

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Tamara V. Ranković

**ANALIZA GENOMA ODABRANIH
FITOPATOGENIH SOJEVA *Pseudomonas*
syringae pv. *aptata* I NJIHOVA BIOLOŠKA
KONTROLA POSREDOVANA TIP VI
SEKRETORNIM SISTEMOM *Pseudomonas*
*putida***

Doktorska disertacija

Beograd, 2025

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Tamara V. Ranković

**GENOME ANALYSIS OF SELECTED
Pseudomonas syringae pv. *aptata*
PHYTOPATHOGENIC STRAINS AND THEIR
BIOLOGICAL CONTROL MEDIATED BY THE
TYPE VI SECRETION SYSTEM OF
*Pseudomonas putida***

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2025

MENTORI I ČLANOVI KOMISIJE ZA ODBRANU DOKTORSKE DISERTACIJE

Mentori:

dr Slaviša Stanković, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet

dr Ivan Nikolić, docent i viši naučni saradnik
Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet

Članovi komisije:

dr Tanja Berić, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet

dr Jelena Lozo, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet

dr Olja Medić, docent
Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet

dr Maja Krstić Ristivojević, naučni saradnik
Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet

Datum odbrane: _____

Zahvalnica

Eksperimentalni deo ove disertacije rađen je u laboratorijama Katedre za mikrobiologiju i Katedre za biohemiju i molekularnu biologiju Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Istraživanja u okviru ove doktorske teze sprovedena su u okviru nacionalnog projekta OI 173026 „Molekularna karakterizacija bakterija iz rodova Bacillus i Pseudomonas kao potencijalnih agenasa za biološku kontrolu“, finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Želela bih da izrazim svoju neizmernu zahvalnost mentoru prof. dr Slaviši Stankoviću na besprekornoj saradnji, prenetom znanju i stručnosti, izdvojenom vremenu za realizaciju i izradu ove teze, na korisnim savetima i sugestijama. Hvala Vam što ste mi ukazali poverenje da u Vašoj istraživačkoj grupi započnem i razvijam naučnu karijeru. Hvala za razumevanje, podršku, strpljenje i pristupačnost u svakom trenutku.

Posebnu zahvalnost dugujem mentoru dr Ivanu Nikoliću na izuzetnoj saradnji, prenetom znanju i stručnosti. Hvala na dragocenoj pomoći i savetima tokom izvođenja eksperimenata, analize rezultata i pisanja. Zahvaljujem se na konstantnoj podršci, poverenju, nesebično utrošenom vremenu za diskusiju, ohrabrivanje i motivaciju u izazovnim trenucima, kao i na prijateljskom odnosu tokom svakodnevnog rada.

Duboku zahvalnost dugujem prof. dr Tanji Berić na pruženom znanju, brojnim savetima i idejama koje su mi pomogle u prevazilaženju problema. Hvala Vam na izvanrednoj saradnji, profesionalnosti, konstruktivnim sugestijama prilikom pisanja i kritičkoj oceni teze.

Zahvaljujem se doc. dr Olji Medić na korisnim savetima, diskusijama, sugestijama prilikom pisanja i kritičkoj oceni teze. Veliko hvala na savršenoj saradnji, podršci, kolegijalnom i prijateljskom odnosu tokom svakodnevnog rada.

Duboku zahvalnost dugujem prof. dr Jeleni Lozo na odličnoj saradnji tokom svih ovih godina. Hvala Vam na prenesenom znanju, strpljenju, korisnim savetima tokom rada, sugestijama prilikom pisanja i kritičkoj oceni teze.

Zahvaljujem se dr Maji Krstić Ristivojević na konstruktivnim savetima i kritičkoj oceni teze.

Veliku zahvalnost dugujem dr Ivi Atanasković na dragocenim savetima za prevazilaženje eksperimentalnih problema. Hvala na pristupačnosti u svako doba, izdvojenom vremenu za odgovore na sve moje nedoumice, na podsticanju radoznalosti, motivaciji i bodrenju.

Zahvaljujem se neposrednim saradnicama Marini Anteljević, Ivi Rosić i Kristini Bošković na pomoći u eksperimentalnom radu i puno lepih trenutaka.

Zahvaljujem se prof. dr Biljani Nikolić i dr Dragani Mitić-Ćulafić na prenetom znanju iz oblasti mikrobiologije i kolegijalnom odnosu tokom rada.

Zahvaljujem se dragim kolegicama dr Stefani Cvetković, dr Stefani Vuletić, dr Nini Tomić, Tei Ganić, Ani Ignjatijević, Tamari Anđić i Ivani Marić na prijateljskoj atmosferi tokom rada i druženju van posla.

Zahvaljujem se mladim kolegama iz laboratorije Katedre za biohemiju i molekularnu biologiju na prijateljskoj atmosferi tokom rada.

Zahvaljujem se kompaniji Agrounik D.O.O. na ukazanoj mogućnosti korišćenja staklenika za adekvatno gajenje eksperimentalnih biljaka.

Veliko hvala prijateljima na bodrenju tokom izrade ove teze, pogotovo mojim biolozima Anki i Đini na savršenom tajmingu da najlepše životne događaje prolazimo zajedno. Posebno se zahvaljujem mojoj kumi Bilji za neiscrpno razumevanje i podršku koji traju još od osnovne škole.

Veliko hvala mojoj snahi Ani i bratatici Mili što su uvek znale da mi vrate osmeh na lice u teškim trenucima i nikad nisu dozvolile da klonem duhom.

Beskrajnu zahvalnost dugujem svojim roditeljima i braći Zvezdanu i Radošu koji su mi bili uzori i pokazivali prave vrednosti ličnim primerom. Hvala vam što ste verovali u mene i što ste uvek bili tu da pružite neizmernu ljubav, oslonac i podršku.

Posebna zahvalnost mom suprugu Milanu na strpljenju tokom izrade teze, veri u mene i ljubavi koju mi pruža. Posebno hvala i mom sinu Danilu koji mi je dao neopisivu snagu da istrajem kada je najviše bilo potrebno.

Ovaj rad posvećujem mojim roditeljima Divni i Veselinu

Analiza genoma odabranih fitopatogenih sojeva *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* i njihova biološka kontrola posredovana Tip VI sekretornim sistemom *Pseudomonas putida*

SAŽETAK

Ovaj rad predstavlja prvu studiju koja se bavi detaljnom analizom genoma i sekretoma fitopatogena *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* i njihove biokontrole posredstvom Tip VI sekretornog sistema (T6SS) prirodnih izolata *Pseudomonas putida*. Posebnim osvrtom na analizu faktora virulencije *P. syringae* pv. *aptata*, pokazane su razlike u repertoaru gena za efektore Tip III sekretornog sistema (T3SS) između izrazito virulentnog soja P21 u odnosu na slabo virulentni P16. U genomu P21 identifikovani su geni za efektore AvrRpm1, HopAW1 i HopAU1 koji do sada nisu detektovani u *P. syringae* pv. *aptata*. Gajenjem *P. syringae* pv. *aptata* u uslovima koji imitiraju uslove u biljnom apoplastu uočeno je formiranje pila i pojačana sekrecija T3SS proteina. Većinom su efektori sekretovani u velikim količinama kod slabo virulentnih sojeva, dok su kod umereno i jako virulentnih prisutni u manjoj meri. *P. putida* S2/27 predstavlja jednog od najboljih kandidata za biološku kontrolu P21, inhibirajući rast patogena na kontakt-zavisan način. Za inhibiciju su potencijalno zaslužni i drugi mehanizmi pored T6SS. U odnosu na S2/27, gajenje u ko-kulturi sa P21 rezultuje smanjenom ekspresijom *hcp1* gena, indikatora aktivnosti T6SS. U *in planta* testovima pokazano je da folijarna inokulacija ili tretman rizosfere suspenzijom *P. putida* S2/27 značajno utiče na redukciju simptoma izazvanih P21 na šećernoj repi. T6SS utiče na povećanu ekspresiju *npr1* i *nced* gena uključenih u lokalni imunski odgovor biljke, dok pri sistemskom odgovoru ne dolazi do povećane ekspresije pomenutih gena. Dobijeni rezultati ukazuju da je patogeni potencijal *P. syringae* pv. *aptata* uslovljen diverzitetom gena i sekretovanih efektoru uključenih u virulenciju. *P. putida* S2/27 poseduje potencijal za primenu u njihovoj biološkoj kontroli.

Ključne reči: *Pseudomonas syringae* pv. *aptata*, genom, sekretom, T3SS, *Pseudomonas putida*, biološka kontrola, T6SS

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Biologija mikroorganizama

Genome analysis of selected *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* phytopathogenic strains and their biological control mediated by the Tip VI secretion system of *Pseudomonas putida*

ABSTRACT

This study represents the first in-depth analysis of the genomes and secretomes of phytopathogenic *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* and their biocontrol mediated by the Type VI secretion system (T6SS) of *Pseudomonas putida*. The main focus was an investigation of the virulence factors of *P. syringae* pv. *aptata*, revealing differences in the gene repertoire for the Type III secretion system (T3SS) effectors between the highly virulent strain P21 and the low-virulent strain P16. In the P21 genome we found genes for AvrRpm1, HopAW1, and HopAU1 effectors, which had not previously been detected in *P. syringae* pv. *aptata*. After incubation of *P. syringae* pv. *aptata* in apoplast-like conditions, the formation of pili and increased secretion of T3SS proteins were observed. Mainly, the T3SS effectors were highly secreted by the low-virulent strains, contrary to moderate and highly virulent strains. Among *P. putida* isolates, S2/27 represents one of the most promising candidates for biocontrol of P21 in a contact-dependent manner. Potentially, other mechanisms besides T6SS are involved in the observed inhibition. Compared to S2/27, incubation in co-culture with P21 led to downregulating the *hcp1* gene, which is the indicator of T6SS activity. *In planta*, foliar or rhizosphere treatment with *P. putida* S2/27 suspension resulted in the reduction of symptoms caused by P21 on sugar beet. T6SS led to the upregulation of *npr1* and *nced* genes in plants' local immune response. This upregulation wasn't observed in plants' systemic immune response. Overall, the pathogenic potential of *P. syringae* pv. *aptata* is mediated by the diversity of genes and secreted effectors involved in virulence. *P. putida* S2/27 has the potential for application in its biocontrol.

Key words: *Pseudomonas syringae* pv. *aptata*, genome, secretome, T3SS, *Pseudomonas putida*, biological control, T6SS

Scientific field: Biology

Scientific subfield: Biology of microorganisms

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Rasprostranjenost i životni ciklus <i>P. syringae</i> kompleksa vrsta.....	2
1.2. Faktori virulencije <i>P. syringae</i> kompleksa vrsta.....	3
1.2.1. Pokretljivost.....	3
1.2.2. Tip III sekretorni sistem	4
1.2.3. Tip VI sekretorni sistem	5
1.2.4. Fitotoksini.....	8
1.2.5. Aktivnost u stvaranju čestica leda	9
1.3. <i>P. syringae</i> pv. <i>aptata</i>	9
1.4. Biološka kontrola biljnih patogena	10
1.4.1. Sekundarni metaboliti <i>P. putida</i>	10
1.4.2. Kontakt-zavisna kompeticija	11
1.4.3. Tip IVB sekretorni sistem	11
1.4.4. Tip Vb sekretorni sistem	12
1.4.5. Uloga Tip VI sekretornog sistema u biokontroli.....	13
1.4.6. Indukovana sistemska rezistencija	14
2. CILJEVI RADA.....	15
3. MATERIJAL I METODE	16
3.1. Bakterijski sojevi i plazmidi korišćeni u ovom radu.....	16
3.2. Medijumi za rast bakterija.....	17
3.3. Priprema DNK biblioteka i sekvenciranje genoma <i>P. syringae</i> pv. <i>aptata</i> P16 i P21.....	19
3.4. Anotacije genoma P16 i P21	19
3.5. Komparativna genomika	19
3.6. Identifikacija efektor T3SS u genomima <i>P. syringae</i>	20
3.7. Analiza sekretoma <i>P. syringae</i>	20
3.8. Prečišćavanje pilusnih proteina Tip III sekretornog sistema	21
3.9. Natrijum dodecilsulfat poliakrilamid gel elektroforeza (SDS-PAGE)	21
3.10. Elektronska mikroskopija	22
3.11. Testovi pokretljivosti	22
3.12. Bioinformatičke analize sekretoma <i>P. syringae</i> pv. <i>aptata</i>	22
3.13. Izolacija bakterija iz vode – uzorkovanje i membranska filtracija	22
3.14. Izolacija genomske DNK <i>Pseudomonas</i> spp. izolata.....	22
3.15. Molekularna identifikacija <i>P. putida</i> i detekcija gena T6SS	23
3.16. Horizontalna elektroforeza DNK na agaroznom gelu.....	23
3.17. Metode za konstrukciju mutanta <i>P. putida</i> S2/27 sa deletiranim/inaktiviranim <i>tssA</i> genom ...	25
3.17.1. Metoda posredovana dvostrukom homologom rekombinacijom.....	25
3.17.2. Inerciona mutageneza	27
3.18. Priprema kompetentnih ćelija <i>E. coli</i> DH5 α i transformacija plazmidom koji omogućava α -komplemetaciju <i>lacZ</i> gena	28
3.19. Ispitivanje kompetitivnosti <i>P. putida</i> izolata i aktivnosti T6SS.....	29
3.20. Test interbakterijske kompeticije između izolata <i>P. putida</i> i <i>P. syringae</i> pv. <i>aptata</i>	29
3.21. Izolacija RNK iz čiste kulture i mešovite kulture i konverzija u komplementarnu DNK	29
3.22. Kvantifikacija ekspresije <i>hcp</i> gena <i>P. putida</i>	30
3.23. <i>In planta</i> direktna interbakterijska kompeticija	30
3.24. Indukcija sistemske rezistencije.....	30
3.25. Izolacija RNK iz biljnog materijala	31

3.26. Kvantifikacija ekspresije gena uključenih u imunski odgovor biljaka	31
4. REZULTATI	32
4.1. Ispitivanje genomskih karakteristika odabranih sojeva <i>P. syringae</i> pv. <i>aptata</i> i komparativna genomika u okviru <i>P. syringae</i> kompleksa vrsta	32
4.2. Analiza Tip III sekretornog sistema i drugih faktora koji doprinose razlikama u virulenciji odabranih sojeva <i>P. syringae</i> pv. <i>aptata</i>	40
4.2.1. Identifikacija gena za T3SS efektore u okviru <i>P. syringae</i> kompleksa.....	40
4.2.2. Vizuelizacija T3SS pila i sekrecija T3SS proteina.....	41
4.2.3. Analiza proteina <i>P. syringae</i> pv. <i>aptata</i> P17 masenom spektrometrijom.....	43
4.2.4. Analiza sekretoma <i>P. syringae</i> pv. <i>aptata</i> sojeva sa različitim stepenom virulencije	43
4.2.5. Pokretljivost <i>P. syringae</i> pv. <i>aptata</i> sojeva.....	48
4.3. Ispitivanje prisustva i uloge Tip VI sekretornog sistema <i>P. putida</i> kao mehanizma za biokontrolu <i>P. syringae</i> pv. <i>aptata</i> i uticaja ovog sistema na imunski odgovor šećerne repe	49
4.3.1. Formiranje kolekcije <i>P. putida</i> izolata	49
4.3.2. Detekcija T6SS gena u okviru kolekcije <i>P. putida</i>	50
4.3.3. Konstrukcija mutanta <i>P. putida</i> sa deletiranim/inaktiviranim <i>tssA</i> genom	52
4.3.4. Razlike u kompetitivnosti <i>P. putida</i> izolata	55
4.3.5. Ekspresija <i>hcp1</i> gena u čistoj kulturi <i>P. putida</i> S2/27 i ko-kulturi sa <i>P. syringae</i> pv. <i>aptata</i> P21.....	58
4.3.6. <i>In planta</i> interbakterijska kompeticija.....	58
4.3.7. Praćenje ekspresije gena uključenih u imunski odgovor šećerne repe – lokalni odgovor ...	59
4.3.8. Indukcija sistemske rezistencije	60
4.3.9. Praćenje ekspresije gena uključenih u imunski odgovor šećerne repe – sistemski odgovor	61
5. DISKUSIJA	63
6. ZAKLJUČCI	74
7. LITERATURA	76
8. PRILOZI	93

1. Uvod

Rod *Pseudomonas* opisao je Migula 1894. godine i već u to vreme obuhvatao je preko 100 različitih vrsta čije su karakteristike opisane u Bergijevom priručniku za sistematsku bakteriologiju (Palleroni, 1984; Anzai et al., 1997). Prema Listi prokariotskih imena u nomenklaturi (engl. „List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature“ – LPSN) (Parte et al., 2020), rod trenutno obuhvata 466 validno opisanih i potvrđenih vrsta (LPSN, 2025). Predstavlja ekološki najznačajniju grupu bakterija na planeti u okviru koje postoji izuzetan diverzitet zahvaljujući izrazitoj fiziološkoj i genetičkoj adaptabilnosti u fluktuirajućim uslovima sredine (Spiers et al., 2000). Predstavnici roda mogu biti prisutni u različitim kopnenim i vodenim sredinama, kao i u interakciji sa biljkama i životinjama (Peix et al., 2018). U okviru biljne filosofije, rod *Pseudomonas* predstavlja jedan od najzastupljenijih rodova (Thapa & Prasanna, 2018). Iako pseudomonade nisu u velikoj meri zastupljene u slatkim vodama, često se mogu detektovati nakon padavina (Batrach et al., 2019). S tim u vezi, predstavnici roda značajni su za kruženje vode u prirodi (Morris et al., 2013). U okviru naučne zajednice, od izuzetnog su značaja za proučavanje zbog njihove uloge u razvoju bolesti ljudi i biljaka, s jedne strane, i primene u biotehnologiji, sa druge strane (Silby et al., 2011). U asocijaciji sa biljkama, mogu naseljavati različite površine: *Pseudomonas syringae* kolonizuje površinu lista i unutrašnjost biljnog tkiva (apoplast), dok su vrste *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens* i *Pseudomonas aeruginosa* bolje prilagođene uslovima u rizosferi (Mithani et al., 2011).

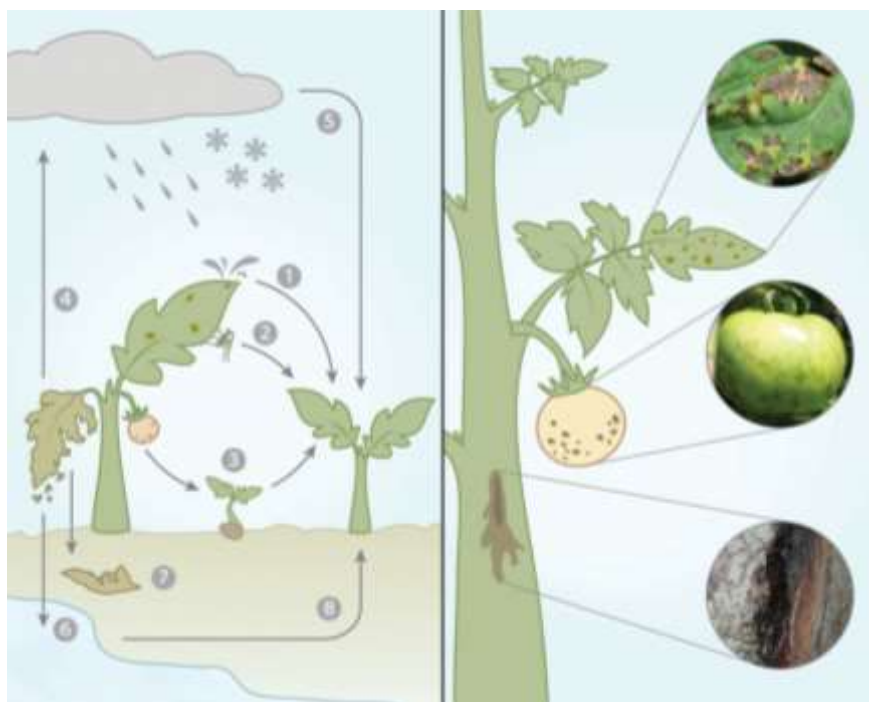
P. syringae kompleks vrsta obuhvata najbolje proučene biljne patogene koji se koriste kao model organizam za ispitivanje molekularnih mehanizama virulencije, adaptabilnosti patogena, kao i za proučavanje mikrobijalne evolucije, ekologije i epidemiologije (Xin et al., 2018). Među predstavnicima su izazivači bolesti mnogih ekonomski važnih biljaka, međutim, pojedinačni sojevi u manjoj ili većoj meri pokazuju specifičnost prema određenim domaćinima (Xin et al., 2013). Prevalencija *P. syringae* u filosofiji je rezultat različitih karakteristika kao što su širok opseg domaćina, diverzitet strategija virulencije i kompeticije, raznovrsnost ekoloških niša koje mogu naseljavati, kao i raznovrsnost strategija kolonizacije domaćina (Xin et al., 2018).

Sa druge strane, mnoge saprofitne pseudomonade imaju sposobnost promocije rastenja biljaka i koriste se u poljoprivredi kao novi inokulanati za njihovu zaštitu (Rivilla & Malone, 2023). *P. putida* predstavlja široko rasprostranjenu saprofitnu vrstu koja se često može izolovati iz zemljišta, biljaka i zagađenih staništa (Navarro-Monserrat & Taylor, 2023). Predstavnici vrste su poznati po sposobnosti bioremedijacije, produkcije metabolita značajnih u biotehnologiji i biološke kontrole fitopatogena (Marchi et al., 2013; Weimer et al., 2020). Neki od biokontrolnih mehanizama *P. putida* podrazumevaju: kompeticiju za prostor i nutrijente, brzu stopu rasta, adaptabilnost na različite sredinske uslove, sekreciju toksičnih efektor (T6SS), hitinolitičku aktivnost, produkciju amonijaka, cijanovodonika, proteaza, ureaza i indukovanu sistemsku rezistenciju biljaka (Costa-Gutierrez et al., 2022). Uz to, *P. putida* pokazuje izuzetnu sposobnost kolonizacije različitih ekonomski značajnih biljaka (Nelson et al., 2002). Zahvaljujući svim navedenim osobinama, *P. putida* može doprineti razvoju novih preparata za biokontrolu u najširem smislu.

U cilju kontrole bolesti izazvanih biljnim patogenima, veoma je važno poznavanje osobina patogena značajnih za njihovo preživljavanje u različitim rezervoarima, kao i sposobnost širenja na druge useve (Hallau et al., 2018). Kako bi se sprovodile preventivne mere za zaštitu useva, sve više se naglašava značaj ispitivanja primene nisko toksičnih, biorazgradivih i ekološki prihvatljivih mikrobijalnih preparata (Mnif & Ghribi, 2015). Literaturni podaci pokazuju da *P. putida* može predstavljati dobrog kandidata za biološku kontrolu biljnih patogena, među kojima je i *P. syringae* (Bernal et al., 2017; Bernal et al., 2018). Uzimajući u obzir ekonomsku važnost *P. syringae* kao patogena, ispitivanje glavnih osobina patogena uključenih u virulenciju i ispitivanje novih i efikasnih mehanizama njegove biološke kontrole je od izuzetnog značaja u sprečavanju potencijalnih budućih epidemija.

1.1. Rasprostranjenost i životni ciklus *P. syringae* kompleksa vrsta

P. syringae je biljni patogen mnogih ekonomski važnih poljoprivrednih kultura, koji je prisutan i van poljoprivrednih staništa, na biljkama i u različitim vodenim sredinama (Monteil et al., 2016). Diseminacija *P. syringae* u različita staništa omogućena je putem aerosola, insektima kao vektorima, ili preko kontaminiranih biljnih delova kao što su semena (Slika 1). U vidu aerosola, mogu se širiti na udaljenost od čak 6 m za samo jedan dan, a u toku nekoliko dana i oko 20 m (Morris et al., 2013). Pored toga, za diseminaciju je značajno i prisustvo ove vrste u snegu i kiši, kao i u kopnenim vodama (Arnold & Preston, 2019). Izvan poljoprivrednih staništa takođe su prisutni sojevi sa izuzetnim patogenim potencijalom (Morris et al., 2013). Poznavanje potencijalnih rezervoara patogena značajno je u upravljanju kontrolom bolesti u budućnosti i sprečavanju potencijalnih budućih epidemija izazvanih ovim kompleksom vrsta.



Slika 1. Transmisija *P. syringae* putem kiše i aerosola (1), insekata (2), preko semena (3). Iz atmosfere (4) sojevi koji imaju aktivnost u stvaranju čestica leda mogu ponovo dospeti na biljne površine putem snega i kiše (5). Diseminacija može biti i putem terestričnih vodenih sistema (6, 8) ili biljnih ostataka u zemljištu (7) (levo). Simptomi izazvani *P. syringae* na listovima, plodovima i stablu (desno) (preuzeto i modifikovano iz Arnold & Preston, 2019).

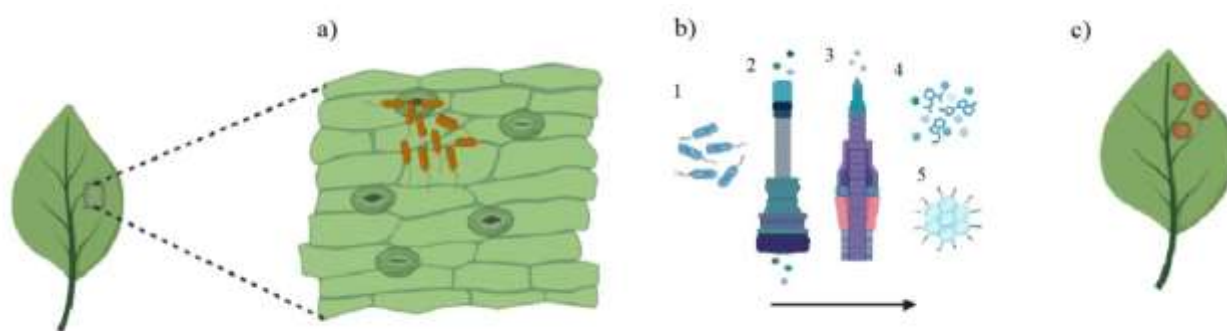
Bakterije koje kolonizuju biljne delove mogu formirati epifitne ili endofitne populacije. Epifitna mesta obuhvataju kutikulu koja pokriva epidermis, trihome i stomine ćelije zatvaračice, dok endofitna mesta obuhvataju stominu duplju, intracelularne prostore i mezofil (Sabaratnam & Beattie, 2003). Životni ciklus *P. syringae* karakteriše se (i) epifitnom fazom, kada bakterije proliferišu na površini biljnog tkiva (filosferi) i (ii) endofitnom fazom u kojoj ulaze u biljno tkivo i kolonizuju intracelularni prostor (apoplast), kada dolazi do izazivanja bolesti (Xin et al., 2018). Epifitne populacije na asimptomatskim biljkama predstavljaju rezervoar bakterija koje pod odgovarajućim uslovima mogu ući u apoplast i dovesti do infekcije i razvoja simptoma (Helmann et al., 2019).

Simptomi bolesti mogu se javiti na svim nadzemnim delovima biljke (Slika 1). Infekcije su uglavnom okarakterisane hlorozom i nekrozom na listovima, vrhovima stabljiki, pupoljcima i cvetovima (Arnold & Preston, 2019). Za plodove su takođe karakteristične nekrotične lezije, kao i

odloženo sazrevanje, dok se na drvenastim delovima biljke mogu uočiti i gale i kanceri (Arnold & Preston, 2019).

1.2. Faktori virulencije *P. syringae* kompleksa vrsta

Penetracija bakterija kroz kutikulu lista najčešće se dešava kroz prirodne otvore na listovima kao što su stome ili oštećenja (Slika 2) (Chaudhry et al., 2021). Sposobnost kolonizacije zavisi od više faktora kao što su uslovi životne sredine, genotip i fenotip biljke, interakcija sa drugim mikroorganizmima/biljkom domaćinom, kao i sposobnosti kolonizatora da izbegne ili toleriše različite stresore (Leveau, 2019). Kada govorimo o uslovima životne sredine, jedan od glavnih faktora je vlažnost. Visoka vlažnost olakšava ulazak bakterija i neophodna je za proliferaciju *P. syringae* unutar apoplasta (Xin et al., 2018). Uz visoku vlažnost, temperatura je takođe jedan od faktora koji u velikoj meri utiče na izazivanje bolesti. Posebno pogodne su temperature između 15 i 20 °C, dok se simptomi bolesti ređe javljaju pri temperaturama nižim od 15 °C i višim od 20 °C, a najređe na 30 °C (Gullino et al., 2009). Sredinski faktori utiču i na ekspresiju različitih faktora virulencije kod *P. syringae*. Glavni faktori virulencije obuhvataju pokretljivost, Tip III sekretorni sistem (T3SS) i njegove efektorne proteine, enzime koji degraduju biljni ćelijski zid i egzopolisaharide, fitotoksine, fitohormone i aktivnost u stvaranju čestica leda (engl. „Ice Nucleation Activity“- INA) (Pontes et al., 2020).



Slika 2. Kolonizacija biljnog tkiva od strane *P. syringae*. a) ulazak bakterija u apoplast; b) faktori virulencije: (1) pokretljivost; (2) T3SS; (3) T6SS; (4) fitotoksini; (5) aktivnost u stvaranju čestica leda; c) izazivanje simptoma bolesti. Kreirano na BioRender.com.

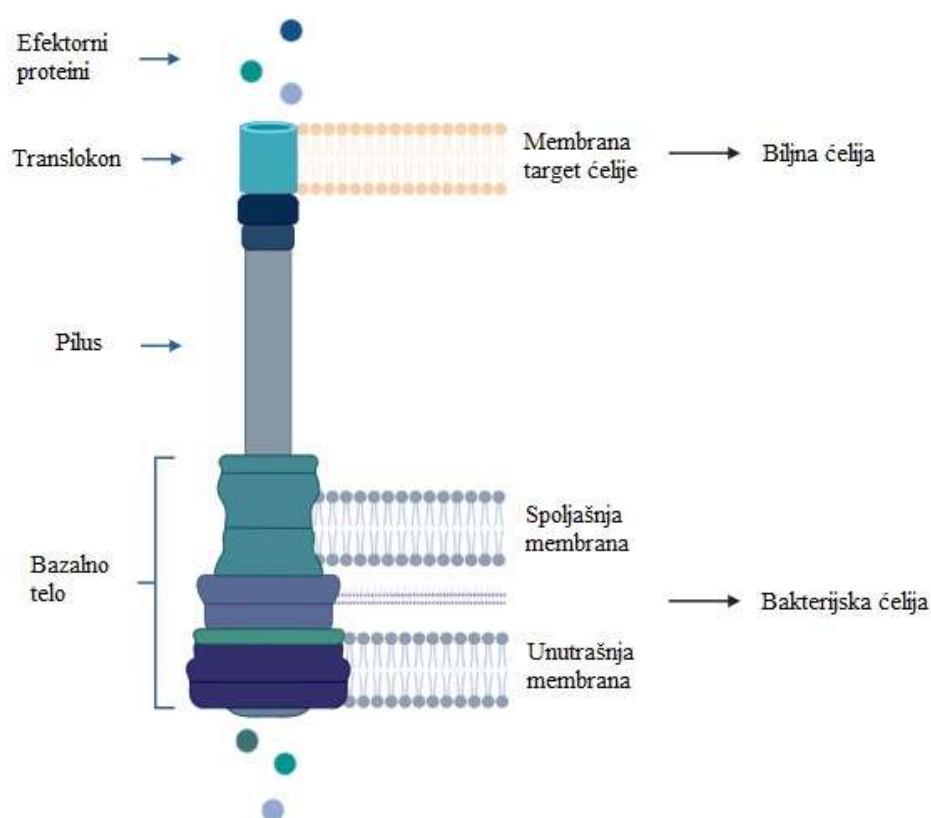
1.2.1. Pokretljivost

Kolonizacija filofere od strane fitopatogena predstavlja kritičan korak za uspostavljanje epifitnog i endofitnog dela životnog ciklusa. Pokretljivost zavisna ili nezavisna od flagela ima ključnu ulogu za preživljavanje u različitim uslovima sredine i ostvarivanje interakcija sa biljkama (Panopoulos & Schroth, 1974). Flagela predstavlja strukturu izgrađenu od subjedinica flagelina, povezanu sa transmembranskim motornim kompleksom (Rossez et al., 2015). Neophodna je za kretanje plivanjem i rojenjem (Hockett et al., 2013). Bakterijske planktonske ćelije se kreću plivanjem i ulaze u apoplast, a zatim se vezuju za površine biljnih ćelija (Ichinose et al., 2013). Kretanje plivanjem može biti ostvareno kao posledica detekcije hemijskih signala koji se oslobađaju iz stoma (Clarke et al., 2016). Nakon što se vezuju za biljne ćelije, dolazi do rojenja ili kretanja trzajima (Ichinose et al., 2013). Rojenje predstavlja važan faktor za uspešnu kolonizaciju preko uspostavljanja biofilma kod različitih predstavnika u okviru *P. syringae* kompleksa vrsta (Venieraki et al., 2016). Kretanje trzajima predstavlja kretanje nezavisno od flagela posredovano tip IV pilima (T4P) i koristi

se primarno za pokrete na površini listova (Li et al., 2007). Pili takođe učestvuju i u adheziji i inicijaciji formiranja biofilma pri čemu dolazi do produkcije različitih egzopolisaharida (Heredia-Ponce et al., 2021). Značaj kretanja plivanjem, rojenjem i trzajima kod različitih predstavnika u okviru *P. syringae* kompleksa vrsta u virulenciji pokazan je negativnim uticajem delecije master regulatora na virulentni potencijal (Kanda et al., 2011; Ngyen et al., 2012).

1.2.2. Tip III sekretorni sistem

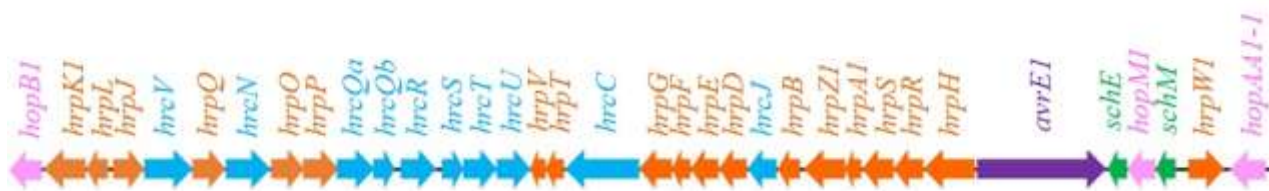
T3SS predstavlja nanomašineriju koja omogućava translokaciju efektornih proteina u citoplazmu ćelija domaćina koji manipulišu ćelijskim procesima u korist patogena. Tip III sekretorni aparat prostire se kroz spoljašnju i unutrašnju bakterijsku membranu i povezan je sa pilusom koji omogućava probijanje biljnog ćelijskog zida (Slika 3). Sa vrhom pilusa povezan je translokon koji omogućava prolazak efektornih proteina kroz ćelijsku membranu domaćina u citoplazmu ćelije (Büttner & He, 2009).



Slika 3. Osnovna građa T3SS. Kreirano u BioRender.com.

T3SS biljnih patogena kodiran je *hrp* genima (engl. „hypersensitive response and pathogenicity“) koji su neophodni za izazivanje bolesti kod biljaka osjetljivih na patogena i izazivanje hipersenzitivne reakcije kod rezistentnih biljaka (Lindgren et al., 1986; Ichinose et al., 2013). U građi T3SS učestvuje oko 20 proteina, a najmanje devet označenih kao Hrc (engl. „Hrp conserved“) je konzervirano među biljnim i animalnim patogenima (Büttner & Bonas, 2006). Za većinu predstavnika *P. syringae* kompleksa vrsta karakteristično je postojanje efektornog lokusa varijabilnog među patogenim varijetetima (engl. „exchangeable effector locus“ – EEL), klastera *hrp/hrc* gena i konzerviranog efektornog lokusa (engl. „conserved effector locus“ – CEL) prisutnog u svim

okarakterisanim sojevima (Tampakaki, 2014). Geni koji kodiraju sekretorni aparat T3SS kodirani su sa četiri operona u okviru *hrp* genskog klastera (Slika 4).



Slika 4. Organizacija T3SS gena u okviru *hrp/hrc* genskog klastera *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 (preuzeto i modifikovano iz Xie et al., 2019).

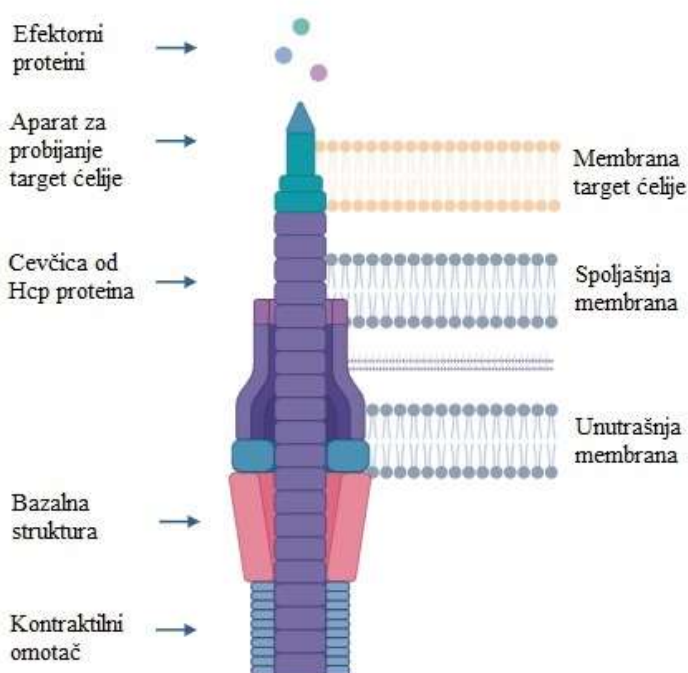
U okviru *hrpZ* genskog klastera nalaze se geni koji kodiraju proteine pilusa (*hrpA*) i poru (*hrpZ*) kroz koju efektori dospevaju u ćeliju domaćina (Guttman et al., 2006). Pored toga, *hrpA* gen je neophodan za ekspresiju gena koji kodiraju regulatorne i efektorne proteine T3SS (Wei et al., 2000). Efektori proteini *P. syringae* uglavnom ciljaju membranu ćelije domaćina (52%), jedro (25%) i citoplazmu (19%), a u manjoj meri hloroplast (3%), mitohondrije (1%) i endoplazmatični retikulum (1%) (Khan et al., 2018). Skup svih poznatih efektora u okviru *P. syringae* čini efektorom (engl. „effectorome“) koji obuhvata preko 70 različitih familija (Bundalovic-Torma et al., 2022). Kod pojedinačnih sojeva prisutno je uglavnom 15 do 30 različitih efektora (Wei et al., 2018). Neki od njih su konzervirani i kodirani su genima sa Hrp ostrva patogenosti (AvrE, HopI, HopAA i HopM), dok postoji veći set varijabilnih efektora (Lindeberg et al., 2012). T3SS supstrati koji se označavaju kao „harpins“ sekretuju se u većoj meri od efektornih proteina, interaguju sa biljnim ćelijskim zidom i membranom i imaju primarnu funkciju u translokaciji efektor (Collmer et al., 2002).

Postoji stalna „trka na naoružanju“ između biljaka domaćina i patogena: s jedne strane biljke evoluiraju mehanizme kojima prepoznaju diverzitet T3SS efektor, dok sa druge strane patogeni evoluiraju mehanizme kojima izbegavaju prepoznavanje efektor od strane biljaka (Dillon et al., 2019). Grupa efektor T3SS koji se označavaju kao avirulentni proteini (Avr) sprečavaju patogena u izazivanju bolesti biljke indukovanjem imuniteta pokrenutog efektorima (engl. „Effector triggered immunity“ - ETI) koji dovodi do programirane ćelijske smrti – hipersenzitivne reakcije (HR) (Crabill et al., 2010). Sa druge strane, mnogi T3SS efektori imaju ulogu u suprimiranju ETI odgovora biljke (Guo et al., 2009). Upoznavanje repertoara efektor i mehanizama koje patogen koristi u izazivanju bolesti biljaka je od značaja u cilju pronalaženja najadekvatnijeg načina kojim bi se mogla izvršiti efikasna biološka kontrola patogena.

1.2.3. Tip VI sekretorni sistem

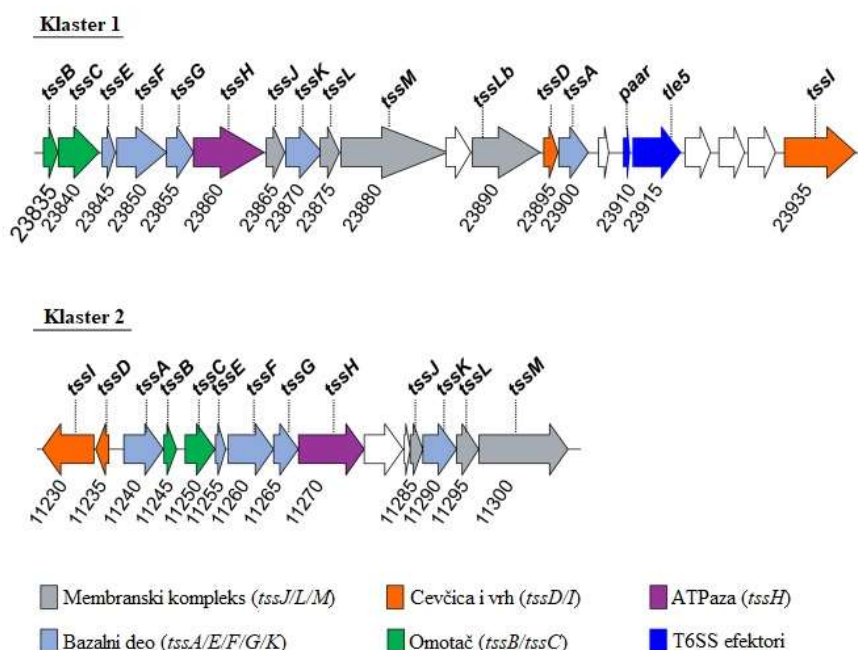
Pored T3SS, ulogu u virulenciji i kolonizaciji *P. syringae* ima i Tip VI sekretorni sistem (T6SS). Geni koji kodiraju T6SS su prvi put identifikovani kod biljnog patogena *Rhizobium leguminosarum* (Bladergroen et al., 2003; Matte et al., 2024). Danas je poznato da su T6SS široko rasprostranjeni među komensalnim i patogenim Gram-negativnim bakterijama uključujući predstavnike Acidobacteria, Bacteroidetes, Deferrubacteres, Gemmatimonadetes, Nitrospirae, Planctomyces, a pogotovo na hromozomima γ -Proteobacteria i na plazmidima α - i β -Proteobacteria (Matte et al., 2024). Sistem je prisutan kod više od 25% Gram-negativnih bakterija (Allsopp & Bernal., 2023). Međutim, još uvek ne postoji podatak u literaturi o procentu bakterija kod kojih je ovaj sistem funkcionalan. Funkcionalnost sistema ispitivana je samo u okviru pojedinačnih sojeva, među kojima su različiti predstavnici roda *Pseudomonas* (Basler et al., 2013; Decoin et al., 2014; Bernal et al., 2017; Wang et al., 2021). Važan je kod mnogih patogena za rast u okviru biljnih tkiva i izazivanje bolesti, što je pokazano kod *P. syringae*, *Erwinia amylovora*, *Xanthomonas* spp., *Pantoea ananatis*, *Burkholderia glumae* i *Ralstonia solanacearum* (Wang et al., 2021; Matte et al., 2024).

U direktnom kontaktu između ćelija, toksini T6SS dospevaju u ciljne ćelije preko sekretornog aparata koji se prostire od citoplazme do spoljašnje membrane (Slika 5). Sekretorni aparat građen je od 13 konzerviranih proteina nazvanih Tss (engl. „Type six secretion“) proteini (Durand et al., 2014; Green & Mecsas, 2016). Protein Hcp (engl. „Hemolysin-coregulated protein“) formira cevčicu okruženu kontraktilnim omotačem od TssB i TssC proteina (Bernal et al., 2018). Omotač je povezan sa kompleksom proteina koji čine bazalnu strukturu (TssA, TssE, TssF, TssG, TssK) i membranskim proteinima (TssJ, TssL, TssM) (Alcoforado Diniz et al., 2015). VgrG i PAAR proteini se nalaze na vrhu Hcp cevčice i nakon kontrakcije omotača izbacuju se iz ćelije zajedno sa efektorima (Bernal et al., 2018). Kombinacije VgrG/PAAR proteina su različite, tj. sistem je modularan, tako da se može transportovati širok spektar efektor (Bernal et al., 2017). Nakon izbacivanja efektornih proteina u ćelije recipijenta, dolazi do deasembliranja kompleksa zahvaljujući ClpV ATP-azi koja omogućava recikliranje kompleksa i njegovo ponovno asembliranje (Lien & Lai, 2017).



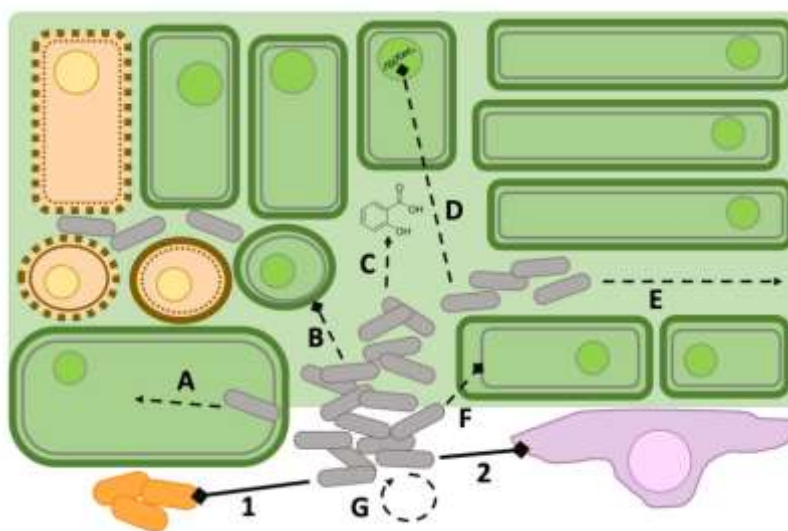
Slika 5. Osnovna građa T6SS. Kreirano u BioRender.com.

Kod biljnih patogena među kojima je i *P. syringae* može biti prisutan jedan ili veći broj genskih klastera T6SS kod pojedinačnih sojeva (Sarris et al., 2010; Bernal et al., 2018; Chien et al., 2020). Geni za gradivne komponente sistema (*tssA-M*) nalaze se u okviru T6SS klastera (Slika 6). Geni za efektorne proteine mogu biti kodirani u okviru klastera (Yu et al., 2024), mada su efektori „siročići“ često kodirani sa regiona van glavnog T6SS genskog klastera (Matte et al., 2024). Efektori „siročići“ su rasuti po hromozomu i ne nalaze se u blizini drugih poznatih T6SS komponenti (Fridman et al., 2020). To su često geni za VgrG i Hcp proteine uz koje se mogu nalaziti geni za druge efektore, a njihovo postojanje može biti rezultat horizontalnog genskog transfera (Bernal et al., 2017; Durán et al., 2023). U pojedinačnim soju može biti prisutan jedan ili veliki broj gena za efektore (Matte et al., 2024).



Slika 6. Organizacija gena u okviru T6SS kod *P. syringae* MB03 (preuzeto i modifikovano iz Yu et al., 2024).

T6SS efektorni proteini narušavaju integritet esencijalnih struktura u ciljnim ćelijama (Slika 7). Mogu biti svrstani u različite kategorije prema funkciji: enzimi koji degraduju ćelijski zid (murein hidrolaze), proteini koji ciljaju membranu (fosfolipaze, proteini koji formiraju pore) i nukleaze (Durand et al., 2014). Efektorni proteini mogu imati sinergistički efekat, tako da se različitim kombinacijama efektora može povećati njihova efikasnost delovanja na ciljne ćelije (Allsopp & Bernal., 2023). Pored T6SS toksina, sintetišu se i proteini za imunitet koji sprečavaju sopstvenu intoksikaciju inaktiviranjem odgovarajućeg toksina u direktnoj interakciji (Russell et al., 2014).



Slika 7. Uloge T6SS fitopatogena. Ciljevi T6SS sistema mogu biti druge bakterije (1), amebe (2) i biljne ćelije (A-G). Uticaj T6SS na nodulaciju (A), degradaciju ćelijskog zida (B), imunski odgovor biljaka (C), biljnu DNK (D), kolonizaciju biljnog tkiva (E), integritet biljne ćelijske membrane (F) i regulaciju drugih faktora virulencije (E) (preuzeto iz Matte et al., 2024).

1.2.4. Fitotoksini

Fitotoksini su sekundarni metaboliti biljnih patogena koji utiču na razvoj bolesti biljaka. Mogu biti specifični za određene domaćine u manjoj ili većoj meri, ali kod većine fitotoksina koje proizvodi *P. syringae* izostaje specifičnost, te oni izazivaju simptome na mnogim biljkama domaćinima (Bender et al., 1999). U okviru *P. syringae*, dobro su proučeni fitotoksini koronatin, siringomicin, siringolin A, siringopeptin, fazeolotoksin, tabtoksin i mangotoksin (Ichinose et al., 2013).

Koronatin je nespecifičan fitotoksin delimično poliketidnog porekla (lipidni depsipeptid) prisutan kod brojnih patogenih varijeteta *P. syringae* koji izaziva bolesti kod mnogih biljnih vrsta (Geng et al., 2014). Posедуje strukturne i funkcionalne sličnosti sa jasmoničnom kiselinom (JK), stoga utiče na otvaranje stoma, čime se olakšava ulazak patogena u apoplast i izazivanje bolesti (Zheng et al., 2012). Kao i jasmonična kiselina, koronatin aktivira signalni put koji dovodi do inhibicije elongacije korena i stimuliše produkciju etilena i ekspresiju PR (engl. „pathogen related“) proteina (Ichinose et al., 2013). Primarni simptom koji izaziva koronatin je hloroza, a dovodi i do promena u strukturi hloroplasta i biljnog ćelijskog zida (Bender et al., 1999). U studiji Thapa et al. (2021) pokazan je značaj gena uključenih u produkciju koronatina za razvoj hloroze kod biljaka. Poređeni su genetički veoma srodni sojevi *P. syringae* pv. *tomato* J4 i J6, koji se razlikuju u prisustvu gena za koronatin. Izražena hloroza uočena je nakon inokulacije sa J4 koji ima funkcionalne gene za koronatin, a nasuprot tome, pojava hloroze je izostala kod soja J6 kod kog su ovi geni odsutni.

Siringomicin i siringopeptin su fitotoksini koji izazivaju nekrotične promene na biljkama (Scholz-Schroeder et al., 2001). Siringomicin je nespecifičan fitotoksin koji ima primarno delovanje na ćelijsku membranu biljnih ćelija, mada može delovati i na mitohondrije (Bidwai et al., 1987). Zahvaljujući amfipatičnoj lipopeptidnoj strukturi, siringomicin se inseruje u lipidni dvosloj membrana i formira pore koje su propustljive za katjone i izaziva poremećaj u homeostazi jona K^+ , H^+ i Ca^{2+} , što je smrtonosno za ćelije (Bender et al., 1999). Sličan mehanizam delovanja kao i siringomicin ima siringopeptin (Iacobellis et al., 1992). Ova dva fitotoksina predstavljaju veoma značajne faktore virulencije kod *P. syringae*. Mutanti defektni u produkciji siringopeptina i siringomicina smanjuju virulentnost *P. syringae* pv. *syringae* B301D 59 i 26%, dok dvostruki mutant ima 76% smanjenu virulentnost (Scholz-Schroeder et al., 2001).

Fazeolotoksin proizvodi *P. syringae* pv. *phaseolicola* i *P. syringae* pv. *actinidiae* i dovode do nedostatka arginina i hloroze kod biljaka (Ichinose et al., 2013). Na produkciju ovog fitotoksina povoljno utiču temperature od 8-18 °C, dok se njegova produkcija smanjuje pri temperaturama 18-30 °C, iako je optimalna temperatura za rast *P. syringae* 28 °C (Nüske & Fritsche, 1989).

