *OEPP/EPPO Bulletin*, 34:155-157.
- Anonymous (2009): Indirect immunofluorescence test for plant pathogenic bacteria – PM7/97 (1). *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 39: 413-416.
- Anonymous (2010): ELISA tests for plant pathogenic bacteria – PM 7/101 (1). *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 40: 369-372.
- Arsenijević, M.(1997): *Bakterioze biljaka*. S Print, Novi Sad.
- Ayache, J., Beaunier, L., Boumendil, J., Ehret, G., Laub, D. (2010): *Sample Preparation Handbook for Transmission Electron Microscopy*. Springer ScienceBusiness Media, LLC.

- Balaž, J., Doroški, H., Kiryakov, I. (2004): Testiranje mogućnosti identifikacije gramnegativnih fitopatogenih bakterija pomoću "Atb Expression" i Biolog sistema. V Kongres o zaštiti bilja, Zlatibor, 22-26. novembar, Zbornik rezimea, 100.
- Barss, H.P. (1913): A new filbert disease in Oregon. Oregon Agricultural Experiment Station Biennial Crop Pest and Horticulture Report 14: 213-223.
- Biolog Inc. (2001): Gram Negative Identification Test Panel Brochure.
- Boudon, S., Manceau, C., Nottéghem, J.L. (2005): Structure and origin of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* populations causing bacterial spot of stone fruit trees in Western Europe. *Phytopathology* 95:1081-1088.
- Bouzar, H., Jones, J.B., Stall, R.E, Hodge, N.C, Minsavage, G.V., Benedict, A.A, Alvarez, A.M.(1994): Physiological, chemical, serological, and pathogenic analyses of worldwide collection of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Phytopathology* 84: 663–671.
- Bradbury, J.F. (1987): *Xanthomonas campestris* pv. *corylina*. CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria No. 896. CAB International, Wallingford, UK.
- Bradbury, JF Guide to plant pathogenic bacteria, p. 190-197. CAB International Mycological Institute, Kew, United Kingdom. 1986.-NEMAM
- Brajušković, G. (2005): Pola veka elektronske mikroskopije u Srbiji. *Vojnosanitetski preglad* 12: 939-943.
- Brinkerhoff, L. A. (1970): Variation in *Xanthomonas malvacearum* and its relation to control. *Annual Review of Phytopathology* 8: 85-110.
- Burr, T., Norelli, J. (1990): Antibiotics. In: Methods in phyto bacteriology. Eds. Klement Z, Rudolph K, Sands D. Akademiai Kiado, Budapest, p. 327–331.
- Ćalić, A., Gašić K., Ivanović, M., Obradović, A., Ferrante, P., Scortichini, M. (2009): New occurrence of *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina* on European hazelnut in Serbia. Annual COST 873 Meeting, Cetara, Italy, October 26 - 29. Book of abstract, 89.

- Chan, J.W.Y.F., Goodwin, P.H. (1999): Differentiation of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* from *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans* by PFGE and RFLP. *European Journal of Plant Pathology* 105: 867–878.
- Chase, A. R., Stall, R. E., Hodge, N. C., Jones, J. B. (1992): Characterization of *Xanthomonas campestris* strains from aroids using physiological, pathological and fatty acid analyses. *Phytopathology* 82: 754–759.
- Cirvilleri, G., Fiori, M., Bonaccorsi, G., Scuderi, S., Viridis, S., Scortichini, M. (2006): Occurrence of *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina* on hazelnut orchards in Sardinia and Sicily. *Journal of Plant Pathology* 88: 338.
- Civeroleo, L. (1984): Bacterial cancer disease of citrus. *Journal of the Rio Grande Valley Horticultural Society* 37: 127-146.
- Control of bacterial blight of hazelnut Ministry of Agriculture, British Columbia
<http://www.agf.gov.bc.ca/cropprot/hazelnutblight.htm>
- Cooksey, D.A., Graham, J.H. (1989): Genomic fingerprinting of two pathovars of phytopathogenic bacteria by rare-cutting restriction enzymes and field inversion gel electrophoresis. *Phytopathology* 79: 745-750.
- Data sheets on Quarantine Pests No. 134 (1986): *Xanthomonas campestris* pv. *corylina*. *Bulletin OEPP/EPPO* 16: 13-16.
- Dhinra, O. D., Sinclair, J. B. (1995): Establishment of disease and testing for resistance. In: „Basic Plant Pathology Methods“, 2nd ed. CRC Press Inc., Boca Raton, FL.str.151-215.
- Dickstein, E.R., Jones, J.B., Stead, D.E. (2001): Automated Techniques, Physiological and Biochemical Methods. In: *Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. Eds. Schaad, N.W., Jones, J.B., Chun, W. APS Press, St. Paul, USA, p. 343-347.
- Dye, D. W. & Lelliott, R. A. (1974): Genus II. *Xanthomonas*. In *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th edn,. Eds. Buchanan, R. E., Gibbons, N. E. Williams & Wilkins, Baltimore,USA, p. 243-249.
- EPPO quarantine pest. Data Sheets on Quarantine Pests. *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina*.

- Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO (2011).
<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>
- Gardan, L. (1982): La bactériose du noisetier. 3èmes journées françaises d'études et d'informations sur les maladies des plantes, p. 489-495. ACTA, Paris, France.
- Gardan, L. (1983): Bacterial blight of hazelnut caused by *Xanthomonas corylina*. Convegno Internazionale sul Nocciolo Avellino, p. 443-450.
- Gardan, L., Deveau, M. (1987): La bactériose du noisetier (*Xanthomonas campestris* pv. *corylina*): biologie de la bactérie. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 17: 241-250.
- Gent, D.H., Schwartz, H.F., Ishimaru, C.A., Louws, F.J., Cramer, R.A., Lawrence, C.B., (2004): Polyphasic characterization of *Xanthomonas* strains from onion. Phytopathology 94: 184-195.
- Guerrero, C.J., Lobos, A.W. (1987): *Xanthomonas campestris* pv. *corylina*, causal agent of bacterial blight of hazel in region IX, Chile. Agricultura Técnica Santiago 47: 422-426.
- Hajri, A., Brin, C., Hunault, G., Lardeux, F., Lemaire, C., Manceau, C., Boureau, T., Poussier, S. (2009): A 'repertoire for repertoire' hypothesis: repertoires of type three effectors are candidate determinants of host specificity in *Xanthomonas*. PLoS ONE 4, e6632.
- Hajri, A., Pothier J., Fischer-Le Saux, M., Bonneau, S., Poussier, S., Boureau, T., Duffy, B., and Manceau, C. (2012): Type three effector gene distribution and sequence analysis provide new insights into the pathogenicity of plant-pathogenic *Xanthomonas arboricola*. Applied and Environmental Microbiology 78(2):371.
- Hampl, V., Pavlicek, A., Flegr, J. (2001): Construction and bootstrap analysis of DNA fingerprinting-based phylogenetic trees with the freeware program FreeTree: Application to trichomonad parasites. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 51, 731-735.
- Hampton, R., Ball, E., De Boer, S., ed., 1993: Serological Methods for Detection and Identification of Viral and Bacterial Plant Pathogens, A Laboratory Manual. APS Press, St. Paul, Minnesota USA, p. 295-298.

- Hauben, L., Vauterin, L., Swings, J., Moore, E. R. B. (1997): Comparison of 16S ribosomal DNA sequences of all *Xanthomonas* species. *International Journal of Systematic Bacteriology* 47: 328-335.
- Hayward, A.C. (1993): The host of *Xanthomonas*. In: *Xanthomonas* (eds.) Swings, J.G., Civerolo, E. L. Chapman and Hall, London, United Kingdom, pp. 51-54.
- Hennnessy, J. (1997): Repetitive sequences and polymerase reaction (rep-PCR) to fingerprint genomic DNA of bacteria. SOP No: PLH7-15.
- Ivanović, M., Obradović, A., Gašić K., Minsavage, G.V., Dickstein, E. R., Jones, J.B. (2012): Exploring diversity of *Erwinia amylovora* population in Serbia by conventional and automated techniques and detection of new PFGE patterns. *European Journal of Plant Pathology*, 133:545–557.
- Jones A. (1982): Chemical control of phytopathogenic prokaryotes. In: Mount M, Lacy G, eds. *Phytopathogenic prokaryotes*. New York: Academic Press, p.399–414.
- Jones, J. B., Somodi, G. C, Scott, J. W. (1997): Increased ELISA sensitivity using a modified extraction buffer for detection of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in leaf tissue. *Journal of Applied Microbiology* 83(4):397-401.
- Jones, J. B., Bouzar, H., Stall, R.E., Almira, E.C., Roberts, P.D., Bowen, B.W., Sudberry, J., Strickler, P.M., Chun, J. (2000): Systematic analysis of xanthomonads (*Xanthomonas* spp.) associated with pepper and tomato lesions. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50: 1211-1219.
- Jones, J.B., Chase, A.R., Harris, G.K. (1993): Evaluation of the Biolog GN MicroPlate system for identification of some plant-pathogenic bacteria. *Plant Disease* 77, 553-558.
- Khatri-Chhetri1, G. B., Wydra, K., Rudolph, K. (2003): Metabolic diversity of *Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola*, causal agent of cowpea bacterial blight and pustule. *European Journal of Plant Pathology* 109: 851–860.
- Klement, Z., Rudolf, K., Sands, D. C. (1990): *Methods in phyto bacteriology*. Akadémiai Kiadó, Budapest.