P. syringae pv. *tabaci*, *P. syringae* pv. *coronafaciens* i *P. syringae* pv. *garcae* proizvode tabtoksin koji indukuje hlorozu (Bender et al., 1999). Konkretnije, hidrolizom tabtoksina pri ulasku u ćelije domaćina nastaje tabtoksin-β laktam koji je biološki aktivan i dovodi do pojave hlorotičnog oboda koji okružuje nekrotični centar (Durbin, 1991). Tabtoksin ima veoma širok spektar delovanja i pored biljaka može uticati i na životinje i mikroorganizme (Turner & Taha, 1984). Predstavnic koji ga proizvode su od njegovog toksičnog dejstva zaštićeni zahvaljujući posedovanju tabtoksin rezistentnog proteina (Ichinose et al., 2013).

Mangotoksin je inhibitor ornitin acetil-transferaze koji je ključan enzim u biosintezi arginina i ornitina (Arrebola et al., 2009). Predstavlja glavni faktor virulencije kod *P. syringae* pv. *syringae* koji izaziva apikalnu nekrozu kod manga (Carrión et al., 2014). Njegova produkcija zabeležena je i kod *P. syringae* pv. *avellane* (Arrebola et al., 2011). Dodatno, može biti značajan za izazivanje nekroze i na drugim biljkama i doprinositi epifitnom fitnessu u filisferi (Arrebola et al., 2009).

1.2.5. Aktivnost u stvaranju čestica leda

Značajan faktor prilikom infekcije *P. syringae* predstavljaju rane koje mogu nastati na različite načine – mehaničkim oštećenjima ili kao posledica mraza. Mnogi sojevi *P. syringae* mogu delovati kao INA agensi koji podižu temperaturu zamrzavanja iznad temperature na kojoj su biljna tkiva osetljiva (Moore, 1988). *P. syringae* sintetizira membranski protein InaZ koji ima ulogu katalizatora u formiranju čestica leda na temperaturama od -2 do -4 °C (Cochet & Widehem, 2000). IN aktivnost je značajna za epifitnu fazu *P. syringae*, omogućava nastajanje povreda kod biljaka, što dovodi do oslobađanja vode i nutrijenata, kao i olakšanog ulaska bakterija u apoplast kao posledice uticaja na otvaranje stoma (Xin et al., 2018). U studiji Morris et al. (2008) pokazano je da je IN aktivnost prisutna kod svih sojeva *P. syringae* izolovanih iz snega, čime su autori ukazali na značaj ove vrste u kruženju vode u prirodi. Njihovo prisustvo u snegu i kiši od izuzetnog je značaja za diseminaciju u vrlo različita staništa. Stoga u prirodi postoje rezervoari populacija ovog patogena i van poljoprivrednih površina. Međutim, čak i izolati poreklom iz takvih staništa pokazuju virulentnost prema poljoprivrednim kulturama (Morris et al., 2008). Takve populacije mogu predstavljati izvor inokuluma i novih osobina koje doprinose fitnessu i agresivnosti u virulentnosti na biljnim domaćinima (Morris et al., 2007).

1.3. *P. syringae* pv. *aptata*

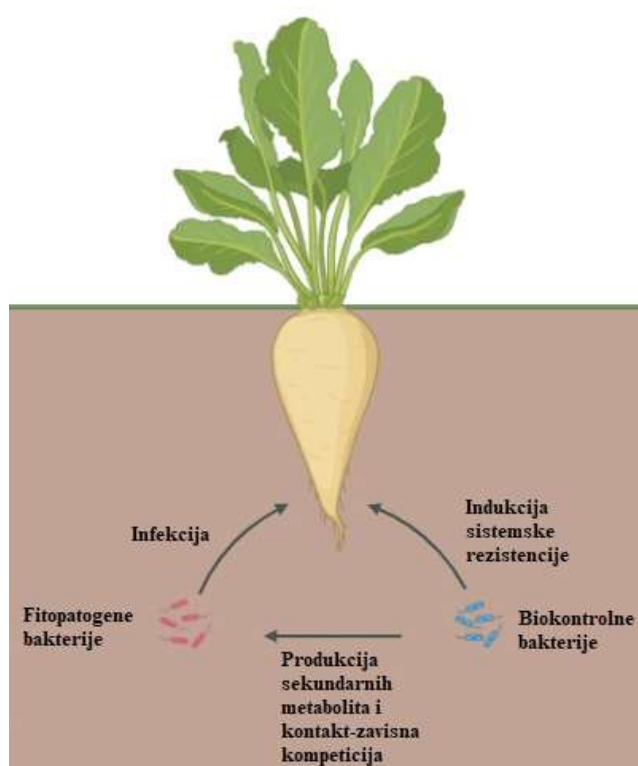
Kompleks vrsta *P. syringae* obuhvata blisko srodne *Pseudomonas* spp. fitopatogene predstavnike koji su slični na genetičkom nivou (Dillon et al., 2019). Od početka XXI veka, preko 70 epidemija izazvanih različitim predstavnicima *P. syringae* kompleksa zabeleženo je u 20 zemalja na preko 40 biljnih vrsta (Lamichhane et al., 2015). U okviru kompleksa vrsta opisano je preko 60 različitih patogenih varijeteta koji se razlikuju u patogenom potencijalu (Gomila et al., 2017).

Predstavnici *P. syringae* pv. *aptata* su izazivači bolesti lisne pegavosti kod nekoliko različitih biljnih domaćina (Nikolić et al., 2018). Simptomi bolesti javljaju se u vidu kružnih ili nepravilnih nekrotičnih mrlja na listovima sa svetlo braon centrom i tamnijim marginama (Stojšin et al., 2015). Bolest lisne pegavosti šećerne repe je prvi put zabeležena u Srbiji 2013. godine, a iste godine uočen je i visok nivo genetičkog diverziteta u okviru ovog patogenog varijeteta (Nikolić et al., 2018). U studijama koje su sprovedeli Nikolić et al. (2018) i Morris et al. (2019), pokazane su velike razlike među sojevima *P. syringae* pv. *aptata* kada je u pitanju stepen virulencije i opseg domaćina. U tom smislu postoji podela sojeva na slabo, umereno ili jako virulentne, pri čemu jako virulentni sojevi imaju širok opseg domaćina. Nasuprot njima, slabo virulentni sojevi inficiraju mali broj domaćina (Nikolić et al., 2018; Morris et al., 2019). Primer izuzetne razlike u opsegu domaćina predstavljaju sojevi *P. syringae* pv. *aptata* P16 i P21. U studiji Morris et al. (2019), soj P16 izazvao je simptome samo na peršunu, dok je P21 bio virulentan na 17 biljaka (biberu, geranijumu, krastavcu, dinji, spanaću, šećernoj repi, kupusu, lubenici, zelenoj salati, bundevi, cvekli, grašku, paradajzu, blitvi, luku, paprici i peršunu).

Slučajevi bolesti koje izaziva *P. syringae* pv. *aptata* zabeleženi su širom sveta (Stojšin et al., 2015; Rotondo et al., 2020; Nampijja et al., 2021). Iako Srbija predstavlja jednog od najvećih proizvođača šećerne repe u Jugoistočnoj Evropi, veliki gubici u prinosu još uvek nisu zabeleženi u našoj zemlji, uprkos izuzetnom patogenom potencijalu ove vrste (Morris et al., 2019). Međutim, promene u sredinskim uslovima, kao što su porast temperature i vlažnosti, mogu dovesti do širenja bolesti izazvane *P. syringae* pv. *aptata* (Nikolić et al., 2018). S obzirom na ekonomsku važnost ovog patogena, neophodna su još kompleksnija istraživanja kako bi se bolje razumeli mehanizmi virulencije patogena. Na taj način moglo bi se adekvatno pristupiti razvijanju mehanizama efikasne i ekološki prihvatljive kontrole bolesti u cilju sprečavanja potencijalnih budućih epidemija koje bi značajno mogle uticati na prinos.

1.4. Biološka kontrola biljnih patogena

Poljoprivreda danas u velikoj meri zavisi od primene različitih hemijskih fertilizatora i pesticida u cilju dobijanja što većih prinosa useva. Kao posledica primene takvih supstanci dolazi do narušavanja ekosistema. Uzimajući u obzir očuvanje životne sredine i ljudskog zdravlja, istraživanja su u sve većoj meri fokusirana na pronalaženje alternative za zaštitu i povećanje prinosa useva. Mikrobijalni biopesticidi pokazuju prednosti nad hemijskim pesticidima u smislu niske toksičnosti, brze biorazgradivosti i ekološke prihvatljivosti (Mnif & Ghribi, 2015). Mnogi mikroorganizmi koji žive u asocijaciji sa biljkama predstavljaju prirodne antagoniste fitopatogena i proučavaju se kao potencijalni biokontrolni agensi (Slika 8). U okviru roda *Pseudomonas*, vrste *P. protegens*, *P. chlororaphis*, *P. putida* i *P. fluorescens* često se proučavaju kao promotori rasta biljaka i biokontrolni agensi zahvaljujući karakteristikama kao što su: (I) kultivabilnost i sposobnost brzog rasta, (II) uspešna kolonizacija biljnih tkiva, (III) kompetitivnost u različitim sredinama, (IV) sposobnost da produkuju širok spektar bioaktivnih metabolita koji direktno ili indirektno promovišu rastenje biljaka i/ili inhibiraju rast patogena (Navarro-Monserrat & Taylor, 2023).



Slika 8. Interakcija biokontrolnih bakterija sa biljkama i fitopatogenima. Kreirano u BioRender.com.

1.4.1. Sekundarni metaboliti *P. putida*

Vrste roda *Pseudomonas* sintetišu širok spektar sekundarnih metabolita koji mogu imati značajnu antimikrobnu aktivnost. Za fluorescenciju nekih pseudomonada odgovoran je fluorescentni pigment pioverdin (Pvd). Pvd je izgrađen od hromofore, acilnog lanca vezanog za aminogrupu hromofore i varijabilnog peptidnog lanca vezanog za karboksilnu grupu hromofore (Visca et al., 2007). Ovaj pigment ima visok afinitet za vezivanje jona gvožđa i predstavlja sideroforu. U medijumu siromašnim gvožđem, produkcija Pvd dovodi do inhibicije rasta bakterija i gljiva koje imaju manje efikasne siderofore. Rizobakterije koje promovišu rast biljaka (engl. "Plant Growth Promoting Rhizobacteria" - PGPR) i produkuju siderofore kao što je Pvd, mogu biti u kompeticiji sa patogenim

mikroorganizmima koji imaju manje razvijene sisteme za uzimanje gvožđa. *P. putida* suprimira rast vrsta roda *Fusarium*, međutim ova supresija izostaje kada se zemljište obogati gvožđem, a pokazano je i da Pvd- negativni mutanti fluorescentnih pseudomonada pružaju manju zaštitu biljkama u odnosu na *wild type* (wt) sojeve (Haas & Défago, 2005). Generalno, Pvd predstavlja jednu od najznačajnijih antimikrobnih komponenti koju proizvodi *P. putida* (Maksimov et al., 2011).

Pseudomonade sa biokontrolnim potencijalom uglavnom sintetiziraju dva ili više različitih fenazina, što je regulirano genetičkim i sredinskim faktorima (Mavrodi et al., 2006). Fenazini inhibiraju transport elektrona i u prisustvu feri-piohelina katalizuju formiranje hidroksil radikala, što dovodi do oštećenja lipida i drugih makromolekula (Haas & Défago, 2005). Izolat iz rizosfere identifikovan kao *P. putida* proizvodi derivat fenazina 5-metil-fenazin-1-karboksilnu kiselinu koja poseduje antimikrobnu i antitumorsku aktivnost (Kennedy et al., 2015).

Dodatno, ciklični lipopeptidi imaju sposobnost da se inseruju u membrane ciljnih ćelija i narušavaju njihovu funkciju, što rezultuje različitim antibakterijskim i antifungalnim efektima (Haas & Défago, 2005). Pseudomonade proizvode različite lipopeptide među kojima su viskozin, amfizin, tolazin, kao i prethodno pomenuti siringomicin i siringopeptin (Li et al., 2013). Izolat *P. putida* iz rizosfere proizvodi ksantolizine među kojima je najdominantniji ksantolizin A, koji poseduje antifungalnu aktivnost, a toksičan je i za Gram-pozitivne bakterije (Li et al., 2013).

Kod sojeva iz *P. putida* grupe detektovana je i produkcija ramnolipida (Loeschcke & Thies, 2015). Ramnolipidi predstavljaju efikasne biosurfaktante sa visokim potencijalom za primenu u industriji, a poseduju i antimikrobnu aktivnost (Wittgens et al., 2011). Dodatno, kod *P. putida* NH-50 uočena je produkcija pioluteorina i jona cijanida (Hassan et al., 2011). Pioluteorin može biti jedan od važnih faktora u biokontroli oomiceta (Brodhagen et al., 2004), a poseduje i antibakterijsku aktivnost (Kidarasa et al., 2011). Jon cijanida iz cijanovodonične kiseline (HCN) je potencijalni inhibitor mnogih metaloenzima, posebno citohrom c oksidaza koje sadrže bakar (Haas & Défago, 2005). HCN koju sintetiziraju pseudomonade, može predstavljati jedno od glavnih jedinjenja odgovornih za inhibiciju rasta biljnih patogena (Lanteigne et al., 2012).

1.4.2. Kontakt-zavisna kompeticija

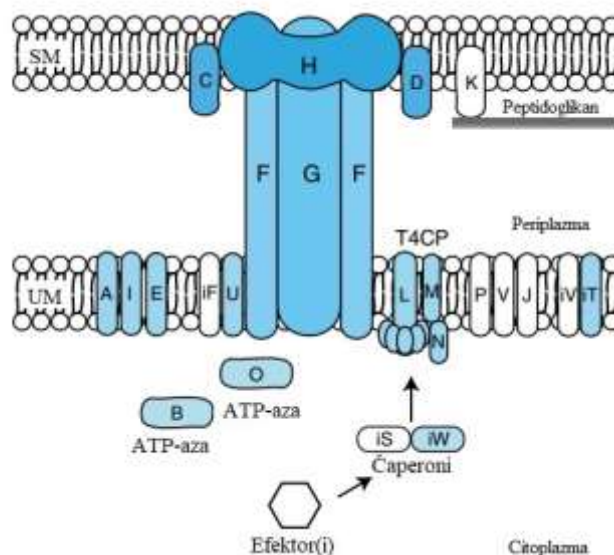
Većina bakterija živi u gustim zajednicama, gde je kompeticija za resurse ključna za njihovo preživljavanje. Mikroorganizmi koji žive u asocijaciji sa biljkama mogu biti uključeni u interbakterijske interakcije kojima ubijaju potencijalne biljne patogene, na taj način štiteći biljku. U prirodnim staništima, kompeticija za nutrijente između fitopatogena i saprofitnih, nepatogenih vrsta može biti iskorišćena za pronalaženje sojeva, potencijalnih kandidata za biološku kontrolu bolesti biljaka.

Jedan od načina adaptacije bakterijskih ćelija različitim sredinama je produkcija efektnih molekula (toksina) koji utiču na regulaciju odnosa u okviru mikrobioma. Kontakt-zavisne kompetitivne interakcije posredovane su različitim sekretornim sistemima: Tip IVB sekretorni sistem (T4BSS), Tip Vb sekretorni sistem (poznat i kao CDI sistem – engl. „contact-dependent growth inhibition“) i T6SS (Ikryannikova et al., 2020). Ovim mehanizmima obezbeđuje se prednost u kompeticiji kroz inhibiciju rasta susednih ćelija u direktnom kontaktu između njih.

1.4.3. Tip IVB sekretorni sistem

U okviru T4SS razlikuju se dva sistema: T4ASS čija je uloga prevashodno u translokaciji DNK (VirB/D4 sistem kod *Agrobacterium tumefaciens*) i T4BSS za koji se do nedavno smatralo da sekretuje efektorne proteine u eukariotske domaćine (Dot/Icm sistem kod *Legionella pneumophila*) (Purtschert-Montenegro et al., 2022). Ova dva sistema se vrlo razlikuju u svojoj građi. T4ASS je sastavljen od 11 VirB proteina i VirD4, dok Dot/Icm T4BSS ima kompleksniju građu u koju ulazi do 27 proteina neophodnih za pravilno funkcionisanje sistema (Slika 9) (Voth et al., 2012).

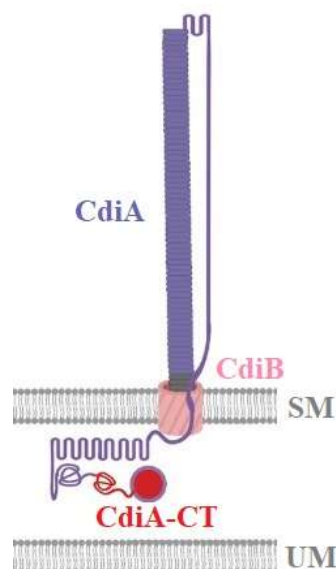
Istraživanja Dot/Icm T4BSS ukazuju da komponente sistema imaju strukture slične drugim tipovima sekretornih sistema (Tip 2 sekretorni sistem, T3SS, T4ASS, T6SS) (Nagai & Kubori, 2011). IcmF i DotU su inicijalno identifikovani kao komponente Dot/Icm sistema *L. pneumophila*, međutim, nedostaju većini drugih T4BSS (Nagai & Kubori 2011). Homolozi IcmF i DotU široko su rasprostranjeni među proteobakterijama i predstavljaju komponente T6SS (Cascales, 2008). Pokazano je da *P. putida* može koristiti T4BSS kao defanzivno oružje u kontakt-zavisnoj kompeticiji i kao ofanzivno oružje u invaziji postojećih biofilmova (Purtschert-Montenegro et al., 2022).



Slika 9. Osnovna građa T4BSS koji čine Dot proteini označeni slovima A-P i Icm proteini obeleženi iF, iV, iS i iW. Plavom bojom označeni su homolozi proteina T4BSS *P. putida*. SM – spoljašnja membrana; UM – unutrašnja membrana. Preuzeto i modifikovano iz Purtschert-Montenegro et al. (2022).

1.4.4. Tip Vb sekretorni sistem

Tip Vb sekretorni sistem (T5bSS) predstavlja jedan od sistema uključenih u kontakt-zavisne interakcije i označava se kao CDI sistem. Fenomen kontakt-zavisne kompeticije je prvobitno otkriven kod *E. coli* EC93 (Aoki et al., 2011), dok je još uvek slabije proučen u okviru *Pseudomonadaceae*. Kod pseudomonada homolozi *cdiA* i *cdiB* gena pronađeni su kod humanih patogena (*P. aeruginosa*), biljnih patogena (*P. syringae*), kao i saprofita koji promovišu rast biljaka (*P. putida*, *P. fluorescens*, *P. protegens*, *P. brassicacearum*) (Berendsen et al., 2015; Mercy et al., 2016). Gen *cdiB* kodira CdiB protein koji se nalazi u spoljašnjoj membrani i neophodan je za sekreciju efektornog proteina CdiA (Slika 10). CdiA efektori poseduju varijabilne toksične C-terminalne domene, koji mogu ostvariti različita delovanja: formiranje pora u membrani target ćelije, degradacija DNK i RNK (Jamet & Nassif, 2015; Willett et al., 2015). Treća važna komponent CDI sistema je protein za imunitet – CdiI. CdiI proteini su takođe varijabilni, što je značajno za prepoznavanje i inaktivaciju odgovarajućih C-terminalnih domena CdiA proteina i zaštitu ćelija od autoinhibicije (Willett et al., 2015). Na taj način inhibira se isključivo rast ćelija sa kojima su u kompeticiji.

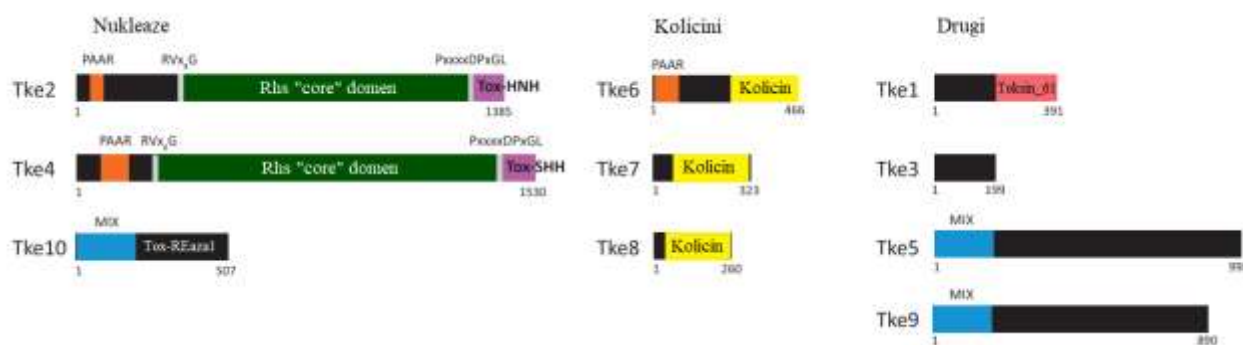


Slika 10. Osnovna građa T5BSS. Preuzeto i modificirano iz Lin et al. (2020).

1.4.5. Uloga Tip VI sekretornog sistema u biokontroli

Iako je prvobitno otkrivena uloga T6SS u virulenciji, tokom poslednje decenije veliki broj autora ukazuje na značaj T6SS u interakcijama između mikroorganizama i njegov uticaj na kompetitivni fitnes u polimikrobnom okruženju (Bernal et al., 2017; Gallegos-Monterrosa & Coulthrust, 2021). Kompeticija između bakterija posredovana T6SS može biti važna za zaštitu raznih ekonomski važnih biljaka čiju rizosferu i filozofu naseljavaju. Različiti sojevi mogu posedovati različit broj genskih klastera T6SS. Do sada je u okviru *P. putida* identifikovano 66 genskih klastera T6SS, a pojedinačni sojevi najčešće sadrže jedan ili dva klastera, maksimalno četiri (Bernal et al., 2017). Većina gena pripada K1-, K2- i K3-T6SS genskim klasterima, a klaster K1 ima najznačajniju ulogu u antibakterijskoj aktivnosti *P. putida* KT2440 (Bernal et al., 2017). Pokazano je da ovaj klaster ima značajnu ulogu u inhibiciji rasta biljnih patogena kao što su *P. syringae*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Xanthomonas campestris*, *Pectobacterium carotovorum* i *Pseudomonas savastanoi* (Bernal et al., 2023). Kod *P. putida* KT2440, TssA protein postoji u dve glavne forme: dugi (TssAL) i kratki (TssAS) (Bernal et al., 2021). Zajedno sa akcesornim proteinom TagA, TssAL omogućava polimerizaciju kontraktilnog omotača koji okružuje bazalni deo sekretornog aparata, dok TagB1 ima ulogu u stabilizaciji kratkog TssAS proteina klastera K1 i neophodan je za kompletnu ekstenziju K1-T6SS kontraktilnih omotača, čime se povećava efikasnost sistema (Bernal et al., 2021).

U studiji Bernal et al. (2017) ukazano je na prisustvo 10 potencijalnih parova efektornih i proteina za imunitet (Tke/Tki – engl. „Type six KT240 effector/immunity“) kod soja *P. putida* KT2440. Tke2, Tke4 i Tke6 sadrže N-terminalni PAAR domen (Slika 11) i predstavljaju specijalizovane efektore, dok ostali predstavljaju „cargo“ efektore. Specijalizovani efektori su fuzionisani sa strukturnim komponentama T6SS – Hcp, VgrG i PAAR proteinima, dok su „cargo“ efektori proteini koji sadrže toksični domen koji se nekovalentno vezuje za jedan od pomenutih strukturnih proteina (Dar et al., 2022). C-terminalni region Tke2 i Tke4 nosi citotoksični domen koji pripada NHN familiji nukleaza, dok Tke6, Tke7 i Tke8 imaju sličnosti sa kolicinima koji formiraju pore, a Tke10 je restrikciona endonukleaza. Tke5, Tke9 i Tke10 imaju MIX motiv, koji predstavlja marker za T6SS efektore i vezujući region za VgrG (Bernal et al., 2017), a efektori Tke1, Tke3, Tke7 i Tke8 nemaju PAAR i MIX domene (Slika 11).



Slika 11. Efektori T6SS kod *P. putida* KT2440 (preuzeto i modifikovano iz Bernal et al., 2017).

1.4.6. Indukovana sistemska rezistencija

Neke biokontrolne PGPR vrste mogu da dovedu do indukovane sistemske rezistencije (ISR) kod biljke domaćina. Različita strukturna i metabolička jedinjenja, uključujući antibiotike i siderofore nepatogenih sojeva roda *Pseudomonas* mogu indukovati sistemska rezistenciju (Gašić & Obradović, 2012). Flagele *P. putida* imaju značajnu ulogu u ISR kod pasulja, paradajza i *A. thaliana* (Bakker et al., 2007). Poznata je i uloga siderofora *P. putida* u izazivanju ISR kod paradajza, što je značajno u zaštiti ove biljke od patogena *Botrytis cinerea* (Ampntelnour et al., 2024).

Salicilna kiselina (SK) predstavlja glavni fitohormon i master regulator uključen u imunski odgovor biljaka na različite patogene (Gopalan et al., 2024). Signalni put salicilne kiseline koji može se aktivirati u prisustvu virulentnih, avirulentnih i nepatogenih mikroorganizama (Choudhary et al., 2007). Gen *npr1* ima krucijalnu ulogu u odgovoru biljaka na patogena i uspostavljanju sistemski stečene rezistencije i indukovane sistemske rezistencije (Backer et al., 2019). Generalno, ekspresija *npr1* gena može zavisiti od većeg broja faktora. Može biti povećana izlaganjem biljaka različitim tipovima stresa, kao što su fitopatogeni, suša ili salinitet (Gopalan et al., 2024). Pored toga, pokazano je i da nivo SK varira u zavisnosti od vremena tokom kojeg su biljke izlagane stresu (Gopalan et al., 2024). Dodatno, indukcija sistemske rezistencije zavisna od puta SK veoma se razlikuje u zavisnosti od biljne i bakterijske vrste. Međutim singalni put SK nije nužan put kojim PGPR dovode do sistemske rezistencije, već se u biljnom odgovoru mogu aktivirati i signalni putevi jasmonične kiseline i etilena (Choudhary et al., 2007). *P. putida* LSW17S dovodi do ISR kod *Arabidopsis* zavisnu od signalnog puta jasmonične kiseline (Van der Ent et al., 2009). Centralnu ulogu u signalnim putevima JK i abscisinske kiseline (AK) ima *myc2* gen i njegova ekspresija je povećana kod biljaka koje pokazuju ISR (Pozo et al., 2008). Kada je u pitanju AK, njena ključna uloga je u regulaciji biljnog rasta i adaptaciji pre svega na abiotički stres, dok je njena uloga u odgovoru na patogene vrlo kompleksna (Bordenave et al., 2013). AK signalni put može čak predstavljati ciljno mesto za efekte koje sekretuje *P. syringae* (de Torres-Zabala et al., 2007). Međutim, uopšteno gledano, ishod imunskog odgovora zavisi od veze između odgovarajućih signalnih puteva i regulatornih elemenata u promotorima gena uključenih u odbranu.

2. Ciljevi rada

Predstavnici *Pseudomonas syringae* kompleksa vrsta predstavljaju veoma heterogenu i najzastupljeniju grupu bakterijskih biljnih patogena, tako da je glavni cilj ovog istraživanja utvrđivanje osobina značajnih za virulentni potencijal i mehanizama koji se mogu koristiti u njihovoj biološkoj kontroli.

Za realizaciju ovog cilja postavljeni su specifični ciljevi:

- Analiza genoma odabranih sojeva *P. syringae* pv. *aptata* izolovanih sa šećerne repe, sa posebnim osvrtom na gene koji doprinose virulenciji;
- Utvrđivanje prisustva i aktivnosti Tip III sekretornog sistema kod odabranih sojeva *P. syringae* pv. *aptata* i analiza sekretoma sojeva sa različitim virulentnim potencijalom;
- Izolacija i identifikacija sojeva *P. putida*, kao agenasa za biokontrolu kroz kontakt-zavisnu kompeticiju;
- Evaluacija biokontrolne aktivnosti posredovane Tip VI sekretornim sistemom *P. putida* i uticaja ovog sistema na imunski odgovor šećerne repe.

3. Materijal i metode

3.1. Bakterijski sojevi i plazmidi korišćeni u ovom radu

U okviru istraživanja korišćeno je 32 izolata *P. putida* izolovanih iz reka Sava i Dunav i šest sojeva *P. syringae* pv. *aptata* izolovanih sa šećerne repe (Tabela 1). Pored izolata vrsta roda *Pseudomonas*, korišćeni su sojevi *Escherichia coli* DH5α i *E. coli* 2013.

Tabela 1. Kolekcija *Pseudomonas* spp. korišćenih u studiji

Vrsta izolata	Šifra izolata	Poreklo izolata	Godina izolacije
<i>Pseudomonas putida</i>	S1/33	Sava (Jamena)	2018
<i>Pseudomonas putida</i>	S2/6	Sava (Sremska Mitrovica)	2018
<i>Pseudomonas putida</i>	S2/7	Sava (Sremska Mitrovica)	2018
<i>Pseudomonas putida</i>	S2/13	Sava (Sremska Mitrovica)	2018
<i>Pseudomonas putida</i>	S2/14	Sava (Sremska Mitrovica)	2018
<i>Pseudomonas putida</i>	S2/20	Sava (Sremska Mitrovica)	2018
<i>Pseudomonas putida</i>	S2/27	Sava (Sremska Mitrovica)	2018
<i>Pseudomonas putida</i>	S2/32	Sava (Sremska Mitrovica)	2018
<i>Pseudomonas putida</i>	S3/6	Sava (Šabac)	2018
<i>Pseudomonas putida</i>	S3/8	Sava (Šabac)	2018
<i>Pseudomonas putida</i>	S3/9	Sava (Šabac)	2018
<i>Pseudomonas putida</i>	S3/16	Sava (Šabac)	2018
<i>Pseudomonas putida</i>	S3/17	Sava (Šabac)	2018
<i>Pseudomonas putida</i>	S3/18	Sava (Šabac)	2018
<i>Pseudomonas putida</i>	S3/25	Sava (Šabac)	2018
<i>Pseudomonas putida</i>	S4/3	Sava (Ostružnica)	2018
<i>Pseudomonas putida</i>	S4/8	Sava (Ostružnica)	2018
<i>Pseudomonas putida</i>	S4/13	Sava (Ostružnica)	2018
<i>Pseudomonas putida</i>	D1/4	Dunav (Bezdan)	2018
<i>Pseudomonas putida</i>	D1/8	Dunav (Bezdan)	2018
<i>Pseudomonas putida</i>	D1/27	Dunav (Bezdan)	2018
<i>Pseudomonas putida</i>	D2/24	Dunav (Bač)	2018
<i>Pseudomonas putida</i>	D2/25	Dunav (Bač)	2018
<i>Pseudomonas putida</i>	D2/27	Dunav (Bač)	2018
<i>Pseudomonas putida</i>	D2/28	Dunav (Bač)	2018
<i>Pseudomonas putida</i>	D2/29	Dunav (Bač)	2018
<i>Pseudomonas putida</i>	D2/32	Dunav (Bač)	2018
<i>Pseudomonas putida</i>	D3/18	Dunav (Slankamen)	2018
<i>Pseudomonas putida</i>	D3/25	Dunav (Slankamen)	2018
<i>Pseudomonas putida</i>	D4/22	Dunav (Novi Sad)	2018
<i>Pseudomonas putida</i>	D5/32	Dunav (Beograd)	2018
<i>Pseudomonas putida</i>	D5/33	Dunav (Beograd)	2018
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>aptata</i>	P16	Šećerna repa (Šid)	2013
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>aptata</i>	P17	Šećerna repa (Šid)	2013
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>aptata</i>	P21	Šećerna repa (Čurug)	2013
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>aptata</i>	P23	Šećerna repa (Čurug)	2013
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>aptata</i>	P26	Šećerna repa (Čurug)	2013
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>aptata</i>	P93	Šećerna repa (Bačko Dobro Polje)	2013

U okviru studije korišćeno je 5 plazmida prikazanih u Tabeli 2.

Tabela 2. Plazmidi korišćeni u studiji

Plazmid	Karakteristike	Referenca
pEX18Tc	Vektor za kloniranje, TcR	Hoang et al., 1998
pEXtssA-UP	PCR produkt <i>tssA</i> -UP kloniran u pEX18Tc	Ova studija
pEXtssA-UP-DOWN	PCR produkt <i>tssA</i> -DOWN kloniran u pEXtssA-UP	Ova studija
pGEM-T Easy	Vektor za kloniranje, AmpR	Promega, SAD
pKNOCK	Vektor za kloniranje, KmR	Alexeyev et al., 1999

3.2. Medijumi za rast bakterija

King's B medijum (KB)

Pepton	20 g
K ₂ HPO ₄	1,5 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	1,5 g
Glicerol	10 ml
dH ₂ O	1000 ml

King's B Agar medijum (KBA)

Pepton	20 g
K ₂ HPO ₄	1,5 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	1,5 g
Glicerol	10 ml
Agar	15 g
dH ₂ O	1000 ml

King's B medijum sa selektivnim agensima (KBC)

King's B gotova podloga	43g
Borna kiselina	100 ml
Cefaleksin	10 mg/ml
Nistatin	50 mg/L
dH ₂ O	900 ml

Minimalni medijum sa saharozom (engl. „*hrp*-inducing medium“ – HIM) (pH 5,7)

KH ₂ PO ₄	5,5 g
K ₂ HPO ₄	1,5 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1 g
MgCl ₂	0,16 g
NaCl	0,1 g
Saharoza	3,4 g
dH ₂ O	1000 ml

Medijum za ispitivanje pokretljivosti (plivanje)

King's B gotova podloga	11,5 g
Glicerol	5 ml
Agar	2,5 g
dH ₂ O	1000 ml

Medijum za ispitivanje pokretljivosti (rojenje)

King's B gotova podloga	23 g
Glicerol	10 ml
Agar	4 g
dH ₂ O	1000 ml

Luria-Bertani bujon (LB)

Trypton	10 g
NaCl	5 g
Ekstrakt kvasca	5 g
dH ₂ O	1000 ml

Luria-Bertani Agar (LA)

Trypton	10 g
NaCl	5 g
Ekstrakt kvasca	5 g
Agar	15 g
dH ₂ O	1000 ml

Modifikovani LA medijum sa saharozom

Trypton	10 g
Ekstrakt kvasca	5 g
Saharoza	200 g
Agar	10 g
dH ₂ O	1000 ml

Hranljivi agar sa saharozom (NSA)

Hranljivi bujon	25 g
Saharoza	50 g
Agar	15 g
dH ₂ O	1000 ml

Trypton soja bujon (TSB)

Kazein	20 g
Žučne soli	1,5 g
X-B D glukuronska kiselina	0,075 g
dH ₂ O	1000 ml

Trypton soja agar (TSA)

Kazein	20 g
Žučne soli	1,5 g
X-B D glukuronska kiselina	0,075 g
Agar	15 g
dH ₂ O	1000 ml

3.3. Priprema DNK biblioteka i sekvenciranje genoma *P. syringae* pv. *aptata* P16 i P21

Izolati *P. syringae* pv. *aptata* P16 i P21 gajeni su u King's B medijumu (Titan Biotech Ltd., UK) i inkubirani 24h na 27 °C. Ekstrakcija DNK urađena je korišćenjem kita ZymoBIOMICS Miniprep kit (Irvine, CA 92614, SAD). Izolovana DNK je poslata u kompaniju CosmosID® (Rockville, MD 20850, SAD) na sekvenciranje i anotaciju genoma. DNK biblioteke pripremljene su korišćenjem Ion Xpress Plus Fragment Kit (Thermo Fisher, SAD), a kvantifikacija je izvršena primenom Qubit fluorometra (Thermo Fisher, SAD). Klonalna amplifikacija, prečišćavanje i nanošenje DNK na Ion 540 chip (Thermo Fisher, SAD) su urađeni korišćenjem Ion Chef sistema zajedno sa Ion 540 Kit-Chef (Thermo Fisher, SAD). Fragmenti veličine 200 bp su očitani upotrebom Ion S5 XL sistema (Thermo Fisher, SAD). Genomske sekvence *P. syringae* pv. *aptata* P16 i P21 su deponovane u NCBI GenBank.

3.4. Anotacije genoma P16 i P21

Sirove sekvence trimovane su korišćenjem programa BBDuk iz paketa BBtools v. 36.49, a kvalitet očitavanja parametra za trimovanje podešen je na 20 za testirane izolate (Bushnell, 2014). Trimovani fastQ fajlovi su asemblirani korišćenjem „--careful“ parametra u programu SPAdes v. 3.9.0, dok su podrazumevane vrednosti korišćene za ostale parametre (Bankevich et al., 2012). Rezultujući kontigenti su filtrirani na osnovu dužine korišćenjem opcije „reformat“ u programu BBtools v. 36.49, tako da su zadržani samo kontigenti od najmanje 500 bp. Veličine genoma P16 i P21 su izračunate na osnovu sirovih k-mer sekvenci i poređene sa sirovim sekvencama drugih *P. syringae* sojeva dostupnih u NCBI bazi. Za izračunavanje broja k-merova korišćen je alat Jellyfish v. 2.2.6 (Marçais et al., 2011), a CheckM's v. 1.0.13 je korišćen za pravljenje dijagrama genoma (Parks et al., 2015). Za anotaciju genoma korišćen je softver Prokka, u okviru kog je alat Prodigal (Hyatt et al., 2010) korišćen za predikciju kodirajućih sekvenci i njihovo poređenje sa poznatim sekvencama u okviru baza podataka: NCBI+ blastp, Uniprot, RefSeq i serije baza u okviru Hidden Markov modela (HMM), uključujući Pfam i TIGRFAMs (Seemann, 2014). HMM je odrađen korišćenjem „hmmscan“ alata iz HMMER 3.1 paketa (Eddy, 2011). Kodirajuće sekvence su svrstane u različite grupe prema njihovim ulogama u ćeliji, u odnosu na klastere ortolognih grupa. (engl. „Clusters of orthologous genes“ – COGs; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>). Za identifikaciju gena za antimikrobnu rezistenciju i faktore virulencije korišćen je Resfinder (Zankari et al., 2012), AMR i VFDB (Chen et al., 2005). Geni za antimikrobnu rezistenciju i faktore virulencije su smatrani prisutnim ukoliko je poklapanje nukleotida sa asembliranim genomom >90% i ukoliko je pokrivenost >60% dužine genske sekvence.

3.5. Komparativna genomika

Genomske sekvence su poređene sa genomima drugih sojeva/patogenih varijeteta iz *P. syringae* kompleksa vrsta (Prilog 1). Poređeni sojevi u najvećoj meri pripadaju filogrupi 02, koja obuhvata bliske srodnike *P. syringae* pv. *aptata* i sastoji se od sveprisutnih i virulentnih sojeva sa izuzetnim potencijalom da izazivaju epidemije bolesti na biljnim domaćinima. Osim sojeva iz filogrupe 02, predstavnici filogrupa 01, 03, 04, 07, 09, 10 i 13 su takođe uključeni u komparativne

analize. Komparativna genomika obuhvatila je ANI (engl. „Average Nucleotide Identity“) i Pangenom analizu.

U okviru ANI analize statistika je računata za 102 genoma, korišćenjem paketa assembly-stats (<https://github.com/sanger-pathogens/assembly-stats>). Komparacija genoma izvršena je poređenjem svakog soja sa svakim korišćenjem FastANI (Jain et al., 2018). Svi parovi sojeva su testirani korišćenjem metode „many to many“ u okviru FastANI i korišćenjem opcije „-matrix“. Ranije studije su pokazale da ANI vrednost 94% do 96% odgovara preporučenoj graničnoj od 70% vrednosti za DNK-DNK hibridizaciju, koja predstavlja zlatni standard za svrstavanje sojeva u okviru iste vrste (Konstantinidis & Tiedje, 2005; Meier-Kolthoff et al., 2014). Za vizuelizaciju dobijenih rezultata korišćen je ANIclustermap v. 1.2.0 (<https://github.com/moshi4/ANIclustermap>).

Pangenom analiza je urađena upotrebom softvera Roary v. 3.13.0 (Page et al., 2015). Prethodno anotirana 102 genoma u GFF formatu korišćena su kao ulazni fajlovi. Upotrebljene su podrazumevane vrednosti svih parametara (Page et al., 2015), izuzev parametra „group limit“ koji je povećan na 60000 klastera. Za vizuelizaciju dobijenih rezultata korišćene su skripte roary_plots.py i create_pan_genome_plots.R u okviru Roary paketa. Geni su klasifikovani kao „core“ ukoliko su prisutni u >99% genoma, a „soft-core“ prisutni u 95-99%. „Shell“ geni prisutni su u 15-95% analiziranih genoma, a „cloud“ u manje od 15%. Filogenetsko stablo je konstruisano na osnovu engl. „approximately maximum likelihood“ metode u FastTree v. 2.1 programu (Price et al., 2010) korišćenjem fajla core_genome_alignment.aln. Pangenom je konstruisan na osnovu asemliranih genoma i određen je set gena prisutnih u svakom od njih. Taj set gena (izlazni fajl: gene_presence_absence) je korišćen za analizu razlika u genima koji doprinose patogenosti P16, P21 i drugih *P. syringae* sojeva. Geni koji kodiraju T3SS efektore su isključeni iz ove analize i analizirani su nezavisno. Za vizuelizaciju korišćen je alat Jupyter Notebook u okviru Phyton v. 3.8.10. GView server (<https://server.gview.ca>, Petkau et al., 2010) je korišćen za komparaciju P16 i P21 sa genomom referentnog soja B728a (pristupna šifra: NC_007005) i generisani su blast atlas. Geni su smatrani homologima ukoliko su ispunjene sledeće granične vrednosti: 80% identičnosti, minimalna dužina poravnatih sekvenci sa visokim stepenom podudaranja - HSP (engl. „High-scoring pair“) 100 bp i očekivana vrednost $1e^{-10}$.

3.6. Identifikacija efektor T3SS u genomima *P. syringae*

Efektori T3SS za 102 genoma identifikovani su analizom koja se zasniva na mašinskom učenju (<https://effectidor.tau.ac.il/>) (Wagner et al., 2022). U server su unošena po dva ulazna fajla u FASTA formatu za svaki genom: anotirani genom i fajl sa poznatim efektorima predviđenim anotacijom. Mera senzitivnosti i specifičnosti sa kojom softver mašinskog učenja može da klasifikuje komponente skupa u dve jasno odvojene kategorije predstavlja AUPRC (Area Under the Precision-Recall Curve) vrednost. Za identifikaciju efektornih proteina granična vrednost AUPRC iznosila je 0,5. U cilju validacije rezultata sekvence identifikovanih efektor su upoređene sa poznatim sekvencama u NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

3.7. Analiza sekretoma *P. syringae*

Analiza sekretoma rađena je u sekretornim uslovima (HIM medijum) i nesekretornim (KB medijum). Po 50 ml bakterijske kulture šest *P. syringae* sojeva gajeno je do OD₆₀₀=0,15 uz šejkiranje (180 rpm) tokom 6 h. Zatim su suspenzije centrifugirane 10 min (6346 rpm) na sobnoj temperaturi. Supernatanti su profiltrirani dva puta kroz filtere dimenzija pora 0,22 µm (Millipore, Francuska). Proteini su precipitirani dodatkom trihlorsirćetne kiseline (10%) i inkubirani preko noći na 4 °C. Nakon toga epruvete sa precipitiranim proteinima su centrifugirane 30 min (5979 rpm, 4 °C). Pelet je ispran dva puta sa 5 ml ledeno hladnog acetona. Osušeni peleti su rastvoreni u 500 µl pufera za resuspendovanje (1 M Urea u 100 mM amonijum bikarbonatu (ABC) + 5 mM Tris (2-

karboksietil)fosfin (TCEP)) i stavljeni 20 s u ultrazvučno kupatilo (Hielscher Ultrasound Technology, Nemačka). Za redukciju proteina nakon dodavanja TCEP reakcija je inkubirana 30 min na 37 °C, nakon čega je sledila alkilacija jodoacetamidom (10 mM) tokom 30 min na 25 °C u mraku. Za digestiju proteina dodat je 1 µg tripsina (Sequencing grade Modified Trypsin, Promega, SAD) i uzorci su inkubirani preko noći na 30 °C. Nakon digestije uzorci su acidifikovani 1.5% (v/v) trifluorosirćetnom kiselinom (TFA) i prečišćeni korišćenjem C18 Micro Spin kolona (Harvard Apparatus, SAD) prema uputstvima proizvođača.

Baza podataka korišćena za analizu proteoma obuhvatala je listu proteina soja *P. syringae* pv. *aptata* ICMP459 (Uniprot pristupna šifra UP000050439), koji je takođe izolovan sa šećerne repe. Proteinske sekvence T3SS efektor iz proteoma četiri *P. syringae* pv. *aptata* soja dostupnih u Uniprot bazi (šifra soja G733 – pristupna šifra UP000271836; ICMP11935 – UP000274315; ICMP4388 – UP000274541 i DSM50252 – UP000005484) i efektor drugih *P. syringae* patogenih varijeteta preuzeti su iz baze efektor www.pseudomonas-syringae.org (*P. syringae* pv. *syringae* B728a - UP000247706, *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 - UP000002515, *P. syringae* pv. *theae* ICMP3934 - UP000282636, *P. syringae* pv. *phaseolicola* 1448A - UP000000551, *P. syringae* pv. *maculicola* ES4326 - UP000003811, *P. amygdali* (prethodno *syringae*) pv. *tabaci* ICMP2835 - UP000050478, *P. syringae* pv. *spinaciae* ICMP16929 - UP000050384 i *P. syringae* pv. *cilantro* 81035 - UP000037891).

3.8. Prečišćavanje pilusnih proteina Tip III sekretornog sistema

Prekonoćne kulture soja *P. syringae* pv. *aptata* P17 gajene su u sekretornim i neseekretornim uslovima. Po 50 ml kultura centrifugirano je 8 min (5183 rpm, 4 °C). Peleti su resuspendovani u 800 µl 20 mM Tris-HCl pufera (pH 7,5), što dovodi do otkidanja pila. Resuspendovani pelet je prebačen u Eppendorf tube zapremine do 2 ml i centrifugiran 6 min (5979 rpm, 4 °C). Supernatant koji sadrži pile prebačen je u Eppendorf tube zapremine do 1,5 ml i centrifugiran 1 h (4632 rpm, 4 °C). Pelet je resuspendovan u 65 µl 1 x SDS „protein loading“ pufera (Laemmli, 1970). Uzorci su čuvani na -20 °C.

3.9. Natrijum dodecilsulfat poliakrilamid gel elektroforeza (SDS-PAGE)

Elektroforeza je vršena na 15% gelu za razdvajanje proteina koji je sadržao 5 ml 30% akrilamida, 2,16 ml dH₂O, 2,5 ml Tris-HCl pufera (pH 8.8), 400 µl 10% natrijum dodecilsulfata (SDS), 75 µl 10% amonijum-persulfata (APS) i 40 µl tetrametiletildiamina (TEMED). Gel je razliven u kalup dodat je 1 ml izopropanola. Nakon 30 min polimerizacije, gel je ispran destilovanom vodom radi uklanjanja izopropanola i nepolimerizovanog akrilamida. Gel koji je naliven preko gela za razdvajanje proteina sadržao je 1,16 ml 30% akrilamida, 2,56 ml dH₂O, 1,16 ml 0,5 M Tris-HCl pufera pH 6,8, 600 µl 10% SDS, 25 µl 10% APS i 20 µl TEMED. Nakon polimerizacije gela, u bunare je nalivano po 7,5 µl uzorka pomešanog sa 7,5 µl 2X pufera (100 mM Tris-HCl pH 6,8; 4% SDS; 0,2% brom-fenol plava; 20% glicerol; 200 mM β-merkaptotanol). Za elektroforezu korišćen je 1X Tris-Glicin pufer (3,02 g Tris, 18,08 g glicin, 10 ml 10% SDS, 1 l dH₂O). Elektroforeza je trajala 2 h, pri naponu od 140 V i struji od 30 mA. Nakon toga, gel je obojen potapanjem u rastvor koji je sadržao 0,125% boje Coomassie brilliant blue R-250, 45% metanola i 10% glacijalne sirćetne kiseline. Bojenje je trajalo 45 minuta, a zatim je gel odbojavan do pojave traka korišćenjem rastvora koji je sadržao 20% metanola i 10% glacijalne sirćetne kiseline.

3.10. Elektronska mikroskopija

Po 10 ml prekonoćnih kultura *P. syringae* pv. *aptata* P17 gajeno je u sekretornim i nesekretornim uslovima. Formvarom prekriveni bakarni gridovi (Plano, S162-3, 300 mesh) su hidrofiličizovani korišćenjem PELCO easyGlow™ Glow Discharge Cleaning System (SAD). Po 5 ml ćelijske suspenzije naneto je na gridove i inkubirano 1 min, a višak tečnosti je uklonjen korišćenjem Whatman celuloznog filter papira. Urađeno je negativno bojenje gridova korišćenjem 2% uranil acetata i ispiranje destilovanom vodom. Čelije su posmatrane i uslikane pod JEM-1400 elektronskim mikroskopom (JEOL, Japan) na 100 kV. Određivanje dužine i dijametra flagela i T3SS pila je urađeno u ImageJ softveru (Schneider et al., 2012).

3.11. Testovi pokretljivosti

Prekonoćne kulture *P. syringae* pv. *aptata* gajene su na 30 °C uz šejkiranje u KB medijumu, a zatim su razblažene u svežem medijumu do OD₆₀₀~0,3, što približno odgovara 2 x 10⁸ CFU/ml (engl. „colony forming units“). Za ispitivanje sposobnosti plivanja sojeva korišćen je 50% KB medijum sa 0,25% agara, a za ispitivanje sposobnosti rojenja nerazblaženi KB koji je sadržao 0,4% agara (Hockett et al., 2013). Sterilni vrh nastavka za pipete (do 10 µl) uronjen je u bakterijsku suspenziju i zatim zaboden do polovine dubine hranljive podloge za ispitivanje sposobnosti plivanja. Za ispitivanje sposobnosti rojenja, po 3 µl bakterijskih suspenzija nakapano je na sredinu odgovarajuće podloge. Svi eksperimenti urađeni su u triplicatu. Nakon 24 h inkubacije u mraku na sobnoj temperaturi, rezultati su analizirani u ImageJ softveru (Schneider et al., 2012).

3.12. Bioinformatičke analize sekretoma *P. syringae* pv. *aptata*

Za identifikaciju potencijalnih efektor T6SS, proteom *P. syringae* pv. *aptata* P21 je analiziran korišćenjem Bastion6 web servera (Wang et al., 2018), isključujući proteine manje od 50 i veće od 5000 aminokiselina. Proteini čiji je Bastion6 skor ≥0,7 smatrani su potencijalnim efektorima T6SS. Mapiranje asembliranog genoma *P. syringae* pv. *aptata* P21 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_018530765.1), urađeno je korišćenjem CGView web servera (Grant & Stothard, 2008). Predikcija operona urađena je u Operon-Mapper web serveru (Taboada et al., 2018) na osnovu genomske sekvence P21.

3.13. Izolacija bakterija iz vode – uzorkovanje i membranska filtracija

Uzorci vode prikupljeni su sterilnim staklenim bocama zapremine 500 ml sa 30 cm dubine. Odmah po uzorkovanju transportovane su u laboratoriju u pokretnom frižideru radi sprečavanja daljeg razmnožavanja bakterija u uzorcima. Nakon transporta rađena je membranska filtracija uzoraka koja podrazumeva filtriranje vode kroz celuložno-nitratne membranske filtere sa porama prečnika 0,45 µl (Millipore, Francuska), uz pomoć vakuum pumpe (Pumpentyp Siehe Untersiele Pumpe, Nemačka). Filteri su postavljeni na selektivnu KBC podlogu i inkubirani na 23 °C.

3.14. Izolacija genomske DNK *Pseudomonas* spp. izolata

Izolacija genomske DNK *Pseudomonas* spp izolata poreklom iz reka Sava i Dunav rađena je na dva načina. Prekonoćne kulture izolata gajene su u KB medijumu preko noći na 30 °C uz šejkiranje (180 rpm). Nakon inkubacije, po 1 ml kultura je centrifugiran 5 min (13000 rpm). Talog je resuspendovan u 567 µl TE pufera (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8,0), uz dodatak proteinaze K (100 µg/ml) i SDS (0,5%). Reakcija je inkubirana 30 min na 37 °C. Dodato je 100 µl 5M NaCl, 300 µl 3% CTAB + PVP pufera i inkubirano 20 min na 65 °C. Zatim je dodato 800 µl hloroforma i centrifugirano 10 min (13000 rpm). Supernatantu je dodata 1/10 zapremine 3M Na-acetata (pH 5,0) i jednaka zapremina ledeno hladnog izopropanola. Zatim su tubice centrifugirane 15 min (13000

rpm). Talog je ispran sa 1 ml 96% ledeno hladnog etanola. Nakon ponovnog centrifugiranja 10 min (13000 rpm), tečna faza je odlivena i talog je sušen u inkubatoru na 37 °C u trajanju od 30 min. Zatim je talog resuspendovan u 50 µl TE pufera sa dodatkom RNaze (200 µg/ml). Nakon inkubacije 15 min na 37 °C eluirana DNK čuvana je na -20 °C.

Drugi način izolacije genomske DNK podrazumevao je upotrebu kita Quick DNA Fungal/Bacterial Miniprep Kit (Zymo Research, SAD), prema protokolu proizvođača.

3.15. Molekularna identifikacija *P. putida* i detekcija gena T6SS

Za identifikaciju izolata koji pripadaju vrsti *P. putida* i detekciju gena za T6SS rađena je PCR metoda. Korišćen je aparat Microcycler (Eppendorf, Hamburg, Nemačka). Rađena je amplifikacija repetitivnih ekstragenjskih sekvenci (REP), gena za 16S rRNK, *tssA* i *tagB1* gena T6SS. Za pravljenje reakcionih smeša korišćen je KAPA Taq Miks (KAPA Biosystems, Velika Britanija) (Tabela 3). Sve sekvence umnožavane su uz upotrebu odgovarajućih prajmera (Tabela 4).

Tabela 3. Koncentracije/zapremine sastojaka reakcionih PCR smeša

Amplifikoni	Taq polimeraza (U)	MgCl ₂ (mM)	Taq Buffer A	dNTP Mix (mM)	Prajmeri (nM)	PCR voda (µl)	DNK (µl)
REP sekvence	1	1,5	2 X	0,1	600	14,55	2
gen za 16S rRNK	0,75	2	1 X	0,63	400	19,65	1,5
<i>tssA</i> i <i>tagB1</i>	2,5	1,5	1 X	0,2	250	17,75	1

Korišćeni su sledeći PCR programi za amplifikaciju:

- REP sekvence

Inicijalna denaturacija na 94 °C, 3 min; 25 ciklusa denaturacije na 94 °C 1 min, hibridizacije na 69 °C 1 min, elongacije na 70 °C 10 min; finalna elongacija na 70 °C 10 min.

- gen za 16S rRNK

Inicijalna denaturacija na 95 °C, 5 min; 33 ciklusa denaturacije na 95 °C 1 min, hibridizacije na 50 °C 1 min, elongacije na 72 °C 1 min; finalna elongacija na 72 °C 7 min.

- *tssA* i *tagB1* geni

Inicijalna denaturacija na 95 °C, 1 min; 30 ciklusa denaturacije na 95 °C 30s, hibridizacije na 60 °C 30 s, elongacije na 72 °C 30 s; finalna elongacija na 72 °C 5 min.

3.16. Horizontalna elektroforeza DNK na agaroznom gelu

Agarozni gelovi (1%) su korišćeni za horizontalnu elektroforezu DNK i određivanje veličine fragmenata PCR produkata. Gelovi su pravljani rastvaranjem 2,4 g agaroze (Serva, Nemačka) u 240 ml 0,5 x TBE pufera (45 mM Tris, 45 mM borna kiselina, 1 mM EDTA pH 8,3), uz dodatak etidijum-bromida (0,4 µg/ml). Isti pufer korišćen je i za elektroforezu. Po 5 µl uzorka pomešano je sa 1,5 µl boje (Gel Loading Dye Purple 6X, New England Biolabs, SAD). Elektroforeza je rađena pri naponu od 90 V i amperaži od 300 mA, u trajanju od 1h i 30 min. Za vizuelizaciju DNK korišćen je UV transiluminator (LKB Bromma, Švedska). Veličina DNK fragmenata određivana je poređenjem sa DNK markerom 100 – 3000 bp (Nippon Genetics, Nemačka).

Tabela 4. Lista prajmera korišćenih u studiji sa sekvencama i veličinom produkata

Naziv prajmera	Sekvenca prajmera (5'-3')	Referenca
REPC	GTAGGAGCGGGTTTACCCGCGAA	Aranda-Olmedo et al., 2002
27F	GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	Edwards et al., 1989.
1523R	AGGAGGTGATCCAGCCG	
tssA_F	GAAGAGGTCACCTCGGTTGCT	Ova studija
tssA_R	GGCAATGGCCTCTTCATAGA	
tagX1_F	ATCAAGCTGCGTAGCCAAAC	
tagX1_R	ACCGAGTCGTCGGAAGT	
IA001	aaaaaaaaagcttGCTTCGCTTACGCTGCAGC	
IA002	aaaaaatctagaGAGCCTCGATGAATCAAATATGGACGC	
IA003	aaaaaatctagaCTACCACCGACATGTGCTTCG	
IA004	aaaaaagaattcGGAAAGTTCTTTGCGTCATATAGGCC	
IA005	GAAGCGGCACCAGCACGAG	
IA006	CTACCCGTGAGACGCCCTG	
IA007	ATGAACATCAAAAAGTTTGCAAAACAAGC	
IA008	CTCTACACCGTTGATGTTCAAAGAGC	
IA071	aaaaaatctagaAACTGCCAGCACTGGGGATGC	
IA072	aaaaaactcgagGGAAACGGTGCAGCTGGACACG	
IA093	TCATCGAGGCTCCTGATCCTTG	
IA094	GTGTTCCGCTTCCTTTAGCAGC	
AM009	GCCTCGCAGAGCAGGATTCC	
AM010	GGCTTGTTGTCCACAACCG	
M13F	CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC	Messing & Vieira, 1982
M13R	CAGGAAACAGCTATGAC	
RT-16SE-F	GCAACGCGAAGAACCTTA	Wang et al., 2018
RT-16SE-R	AACCCAACATCTCACGACAC	
RT-hcp-F	TGATGCGGGCAAAGTTGAAG	
RT-hcp-R	CGACATGGAAGAAGTGGTGG	
NPR1BvF	TCATGAAGCTTGTCGTCCTG	Desoignies et al., 2013
NPR1BvR	ATACACCTTGCCAGCAATCC	
BvMYC2-F	AGTGAGCTTGACGTGCAGTA	Zhao et al., 2023
BvMYC2-R	CCCCTCATCTGCCTCAAGAAATAC	
BvLOX-F	ATCGGCAGTTGAGTGCAATG	
BvLOX-R	CTGCCATTCCCCTGCTTACA	
BvNCED-F	AGGAACAAACTGGGGAGGAAAA	
BvNCED-R	TCCCAATTGATCTCATCGTGC	
25RNK_F	AGACAAGAAGGGGCAACGAG	Cui et al., 2022
25RNK_R	CACATTGGACGGGGCTTTTC	

3.17. Metode za konstrukciju mutanta *P. putida* S2/27 sa deletiranim/inaktiviranim *tssA* genom

U cilju dobijanja mutanta S2/27 $\Delta tssA$, rađene su dve različite metode:

- (I) metoda posredovana dvostrukom homologom rekombinacijom, koja se zasniva na zameni gena sa hromozoma kopijom mutiranog gena sa plazmida (Hmelo et al., 2015)
- (II) inserciona mutageneza, zasnovana na inserciji suicidalnog vektora u okviru gena od interesa (Alexeyev et al., 1999)

3.17.1. Metoda posredovana dvostrukom homologom rekombinacijom

- **Priprema inserata za kloniranje**

Fragment veličine 710 bp koji se nalazi uzvodno od *tssA* gena (*tssA*-UP) *P. putida* S2/27 obuhvata deo *tssM* gena od 1-702 nt i kraj *tssA* gena od 1451-1463 nt (5'-3' smer) i umnožen je PCR metodom uz korišćenje prajmera IA001 i IA002 (Tabela 4). Fragment veličine 718 bp koji se nalazi nizvodno od *tssA* gena (*tssA*-DOWN) obuhvata ceo *tagO* gen i početak *tssA* gena (1-13 nt, 5'-3') umnožen je korišćenjem IA003 i IA004 prajmera (Tabela 4). Kao matrica korišćena je ukupna DNK izolata *P. putida* S2/27. Reakcione smeše sadržale su: 25 μ l 2X DreamTaq MasterMix (Thermo Fisher, SAD), 21 μ l Dnase/Rnase Free Water (Thermo Fisher, SAD), po 200 nM svakog od prajmera i 2 μ l DNK. Za umnožavanje željenih fragmenata korišćen je aparat MiniAmp Thermal Cycler (Thermo Fisher, SAD), prema sledećem programu za *tssA*-UP: inicijalna denaturacija na 95 °C, 1 min; 34 ciklusa denaturacije na 95 °C 30 s, hibridizacije na 59 °C 30 s, elongacije na 72 °C 1 min; finalna elongacija na 72 °C 5 min. Za fragment *tssA*-DOWN amplifikacija je rađena prema programu: inicijalna denaturacija na 95 °C, 1 min; 30 ciklusa denaturacije na 95 °C 30 s, hibridizacije na 60 °C 30 s, elongacije na 72 °C 30 s; finalna elongacija na 72 °C 5 min. Umnoženi fragmenti prečišćeni su korišćenjem kita GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Fisher, SAD). Nakon prečišćavanja, koncentracije DNK su izmerene na Nanodrop 2000 spektrofotometru (Thermo Fisher, SAD).

- **Izolacija plazmidne DNK iz *E. coli* DH5 α pEX18Tc**

Prekonoćne kulture *E. coli* DH5 α pEX18Tc inkubirane su 16 h na 37 °C uz šejkiranje (180 rpm). Po 10 ml prekonoćnih kultura korišćeno je za izolaciju plazmida pEX18Tc korišćenjem kita Monarch Plasmid Miniprep Kit (New England BioLabs, SAD), prema protokolu proizvođača. Koncentracije izolovanih plazmida izmerene su na Nanodrop 2000 spektrofotometru (Thermo Fisher, SAD).

- **Kloniranje inserata *tssA*-UP i *tssA*-DOWN u plazmid pEX18Tc**

Za restrikcionu digestiju plazmida pEX18Tc i inserta *tssA*-UP postavljena je sledeća reakcija: 25 μ l pEX18Tc (272 ng/ μ l) ili *tssA*-UP (99,7 ng/ μ l), 3 μ l 10 x NEBuffer (New England Biolabs, SAD), 1 μ l restrikcionog enzima HindIII (New England Biolabs, SAD) i 1 μ l restrikcionog enzima XbaI (Thermo Fisher, SAD). Kao negativna kontrola, postavljena je ista reakcija koja je umesto inserta sadržala istu zapreminu DNase/RNase Free vode (Thermo Fisher). Reakcije su inkubirane 3 h na 37 °C. Nakon inkubacije, čitava reakcija digestije plazmida nalivena je u bunar 1% agaroznog gela. Elektroforeza je urađena u trajanju od 1 h i 45 min prema prethodno navedenom protokolu. Digerirani plazmid je zatim prečišćen iz gela korišćenjem Zymoclean Gel Recovery kita (ZymoBionics, SAD). Za prečišćavanje digiriranog inserta korišćen je GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Fisher, SAD). Koncentracije prečišćene DNK izmerene su na Nanodrop 2000 spektrofotometru (Thermo Fisher, SAD). Zatim je postavljena reakcija ligacije u odnosu insert:vektor = 4:1. Za izračunavanje molarnih koncentracija korišćen je NEBioCalculator (<https://nebiocalculator.neb.com/#!/dsdnaamt>). Na osnovu molarnih koncentracija postavljena je

reakciona smeša koja je sadržala 10 µl digeriranog i prečišćenog plazmida pEX18Tc (113 ng/µl), 7 µl digeriranog i prečišćenog inserta (74 ng/µl), 2 µl 10 x Ligation Buffer (Promega, SAD) i 1 µl T4 DNA Ligase (Promega, SAD). U negativnoj kontroli dodata je DNase/RNase Free voda (Thermo Fisher, SAD) umesto inserta. Reakcije su inkubirane preko noći na 4 °C. Dalje je za kloniranje *tssA-DOWN* korišćen dobijeni plazmid pEX18Tc u koji je prethodno ukloniran uzvodni fragment od *tssA* gena (pEX18Tc-*tssA-UP*). Reakcija digestije plazmida postavljena je na sledeći način: 25 µl pEX18Tc-*tssA-UP* (621,7 ng/µl), 3 µl 10 x NEBuffer (New England Biolabs), po 1 µl restrikcionih endonukleaza EcoRI (New England Biolabs) i XbaI (Thermo Fisher). Ista zapremina pufera i restrikcionih enzima korišćena je i za digestiju 25 µl umnoženog *tssA-DOWN* fragmenta (141,9 ng/µl). Reakcije su inkubirane 3 h na 37 °C. Digerirani plazmid pEX18Tc-*tssA-UP* je prečišćen nakon elektroforeze koja je trajala 1 h i 45 minuta pri naponu od 90 V. Za prečišćavanje digeriranog plazmida korišćen je Zymoclean Gel Recovery Kit (Zymo Research, SAD). Za prečišćavanje digeriranog inserta korišćen je GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Fisher, SAD). Koncentracije prečišćene DNK izmerene su na Nanodrop 2000 spektrofotometru (Thermo Fisher, SAD). Zatim je postavljena reakcija ligacije u odnosu insert:vektor = 4:1. Ligaciona reakcija je sadržala 11,5 µl digeriranog i prečišćenog plazmida pEX18Tc-*tssA-UP* (163,4 ng/µl), 5,5 µl digeriranog i prečišćenog inserta *tssA-DOWN* (134,2 ng/µl), 2 µl 10x Ligation Buffer (Promega, SAD) i 1 µl T4 DNA Ligase (Promega, SAD). Kao negativna kontrola, postavljena je ista reakcija koja je umesto inserta sadržala istu zapreminu DNase/RNase Free Water (Thermo Fisher, SAD). Reakcije su inkubirane preko noći na 4 °C.

- **Transformacija *E. coli* DH5α plazmidom pEX18Tc-*tssA-UP-DOWN* i provera transformanata**

Kompetentne ćelije *E. coli* DH5α su pripremljene prema prethodno opisanom protokolu. Po 100 µl kompetentnih ćelija pomešano je sa 10 µl ligacione smeše ili negativne kontrole. Transformacija je rađena temperaturnim šokom. Kompetentne ćelije su inkubirane sa DNK na ledu 30 min, zatim na 42 °C 30 s i ponovo na ledu 5 min. Nakon toga u Ependorf tube je naliveno po 900 µl LB medijuma i sledila je inkubacija na 37 °C u trajanju od 1 h. Ćelije su centrifugirane 5 min (5000 rpm) i talog je resuspendovan u 50 µl svežeg LB medijuma. Suspenzije su utrljane na LA podlogu koja je sadržala tetraciklin u koncentraciji 10 µg/ml. Kao kontrola antibiotika, utrljana je suspenzija koja je sadržala samo kompetentne ćelije. U cilju provere transformanata, izrasle kolonije su testirane na prisustvo inserta. Korišćeno je dva para prajmera: M13F, M13R; IA003, IA004. PCR smeša sadržala je 10 µl 2X DreamTaq MasterMix (Thermo Fisher, SAD), 6 µl Dnase/Rnase Free Water (Thermo Fisher, SAD) i po 500 nM odgovarajućih prajmera. Sterilnim nastavkom deo kolonije potencijalnog transformanta, prenet je u tubicu sa PCR smešom. Korišćen je sledeći PCR program sa M13 prajmerima: inicijalna denaturacija na 95 °C, 1 min; 30 ciklusa denaturacije na 95 °C 30 s, hibridizacije na 49 °C 30 s, elongacije na 72 °C 30 s; finalna elongacija na 72 °C 5 min. Isti PCR program korišćen je i za umnožavanje fragmenata sa IA003 i IA004 prajmerima, uz razliku u temperaturi hibridizacije koja je iznosila 60 °C. Zatim je urađena elektroforeza prema opisanom protokolu i umnoženi fragmenti su vizuelizovani na transiluminatoru (LKB Bromma, Švedska). U cilju finalne potvrde transformanta, urađena je izolacija plazmida korišćenjem kita Monarch Plasmid Miniprep Kit (New England BioLabs, SAD). Koncentracija izolovanog plazmida izmerena je na Nanodrop 2000 spektrofotometru (Thermo Fisher, SAD) i podešena na 75 ng/µl. Pomešano je po 5 µl plazmidne DNK sa 5 µl 5µM M13F/M13R prajmera. Uzorci su poslani na sekvenciranje u kompaniju Eurofins (Austrija).

- **Prvi događaj homologe rekombinacije kod *P. putida* S2/27**

Prekonoćne kulture donora (*E. coli* DH5 α -pEX18-Tc-tssA-UP-DOWN), helpera (*E. coli* 2013) i recipijenta (*P. putida* S2/27) gajene su u LB medijumu 16 h, uz šejkiranje (180 rpm). Medijumu u kom je gajen donor dodat je tetraciklin (10 μ g/ml), a helper je gajen uz prisustvo kanamicina (100 μ g/ml). Temperatura inkubacije donora i helpera iznosila je 37 °C, a recipijenta 30 °C. Nakon inkubacije, rađena je konjugacija. Suspenzije su centrifugirane 5 min (5000 rpm). Nakon ispiranja od antibiotika, talog donora je resuspendovan u 100 μ l LB medijuma. Dobijena suspenzija je korišćena zatim za resuspendovanje helpera i na kraju recipijenta. Pomešane kulture nakapane su na neselektivnu LA podlogu i inkubirane 4 h na 30 °C. Nakon inkubacije, ezom je skinut bakterijski tepih i resuspendovan u 1 ml LB medijuma. Selekcija merodiploida vršena je korišćenjem LA podloge koja je sadržala tetraciklin (20 μ g/ml) i triklosan (25 μ g/ml). Dodatno, proveru merodiploida rađena je colony PCR metodom korišćenjem 2 para prajmera: IA005 i IA006; IA007 i IA008. Reakciona smeša je sadržala 10 μ l 2X DreamTaq MasterMix (Thermo Fisher, SAD), 6 μ l Dnase/Rnase Free Water (Thermo Fisher, SAD), po 500 nM odgovarajućih prajmera i deo kolonije potencijalnog merodiploida. Za oba para prajmera korišćen je isti PCR program: inicijalna denaturacija 95 °C, 1 min; 30 ciklusa denaturacije na 95 °C 30 s, hibridizacije na 62 °C 30 s, elongacije na 72 °C 30 s; finalna elongacija na 72 °C 5 min. Elektroforeza je rađena prema opisanom protokolu.

- **Drugi događaj homologe rekombinacije kod *P. putida* S2/27**

Merodiploidi su inkubirani u LB medijumu 1 h na 30 °C. Zatim je suspenzija utrljana na modifikovani LA medijum sa saharozom. Narednog dana izrasle kolonije presejane su na LA podlogu sa dodatkom Tc (10 μ g/ml) i LA podlogu bez selekcije. Za kolonije koje su izgubile rezistenciju na Tc rađen je colony PCR sa prajmerima IA005 i IA006 korišćenjem navedene reakcione smeše i PCR programa. Umnoženi fragmenti vizuelizovani su na 1% agaroznom gelu nakon elektroforeze.

3.17.2. Inserciona mutageneza

- **Umnožavanje unutrašnjeg fragmenta *tssA* gena**

Unutrašnji fragment *tssA* gena od 489. do 1437. nukleotida u 5'-3' smeru umnožen je iz genomske DNK *P. putida* S2/27 PCR metodom. Korišćeni su prajmeri IA071 i IA072 (Tabela 4). Reakciona smeša sadržala je: 10 μ l 2X DreamTaq MasterMix (Thermo Fisher, SAD), 6 μ l Dnase/Rnase Free Water (Thermo Fisher, SAD), po 500 nM svakog od prajmera i 2 μ l DNK. Podešen je sledeći program: inicijalna denaturacija na 95 °C, 1 min; 30 ciklusa denaturacije na 95 °C 30 s, hibridizacije na 60 °C 30 s, elongacije na 72 °C 30 s; finalna elongacija na 72 °C 5 min. PCR produkti su vizuelizovani na 1% agaroznom gelu nakon elektroforeze. Korišćen je FastGene marker od 100-3000 bp (Nippon Genetics, Nemačka).

- **Kloniranje unutrašnjeg fragmenta *tssA* gena u vektor pKNOCK-Km**

Za restrikcionu digestiju plazmida pKNOCK-Km i inserta postavljene su sledeće reakcije: 25 μ l pKNOCK-Km plazmida (100 ng/ μ L) ili inserta *tssA* (100 ng/ μ L), 3 μ l Thermo Scientific 10X Buffer Y, 1 μ l restrikcionog enzima XhoI (Promega, SAD) i 1 μ l restrikcionog enzima XbaI (Thermo Fisher, SAD). Smeša je inkubirana 3 h na 37 °C. Čitava reakcija digestije plazmida nalivena je u bunar 1% agaroznog gela i urađena je elektroforeza. Korišćen je FastGene marker od 100-3000 bp (Nippon Genetics, Nemačka). Digerirani plazmid je zatim prečišćen iz gela korišćenjem GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Fisher, SAD). Za prečišćavanje digeriranog inserta korišćen je GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Fisher, SAD). Koncentracije prečišćene DNK izmerene su na Nanodrop 2000 spektrofotometru (Thermo Fisher, SAD). Reakcija ligacije postavljena je u odnosu

insert:vektor = 4:1. Na osnovu molarnih koncentracija napravljena je reakciona smeša koja je sadržala 40 fM digeriranog i prečišćenog plazmida pKNOCK-Km, 160 fM digeriranog i prečišćenog inserta, 2 µl 10x Ligation Buffer (Promega, SAD) i 1 µl T4 DNA Ligase (Promega, SAD). Kao negativna kontrola, postavljena je ista reakcija koja je umesto inserta sadržala istu zapreminu DNase/RNase Free Water (Thermo Fisher, SAD). Reakcije su inkubirane preko noći na 4 °C.

- **Transformacija *E. coli* DH5α plazmidom pKNOCK-Km i provera transformanata**

Kompetentne ćelije *E. coli* DH5α pripremljene su prema prethodno opisanom protokolu. Po 100 µl kompetentnih ćelija pomešano je sa 10 µl ligacione smeše ili negativne kontrole. Transformacija je rađena temperaturnim šokom. Kompetentne ćelije su inkubirane sa DNK na ledu 30 min, zatim na 42 °C 30 s i ponovo na ledu 5 min. Nakon toga u Ependorf tube je naliveno po 900 µl LB medijuma i sledila je inkubacija na 37 °C u trajanju od 1 h. Ćelije su centrifugirane 5 min (5000 rpm) i talog je resuspendovan u 50 µl svežeg LB medijuma. Suspenzije su utrljane na LA podlogu koja je sadržala kanamicin u koncentraciji 100 µg/ml. Kao kontrola antibiotika, utrljana je suspenzija koja je sadržala samo kompetentne ćelije.

- **Konjugacija i provera transkonjuganata**

Prekonoćne kulture donora (*E. coli* DH5α-pKNOCK-Km), helpera (*E. coli* 2013) i recipijenta (*P. putida* S2/27) gajene su u LB medijumu 16 h, uz šejkiranje (180 rpm). Medijumu u kom su gajeni donor i helper dodat je kanamicin (100 µg/ml). Temperatura inkubacije donora i helpera iznosila je 37 °C, a recipijenta 30 °C. Nakon inkubacije, suspenzije su centrifugirane 5 min (5000 rpm). Zatim su isprane od antibiotika i talog donora je resuspendovan u 100 µl LB medijuma. Dobijena suspenzija je korišćena za resuspendovanje helpera i na kraju recipijenta. Pomešane kulture nakapane su na neselektivnu LA podlogu i inkubirane 4 h na 30 °C. Nakon inkubacije ezom je skinut bakterijski tepih i resuspendovan u 1 ml LB medijuma. Selekcija transkonjuganata vršena je korišćenjem LA podloge koja je sadržala kanamicin (100 µg/ml) i triklosan (25 µg/ml). Nakon konjugacije rađena je colonyPCR metoda za proveru transkonjuganata. PCR smeša sadržala je 10 µl 2X DreamTaq MasterMix (Thermo Fisher, SAD), 6 µl Dnase/Rnase Free Water (Thermo Fisher), po 500 nM prajmera AM009 i AM010 (Tabela 4). Mesto integracije plazmida provereno je korišćenjem IA093 i IA094 prajmera (Tabela 4). Sterilnim nastavkom deo kolonije potencijalnog transformanta, prenet je u tubicu sa PCR smešom. Korišćen je sledeći PCR program: inicijalna denaturacija na 95 °C, 1 min; 30 ciklusa denaturacije na 95 °C 30 s, hibridizacije na 54 °C (AM009 i AM010) / 55°C (IA093/IA094) 30 s, elongacije na 72 °C 30 s; finalna elongacija na 72 °C 5 min. Amplikoni su naliveni u bunare 1% agaroznog gela i urađena je elektroforeza. Korišćen je marker od 100-3000 bp (Nippon Genetics, Nemačka).

3.18. Priprema kompetentnih ćelija *E. coli* DH5α i transformacija plazmidom koji omogućava α-komplemetaciju *lacZ* gena

Prekonoćna kultura *E. coli* DH5α gajena na 37 °C uz šejkiranje (180 rpm) razblažena je 100 x u LB medijumu i inkubirana do dostizanja OD₆₀₀ 0,5. Nakon toga, 50 ml kulture je centrifugirano 10 min na sobnoj temperaturi (6692 rpm). Medijum je odliven i talog je resuspendovan u hladnom 0,1 M CaCl₂. Kultura je inkubirana na ledu 30 min, a zatim centrifugirana 10 min na 4 °C (6692 rpm). Supernatant je odliven, ćelije su koncentrovane u 1 ml hladnog 0,1 M CaCl₂ i inkubirane na ledu 5 min. Pomešano je 110 µl dobijenih kompetentnih ćelija sa 10 µl smeše koja je sadržala: 5 µl 2 x Rapid Ligation Buffer (Promega, SAD), 1 µl T4 DNA Ligase (3 Weiss units/µl) (Promega, SAD), 1 µl pGEM-T Easy Vector (Promega, SAD). Reakcija je inkubirana na ledu 20 min, zatim 45 s na 42 °C i ponovo na ledu 2 min. Nakon toga, dodato je 900 µl LB medijuma i inkubirano 1,5 h na 37 °C. Kulture su centrifugirane 10 min na sobnoj temperaturi (2991 rpm). Supernatant je odliven, a talog

je resuspendovan u 100 µl LB medijuma i utrljan na LA podlogu koja je sadržala X-gal (0,2 mg/ml), IPTG (0,001M) i ampicilin (100 µg/ml). Utrljane podloge su inkubirane 24 h na 37 °C.

3.19. Ispitivanje kompetitivnosti *P. putida* izolata i aktivnosti T6SS

Prekonočne kulture izolata *P. putida* i *E. coli* DH5α transformisane plazmidom pGEM-T Easy gajene su u TSB medijumu, sa dodatkom ampicilina (100 µg/ml) za *E. coli* i kanamicina (100 µg/ml) za *P. putida* Δ*tssA*-S2/27. Temperatura inkubacije za *P. putida* iznosila je 30 °C, a za *E. coli* DH5α 37 °C, uz šejkiranje (180 rpm). Nakon 24 h inkubacije kulture su razblažene do OD₆₀₀ 1 i po 1 ml je centrifugiran 1 min na sobnoj temperaturi (13000 rpm). Supernatant je odliven i talog je resuspendovan u 100 µl svežeg TSB medijuma. Na TSA podlogu koja je sadržala X-gal (0,2 mg/ml) i IPTG (0,001M) nakapano je po 10 µl čistih kultura i po 20 µl mešoviti kultura *P. putida* i *E. coli*, pomešanih u odnosu 1:1. Zasejane ploče su inkubirane 5 h na 30 °C. Za ispitivanje aktivnosti T6SS, upoređena je inhibicija DH5α u prisustvu izolata S2/27 i istog izolata sa inaktiviranim *tssA* genom.

3.20. Test interbakterijske kompeticije između izolata *P. putida* i *P. syringae* pv. *aptata*

Prekonočne kulture izolata *P. putida* i *P. syringae* pv. *aptata* P21 gajene su u KB medijumu, na 30 °C uz šejkiranje (180 rpm). Nakon 24 h inkubacije, kulture su razblažene do OD₆₀₀ 1, a zatim je po 1 ml kultura centrifugiran 1 min, na 13 000 rpm. Supernatant je odliven, a talog je resuspendovan u 100 µl svežeg KB medijuma. U Ependorf tubama su napravljene mešovite kulture *P. putida* i *P. syringae* pv. *aptata* P21, u odnosu 1:1. Po 20 µl mešoviti kultura nakapano je na nitrocelulozne filtere dijametra pora 0,45 µm (Sartorius, Nemačka), a kao kontrola nakapano je 10 µl čiste kulture P21. Za ispitivanje kontakt-zavisne inhibicije, čiste kulture *P. putida* i *P. syringae* pv. *aptata* P21 razdvojene su nitroceluloznim filterom, što omogućava difundovanje malih molekula, ali onemogućava direktan kontakt između ćelija. Nakon 5 h inkubacije na 30 °C, filteri su prebačeni u 1 ml KB medijuma i vorteksovani da bi se kulture resuspendovale. Napravljena je serija razblaženja. Po 100 µl odgovarajućih razblaženja utrljavano je na NAS podlogu u cilju kvantifikacije rasta P21. Nakon 24 h brojane su kolonije P21 i računat je broj CFU/ml (engl. „Colony Forming Units“). Procena statističke značajnosti rađena je korišćenjem one-way ANOVA i primenom Tukey testa značajnosti (HSD) ($p < 0,05$).

3.21. Izolacija RNK iz čiste kulture i mešovite kulture i konverzija u komplementarnu DNK

Prekonočne kulture sojeva *P. putida* S2/27 i *P. syringae* P21 gajene su u KB medijumu na 30 °C uz šejkiranje (180 rpm). Zatim su suspenzije razblažene do OD₆₀₀ 0,1. Čista kultura S2/27 i mešovita kultura S2/27 i P21 u odnosu 1:1, inkubirane su 5 h na 30 °C. Nakon inkubacije, mešovita kultura je centrifugirana 1 min na 13000 rpm. Dobijeni talog resuspendovan je u 250 µl trizola i inkubiran u mraku 5 min. Dodato je 60 µl hloroforma i inkubirano još 3 min u mraku. Nakon toga uzorak je centrifugiran 15 min na 10300 rpm, na temperaturi 4 °C. Gornja faza preneti je u novu Ependorf tubu, dodato je 200 µl izopropanola i inkubirano 10 min. Nakon inkubacije uzorak je centrifugiran 10 min na 10500 rpm, pri temperaturi 4 °C. Talog je resuspendovan u 1 ml hladnog 75% etanola, vorteksovani i centrifugirani 10 min, na 7000 rpm i 4 °C. Nakon sušenja 10 min na sobnoj temperaturi, talog je resuspendovan u 30 µl PCR vode i inkubiran 15 min na 60 °C. Na Nanodrop 2000 spektrofotometru (Thermo Fisher, SAD) izmerene su koncentracija izolovanih RNK i uzorci su čuvani na -80 °C.

Konverzija RNK u komplementarnu DNK rađena je korišćenjem RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit, prema protokolu proizvođača. Reakciona smeša sadržala je 1 µl Random Hexamer prajmera, 1 µl PCR vode, 4 µl 5X Reaction Buffer, 1 µl RiboLock Rnase Inhibitor (20 U/µl), 2 µl 10 mM dNTP Mix, 1 µl RevertAid M-MuLV reverzne transkriptaze (200 U/µl) i RNK

koncentracije 100 ng/μl. Nakon kratkog centrifugiranja, uzorci su inkubirani 5 min na 25 °C, zatim 60 min na 42 °C i 5 min na 70 °C.

3.22. Kvantifikacija ekspresije *hcp* gena *P. putida*

Ekspresija gena *hcp* u čistoj kulturi *P. putida* S2/27 i mešovitoj kulturi sa P21 praćena je korišćenjem kvantitativne real-time PCR metode. Napravljene su reakcione smeše koje sadrže različitu zapreminu cDNK (100 ng/μl) (Tabela 5). Za umnožavanje ciljanog gena korišćeni su prajmeri RT-*hcp*-F i RT-*hcp*-R, a za endogenu kontrolu RT-16SE-F, RT-16SE-R (Wang et al., 2018). Kao negativna kontrola korišćena je PCR voda umesto cDNA. U bunariće je nalivano po 12 μl reakcionih smeša. Korišćen je aparat Step One Plus, Real Time PCR System (Applied Biosystems, SAD). Podešen je sledeći program: Priprema uzoraka 2 min na 50 °C, inicijalna denaturacija 10 min na 95 °C, 40 ciklusa denaturacije (95 °C, 15 s) i hibridizacije (60 °C, 1 min), zatim denaturacija 10 min na 90 °C i hibridizacija 1 min na 60 °C. Za kvantifikaciju relativne ekspresije gena korišćena je Comparative Ct ($\Delta\Delta C_t$) metoda. Procena statističke značajnosti rađena je primenom t-testa za nezavisne uzorke ($p < 0,05$).

Tabela 5. Reakcione smeše korišćene u qPCR metodi

Reakciona smeša	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
	(μl)							
qPCR mastermiks	6	6	6	6	6	6	6	6
PCR dH ₂ O	3,5	3	2,5	2	3,5	3	2,5	2
F prajmer	1	1	1	1	1	1	1	1
R prajmer	1	1	1	1	1	1	1	1
cDNK	0,5	1	1,5	2	0,5	1	1,5	2

*qPCR mastermiks sadrži SybrGreen boju. U reakcionim smešama I-IV korišćeni su RT-*hcp*-F i RT-*hcp*-R prajmeri. U reakcionim smešama V-VIII korišćeni su RT-16SE-F i RT-16SE-R prajmeri. Koncentracija korišćenih prajmera iznosila je 10 mM.

3.23. *In planta* direktna interbakterijska kompeticija

Prekonočne kulture sojeva P21, wt S2/27 i Δ tssA S2/27 zasejane su u KB medijum uz dodatak kanamicina (100 μg/ml) za gajenje mutanta. Nakon inkubacije na 30 °C suspenzije su centrifugirane 10 min na 5979 rpm i podešena je OD₆₀₀ 0,1 u sterilnoj destilovanoj vodi. Listovi biljaka šećerne repe stari mesec dana su korišćenjem sterilnog šprica inokulisani sa abaksijalne strane sa po 100 μl pojedinačnih suspenzija i mešoviti kultura P21 i wt S2/27 ili Δ tssA S2/27 u odnosu 1:1. Kao negativna kontrola inokulisana je sterilna destilovana voda. Rađeno je minimum 5 ponavljanja. Nakon 7 dana, listovi su skenirani (Lexmark CX410de) i izmereni su procenti oštećenja lista korišćenjem ImageJ programa. Za proveru statističke značajnosti rađena je jednosmerna ANOVA i Tukey test značajnosti (HSD) ($p < 0,05$).

3.24. Indukcija sistemske rezistencije

Prekonočne kulture sojeva wt S2/27 i Δ tssA S2/27 gajene su u TSB medijumu uz dodatak kanamicina koncentracije 100 μg/ml u medijum mutanta. Po 500 ml prekonočnih kultura centrifugirano je na 4000 rpm, 20 min i resuspendovano u sterilnoj vodi. Biljke su tokom tri nedelje tretirane suspenzijama sojeva wt ili Δ tssA S2/27 čija je OD₆₀₀ iznosila između 1 i 1,1. U trećoj nedelji nakon tretmana rađena je infekcija biljaka patogenom P21 (OD₆₀₀ 0,001). Suspenzije su utiskivane na naličje prvih pravih listova sterilnim špricom. Kontrolne biljke inokulisane su sterilnom destilovanom vodom. U ovom eksperimentu korišćeno je 6 grupa po 5 biljaka šećerne repe starih mesec dana (Tabela 6).

Tabela 6. Grupe biljaka u odnosu na tretmane i infekciju

Grupa	Tretman	Inokulacija
I	wt S2/27	P21
II	wt S2/27	sterilna dH ₂ O
III	Δ tssA S2/27	P21
IV	wt S2/27	sterilna dH ₂ O
V	NT*	P21
VI	NT	sterilna dH ₂ O

*netretirane biljke

Nakon 7 dana od inokulacije sa P21, listovi biljaka su skenirani (Lexmark CX 410de) i izmereni su procenti oštećenja lista korišćenjem ImageJ programa. Za proveru statističke značajnosti rađena je one-way ANOVA praćena HSD testom ($p < 0,05$).

3.25. Izolacija RNK iz biljnog materijala

Svi tretirani listovi iz *in planta* eksperimenata su izmrvljeni tečnim azotom u sterilnim avanima. U ~95 mg biljnog tkiva dodato je po 1 ml trizola (Ambion, Life Technologies). Uzorci su inkubirani na sobnoj temperaturi 5 min, a onda je dodato 0,2 ml hloroforma i jako promućkano. Nakon inkubacije 3 min u mraku, uzorci su centrifugirani 15 min, na 10363 rpm pri temperaturi od 4 °C. Gornja vodena faza prebačena je u novu ependorf tubu i dodato je 0,5 ml izopropanola. Uzorci su inkubirani 10 min na 4 °C, a zatim centrifugirani 10 min na 10363 rpm, na 4 °C. Supernatant je odliven pipetom, a pelet resuspendovan u 1 ml 75% etanola. Nakon kratkog vorteksovanja uzorci su centrifugirani (5 min, 8193 rpm, 4 °C). Korak ispitivanja etanolom ponovljen je dva puta. Supernatant je odbačen, a pelet je sušen oko 5 min na vazduhu i zatim resuspendovan u vodi oslobođenoj DNaza i RNaza. Uzorci su inkubirani u heating bloku na 57 °C, 10 min i nakon toga čuvani na -80 °C. Pored izolacije RNK trizolom, rađena je i izolacija RNK korišćenjem kita Qiagen Plant Mini, prema protokolu proizvođača. Nakon izolacije RNK rađen je tretman uzoraka DNazom. Reakciona smeša je sadržala 30 µl RNK, 5 µl reakcionog pufera sa MgCl₂ (10X), 13 µl vode oslobođene RNaza/DNaza i 2 µl DNaze I. Reakcija je inkubirana 30 min na 37 °C. Zatim je RNK prečišćena korišćenjem pomenutog protokola za izolaciju RNK trizolom. Finalne koncentracije izmerene su na Nanodrop 2000 spektrofotometru (Thermo Fisher, SAD).

3.26. Kvantifikacija ekspresije gena uključenih u imunski odgovor biljaka

Kvantifikacija ekspresije gena *npr1*, *myc2*, *lox* i *nced* rađena je primenom kvantitativne real-time PCR metode. Kao endogena kontrola rađena je kvantifikacija ekspresije gena za 25S RNK. Korišćeni prajmeri prikazani su u tabeli 4. Smeša za qPCR sadržala je: 5 µl SybrGreen miksa (Thermo Fisher, SAD), 2 µl PCR vode, po 1 µl odgovarajućih prajmera i 1 µl cDNK. U bunariće je nalivano po 12 µl u triplikatu. Podešen je sledeći program: priprema uzoraka 2 min na 50 °C, inicijalna denaturacija 10 min na 95 °C, 40 ciklusa denaturacije (95 °C, 15 s) i hibridizacije (60 °C, 1 min), zatim denaturacija 10 min na 90 °C i hibridizacija 1 min na 60 °C. Za interpretaciju i analizu podataka dobijenih qPCR metodom korišćen je StepOne Software v2.3. Za kvantifikaciju relativnih promena u ekspresiji gena korišćena je Comparative Ct ($\Delta\Delta$ Ct) metoda. Za procenu statističke značajnosti rađena je jednosmerna ANOVA uz Tukey test značajnosti ($p < 0,05$).

4. Rezultati

4.1. Ispitivanje genomskih karakteristika odabranih sojeva *P. syringae* pv. *aptata* i komparativna genomika u okviru *P. syringae* kompleksa vrsta

Sojevi *P. syringae* pv. *aptata* P16 i P21 razlikuju se po agresivnosti u virulenciji i opsegu domaćina koje inficiraju. P21 je izuzetno virulentan soj sa širokim opsegom domaćina, dok je P16 slabo virulentan i ima umereni opseg domaćina (Nikolić et al., 2018). U cilju razumevanja razlika u stepenu virulentnosti P16 i P21, kao i njihovog filogenetskog statusa u okviru kompleksa vrsta *P. syringae*, rađene su komparativne analize genoma. Sekvence genoma P16 i P21 dostupne su u NCBI GenBank pod sledećim pristupnim šiframa: JAH CZG000000000.1 i JAH DTA000000000.1. Genomi su poređeni sa genomima 100 odabranih sojeva iz NCBI baze podataka. U okviru odabranih *P. syringae* sojeva nalaze se predstavnici iz filogenetske grupe 02 (FG02) koji obuhvataju široko rasprostranjene, heterogene i izuzetno patogene sojeve *P. syringae*. Dodatno, u analizu su uključeni i predstavnici filogenetskih grupa 01, 03, 04, 07, 09, 10 i 13 izolovani iz različitih staništa.

Tabela 7. Klasifikacija kodirajućih regiona gena prema funkciji. Preuzeto i modifikovano iz Ranković et al. (2023).

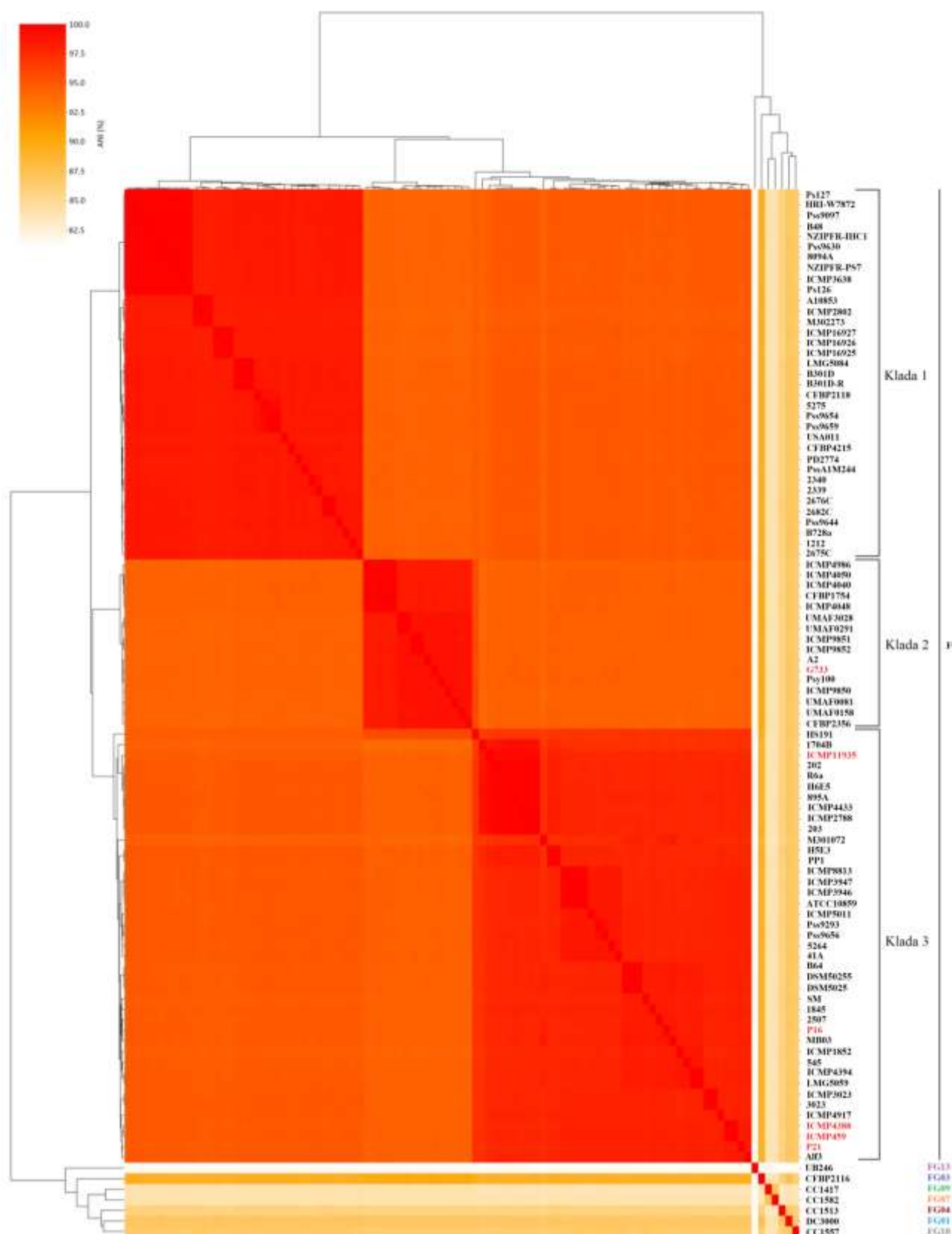
Funkcionalne kategorije gena	Broj gena	
	P16	P21
A - Obrada i modifikacija RNK	1	2
B - Struktura i dinamika hromatina	0	0
C - Produkcija i konverzija energije	182	183
D - Kontrola ćelijskog ciklusa, ćelijska deoba, segregacija hromozoma	37	37
E - Transport i metabolizam aminokiselina	278	282
F - Transport i metabolizam nukleotida	73	73
G - Transport i metabolizam ugljenih hidrata	191	195
H - Transport i metabolizam koenzima	149	149
I - Transport i metabolizam lipida	128	125
J - Translacija, struktura i biogeneza ribozoma	216	216
K - Transkripcija	182	181
L - Replikacija, rekombinacija i reparacija	106	113
M - Biogeneza ćelijskog omotača/zida/membrane	177	184
N - Pokretljivost	41	42
O - Posttranslacione modifikacije, promet proteina, šaperoni	116	117
P - Transport i metabolizam neorganskih jona	165	166
Q - Biosinteza, transport i katabolizam sekundarnih metabolita	62	61
R - Predikcija opšte funkcije	143	151
S - Nepoznata funkcija	38	40
T - Mehanizmi signalne transdukcije	136	138
U – Intracelularni transport, sekrecija i vezikularni transport	54	66
V - Odbrambeni mehanizmi	61	59
W - Ekstracelularne strukture	0	0
X - Mobilom: profagi, transpozoni	3	9
Y - Strukture jedra	0	0
Z - Citoskelet	1	1

Svi analizirani sojevi *P. syringae* imaju genome u osegu veličina 5,77-6,87 Mbp, prema podacima iz NCBI baze. Konkretno, genomi sojeva P16 i P21 su veličine 5,97 i 6,35 Mb sa 59,03 i 58,77% sadržaja GC parova (Prilog 1). U odnosu na predstavnike FG02, soj P21 pripada grupi sa najvećom veličinom genoma, slično DSM50252 (6,36 Mbp) koji pripada istom patogenom varijetetu. Broj kontigenata iznosio je 141 sa srednjom dužinom 42369,2 bp za P16 i 99 kontigenata sa srednjom dužinom 64179,1 bp za P21. Dužina najkraćeg kontigenta koji zajedno sa dužim kontigentima čini 50% ukupne veličine genoma predstavlja N50 vrednosti koje su iznosile 109000 i 131242 bp za P16 i P21.

Sojevi P16 i P21 imaju više gena za tRNK (56) i rRNK (9) u poređenju sa drugim predstavnicima istog patogenog varijeteta (tRNK 29-44; rRNK 3-4) (Prilog 1). Anotacijom genoma P16 dobijeno je 5360 kodirajućih regiona, od kojih 3439 ima poznate funkcije, dok je funkcija 1921 kodirajućeg regiona nepoznata. Nešto veći broj kodirajućih regiona (5727) uočen je kod P21, od čega su 3536 sa poznatim i 2191 sa nepoznatim funkcijama. Kodirajući regioni gena klasifikovani su u različite COG kategorije prema njihovim ulogama u ćeliji (Tabela 7). U okviru kodirajućih regiona sa poznatim funkcijama, 597 kodirajućih regiona gena soja P16 i 653 za soj P21 nisu pripali nijednoj od COG kategorija.

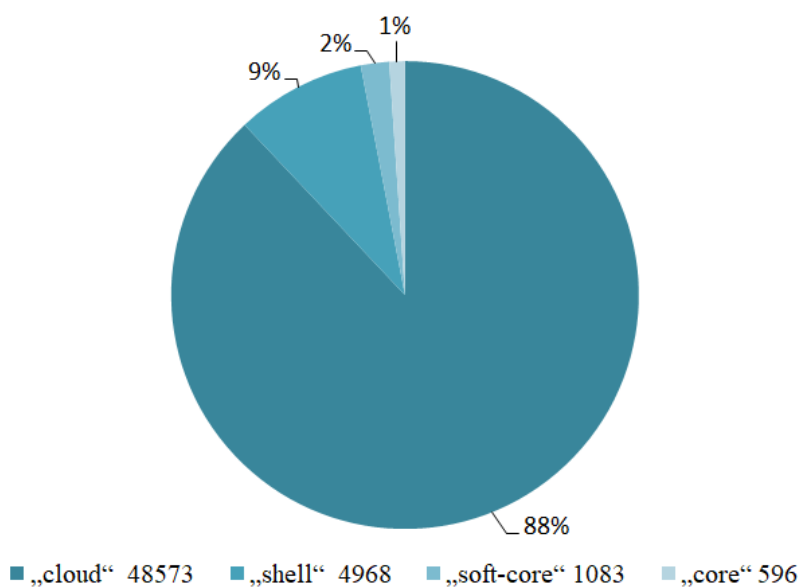
U cilju validacije anotacije genoma i procene homologije gena, P16 i P21 su korišćenjem Blast Atlas (Stothard et al., 2019) alata poređeni sa referentnim sojem *P. syringae* pv. *syringae* B728a, koji je vrlo često korišćeni model sistem i član je FG02. Uočeno je 4181 kodirajućih regiona gena P16 koji imaju 80% identičnosti sa B728a i 5402 kodirajuća regiona gena P21 koji se u istom procentu poklapaju sa referentnim sojem.

Uvid u filogenomski status P16 i P21 u okviru *P. syringae* kompleksa vrsta dobijen je analizom prosečne identičnosti testiranih genoma na nukleotidnom nivou (engl. „Average Nucleotide Identity“ – ANI). Poređenjem kodirajućih regiona svakog genoma *P. syringae* sa svakim uočene su tri različite klade u okviru FG02 sa nivoom sličnosti od najmanje 95% (Slika 12). Sojevi P16 i P21 pripadaju kladi 3 zajedno sa drugim sojevima *P. syringae* pv. *aptata* izolovanim sa šećerne repe i sojevima koji pripadaju patogenim varijetetima *syringae*, *pisi*, *lapsa*, *japonica* i *atrofaciens* (ANI vrednosti 98,3-99,9%). Kladi 2 pripadaju *P. syringae* pv. *syringae*, *P. syringae* pv. *papulans*, *P. syringae* pv. *aceris* i *P. syringae* pv. *dysoxily* (98,3-99,8%). Soj *P. syringae* pv. *aptata* G733, izolovan sa pirinča, takođe pripada kladi 2 sa ANI vrednostima 98,5-99% u poređenju sa drugim pripadnicima ove klade. Međutim, ANI vrednosti ovog soja pri poređenju sa drugim *P. syringae* pv. *aptata* sojevima su niže (94,4-94,6%). Kladi 1 pripadaju samo *P. syringae* pv. *syringae* i *P. syringae* pv. *solidagae* (ANI vrednosti 98,2-99,9%). Sojevi koji pripadaju drugim filogrupama značajno se razlikuju i među sobom i u odnosu na pripadnike FG02 (ANI vrednosti 81,1-90,1%), što opravdava njihovu klasifikaciju u odvojene filogrupe. Na primer, soj UB246, koji pripada FG13 izolovan iz rečne vode pokazuje najmanju sličnost sa ostalim testiranim sojevima (81,1-81,5%).