- Kojić, M., Strahinić, I., Topisirović, Lj. (2005): Proteinase PI and lactococcin A genes are located on the largest plasmid in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* bv. *diacetylactis* S50. Canadian Journal of Microbiology 51: 305-314.
- Korać, M. (2000): Leska. Technosoft. Novi Sad.
- Korać, M., Cerović, S. (2001): Proizvodnja lešnika. Poljoprivredni kalendar. JP Dnevnik poljoprivrednik, Novi Sad.
- Koval, G.K. (1978): Diseases of hazel. Zashchita Rastanii 8: 44-45.
- Krieg N.R. (2005): Identification of prokaryotes. In: In: The Proteobacteria. Bergey 's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd ed., vol. 2. Eds. D.J. Brenner, N.R. Krieg, J.T. Staley, G. Garrity. Springer, New York, USA, p. 33-38.
- Lagerstedt H.B. (1975): Filberts. In: Janick J., Moore J.N. (eds) Advances in fruit breeding. Purdue University Press, West Lafayette, IN, p. 456–488.
- Lamichhane, J. R., Varvaro, L. (2013): *Xanthomonas arboricola* disease of hazelnut: current status and future perspectives for its management. Plant Pathology (in press).
- Lazo, G.R., Roffey, R., Gabriel, D. W. (1987): Pathovars of *Xanthomonas campestris* are distinguishable by restriction fragment-length polymorphism. International Journal of Systematic Bacteriology 37 (23): 214-221.
- Lee, Y. A., Hildebrand, D. C., Schroth, M. N. (1992): Use of quinate metabolism as a phenotypic property to identify members of *Xanthomonas campestris* DNA homology group 6. Phytopathology 82: 971-973.
- Lee, Y. A., Lo, Y. C., Yu, P. P. (1999): A gene involved in quinate metabolism is specific to one DNA homology group of *Xanthomonas campestris*. Journal of Applied Microbiology 87: 649–658.
- Lee, Y.A. Chen, K.P., Hsu, Y. W. (2006): Characterization of *Erwinia chrysanthemi*, the soft-rot pathogen of white-flowered calla lily, based on pathogenicity and PCR-RFLP and PFGE analyses. Plant Pathology 55: 530-536.
- Lelliot, R.A., Stead, D.E. (1987): Methods for the Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants. Blackwell Scientific Publications, Oxford, London.

- Lelliott, R.A., Stead, D.E. (1987): Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. vol. 2. British Society for Plant Pathology & Blackwell, London.
- Leyns, F., De Cleene M., Swings, JG., De Ley, J. (1984): The host range of the genus *Xanthomonas*. The Botanical Review, Vol 50, (3):308-356.
- Locke, T., Barnes, D. (1979): New or unusual records of plant diseases and pests. *Xanthomonas corylina* on cob-nuts and filberts. Plant Pathology 28, 53.
- Loper, J.E., Henkels, M.D., Roberts, R.G., Grove, G.G., Willett, M.J., Smith, T.J. (1991): Evaluation of streptomycin, oxytetracycline, and copper resistance of *Erwinia amylovora* isolated from pear orchards in Washington State. Plant Disease 75: 287-290.
- Lopez, M. M., Bertolini, E., Olmos, A., Caruso, P., Gorris, M.T., Llop, P., Penyalver, R., Cambra, M. (2003): Innovative tools for detection of plant pathogenic viruses and bacteria. International Microbiology 6: 233–243.
- Louws, F. J., Cupples, D. A. (2001): Molecular techniques, In: N.W. Schaad, J.B. Jones, W. Chun (Eds.), Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria, 3rd edition., APS Press, St. Paul, MN, pp.321–332.
- Louws, F. J., Fulbright D. W., Stephens, C. T., De Bruijn, F. J. (1994): Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. Applied and Environmental Microbiology 60, 2286-2295.
- Louws, F. J., Fulbright D. W., Stephens, C. T., De Bruijn, F. J. (1994): Differentiation of genomic structure by rep-PCR fingerprinting to rapidly classify *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Phytopathology 85:528-536.
- Louws, F.J., Rademaker, J.L.W., de Bruijn, F.J. (1999): The three Ds of PCR-based genomic analysis of phyto-bacteria: Diversity, detection, and disease diagnosis. Annual Review of Phytopathology 37, 81-125.
- Luisetti, J., Jailloux, F., Germain, E., Prunier, J.P., Gardan, L. (1976) Caractérisation de *Xanthomonas corylina* responsable de la bactériose du noisetier récemment observée