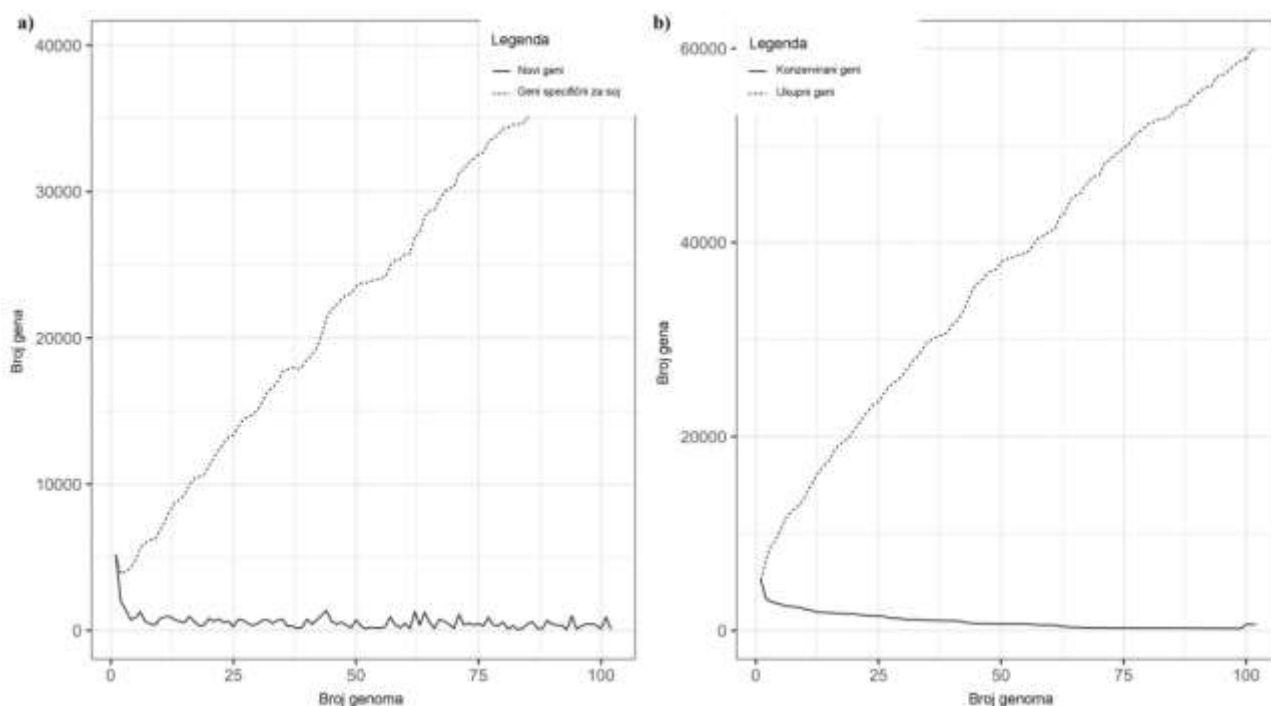
Slika 12. Komparacija genoma korišćenjem FastANI metode sa pragom identičnosti od 95%. Preuzeto i modifikovano iz Ranković et al. (2023).

Za ispitivanje repertoara gena u okviru *P. syringae* kompleksa vrsta korišćena je Pangenom analiza koja je pored genoma P16 i P21 sojeva obuhvatila još 100 genoma *P. syringae* sojeva iz NCBI baze podataka. Pangenom čini 55220 gena od kojih 596 predstavlja „core“, 1083 „soft-core“, 4968 „shell“ i 48573 „cloud“ gene (Slika 13). „Core“ geni predstavljaju veoma konzervirane gene koji nose filogenetsku informaciju, dok akcesorni („shell“ i „cloud“) geni predstavljaju fleksibilni deo genoma (Gomila et al., 2017). Za razliku od „core“ gena koji su prisutni kod više od 99% testiranih sojeva, „soft-core“ geni su prisutni kod 95-99%. „Core“ i „soft-core“ geni zajedno obuhvataju samo 3,04% ukupnog pangenoma, dok akcesorni geni čine ~97%.



Slika 13. Zastupljenost „core“, „soft-core“, „shell“ i „cloud“ gena u okviru pangenoma *P. syringae*. Preuzeto i modifikovano iz Ranković et al. (2023).

Sa povećanjem broja analiziranih genoma *P. syringae* uočava se povećanje broja akcesornih gena. Kriva koja pokazuje odnos novih gena i gena specifičnih za soj ukazuje na povećanje broja jedinstvenih gena sa dodatkom novih genoma (Slika 14a). Uočeno je oko 35000 gena koji su specifični za soj. Sa druge strane, broj „core“ gena naglo opada sa dodatkom prvih 30 genoma u analizu, a nakon toga broj ostaje približno konstantan. Broj ukupnih gena u pangenomu se linearno povećava (Slika 14b), što može ukazivati na otvoreni tip pangenoma *P. syringae* kompleksa vrsta. Dodatno, prisustvo velikog broja akcesornih gena i gena specifičnih za soj ukazuje na izrazitu varijabilnost u okviru testiranih sojeva, što se može povezati sa njihovom adaptabilnošću na različite sredinske uslove.



Slika 14. Kriva: a) odnos broja novih i jedinstvenih gena u odnosu na broj genoma; b) odnos broja „core“ i ukupnih gena u odnosu na broj genoma. Preuzeto i modificirano iz Ranković et al. (2023).

Na osnovu „core“ gena konstruisano je stablo na kome se mogu uočiti četiri klastera (Slika 15). Distribucija akcesornih gena *P. syringae* sojeva je veoma varijabilna, sa najvećim razlikama između sojeva koji pripadaju različitim filogenetskim grupama. Sojevi P16 i P21 su blisko srodni i pripadaju istom klasteru zajedno sa četiri druga soja *P. syringae* pv. *aptata*, koji su takođe poreklom sa šećerne repe. Nasuprot ovim sojevima, *P. syringae* pv. *aptata* G733 se odvaja u posebnu kladu zajedno sa pripadnicima *P. syringae* pv. *syringae*, što je u saglasnosti i sa rezultatima ANI analize (Slika 12).

Pangenom analizom dobijen je uvid u prisustvo/odsustvo različitih gena uključenih u kolonizaciju i virulenciju kod sojeva *P. syringae*. Izdvojene su grupe gena koji su uključeni u adheziju, sekreciju efekatora, pokretljivost, formiranje biofilma, kao i geni za egzotoksine, receptore za siderofore, antimikrobnu aktivnost, regulatorni geni i drugi (Slika 16). Najveći broj detektovanih gena uključen je u pokretljivost. Svi testirani sojevi, uključujući i sojeve koji pripadaju patogenom varijetetu *aptata*, sadrže gene koji kodiraju flagelarne strukture (*flh*, *flg*, *fli* geni) i *che* gene uključene u hemotaksiju. Pored toga, sojevi P16 i P21 poseduju gene uključene u pokretljivost nezavisnu od flagele (rojenje i kretanje trzajima). Konkretnije, soj P16 sadrži gene koji kodiraju proteine uključene u pokretljivost rojenjem i regulatorni senzorni protein (*swrC* i *rssA*), dok je kod P21 i drugih ispitivanih *P. syringae* pv. *aptata* sojeva prisutan samo *rssA* gen (Slika 16). Oba soja sadrže veći broj gena za histidin kinaze i Bphp1 koji je uključen u regulaciju kretanja rojenjem posredstvom svetlosti. Genomi analiziranih sojeva sadrže i set *pil* gena (Slika 16) koji su uključeni u asembliranje, ekstenziju, pričvršćivanje i retrakciju Tip IV pilusa koji je značajan za pokretljivost trzajima. Pored toga, pokretljivost trzajima i T4P su u korelaciji sa formiranjem biofilma. Ključnu ulogu u disperziji biofilma kod *P. syringae* pv. *aptata* ima *bdlA* gen koji je prisutan kod svih testiranih sojeva. Geni za egzopolisaharide levane nisu detektovani, dok je većina gena za alginate prisutna kod svih sojeva izuzev *algC* gena koji je prisutan samo kod *P. syringae* pv. *syringae* NZIPFR-VIR1. Gen *acsC* koji kodira celuloznu sintazu prisutan je kod nekoliko sojeva, međutim nije prisutan kod testiranih *P. syringae* pv. *aptata* izuzev G733. Gen *acsA* prisutan je samo kod *P. viridiflava* CC1582.

Svi testirani *P. syringae* sojevi uključujući P16, P21 i druge pripadnike *P. syringae* pv. *aptata* imaju *inaZ* gen za „ice nucleation“ aktivnost, senzornu histidin kinazu (*phoQ*) i komplekse master

regulatora virulencije (*algU/rpoE*, *csrA1A2*, *gacA* i *bvgAS*). Pored toga, kod svih sojeva prisutni su geni koji kodiraju receptore za siderofore, kao što su feripioverdin, feripiohelin, ferihrom, ferienterobaktin, feri-anguinibaktin, feri-pseudobaktin BN8/BN7. Svi analizirani *P. syringae* genomi poseduju *iaaM* gen, koji je značajan za produkciju biljnog hormona auksina, a većina poseduje i gen za korišćenje GABA (*gabP*) (Slika 16).

Generalno, u okviru *P. syringae* pv. *aptata* nije uočen veliki broj razlika u prisutnosti gena uključenih u kolonizaciju i virulenciju među analiziranim sojevima. Za razliku od ostalih *P. syringae* pv. *aptata* sojeva, P16 i P21 poseduju *cpxA* gen koji je deo dvokomponentnog sistema CpxA/CpxR, uključenog u virulenciju kod *P. syringae*. Dodatno, detektovani su geni koji predstavljaju obeležja tip VI sekretornog sistema i uključeni su u kompeticiju i virulenciju. Pored *hcp1* i *clpV1* koji su prisutni kod svih sojeva *P. syringae* pv. *aptata*, *hcpA* je detektovan kod P16, P21 i ICMP11935. Uopšteno govoreći, veći broj gena uključenih u sekreciju različitih efektor detektovan je kod P21 u odnosu na P16 (Slika 16).

Geni za fitotoksine nisu detektovani analizom pangena koja je rađena na osnovu Prokka anotacije. Umesto toga, dodatna analiza Blast atlas, u kojoj su genomi P16 i P21 poređeni sa referentnim sojem B728a, otkrila je prisustvo *syrD* gena koji kodira siringomicin kod P16 i P21. Sekvence ovog gena kod B728a pokazale su 98,24 i 97,06% identičnosti sa *syrD* P16 i P21. Takođe, u oba soja detektovani su geni za siringopeptin (*sypA*, *sypB* i *sypC*), sa procentom identičnosti 85-97% sa istim genima kod B728a.

„Draft“ genomi oba soja imaju kodirajuću sekvencu za protein/enzim LuxQ (histidin kinaza/fosfataza), koja je deo *lux* operona uključenog u međucelijsku komunikaciju (engl. „Quorum Sensing“ – QS). Sa druge strane, imaju i *pvdQ* gen koji kodira AHL acilazu u testiranim sojevima što ukazuje na potencijalnu aktivnost u utišavanju međucelijske komunikacije između bakterija.



Slika 16. Geni uključeni u kolonizaciju i virulenciju u okviru *P. syringae* kompleksa. Redosled sojeva prikazan je kao u ANI analizi. Sojevi označeni žutom, sivom i naranžastom bojom pripadaju ANI kladama 1, 2 i 3 u okviru FG02. Ostali sojevi su predstavnici FG 13,03, 09, 07, 04, 01 i 10. Zelena polja označavaju prisustvo a bela odsustvo gena. Preuzeto i modificirano iz Ranković et al. (2023).

4.2. Analiza Tip III sekretornog sistema i drugih faktora koji doprinose razlikama u virulenciji odabranih sojeva *P. syringae* pv. *aptata*

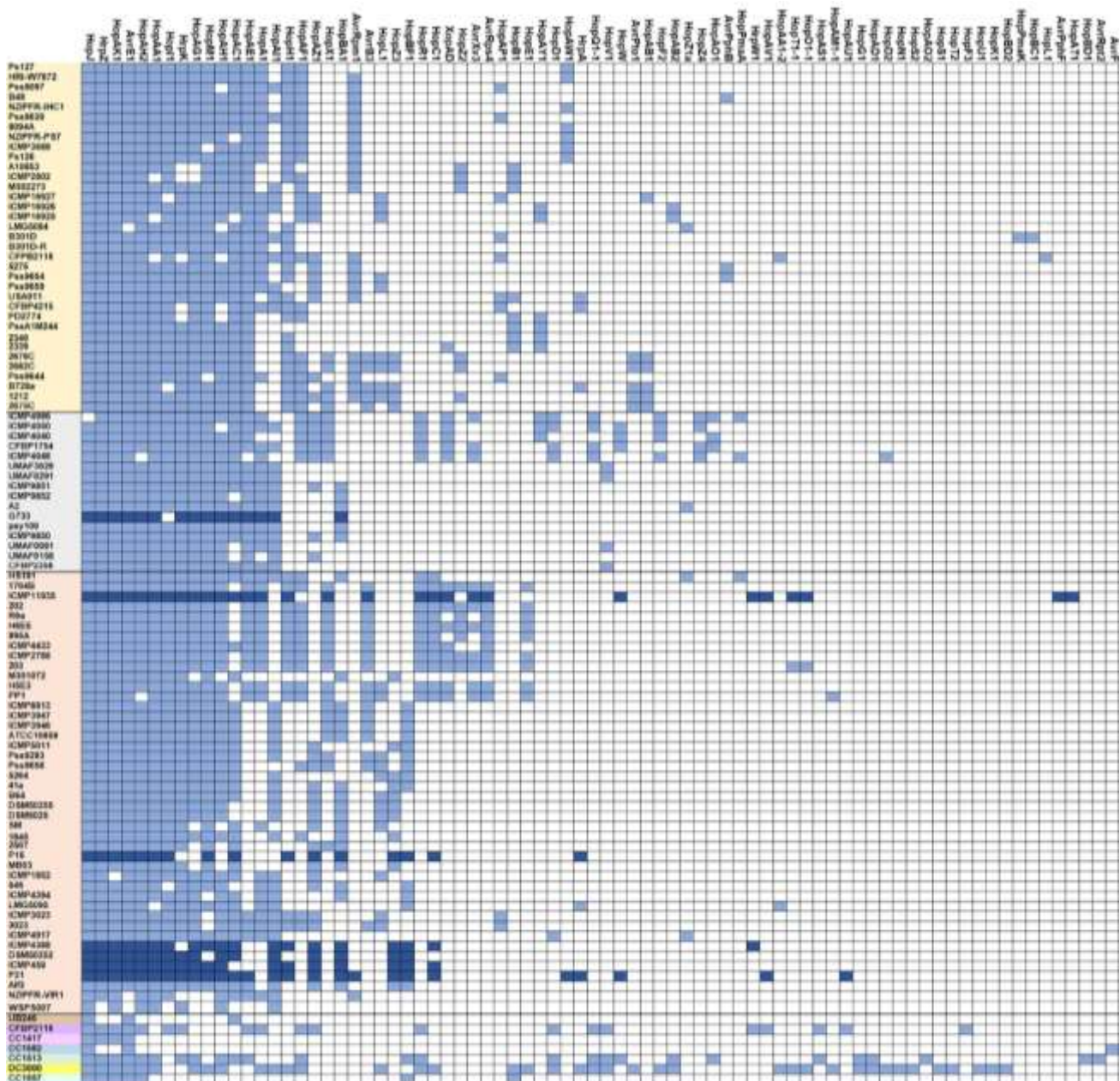
4.2.1. Identifikacija gena za T3SS efektore u okviru *P. syringae* kompleksa

Na osnovu predikcije T3SS efektora posredovane mašinskim učenjem, ustanovljen je repertoar od 78 različitih gena za T3SS efektore u okviru 102 genoma uključujući P16 i P21. Kod 90% analiziranih sojeva bili su prisutni geni za efektore HopJ, HrpZ, HopAK1, AvrE1, HopAH2, HopAA1, HopI1, HrpK, HopAG1 i HopM1. U okviru pojedinačnih sojeva najčešće je detektovano između 15 i 20 poznatih gena za efektorne proteine. Najveći broj gena (39) je detektovan u genomu *P. syringae* pv. *tomato* DC3000. Samo pet drugih sojeva, uključujući dva *P. syringae* pv. *aptata* soja (ICMP11935 i P21) imali su gene za više od 25 efektora. Manje od 10 gena za efektore detektovano je kod četiri soja koja su poreklom iz prirodnih izvora i to samo tri poznata gena u genomima UB246 i CC1582, četiri u CC1417 i sedam gena u CC1557. Najmanji broj efektora kod soja izolovanog sa jabuke detektovan je u genomu WSPS007 koji pripada patogenom varijetetu *syringae*.

Ukoliko posmatramo samo *P. syringae* pv. *aptata* najveći broj gena detektovan je kod sojeva P21 (26) i ICMP11935 (29). ICMP11935 je istovremeno jedini soj kod koga su detektovani geni za efektore AvrPphF i HopAT1 (Slika 17). U okviru šest sojeva *P. syringae* pv. *aptata* poreklom sa šećerne repe identifikovano je ukupno 32 različita gena za efektorne proteine. Kod svih *P. syringae* pv. *aptata* prisutni su geni sa konzerviranog lokusa, za efektore AvrE1, HopM1, HopAA1 i 13 drugih (HopAK, HrpZ, HopJ, HrpA, HopAH2, HopC1, HopH1, HopZ3, HopAC1, HopI1, HopAZ1, HopBA1 i HopBF1). Detektovano je devet kodirajućih sekvenci za efektore kod P21 koji nisu prisutni kod P16 (HopAI1, HopAH1, HopAG1, AvrRpm1, HrpK, HopAW1, HopAU1, HopW i HopAV1) (Slika 17). Geni za efektore AvrRpm1, HopAW1 i HopAU1 identifikovani u genomu P21 su po prvi put detektovani kod predstavnika patogenog varijeteta *aptata*. Genska sekvenca za efektor AvrRpm1 je 99,54% identična sa sekvencom ovog gena soja *P. syringae* pv. *syringae* B728a. Gen za ovaj efektor protein prisutan je samo u genomima sojeva iz FG02, koji pretežno pripadaju *P. syringae* pv. *syringae*. Sa druge strane, gen za HopAU1 pokazuje najveći procenat identičnosti (99,84%) sa kodirajućom sekvencom *P. syringae* pv. *theae*. Međutim, ovaj gen identifikovan je i kod CFBP2116, pripadnika FG03. Gen za efektor HopAW1 detektovan je samo kod sedam sojeva koji su pripadnici FG02 i pokazuje visok procenat poklapanja (>99%) sa većim brojem patogenih varijeteta u okviru *P. syringae*.

Pored do sada poznatih gena za T3SS, predikcijom T3SS efektor posredovanom mašinskim učenjem omogućava se i detekcija potencijalno novih efektor. Uz 26 gena za efektore kod P21 koji su potvrđeni BLASTp analizom njihovih proteinskih sekvenci, indentifikovana su tri efektor koja nisu pokazala podudarnost sa već poznatim efektorima u okviru *P. syringae* kompleksa. To su: pantoenat kinaza, VapC endonukleaza i RAQPRD integrativni konjugativni protein. Ovi proteini bi mogli predstavljati kandidate za nove, do sada neidentifikovane T3SS efektore.

U genomu P16 detektovano je 20 potencijalnih efektor, među kojima je 16 potvrđeno BLASTp analizom (Slika 17). Preostala četiri proteina su pantotenat kinaza, VapC endonukleaza, fosfolipaza i pektat liaza. Sve kodirajuće sekvence za potencijalno nove efektore imale su visoku AUPRC vrednost u opsegu 0,646 (VapC endonukleaza) do 0,957 (fosfolipaza). Pored toga, u okviru svih analiziranih sojeva otkriveno je oko 30 potencijalno novih efektornih proteina sa AUPRC vrednosti preko 0,5, što ukazuje na veći repertoar efektor u okviru *P. syringae* kompleksa nego što je do sada bilo poznato.



Slika 17. Predikcija T3SS efektor posredovana sa mašinskim učenjem. Redosled sojeva prikazan je kao u ANI analizi. Sojevi označeni žutom, sivom i naranžastom bojom pripadaju ANI kladama 1, 2 i 3 u okviru FG02. Ostali sojevi su predstavnici FG 13, 03, 09, 07, 04, 01 i 10. Plava polja označavaju prisustvo gena, a siva odsustvo. Preuzeto i modifikovano iz Ranković et al. (2023).

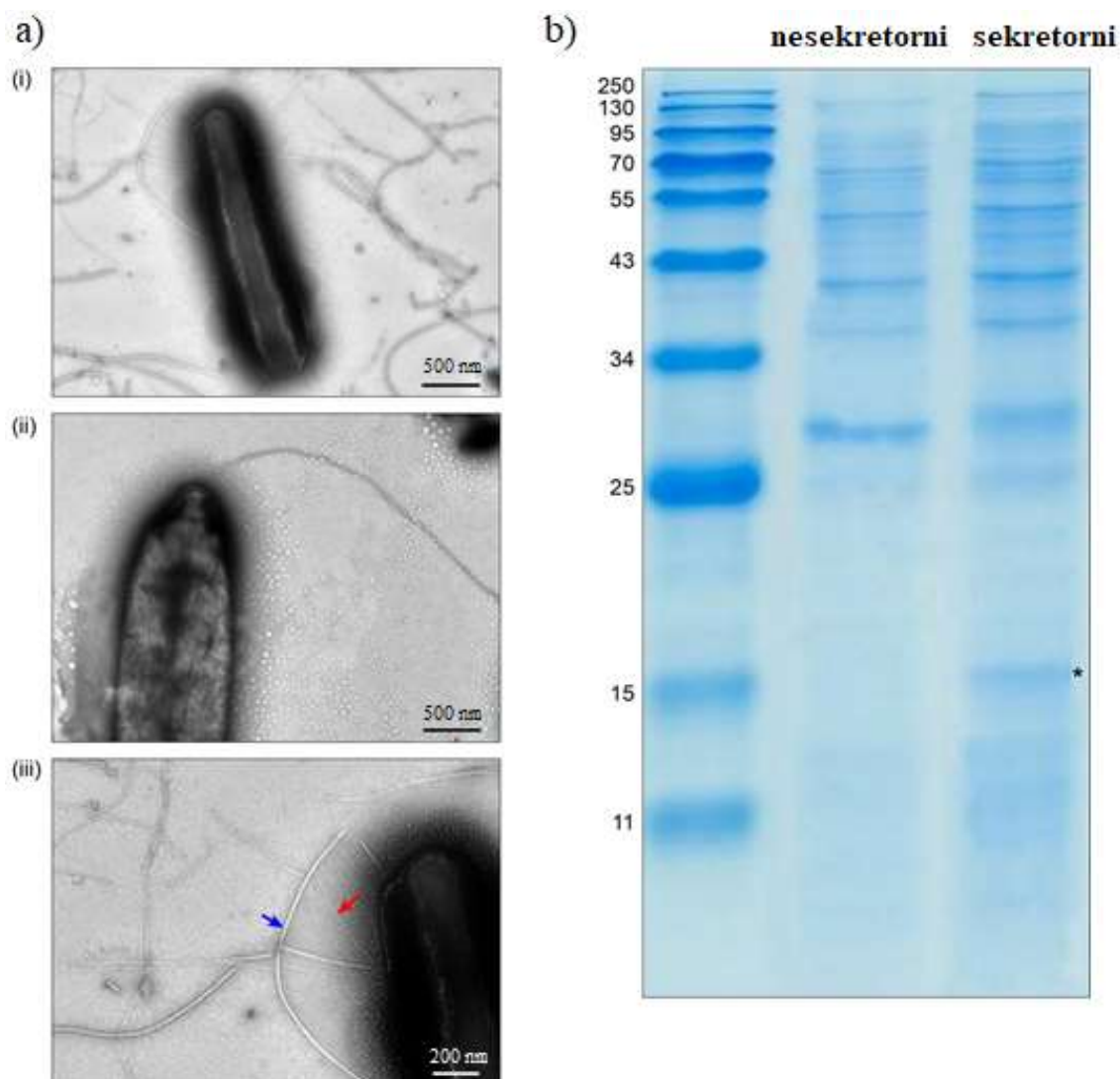
4.2.2. Vizuelizacija T3SS pila i sekrecija T3SS proteina

Nakon identifikacije repertoara gena uključenih u virulenciju *P. syringae* kompleksa vrsta, cilj je bio utvrđivanje repertoara sekretovanih faktora virulencije u različitim uslovima gajenja. Prvi korak podrazumevao je vizuelizaciju pila i ispitivanje aktivnosti T3SS kao jednog od glavnih faktora koji doprinose patogenom potencijalu *P. syringae*. Slabo virulentni soj P17 inkubiran je u sekretornim uslovima, koji imitiraju uslove u biljnom apoplastu, kao i u nesekretornim uslovima. Pili su uslikani pod elektronskim mikroskopom i njihova dužina je merena u ImageJ programu (Tabela 8). Srednja vrednost dijametra pila iznosila je $7,3 \pm 0,8$ nm, dok je srednja vrednost dijametra flagela bila $18,0 \pm 4,0$ nm, isključivo u sekretornim uslovima (Slika 18)

Tabela 8. Dijametri pila i flagela soja P17 uslikani elektronskim mikroskopom

Pojedinačni dijametri (nm)											Srednja vrednost (nm)	St. dev (nm)
Pili	8,2	7,1 1	8,1 2	6,8 2	8,1 7	6,8 5	7,0 2	5,7	7,1 1	6,8 2	7,33	0,83
Flagele	23, 9	17, 2	16, 3	14, 8	18, 4	16, 6	12, 6	25, 7	15, 7	19, 1	18,01	4,02

Analizom supernatanta bakterijskih kultura na SDS-PAGE gelovima identifikovane su trake koje su bile vidljive isključivo u supernatantu kultura gajenih u sekretornim uslovima, uključujući i traku molekulske mase ~15 kDa, što je približno molekulskoj masi HrpA proteina (očekivana molekulska masa 11 kDa). Pored toga, vidljive su i slabije trake koje odgovaraju proteinima većih molekulskih masa (Slika 18).



Slika 18. Formiranje pila i sekrecija T3SS proteina u HIM medijumu. a) Transmisiona elektronska mikroskopija soja P17 u: i) sekretornim uslovima; ii) nesekretornim uslovima (iii) označeni pili (crvena strelica) i flagela (plava strelica); b) SDS-PAGE analiza supernatanta P17 – levo marker molekulskih masa (kDa), desno profili proteina u nesekretornim i

sekretornim uslovima; zvezdica označava traku kompatibilnu sa molekulskom masom HrpA (11 kDa). Preuzeto i modificirano iz Nikolić et al. (2023).

4.2.3. Analiza proteina *P. syringae* pv. *aptata* P17 masenom spektrometrijom

Kako bismo ispitali da li postoji razlika u sekreciji T3SS proteina u sekretornim uslovima koji imitiraju uslove u apoplastu i neseekretornim uslovima, u kojima su nutrijenti dostupni u velikim količinama, rađena je tečna hromatografija sa tandem masenom spektrometrijom („Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry“ – LC-MS/MS). Za početnu analizu je odabran soj P17 kao slabo virulentni predstavnik, u cilju optimizacije uslova za analizu sojeva koji se razlikuju po stepenu virulencije. Rezultati potvrđuju sekreciju HrpA u T3SS sekretornim uslovima. Dodatno, uočena je sekrecija drugih poznatih T3SS efektor (Tabela 9). Kao i HrpA, većina ovih efektor (HopBA1, HopM1, HopBF1, HopI1, HopAA1, HopC1, HopAZ1, HopZ3, HopPmaK, HopBC1) detektovani su samo u sekretornim uslovima. U najvećoj meri prisutni su HopBA1, HrpK1 i HrpA proteini. Jedan efektor (HopJ1) detektovan je u malim količinama i u sekretornim i u neseekretornim uslovima, dok je jedan (HopAH2) detektovan u većoj meri u neseekretornim uslovima.

Tabela 9. Detekcija T3SS proteina u supernatantu soja P17 u različitim uslovima. Kvantifikacija upotrebom LC-MS/MS rađena je u triplicatu. Preuzeto i modificirano iz Nikolić et al. (2023).

T3SS proteini	Molekulski masa	T3SS sekretorni uslovi			T3SS neseekretorni uslovi		
		Repl . a	Repl . b	Repl . c	Repl . a	Repl . b	Repl . c
Tip III efektor HopBA1	25 kDa	40	36	34	0	0	0
Tip III helper protein HrpK1	81 kDa	32	28	29	0	0	0
Tip III harpin protein HrpA	11 kDa	30	17	18	0	0	0
Tip III efektor HopBC1	27 kDa	17	17	16	0	0	0
Tip III efektor HopM1	76 kDa	16	16	14	0	0	0
Tip III efektor HopBF1	14 kDa	14	13	13	0	0	0
Tip III efektor HopC1	29 kDa	13	14	11	0	0	0
Tip III efektor HopPmaK (HopAL1)	74 kDa	7	12	10	0	0	0
Tip III helper protein HrpW1	45 kDa	9	7	12	0	0	0
Tip III helper protein HopAK1	58 kDa	5	7	5	0	0	0
Tip III efektor HopAA1	56 kDa	6	4	4	0	0	0
Tip III helper protein HrpZ1	35 kDa	3	3	3	0	0	0
Tip III efektor HopAZ1	25 kDa	3	3	2	0	0	0
Tip III efektor HopI1	38 kDa	1	3	1	0	0	0
Tip III efektor HopZ3	50 kDa	0	2	1	0	0	0
Tip III efektor HopJ1	12 kDa	1	0	1	1	2	0
Tip III efektor HopAH2	40 kDa	0	2	0	12	5	5

4.2.4. Analiza sekretoma *P. syringae* pv. *aptata* sojeva sa različitim stepenom virulencije

Analiza sekretoma rađena je u cilju ispitivanja korelacije stepena virulencije sojeva *P. syringae* pv. *aptata* i broja, prirode i/ili količine transportovanih efektornih proteina. Urađena je semi-kvantitativna proteomska analiza sekretoma šest sojeva *P. syringae* pv. *aptata* sa različitim patogenim karakteristikama, u uslovima koji imitiraju uslove u apoplastu. Sojevi P16 i P17 su slabo virulentni, P26 i P93 umereno virulentni, dok su P21 i P23 izuzetno virulentni (Nikolić et al., 2018; Morris et al., 2019). U cilju fokusiranja na sekretovane proteine koji mogu doprineti ovim razlikama, od inicijalnih 901 detektovanog proteina, odabrani su proteini sa minimalno pet detektovanih peptida i

maksimalnim intenzitetom razlike između individualnih sojeva ($\log_2 \geq 3$). Rezultujuća lista od 246 proteina isključuje uglavnom citosolne proteine koji su konstantno prisutni u malim koncentracijama usled lize ćelija. Lista se sastoji pretežno od poznatih proteina koji se sekretuju, kao što su 23 od 26 poznatih T3SS-sekretovanih proteina, svih šest poznatih T6SS-sekretovanih proteina i osam od 15 eksportovanih flagelarnih proteina.

Flagelarni proteini kao što su flagelin, „hook-associated“ proteini i sekretovane regulatorne komponente, prisutni su u sekretomima svih sojeva uniformno, sa najvećim stepenom sekrecije kod umereno i jako virulentnih sojeva (P23 i P93 > P21 i P26), dok je najniži nivo sekrecije karakterističan za slabo virulentni soj P16 (Tabela 10).

Kada je u pitanju sekrecija proteina T3SS, u najvećoj meri je detektovan HrpA pilusni protein kod svih sojeva. Takođe, u većoj meri su bili prisutni i T3SS „helper“ proteini HrpK1, HrpW, HrpZ1 i HopAK1. Pored toga, detektovan je i protein HrpB koji predstavlja regulatornu komponentu, kao i 17 različitih T3SS efektnih proteina (Tabela 10). Činjenica da su kod svih testiranih sojeva sekretovani „core“ efektori sa konzerviranog efektnog lokusa, kao što su AvrE1, HopM1, HopI1 i HopAA1, potvrđuje konzervirano prisustvo kompletnog *hrp* ostrva patogenosti koje kodira T3SS. Većina T3SS efektoru su sekretovani u velikim količinama kod slabo virulentnih sojeva P16 i P17, dok su kod umereno i jako virulentnih sojeva P26, P93, P21 i P23 prisutni u manjoj meri, oko 10-20 puta manje. Međutim, efektori HopAU1, HopAW1, HopAH1 i AvrRpm1 pokazali su drugačiji obrazac – detektovani su u supernatantu umereno virulentnog soja P26 i jako virulentnog P21 u većoj meri u odnosu na ostale sojeve (Tabela 10).

Među proteinima T6SS, detektovane su velike količine sekretovanog Hcp1 proteina. Generalno ovaj protein je u velikoj meri detektovan kod svih testiranih sojeva, a kod sojeva P16, P23 i P93 ima najviši nivo sekrecije (Tabela 10). Kod istih sojeva zapažena je i sekrecija VgrG proteina u većoj meri. Pored toga, još jedan set T6SS gena koji takođe pripada Hcp familiji je sekretovan, posebno kod sojeva P23 i P93 (Tabela 10).

Tabela 10. Relativna kvantifikacija sekretovanih proteina. Preuzeto i modifikovano iz Nikolić et al. (2023).

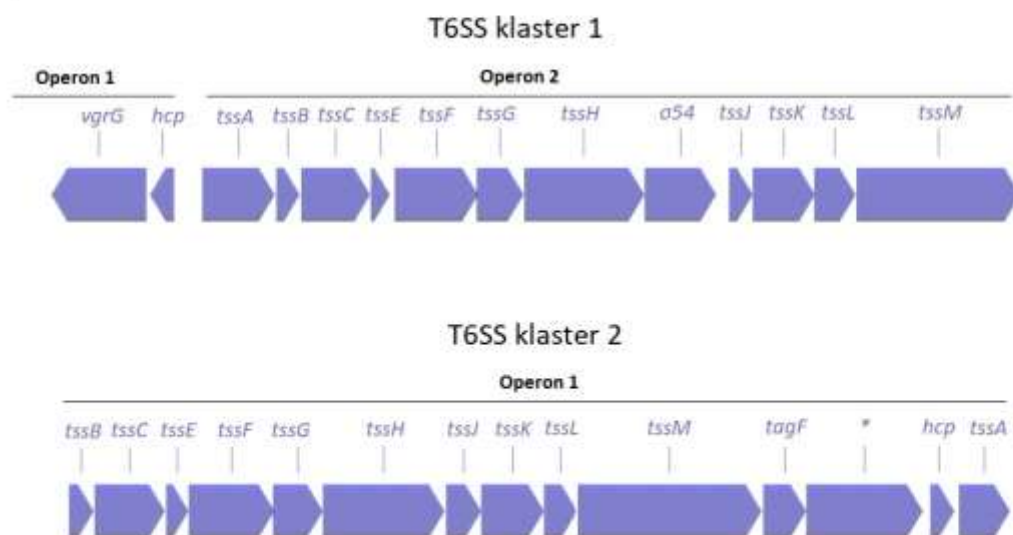
Protein	Prosećan intenzitet proteina (log 2) u testiranim sojevima						Prosek log ₂	Max razlika log ₂
	P16 SV*	P17 SV	P21 JV	P23 JV	P26 UV	P93 UV		
Tip III sekretorni sistem								
Tip III harpin protein HrpA	35,158	35,424	33,986	31,331	32,991	30,108	33,166	5,317
Tip III helper protein HrpK1	33,692	32,764	31,349	28,746	29,748	28,417	30,786	5,276
Tip III helper protein HrpW1	33,116	31,356	28,468	28,810	28,660	28,344	29,792	4,772
Tip III helper protein HrpZ1	31,748	30,397	28,822	28,028	28,579	26,993	29,094	4,755
Tip III efektor HopBA1	32,721	31,934	26,326	28,058	24,955	27,470	28,577	7,765
Tip III efektor HopI1	30,611	29,790	28,913	26,368	28,069	25,733	28,247	4,878
Tip III efektor HopBN1	31,312	30,115	28,620	25,265	27,861	25,648	28,137	6,047
Tip III efektor AvrE1	29,827	28,419	28,164	26,723	27,696	25,853	27,780	3,973
Tip III helper protein HopAK1	31,575	30,297	27,908	25,085	26,734	24,926	27,754	6,649
Tip III efektor HopAZ1	30,774	30,893	27,588	24,890	26,627	24,511	27,547	6,382
Tip III efektor HopAA1	29,924	28,046	28,234	25,592	26,266	24,456	27,086	5,468

Tip III efektor HopM1	30,460	29,606	26,765	25,864	25,604	23,930	27,038	6,530
Tip III efektor HopBF1	32,206	30,950	25,168	26,384	21,845	25,634	27,031	10,361
Tip III efektor HopC1	30,485	29,604	27,516	25,332	26,351	22,785	27,012	7,700
Tip III efektor HopH1	29,731	28,448	25,761	24,816	24,829	23,583	26,195	6,148
Tip III efektor HopBC1	28,918	28,708	25,921	24,103	24,917	24,094	26,110	4,825
Tip III inner rod protein HrpB	27,842	26,900	26,291	23,718	24,533	22,243	25,254	5,599
Tip III efektor HopZ3	27,853	28,582	22,023	25,252	21,296	25,160	25,028	7,286
Tip III efektor HopAU1 (pv. <i>theae</i>)	21,125	21,429	28,602	24,773	27,282	22,675	24,314	7,478
Tip III efektor HopPmaK	28,240	28,850	20,096	20,456	22,750	23,100	23,915	8,754
Tip III efektor HopAW1 (pv. <i>syringae</i>)	22,344	19,953	27,682	20,383	27,057	21,593	23,169	7,730
Tip III efektor HopAH1	19,976	21,827	25,483	22,406	24,362	22,368	22,737	5,506
Tip III efektor AvrRpm1 (pv. <i>syringae</i>)	19,988	21,429	26,473	21,459	25,504	20,608	22,577	6,485
Tip VI sekretorni sistem								
Pretopostavljeni Tip VI efektor, Hcp1 familija	36,810	34,085	33,449	36,644	33,152	36,473	35,102	3,658
Pretopostavljeni Tip VI efektor, VgrG familija	30,412	29,552	28,495	30,660	27,655	30,453	29,538	3,005
Pretopostavljeni Tip VI efektor, Hcp1 familija	22,551	21,565	28,484	31,146	26,868	30,847	26,910	9,581
Pretopostavljeni Tip VI efektor, VgrG familija	23,417	23,397	20,542	27,142	22,382	26,237	23,853	6,600
Rhs protein	21,191	19,702	21,223	25,796	21,238	25,048	22,366	6,094
Flagelum								
Flagelarni "hook-associated" protein 2	31,746	33,611	34,777	34,798	34,304	34,607	33,974	3,052
Flagelarni biosintetički anti-sigma faktor FlgM	31,399	32,786	34,528	33,849	33,952	33,737	33,375	3,130
Flagelarni "hook-associated" protein FlgL	28,693	31,349	30,997	32,219	31,066	31,774	31,016	3,526
Flagelarni "hook-associated" protein FlgK	28,016	30,338	30,414	31,628	30,902	31,840	30,523	3,824
Protein za modifikaciju bazalnog tela FlgD	24,841	28,208	28,824	30,350	29,266	30,399	28,648	5,558
Flagelarni protein FlaG	26,669	28,226	28,608	29,836	28,362	29,424	28,521	3,167
Flagelarni protein bazalnog tela	23,260	25,782	25,413	27,150	25,913	27,403	25,820	4,144
Flagelarni rod assemb. prot./muramidaza FlgJ	22,328	22,479	25,790	25,060	24,430	24,772	24,143	3,462

*SV – slabo virulentni sojevi; JV – jako virulentni sojevi; UV – umereno virulentni sojevi

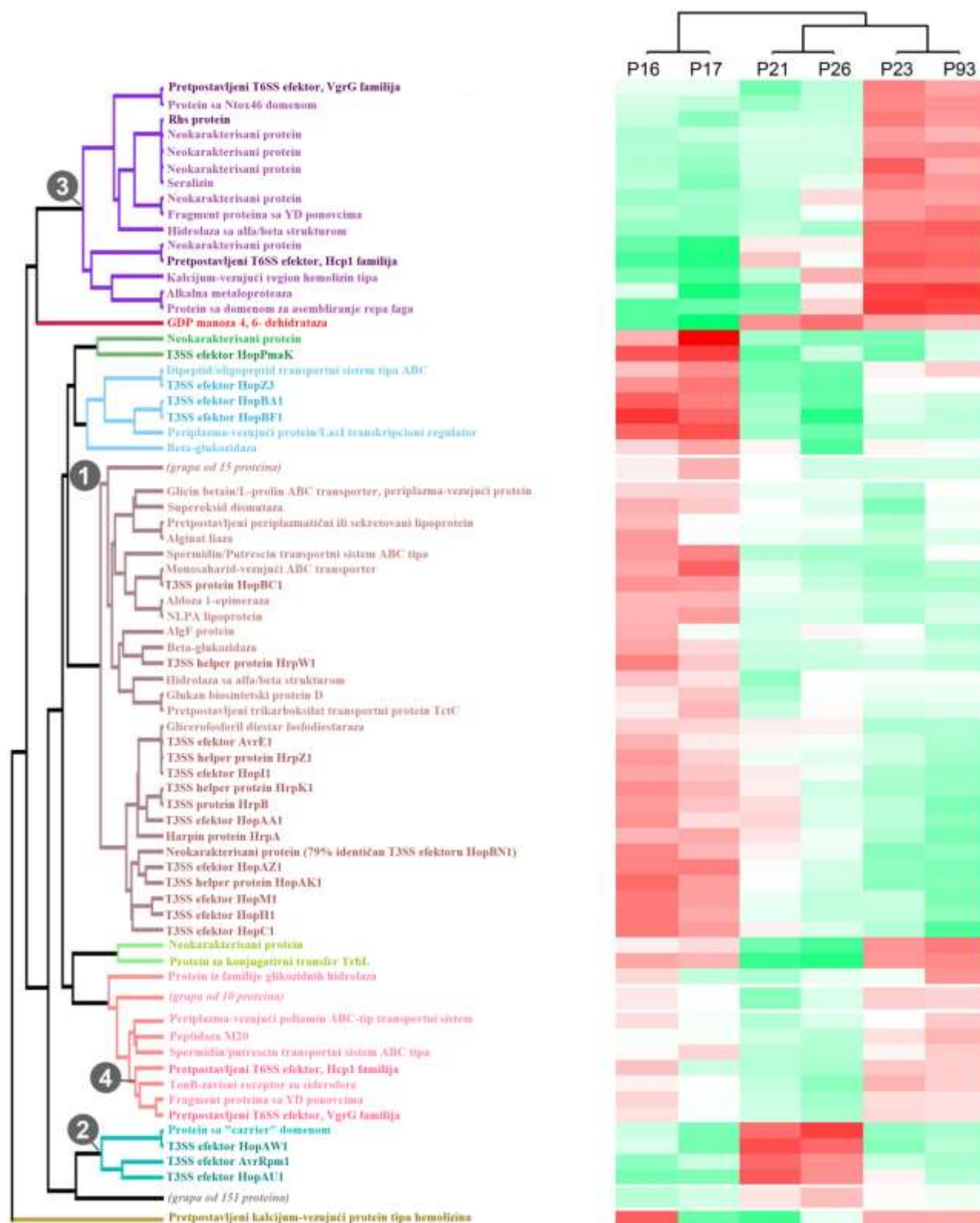
U cilju boljeg razumevanja ovih rezultata, urađena je i bioinformatička analiza T6SS gena sa poznatim genomskim sekvencama sojeva iz ovog rada. U genomu soja P21, geni T6SS su

a)



Da bismo dobili uvid u obrasce proteinske sekrecije i identifikovali potencijalne nove sekretovane proteine, sojevi i analizirani proteini su grupisani na osnovu razlika u intenzitetu sekrecije (Slika 20). Sojevi su se odvojili u tri klade: (i) slabo virulentni sojevi P16 i P17, (ii) umereno i jako virulentni sojevi P26 i P21 i (iii) umereno i jako virulentni sojevi P93 i P23. Kada je u pitanju grupisanje proteina, uočene su četiri klade. Klada 1 sadrži većinu T3SS-sekretovanih proteina. U

okviru klade 2 takođe se nalaze T3SS efektori, dok klade 3 i 4 obuhvataju T6SS sekretovane proteine sa različitim tipovima regulacije (Slika 20).



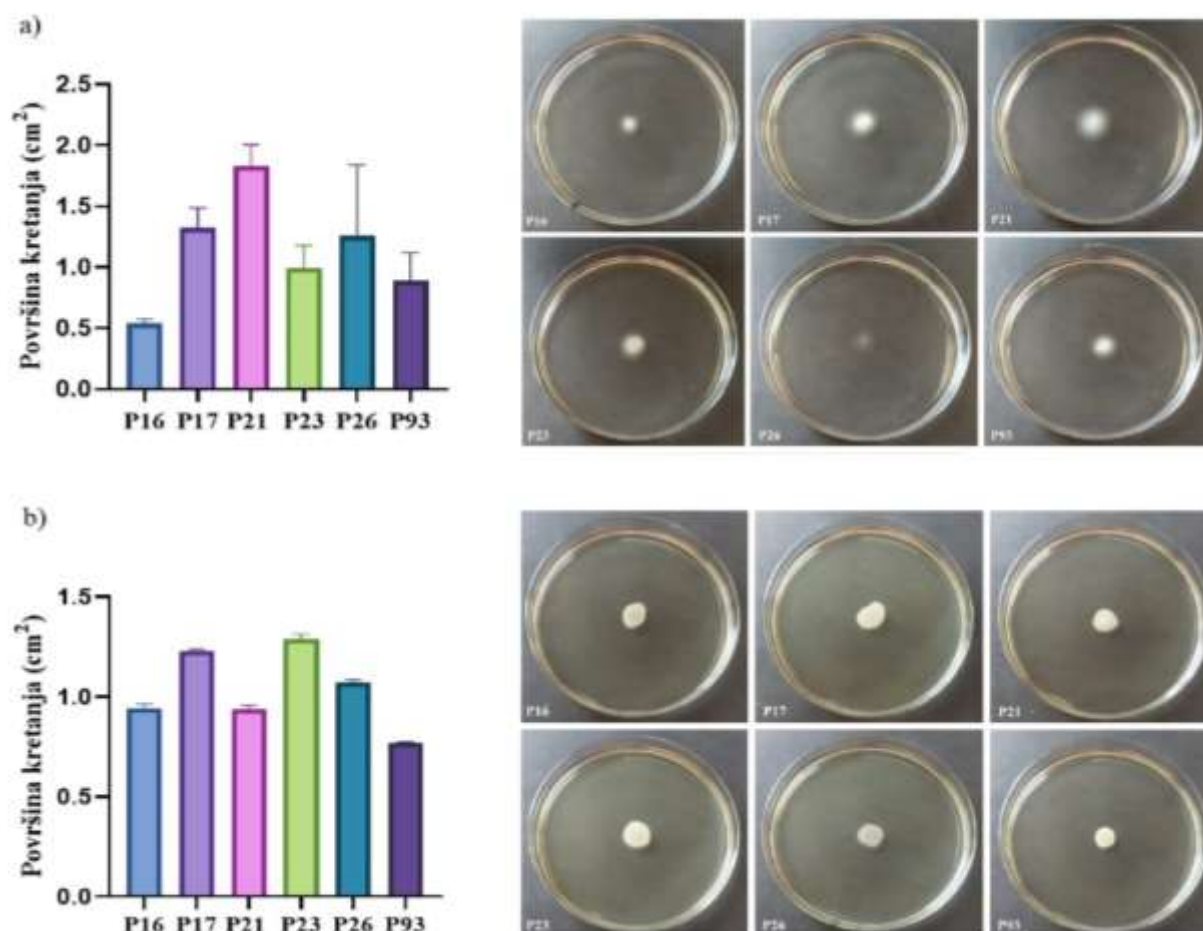
Slika 20. Grupisanje sojeva i sekretovanih proteina u supernatantu kultura, sa maksimalnim intenzitetom razlike između individualnih sojeva ($\log_2 \geq 3$). Različiti intenziteti crvene boje označavaju viši nivo sekrecije, a zelene niži (srednje vrednosti dva biološka replikata). Svaka klada označena je različitom bojom, a u okviru klada tamnijim bojama označeni su već poznati T3SS/T6SS sekretovani proteini. Preuzeto i modifikovano iz Nikolić et al. (2023).

Grupisanje proteina jasno ukazuje na korelaciju sekrecije većine T3SS sekretovanih proteina (klada 1, Slika 20) i drugog klastera T3SS efektora sa različitim intenzitetom sekrecije kod testiranih sojeva (klada 2, Slika 20), što ukazuje na razlike u regulaciji sekrecije ove dve podgrupe T3SS efektor. Na osnovu dobijenih rezultata, može se zaključiti da *P. syringae* pv. *aptata* sojevi koriste različite strategije zasnovane na sekreciji proteina, koje su korelisane sa intenzitetom patogenosti.

Slično T3SS sekretovanim proteinima, poznati efektori T6SS odvajaju se u dve klade sa različitim načinom regulacije (ljubičasta klada 3 i roze klada 4 na slici 20). U cilju identifikacije poznatih i potencijalno novih T6SS efektor. rađena je analiza čitavog proteoma (5074 proteina) korišćenjem Bastion6 softvera (Wang et al., 2018) koji prepoznaje karakteristike proteina kao što su sastav i redosled amino kiselina, sličnost i homologija sa drugim proteinima, evolucione informacije i fizičko-hemijske karakteristike. Identifikovan je 251 protein kao potencijalni T6SS efektor (score vrednost > 0,7). Među njima se nalaze proteini iz klada 3 i 4 (Slika 20). Konkretno, to su protein sa YD ponovcima (hit score 0,926), seralizin (0,757), TonB-zavisan receptor za siderofore (0,791), alkalna metaloendopeptidaza (0,757) i M10A/M12B kalcijum vezujuća peptidaza tipa hemolizin (0,742). Seralizin je kodiran sa T6SS klastera 1 (Slika 19). Svi ostali potencijalno novi T6SS efektori ne nalaze se u okviru T6SS klastera. Pored toga, u okviru soja P21 je ispitivano prisustvo proteina za imunitet koji su kodirani u blizini potencijalno novih efektor. i pronađeno je nekoliko kandidata za ove proteine. Gen *inh/omp19* kodira inhibitor alkalne proteaze i kodiran je sa istog operona kao gen za alkalnu metaloendopeptidazu. Slično tome, *smi1* gen koji kodira homologa Tdi proteina za imunitet je lociran na susednom operonu od gena koji kodira YD repeat protein. Ovi rezultati jasno ukazuju da neki od identifikovanih proteina predstavljaju T6SS efektore.

4.2.5. Pokretljivost *P. syringae* pv. *aptata* sojeva

S obzirom na detektovan veliki broj flagelarnih proteina tokom analize sekretoma šest sojeva *P. syringae* pv. *aptata* (P16, P17, P21, P23, P26 i P93), urađeni su testovi pokretljivosti plivanjem i rojenjem. Površina rasta sojeva oko mesta inokulacije kretala se od 0,50 do 1,97 cm² kada je u pitanju pokretljivost plivanjem, dok su zone rojenja iznosile od 0,76 do 1,32 cm². Najveća pokretljivost plivanjem uočena je kod izrazito virulentnog soja P21 (Slika 21a), sa prosečnom veličinom zone od 1,83 cm². Najmanja pokretljivost uočena je kod slabo virulentnog soja P16, sa prosečnom površinom od 0,54 cm². Ovaj rezultat je u saglasnosti sa analizom sekretoma, s obzirom da je kod P16 detektovan najniži nivo sekrecije flagelarnih proteina. Pokretljivost rojenjem izraženija je kod P17 i P23 (prosečne veličine zona kretanja 1,23 i 1,29 cm²). Kod sojeva P16 i P21 izmerene su približno iste površine kretanja rojenjem (Slika 21b).

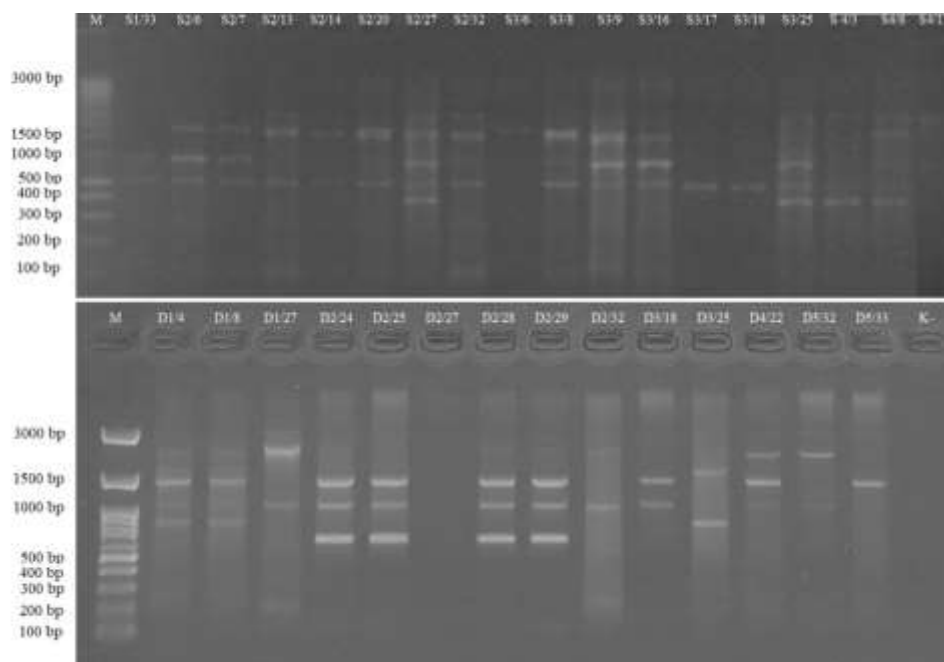


Slika 21. Grafički prikaz površine kretanja plivanjem (a) i rojenjem (b) šest sojeva *P. syringae* (levo) i prikaz kretanja na hranljivim podlogama (desno).