- en France. Comptes Rendus des Séances de l'Académie d'Agriculture de France 62, 845-849.
- Maes, M. (1993): Fast classification of plant-associated bacteria in the *Xanthomonas* genus. FEMS Microbiology Letters 113:161-166.
- Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. (1982): Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Marco, G. M., Stall, R. E. (1983): Control of bacterial spot of pepper initiated by strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that differ in sensitivity to copper. Plant Disease 67:779-781.
- Mc Manus P.S., Jones A.L. (1995): Genetic fingerprinting of *Erwinia amylovora* strains isolated from tree-fruit crops and *Rubus* spp. Phytopathology 85,1547–1553.
- McManus P.S., Stockwell V.O., Sundin G.W., Jones A.L.(2002): Antibiotic use in plant agriculture. Annual Review of Phytopathology 40: 443–465.
- McManus, P. S. (2000): Antibiotic use and microbial resistance in plant agriculture. ASM News, Vol. 66, (8): 1-4.
- McManus, P. S., Stockwell, V. O., Sundin, G.W., Jones, A. L. (2002): Antibiotic use in plant agriculture. Annual Review of Phytopathology, 40:443–465.
- Mellano M A., Cooksey, D A (1988): Nucleotide sequence and organization of copper resistance genes from *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Journal of Bacteriology 170(6): 2879.
- Milgroom, M.G. (2001): The synthesis of genetics and epidemiology: Contributions of population biology in plant pathology. Journal Of Plant Pathology (Special Issue), 83 (2): 57-62.
- Miller, P. W. (1939): Bacterial blight of filberts and its control. Extension Bulletin 532.
- Miller, P. W., Bollen, W. B., Simmons, J. E., Gross, H. N., Barss, H. P. (1940): The pathogen of Filbert bacteriosis compared with *Phytomonas juglandis*, the cause of walnut blight. Phytopathology. 30 (9): 713-733.
- Miller, P. W., Bollen, W. B., Simmons, J.E. (1949): Filbert bacteriosis and its control. Oregon Agricultural Experiment Station Technical Bulletin No. 16.

- Mitrović, M. (2002): Stanje i proizvodnja leske u svetu i Jugoslaviji. *Jugoslovensko voćarstvo*, Vol. 36 (139/140), 137-147.
- Molnar, T.J. (2011): *Corylus*. In: *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources: Forest Trees*. edited by Kole, C. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, p. 15-48.
- Moore, L. W. (2002a): Bacterial Blight. In: *Compendium of Nut Crop Diseases in Temperate Zones*, edited by: Teviotdale, B. L., Michailides, T. J., Pscheidt, J. W. The American Phytopathological Society, St. Paul, MN, p. 47.
- Moore, L. W. (2002b): Diseases Caused by a Bacterium. Part I: Diseases and Disorders Affecting Several Nut crops. In: *Compendium of Nut Crop Diseases in Temperate Zones*, edited by: Teviotdale, B. L., Michailides, T. J., Pscheidt, J. W., The American Phytopathological Society, St. Paul, MN, p. 10-11.
- Moore, L. W., Psallidas, P. G. (2002): Diseases Caused by Bacteria. Part III. Hazelnut Diseases. In: *Compendium of Nut Crop Diseases in Temperate Zones*, edited by Teviotdale, B. L., Michailides, T. J., Pscheidt, J. W., The American Phytopathological Society, St. Paul, MN, p. 47- 48.
- Nassonova, E.S. (2008): Pulsed Field Gel Electrophoresis: Theory, instruments and application. *Cell and Tissue Biology*, Vol. 2 (6): 557-565.
- Norman, D. J., Chase, A. R., Stall, R. E., and Jones, J. B. 1999. Heterogeneity of *Xanthomonas campestris* pv. *hederae* strains from araliaceous hosts. *Phytopathology* 89:646-652.
- Noviello, C. (1969): Infectious diseases of hazel. *Annali della Facoltà di Scienze Agrarie della Università degli Studi di Napoli Portici* 3: 11-39.
- Obradović, A. (1999): Identifikacija bakterija rodova *Pseudomonas* i *Erwinia* patogena salate i karfiola. *Zaštita bilja* 227: 9-60.
- Obradović, A., Ivanović, S. M. (2008): Bakterioze leske. IX savetovanje o zaštiti bilja, Zlatibor, 24.-28. novembar, *Zbornik rezimea*, 140-141.
- Obradović, A., Mavridis, A., Rudolph, K., Janse, J. D., Arsenijevic, M., Jones, J. B., Minsavage, G.V., Wang, J.F. (2004): Characterization and PCR-based typing of

- Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* from peppers and tomatoes in Serbia. European Journal of Plant Pathology 110: 285–292.
- Obradović, A., Mavridis, A., Rudolph, K., Janse, J.D., Arsenijević, M., Jones, J.B., Minsavage, G.V., Wang, J.F.(2004): Characterization and PCR-based typing of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* from peppers and tomatoes in Serbia. European Journal of Plant Pathology 110(3): 285-292.
- Opgenorth, D. C., Smart, C. D., Louws, F. J., De Bruijn, F. J., Kirkpatrick, B. C. (1996): Identification of *Xanthomonas fragariae* field isolates by rep-PCR genomic fingerprinting. Plant Disease 80: 868-873.
- Pagani, M. C. (2004): An ABC transporter protein and molecular diagnoses of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* causing bacterial spot of stone fruits. Dissertation. Faculty of North Carolina State University.
- Page, R.D.M. (1996): TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. Computer Applications in the Biosciences 12, 357-358.
- Parkinson, N., Cowie, C., Heeney, J., Stead, D. (2009): Phylogenetic structure of *Xanthomonas* determined by comparison of *gyrB* sequences. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 59: 264–274.
- Pooler, M.R., Ritchie, D.F., Hartung, J.S. (1996): Genetic relationships among strains of *Xanthomonas fragariae* based on random amplified polymorphic DNA PCR, repetitive extragenic palindromic PCR, and enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR data and generation of multiplexed PCR primers useful for the identification of this phytopathogen. Applied and environmental microbiology. 62(9), 3121-7.
- Poschenrieder, G., Theil, S. (2005): First occurrence of plant pathogenic bacteria in hazelnut production in Bavaria. Phytomedicine, 39-40.
- Prunier, J.P., Luisetti, J., Gardan, L., Germain, E., Sarraquigne, J. (1976) : La bactériose du noisetier (*Xanthomonas corylina*). Revue Horticole 170, 31- 40.
- Psallidas, P. G. (1987): The problem caused by *Pseudomonas syringae* pv. *avellanae* in Greece. OEPP/EPPO Bulletin 94:103-111.

- Psallidas, P. G. (1993): *Pseudomonas syringae* pv. *avellanae* pathovar nov., the bacterium causing canker disease on *Corylus avellana*. Plant Pathology 42: 358-363.
- Psallidas, P.G., Panagopoulos, C.G. (1979): A bacterial canker of hazelnut in Greece. Phytopathologische Zeitschrift 94: 103-111.
- Rademaker, J. L. W., Hoste, B., Louws, F.J., Kersters K., Swings, J., Vauterin, L., Vauterin, P., De Bruijn.F.J. (2000): Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA-DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 50: 665–677.
- Rademaker, J.L.W., Louws, F.J., Schultz M.H., Rossbach, U., Vauterin, L., Swings, J., deBruijn, F.J. (2005): A comprehensive species to strain taxonomic framework for *Xanthomonas*. Phytopathology 95: 1098–1111.
- Ritchie D. (2004): Copper-containing fungicides/bactericides and their use in management of bacterial spot on peaches. Southeast Regional Newsletter, Vol.4, No.1. North Carolina State University.
- Ritchie, D. F., V. Dittapongpitch (1991): Copper- and streptomycin-resistant strains and host differentiated races of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in North Carolina. Plant Disease 75:733-736.
- Saddler, G.S., Bradbury, J.F., (2005): Genus *Xanthomonas* Dowson 1939. In: The Proteobacteria. Bergey 's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd ed., vol. 2. Eds. D.J. Brenner, N.R. Krieg, J.T. Staley, G. Garrity. Springer, New York, USA, p. 199-210.
- Schaad, N. W. (1979): Serological identification of plant pathogenic bacteria. Annual Review of Phytopathology 17, 123-147.
- Schaad, N. W. (2001): Initial identification of common genera. In: Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria, 3rd eds. Schaad, N. W., Jones, J. B., Chun W. APS Press, St. Paul, MN. p.1-16.
- Schaad, N.W., Jones, J.B., Lacy, G.H. (2001): *Xanthomonas*. In: Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria, 3rd edition. (eds) Schaad N. W, Jones J. B, Chun W., APS Press, St. Paul, MN, p. 175-200.

- Scheck, H. J., and Pscheidt, J. W. 1998. Effect of copper bactericides on copper-resistant and sensitive strains of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. Plant Disease 82:397-406.
- Scortichini, M. (2002): Bacterial canker and decline of European hazelnut. Plant Disease 86: 704-709.
- Scortichini, M., Marchesi, U., Rossi, M. P., Angelucci, L., Dettori, M. T. (2000c): Rapid identification of *Pseudomonas avellanae* field isolates, causing hazelnut decline in Central Italy by repetitive PCR genomic fingerprinting. Journal of Phytopathology, 148 (3), 153-158.
- Scortichini, M., Janse, J. D., Rossi, M. P. Derks J. H. J. (1996): Characterization of *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* strains from different hosts by pathogenicity tests and analysis of whole-cell fatty acids and whole-cell proteins. Journal of Phytopathology 144, 69-74.
- Scortichini, M., Lazzari, M. (1996): Systemic migration of *Pseudomonas syringae* pv. *avellanae* in twigs and young trees of hazelnut and symptom development. Journal of Phytopathology, 144 (4), 215-219.
- Scortichini, M., Marchesi, U., Di Prospero, P. (2001b): Genetic diversity of *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* (synonyms: *X. campestris* pv. *juglandis*; *X. juglandis* pv. *juglandis*) strains from different geographical areas shown by repetitive polymerase chain reaction genomic fingerprinting. J. Phytopathology 149, 325-332.
- Scortichini, M., Marchesi, U., Dettori, M. T., Angelucci, L., Rossi M. P., Morone, C. (2000a): Genetic and pathogenic diversity of *Pseudomonas avellanae* strains isolated from *Corylus avellana* trees in north-west of Italy, and comparison with strains from other regions. European Journal of Plant Pathology, 106 (2), 147–154.
- Scortichini, M., Marchesi, U., Rossi, M. P., Prospero, P. D. (2002a): Bacteria associated with hazelnut (*Corylus avellana* L.) decline are of two groups: *Pseudomonas avellanae* and strains resembling *P. syringae* pv. *syringae*. Applied and Environmental Microbiology, 68,476–484.
- Scortichini, M., Rossi, M. P., Loreti, S., Bosco, A., Fiori, M., Jackson, R. W., Stead, D. E., Aspin, A., Marchesi, U., Zini, M., Janse, J. D. (2005): *Pseudomonas syringae* pv.

- coryli, the causal agent of bacterial twig dieback of *Corylus avellana*. *Phytopathology*. 95, 1316-1324.
- Scortichini, M., Rossi, M. P., Marchesi U. (2002b): Genetic, phenotypic and pathogenic diversity of *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina* strains question the representative nature of the type strain. *Plant Pathology* 51, 374–381.
- Starr, M.P. (1981): The genus *Xanthomonas*. In: *The Prokaryotes Vol. I* (eds.), Starr, M. P., Stolp, H., Truper, H. G., Balows, A. and Schlegel, H. G. Springer-Verlag, Berlin, p.742-763.
- Stead, D.E., Hennessy J., Wilson, J. (1998): Modern methods for identifying bacteria. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 52, 17–25.
- Sundin, G. W., Bender, C. L. (1993): Ecological and genetic analysis of copper and streptomycin resistance in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Applied And Environmental Microbiology*, Vol. 59, No.4, 1018-1024.
- Šoškić, M. (2007): *Orah i leska*. Partenon, Beograd.
- Šutić, D. (1956): Bakterijska pegavost lišća leske. *Zaštita bilja* 37: 47-53.
- Swings, J., Vauterin, L. and Kersters, K. (1993): The bacterium *Xanthomonas*. In: *Xanthomonas* (eds.) Swings, J.G., Civerolo, E. L. Chapman & Hall, London, United Kingdom, p. 121-146.
- The Biolog's Microstation system. MicroLog Version 4.2. User Guide. Biolog Incorporated, Hayward, California.
- Thompson, M.M., Lagerstedt, H.B. and Mehlenbacher, S.A. (1996): Hazelnuts, In: Janick, J. and Moore, J.N. (eds.). *Fruit breeding*, Vol. III: Nuts. Wiley, New York; p. 125-184.
- Vanneste, J.L., McLaren, G.F., Yu, J., Cornish, D.A., Boyd, R. (2005): Copper and streptomycin resistance in bacterial strains isolated from stone fruit orchards in New Zealand. *New Zealand Plant Protection* 58:101-105.
- Vanneste, J.L., Voyle, M.D., Yu, J., Cornish, D.A., Boyd, R.J., McLaren, G.F. (2008): Copper and streptomycin resistance in *Pseudomonas* strains isolated from pipfruit and stone fruit orchards in New Zealand. In: “*Pseudomonas syringae* Pathovars and