4.3. Ispitivanje prisustva i uloge Tip VI sekretornog sistema *P. putida* kao mehanizma za biokontrolu *P. syringae* pv. *aptata* i uticaja ovog sistema na imunski odgovor šećerne repe

4.3.1. Formiranje kolekcije *P. putida* izolata

U okviru kolekcije od 300 izolata *Pseudomonas* spp. izolovanih na KBC podlozi rađena je molekularna identifikacija *P. putida*. PCR metodom uz upotrebu repC prajmera umnožene su repetitivne ekstrageneske sekvence kod 32 izolata, što ukazuje na njihovu pripadnost vrsti *P. putida* (Slika 22). Kod pojedinačnih izolata došlo je do umnožavanja jednog do šest fragmenata veličine 100-3000 bp. Dodatno, upotrebom 27F i 1523R prajmera umnožen je gen za 16S rRNK. Umnoženi su fragmenti veličine 1500 bp. Sekvence dobijenih produkata poređene su sa sekvencama u NCBI bazi podataka i potvrđeno je da izolati pripadaju vrsti *P. putida*. Procenat identičnosti sekvenci sa poznatim *P. putida* sojevima iznosio je 98-100% (Prilog 2).

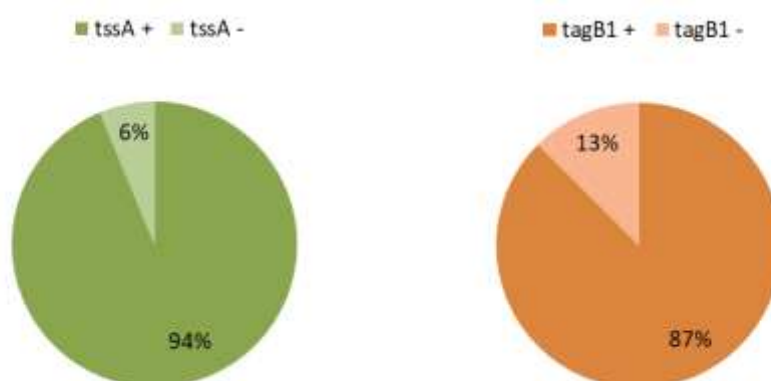


Slika 22. Umnožene repetitivne ekstragenne sekvence kod izolata *P. putida* izolovanih iz Save (gornji red) i Dunava (donji red). M - marker (100-3000 bp); K⁻ - negativna kontrola.

4.3.2. Detekcija T6SS gena u okviru kolekcije *P. putida*

Protein TssA predstavlja esencijalni strukturni protein sekretornog aparata T6SS. Detekcijom *tssA* gena ispitivano je prisustvo T6SS u okviru kolekcije *P. putida*. Dodatno, poznato je da različiti sojevi mogu posedovati veći ili manji broj genskih klastera T6SS, kao i da K1-T6SS genski klaster kod *P. putida* predstavlja najpotentniji mehanizam T6SS za biološku kontrolu biljnih patogena. Gen *tagB1* (prethodno nazivan *tagX1* gen) prisutan je isključivo kod sojeva koji imaju K1-T6SS. Da bismo ispitali potencijalno prisustvo ovog klastera u okviru kolekcije *P. putida* iz ove studije rađena je detekcija *tagB1* gena.

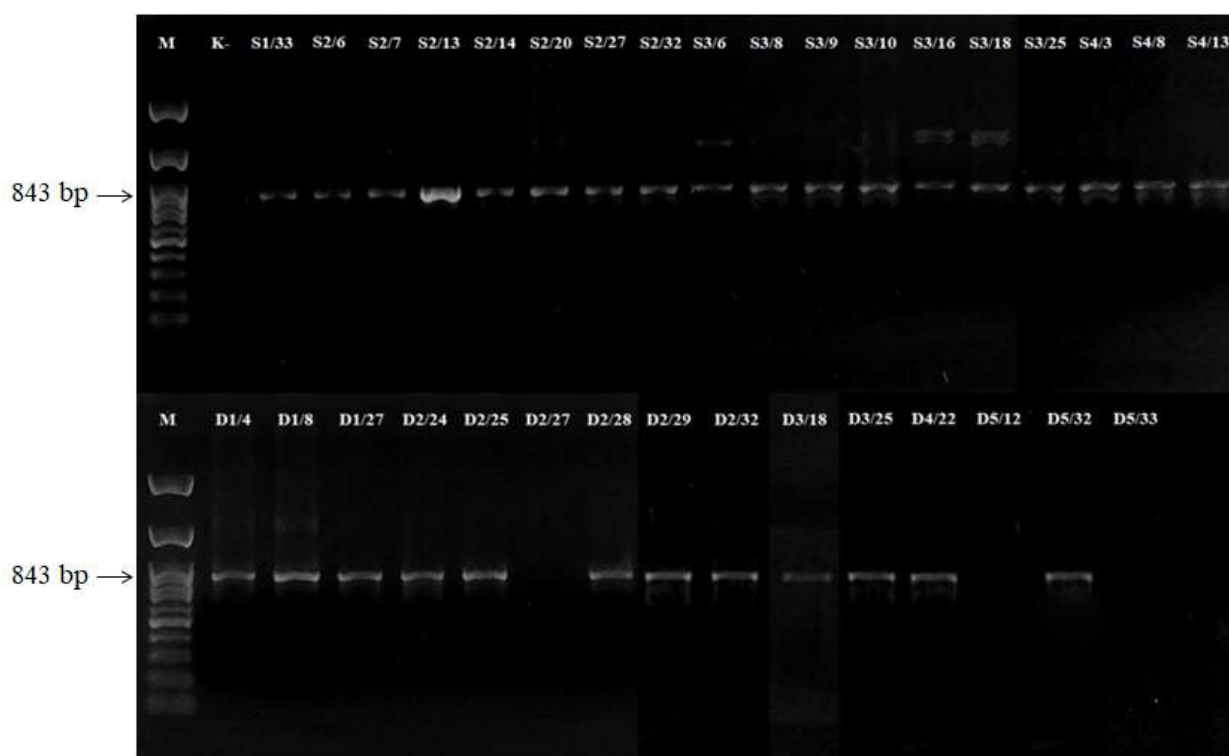
Nakon vizuelizacije umnoženih produkata na agaroznim gelovima, ustanovljeno je da većina testiranih izolata u okviru *P. putida* kolekcije poseduje *tssA* i *tagB1* gene (Slika 23).



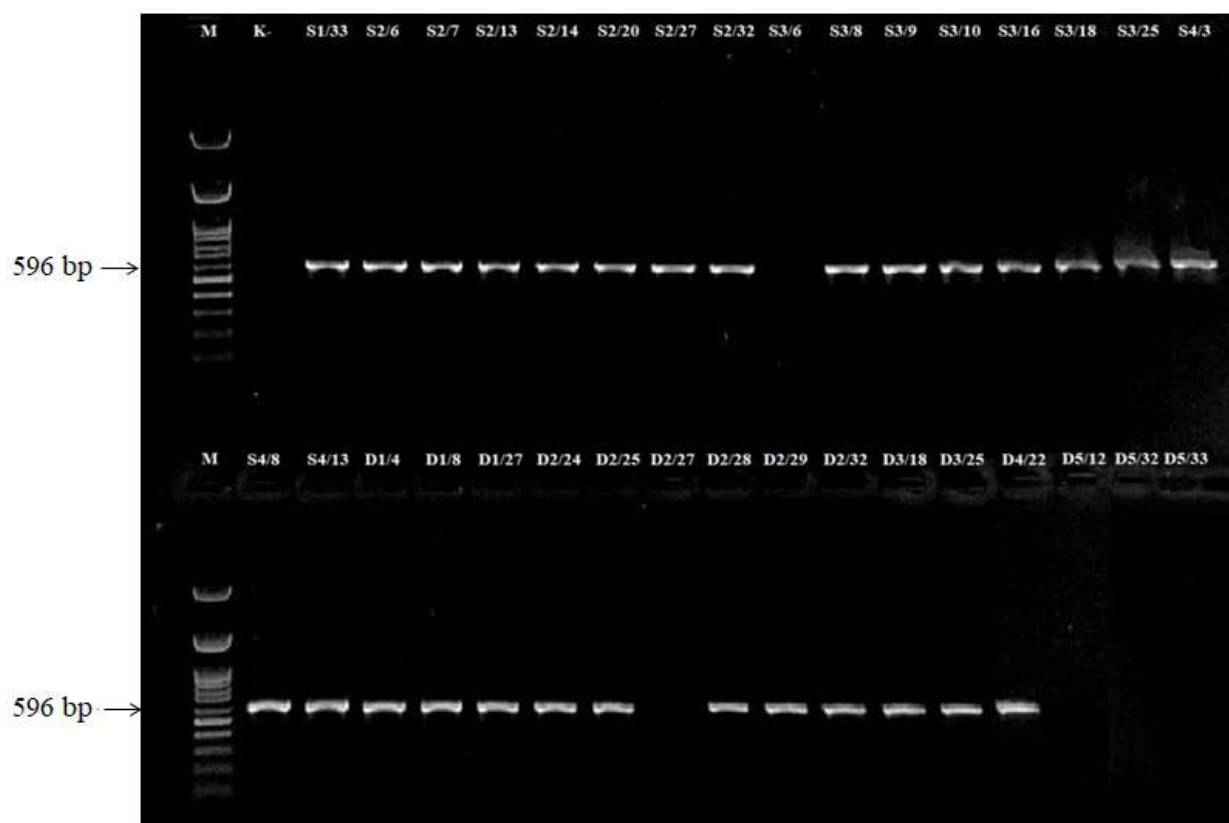
Slika 23. Procentualna zastupljenost *tssA* i *tagB1* gena u okviru kolekcije izolata *P. putida*.

Umnožavanje fragmenta *tssA* gena rađeno je korišćenjem prajmera *tssA_F* i *tssA_R*. Na analiziranim agaroznim gelovima uočeni su ampliconi veličine 843 bp. Umnoženi fragmenti koji odgovaraju regionu u okviru *tssA* gena prisutni su kod 30 od 32 izolata (Slika 24). Fragment veličine 596 bp koji odgovara *tagB1* genu umnožen je *tagX1_F* i *tagX1_R* prajmerima i detektovan je kod 28 izolata (Slika 25). Nijedan od ispitivanih gena nije detektovan samo kod izolata D2/27, D5/12 i

D5/33. Izolati S3/6 i D5/32 poseduju *tssA* gen, dok *tagB1* nije prisutan, ukazujući na prisustvo T6SS, ali odsustvo K1-genskog klastera.



Slika 24. Umnožen *tssA* gen (843 bp) u okviru kolekcije izolata *P. putida*. M-marker (100-3000 bp); K⁻ - negativna kontrola.



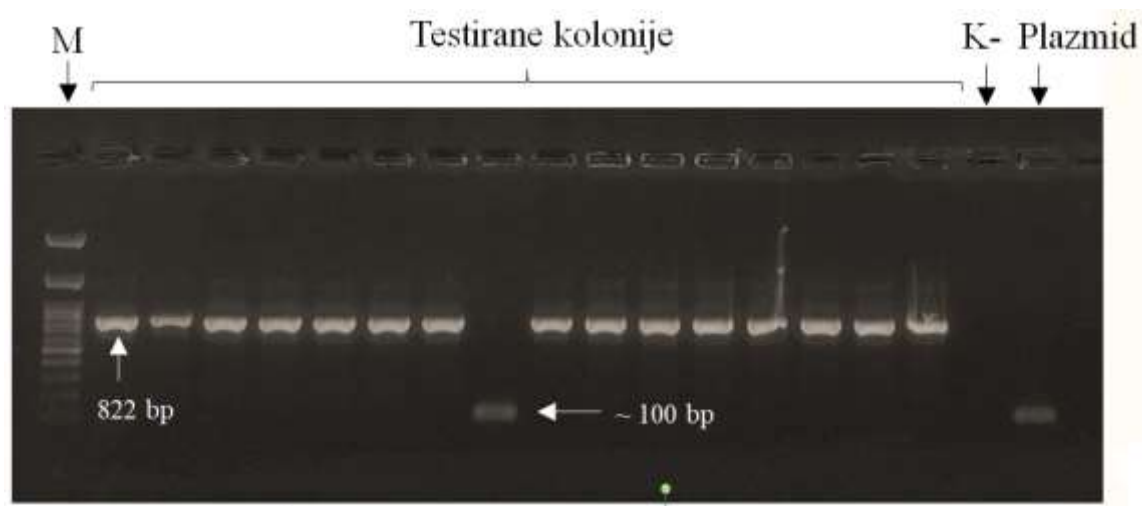
Slika 25. Umnožen *tagB1* gen (596 bp) u okviru kolekcije izolata *P. putida*. M-marker (100-3000 bp); K⁻ - negativna kontrola.

4.3.3. Konstrukcija mutanta *P. putida* sa deletiranim/inaktiviranim *tssA* genom

U cilju ispitivanja uticaja molekularnih mehanizama T6SS izolata *P. putida* S2/27 na kompetitivni i biokontrolni potencijal bila je neophodna konstrukcija mutanta T6SS. S obzirom da *tssA* gen kodira esencijalnu komponentu T6 sekretornog aparata – TssA protein, delecija/inaktivacija ovog gena sprečava formiranje sekretornog aparata i samim tim aktivnost sistema. Konstrukcija mutanta rađena je na dva načina: (I) plazmid-posredovanom metodom praćenom dvostrukom homologom rekombinacijom, koja se uprkos poznatoj efikasnosti u okviru roda *Pseudomonas*, pokazala neefikasnom kada je u pitanju *P. putida* S2/27 (II) inserciona mutagenaza, kojom je dobijen mutant ciljanog gena.

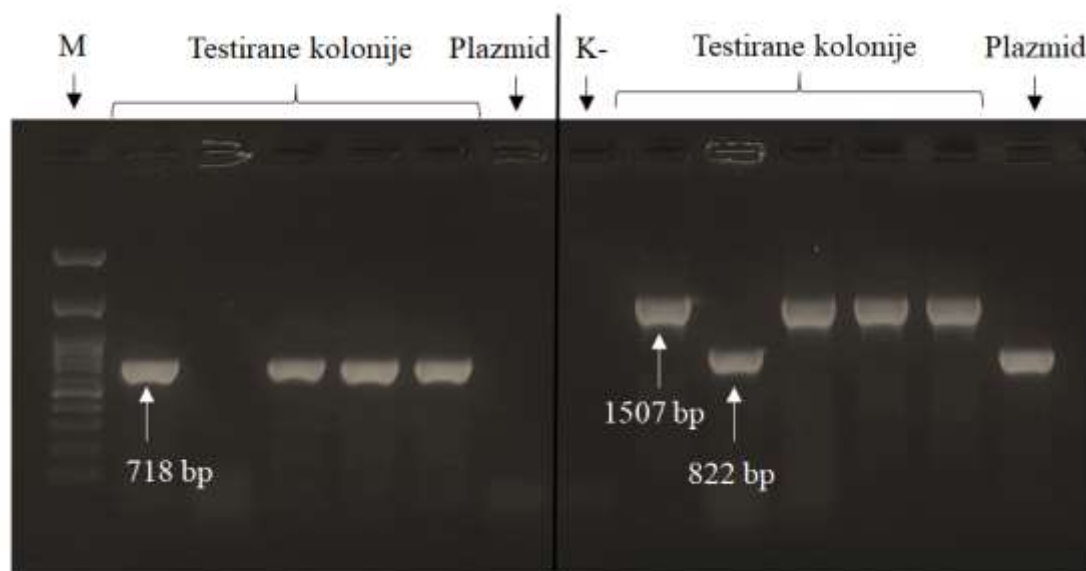
- **Plazmid-posredovana metoda praćenom dvostrukom homologom rekombinacijom**

Uzvodni region od *tssA* gena (*tssA*-UP) kloniran je u vektor pEX18Tc. Sa nastalim konstruktom rađena je transformacija u *E. coli* DH5 α . U cilju provere transformanata, PCR metodom su direktno iz kolonija umnoženi fragmenti korišćenjem M13 prajmera koji se vezuju u okviru *lacZ* gena. Kod pozitivnih kolonija umnožen je fragment veličine 822 bp, koji sadrži insert, dok je kod negativnih kolonija i kontrole (plazmida) prisutna samo traka na ~100 bp (Slika 26).



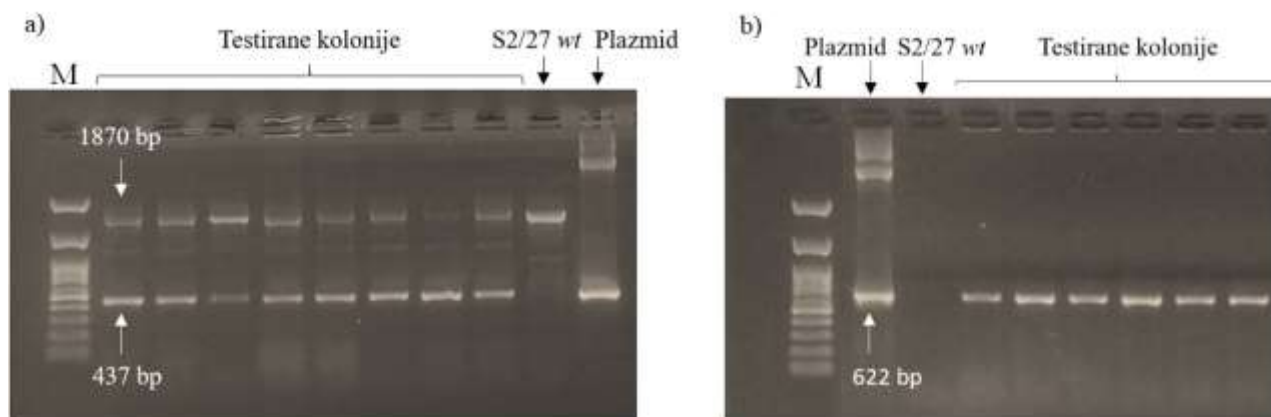
Slika 26. Amplifikovani fragmenta sa insertom *tssA*-UP. M – marker (100-3000 bp), K⁻, plazmid - negativne kontrole.

Dobijeni plazmid pEX18Tc-*tssA*-UP je izolovan iz jedne od pozitivnih kolonija i korišćen za kloniranje nizvodnog fragmenta od *tssA* (*tssA*-DOWN). Nakon kloniranja ponovo je rađena transformacija *E. coli* DH5 α , a u cilju provere transformanata urađena je PCR metoda sa IA003 i IA004 prajmerima koji umnožavaju fragment veličine 718 bp kod pozitivnih kolonija (Slika 27). Kao dodatna provera, ponovo je urađen PCR sa M13 prajmerima. Kod pozitivnih kolonija umnožen je fragment veličine 1507 bp koji sadrži uzvodni i nizvodni region od *tssA*, dok je kod negativnih kolonija umnožen fragment veličine 822 bp koji sadrži samo uzvodni region od *tssA* (Slika 27).



Slika 27. Amplifikovani fragmenti sa insertom *tssA*-DOWN (levo) i amplifikovani fragmenti koji sadrže *tssA*-UP i *tssA*-DOWN (desno). M – marker (100-3000 bp).

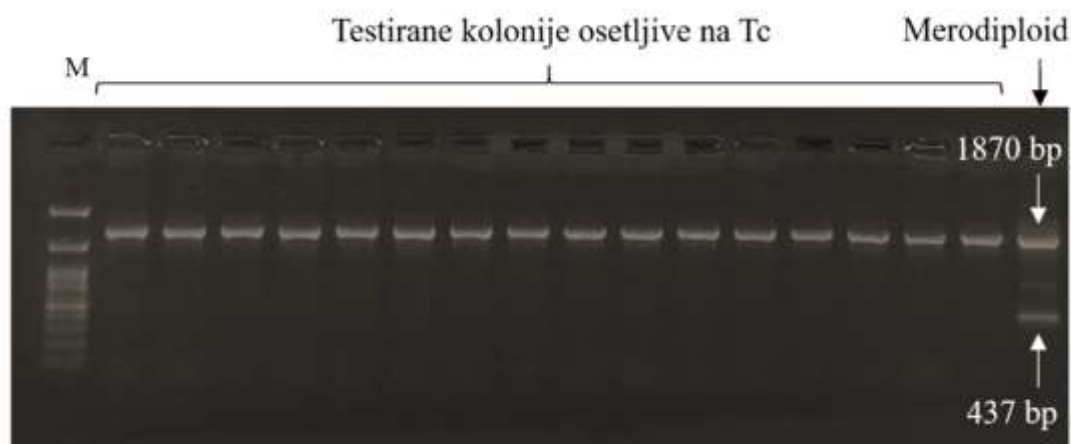
Transformacija *P. putida* S2/27 rađena je konjugacijom sa *E. coli* DH5 α koja sadrži konstruisani plazmid, a soj *E. coli* 2013 korišćen je kao „helper“. Homologom rekombinacijom došlo je do ugradnje plazmida u hromozom S2/27 i nastali su merodiploidi. PCR metodom urađena je provera merodiploida sa prajmerima IA005 i IA006. S obzirom na to da merodiploidi sadrže *tssA* gen i gen koji odgovara deletiranom lokusu, na gelu su uočene dve trake kod pozitivnih kolonija. Fragment veličine 1870 bp odgovara *tssA* genu, a fragment veličine 437 bp deletiranom lokusu (Slika 28a). Pored toga pokazano je i da merodiploidi poseduju *sacB* gen koji se nalazi na plazmidu (Slika 28b).



Slika 28. Amplifikovani fragmenti koji odgovaraju *tssA* genu i deletiranom lokusu (a) i *sacB* genu (b). M - marker (100-3000 bp).

Merodiploid je inkubiran u LB medijumu bez antibiotika kako bi došlo do drugog događaja homologe rekombinacije. Prilikom druge homologe rekombinacije dolazi do ekscizije plazmida iz hromozoma, gubljenja *sacB* gena i rezistencije na Tc. Gajenjem na podlozi sa saharozom selektovane su kolonije koje su izgubile *sacB* gen. Kolonije izrasle nakon selekcije sa saharozom prenete su na LA podlogu i LA sa dodatim Tc. Dalje je urađen PCR iz kolonija koje su izgubile rezistenciju na Tc. Postoje tri moguća ishoda nakon rekombinacije: regeneracija divljeg soja, nastanak mutanta sa deletiranim *tssA* ili veoma retko nastanak saharoza-rezistentnog merodiploida. U slučaju konstrukcije

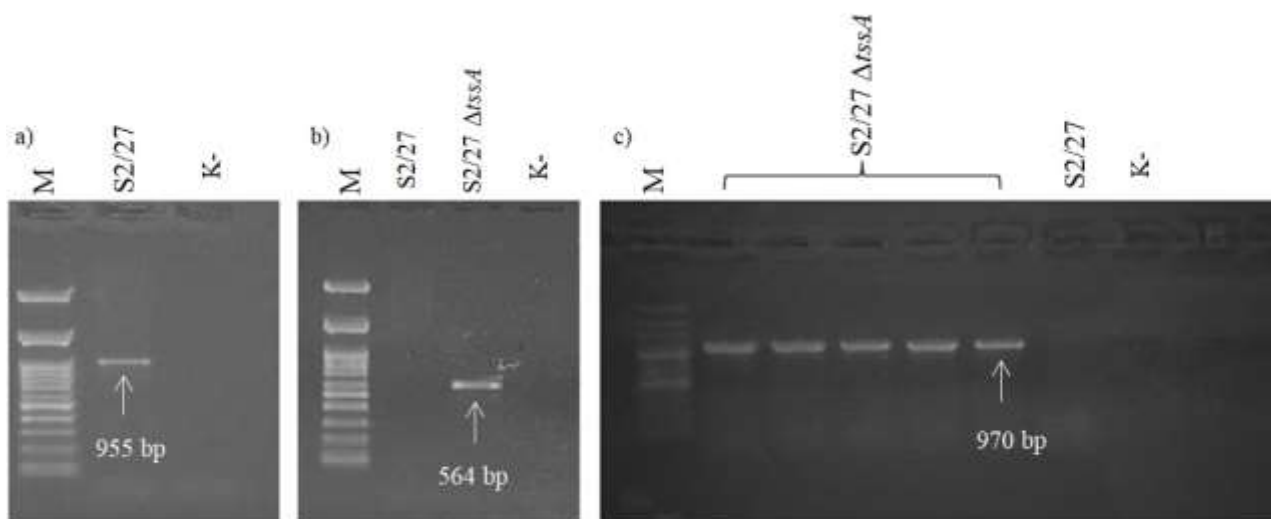
mutanta sa deletiranim *tssA* kod *P. putida* u ovoj studiji, ova metoda se nije pokazala pogodnom, jer je bez obzira na veliki broj testiranih kolonija, rezultat bio regeneracija divljeg soja (Slika 29).



Slika 29. Amplifikacija *tssA* gena kod testiranih kolonija – regeneracija divljeg tipa. M - marker (100-3000 bp).

- **Konstrukcija mutanta *P. putida* sa inaktiviranim *tssA* genom insercionom mutagenезom**

U okviru genomske DNK *P. putida* S2/27 umnožen je *tssA* gen upotrebom IA071 i IA072 prajmera i dobijen je produkt veličine 955 bp (Slika 30a). Dobijeni produkt kloniran je u pKNOCK vektor u okviru polilinker regiona kojim je transformisana *E. coli* DH5 α . Konjugacijom je plazmid transferovan iz donora *E. coli* DH5 α - pKNOCK u recipijenta S2/27, uz pomoć „helper“ soja *E. coli* 2013. Potvrđeno je da je plazmid integrisan u hromozom S2/27 umnožavanjem fragmenta od 564 bp sa prajmerima AM009 i AM010 (Slika 30b). Kao rezultat homologe rekombinacije, dobijene su dve kopije mutiranog gena koje su razdvojene insercijom pKNOCK plazmida. Mesto insercije provereno je „colony“ PCR metodom. Kod klonova mutanata umnožen je fragment veličine 970 bp (Slika 30c).



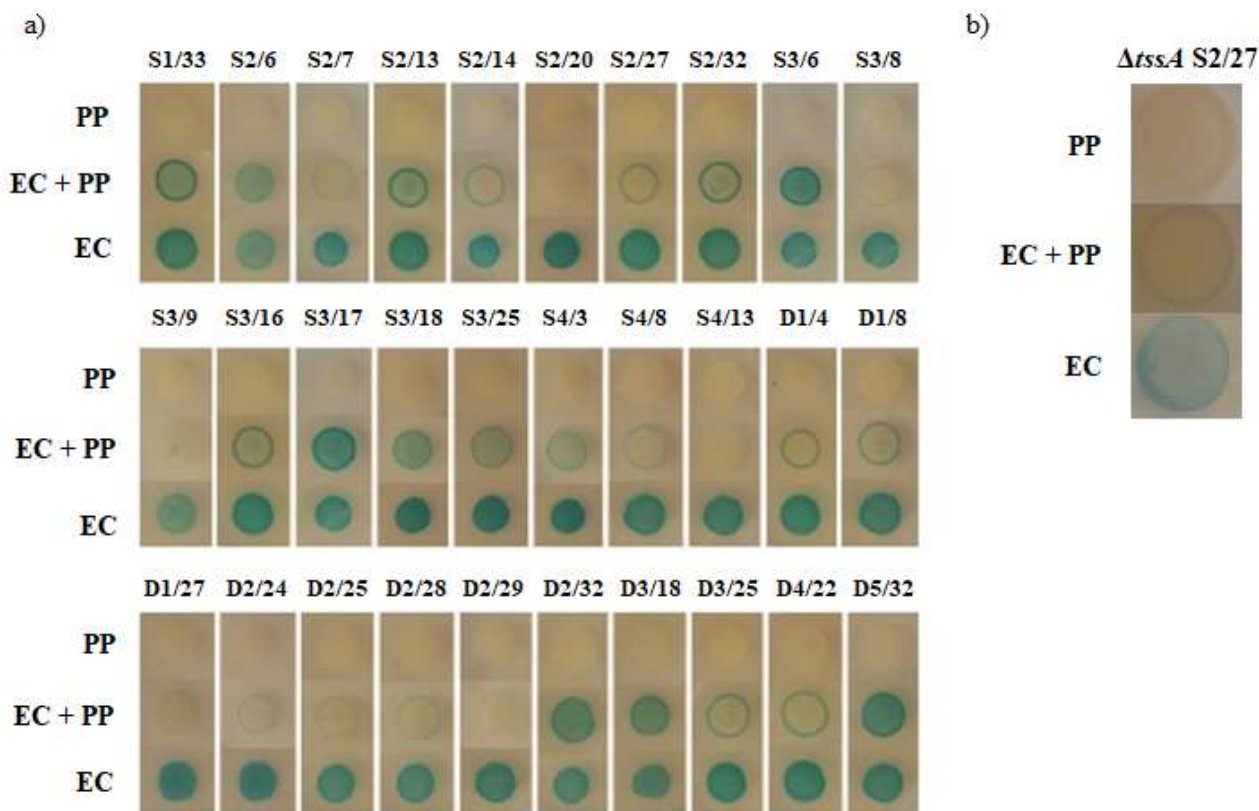
Slika 30. Amplifikacija *tssA* iz genomske DNK S2/27 (a); potvrda integracije pKNOCK u hromozom S2/27 (b) i provera mesta integracije (c). M- marker (100-3000 bp); K⁻ - negativna kontrola.

4.3.4. Razlike u kompetitivnosti *P. putida* izolata

U cilju inicijalnog ispitivanja kompetitivnog potencijala različitih izolata *P. putida* koji poseduju *tssA* gen rađen je test sa *E. coli*. Soj *E. coli* DH5 α transformisan je pGEMT Easy plazmidom koji omogućava α -komplementaciju *lacZ* gena. Zahvaljujući tome, na hranljivoj podlozi kojoj su dodati X-gal i IPTG ovaj soj formira kolonije plave boje. Na osnovu intenziteta plave boje u mešovitim kulturama *P. putida* izolata i *E. coli* DH5 α -*lacZ* može se zaključiti koja vrsta je dominantna u kulturi. Žuta boja ukazuje na dominaciju *P. putida*, dok plava boja ukazuje na dominaciju *E. coli* u mešovitoj kulturi. Na taj način je vizuelno prikazana očigledna razlika u kompetitivnosti različitih *P. putida* izolata. Rezultati pokazuju da *P. putida* dominira u 17 mešovitih kultura, dok je rast *E. coli* najizraženiji u kompeticiji sa sedam *P. putida* izolata (Slika 31a).

U najvećoj meri rast *E. coli* inhibiran je izolatima S2/7, S2/20, S2/27, S3/8, S3/9, S4/8, S4/13, D1/27, D2/24, D2/25, D2/28 i D2/29. Sa druge strane, prema ovom testu najslabiji kompetitori među *P. putida* izolatima su S2/6, S3/6, S3/17, D2/32, D3/18 i D5/32.

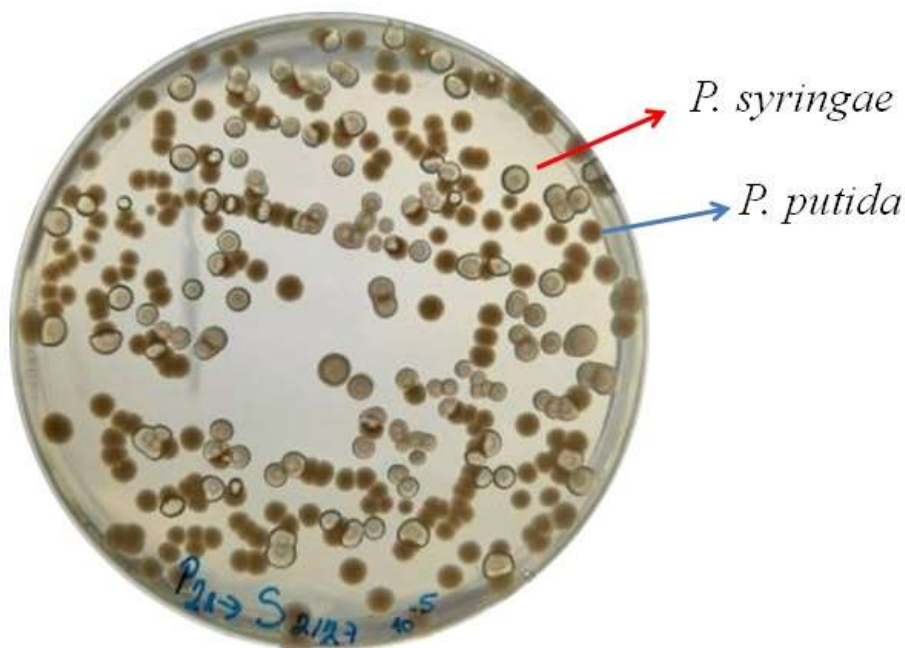
Dodatno, da bismo ispitali da li T6SS *P. putida* ima ulogu u uočenoj inhibiciji rađena je kompeticija između *P. putida* S2/27 Δ tssA i *E. coli* DH5 α -*lacZ* (Slika 31b). Nije pokazana značajna razlika u inhibiciji rasta *E. coli* na osnovu ove metode, stoga se može zaključiti da je inhibicija T6SS-nezavisna.



Slika 31. Test kompeticije između: a) *P. putida* izolata i *E. coli* DH5 α -*lacZ*; b) *P. putida* S2/27 Δ tssA i *E. coli* DH5 α -*lacZ*. PP- čista kultura *P. putida*; EC + PP – mešovita kultura *E. coli* DH5 α -*lacZ* i *P. putida*; EC – čista kultura *E. coli* DH5 α -*lacZ*.

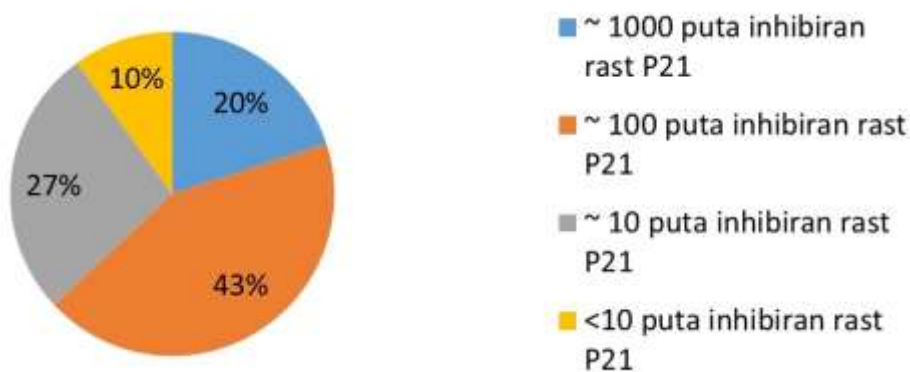
S obzirom na to da je na osnovu brzog „screening“ testa zaključeno da različiti *P. putida* izolati pokazuju različit stepen agresivnosti u kompetitivnom okruženju, ispitano je u kojoj meri različiti *P. putida* izolati mogu inhibirati rast *P. syringae* pv. *aptata* P21, patogena sa izuzetnim virulentnim potencijalom na šećernoj repi. Korišćena je NAS podloga na kojoj se jasno razlikuje

morfologija kolonija *P. syringae* i *P. putida* (Slika 32). *P. syringae* pv. *aptata* P21 na podlozi kojoj je dodata saharoza stvara levane delovanjem enzima levan-saharaze (Nikolić, 2018).



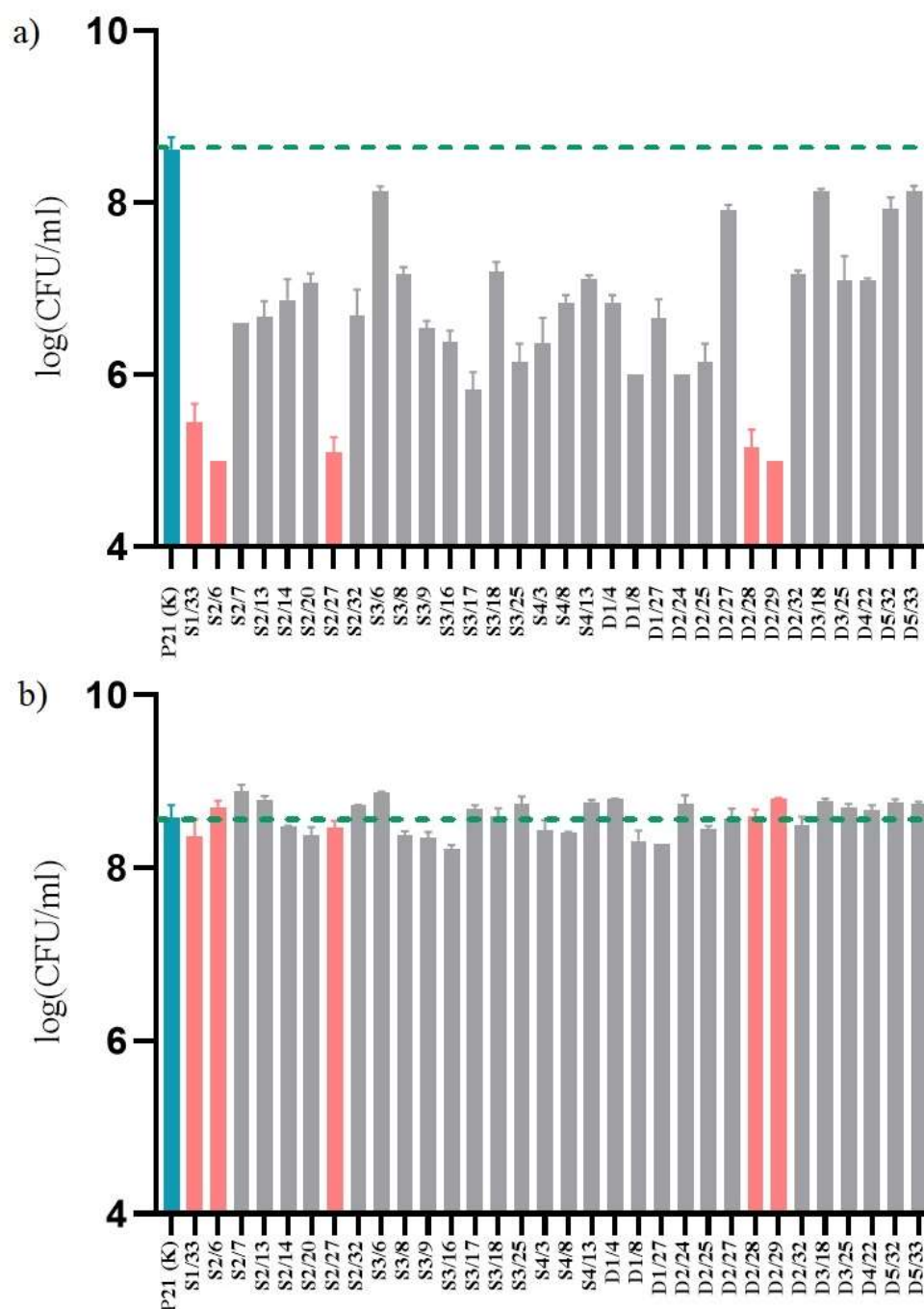
Slika 32. Različite morfologije kolonija *P. syringae* i *P. putida* na NAS podlozi

Rast P21 je kvantifikovan nakon kompeticije sa *P. putida* izolatima pri kontakt-zavisnoj i kontakt-nezavisnoj interakciji. Prilikom kontakt-zavisne kompeticije, uočen je različit stepen inhibicije u prisustvu različitih izolata *P. putida*. Najveći broj izolata (43%) inhibirao je rast P21 oko 100 puta (Slika 33).



Slika 33. Procentualna zastupljenost izolata *P. putida* sa različitim stepenom inhibicije P21.

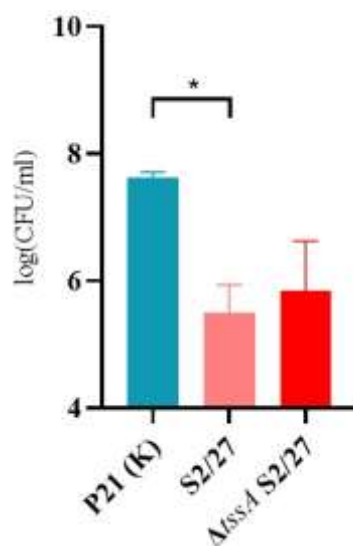
Rast P21 je u najvećoj meri (~1000 puta) inhibiran nakon gajenja u mešovitim kulturama sa izolatima S1/33, S2/6, S2/27, D2/28 i D2/29 (Slika 34a). Najslabiji kompetitori su izolati S3/6, D3/18 i D5/33. Izuzev najslabijih kompetitora, svi ostali izolati doveli su do statistički značajne inhibicije P21 u direktnom kontaktu ($p < 0,05$). Rast P21 prilikom kontakt-nezavisne interakcije sa *P. putida* sličan je rastu P21 u čistoj kulturi (Slika 34b). Do statistički značajne inhibicije rasta P21 u odsustvu kontakta dovelo je samo dva izolata (S3/16 i D1/27). Gajenjem sa 16 *P. putida* izolata bez kontakta došlo je čak do povećanog rasta P21 u odnosu na kontrolu (Slika 34b).



Slika 34. Inhibitorna aktivnost *P. putida* izolata prema *P. syringae* pv. *aptata* P21 u direktnom kontaktu između ćelija (a) i odsustvu direktnog kontakta (b). Plavi stubići označavaju kvantifikaciju rasta P21 u čistoj kulturi, a ostali stubići pokazuju rast P21 u ko-kulturi najboljim kompetitorima (roze) i ostalim *P. putida* (sivi).

Najslabiji kompetitori protiv P21 su takođe među najslabijim protiv *E. coli* DH5 α -*lacZ*, dok su S2/27, D2/28 i D2/29 takođe među najboljim kompetitorima. Međutim, nisu svi izolati pokazali sličnu kompetitivnu agresivnost protiv *E. coli* i P21. Nasuprot slaboj kompetitivnosti sa *E. coli*, izolati S1/33 i S2/6 pripadaju grupi najjačih kompetitora protiv P21 (Slika 34a). Sa druge strane, neki od najjačih kompetitora protiv *E. coli*, S2/7, S2/20, S3/8, S3/9, S4/8, S4/13, D1/27, D2/24 i D2/25, pripadaju umereno agresivnim kompetitorima protiv P21. Na osnovu toga se može zaključiti da agresivnost u kompeticiji različitih *P. putida* izolata zavisi od vrste sa kojom su u kompeticiji.

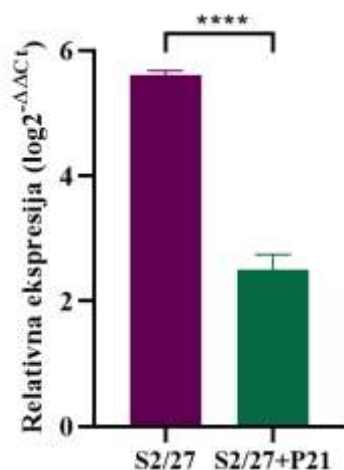
Dalje je ispitano da li T6SS ima ulogu u inhibitornoj aktivnosti jednog od najboljih kompetitora (S2/27). Rast u prisustvu S2/27 je nešto više inhibiran u poređenju sa mutantom sa inaktiviranim *tssA* genom. Međutim ova razlika nije statistički značajna (Slika 35).



Slika 35. Kvantifikacija rasta P21 nakon kompeticije u direktnom kontaktu sa S2/27 i $\Delta tssA$ S2/27. Statistička značajnost analizirana korišćenjem one-way ANOVA i primenom Tukey testa značajnosti (HSD) ($p < 0,05$).

4.3.5. Ekspresija *hcp1* gena u čistoj kulturi *P. putida* S2/27 i ko-kulturi sa *P. syringae* pv. *aptata* P21

Kako bismo ispitali da li je aktivnost T6SS *P. putida* S2/27 stimulirana prisustvom patogena P21, rađena je qPCR metoda za praćenje ekspresije *hcp1* gena koji je neophodan za aktivnost T6SS. Pokazano je da je ekspresija *hcp1* statistički značajno smanjena u ko-kulturi sa P21 u odnosu na čistu kulturu *P. putida* S2/27 (Slika 36). Na osnovu dobijenih CT Mean vrednosti može se zaključiti da su uzorci dosledni, bez značajnih varijacija.

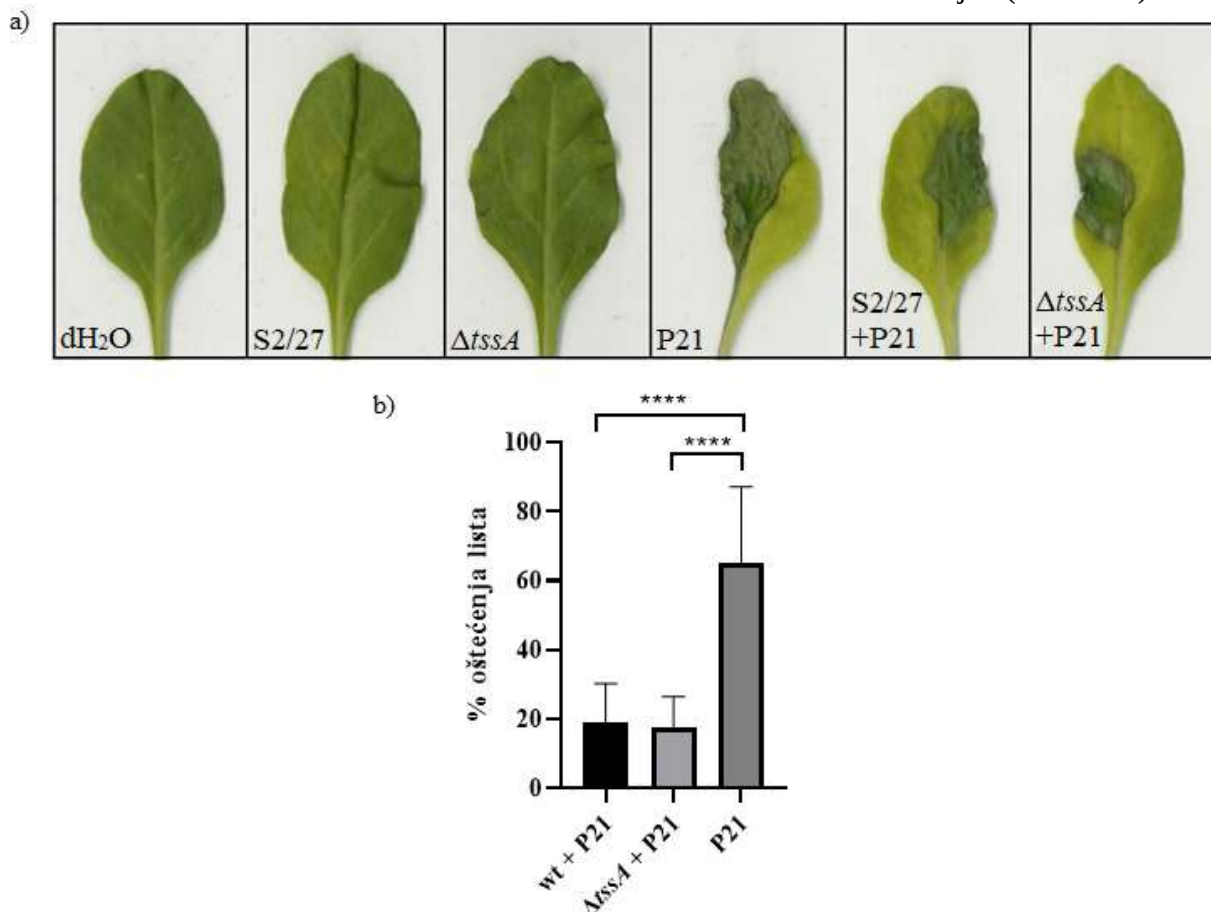


Slika 36. Relativna ekspresija *hcp1* gena u čistoj kulturi S2/27 i ko-kulturi *P. putida* S2/27 i *P. syringae* pv. *aptata* P21 u odnosu na kontrolu. Statistička značajnost procenjena je na osnovu t-testa za nezavisne uzorke ($p < 0,05$).

4.3.6. *In planta* interbakterijska kompeticija

T6SS posredovana biokontrolna aktivnost S2/27 evaluirana je na osnovu stepena oštećenja listova na šećernoj repi nakon inokulacije čistom kulturom P21 u odnosu na ko-kulture P21 i S2/27 (wt ili $\Delta tssA$). Kao negativna kontrola listovi su inokulisani sterilnom destilovanom vodom i nije uočena pojava simptoma. Takođe, simptomi su bili odsutni na svim listovima inokuliranim čistim

kulturama wt i $\Delta tssA$ S2/27 (Slika 37a). Najizraženiji simptomi bili su prisutni na listovima inficiranim čistom kulturom P21, pri čemu je procenat oštećenja lista iznosio u proseku 65,25%. Niži procenat oštećenja listova uočen je nakon ko-inokulacije sa wt S2/27 i P21 (18,89) i $\Delta tssA$ S2/27 i P21 (17,55). Rezultati ukazuju da T6SS S2/27 nema značaja za redukciju simptoma bolesti izazvane P21 sojem na šećernoj repi. S obzirom da su uočeni izraženiji simptomi prilikom ko-inokulacije sa wt sojem u odnosu na $\Delta tssA$, može se zaključiti da T6SS potencijalno ima negativan efekat na lokalni imunski odgovor biljaka. Drugi mehanizmi mogu biti zaslužni za uočen niži procenat oštećenja listova u odnosu na infekciju samim patogenom. Dobijene razlike između simptoma biljaka inficiranih čistom kulturom P21 u odnosu na ko-kulture su statistički značajne (Slika 37b).

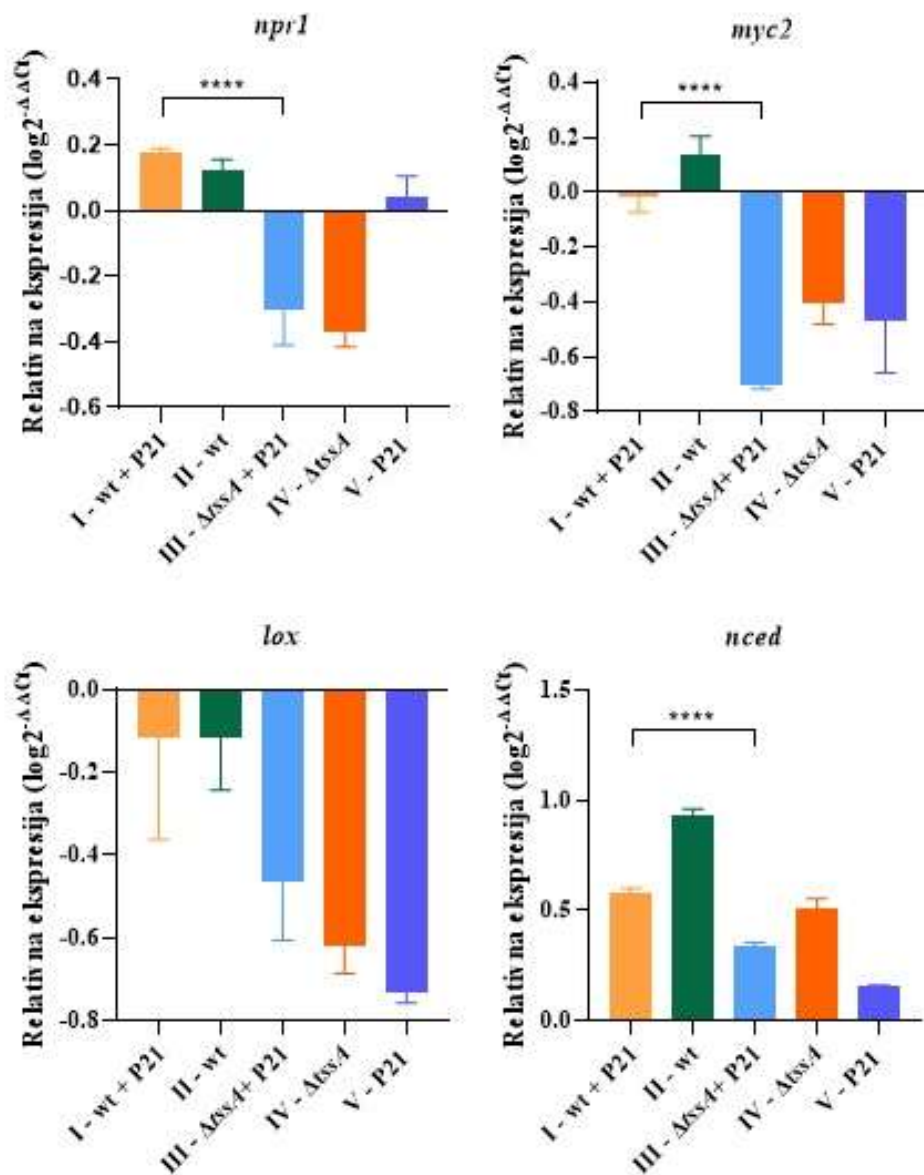


Slika 37. Praćenje simptoma na šećernoj repi nakon inokulacije odgovarajućih suspenzija (a) i grafički prikaz razlika u procentu oštećenja listova nakon inokulacije ko-kultura wt/ $\Delta tssA$ i P21 i čiste kulture P21 (b). Statistička značajnost analizirana korišćenjem jednosmerne ANOVA i primenom Tukey testa značajnosti (HSD) ($p < 0,05$).