- Related Pathogens- Identification, Epidemiology and Genomics“ (eds.) M. Fatmi, A. Collmer, N.S. Iacobellis, J.W. Mansfield, J. Murillo, N.W. Shaad, M. Ullrich. Springer Business Media B.V.,p. 81-89.
- Vauterin, L., Hoste, B., Kersters, K., Swings, J.(1995): Reclassification of *Xanthomonas*. International Journal of Systematic Bacteriology 45: 472-489.
- Vauterin, L., Hoste, B., Yang, P., Alvarez, A. ,Kersters, K., Swings, J. (1993.): Taxonomy of the genus *Xanthomonas*. Pages 156-191 in: J. G. Swings and E. L. Civerolo, eds., *Xanthomonas*. Chapman & Hall, London.
- Vauterin, L., Swings, J. (1997): Are classification and phytopathological diversity compatible in *Xanthomonas*? Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 19, 77–82.
- Vauterin, L., Swings, J., Kersters, K., Gillis, M., Mew, T. W., Schroth, M. N., Palleroni, N. J, Hildebrand, D. C., Stead, D. E., Civerolo, E. L., Hayward, A. A. C.,Maraite, H., Stall, E. E., Vidaver, A. K., Bradbury, J. F. (1990): Towards an improved taxonomy of *Xanthomonas*. Int. J. Syst Bacteriol. 40, 312-316.
- Veličković, M. (2002): Voćarstvo. 252-257.
- Versalovic, J., Koeuth, T., Lupski, J.R. (1991): Distribution of repetitive DNA-sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. Nucleic Acids Research 19, 6823-6831.
- Versalovic, J., Schneider, M., De Bruijn, F. J., Lupski, J. R. (1994): Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. Methods in Molecular and Cellular Biology 5, 25-40.
- Vincelli, Paul (2008): Nucleic Acid–Based Pathogen Detection in Applied Plant Pathology, Volume 92, Number 5, 660-669.
- Vuono, G., Balestra, G. M., Varvaro, L. (2006): Control of dieback (“moria”) of *Corylus avellana* in Central Italy using copper compounds. Journal of Plant Pathology 88, 215-218.

- Ward, E., Foster, S.J., Fraaije, B.A., McCartney, H.A. (2004): Plant pathogen diagnostics: Immunological and nucleic acid-based approaches. *Annals Of Applied Biology* 145, 1-6.
- Waterbury, P.G and Lane, M. J. (1987): Generation of lambda phage concatemers for use as pulsed field electrophoresis markers *Nucleic Acids Research* 15, 3930.
- Weingart H., Volksch, B. (1997): Genetic fingerprinting of *Pseudomonas syringae* pathovars using ERIC, REP and IS50 PCR. *Journal of Phytopathology* 145, 339-345.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., Lane, D.J. (1991): 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* 173, 697-703.
- Wimalajeewa, D.L.S., Washington, W.S. (1980): Bacterial blight of hazel-nut. *Australasian Plant Pathology*, Vol 9, No 4, 113-114.
- Woods, C., Versalovic, J., Koeuth, T., Lupski, J. R. (1993): Whole-Cell Repetitive Element Sequence-Based Polymerase Chain Reaction Allows Rapid Assessment of Clonal Relationships of Bacterial Isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 7, 1927-1931.
- Young JM, Park DC, ShearmanHM, Fargier E, 2008. A multilocus sequence analysis of *Xanthomonas*. *Systematic and Applied Microbiology* 31, 366-377.
- Young, J.M., Kerr, A., Sawada, H. (2005): Genus *Agrobacterium* Conn 1942. In: *The Proteobacteria. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed., vol. 2. Eds. D.J. Brenner, N.R. Krieg, J.T. Staley, G. Garrity. Springer, New York, USA, pp. 340–345.
- Zaccardelli, M., Ceroni, P., Mazzucchi, U. (1999): Amplified fragment length polymorphism fingerprinting of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*. *Journal of Plant Pathology* 81:173-179.
- Zevenhuizen, L., J. Dolfing, E. J. Eshuis, Scholtenkoerselman, I. J. (1979): Inhibitory effects of copper on bacteria related to the free ion concentration. *Microbial Ecology* 5, 139-146.