4.3.7. Praćenje ekspresije gena uključenih u imunski odgovor šećerne repe – lokalni odgovor

U cilju provere uticaja T6SS S2/27 na lokalni imunski odgovor šećerne repe praćena je ekspresija gena uključenih u signalni put salicilne kiseline (*npr1*), jasmonične kiseline (*myc2* i *lox*) i abscisinske kiseline (*nced*). Normalizacija je izvršena u odnosu na referentni gen za 25S rRNK, a nivo ekspresije gena u okviru različitih grupa biljaka prikazan je u odnosu na nivo ekspresije kod biljaka inokulisanih sterilnom destilovanom vodom. Generalno, kod svih grupa biljaka smanjena je ekspresija *lox* gena, a povećana ekspresija *nced* gena (Slika 38). Kod biljaka inokulisanih: čistom kulturom S2/27 (I grupa); ko-kulturom S2/27 i P21 (II grupa) i čistom kulturom P21 (V grupa), najveća je ekspresija *npr1* i *nced* gena, dok je kod biljaka inokulisanih čistom kulturom S2/27 $\Delta tssA$ (III grupa) i ko-kulturom S2/27 $\Delta tssA$ i P21 (IV grupa) u većoj meri u odnosu na kontrolu ekspresiran samo *nced* gen. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da lokalna infekcija patogenom P21

u čistoj kulturi ili u ko-kulturi sa wt/ $\Delta tssA$ dovodi do smanjene ekspresije *myc2* i *lox* gena. U I grupi biljaka se uočava veća ekspresija *npr1* i *nced* gena u odnosu na III grupu. Dodatno, veća ekspresija ovih gena uočena je kod II grupe u odnosu na IV grupu. Ovi rezultati ukazuju da T6SS *P. putida* može imati uticaj na statistički značajno povećanje ekspresije *npr1* i *nced* gena. Statističke značajnosti razlike u ekspresiji gena između svih testiranih grupa prikazane su u Prilogu 3.

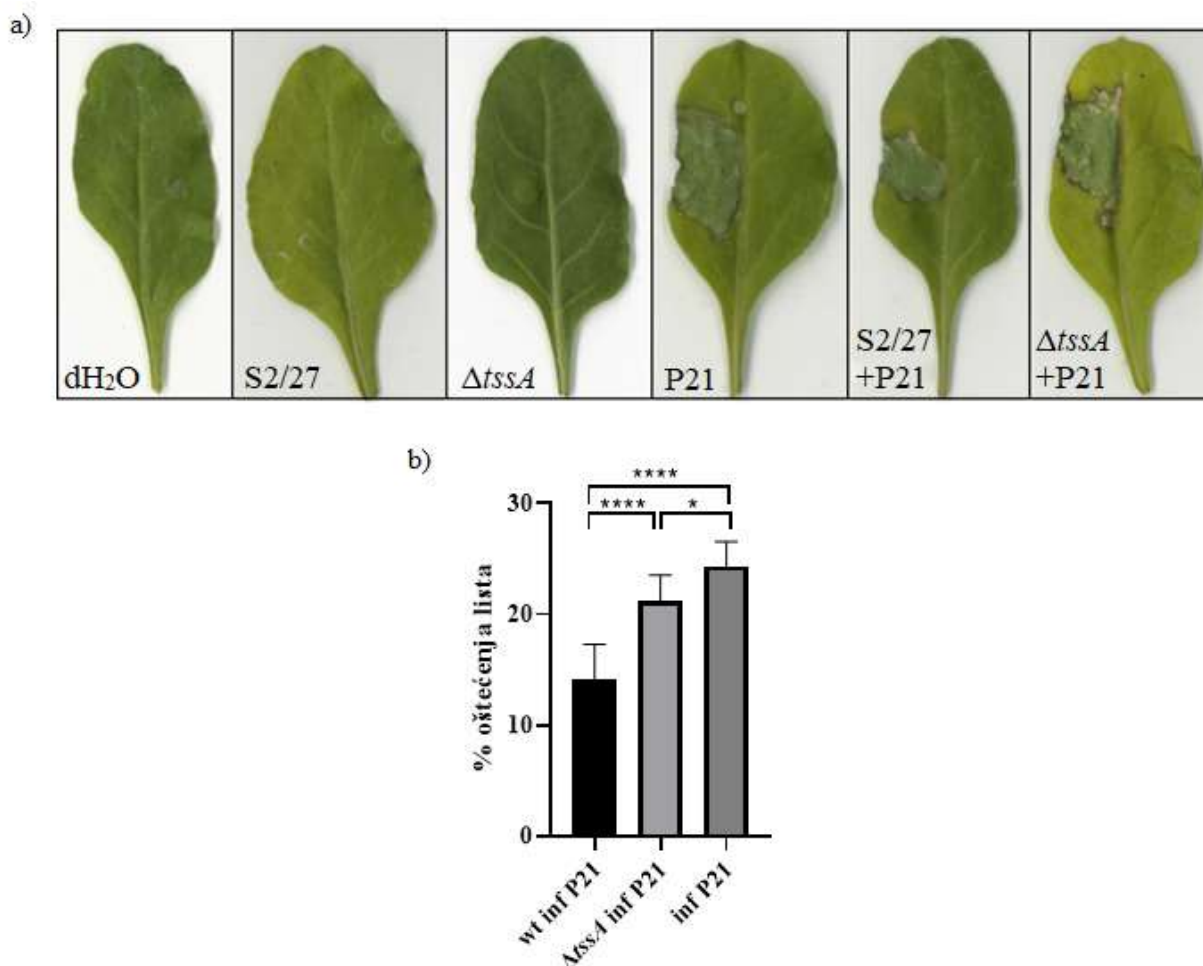


Slika 38. Relativna ekspresija *npr1*, *myc2*, *lox* i *nced* gena kod pet grupa biljaka inokuliranih sa: (I) čistom kulturom S2/27; (II) ko-kulturom S2/27 i P21; (III) čistom kulturom S2/27 $\Delta tssA$ (IV) ko-kulturom S2/27 $\Delta tssA$ i P21 i (V) čistom kulturom P21. Statistička značajnost analizirana korišćenjem jednosmerne ANOVA i primenom Tukey testa značajnosti (HSD) ($p < 0,05$).

4.3.8. Indukcija sistemske rezistencije

U cilju ispitivanja uticaja T6SS *P. putida* S2/27 na indukciju sistemske rezistencije kod šećerne repe, biljke su tretirane suspenzijama wt i $\Delta tssA$ S2/27 tokom tri nedelje i zatim inficirane patogenom *P. syringae* pv. *atata* P21. Kontrolne biljke obuhvatale su tri grupe: netretirane biljke, biljke tretirane wt sojem i biljke tretirane $\Delta tssA$ mutantom. Listovi ovih biljaka su naknadno inokulisani sterilnom destilovanom vodom. Nijedna biljka iz ove tri grupe su nakon sedam dana nije

pokazivala simptome bolesti (Slika 39a). Biljke koje su inficirane patogenom takođe su bile podeljene na tri grupe, na isti način. Sve biljke iz ovih grupa razvile su simptome (Slika 39a). Najveći procenat oštećenja listova uočen je kod netretiranih biljaka inficiranih sa P21 (24,33%). Kod biljaka tretiranih $\Delta tssA$ mutantom uočena je redukcija simptoma u manjoj meri (21,33%). Simptomi su bili skoro duplo manji kod biljaka tretiranih wt sojem pre infekcije, a procenat oštećenja lista iznosio je prosečno 14,08% (Slika 39b). Redukcija simptoma kao posledica tretiranja biljaka suspenzijama S2/27 i $\Delta tssA$ S2/27 pre infekcije sa P21 je statistički značajna.

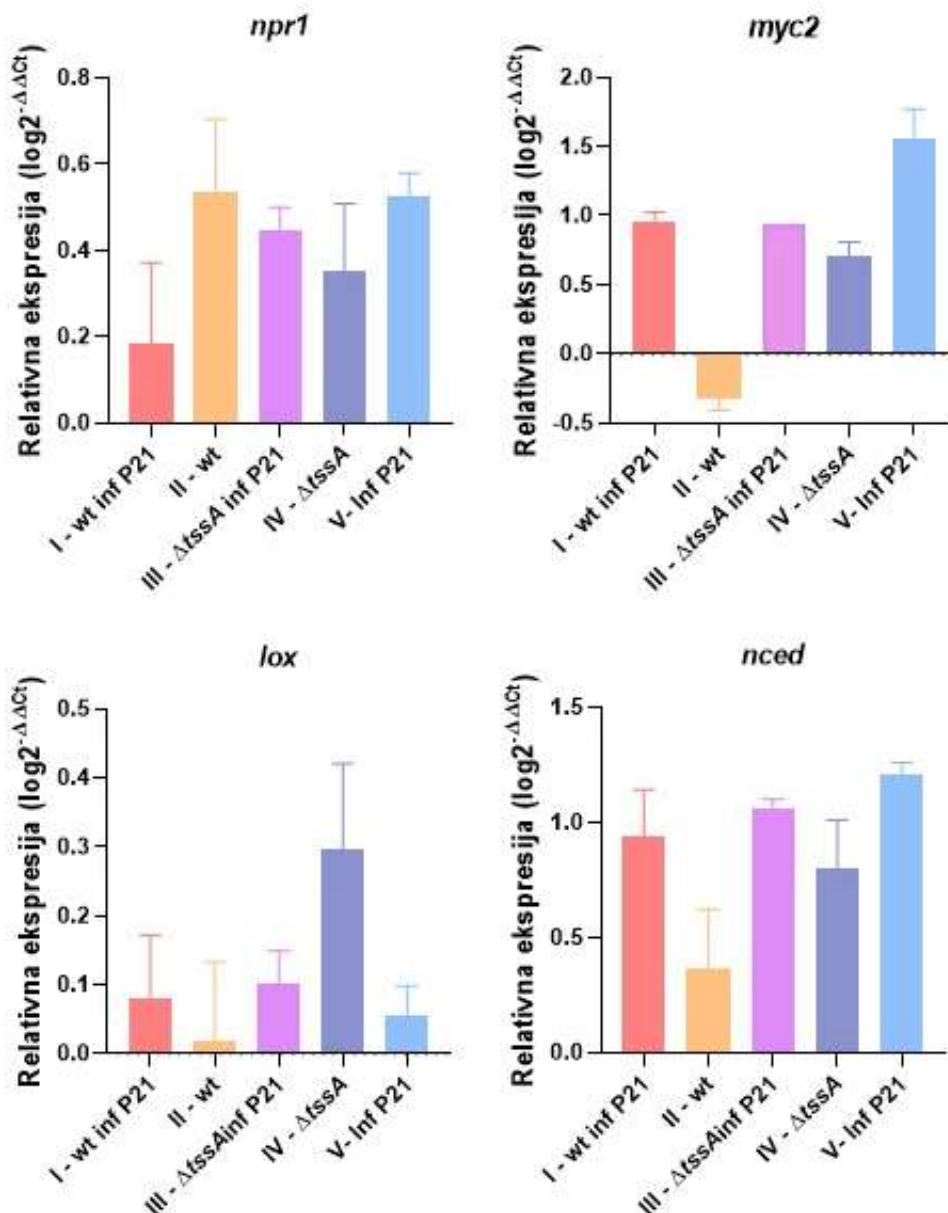


Slika 39. Praćenje simptoma na šećernoj repi nakon inokulacije odgovarajućih suspenzija (a) i grafički prikaz razlika u procentu oštećenja listova kod biljaka inficiranih sa P21 sa i bez prethodnog tretmana sa wt/ $\Delta tssA$ S2/27 (b). Statistička značajnost analizirana korišćenjem jednosmerne ANOVA i primenom Tukey testa značajnosti (HSD) ($p < 0,05$).

4.3.9. Praćenje ekspresije gena uključenih u imunski odgovor šećerne repe – sistemski odgovor

Ispitivanje uticaja T6SS S2/27 na sistemski imunski odgovor šećerne repe rađeno je praćenjem ekspresije *npr1*, *myc2*, *lox* i *nced* gena. Normalizacija je izvršena u odnosu na referentni gen za 25S rRNK, a nivo ekspresije gena u okviru različitih grupa biljaka prikazan je u odnosu na nivo ekspresije kod netretiranih biljaka koje nisu inficirane patogenom. Kod biljaka tretiranih suspenzijom wt soja S2/27 i naknadno inficiranih sa P21 (I grupa), biljka tretiranih suspenzijom mutanta $\Delta tssA$ S2/27, pa inficiranih sa P21 (III grupa) i netretiranih biljaka inficiranih sa P21 (V grupa), najveća je ekspresija *myc2* i *nced* gena (Slika 40), ukazujući da infekcija patogenom ima uticaj na indukciju ekspresije ovih gena. Nasuprot tome, kod biljaka tretiranih wt sojem S2/27 (II grupa)

ekspresija *myc2* gena smanjena je u odnosu na kontrolnu grupu. Kod biljaka tretiranih suspenzijom mutanta, pa inokuliranih vodom (grupa IV) ekspresija *lox* gena je veća u odnosu na ostale grupe. Ukoliko uporedimo biljke inficirane P21 koje su prethodno tretirane suspenzijama wt soja ili $\Delta tssA$, možemo zaključiti da T6SS ne dovodi do povećane ekspresije gena, kada je u pitanju sistemski imunski odgovor biljke. Nasuprot tome, ekspresija gena *npr1*, *lox* i *nced* je čak veća kod biljaka tretiranih $\Delta tssA$ S2/27. Ukoliko posmatramo biljke tretirane suspenzijom wt S2/27, naknadna infekcija sa P21 dovodi do povećane ekspresije svih gena izuzev *npr1*. Sa druge strane, u okviru biljaka tretiranih suspenzijom $\Delta tssA$ S2/27, infekcija sa P21 dovodi do povećane ekspresije svih gena izuzev *lox*. Statistička značajnost za razlike u ekspresiji svih gena između testiranih grupa biljaka prikazana je u Prilogu 4.



Slika 40 Relativna ekspresija *npr1*, *myc2*, *lox* i *nced* gena: (I) biljke tretirane suspenzijom wt soja S2/27 koje su naknadno inficirane sa P21; (II) biljke tretirane wt sojem S2/27, inokulirane vodom; (III) biljke tretirane suspenzijom mutanta $\Delta tssA$ S2/27 inficirane sa P21; (IV) biljke tretirane suspenzijom mutanta, pa inokulirane vodom i (V) netretirane biljke inficirane sa P21.

5. Diskusija

Prinos šećerne repe u Srbiji u 2024. godini smanjen je u odnosu na 2023. za 3,5 t/ha, uprkos većoj požnjevenoj površini za oko 5000 ha (www.stat.gov.rs). Pored samog povećanja žetvenih površina, veoma je važno ispitivanje strategija za prevenciju i suzbijanje patogenih mikroorganizama koji mogu nepovoljno uticati na prinos useva. *P. syringae* pv. *aptata* je fitopatogena bakterija sa izuzetnim virulentnim potencijalom na šećernoj repi, međutim, može inficirati i druge domaće kao što su blitva, cvekla, dinja i bundeva (Nikolić et al., 2018). Širok spektar biljnih domaćina koje ovaj patogeni varijetet može inficirati, naglašava važnost ispitivanja njegove patogenosti i mehanizama kontrole bolesti koje izaziva. Prvi slučaj bolesti lisne pegavosti na šećernoj repi izazvan ovim patogenom u Srbiji zapažen je 2013. godine, na komercijalnim zasadima u Vojvodini (Stojšin et al., 2015). Tada je bolest uočena na 25 polja sa zasadima, sa učestalošću od 0,1 do 40%. Kako bismo na najbolji način mogli da pristupimo prevenciji i kontroli eventualnih budućih epidemija, od ključnog je značaja upoznavanje epidemiologije i ekologije patogena. U tom smislu su značajne osobine patogena korisne za preživljavanje u različitim rezervoarima, kao i sposobnost širenja na druge useve. Dostupnost genomskih sekvenci patogena može u velikoj meri poboljšati brzinu i kvalitet istraživanja kontrole bolesti biljaka, s obzirom na to da omogućava analizu različitih faktora koji utiču na infekciju biljke domaćina.

U okviru roda *Pseudomonas* postoji veliki diverzitet na nivou genoma, a značajna divergencija u genima odgovornim za patogenost daje uvid u stepen virulencije i specifičnost prema biljkama domaćinima (Ramkumar et al., 2015). *P. syringae* ima globalnu metapopulaciju od oko 10^{22} ćelija, a broj različitih genetičkih linija je samo nekoliko redova veličine manji, što ukazuje na izuzetan genetički diverzitet u okviru ove vrste (Morris et al., 2019). Kada je u pitanju *P. syringae* pv. *aptata*, u prethodnim studijama koje su se bavile komparacijom individualnih sojeva sa šećerne repe iz Srbije uočen je izuzetno visok diverzitet u smislu patogenosti i opsega domaćina (Nikolić et al., 2018; Morris et al., 2019). U istim studijama, testovi patogenosti na biljkama omogućili su klasifikaciju sojeva u različite grupe u odnosu na stepen virulencije, te se mogu razlikovati slabo, umereno i izrazito virulentni sojevi. Izrazito virulentni sojevi pokazuju širok opseg domaćina izazivajući bolest na većem broju biljnih vrsta (10-16), dok slabo virulentni sojevi imaju uzak opseg domaćina i izazivaju bolest na jednoj ili nekoliko biljaka domaćina (Nikolić et al., 2018; Morris et al., 2019). Upravo zbog izuzetnog genetičkog diverziteta značajno je proučavanje faktora virulencije na nivou genoma kod različitih sojeva. Na taj način može se dobiti uvid u faktore koji u najvećoj meri utiču na manipulaciju imunskim odgovorom biljke i uspešnost u izazivanju bolesti. Iako broj slučajeva bolesti lisne pegavosti izazvane *P. syringae* pv. *aptata* raste iz godine u godinu (Stojšin et al., 2015; Rotondo et al., 2020; Nampiija et al., 2021), poznavanje faktora uključenih u interakcije između domaćina i patogena daju značajan uvid u adekvatan pristup kontroli bolesti (Sundin et al., 2016).

Do sada u literaturi nije bilo studija koje se bave detaljnom analizom genoma *P. syringae* pv. *aptata* i još uvek nema informacija koje se tiču genomskih karakteristika, epidemiologije i strategija virulencije ovog patogena. Da bismo ustanovili da li je razlika u genima za virulenciju odgovorna za prethodno pokazane razlike u virulenciji *in planta* (Nikolić et al., 2018), u ovoj studiji rađena je analiza genoma odabranih sojeva iz kolekcije izolata *P. syringae* pv. *aptata* sa šećerne repe. Korišćen je soj P16, kao slabo virulentan predstavnik sa uskim opsegom domaćina i soj P21 koji je izrazito virulentan i poseduje širok opseg domaćina. Poređenjem ova dva soja, dobijen je uvid u genetičku osnovu patogenih karakteristika *P. syringae* pv. *aptata*. Sojevi P16 i P21 poređeni su sa sto genoma *P. syringae* različitih patogenih varijeteta preuzetih iz NCBI baze podataka i veličina genoma sojeva je u skladu sa postojećim literaturnim podacima za kompleks vrsta *P. syringae* (Baltrus et al., 2017). U poređenim genomima uočen je i visok sadržaj GC parova. Sastav amino kiselina ima uticaj na prirodnu selekciju kada je u pitanju metabolička efikasnost i sinteza proteina je manje energetski zahtevna kada su aminokiseline kodirane kodonima sa visokim GC sadržajem (Du et al., 2018).

Poređeni sojevi pripadaju različitim filogenetskim grupama u okviru *P. syringae* kompleksa. Ovom studijom obuhvaćeni su predstavnici filogrupa 1, 3, 4, 7, 9, 10, 13, izolovani iz različitih

staništa, kao i prestavnici filogrupe 2 kojoj pripadaju sojevi P16 i P21 (Ranković et al., 2023). U filogrupu 2 pored *P. syringae* pv. *aptata*, spadaju i sojevi *P. syringae* pv. *papulans*, *P. syringae* pv. *syringae*, *P. syringae* pv. *aceris*, *P. syringae* pv. *solidagae*, *P. syringae* pv. *coryli*, *P. syringae* pv. *lapsa*, *P. syringae* pv. *atrofaciens* (Baltrus et al., 2017). Svrstavanje sojeva u 13 filogenetskih grupa u okviru *P. syringae* kompleksa omogućeno je studijama zasnovanim na multilokusnoj analizi sekvenci (engl. „MLSA“) nekoliko konzerviranih gena (Bull et al., 2011; Berge et al., 2014). Pored toga, podaci o genomima pojedinačnih sojeva značajni su za filogenomske studije u okviru kompleksa (Baltrus et al., 2017). U studiji Gomila et al. (2017) rađena je analiza 139 genoma *P. syringae* i uočeno je postojanje šest filogenomskih grana, pri čemu je soj *P. syringae* pv. *aptata* DSM 50252 svrstan u filogenomsku granu 1, zajedno sa sojevima *P. syringae* pv. *coryli*, *P. syringae* pv. *syringae*, *P. syringae* pv. *pisi*, *P. syringae* pv. *panici*, *P. syringae* pv. *japonica* i *P. syringae* pv. *avellanae*.

Za ispitivanje filogenomskog statusa i divergencije među blisko srodnim sojevima koristi se ANI analiza, koja se zasniva na utvrđivanju prosečne identičnosti genoma na nivou nukleotida (Jain et al., 2018; Sawada & Fujikawa, 2019). U ovoj studiji, ispitivane su sličnosti između kodirajućih regiona odabranih genoma *P. syringae* (Ranković et al., 2023). Svi predstavnici *P. syringae* pv. *aptata* pripadaju istoj kladi, izuzev soja G733. Međutim, s obzirom da pripadnici *P. syringae* kompleksa predstavljaju izuzetno heterogenu grupu, teško je strogo definisati taksonomske granice među njima. U ovom istraživanju uočeno je odsustvo jasnih granica između pripadnika prethodno ustanovljenih filogenetskih/filogenomskih grupa. Iako su taksonomske i filogenomske analize u okviru *P. syringae* kompleksa vrsta u fokusu brojnih studija, različiti pristupi deponovanja genomskih podataka mogu u određenoj meri dovesti do neslaganja među njima. Mnogi izolati su deponovani u baze podataka bez punog opisa ili podaci nisu adekvatno ažurirani u skladu sa napretkom molekularnih tehnika (Gomila et al., 2017). Ovo ukazuje na potrebu da se izvrši harmonizacija baza sa genomskim podacima, kako bi se omogućila adekvatnija identifikacija među sojevima. Takođe, sa razvijanjem molekularnih tehnika, ispravnost koncepta patogenih varijeteta se dovodi u pitanje (Gomila et al., 2017; Morris et al., 2019). Prethodno definisani patogeni varijeteti ne pokazuju značajne razlike na nivou genoma i filogenetski su vrlo bliski, tako da postoji potreba za prilagođavanjem nomenklature, što je u velikoj meri otežano zbog decenija upotrebe termina patogeni varijetet. Usklađivanje postojećih podataka sa budućim razvitkom metoda analize genoma predstavljaju inicijalne korake u kompletnom razumevanju epidemiologije i etiologije bolesti koje izaziva *P. syringae*.

Bakterijski sojevi koji pripadaju istoj vrsti u velikoj meri variraju u sadržaju gena, stoga je repertoar gena vrste značajno veći u odnosu na pojedinačni soj (Mira et al., 2010). Ta činjenica naglašava važnost analiza svih gena većeg broja genoma biljnih patogena koji pripadaju istoj vrsti. Ukoliko uporedimo sličnosti i razlike između *P. syringae* sojeva uključenih u izazivanje različitih epidemija, možemo dobiti značajne informacije za predupređivanje izbijanja novih epidemija. Napredak u bioinformatičkim metodama i upotreba genomskih podataka omogućili su i implementaciju pangenom analize kao reprezentativne discipline za izučavanje čitavog repertoara gena u genomima od interesa (Kim et al., 2020). Veći broj alata dostupan je za analizu pangenoma (Golchha et al., 2024), a u najširoj upotrebi je softver „Roary“ koji koristi podatke iz anotiranih genoma (Page et al., 2015) i korišćen je u ovom istraživanju. Treba napomenuti da postoji veći broj alata za anotiranje genoma, a od njihovog izbora može zavisiti i rezultat pangenom analize. Brzim napretkom bioinformatičkih metoda, sekvenciranje genoma postalo je pristupačnije. Na taj način su postale dostupne ogromne količine podataka, što je izuzetno značajno za razumevanje različitih osobina kod vrsta od interesa. Sa druge strane, sa razvojem sve većeg broja alata i njihove lakše dostupnosti stvara se određena konfuzija u tumačenju rezultata zbog međusobne inkompatibilnosti softvera. U tom smislu, kada se radi komparativna analiza genoma kao što je pangenom analiza, jako je važno da svi genomi budu anotirani upotrebom istog softvera.

Kao i prema ANI analizi i prema repertoaru gena soj G733 pripada odvojenoj kladi od drugih sojeva *P. syringae* pv. *aptata*, što dodatno može ukazivati na njegovu pogrešnu identifikaciju kao pripadnika ovog patogenog varijeteta. U okviru pangenoma, većina gena pripada fleksibilnom (akcesornom) delu genoma (Ranković et al., 2023). Ekstenzivan akcesorni genom ukazuje na

izuzetnu varijabilnost među analiziranim sojevima i može se povezati sa njihovom sposobnosti preživljavanja u različitim ekološkim nišama i visokom stopom horizontalnog genskog transfera u okviru *P. syringae* kompleksa vrsta (Dillon et al., 2019). Sa druge strane, komponente „core“ genoma manje su podložne horizontalnom transferu gena, što ih čini pogodnijem za ispitivanje evolucione istorije (Sarkar & Guttman, 2004). Visok procenat fleksibilnog genoma (~94%) takođe je uočen u studiji Gomila et al. (2017), u kojoj je analizirano 127 genoma. Sa druge strane analiza pangena 15 sojeva *P. syringae* pv. *actinidiae* pokazala je približno izjednačen sadržaj „core“ gena (44,54 %) i akcesornih gena (55,46 %), dok je 2416 od 9848 gena specifično za soj u okviru ovog patogenog varijeteta (Wang et al., 2024). Ove vrednosti su u korelaciji sa brojem analiziranih sojeva jer se sa povećanjem broja genoma u analizi očekuje i povećanje akcesornog dela pangena, kao i veći broj gena specifičnih za soj (Dillon et al., 2019). Tu činjenicu potvrđuje i studija koja je obuhvatila 153 genoma *P. syringae* pv. *actinidiae*, u okviru kojih su „core“ geni činili 19% (Turco et al., 2024). Dakle, genetička heterogenost u okviru kompleksa vrsta *P. syringae* ogleda se u izuzetno visokoj učestalosti akcesornih gena u okviru pangena, kao i prisustva velikog broja gena karakterističnih samo za pojedinačne sojeve, čime se naglašava značaj studija koje se bave analizom individualnih sojeva na genomskom nivou. Dodatno, treba imati u vidu i da visoke stope horizontalnog genskog transfera mogu povoljno uticati na povećanje učestalosti određenih gena koji su specifični za soj, tako da bi trebalo obratiti pažnju i na potencijalni značaj ovih gena u izazivanju budućih epidemija.

Pangenom analizom se dobija uvid u sve gene prisutne kod svih pojedinačnih ispitivanih sojeva. Konkretno, od značaja za ovo istraživanje bili su geni uključeni u kolonizaciju i virulenciju koji su poređeni među sojevima. Nakon što fitopatogeni uđu u apoplast biljke, sledeći važan korak predstavlja kolonizacija, što se postiže kroz prevazilaženje mehanizama rezistencije biljaka domaćina (Ichinose et al., 2013). Kolonizacija filofsere predstavlja značajan faktor u uspostavljanju epifitnog i endofitnog životnog ciklusa. *P. syringae* poseduje različite osobine koje doprinose adaptabilnosti u kolonizaciji filofsere. Pokretljivost (zavisna i nezavisna od flagela) predstavlja osobinu od ključnog značaja za opstanak u varirajućim uslovima sredine i interakciji sa biljkama (Panopoulos & Schroth, 1974). Od izuzetnog je značaja za pribavljanje nutrijenata, izbegavanje toksina i nepovoljnih uslova sredine, inficiranje biljke domaćina i širenje infekcije (Ichinose et al., 2013). Pokretljivost rojenjem predstavlja tip kretanja zavisan od flagela i neophodan je za kretanje po čvrstim površinama i za uspešnu kolonizaciju kod različitih patogenih varijeteta u okviru *P. syringae* kompleksa (Venieraki et al., 2016).

U ovom istraživanju je uočeno da svi testirani sojevi *P. syringae* sadrže gene uključene u pokretljivost flagelama i hemotaksiju, dok P16 i P21 poseduju i gene za pokretljivost rojenjem i pokretljivost trzajima koja ne zavisi od flagela (Ranković et al., 2023). Kolonizacija koja je posredovana kretanjem mogla bi predstavljati važan faktor koji utiče na virulenciju *P. syringae* pv. *aptata*. To je u saglasnosti sa rezultatima dobijenim u testu ispitivanja pokretljivosti sojeva P16 i P21 u kome su sojevi bili pozitivni na pokretljivost klizanjem (Morris et al., 2019). Pored toga, u ovoj studiji je pokazano da P21 pokazuje veći stepen kretanja plivanjem u odnosu na P16, što može imati efekat na različit stepen virulencije. Mutacije u genima za flagele u značajnoj meri utiču na smanjenje virulencije prema biljkama domaćinima (Ichinose et al., 2013). Ekspresija gena uključenih u pokretljivost povezana je i sa drugim faktorima virulencije i uslovima sredine. Pokazano je da *P. syringae* mutanti u *fliC* i *fliD* genima imaju smanjenu virulentnost, dok pokazuju povećanu ekspresiju *hrp* gena T3SS, na osnovu čega je zaključeno da unutarćelijski molekuli flagelina mogu delovati kao signal koji reguliše ekspresiju T3SS (Ichinose et al., 2016). Kada su u pitanju sredinski faktori, svetlost može imati uticaja na pokretljivost kod *P. syringae* pv. *syringae* B728a zahvaljujući histidin kinazi (LOV-HK), pozitivnom regulatoru u odgovoru na plavu svetlost i bakteriofitohromu (Bphp1) kao negativnom regulatoru u odgovoru na crvenu svetlost (Wu et al., 2013). Svi testirani sojevi koji pripadaju patogenom varijetetu *aptata* poseduju veći broj histidin kinaza, a P16 i P21 takođe poseduju Bphp1, što ukazuje na mogući pozitivan uticaj svetlosti na pokretljivost rojenjem kod *P. syringae* pv. *aptata*. Pored svetlosti, temperatura može takođe imati uticaj na rojenje kod B728a, koje je inhibirano na temperaturama od 28 do 30 °C (Hockett et al., 2013). Dodatno, uslovi vlažnosti mogu pogodovati određenom tipu kretanja: u uslovima visoke vlažnosti favorizovano je plivanje, dok je u uslovima

niže vlažnosti u apoplastu favorizovana pokretljivost klizanjem ili posredstvom tip IV pila (T4P) (Ichinose et al., 2013). Za asembliranje i funkcionalnost T4P neophodno je oko 40 gena koji kodiraju glavne strukturne proteine za elongaciju i retrakciju (Mattick, 2002). Svi genomi analiziranih *P. syringae* sojeva, uključujući i *P. syringae* pv. *aptata* poseduju *pil* gene za asembliranje, ekstenziju, vezivanje i retrakciju T4P i *pilT* gen koji kodira protein uključen u pokretljivost rojenjem. To ukazuje da *P. syringae* pv. *aptata* može koristiti ovaj tip pokretljivosti za uspešnu kolonizaciju staništa. U povoljnom okruženju, bakterijski pili omogućavaju adheziju i iniciraju formiranje biofilma, dok *bldA* gen ima ključnu ulogu u disperziji biofilma *P. syringae* pv. *aptata*. Pokretljivost rojenjem i T4P komponente su u korelaciji sa formiranjem biofilma. Sposobnost formiranja biofilma zahteva produkciju različitih egzopolisaharida (EPS) (Heredia-Ponce et al., 2021). U ovoj studiji geni za EPS (*acsA* i *acsC*) detektovani su u svega nekoliko *P. syringae* sojeva, međutim, nisu prisutni u P16 i P21 sojeima. Celulozni operon povećava fitnes u epifitnoj fazi *P. syringae* pv. *syringae* UMAF0158 pozitivnim uticajem na formiranje biofilma i adheziju na površinu listova, ali povećana ekspresija ovog operona utiče na smanjen stepen nekroze na listovima paradajza (Arrebola et al., 2015). Pretpostavlja se da bi celuloza mogla imati ulogu u otežavanju tranzicije između epifitne i endofitne faze *P. syringae* sojeva (Heredia-Ponce et al., 2020).

Fluorescentne pseudomonade, među kojima je i *P. syringae*, često se suočavaju sa slabom rastvorljivošću Fe^{3+} jona i potrebom za razvijanjem visoko efikasnih sistema za snabdevanje gvoždem. Kod bakterija koje promovišu rast biljaka siderofore mogu štititi biljke od patogena, dok siderofore patogenih bakterija mogu funkcionisati kao faktori virulencije, oštetiti tkiva domaćina i promovisati rast patogena (Kramer et al., 2020). U genomima P16 i P21 prisutni su geni koji kodiraju receptore za siderofore (feripioverdin, feripiohelin, ferihrom, ferienterobaktin, ferianguinibaktin, feripseudobaktin). Siderofore mogu biti od značaja u uslovima kompeticije i njihova produkcija se povećava u prisustvu drugih sojeva (Niehus et al., 2017). Na osnovu navedenog može se zaključiti da detekcija gena za siderofore u genomima P16 i P21 može ukazati na njihov potencijalni doprinos fitnesu *P. syringae* pv. *aptata* kako u polimikrobnom okruženju, tako i u interakciji sa biljkama domaćinima. Pored toga, prisustvo gena za aktivnost stvaranja čestica leda kod P16 i P21 takođe može doprinositi virulenciji ovih sojeva. Aktivnost u stvaranju čestica leda može biti značajna u epifitnoj fazi životnog ciklusa *P. syringae* zahvaljujući sposobnosti da izaziva povrede na biljkama kao posledica zamrzavanja, čime se olakšava ulazak patogena i širenje infekcije (Xin et al., 2018).

Potencijalni doprinos virulenciji analiziranih *P. syringae* genoma daje prisustvo *iaaM* gena za produkciju hormona auksina. Auksin ima važnu ulogu u biljkama jer utiče na procese ćelijske deobe, elongacije i razvoja plodova, međutim, povećana produkcija i visok nivo indol-3 sirćetne kiseline mogu povećati osetljivost na bolesti (Duca et al., 2014). Sinteza indol-3 sirćetne kiseline, dominantne forme auksina u biljkama, predstavlja još jedan mehanizam virulencije *P. syringae* (McClerklin et al., 2018). Produkcijom auksina soj DC3000 inhibira odbrambene mehanizme biljke kroz supresiju signalne mreže salicilne kiseline (Djami-Tchatchou et al., 2020). Prisustvo efektornog proteina AvrRpt2 je u korelaciji sa povećanjem produkcije indol-3 sirćetne kiseline tokom infekcije sojem DC3000 (Chen et al., 2007). U okviru ispitivanih genoma u ovoj studiji, gen za ovaj efektorni protein specifičan je samo za soj DC3000 i nije detektovan kod drugih predstavnika vrste. U analiziranim genomima u ovom radu detektovan je *gabP* gen koji kodira permeazu za gama-aminobuternu kiselinu. Biljke proizvode gama-aminobuternu kiselinu, koja je najzastupljenija aminokiselina u apoplastu u cilju reprimiranja ekspresije T3SS (Park et al., 2010). Korišćenje gama-aminobuternu kiselinu od strane GabP permeaze fitopatogena može direktno inhibirati indukciju odbrambenih mehanizama biljke u domaćinima gde efektori T3SS pokreću imunski odgovor biljke (McCraw et al., 2016).

Analizom pangenoma *P. syringae* nisu detektovani geni za fitotoksine (Ranković et al., 2023). Geni za siringolin, siringomicin i siringopeptin nisu detektovani ni u studiji koja je obuhvatala analizu pangenoma 153 *P. syringae* pv. *actinidiae* (Turco et al., 2024). Sa druge strane, na osnovu homologije gena sa *P. syringae* pv. *syringae* B728a, u genomima P16 i P21 detektovan je *syrD* gen za siringomicin i geni za siringopeptin. SyrD je transportni protein koji omogućava eksport toksina kroz citoplazmatičnu membranu *P. syringae* (Quigley et al., 1993). Zanimljivo je da postoji negativna

korelacija između repertoara efektora T3SS i sposobnosti sojeva da proizvode toksine (Baltrus et al., 2011; Hockett et al., 2014). Time se može objasniti mali broj gena za fitotoksine kod ispitivanih *P. syringae* pv. *aptata* sojeva, s obzirom na veći broj gena za efektorne proteine, pogotovo kod P21. Analizom gena za efektorne proteine identifikovan je repertoar od 78 različitih gena, među kojima je 10 bilo dominantno prisutno u ispitivanim sojevima. Danas je poznato da efektorom *P. syringae* sadrži preko 70 familija efektor, od kojih su tri (AvrE, HopM i HopAA) kodirani sa konzerviranog regiona u okviru ostrva patogenosti i prisutni su u velikom broju sojeva u okviru *P. syringae* kompleksa (Bundalovic-Torma et al., 2022). U okviru analize 494 *P. syringae* soja pokazano je da je uz pomenuta tri proteina HopB1 identifikovan u 95% sojeva, što naglašava njegovu važnost u patogenosti i osnovnim interakcijama sa biljkama (Dillon et al., 2019). Najveći repertoar efektor (39) ima *P. syringae* pv. tomato DC3000. Ovaj rezultat potvrđuje i studija koju su sproveli Wang et al. (2024), u kojoj je kod istog soja detektovano 42 gena za efekte T3SS, što je takođe najveći broj u odnosu na druge testirane sojeve. Ovaj veliki repertoar gena kodira dve grupe efektornih proteina: (I) HopM i AvrE koji utiču na povećanje količine vode u apoplastu („water soaking“); (II) AvrPto i AvrPtoB koji suprimiraju imunitet pokrenut patogenom („Pattern-triggered Immunity“ – PTI) (Wei et al., 2018). Za razliku od DC3000, P16 i P21 nemaju gene za ekspresiju druge grupe efektor, ali imaju gene za konzervirane efekte HopM i AvrE1, koji su takođe prisutni i kod drugih sojeva *P. syringae* pv. *aptata*.

P. syringae pv. *aptata* je prethodno karakterisan kao patogeni varijetet sa malim repertoarom efektor T3SS (Baltrus et al., 2011). Generalno, u okviru ovog patogenog varijeteta, u ovoj studiji detektovano je 32 različita gena za efektorne proteine kod šest sojeva izolovanih sa šećerne repe. Dva soja koja pripadaju *P. syringae* pv. *aptata* (ICMP11935 i P21) zajedno sa DC3000 spadaju u grupu sojeva sa najvećim brojem detektovanih gena za efekte, u okviru ove studije. Ranija istraživanja komparativne genomike u okviru 19 *P. syringae* patogenih varijeteta pokazala su da *P. syringae* pv. *aptata* DSM50252 ima 12 gena za sintezu efektor T3SS (Baltrus et al., 2011), dok je u ovom istraživanju kod istog soja detektovano 16 efektornih gena. Razlog ove deskrapance leži u činjenici da su korišćeni različiti alati za identifikaciju gena za efekte. Naši rezultati ukazuju na to da je predikcija T3SS efektor posredovana mašinskim učenjem efikasnija u odnosu na korišćenje algoritma tBLASTn u okviru NCBI baze.

U ovoj studiji su po prvi put u okviru *P. syringae* pv. *aptata* detektovani geni za efekte AvrRpm1, HopAW1 i HopAU1. AvrRpm1 ima ulogu u fosforilaciji RIN4 proteina i supresiji PTI i imuniteta pokrenutog efektorima (engl. „Effector-triggered immunity“ – ETI) (Geng et al., 2016). HopAW1 za sada ima nepoznatu biohemijsku funkciju, ali pripada HOPAS1 familiji značajnoj za virulenciju *P. syringae* pv. *actinidiae* i ETI kod *Arabidopsis* (McAtee et al., 2018). HopAU1 efektor kod *P. syringae* pv. *phaseolicola* uključen je u kasni stadijum infekcije i ima ulogu u modifikaciji apoplasta i obezbeđivanju povoljnih uslova za proliferaciju patogena, dok mutanti za ovaj efektor slabije rastu u biljnom apoplastu (Macho et al., 2012). Pored toga, *hopAU1* gen se konstantno eksprimira tokom rane faze infekcije, kao i neki transkripcioni regulatori uključeni u odgovor na promene životne sredine i indukciju virulentnih faktora kao što su fitotoksini i drugi T3SS efektori (Fujikawa & Sawada, 2019).

Slabo virulentni soj P16 ima manje gena za efekte u odnosu na jako virulentni P21 (Ranković et al., 2023). S obzirom da su ova dva soja u velikoj meri slična kada je u pitanju prisutnost gena za druge faktore virulencije, može se zaključiti da je upravo različit repertoar efektor u osnovi prethodno pokazanih razlika u virulenciji u eksperimentima *in planta* (Morris et al., 2019). To dodatno naglašava značaj genomskih analiza i njihov doprinos upoznavanju mehanizama patogenosti sojeva *P. syringae*. Otkrivanje novih efektor značajno daje doprinos razumevanju virulentnih karakteristika konkretnog patogena, a identifikacija gena za ove efekte predstavlja prvi važan korak u tom procesu. Pored već poznatih gena za efekte, u okviru svih analiziranih sojeva u ovoj studiji, identifikovano je 30 potencijalno novih gena za efekte, od kojih četiri kod soja P16 i tri kod soja P21. To saznanje omogućava usmeravanje budućih istraživanja koja bi se mogla baviti ispitivanjem funkcionalnosti ovih gena. Uloga pojedinačnih produkata ovih gena, kao i njihovih sinergističkih

efekata u biljnoj patologiji, mogla bi se ispitati konstrukcijom različitih mutanata i praćenjem njihovog efekta na simptome bolesti kod biljaka domaćina.

Pored kompeticije sa imunskim sistemom biljaka domaćina, fitopatogeni su u kompeticiji sa drugim mikroorganizmima. Različiti mehanizmi za snabdevanje nutrijentima koji omogućavaju snabdevanje šećerima, aminokiselinama, kao i drugim metabolitima, čine biljne patogene kompetitivnim u okviru biljnog mikrobioma (Fatima & Senthil-Kumar, 2015). Kompeticija može biti posredovana T6SS (Bernal et al., 2017), različitim sekundarnim metabolitima (Haas i Defago, 2005), kao i utišavanjem međucelijske komunikacije (engl. „Quorum Quenching“ – QQ) (Rodríguez et al., 2020). Kod P16 i P21 detektovani su geni *clpV1*, *hcpA* i *hcp1*, koji predstavljaju glavna obeležja T6SS. Prisustvo ovih gena može ukazati da kompeticija sa drugim mikroorganizmima posredovana T6SS potencijalno predstavlja jednu od strategija kojom *P. syringae* pv. *aptata* postiže uspešnu kolonizaciju, međutim, neophodno je dalje ispitati aktivnost sistema u kompetitivnim uslovima. U model sistemu *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 identifikovana su dva genska klastera (HSI-I i HSI-II), a samo HSI-II kodira funkcionalni T6SS uključen u interbakterijsku kompeticiju (Chien et al., 2020). Pored T6SS gena, detektovani su geni za AHL acilazu kod oba soja. To može ukazati na potencijalnu aktivnost u utišavanju međucelijske komunikacije između bakterija. Enzim PvdQ acilaza ima dvostruku ulogu kod fluorescentnih pseudomonada (biosintezu pioverdina i degradaciju dugih lanaca AHL), što dovodi do jake QQ aktivnosti (Koch et al., 2010).

Kako bismo preciznije ustanovili značaj prisustva različitih gena uključenih u virulenciju *P. syringae*, bilo je neophodno analizirati i njihove produkte. Stoga je sledeći korak u istraživanju podrazumevao ispitivanje repertoara sekretovanih faktora virulencije (Nikolić et al., 2023). U poslednje vreme, napredak u analizama proteoma predstavlja vrlo moćan alat za identifikaciju i kvantifikaciju proteina iz kompleksnih bioloških uzoraka i daje uvid u potencijalne mehanizme infekcije biljnim patogenima (Scumacher et al., 2014). Kvantitativna analiza proteoma u ovom istraživanju obuhvatila je pored P16 i P21 još četiri soja *P. syringae* pv. *aptata* koji se razlikuju po stepenu virulencije. Uz P16, P17 predstavlja slabo virulentan soj. P23 pripada grupi izuzetno virulentnih sojeva zajedno sa P21. Umereno virulentni sojevi su P26 i P93 (Morris et al., 2019). Prevladavajuće su analizirani proteini koji se sekretuju aktivnošću sekretornih sistema Tip III i Tip VI, kao i flagelarnih proteina zbog njihovog doprinosa virulenciji biljnih patogena (Pontes et al., 2020). U poređenju sa analizom genoma u kojoj je detektovano 16 poznatih gena za efektore kod P16 i 25 gena kod P21, analizom proteoma utvrđeno je da se 23 efektor T3SS sekretuje ekstracelularno u okviru šest ispitivanih sojeva *P. syringae* pv. *aptata*, što potvrđuje sekreciju većine efektor za koje su detektovani geni u analizi genoma. Pilusni protein HrpA sekretuje se u najvećoj meri kod svih šest sojeva, što je i očekivano jer se pilus T3SS sastoji od nekoliko stotina kopija HrpA proteina. HrpA utiče na povećanje ekspresije T3SS gena i neophodan je za aktivaciju *hrpZ* operona prilikom kontakta sa biljkom (Ortiz-Martín et al., 2010). HrpZ1 je takođe prisutan u velikoj meri kod testiranih sojeva i može biti značajan za infekciju biljaka domaćina. Mutacija u *hrpZ* genu kod *P. syringae* pv. *maculicola* dovodi do nesposobnosti infekcije biljaka *Arabidopsis thaliana* i *Brassica oleacea* (Álvarez-Mejía et al., 2015). U okviru istog operona sa *hrpZ* i *hrpA* nalazi se i *hrpB* gen (Tsunemi et al., 2011). HrpB se takođe sekretuje u okviru svih testiranih sojeva, a u nešto većoj meri kod slabije virulentnih. Ima ulogu kao pozitivni regulator ekspresije *hrp* gena, kao i gena lokalizovanih van ovog klastera (Genin et al., 1992). Među najzastupljenijim efektorima u okviru *P. syringae* pv. *aptata* su i prethodno pomenuti konzervirani proteini AvrE1 i HopM1 koji utiču na uslove vlažnosti nakon što bakterije uđu u biljni apoplast (Xin et al., 2016). Povećana vlažnost rezultuje da na listovima postoje mesta koja su izuzetno natopljena vodom, što je pokazano i u *in planta* testovima *P. syringae* pv. *aptata*, tokom rane faze bolesti (Nikolić et al., 2018; Morris et al., 2019). Time se povećava dostupnost nutrijenata za fitopatogena i olakšana je invazija tkiva, a može postojati i nepovoljan uticaj na sam odgovor biljke (Matte et al., 2024). Dodatno, u većoj meri sekretovan je i HopAA1 efektor, koji predstavlja deo minimalnog funkcionalnog seta efektor neophodnih za virulenciju *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 prema duvanu (Cunnac et al., 2011) i izaziva lokalizovanu ćelijsku smrt (Huang et al., 2024). Pored ovih efektor, u velikoj meri sekretovan je i HopBF1, koji je uključen u fosforilaciju molekularnog šaperona HSP90, koji ima ulogu u sprečavanju aktivacije imunskog

odgovora biljke što dovodi do pojave simptoma bolesti (Lopez et al., 2019). Konkretno, kod *P. syringae* pv. *tomato* DC3000, HopBF1 je uključen u aktiviranje ETI odgovora kod biljke (Lonjon et al., 2024). Pokazano je da 19 familija efektoru u okviru efektoroma *P. syringae*, izaziva ETI odgovor kod *Arabidopsis thaliana* (Laflamme et al., 2020). Kao odgovor na ovu osobinu biljaka, evoluirali su patogeni mehanizmi koji omogućavaju izbegavanje ETI odgovora, kao što su: mutacije, rekombinacije ili gubitak efektornih gena (Bundalovic-Torma et al., 2022); regulacija nivoa ekspresije konzerviranih efektoru (Laflamme et al., 2020); interakcije između efektoru, pri čemu određeni efektori suprimiraju ETI aktiviran od strane drugih efektoru (Martel et al., 2022). Slabo virulentni sojevi (P16 i P17) pokazali su znatno veću učestalost harpina. Pored toga, u poređenju sa virulentnijim sojevima, kod P16 i P17 veća je i učestalost efektoru koji eliciraju ETI (AvrE1, AvrRpm1, HopI1, HopZ3, HopAZ1, HopAA1 i HopBA1) (Laflamme et al., 2020). Postoje podaci da prekomerna ekspresija efektoru AvrE1 kod *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 dovodi do izazivanja ETI u *Arabidopsis* (Laflamme et al., 2020).

Sekrecija tri efektoru (AvrRpm1, HopAW1 i HopAU1) je detektovana po prvi put u okviru *P. syringae* pv. *aptata* (Nikolić et al., 2023), što je u saglasnosti sa rezultatima analize genoma u okviru ove studije. Navedeni efektori su detektovani kod svih *P. syringae* pv. *aptata* sojeva, ali u nešto većoj meri kod umereno virulentnog P26 i izuzetno virulentnog P21, što ukazuje na potencijalnu ulogu ovih efektoru u mehanizmima patogenosti specifičnim za soj. U poređenju sa P21 koji izaziva nekrozu na 70% površine lista širokog spektra domaćina, soj P26 umereno je virulentan na srednje širokom opsegu domaćina i izaziva nekrotična oštećenja koja obuhvataju 35% površine lista (Nikolić et al., 2018, Morris et al., 2019). U okviru ova dva soja, slaba je sekrecija efektoru koji su prepoznatljivi od strane imunskog odgovora biljke i dovode do ETI, što bi moglo ukazivati na potencijalno letalan efekat pomenuta tri efektoru na različite biljne vrste. Sa druge strane, sojevi P16 i P17 su vrlo slabo virulentni i izazivaju manje od 10% nekroze na listovima uskog opsega domaćina (P16 samo na peršunu, a P17 i na luku) (Nikolić et al., 2018; Morris et al., 2019). Analizom sekretoma pokazana je iznenađujuće visoka učestalost efektoru kod slabo virulentnih sojeva, što ukazuje da visoka učestalost efektoru može voditi do brzog odgovora biljnog imunskog sistema i posledično slabog razvoja simptoma bolesti. Tokom evolucije, biljke su razvijale različite mehanizme koji im omogućavaju prepoznavanje diverziteta T3SS efektoru. Generalno, konzervirani efektori koji su prisutni u svim *P. syringae* sojevima često predstavljaju efektore koje biljni imunitet prepoznaje. Sa druge strane, kod patogena evoluiraju mehanizmi kojima se povećava uspešnost prilikom infekcije. Ta stalna „trka u naoružanju“ između biljnih patogena i biljaka domaćina predstavlja jedan evolutivni proces u čijoj osnovi leži genetički diverzitet. Međutim, iako sam repertoar T3SS efektoru ima ulogu u velikom diverzitetu patogenosti među *P. syringae* sojevima, na ishod bolesti u znatno većoj meri utiče mehanizam sekrecije pojedinih efektoru, odnosno u kojoj meri se oni sekretuju. U tom smislu, ukoliko u velikoj meri dolazi do sekrecije konzerviranih efektoru, to može rezultirati smanjenom patogenosti zbog brzog aktiviranja ETI odgovora kod biljke. Dakle, upravo regulacija intenziteta sekrecije određenih efektoru može biti u korelaciji sa intenzitetom patogenosti različitih sojeva i predstavljati ključni izazov za odbrambene mehanizme biljaka. Takođe, postoji veza između različitih efektoru, stoga se uspešnost u izazivanju bolesti može povećati sekrecijom efektoru koji suprimiraju imunski odgovor biljke aktiviran od strane drugih efektoru (Martel et al., 2022).

Uz T3SS efektore, primećena je i značajna sekrecija komponenti T6SS sistema u supernatantima kultura gajenih u uslovima koji imitiraju uslove u apoplastu. Broj klastera T6SS varira u okviru *P. syringae* kompleksa vrsta. Kod *P. syringae* pv. *actinidiae*, *P. syringae* pv. *syringae* i *P. syringae* pv. *aesculi* prisutan je jedan klaster (Bernal et al., 2018), dok su dva klastera prisutna kod *P. syringae* pv. *tomato*, *P. syringae* pv. *oryze* i *P. syringae* pv. *tabaci* (Sarris et al., 2010). Analizom genoma P21 u ovom istraživanju pokazano je da postoje dva različita klastera koja kodiraju komponente T6SS (Nikolić et al., 2023). Hcp1 i VgrG proteini klastera 1 se u velikoj meri sekretuju kod svih sojeva, dok se se sekrecija proteina kodiranih sa drugog klastera razlikuje među sojevima. Poređenjem koregulacije sekrecije proteina u testiranim sojevima, identifikovano je nekoliko proteina koji su potencijalno novi efektori T6SS: alkalna metaloproteaza nalik seralizinu, čija je koregulacija sa T6SS proteinima prethodno detektovana u okviru *P. syringae* (Ali et al., 2022). Zatim, mnogi

bakterijski toksini i proteini uključeni u kontakt i komunikaciju između ćelija, od kojih su neki T6SS efektori, pripadaju u familiji proteina sa YD ponovcima (Koskiniemi et al., 2013). Dodatno, TonB-zavisni receptori za siderofore su medijatori u supstrat-specifičnom transportu kroz spoljašnju membranu i većinom su uključeni u snabdevanje gvožđem (Lin et al., 2017). To je i u saglasnosti sa prethodnim istraživanjima u kojima je pokazano da efektori interaguju sa TonB-zavisnim receptorima siderofora i omogućavaju aktivni transport jona metala, ukazujući na ulogu efektoru u snabdevanju različitim jonima iz ekstracelularnog okruženja (Hernandez et al., 2020). Sekretacija ovih proteina kod testiranih izolata proširuje repertoar potencijalnih efektoru u okviru *P. syringae* pv. *aptata* i uopšte kompleksa vrsta *P. syringae*.

Analizom sekretoma *P. syringae* pv. *aptata* pokazana je veza između funkcije T3SS i T6SS u uslovima koji imitiraju uslove apoplasta. To sugerise da veza između ova dva sistema može oblikovati strategije patogenosti na način koji je specifičan za soj. Sojevi P23 i P93 pokazuju intenzivnu sekretaciju T6SS proteina i slabu sekretaciju većine T3SS efektoru, što ukazuje da se u ovakvim uslovima pomenuti sojevi u većoj meri oslanjaju na aktivnost T6SS. Sa druge strane, slabo virulentni sojevi P16 i P17 sekretuju veće količine većine T3SS efektoru i manje količine T6SS proteina. Wang et al. (2021) pokazali su da mutanti *P. syringae* pv. *actinidiae* sa inaktiviranim T6SS gube patogenost *in planta*, uz smanjenu ekspresiju nekoliko T3SS gena, što takođe ukazuje na vezu između ova dva sistema. Rezultati ove studije ukazuju da korelacija između ova dva sistema doprinosi različitim strategijama infekcije *P. syringae*. Veza između T3SS i T6SS pokazana je i kod drugih biljnih patogena. Kod *Erwinia amylovora*, mutacija u genima ključnim za funkcionisanje T6SS indukuje ekspresiju jednog T3SS genskog klastera, dok smanjuje sekretaciju sa drugog klastera (Matte et al., 2024). Sa druge strane, ekspresija gena T3SS smanjena je kod T6SS mutanta *P. syringae* M228 (Wang et al., 2021). Ovi primeri ukazuju da postoje kompleksni mehanizmi ekspresije T6SS sa drugim faktorima virulencije, uključujući T3SS. Još uvek je nejasno na koji način T6SS doprinosi virulenciji biljnih patogena: kroz degradaciju ćelijskog zida ili ćelijske membrane, modifikaciju nukleinskih kiselina domaćina, menjanjem imunskog odgovora biljke, ili drugim mehanizmima (Matte et al., 2024). Daljim istraživanjima bi se moglo pokazati da li veći uticaj na patogenost ima direktna sekretacija faktora virulencije ili T6SS posredovana regulacija ekspresije T3SS efektoru (Wang et al., 2021).

Na osnovu analize sekretoma može se zaključiti da postoje tri različite strategije virulencije kod *P. syringae* sojeva patogenih na šećernoj repi: (I) visoka sekretacija većine T3SS efektoru uz slabu sekretaciju T6SS efektoru; (II) visoka sekretacija pojedinih T3SS efektoru uz slabu sekretaciju T6SS efektoru i (III) visoka sekretacija T6SS i niska sekretacija T3SS (Nikolić et al., 2023). S tim u vezi, neophodna su dalja istraživanja ispitivanja uticaja pojedinačnih efektoru kroz konstrukciju različitih mutanata sa deletiranim genima T3SS i T6SS sistema, što može doprineti razjašnjavanju mehanizama doprinosa pojedinačnih sistema patogenosti kod *P. syringae*.

Pored toga što predstavlja važan faktor virulencije za fitopatogene, T6SS je značajan i za saprofitne vrste u borbi za preživljavanje u okviru biljnog mikrobioma (Matte et al., 2024). Bolji fitness obezbeđuje se kroz ostvarivanje prednosti u T6SS-zavisnoj interbakterijskoj kompeticiji (Russell et al., 2014). Kompeticija posredovana T6SS kod *P. putida* KT2440 se u prethodnim studijama pokazala kao efikasna strategija za biološku kontrolu biljnih patogena, među kojima je i *P. syringae* (Bernal et al., 2017). Međutim, u literaturi nema podataka o T6SS posredovanoj kompeticiji između *P. putida* i *P. syringae* sojeva izolovanih iz prirode. S obzirom da izvori voda za navodnjavanje, kao što su reke, mogu predstavljati prirodne rezervoare biljnih patogena, ispitivanje uloge T6SS u biokontrolnom potencijalu *P. putida* iz ovih staništa može biti značajno u kontroli bolesti izazvanih bakterijama sa izuzetnim patogenim potencijalom, kao što je *P. syringae* pv. *aptata*.

Sojevi *P. putida* korišćeni u ovoj studiji izolovani su sa različitih lokacija iz Save i Dunava. Velika učestalost prisutnosti gena T6SS (*tssA* i *tagB1*) u okviru testiranih izolata ukazuje na široku rasprostranjenost K1 genskog klastera i T6SS uopšte, a takođe ukazuje i da izolati potencijalno mogu predstavljati dobre kompetitore. Efikasnost T6SS u kompeticiji pokazana je na više primera PGPR vrsta (Decoin et al., 2014; Bernal et al., 2017). Kompeticija između saprofitnih vrsta i fitopatogena može biti dobra strategija za biološku kontrolu biljnih patogena. Različiti izolati iz prirode mogu

pokazivati različitu agresivnost u kompeticiji. S tim u vezi, od značaja je napraviti selekciju među potencijalnim biokontrolnim kandidatima. Razlike između *P. putida* izolata su uočene na osnovu inicijalnog skrininga sa *lacZ*-kodirajućom *E. coli* DH5 α . Međutim, nije uočena značajna razlika u inhibiciji *E. coli* između wt soja S2/27 i mutanta za *tssA* gen. Na osnovu toga, može se zaključiti da *P. putida* S2/27 inhibira rast *E. coli* DH5 α nezavisno od T6SS. Agresivnosti u kompeticiji može doprinosti više faktora (Mercy et al., 2016). U istraživanju koje je obuhvatilo 122 genoma predstavnika roda *Pseudomonas* pokazano je da 91% genoma sadrži barem jedan T6SS klaster, a 51% i više od jednog, što ukazuje na značajnu ulogu ovog sistema u preživljavanju i fitnessu pseudomonada u različitim ekosistemima (Navarro-Monserrat & Taylor, 2023). U okviru *P. putida* do sada je identifikovano 66 genskih klastera T6SS, a pojedinačni sojevi imaju od nula do četiri (Bernal et al., 2017). Stoga, izostanak značajne razlike između wt i Δ *tssA* soja može biti posledica postojanja većeg broja klastera kod S2/27. Izolati koji nemaju *tagB1* gen pripadaju grupi izolata koji su bili neefikasni u kompeticiji sa *E. coli* DH5 α , što ide u prilog činjenici da klaster K1-T6SS može u velikoj meri doprineti uspešnosti u kompeticiji. Ovaj rezultat je u saglasnosti sa studijom Bernal et al. (2017) gde je testiranjem mutanata za različite gene ovog klastera utvrđeno da je kod njih narušena uspešnost u kompeticiji sa *lacZ*-kodirajućom *E. coli* DH5 α u odnosu na inicijalno kompetitivno agresivan soj *P. putida* KT2440. Dodatno, drugi mehanizmi kod *P. putida* mogu doprinosti prednosti u interbakterijskoj kompeticiji. U studiji koju su sprovedi Purtschert-Montenegro et al. (2022) pokazan je značaj T4BSS kodiranog sa retkog genetskog ostrva kod *P. putida* IsoF soja. Ovaj soj koristi T4BSS ne samo u defanzivne svrhe, već i u ofanzivne, odnosno prilikom invazije postojećih biofilмова, omogućavajući opstanak u prirodnim staništima. Pored toga, pokazana je i biokontrolna aktivnost ovog soja prema patogenu parađajza *Ralstonia solanacearum*, koja je zavisna od T4BSS.

S obzirom na to da postoji razlika u kompetitivnosti među testiranim izolatima, bilo je od značaja kvantifikovati u kojoj meri je inhibiran rast izuzetno virulentnog biljnog patogena P21 u direktnom kontaktu sa različitim izolatima *P. putida*, kao i u odsustvu direktnog kontakta. Inhibicija rasta P21 najviše je bila izražena u direktnoj kompeticiji sa *P. putida* izolatima, pozitivnim na prisustvo oba testirana T6SS gena. Među njima su izolati koji predstavljaju i najagresivnije kompetitore protiv *E. coli*. Međutim, uspešnost u kompeticiji protiv *E. coli* ne podudara se u potpunosti sa uspešnosti u kompeticiji protiv P21. To može sugerisati da ova osobina varira u odnosu na vrstu sa kojom su predstavnici *P. putida* u kompeticiji. Sa druge strane, u ovom testu izolati koji nemaju *tagB1* gen takođe pripadaju grupi najslabijih kompetitora. Time se dodatno naglašava potencijalna važnost K1 genskog klastera u ovoj interakciji. Dodatno, pokazano je da je inhibicioni efekat na P21 prvenstveno rezultat direktnog kontakta između ćelija, dok je u odsustvu direktnog kontakta rast P21 približno jednak rastu u čistoj kulturi. Kako bismo ispitali da li je je za inhibicioni efekat odgovoran T6SS, kvantifikovana je i inhibicija P21 u kokulturi sa Δ *tssA* S2/27. Uočen je sličan efekat inhibicije rasta P21 u odnosu na kokulturu sa wt sojem. Ovaj rezultat u saglasnosti je i sa ekspresijom *hcp1* gena kod S2/27. Gen *hcp1* kodira Hcp1 protein koji ulazi u građu Hcp cevčice (Bernal et al., 2017). Pored toga ima ulogu i kao efektorni protein T6SS i predstavlja indikator aktivnosti sistema (Wang et al., 2018). Da bismo ustanovili da li P21 dovodi do povećane ekspresije *hcp1* gena kod S2/27, a samim tim i povećane aktivnosti T6SS, kvantifikovana je ekspresija gena *hcp1* u čistoj kulturi S2/27 i mešovitoj kulturi S2/27 i P21. Ekspresija *hcp1* bila je smanjena u kokulturi u odnosu na čistu kulturu S2/27. Na osnovu svih dobijenih rezultata testova kompeticije u *in vitro* uslovima, može se zaključiti da T6SS nije primarni mehanizam kojim S2/27 dovodi do inhibicije P21 u direktnom kontaktu.

Pored *in vitro* testova, direktna kompeticija između P21 i S2/27 (wt i Δ *tssA*) praćena je *in planta* na listovima šećerne repe. Analizirana je uloga T6SS *P. putida* S2/27 u biološkoj kontroli P21. Prethodna istraživanja koja su sprovedi Bernal et al. (2017) pokazala su vezu između gena K1-T6SS *P. putida* KT2440 i simptoma izazvanih različitim patogenima, uključujući i *P. syringae* na listovima duvana. Pokazano je da je stepen oštećenja listova manji kod biljaka inokulisanih mešovitim kulturama KT2440 i patogena, u odnosu na ko-inokulaciju sa mutantom sa inaktiviranim T6SS (Bernal et al., 2017). U ovoj studiji uočen je različit procenat redukcije simptoma izazvanih P21 u zavisnosti od načina tretiranja šećerne repe wt ili Δ *tssA* sojem S2/27. Ukoliko se *P. putida* direktno

folijarno inokuliše sa P21 dolazi do približno trostruke redukcije simptoma na listovima. Međutim, nasuprot pomenutoj studiji Bernal et al. (2017), u ovom istraživanju uočena je blago povećana redukcija simptoma kod biljaka inokuliranih ko-kulturom $\Delta tssA$ S2/27 i P21 u odnosu na ko-inokulaciju wt S2/27 i P21. S obzirom na izuzetnu metaboličku raznovrsnost u okviru vrsta *P. putida* i *P. syringae* (Loeschcke & Thies, 2015; Baltrus et al., 2017), različit stepen virulencije u okviru *P. syringae* sojeva (Nikolić et al., 2018), kao i činjenicu da obe vrste poseduju T6SS (Sarris et al., 2010; Bernal et al., 2017), može se očekivati da agresivnost u kompeticiji *in planta* varira u zavisnosti od testiranih sojeva. Dodatno, uočena mala razlika u procentima oštećenja listova pri ko-inokulaciji P21 i wt/ $\Delta tssA$ S2/27 u saglasnosti je sa rezultatima *in vitro* testova.

Pored toga, poznato je da postoje različiti tipovi T6SS – ofanzivni i defanzivni (Basler & Mekalanos, 2012). Primer je kompeticija između *Vibrio cholerae* sa ofanzivnim i *P. aeruginosa* sa defanzivnim tipom T6SS. Tek nakon što dođe do napada od strane T6SS *V. cholerae*, *P. aeruginosa* assemblira T6SS na mestu napada i aktivacijom sistema inhibira rast kompetitora (Basler et al., 2013). Za sada u literaturi nije poznato koji tip sistema ima *P. syringae*. Rezultati ovog eksperimenta potencijalno bi mogli ukazati na defanzivni tip T6SS kod P21. U tom kontekstu, kada se u bliskom okruženju P21 nalazi kompetitor sa aktivnim T6SS – wt S2/27, moglo bi se pretpostaviti da dolazi do jače stimulacije aktivacije T6SS kod *P. syringae*. Poznato je da T6SS kod fitopatogena ima dvojaku ulogu: u interbakterijskoj kompeticiji i virulenciji (Green & Mecsas, 2016). Stoga se može zaključiti da će u određenoj meri T6SS soja P21 dovesti do inhibicije rasta wt S2/27 i širenja infekcije na listovima šećerne repe. Nasuprot tome, prilikom ko-inokulacije sa mutantom S2/27 sa inaktiviranim *tssA* genom, moglo bi doći do izostanka aktivacije T6SS kod *P. syringae* ili bi sistem mogao biti aktivan u manjoj meri ukoliko S2/27 poseduje veći broj klastera koji kodiraju gene T6SS, što je uglavnom karakteristično za *P. putida* (Bernal et al., 2017).

Pored direktne inhibicije patogena produkcijom različitih antimikrobnih toksina, biokontrolni agensi kojima pripada i *P. putida* (Sun et al., 2017), mogu imati zaštitni efekat na biljku moduliranjem njenog imunskog sistema, odnosno indukovanjem sistemske rezistencije (ISR) koja je regulisana biljnim hormonima jasmoničnom kiselinom i etilenom (Lucke et al., 2020). Postoje brojni primeri indukcije sistemske rezistencije različitim sojevima *P. putida* (Akram et al., 2008; Planchamp et al., 2015). *P. putida* KT2440 koja poseduje aktivan T6SS (Bernal et al., 2017) može indukovati sistemsku rezistenciju kod *Arabidopsis thaliana* kao odgovor na infekciju patogenom *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 (Matilla et al., 2010). Međutim, do sada u literaturi nema podataka o uticaju konkretnih T6SS gena *P. putida* u indukciji sistemske rezistencije kod biljaka. U odnosu na direktnu folijarnu inokulaciju S2/27 (wt i $\Delta tssA$) i P21, veća razlika u inhibiciji P21 uočena je kada je rizosfera biljaka prvobitno tretirana odgovarajućim suspenzijama S2/27, nakon čega su listovi inficirani sa P21. Veći efekat na smanjene simptome bolesti u ovom slučaju imao je tretman rizosfere sa wt S2/27 u odnosu na $\Delta tssA$ S2/27. Na osnovu dobijenih rezultata, može se zaključiti da soj S2/27 dovodi do indukcije sistemske rezistencije šećerne repe prema patogenu P21. Dodatno, moglo bi se pretpostaviti da T6SS potencijalno ima imunosupresivni efekat u lokalnom odgovoru biljaka, dok sistemski dovodi do stimulacije biljnog odgovora.

U cilju provere ove hipoteze, praćena je ekspresija četiri gena uključenih u imunski odgovor biljaka: (I) *npr1* gen koji je deo puta salicilne kiseline i dovodi do aktivacije PR (engl. „Pathogen Related“) proteina (Dong, 2004); (II) *myc2* gena koji se aktivira u signalnom putu jasmonične kiseline (Kazan & Manners, 2013); (III) *lox* gena koji ima ključnu ulogu u odbrambenim mehanizmima u odgovoru na različite tipove abiotičkih i biotičkih stresora (Viswanath et al., 2020) i (IV) *nced* gena uključenog u sintezu abscisinske kiseline (Priya et al., 2019). Kada je u pitanju lokalni imunski odgovor biljaka, rezultati ukazuju da mutacija u *tssA* genu T6SS dovodi do smanjene ekspresije sva četiri gena u odnosu na njihovu ekspresiju kod biljaka inokuliranih ko-kulturom wt S2/27 i P21. Stoga bi se moglo zaključiti da redukcija simptoma na listovima nije direktna posledica uticaja T6SS na ekspresiju testiranih gena. Sa druge strane, kada je u pitanju sistemski odgovor biljaka nakon tretmana rizosfere, mutacija u *tssA* genu dovela je do povećanja ekspresije svih gena izuzev *myc2*. Veći efekat na redukciju simptoma P21, može biti rezultat uspešnije kolonizacije rizosfere od strane wt soja S2/27 u odnosu na mutanta sa inaktiviranim *tssA* genom. Brojni primeri u literaturi

ukazuju na značajnu ulogu T6SS u kolonizaciji (Gupta et al., 2024). Promena u ekspresiji gena može zavisiti od vrste biljnog materijala koji je analiziran. Konkretno, kod *P. fluorescens* WCS417r koji indukuje ISR u *Arabidopsis* dolazi do promene u ekspresiji blizu 100 gena u korenu, dok nema značajne promene ekspresije u listovima (Pozo et al., 2008). S tim u vezi, buduća analiza ekspresije gena u rizosferi mogla bi dodatno rasvetliti uticaj tretmana suspenzijama *P. putida* na imunski odgovor biljaka i zaštitnu ulogu prema *P. syringae*.

Ova studija nedvosmisleno pokazuje potencijal soja *P. putida* S2/27 za biokontrolu lisne pegavosti šećerne repe izazvane *P. syringae*. S obzirom na poznati negativan uticaj hemijskih pesticida na životnu sredinu i zdravlje ljudi, od izuzetne je važnosti proučavanje biokontrolnih mehanizama kod sojeva koji bi se mogli koristiti za suzbijanje bolesti izazvanih fitopatogenima. Mehanizam koji dovodi do značajne inhibicije *P. syringae* pv. *aptata* P21 od strane *P. putida* S2/27 zasniva se u velikoj meri na direktnom kontaktu između ćelija. Međutim, potencijalno ova inhibicija može biti nezavisna od T6SS sistema. Takođe, može postojati veći broj klastera u genomu ovog soja, stoga sistem može u izvesnoj meri ostati aktivan i kod konstruisanog mutanta $\Delta tssA$ S2/27. Buduća istraživanja kojima bi se izvršila analiza genoma i sekretoma S2/27 mogla bi dati uvid u broj klastera T6SS, kao i druge potencijalne mehanizme inhibicije kojima ovaj soj može uticati na slabije širenje infekcije P21. Dodatno, analizom sekretoma može se ispitati u kojoj meri se sekretuju određeni efektorni proteini T6SS u uslovima koji imitiraju uslove u biljnom apoplastu. Izučavanjem mehanizama biološke kontrole na molekularnom nivou, mogli bi se konkretizovati adekvatni pristupi za ekološki prihvatljiv način suzbijanja bolesti izazvanih široko rasprostranjenim patogenom kao što je *P. syringae*.

6. Zaključci

Na osnovu rezultata ovog istraživanja mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Analizom opštih karakteristika 102 genoma *P. syringae* može se zaključiti da soj P21 pripada grupi sojeva sa najvećom veličinom genoma. *P. syringae* sojevi P16 i P21 imaju veći broj gena za tRNK i rRNK u odnosu na druge predstavnike *P. syringae* pv. *aptata* obuhvaćene ovom studijom.
- Na osnovu ANI analize izdvojene su tri različite klade u okviru filogrupe 2 *P. syringae* kompleksa, a sojevi P16 i P21 su svrstani u kladu 3 zajedno sa drugim sojevima *P. syringae* pv. *aptata* izolovanim sa šećerne repe
- Analizom pangenoma *P. syringae* uočena je veća zastupljenost akcesornih gena u odnosu na „core“ i „soft-core“ gene. Distribucija akcesornih gena *P. syringae* sojeva je veoma varijabilna, sa najvećim razlikama između sojeva koji pripadaju različitim filogenetskim grupama. Na osnovu „core“ gena konstruisano je stablo na kom se izdvajaju 4 klastera. P16 i P21 pripadaju istom klasteru sa drugim *P. syringae* pv. *aptata* sojevima sa šećerne repe.
- Na osnovu predikcije T3SS efektoru posredovane mašinskim učenjem identifikovan je repertoar od 78 različitih gena za T3SS u okviru 102 genoma *P. syringae*, a u okviru pojedinačnih sojeva detektovano je najčešće između 15 i 20 gena. Manji broj gena za efektore uglavnom je detektovan kod sojeva poreklom iz prirodnih izvora. Izuzetno virulentni soj P21 poseduje veći repertoar efektoru u odnosu na slabo virulentni P16.
- Geni za efektore AvrRpm1, HopAW1 i HopAU1 identifikovani u genomu P21 su po prvi put detektovani kod predstavnika *P. syringae* pv. *aptata*. Kod P21 detektovana su tri potencijalno nova kandidata za efektore: pantoenat kinaza, VapC endonukleaza i RAQPRD integrativni konjugativni protein. Kod P16 identifikovana su 4 potencijalno nova efektora: pantotenat kinaza, VapC endonukleaza, fosfolipaza i pektat liaza.
- Analizom sekretoma uočeno je da su flagelarni proteini prisutni kod svih sojeva uniformno, sa najvećim stepenom sekrecije kod umereno i jako virulentnih sojeva. Uočena je sekrecija 17 različitih T3SS proteina u sekretornim uslovima, dok su u neseekretornim detektovana samo dva. Većina T3SS efektoru su sekretovani u velikim količinama kod slabo virulentnih sojeva P16 i P17, dok su kod umereno i jako virulentnih sojeva P26, P93, P21 i P23 prisutni u manjoj meri. Kod svih testiranih sojeva sekretovani su proteini T6SS.
- Na osnovu analize sekretoma može se zaključiti da postoje tri različite strategije virulencije kod *P. syringae* sojeva patogenih na šećernoj repi: (I) visoka sekrecija većine T3SS efektoru uz slabu sekreciju T6SS efektoru; (II) visoka sekrecija pojedinih T3SS efektoru uz slabu sekreciju T6SS efektoru i (III) visoka sekrecija T6SS i niska sekrecija T3SS.
- Prisustvo gena *tagB1* i *tssA* kod većine izolata *P. putida* ukazuje na široku rasprostranjenost K1 genskog klastera i T6SS uopšte.
- U inicijalnom skriningu kompetitivnosti *P. putida* sa *lacZ*-kodirajućom *E. coli* DH5α pokazano je da postoji razlika u agresivnosti u kompeticiji između različitih izolata. Više od polovine testiranih izolata dominirali su u mešovitoj kulturi sa *E. coli*. Među slabijim kompetitorima su izolati kod kojih nije prisutan *tagB1* gen. Mutacija u *tssA* genu T6SS *P. putida* S2/27 ne dovodi do značajnih razlika u inhibiciji *E. coli*.

- Kvantifikacijom rasta P21 nakon gajenja sa *P. putida* u direktnom kontaktu ili u odsustvu direktnog kontakta može se zaključiti da postoji razlika u kompetitivnosti različitih izolata i da je direktan kontakt neophodan za inhibitornu aktivnost *P. putida*. Mutacija u *tssA* genu T6SS *P. putida* S2/27 ne dovodi do značajnih razlika u inhibiciji P21. Drugi mehanizmi mogu u većoj meri doprinositi inhibitornoj aktivnosti *P. putida*.
- *P. putida* utiče na redukciju simptoma bolesti izazvanih P21 *in planta* nakon direktne folijarne inokulacije ili tretiranjem rizosfere, verovatno mehanizmima nezavisnim od T6SS.
- Lokalna infekcija patogenom P21 u čistoj kulturi ili u ko-kulturi sa wt/ Δ *tssA* dovodi do smanjene ekspresije *myc2* i *lox* gena, a T6SS može imati uticaj na povećanje ekspresije *npr1* i *nced* gena. Kada je u pitanju sistemski odgovor biljke, T6SS ne dovodi do povećane ekspresije pomenutih gena.

7. Literatura

- Akram, A., Ongena, M., Duby, F., Dommès, J., & Thonart, P. (2008). Systemic resistance and lipoxygenase-related defence response induced in tomato by *Pseudomonas putida* strain BTP1. *BMC Plant Biology*, 8, 1-12.
- Alcoforado Diniz, J., Liu, Y. C., & Coulthurst, S. J. (2015). Molecular weaponry: diverse effectors delivered by the Type VI secretion system. *Cellular Microbiology*, 17(12), 1742-1751.
- Alexeyev, M. F. (1999). The pKNOCK series of broad-host-range mobilizable suicide vectors for gene knockout and targeted DNA insertion into the chromosome of gram-negative bacteria. *Biotechniques*, 26(5), 824-828.
- Ali, M., Gu, T., Yu, X., Bashir, A., Wang, Z., Sun, X., Ashraf, N. M., & Li, L. (2022). Identification of the genes of the plant pathogen *Pseudomonas syringae* MB03 required for the nematocidal activity against *Caenorhabditis elegans* through an integrated approach. *Frontiers in Microbiology*, 13, 826962.
- Allsopp, L. P., & Bernal, P. (2023). Killing in the name of: T6SS structure and effector diversity. *Microbiology*, 169(7), 001367.
- Álvarez-Mejía, C., Rodríguez-Ríos, D., Hernández-Guzmán, G., López-Ramírez, V., Valenzuela-Soto, H., & Marsch, R. (2015). Characterization of the *hrpZ* gene from *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* M2. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46, 929-936.
- Ampntelnour, L., Poulaki, E. G., Dimitrakas, V., Mavrommati, M., Amourgis, G. G., & Tjamos, S. E. (2024). Enhancing Botrytis disease management in tomato plants: insights from a *Pseudomonas putida* strain with biocontrol activity. *Journal of Applied Microbiology*, 135(4), lxae094.
- Anzai, Y., Kudo, Y., & Oyaizu, H. (1997). The phylogeny of the genera *Chryseomonas*, *Flavimonas*, and *Pseudomonas* supports synonymy of these three genera. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47(2), 249-251.
- Aoki, S. K., Poole, S. J., Hayes, C. S., & Low, D. A. (2011). Toxin on a stick: modular CDI toxin delivery systems play roles in bacterial competition. *Virulence*, 2(4), 356-359.
- Aranda-Olmedo, I., Tobes, R., Manzanera, M., Ramos, J. L., & Marqués, S. (2002). Species-specific repetitive extragenic palindromic (REP) sequences in *Pseudomonas putida*. *Nucleic Acids Research*, 30(8), 1826-1833.
- Arrebola, E., Cazorla, F. M., Codina, J. C., Gutiérrez-Barranquero, J. A., Pérez-García, A., & de Vicente, A. (2009). Contribution of mangotoxin to the virulence and epiphytic fitness of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *International Microbiology*, 12(2), 87.
- Arrebola, E., Cazorla, F. M., Perez-García, A., & de Vicente, A. (2011). Chemical and metabolic aspects of antimetabolite toxins produced by *Pseudomonas syringae* pathovars. *Toxins*, 3(9), 1089-1110.

- Arrebola, E., Carrión, V. J., Gutierrez-Barranquero, J. A., Pérez-García, A., Rodríguez-Palenzuela, P., Cazorla, F. M., & de Vicente, A. (2015). Cellulose production in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*: a compromise between epiphytic and pathogenic lifestyles. *FEMS Microbiology Ecology*, 91(7), fiv071.
- Arnold, D. L., & Preston, G. M. (2019). *Pseudomonas syringae*: Enterprising epiphyte and stealthy parasite. *Microbiology*, 165(3), 251-253.
- Backer, R., Naidoo, S., & Van den Berg, N. (2019). The nonexpressor of pathogenesis-related genes 1 (*npr1*) and related family: mechanistic insights in plant disease resistance. *Frontiers in Plant Science*, 10, 102.
- Bakker, P. A., Pieterse, C. M., & Van Loon, L. C. (2007). Induced systemic resistance by fluorescent *Pseudomonas* spp. *Phytopathology*, 97(2), 239-243.
- Baltrus, D. A., Nishimura, M. T., Romanchuk, A., Chang, J. H., Mukhtar, M. S., Cherkis, K., Roach, J., Grant, S. R., Jones, C. D., & Dangl, J. L. (2011). Dynamic evolution of pathogenicity revealed by sequencing and comparative genomics of 19 *Pseudomonas syringae* isolates. *PLoS pathogens*, 7(7), e1002132.
- Baltrus, D. A., McCann, H. C., & Guttman, D. S. (2017). Evolution, genomics and epidemiology of *Pseudomonas syringae*: challenges in bacterial molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 18(1), 152-168.
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., Lesin, V. M., Nikolenko, S. I., Pham, S., Prjibelski, A. D., Pyshkin, A. V., Sirotkin, A. V., Vyahhi, N., Tesler, G., Alekseyev, M. A., & Pevzner, P. A. (2012). SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of Computational Biology*, 19, 455-477.
- Basler, M., & Mekalanos, J. J. (2012). Type 6 secretion dynamics within and between bacterial cells. *Science*, 337, 815.
- Basler, M., Ho, B. T., & Mekalanos, J. J. (2013). Tit-for-tat: type VI secretion system counterattack during bacterial cell-cell interactions. *Cell*, 152(4), 884-894.
- Batrach, M., Maskeri, L., Schubert, R., Ho, B., Kohout, M., Abdeljaber, M., Abuhasna, A., Kholoki, M., Psihogios, P., Razzaq, T., Sawhney, S., Siddiqui, S., Xoubi, E., Cooper, A., Hatzopoulos, T., & Putonti, C. (2019). *Pseudomonas* diversity within urban freshwaters. *Frontiers in Microbiology*, 10, 195.
- Bender, C. L., Alarcón-Chaidez, F., & Gross, D. C. (1999). *Pseudomonas syringae* phytotoxins: mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(2), 266-292.
- Berge, O., Monteil, C. L., Bartoli, C., Chandeysson, C., Guilbaud, C., Sands, D. C., & Morris C. E. (2014). A user's guide to a data base of the diversity of *Pseudomonas syringae* and its application to classifying strains in this phylogenetic complex. *PLoS One*, 9, e105547.
- Berendsen, R. L., van Verk, M. C., Stringlis, I. A., Zamioudis, C., Tommassen, J., Pieterse, C. M., & Bakker, P. A. (2015). Unearthing the genomes of plant-beneficial *Pseudomonas* model strains WCS358, WCS374 and WCS417. *BMC Genomics*, 16, 1-23.

- Bernal, P., Allsopp, L. P., Filloux, A., & Llamas, M. A. (2017). The *Pseudomonas putida* T6SS is a plant warden against phytopathogens. *The ISME Journal*, 11(4), 972-987.
- Bernal, P., Llamas, M. A., & Filloux, A. (2018). Type VI secretion systems in plant-associated bacteria. *Environmental Microbiology*, 20(1), 1-15.
- Bernal, P., Civantos, C., Pacheco-Sánchez, D., Quesada, J. M., Filloux, A., & Llamas, M. A. (2023). Transcriptional organization and regulation of the *Pseudomonas putida* K1 type VI secretion system gene cluster. *Microbiology*, 169(1).
- Bidwai, A. P., Zhang, L., Bachmann, R. C., & Takemoto, J. Y. (1987). Mechanism of action of *Pseudomonas syringae* phytotoxin, syringomycin: stimulation of red beet plasma membrane ATPase activity. *Plant Physiology*, 83(1), 39-43.
- Bladergroen, M. R., Badelt, K., & Spaink, H. P. (2003). Infection-blocking genes of a symbiotic *Rhizobium leguminosarum* strain that are involved in temperature-dependent protein secretion. *Molecular Plant-microbe Interactions*, 16(1), 53-64.
- Bordenave, C. D., Escaray, F. J., Menendez, A. B., Serna, E., Carrasco, P., Ruiz, O. A., & Gárriz, A. (2013). Defense responses in two ecotypes of *Lotus japonicus* against non-pathogenic *Pseudomonas syringae*. *PLoS One*, 8(12), e83199.
- Brodhagen, M., Henkels, M. D., & Loper, J. E. (2004). Positive autoregulation and signaling properties of pyoluteorin, an antibiotic produced by the biological control organism *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Applied Environmental Microbiology*, 70(3), 1758-1766.
- Bull, C. T., Clarke, C. R., Cai, R., Vinatzer, B. A., Jardini, T. M., & Koike, S. T. (2011). Multilocus sequence typing of *Pseudomonas syringae* sensu lato confirms previously described genomospecies and permits rapid identification of *P. syringae* pv. *coriandricola* and *P. syringae* pv. *apii* causing bacterial leaf spot on parsley. *Phytopathology* 101, 847–858.
- Bundalovic-Torma, C., Lonjon, F., Desveaux, D., & Guttman, D. S. (2022). Diversity, evolution, and function of *Pseudomonas syringae* effectoromes. *Annual Review of Phytopathology*, 60(1), 211-236.
- Büttner, D., & Bonas, U. (2006). Who comes first? How plant pathogenic bacteria orchestrate type III secretion. *Current Opinion in Microbiology*, 9(2), 193-200.
- Büttner, D., & He, S. Y. (2009). Type III protein secretion in plant pathogenic bacteria. *Plant Physiology*, 150(4), 1656-1664.
- Bushnell B. (2014). BBMap: a fast, accurate, splice-aware aligner. (Berkeley, CA: Ernest Orlando Lawrence Berkeley National Laboratory).
- Carrión, V. J., van der Voort, M., Arrebola, E., Gutiérrez-Barranquero, J. A., de Vicente, A., Raaijmakers, J. M., & Cazorla, F. M. (2014). Mangotoxin production of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* is regulated by MgoA. *BMC Microbiology*, 14, 1-13.
- Cascales, E. (2008). The type VI secretion toolkit. *EMBO Reports*, 9(8), 735-741.

- Chaudhry, V., Runge, P., Sengupta, P., Doehlemann, G., Parker, J. E., & Kemen, E. (2021). Shaping the leaf microbiota: plant–microbe–microbe interactions. *Journal of Experimental Botany*, 72(1), 36-56.
- Chen, L., Yang, J., Yu, J., Yao, Z., Sun, L., Shen, Y., & Jin, Q. (2005). VFDB: a reference database for bacterial virulence factors. *Nucleic Acids Research*, 33, D325-D328.
- Chen, Z., Agnew, J. L., Cohen, J. D., He, P., Shan, L., Sheen, J., & Kunkel, B. N. (2007). *Pseudomonas syringae* type III effector AvrRpt2 alters *Arabidopsis thaliana* auxin physiology. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(50), 20131-20136.
- Chien, C.F., Liu, C.Y., Lu, Y.Y., Sung, Y.H., Chen, K.Y., & Lin, N.C. (2020). HSI-II gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 encodes a functional Type VI secretion system required for interbacterial competition. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1118.
- Choudhary, D. K., Prakash, A., & Johri, B. N. (2007). Induced systemic resistance (ISR) in plants: mechanism of action. *Indian Journal of Microbiology*, 47, 289-297.
- Clarke, C. R., Hayes, B. W., Runde, B. J., Markel, E., Swingle, B. M., & Vinatzer, B. A. (2016). Comparative genomics of *Pseudomonas syringae* pathovar *tomato* reveals novel chemotaxis pathways associated with motility and plant pathogenicity. *PeerJ*, 4, e2570.
- Cochet, N., & Widehem, P. (2000). Ice crystallization by *Pseudomonas syringae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54, 153-161.
- Collmer, A., Lindeberg, M., Petnicki-Ocwieja, T., Schneider, D. J., & Alfano, J. R. (2002). Genomic mining type III secretion system effectors in *Pseudomonas syringae* yields new picks for all TTSS prospectors. *Trends in Microbiology*, 10(10), 462-469.
- Costa-Gutierrez, S. B., Adler, C., Espinosa-Urgel, M., & de Cristóbal, R. E. (2022). *Pseudomonas putida* and its close relatives: mixing and mastering the perfect tune for plants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 106(9), 3351-3367.
- Crabill, E., Joe, A., Block, A., Van Rooyen, J. M., & Alfano, J. R. (2010). Plant immunity directly or indirectly restricts the injection of type III effectors by the *Pseudomonas syringae* type III secretion system. *Plant Physiology*, 154(1), 233-244.
- Cui, J., Liu, J., Li, J., Cheng, D., & Dai, C. (2022). Genome-wide sequence identification and expression analysis of N6-methyladenosine demethylase in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) under salt stress. *PeerJ*, 10, e12719.
- Cunnac, S., Chakravarthy, S., Kvitko, B. H., Russell, A. B., Martin, G. B., & Collmer, A. (2011). Genetic disassembly and combinatorial reassembly identify a minimal functional repertoire of type III effectors in *Pseudomonas syringae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(7), 2975-2980.
- Dar, Y., Jana, B., Bosis, E., & Salomon, D. (2022). A binary effector module secreted by a type VI secretion system. *EMBO Reports*, 23(1), e53981.
- Decoin, V., Barbey, C., Bergeau, D., Latour, X., Feuilloley, M. G., Orange, N., & Merieau, A. (2014). A type VI secretion system is involved in *Pseudomonas fluorescens* bacterial competition. *Plos One*, 9(2), e89411.

- de Torres-Zabala, M., Truman, W., Bennett, M. H., Lafforgue, G., Mansfield, J. W., Rodriguez Egea, P., Bögre, L., & Grant, M. (2007). *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* hijacks the *Arabidopsis* abscisic acid signalling pathway to cause disease. *The EMBO Journal*, 26(5), 1434-1443.
- Desoignies, N., Schramme, F., Ongena, M., & Legrève, A. (2013). Systemic resistance induced by *Bacillus* lipopeptides in *Beta vulgaris* reduces infection by the rhizomania disease vector *Polymyxa betae*. *Molecular Plant Pathology*, 14(4), 416-421.
- Dillon, M. M., Almeida, R. N., Laflamme, B., Martel, A., Weir, B. S., Desveaux, D., & Guttman, D. S. (2019). Molecular evolution of *Pseudomonas syringae* type III secreted effector proteins. *Frontiers in Plant Science*, 10, 418.
- Dillon, M. M., Thakur, S., Almeida, R. N., Wang, P. W., Weir, B. S., & Guttman, D.S. (2019). Recombination of ecologically and evolutionarily significant loci maintains genetic cohesion in the *Pseudomonas syringae* species complex. *Genome Biology*, 20, 1-28.
- Djami-Tchatchou, A. T., Harrison, G. A., Harper, C. P., Wang, R., Prigge, M. J., Estelle, M., & Kunkel, B. N. (2020). Dual role of auxin in regulating plant defense and bacterial virulence gene expression during *Pseudomonas syringae* PtoDC3000 pathogenesis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 33(8), 1059-1071.
- Dong, X. (2004). NPR1, all things considered. *Current Opinion in Plant Biology*, 7(5), 547-552.
- Du, M. Z., Zhang, C., Wang, H., Liu, S., Wei, W., & Guo, F. B. (2018). The GC content as a main factor shaping the amino acid usage during bacterial evolution process. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2948.
- Duca, D., Lorv, J., Patten, C. L., Rose, D., & Glick, B. R. (2014). Indole-3-acetic acid in plant-microbe interactions. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 106, 85-125.
- Durán, D., Vazquez-Arias, D., Blanco-Romero, E., Garrido-Sanz, D., Redondo-Nieto, M., Rivilla, R., & Martín, M. (2023). An orphan VrgG auxiliary module related to the type VI secretion systems from *Pseudomonas ogarae* F113 mediates bacterial killing. *Genes*, 14(11), 1979.
- Durand, E., Cambillau, C., Cascales, E., & Journet, L. (2014). VgrG, Tae, Tle, and beyond: the versatile arsenal of Type VI secretion effectors. *Trends in Microbiology*, 22(9), 498-507.
- Durbin, R. D. (1991). Bacterial phytotoxins: Mechanisms of action. *Experientia*, 47, 776-783.
- Eddy, S. R. (2011). Accelerated profile HMM searches. *PLoS Computational Biology*, 7, e1002195.
- Edwards, U., Rogall, T., Blöcker, H., Emde, M., & Böttger, E. C. (1989). Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research*, 17(19), 7843-7853.
- Fatima, U., & Senthil-Kumar, M. (2015). Plant and pathogen nutrient acquisition strategies. *Frontiers in Plant Science*, 6, 750.
- Fridman, C. M., Keppel, K., Gerlic, M., Bosis, E., & Salomon, D. (2020). A comparative genomics methodology reveals a widespread family of membrane-disrupting T6SS effectors. *Nature Communications*, 11(1), 1085.

- Fujikawa, T., & Sawada, H. (2019). Genome analysis of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* biovar 6, which produces the phytotoxins, phaseolotoxin and coronatine. *Scientific Reports*, 9(1), 3836.
- Gallegos-Monterrosa, R., & Coulthurst, S. J. (2021). The ecological impact of a bacterial weapon: microbial interactions and the Type VI secretion system. *FEMS Microbiology Reviews*, 45(6), fuab033.
- Gašić, K., & Obradović, A. (2012). Indukovana otpornost biljaka. *Ratarstvo i Povrtarstvo*, 49(3), 326-334.
- Geng, X., Jin, L., Shimada, M., Kim, M. G., & Mackey, D. (2014). The phytotoxin coronatine is a multifunctional component of the virulence armament of *Pseudomonas syringae*. *Planta*, 240, 1149-1165.
- Geng, X., Shen, M., Kim, J. H., & Mackey, D. (2016). The *Pseudomonas syringae* type III effectors AvrRpm1 and AvrRpt2 promote virulence dependent on the F-box protein COI1. *Plant Cell Reports*, 35, 921-932.
- Genin, S., Gough, C. L., Zischek, C., & Boucher, C. A. (1992). Evidence that the *hrpB* gene encodes a positive regulator of pathogenicity genes from *Pseudomonas solanacearum*. *Molecular Microbiology*, 6(20), 3065-3076.
- Golchha, N. C., Nighojkar, A., & Nighojkar, S. (2024). Bacterial pangenome: A review on the current strategies, tools and applications. *Medinformatics*.
- Gomila, M., Busquets, A., Mulet, M., García-Valdés, E., & Lalucat, J. (2017). Clarification of taxonomic status within the *Pseudomonas syringae* species group based on a phylogenomic analysis. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2422.
- Gopalan, N. R., Priya, S. Y., & Mohapatra, S. (2024). The rhizobacterial strain, *Pseudomonas putida* AKMP7, causes conditional pathogenesis in *Arabidopsis thaliana* via negative regulation of salicylic acid signaling, under water stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 206, 108262.
- Green, E. R., & Meccas, J. (2016). Bacterial secretion systems: an overview. *Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens*, 213-239.
- Gullino, M. L., Gilardi, G., Sanna, M., & Garibaldi, A. (2009). Epidemiology of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* on tomato. *Phytoparasitica*, 37, 461-466.
- Guo, M., Tian, F., Wamboldt, Y., & Alfano, J. R. (2009). The majority of the type III effector inventory of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 can suppress plant immunity. *Molecular Plant-microbe Interactions*, 22(9), 1069-1080.
- Gupta, G., Chauhan, P. S., Jha, P. N., Verma, R. K., Singh, S., Yadav, V. K., Sahoo, D. K., & Patel, A. (2024). Secretory molecules from secretion systems fine-tune the host-beneficial bacteria (PGPRs) interaction. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1355750.
- Guttman, D. S., Gropp, S. J., Morgan, R. L., & Wang, P. W. (2006). Diversifying selection drives the evolution of the type III secretion system pilus of *Pseudomonas syringae*. *Molecular Biology and Evolution*, 23(12), 2342-2354.

- Haas, D., & Défago, G. (2005). Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Reviews Microbiology*, 3(4), 307-319.
- Hallau, L., Neumann, M., Klatt, B., Kleinhenz, B., Klein, T., Kuhn, C., Rohrig, M., Bauckhage, C., Kerstingf, K., Mahleina, A.-K., Steinera, U. & Oerke, E. C. (2018). Automated identification of sugar beet diseases using smartphones. *Plant Pathology*, 67(2), 399-410.
- Hassan, M. N., Afghan, S., & Hafeez, F. Y. (2011). Biological control of red rot in sugarcane by native pyoluteorin-producing *Pseudomonas putida* strain NH-50 under field conditions and its potential modes of action. *Pest Management Science*, 67(9), 1147-1154.
- Helmann, T. C., Deutschbauer, A. M., & Lindow, S. E. (2019). Genome-wide identification of *Pseudomonas syringae* genes required for fitness during colonization of the leaf surface and apoplast. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(38), 18900-18910.
- Heredia-Ponce, Z., Gutiérrez-Barranquero, J. A., Purtschert-Montenegro, G., Eberl, L., Cazorla, F. M., & de Vicente, A. (2020). Biological role of EPS from *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* UMAF0158 extracellular matrix, focusing on a Psl-like polysaccharide. *npj Biofilms and Microbiomes*, 6(1), 37.
- Heredia-Ponce, Z., de Vicente, A., Cazorla, F. M., & Gutiérrez-Barranquero, J. A. (2021). Beyond the wall: exopolysaccharides in the biofilm lifestyle of pathogenic and beneficial plant-associated *Pseudomonas*. *Microorganisms*, 9(2), 445.
- Hernandez, R. E., Gallegos-Monterrosa, R., & Coulthurst, S. J. (2020). Type VI secretion system effector proteins: effective weapons for bacterial competitiveness. *Cellular Microbiology*, 22(9), e13241.
- Hmelo, L. R., Borlee, B. R., Almblad, H., Love, M. E., Randall, T. E., Tseng, B. S., Lin, C., Irie, Y., Storek, K. M., Yang, J. J., Siehnell, R. J., Howell, P. L., Singh, P. K., Tolker-Nielsen, T., Parsek, M. R., Schweizer, H. P., & Harrison, J. J. (2015). Precision-engineering the *Pseudomonas aeruginosa* genome with two-step allelic exchange. *Nature Protocols*, 10(11), 1820-1841.
- Hoang, T.T., Karkhoff-Schweizer, R.R., Kutchma, A.J. & Schweizer, H.P. (1998). A broad-host-range Flp-FRT recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Gene*, 212, 77–86.
- Hockett, K. L., Burch, A. Y., & Lindow, S. E. (2013). Thermo-regulation of genes mediating motility and plant interactions in *Pseudomonas syringae*. *PLoS One*, 8(3), e59850.
- Hockett, K. L., Nishimura, M. T., Karlsrud, E., Dougherty, K., & Baltrus, D. A. (2014). *Pseudomonas syringae* CC1557: a highly virulent strain with an unusually small type III effector repertoire that includes a novel effector. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 27(9), 923-932.
- Huang, J., Chen, K., Li, Z., Zhang, H., Guan, X., Zhong, X., & Jia, P. (2024). Insight into Function and Subcellular Localization of a Type III-Secreted Effector in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *American Journal of Plant Sciences*, 15(10), 835-846.

- Hyatt, D., Chen, G. L., LoCascio, P. F., Land, M. L., Larimer, F. W., & Hauser, L. J. (2010). Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC Bioinformatics*, 11, 1-11.
- Iacobellis, N. S., Lavermicocca, P., Grgurina, I., Simmaco, M., & Ballio, A. (1992). Phytotoxic properties of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* toxins. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 40(2), 107-116.
- Ichinose, Y., Taguchi, F., & Mukaiharu, T. (2013). Pathogenicity and virulence factors of *Pseudomonas syringae*. *Journal of General Plant Pathology*, 79, 285-296.
- Ichinose, Y., Sawada, T., Matsui, H., Yamamoto, M., Toyoda, K., Noutoshi, Y., & Taguchi, F. (2016). Motility-mediated regulation of virulence in *Pseudomonas syringae*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 95, 50-54.
- Ikryannikova, L. N., Kurbatov, L. K., Gorokhovets, N. V., & Zamyatnin Jr, A. A. (2020). Contact-dependent growth inhibition in bacteria: do not get too close!. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(21), 7990.
- Jain, C., Rodriguez-RL, M., Phillippy, A. M., Konstantinidis, K. T., & Aluru, S. (2018). High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries. *Nature Communications*, 9, 1-8.
- Jamet, A., & Nassif, X. (2015). New players in the toxin field: polymorphic toxin systems in bacteria. *MBio*, 6(3), e00285-15.
- Kanda, E., Tatsuta, T., Suzuki, T., Taguchi, F., Naito, K., Inagaki, Y., Toyoda, K., Shiraishi, T., & Ichinose, Y. (2011). Two flagellar stators and their roles in motility and virulence in *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 6605. *Molecular Genetics and Genomics*, 285, 163-174.
- Kazan, K., & Manners, J. M. (2013). MYC2: the master in action. *Molecular Plant*, 6(3), 686-703.
- Kennedy, R. K., Naik, P. R., Veena, V., Lakshmi, B. S., Lakshmi, P., Krishna, R., & Sakthivel, N. (2015). 5-Methyl phenazine-1-carboxylic acid: a novel bioactive metabolite by a rhizosphere soil bacterium that exhibits potent antimicrobial and anticancer activities. *Chemico-biological Interactions*, 231, 71-82.
- Khan, M., Seto, D., Subramaniam, R., & Desveaux, D. (2018). Oh, the places they'll go! A survey of phytopathogen effectors and their host targets. *The Plant Journal*, 93(4), 651-663.
- Kim, Y., Gu, C., Kim, H. U., & Lee, S. Y. (2020). Current status of pan-genome analysis for pathogenic bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*, 63, 54-62.
- Koch, G., Jimenez, P.N., Muntendam, R., Chen, Y., Papaioannou, E., Heeb, S., Cámara, M., Williams, P., Cool, R. H., & Quax, W. J. (2010). The acylase PvdQ has a conserved function among fluorescent *Pseudomonas* spp. *Environmental Microbiology Reports*, 2, 433-439.
- Konstantinidis, K. T., & Tiedje, J. M. (2005). Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102, 2567-2572.