Biografija

Andelka Prokić (devojačko Čalić) rođena je 03. 11. 1980. godine u Beogradu gde je završila osnovnu školu i Desetu gimnaziju „Mihajlo Pupin”, opšteg usmerenja. Na Poljoprivrednom fakultetu, Odsek za zaštitu bilja i prehrambenih proizvoda, Univerziteta u Beogradu, diplomirala je 2006. godine, sa prosečnom ocenom 9,03. Diplomski rad iz oblasti nematologije, pod nazivom: „Otpornost krompira prema krompirovim cistolikim nematodama“ odbranila je ocenom 10 (deset). Doktorske akademske studije na Poljoprivrednom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, smer poljoprivredne nauke: modul fitomedicina, upisala je školske 2007/2008. godine. Od 01.10.2008. godine, kao stipendista doktorand, angažovana je u Laboratoriji za fitobakteriologiju Poljoprivrednog fakulteta u Beogradu. Decembra 2009. godine prijavila je doktorsku disertaciju pod naslovom: „*Xanthomonas arboricola* pv. *corylina* - identifikacija patogena i biodiverzitet populacije”, pod rukovodstvom prof. dr Alekse Obradovića.

Kao stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije tokom 2008. godine pohađala je kurs „Program edukacije mladih istraživača u primeni molekularnih metoda u naučno-istraživačkom procesu“ na Institutu za zaštitu bilja i životnu sredinu, Beograd. Tokom 2009. godine u okviru projekta COST Action 873 boravila je u Nacionalnom institutu za istraživanja u poljoprivredi – INRA, Francuska, proučavajući metode za dijagnozu fitopatogenih bakterija iz roda *Xanthomonas*. Iste godine pohađala je kurs: „Akademske veštine“, Ministarstva za nauku u tehnološki razvoj u Beogradu. U toku 2010. godine bila je organizator i učesnik međunarodnog kursa: „*Pseudomonas* pathogens of stone fruits and nuts: Classical and Molecular Phytobacteriology“ na Poljoprivrednom fakultetu u Beogradu. Seminar u okviru TEMPUS projekta: „Genetic improvement for plant resistance“ pohađala je 2012. godine na Poljoprivrednom fakultetu u Beogradu. U toku 2010. godine učestvovala je u realizaciji projekta Ministarstva: „Biološka zaštita kao alternativa hemijskim sredstvima za zaštitu bilja“ (TR 20062) kao i međunarodnog istraživačkog

projekta: EUPHRESKO ErwinDect („Ring test on diagnosis and detection of *Erwinia amylovora*“).

Trenutno je, kao istraživač saradnik, angažovana na realizaciji nacionalnih projekata Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja: „Razvoj integrisanih sistema upravljanja štetnim organizmima u biljnoj proizvodnji sa ciljem prevazilaženja rezistentnosti i unapređenja kvaliteta i bezbednosti hrane“ (III 46008) i Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede, u nadzoru pojedinih poljoprivrednih kultura na prisustvo karantinskih fitopatogenih bakterija. Od 2013. godine učesnik je međunarodnog projekta FP7-REGPOT: „Advancing research in agricultural and food sciences at Faculty of Agriculture, University Of Belgrade“ (AREA). Na fakultetu od 2010/2011 godine učestvuje u obuci studenata diplomaca i izradi diplomskih i seminarskih radova na predmetu Bakterioze bilja, kao i u pripremi i izvođenju praktične nastave na predmetima iz oblasti fitobakteriologije.

Andelka Prokić do sada je kao autor ili koautor objavila i saopštila 55 naučnih radova u domaćim i međunarodnim časopisima. Aktivno je učestvovala na brojnim naučnim skupovima u zemlji i inostranstvu, predstavljajući rezultate rada usmeno ili u vidu postera. Govori engleski i ruski jezik. Član je Društva za zaštitu bilja Srbije i Mikrobiološkog društva Srbije.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a Anđelka Prokić

Broj indeksa ili prijave doktorske disertacije 07/34

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom:

„*Xanthomonas arboricola* pv. *corylina*“- IDENTIFIKACIJA PATOGENA I
BIODIVERZITET POPULACIJE”

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

U Beogradu, 17.09.2014.

Potpis doktoranda

Prokić A.

Prilog 2.

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

Ime i prezime autora Andelka Prokić
Broj indeksa ili prijave doktorske disertacije 07/34
Studijski program Poljoprivredne nauke, Modul: Fitomedicina
Naslov doktorske disertacije „*Xanthomonas arboricola* pv. *corylina*“ -
IDENTIFIKACIJA PATOGENA I BIODIVERZITET POPULACIJE
Mentor prof. dr Aleksa Obradović

Potpisani/a Andelka Prokić

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

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

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

U Beogradu, 17.09.2014.

Potpis doktoranda

Prokić A.

Prilog 3.

Izjava o korišćenju

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

„*Xanthomonas arboricola* pv. *corylina*“- IDENTIFIKACIJA PATOGENA I BIODIVERZITET POPULACIJE

koja je moje autorsko delo.

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

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

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

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

U Beogradu, 17.09.2014.

Potpis doktoranda

Prokić A.

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

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

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

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

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

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