- Koskiniemi, S., Lamoureux, J. G., Nikolakakis, K. C., t'Kint de Roodenbeke, C., Kaplan, M. D., Low, D. A., & Hayes, C. S. (2013). Rhs proteins from diverse bacteria mediate intercellular competition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(17), 7032-7037.
- Kramer, J., Özkaya, Ö., & Kümmerli, R. (2020). Bacterial siderophores in community and host interactions. *Nature Reviews Microbiology*, 18(3), 152-163.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.
- Laflamme, B., Dillon, M. M., Martel, A., Almeida, R. N., Desveaux, D., & Guttman, D. S. (2020). The pan-genome effector-triggered immunity landscape of a host-pathogen interaction. *Science*, 367(6479), 763-768.
- Lamichhane, J. R., Messéan, A., & Morris, C. E. (2015). Insights into epidemiology and control of diseases of annual plants caused by the *Pseudomonas syringae* species complex. *Journal of General Plant Pathology*, 81(5), 331-350.
- Leveau, J. H. (2019). A brief from the leaf: latest research to inform our understanding of the phyllosphere microbiome. *Current Opinion in Microbiology*, 49, 41-49.
- Li, Y., Hao, G., Galvani, C. D., Meng, Y., Fuente, L. D. L., Hoch, H. C., & Burr, T. J. (2007). Type I and type IV pili of *Xylella fastidiosa* affect twitching motility, biofilm formation and cell-cell aggregation. *Microbiology*, 153(3), 719-726.
- Li, W., Rokni-Zadeh, H., De Vleeschouwer, M., Ghequire, M. G., Sinnaeve, D., Xie, G. L., Rozenski, J., Maddier, A., Martins, J. C., & De Mot, R. (2013). The antimicrobial compound xantholysin defines a new group of *Pseudomonas* cyclic lipopeptides. *PloS One*, 8(5).
- Lien, Y. W., & Lai, E. M. (2017). Type VI secretion effectors: methodologies and biology. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7, 254.
- Lin, J., Zhang, W., Cheng, J., Yang, X., Zhu, K., Wang, Y., Wei, G., Qian, P, Y., Luo, Z, Q., & Shen, X. (2017). A *Pseudomonas* T6SS effector recruits PQS-containing outer membrane vesicles for iron acquisition. *Nature Communications*, 8(1), 14888.
- Lindeberg, M., Cunnac, S., & Collmer, A. (2012). *Pseudomonas syringae* type III effector repertoires: last words in endless arguments. *Trends in Microbiology*, 20(4), 199-208.
- Lindgren, P. B., Peet, R. C., & Panopoulos, N. J. (1986). Gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* controls pathogenicity of bean plants and hypersensitivity of nonhost plants. *Journal of Bacteriology*, 168(2), 512-522.
- Loeschcke, A., & Thies, S. (2015). *Pseudomonas putida*—a versatile host for the production of natural products. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99, 6197-6214.
- Loh, J., Pierson, E. A., Pierson III, L. S., Stacey, G., & Chatterjee, A. (2002). Quorum sensing in plant-associated bacteria. *Current Opinion in Plant Biology*, 5(4), 285-290.
- Lonjon, F., Lai, Y., Askari, N., Aiyar, N., Bundalovic-Torma, C., Laflamme, B., Wang, P. W., Desveaux, D., & Guttman, D. S. (2024). The effector-triggered immunity landscape of tomato against *Pseudomonas syringae*. *Nature Communications*, 15(1), 5102.

- Lopez, V. A., Park, B. C., Nowak, D., Sreelatha, A., Zembek, P., Fernandez, J., Servage, K. A., Gradowski, M., Hennig, J., Tomchick, D. R., Pawłowski, K., Krzymowska, M., & Tagliabracchi, V. S. (2019). A bacterial effector mimics a host HSP90 client to undermine immunity. *Cell*, 179(1), 205-218.
- LPSN (2025). List of Prokaryotic names with standing in nomenclature. www.bacterio.net. Pristupljeno 16.01.2025.
- Lucke, M., Correa, M. G., & Levy, A. (2020). The role of secretion systems, effectors, and secondary metabolites of beneficial rhizobacteria in interactions with plants and microbes. *Frontiers in Plant Science*, 11, 589416.
- Macho, A. P., Zumaquero, A., Gonzalez-Plaza, J. J., Ortiz-Martin, I., Rufian, J. S., & Beuzon, C. R. (2012). Genetic analysis of the individual contribution to virulence of the type III effector inventory of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *PLoS One*, 7(4), e35871.
- Maksimov, I. V., Abizgil'Dina, R. R., & Pusenkova, L. I. (2011). Plant growth promoting rhizobacteria as alternative to chemical crop protectors from pathogens. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 47, 333-345.
- Marchi, M., Boutin, M., Gazengel, K., Rispe, C., Gauthier, J. P., Guillerm-Erckelboudt, A. Y., ... & Sarniguet, A. (2013). Genomic analysis of the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* Pf 29 Arp with evidence of T3SS and T6SS gene expression on plant roots. *Environmental Microbiology Reports*, 5(3), 393-403.
- Martel, A., Laflamme, B., Breit-McNally, C., Wang, P., Lonjon, F., Desveaux, D., & Guttman, D. S. (2022). Metaeffector interactions modulate the type III effector-triggered immunity load of *Pseudomonas syringae*. *PLoS Pathogens*, 18, e1010541.
- Matilla, M. A., Ramos, J. L., Bakker, P. A., Doornbos, R., Badri, D. V., Vivanco, J. M., & Ramos-González, M. I. (2010). *Pseudomonas putida* KT2440 causes induced systemic resistance and changes in *Arabidopsis* root exudation. *Environmental Microbiology Reports*, 2(3), 381-388.
- Matte, L. M., Genal, A. V., Landolt, E. F., & Danka, E. S. (2024). T6SS in plant pathogens: unique mechanisms in complex hosts. *Infection and Immunity*, 92(9), e00500-23.
- Mattick, J. S. (2002). Type IV pili and twitching motility. *Annual Reviews in Microbiology*, 56(1), 289-314.
- Mavrodi, D. V., Blankenfeldt, W., & Thomashow, L. S. (2006). Phenazine compounds in fluorescent *Pseudomonas* spp. biosynthesis and regulation. *Annual Review of Phytopathology*, 44(1), 417-445.
- McAtee, P. A., Brian, L., Curran, B., van der Linden, O., Nieuwenhuizen, N. J., Chen, X., Henry-Krik, R. A., Stroud, E. A., Nardoza, S., Jayaraman, J., Rikkerink, E. H. A., Print, C. G., Allan, A. C., & Templeton, M. D. (2018). Re-programming of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* gene expression during early stages of infection of kiwifruit. *BMC Genomics*, 19, 1-15.
- McClerklin, S. A., Lee, S. G., Harper, C. P., Nwumeh, R., Jez, J. M., & Kunkel, B. N. (2018). Indole-3-acetaldehyde dehydrogenase-dependent auxin synthesis contributes to virulence of *Pseudomonas syringae* strain DC3000. *PLoS Pathogens*, 14(1), e1006811.

- McCraw, S. L., Park, D. H., Jones, R., Bentley, M. A., Rico, A., Ratcliffe, R. G., Kruger, N. J., Collmer, A., & Preston, G. M. (2016). GABA (γ -aminobutyric acid) uptake via the GABA permease GabP represses virulence gene expression in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 29(12), 938-949.
- Meier-Kolthoff, J. P., Klenk, H. P., & Göker, M. (2014). Taxonomic use of DNA G+ C content and DNA–DNA hybridization in the genomic age. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(Pt_2), 352-356.
- Mercy, C., Ize, B., Salcedo, S. P., De Bentzmann, S., & Bigot, S. (2016). Functional characterization of *Pseudomonas* contact dependent growth inhibition (CDI) systems. *PloS One*, 11(1), e0147435.
- Messing, J., & Vieira, J. (1982). A new pair of M13 vectors for selecting either DNA strand of double-digest restriction fragments. *Gene*, 19(3), 269-276.
- Mira, A., Martín-Cuadrado, A. B., D'Auria, G., & Rodríguez-Valera, F. (2010). The bacterial pan-genome: a new paradigm in microbiology. *International Microbiology*, 13(2), 45-57.
- Mithani, A., Hein, J., & Preston, G. M. (2011). Comparative analysis of metabolic networks provides insight into the evolution of plant pathogenic and nonpathogenic lifestyles in *Pseudomonas*. *Molecular Biology and Evolution*, 28(1), 483-499.
- Mnif, I., & Ghribi, D. (2015). Potential of bacterial derived biopesticides in pest management. *Crop Protection*, 77, 52-64.
- Monteil, C. L., Yahara, K., Studholme, D. J., Mageiros, L., Méric, G., Swingle, B., Morris, C. E., Vinatzer, B. A., & Sheppard, S. K. (2016). Population-genomic insights into emergence, crop adaptation and dissemination of *Pseudomonas syringae* pathogens. *Microbial Genomics*, 2(10).
- Moore, L. W. (1988). *Pseudomonas syringae*: disease and ice nucleation activity. *Ornamentals Northwest*, 12(2), 3.
- Morris, C. E., Kinkel, L. L., Xiao, K., Prior, P., & Sands, D. C. (2007). Surprising niche for the plant pathogen *Pseudomonas syringae*. *Infection, Genetics and Evolution*, 7(1), 84-92.
- Morris, C. E., Sands, D. C., Vinatzer, B. A., Glaux, C., Guilbaud, C., Buffiere, A., Yan, S., Dominguez, H., & Thompson, B. M. (2008). The life history of the plant pathogen *Pseudomonas syringae* is linked to the water cycle. *The ISME Journal*, 2(3), 321-334.
- Morris, C. E., Monteil, C. L., & Berge, O. (2013). The life history of *Pseudomonas syringae*: linking agriculture to earth system processes. *Annual Review of Phytopathology*, 51(1), 85-104.
- Morris, C. E., Lamichhane, J. R., Nikolić, I., Stanković, S., & Moury, B. (2019). The overlapping continuum of host range among strains in the *Pseudomonas syringae* complex. *Phytopathology Research*, 1(1), 4.
- Nagai, H., & Kubori, T. (2011). Type IVB secretion systems of *Legionella* and other Gram-negative bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 2, 136.

- Nampijja, M., Derie, M. L., & du Toit, L. J. (2021). First Report of Bacterial Leaf Spot Caused by *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* on Swiss Chard, *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*, in Arizona. *Plant Disease*, 105(11), 3738.
- Navarro-Monserrat, E. D., & Taylor, C. G. (2023). T6SS: a key to pseudomonas's success in biocontrol?. *Microorganisms*, 11(11), 2718.
- Nelson, K. E., Weinl, C., Paulsen, I. T., Dodson, R. J., Hilbert, H., Martins dos Santos, V. A. P., Fouts, D. E., Gill, S. R., Pop, M., Holmes, M., Brinkac, L., Beanan, M., DeBoy, R. T., Daugherty, S., Kolonay, J., Madupu, R., Nelson, W., White, O., Peterson, J., Khouri, H., Hance, I., Chris Lee, P., Holtzapple, E., Scanlan, D., Tran, K., Moazzez, A., Utterback, T., Rizzo, M., Lee, K., Kosack, D., Moestl, D., Wedler, H., Lauber, J., Stjepandic, D., Hoheisel, J., Straetz, M., Heim, S., Kiewitz, C., Eisen, J., Timmis, K. N., Dusterhöft, A., Tümmeler, B., & Fraser, C. M. (2002). Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental Microbiology*, 4(12), 799-808.
- Nguyen, L. C., Taguchi, F., Tran, Q. M., Naito, K., Yamamoto, M., Ohnishi-Kameyama, M. Ono, H., Yoshida, M., Toyoda, K., Shiraishi, T. & Ichinose, Y. (2012). Type IV pilin is glycosylated in *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 6605 and is required for surface motility and virulence. *Molecular Plant Pathology*, 13(7), 764-774.
- Niehus, R., Picot, A., Oliveira, N. M., Mitri, S., & Foster, K. R. (2017). The evolution of siderophore production as a competitive trait. *Evolution*, 71(6), 1443-1455.
- Nikolić, I. (2018). Identifikacija, genetički diverzitet i biološka kontrola *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* sa područja Srbije. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu.
- Nikolić, I., Stanković, S., Dimkić, I., Berić, T., Stojšin, V., Janse, J., & Popović, T. (2018). Genetic diversity and pathogenicity of *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* isolated from sugar beet. *Plant Pathology*, 67(5), 1194–1207.
- Nikolić, I., Glatter, T., Ranković, T., Berić, T., Stanković, S., & Diepold, A. (2023). Repertoire and abundance of secreted virulence factors shape the pathogenic capacity of *Pseudomonas syringae* pv. *aptata*. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1205257.
- Nüske, J., & Fritsche, W. (1989). Phaseolotoxin production by *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*: the influence of temperature. *Journal of Basic Microbiology*, 29(7), 441-447.
- Ortiz-Martín, I., Thwaites, R., Macho, A. P., Mansfield, J. W., & Beuzón, C. R. (2010). Positive regulation of the Hrp type III secretion system in *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Molecular Plant-microbe Interactions*, 23(5), 665-681.
- Page, A. J., Cummins, C. A., Hunt, M., Wong, V. K., Reuter, S., Holden, M. T., Fookes, M., Falush, D., Keane, J. A., & Parkhill, J. (2015). Roary: rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics*, 31, 3691-3693.
- Palleroni, N. J. (1984). Genus I. *Pseudomonas*. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 1, 141-199.
- Panopoulos, N., & Schroth, M. (1974). Role of flagellar motility in the invasion of bean leaves. *Phytopathology*, 64, 1389-1397.

- Park, D. H., Mirabella, R., Bronstein, P. A., Preston, G. M., Haring, M. A., Lim, C. K., ... & Schuurink, R. C. (2010). Mutations in γ -aminobutyric acid (GABA) transaminase genes in plants or *Pseudomonas syringae* reduce bacterial virulence. *The Plant Journal*, 64(2), 318-330.
- Parks, D. H., Imelfort, M., Skennerton, C. T., Hugenholtz, P., & Tyson, G. W. (2015). CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome Research*, 25, 1043-1055.
- Parte, A.C., Sardà Carbasse, J., Meier-Kolthoff, J.P., Reimer, L.C. and Göker, M. (2020). List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70, 5607-5612.
- Pei, T.-T., Li, H., Liang, X., Wang, Z.-H., Liu, G., Wu, L.-L., Kim, H., Xie, Z., Yu, M., Lin, S., Xu, P., & Dong, T. G. (2020). Intramolecular chaperone-mediated secretion of an Rhs effector toxin by a type VI secretion system. *Nature Communications*, 11(1), 1865.
- Peix, A., Ramírez-Bahena, M. H., & Velázquez, E. (2018). The current status on the taxonomy of *Pseudomonas* revisited: an update. *Infection, Genetics and Evolution*, 57, 106-116.
- Pereira, C. S., Thompson, J. A., & Xavier, K. B. (2013). AI-2-mediated signalling in bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(2), 156-181.
- Petkau, A., Stuart-Edwards, M., Stothard, P., & Van Domselaar, G. (2010). Interactive microbial genome visualization with GView. *Bioinformatics*, 26: 3125-3126.
- Planchamp, C., Glauser, G., & Mauch-Mani, B. (2015). Root inoculation with *Pseudomonas putida* KT2440 induces transcriptional and metabolic changes and systemic resistance in maize plants. *Frontiers in Plant Science*, 5, 719.
- Pontes, J. G. D. M., Fernandes, L. S., dos Santos, R. V., Tasic, L., & Fill, T. P. (2020). Virulence factors in the phytopathogen–host interactions: an overview. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(29), 7555-7570.
- Pozo, M. J., Van Der Ent, S., Van Loon, L. C., & Pieterse, C. M. (2008). Transcription factor MYC2 is involved in priming for enhanced defense during rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*, 180(2), 511-523.
- Price, M. N., Dehal, P. S., & Arkin, A. P. (2010). FastTree 2—approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PLoS One*, 5, e9490.
- Priya, R., Sneha, P., Dass, J. F. P., Manickavasagam, M., & Siva, R. (2019). Exploring the codon patterns between CCD and NCED genes among different plant species. *Computers in Biology and Medicine*, 114, 103449.
- Purtschert-Montenegro, G., Cárcamo-Oyarce, G., Pinto-Carbó, M., Agnoli, K., Bailly, A., & Eberl, L. (2022). *Pseudomonas putida* mediates bacterial killing, biofilm invasion and biocontrol with a type IVB secretion system. *Nature Microbiology*, 7(10), 1547-1557.
- Quigley, N. B., Mo, Y. Y., & Gross, D. C. (1993). SyrD is required for syringomycin production by *Pseudomonas syringae* pathovar *syringae* and is related to a family of ATP-binding secretion proteins. *Molecular Microbiology*, 9(4), 787-801.

- Ramkumar, G., Lee, S. W., Weon, H. Y., Kim, B. Y., & Lee, Y. H. (2015). First report on the whole genome sequence of *Pseudomonas cichorii* strain JBC 1 and comparison with other *Pseudomonas* species. *Plant Pathology*, 64(1), 63-70.
- Ranković, T., Nikolić, I., Berić, T., Popović, T., Lozo, J., Medić, O., & Stanković, S. (2023). Genome analysis of two *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* strains with different virulence capacity isolated from sugar beet: features of successful pathogenicity in the phyllosphere microbiome. *Microbiology Spectrum*, 11(2), e03598-22.
- Republika Srbija, Republički zavod za statistiku. Biljna proizvodnja, od 2005, 2005-2024. (2024). www.stat.gov.rs.
- Rivilla, R., & Malone, J. G. (2023). Plant-Associated Pseudomonads. *Microorganisms*, 11(5), 1216.
- Rodríguez, M., Torres, M., Blanco, L., Béjar, V., Sampedro, I., & Llamas, I. (2020). Plant growth-promoting activity and quorum quenching-mediated biocontrol of bacterial phytopathogens by *Pseudomonas segetis* strain P6. *Scientific Reports*, 10, 1-12.
- Rossez, Y., Wolfson, E. B., Holmes, A., Gally, D. L., & Holden, N. J. (2015). Bacterial flagella: twist and stick, or dodge across the kingdoms. *PLoS Pathogens*, 11(1), e1004483.
- Rotondo, F., Vrisman, C. M., Rani, R., Testen, A. L., Deblais, L., & Miller, S. A. (2020). First report of *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* causing bacterial leaf spot on common beet (*Beta vulgaris*) in Ohio. *Plant Disease*, 104(2), 561.
- Russell, A. B., Peterson, S. B., & Mougous, J. D. (2014). Type VI secretion system effectors: poisons with a purpose. *Nature Reviews Microbiology*, 12(2), 137-148.
- Sabaratnam, S., & Beattie, G. A. (2003). Differences between *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a and *Pantoea agglomerans* BRT98 in epiphytic and endophytic colonization of leaves. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(2), 1220-1228.
- Sarkar, S. F., & Guttman, D. S. (2004). Evolution of the core genome of *Pseudomonas syringae*, a highly clonal, endemic plant pathogen. *Applied Environmental Microbiology*, 70, 1999-2012.
- Sarris, P. F., Karri, I. V., & Goumas, D. E. (2010). First report of *Pseudomonas syringae* pv. *alisalensis* causing bacterial blight of arugula (*Eruca vesicaria* subsp. *sativa*) in Greece. *New Disease Reports*, 22(22), 2044-0588.
- Sawada, H., & Fujikawa, T. (2019). Genetic diversity of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, pathogen of kiwifruit bacterial canker. *Plant Pathology*, 68(7), 1235-1248.
- Schumacher, J., Waite, C. J., Bennett, M. H., Perez, M. F., Shethi, K., & Buck, M. (2014). Differential secretome analysis of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* using gel-free MS proteomics. *Frontiers in Plant Science*, 5, 242.
- Seemann, T. (2014). Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, 30, 2068-2069.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7).

- Scholz-Schroeder, B. K., Hutchison, M. L., Grgurina, I., & Gross, D. C. (2001). The contribution of syringopeptin and syringomycin to virulence of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strain B301D on the basis of *sypA* and *syrB1* biosynthesis mutant analysis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 14(3), 336-348.
- Silby, M. W., Winstanley, C., Godfrey, S. A., Levy, S. B., & Jackson, R. W. (2011). *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. *FEMS Microbiology Reviews*, 35(4), 652-680.
- Spiers, A. J., Buckling, A., & Rainey, P. B. (2000). The causes of *Pseudomonas* diversity. *Microbiology*, 146(10), 2345-2350.
- Stojšin, V., Balaž, J., Budakov, D., Stanković, S., Nikolić, I., Ivanović, Ž., & Popović, T. (2015). First report of *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* causing bacterial leaf spot on sugar beet in Serbia. *Plant Disease*, 99(2), 281-281.
- Stothard, P., Grant, J. R., & Van Domselaar, G. (2019). Visualizing and comparing circular genomes using the CGView family of tools. *Briefings in Bioinformatics*, 20(4), 1576-1582.
- Sun, D., Zhuo, T., Hu, X., Fan, X., & Zou, H. (2017). Identification of a *Pseudomonas putida* as biocontrol agent for tomato bacterial wilt disease. *Biological Control*, 114, 45-50.
- Sundin, G. W., Castiblanco, L. F., Yuan, X., Zeng, Q., & Yang, C. H. (2016). Bacterial disease management: challenges, experience, innovation and future prospects: challenges in bacterial molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 17, 1506–1518.
- Taboada, B., Estrada, K., Ciria, R., & Merino, E. (2018). Operon-mapper: A web server for precise operon identification in bacterial and archaeal genomes. *Bioinformatics*, 34(23), 4118–4120.
- Taguchi, F., & Ichinose, Y. (2011). Role of type IV pili in virulence of *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 6605: correlation of motility, multidrug resistance, and HR-inducing activity on a nonhost plant. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 24(9), 1001-1011.
- Tampakaki, A. P. (2014). Commonalities and differences of T3SSs in rhizobia and plant pathogenic bacteria. *Frontiers in Plant Science*, 5, 114.
- Thapa, S., & Prasanna, R. (2018). Prospecting the characteristics and significance of the phyllosphere microbiome. *Annals of Microbiology*, 68, 229-245.
- Thapa, N., Timilsina, S., Minsavage, G. V., Pereira-Martin, J., Vallad, G. E., Goss, E. M., Roberts, P., Mou, Z., Zhang, S., & Jones, J. B. (2021). Draft Genome Sequences of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* Strains J4 and J6, Isolated in Florida. *Microbiology Resource Announcements*, 10(15), e00127-21.
- Tsunemi, K., Taguchi, F., Marutani, M., Watanabe-Sugimoto, M., Inagaki, Y., Toyoda, K., Shiraishi, T., & Ichinose, Y. (2011). Degeneration of *hrpZ* gene in *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* to evade tobacco defence: an arms race between tobacco and its bacterial pathogen. *Molecular Plant Pathology*, 12(7), 709-714.
- Turco, S., Ferrucci, A., Drais, M. I., & Mazzaglia, A. (2024). A genome-wide comparative analysis to characterise the phylogenetic relationship and the pathogenicity of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* strains. *European Journal of Plant Pathology*, 168(1), 97-107.

- Turner, J. G., & Taha, R. R. (1984). Contribution of tabtoxin to the pathogenicity of *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. *Physiological Plant Pathology*, 25(1), 55-69.
- Van der Ent, S., Van Wees, S. C., & Pieterse, C. M. (2009). Jasmonate signaling in plant interactions with resistance-inducing beneficial microbes. *Phytochemistry*, 70(13-14), 1581-1588.
- Venieraki, A., Tsalgaidou, P. C., Georgakopoulos, D. G., Dimou, M., & Katinakis, P. (2016). Swarming motility in plant-associated bacteria. *Hellenic Plant Protection Journal*, 9, 16–27.
- Visca, P., Imperi, F., & Lamont, I. L. (2007). Pyoverdine siderophores: from biogenesis to biosignificance. *Trends in Microbiology*, 15(1), 22-30.
- Viswanath, K. K., Varakumar, P., Pamuru, R. R., Basha, S. J., Mehta, S., & Rao, A. D. (2020). Plant lipoxygenases and their role in plant physiology. *Journal of Plant Biology*, 63, 83-95.
- Voth, D. E., Broederdorf, L. J., & Graham, J. G. (2012). Bacterial Type IV secretion systems: versatile virulence machines. *Future Microbiology*, 7(2), 241-257.
- Wagner, N., Avram, O., Gold-Binshtok, D., Zerah, B., Teper, D., & Pupko, T. (2022). Effectidor: an automated machine-learning-based web server for the prediction of Tip-III secretion system effectors. *Bioinformatics*, 38(8), 2341-2343.
- Wang, J., Yang, B., Leier, A., Marquez-Lago, T. T., Hayashida, M., Rocker, A., Zhang, Y., Akutsu, T., Chou, K.-C., Strugnell, R. A., Song, J., & Lithgow, T. (2018). Bastion6: A bioinformatics approach for accurate prediction of type VI secreted effectors. *Bioinformatics*, 34(15), 2546–2555.
- Wang, N., Han, N., Tian, R., Chen, J., Gao, X., Wu, Z., Liu, Y., & Huang, L. (2021). Role of the type VI secretion system in the pathogenicity of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, the causative agent of kiwifruit bacterial canker. *Frontiers in Microbiology*, 12, 627785.
- Wang, Q., Zhang, Y., Chen, R., Zhang, L., Fu, M., & Zhang, L. (2024). Comparative genomic analyses provide insight into the pathogenicity of three *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* strains from Anhui Province, China. *BMC Genomics*, 25(1), 461.
- Wang, Y., Li, Y., Wang, J., & Wang, X. (2018). FleQ regulates both the type VI secretion system and flagella in *Pseudomonas putida*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 65(3), 419-427.
- Wei, H. L., Zhang, W., & Collmer, A. (2018). Modular study of the type III effector repertoire in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 reveals a matrix of effector interplay in pathogenesis. *Cell Reports*, 23(6), 1630-1638.
- Wei, W., Plovianich-Jones, A., Deng, W. L., Jin, Q. L., Collmer, A., Huang, H. C., & He, S. Y. (2000). The gene coding for the Hrp pilus structural protein is required for type III secretion of Hrp and Avr proteins in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(5), 2247-2252.
- Weimer, A., Kohlstedt, M., Volke, D. C., Nikel, P. I., & Wittmann, C. (2020). Industrial biotechnology of *Pseudomonas putida*: advances and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104, 7745-7766.

- Willett, J. L., Ruhe, Z. C., Goulding, C. W., Low, D. A., & Hayes, C. S. (2015). Contact-dependent growth inhibition (CDI) and CdiB/CdiA two-partner secretion proteins. *Journal of Molecular Biology*, 427(23), 3754-3765.
- Wittgens, A., Tiso, T., Arndt, T. T., Wenk, P., Hemmerich, J., Müller, C., Wichmann, R., Küpper, B., Zwick, M., Wilhelm, S., Hausmann, R., Sylđatk, C., Rosenau, F., & Blank, L. M. (2011). Growth independent rhamnolipid production from glucose using the non-pathogenic *Pseudomonas putida* KT2440. *Microbial Cell Factories*, 10, 1-18.
- Wu, L., McGrane, R. S., & Beattie, G. A. (2013). Light regulation of swarming motility in *Pseudomonas syringae* integrates signaling pathways mediated by a bacteriophytochrome and a LOV protein. *MBio*, 4(3), 10-1128.
- Xie, Y., Shao, X., & Deng, X. (2019). Regulation of type III secretion system in *Pseudomonas syringae*. *Environmental Microbiology*, 21(12), 4465-4477.
- Xin, X. F., & He, S. Y. (2013). *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000: a model pathogen for probing disease susceptibility and hormone signaling in plants. *Annual Review of Phytopathology*, 51, 473-498.
- Xin, X. F., Nomura, K., Aung, K., Velásquez, A. C., Yao, J., Boutrot, F., Chang, J. H., Zipfel, C., & He, S. Y. (2016). Bacteria establish an aqueous living space in plants crucial for virulence. *Nature*, 539(7630), 524-529.
- Xin, X. F., Kvitko, B., & He, S. Y. (2018). *Pseudomonas syringae*: what it takes to be a pathogen. *Nature Reviews Microbiology*, 16(5), 316-328.
- Yu, X., Yan, Y., Zeng, J., Liu, Y., Sun, X., Wang, Z., & Li, L. (2024). T6SS nuclease effectors in *Pseudomonas syringae* act as potent antimicrobials in interbacterial competition. *Journal of Bacteriology*, e00273-23.
- Zankari, E., Hasman, H., Cosentino, S., Vestergaard, M., Rasmussen, S., Lund, O., Aarestrup, F. M., & Larsen, M. V. (2012). Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67, 2640-2644.
- Zhao, L., Li, S., Yu, Q., Zhang, C., Wang, L., Jiang, Y., Wu, Z., & Pi, Z. (2023). Vernalization promotes GA-mediated bolting initiation via the inhibition of ABA and JA biosynthesis. *Agronomy*, 13(5), 1251.
- Zheng, X. Y., Spivey, N. W., Zeng, W., Liu, P. P., Fu, Z. Q., Klessig, D. F., He, S. Y., & Dong, X. (2012). Coronatine promotes *Pseudomonas syringae* virulence in plants by activating a signaling cascade that inhibits salicylic acid accumulation. *Cell Host & Microbe*, 11(6), 587-596.

8. Prilozi

Prilog 1. Opšte karakteristike genoma *P. syringae* korišćenih u komparativnim analizama

Vrsta	Soj	Filogenetska grupa	Poreklo izolata	Geografsko poreklo	GenBank pristupna šifra	Veličina genoma (bp)	GC %	Protein kodirajuće sekvence	Geni za tRNK	Geni za rRNK
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>aptata</i>	P16	FG02	<i>Beta vulgaris</i>	Srbija	GCA_018642105.1	5974057	59	5360	56	9
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>aptata</i>	P21	FG02	<i>Beta vulgaris</i>	Srbija	GCA_018530765.1	6353752	58,8	5727	56	9
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>aptata</i>	G733	FG02	<i>Oryza sativa</i>	-	GCA_003699535.1	5802565	59,3	5006	44	3
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>aptata</i>	ICMP11935	FG02	<i>Beta vulgaris</i>	Francuska	GCA_003702445.1	5984734	58,7	4700	29	3
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>aptata</i>	DSM50252	FG02	<i>Beta vulgaris</i>	-	GCA_000145905.1	6364678	59,1	6364	36	4
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>aptata</i>	ICMP459	FG02	<i>Beta vulgaris</i>	SAD	GCA_001401335.1	5977364	58,8	5005	44	3
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>aptata</i>	ICMP4388	FG02	<i>Beta vulgaris</i>	SAD	GCA_003700795.1	5859953	58,7	4533	30	3
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>aceris</i>	M302273	FG02	<i>Acer</i> sp.	SAD	GCA_000145925.1	6250569	59	5600	40	3
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>aceris</i>	A10853	FG02	<i>Acer</i> sp.	SAD	GCA_001270465.1	6285198	59	5341	42	3
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>aceris</i>	ICMP9850	FG02	<i>Acer buergerianum</i>	Japan	GCA_003700545.1	5873352	59	5002	40	4
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>aceris</i>	ICMP9852	FG02	<i>Acer buergerianum</i>	Japan	GCA_003700575.1	5777533	59	4954	52	4
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>aceris</i>	ICMP9851	FG02	<i>Acer buergerianum</i>	Japan	GCA_003701675.1	5809409	59	4905	37	3
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>aceris</i>	ICMP2802	FG02	<i>Acer</i> sp.	-	GCA_001400655.1	6300961	59	5486	53	4
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i>	LMG5059	FG02	<i>Triticum aestivum</i>	Novi Zeland	GCA_003047185.1	6080544	58,9	5060	67	16

<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i>	DSM5025	FG02	<i>Triticum</i> <i>aestivum</i>	SAD	GCA_003699335.1	5848565	59	5008	46	3
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i>	ICMP4394	FG02	<i>Triticum</i> <i>aestivum</i>	Novi Zeland	GCA_001400125.1	6012246	58,5	5129	57	4
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i>	ICMP5011	FG02	<i>Triticum</i> <i>aestivum</i>	Zimbabwe	GCA_003699595.1	5890334	59	5107	57	4
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i>	ICMP1852	FG02	<i>Triticum</i> <i>aestivum</i>	Novi Zeland	GCA_003700175.1	5851851	59	5384	44	3
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i>	DSM50255	FG02	<i>Triticum</i> <i>aestivum</i>	SAD	GCA_000498595.1	5777269	59	5204	31	3
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>dysoxyli</i>	CFBP2356	FG02	<i>Dysoxylum</i> <i>spectabile</i>	Novi Zeland	GCA_009898305.1	5944509	59	5023	55	7
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>japonica</i>	M301072	FG02	-*	SAD	GCA_000145785.1	6380619	59	8796	48	6
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lapse</i>	ATCC10859	FG02	<i>Triticum</i> <i>aestivum</i>	-	GCA_001482725.1	5918899	59,1	4973	63	16
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lapse</i>	ICMP3946	FG02	-	-	GCA_003698895.1	5856122	59	5010	42	4
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lapse</i>	ICMP3947	FG02	<i>Zea</i> sp.	-	GCA_001400495.1	5850429	59	5003	42	2
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lapse</i>	ICMP8813	FG02	-	-	GCA_003699285.1	5838357	59	5022	40	2
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>papulans</i>	CFBP1754	FG02	<i>Malus</i> <i>sylvestris</i>	Kanada	GCA_001535905.1	6180564	58,5	5467	60	9
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>papulans</i>	ICMP4040	FG02	<i>Malus</i> <i>domestica</i>	SAD	GCA_003699835.1	6100320	58,5	5370	48	3
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>papulans</i>	ICMP4048	FG02	<i>Malus</i> <i>domestica</i>	Kanada	GCA_001401005.1	6097472	58,5	5341	45	3
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>papulans</i>	ICMP4050	FG02	<i>Malus</i> <i>domestica</i>	Kanada	GCA_003702795.1	6128836	58,5	5381	42	3
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>papulans</i>	ICMP4986	FG02	<i>Malus</i> <i>domestica</i>	SAD	GCA_003699185.1	6351666	58,5	5751	44	3
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>pisi</i>	PP1	FG02	<i>Pisum sativum</i>	Japan	GCA_000452445.3	6039562	58,8	5136	64	16
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>pisi</i>	202	FG02	<i>Pisum sativum</i>	SAD	GCA_003205965.1	6505845	58	5671	62	7

<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lisi</i>	203	FG02	<i>Pisum sativum</i>	Novi Zeland	GCA_003205895.1	6576361	57,5	5762	62	6
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lisi</i>	895A	FG02	<i>Pisum sativum</i>	-	GCA_003699325.1	5997727	58,5	5180	47	4
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lisi</i>	H6E5	FG02	<i>Pisum sativum</i>	-	GCA_003699005.1	6150060	58,5	5347	47	4
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lisi</i>	H5E3	FG02	<i>Pisum sativum</i>	-	GCA_003699035.1	5951392	58,5	5163	45	4
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lisi</i>	ICMP2788	FG02	<i>Pisum sativum</i>	SAD	GCA_003700675.1	6282175	58	5443	42	4
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lisi</i>	R6a	FG02	<i>Pisum sativum</i>	-	GCA_003698965.1	6185107	58,5	5399	41	3
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lisi</i>	ICMP4433	FG02	<i>Pisum sativum</i>	Kanada	GCA_003703105.1	6175014	58	5351	35	3
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lisi</i>	1704B	FG02	<i>Pisum sativum</i>	-	GCA_000145805.1	6520586	-	9160	48	3
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>solidagae</i>	ICMP16927	FG02	<i>Solidago</i> <i>canadensis</i>	Japan	GCA_003701885.1	5938726	59	5028	38	3
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>solidagae</i>	ICMP16925	FG02	<i>Solidago</i> <i>altissima</i>	Japan	GCA_001401055.1	5980445	59	5087	33	3
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>solidagae</i>	ICMP16926	FG02	<i>Solidago</i> <i>canadensis</i>	Japan	GCA_003701925.1	5924161	59	5052	32	3
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	CFBP4215	FG02	<i>Prunus avium</i>	Francuska	GCA_900235825.1	6035297	59,3	4984	63	16
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	B728a	FG02	<i>Phaseolus</i> <i>vulgaris</i>	SAD	GCA_000012245.1	6093698	59,2	5072	63	16
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	9097	FG02	<i>Prunus sp.</i>	Velika Britanija	GCA_002905815.2	5929959	59,3	4886	63	15
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	HS191	FG02	<i>Proso millet</i>	Australija	GCA_000988395.1	6002759	58,9	5065	65	16
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	CFBP2118	FG02	<i>Prunus cerasus</i>	Francuska	GCA_900235865.1	6031285	59,3	4983	63	16
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	B301D	FG02	<i>Pyrus</i> <i>communis</i>	Velika Britanija	GCA_000988485.1	6094819	59,2	5095	63	16
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	UMAF0158	FG02	<i>Mangifera</i> <i>indica</i>	Španija	GCA_001281365.1	5850990	59,3	4973	63	16

<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	SM	FG02	<i>Triticum</i> <i>aestivum</i>	SAD	GCA_000412165.1	6094398	59	5172	64	16
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	B64	FG02	<i>Triticum</i> <i>aestivum</i>	-	GCA_000331385.1	5873298	59	4938	61	13
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	ICMP3023	FG02	<i>Syringa</i> <i>vulgaris</i>	Velika Britanija	GCA_001401075.1	6073080	59	5127	56	4
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	9656	FG02	<i>Prunus avium</i>	Velika Britanija	GCA_002905975.1	5980728	59	5015	55	9
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	100	FG02	<i>Phaseolus</i> <i>lunatus</i>	Kenija	GCA_002917175.1	5872916	59	4999	57	9
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	3023	FG02	<i>Syringa</i> <i>vulgaris</i>	Velika Britanija	GCA_002917245.1	6203212	59	5250	60	9
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	41A	FG02	<i>Prunus</i> <i>armeniaca</i>	Francuska	GCA_000935775.1	5983849	59	5027	52	5
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	UMAF0291	FG02	<i>Mangifera</i> <i>indica</i>	Španija	GCA_014493645.1	5857022	59	4908	57	9
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	UMAF3028	FG02	<i>Mangifera</i> <i>indica</i>	Španija	GCA_014493635.1	5856306	59	4908	60	8
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	UMAF0081	FG02	<i>Mangifera</i> <i>indica</i>	Španija	GCA_023232565.1	5874868	59	4936	58	11
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	5264	FG02	<i>Prunus avium</i>	Velika Britanija	GCA_002916225.1	6029896	59	5150	58	10
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	LMG 5084	FG02	<i>Pyrus</i> <i>communis</i>	Velika Britanija	GCA_013416855.1	6144879	59	5122	55	13
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	5275	FG02	<i>Prunus avium</i>	Velika Britanija	GCA_002916275.1	5994461	59	5051	55	5
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	8094A	FG02	<i>Prunus avium</i>	Velika Britanija	GCA_002916355.1	5942438	59	4996	57	9
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	2676C	FG02	<i>Phaseolus</i> <i>vulgaris</i>	Lesoto	GCA_002917155.1	6158476	59	5195	55	8
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	2340	FG02	<i>Pyrus sp.</i>	Mađarska	GCA_001535725.1	6181159	59	5213	58	13
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	9654	FG02	<i>Prunus</i> <i>domestica</i>	Velika Britanija	GCA_002906015.1	5941610	59	4984	55	8
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	2682C	FG02	<i>Phaseolus</i> <i>vulgaris</i>	Lesoto	GCA_002917215.1	6259099	59	5306	55	8

<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	2675C	FG02	<i>Abelmoschus</i> <i>esculentus</i>	Kenija	GCA_002917195.1	5994384	59	4999	57	12
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	NZIPFR-PS7	FG02	<i>Prunus avium</i>	Novi Zeland	GCA_002736945.1	6143879	59	5187	57	7
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	NZIPFR- IHC1	FG02	<i>Prunus</i> sp.	Novi Zeland	GCA_002736965.1	6090296	59	5111	65	13
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	HRI-W 7872	FG02	<i>Prunus</i> <i>domestica</i>	Velika Britanija	GCA_001535875.1	5899795	59	4950	55	11
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	MB03	FG02	<i>Populus</i> <i>lasiocarpa</i>	Kina	GCA_001623415.1	5777225	59	4915	53	4
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	A1M244	FG02	<i>Prunus avium</i>	Čile	GCA_022510265.1	5979725	59	4999	53	4
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	2339	FG02	<i>Prunus avium</i>	Mađarska	GCA_001535855.1	6122357	59	5098	56	12
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	1845	FG02	<i>Helianthus</i> <i>annuus</i>	Rusija	GCA_001675415.1	5768876	59	4773	58	5
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	2507	FG02	<i>Triticum</i> <i>aestivum</i>	Rusija	GCA_001675375.1	5944881	59	4929	54	4
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	Alf3	FG02	<i>Alfalfa</i>	SAD	GCA_000738515.1	5806984	59	4912	46	3
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	A2	FG02	<i>Pyrus</i> <i>calleryana</i>	-	GCA_001293665.1	5901107	59	5019	39	3
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	B48	FG02	<i>Prunus persica</i>	SAD	GCA_001293705.1	5975993	59	5083	42	3
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	ICMP4917	FG02	<i>Citrus limon</i>	Francuska	GCA_003702385.1	5928691	59	5097	41	4
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	ICMP3688	FG02	<i>Prunus dulcis</i>	Novi Zeland	GCA_003700375.1	5805147	59	4941	42	4
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	127	FG02	<i>Prunus avium</i>	Južna Afrika	GCA_002611605.1	6083167	59	5444	40	2
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	126	FG02	<i>Prunus avium</i>	Južna Afrika	GCA_002611615.1	5953004	59	5006	48	4
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	545	FG02	<i>Phaseolus</i> <i>vulgaris</i>	Kanada	GCA_003412685.1	5702919	59	4961	28	3
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	PD2774	FG02	<i>Actinidia</i> sp.	SAD	GCA_001466875.1	6357389	59	5365	52	5

<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	B301D-R	FG02	<i>Pyrus</i> <i>communis</i>	Velika Britanija	GCA_000585725.1	6036561	59	5071	54	9
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	1212	FG02	<i>Pisum sativum</i>	Velika Britanija	GCA_000452465.2	6163906	59	5284	53	4
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	9293	FG02	<i>Prunus</i> <i>domestica</i>	Velika Britanija	GCA_002905935.1	6135031	59	5336	55	8
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	9630	FG02	<i>Prunus</i> <i>domestica</i>	Velika Britanija	GCA_002905995.1	5940819	59	5115	57	11
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	9644	FG02	<i>Prunus avium</i>	Velika Britanija	GCA_002905835.1	6173193	59	5245	58	11
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	9659	FG02	<i>Prunus avium</i>	Velika Britanija	GCA_002905855.1	5943090	59	5090	54	8
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	NZIPFR- VIR1	FG02	<i>Prunus avium</i>	Novi Zeland	GCA_002736905.1	6875296	59	3705	61	7
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	WSPS007	FG02	<i>Malus</i> <i>domestica</i>	Južna Koreja	GCA_004005515.1	5498736	59,5	5134	-	-
<i>Pseudomonas syringae</i>	SAD011	FG02	<i>Stream water</i>	SAD	GCA_000452525.4	6112257	59,2	5051	62	16
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	DC3000	FG01	<i>Solanum</i> <i>lycopersicum</i>	Velika Britanija	GCA_000007805.1	6538260	58,3	5576	63	16
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>morsprunorum</i>	CFBP 2116	FG03	<i>Prunus cerasus</i>	Francuska	GCA_900289125.1	6262486	58	5385	65	16
<i>Pseudomonas tremiae</i>	CC1513	FG04	<i>Pritzelago</i> <i>alpina</i>	Francuska	GCA_000452765.1	5725032	57,5	5094	39	3
<i>Pseudomonas</i> <i>viridiflava</i>	CC1582	FG07	Epilimon	Francuska	GCA_000452505.1	5985404	59	5299	30	2
<i>Pseudomonas syringae</i>	CC1417	FG09	Epilimon	SAD	GCA_000452825.2	5648464	59	4988	41	3
<i>Pseudomonas syringae</i>	CC1557	FG10	Sneg	Francuska	GCA_000452705.3	5811653	58,5	4919	62	16
<i>Pseudomonas syringae</i>	UB246	FG13	Reka	Francuska	GCA_000452865.1	6176522	57	5509	28	2

Prilog 2. Identifikacija *P. putida* izolata na osnovu preklapanja sekvenci gena za 16S rRNK sa poznatim sojevima iz NCBI baze.

Šifra izolata	Soj sa najvećim procentom preklapanja iz NCBI	% pokrivenosti	% preklapanja
S1/33	<i>Pseudomonas putida</i> CP1V1-01	99	99,55
S2/6	<i>Pseudomonas putida</i> BS3701	99	100,00
S2/7	<i>Pseudomonas putida</i> SC25	99	99,07
S2/13	<i>Pseudomonas putida</i> SC25	99	99,32
S2/14	<i>Pseudomonas putida</i> OBS-2 16S	99	99,82
S2/20	<i>Pseudomonas putida</i> SC25	99	99,83
S2/27	<i>Pseudomonas putida</i> SC25	100	99,29
S2/32	<i>Pseudomonas putida</i> SC25	100	99,59
S3/6	<i>Pseudomonas putida</i> F-1 16S	98	99,26
S3/8	<i>Pseudomonas putida</i> SC25	100	99,91
S3/9	<i>Pseudomonas putida</i> SC25	99	99,82
S3/16	<i>Pseudomonas putida</i> BGRI_EBC_SS23-S10	100	99,82
S3/17	<i>Pseudomonas putida</i> B1	99	99,46
S3/18	<i>Pseudomonas putida</i> BGRI_EBC_SS23-S10	99	99,36
S3/25	<i>Pseudomonas putida</i> SC25	99	99,91
S4/3	<i>Pseudomonas putida</i> SC25	99	99,46
S4/8	<i>Pseudomonas putida</i> BGRI_EBC_SS23-S10	99	99,83
S4/13	<i>Pseudomonas putida</i> SC25	100	99,73
D1/4	<i>Pseudomonas putida</i> SC25	99	99,54
D1/8	<i>Pseudomonas putida</i> SC25	99	99,48
D1/27	<i>Pseudomonas putida</i> BGRI_EBC_SS23-S10	100	99,82
D2/24	<i>Pseudomonas putida</i> BGRI_EBC_SS23-S10	99	99,75
D2/25	<i>Pseudomonas putida</i> JCM:20129	99	99,49
D2/27	<i>Pseudomonas putida</i> DSQ4	99	99,49
D2/28	<i>Pseudomonas putida</i> JCM:20129	99	99,41
D2/29	<i>Pseudomonas putida</i> BGRI_EBC_SS23-S10	99	99,61
D2/32	<i>Pseudomonas putida</i> SC25	99	99,15
D3/18	<i>Pseudomonas putida</i> BGRI_EBC_SS23-S10	98	100,00
D3/25	<i>Pseudomonas putida</i> BGRI_EBC_SS23-S10	99	99,49
D4/22	<i>Pseudomonas putida</i> BGRI_EBC_SS23-S10	100	99,92
D5/32	<i>Pseudomonas putida</i> JCM:20129	99	98,77
D5/33	<i>Pseudomonas putida</i> JGLJF	99	99,74

Prilog 3. Statistička značajnost razlika u ekspresiji gena biljnog imuniteta u lokalnom odgovoru

	Tukey's multiple comparisons test	Razlika između srednjih vrednosti	95,00% CI (interval poverenja)	Značajnost	Prilagođena <i>p</i> -vrednost
<i>npr1</i>	I - wt + P21 vs. II - wt	0,05005	-0,1186 do 0,2187	Ne	0,8597
	I - wt + P21 vs. III - Δ tssA + P21	0,4742	0,3055 do 0,6428	Da	<0,0001
	I - wt + P21 vs. IV - Δ tssA	0,5434	0,3748 do 0,7121	Da	<0,0001
	I - wt + P21 vs. V - P21	0,1331	-0,03555 do 0,3017	Ne	0,1443
	II - wt vs. III - Δ tssA + P21	0,4241	0,2555 do 0,5928	Da	<0,0001
	II - wt vs. IV - Δ tssA	0,4934	0,3247 do 0,6620	Da	<0,0001
	II - wt vs. V - P21	0,08304	-0,08561 do 0,2517	Ne	0,5176
	III - Δ tssA + P21 vs. IV - Δ tssA	0,06926	-0,09939 do 0,2379	Ne	0,6684
	III - Δ tssA + P21 vs. V - P21	-0,3411	-0,5097 do -0,1724	Da	0,0004
	IV - Δ tssA vs. V - P21	-0,4104	-0,5790 do -0,2417	Da	<0,0001
<i>myc2</i>	I - wt + P21 vs. II - wt	-0,1543	-0,4243 do 0,1157	Ne	0,3847
	I - wt + P21 vs. III - Δ tssA + P21	0,6878	0,4178 do 0,9578	Da	<0,0001
	I - wt + P21 vs. IV - Δ tssA	0,3877	0,1177 do 0,6576	Da	0,0056
	I - wt + P21 vs. V - P21	0,4532	0,1832 do 0,7232	Da	0,0018
	II - wt vs. III - Δ tssA + P21	0,8421	0,5721 do 1,112	Da	<0,0001
	II - wt vs. IV - Δ tssA	0,542	0,2720 do 0,8120	Da	0,0004
	II - wt vs. V - P21	0,6075	0,3375 do 0,8775	Da	0,0002
	III - Δ tssA + P21 vs. IV - Δ tssA	-0,3001	-0,5701 do -0,03014	Da	0,0283
	III - Δ tssA + P21 vs. V - P21	-0,2346	-0,5046 do 0,03538	Ne	0,0972
	IV - Δ tssA vs. V - P21	0,06552	-0,2044 do 0,3355	Ne	0,9251
<i>lox</i>	I - wt + P21 vs. II - wt	-0,0003	-0,3818 do 0,3811	Ne	>0,9999
	I - wt + P21 vs. III - Δ tssA + P21	0,3496	-0,03182 do 0,7310	Ne	0,0765
	I - wt + P21 vs. IV - Δ tssA	0,5008	0,1193 do 0,8822	Da	0,0103
	I - wt + P21 vs. V - P21	0,6165	0,2350 do 0,9979	Da	0,0024
	II - wt vs. III - Δ tssA + P21	0,3499	-0,03148 do 0,7313	Ne	0,0761
	II - wt vs. IV - Δ tssA	0,5011	0,1197 do 0,8825	Da	0,0102
	II - wt vs. V - P21	0,6168	0,2354 do 0,9982	Da	0,0024
	III - Δ tssA + P21 vs. IV - Δ tssA	0,1512	-0,2302 do 0,5326	Ne	0,6949
	III - Δ tssA + P21 vs. V - P21	0,2669	-0,1145 do 0,6483	Ne	0,2207
	IV - Δ tssA vs. V - P21	0,1157	-0,2657 do 0,4971	Ne	0,8504
<i>nced</i>	I - wt + P21 vs. II - wt	-0,3541	-0,4239 do -0,2842	Da	<0,0001
	I - wt + P21 vs. III - Δ tssA + P21	0,2464	0,1765 do 0,3162	Da	<0,0001
	I - wt + P21 vs. IV - Δ tssA	0,06885	-0,0009679 do 0,1387	Ne	0,0537
	I - wt + P21 vs. V - P21	0,4256	0,3558 do 0,4954	Da	<0,0001
	II - wt vs. III - Δ tssA + P21	0,6004	0,5306 do 0,6702	Da	<0,0001
	II - wt vs. IV - Δ tssA	0,4229	0,3531 do 0,4927	Da	<0,0001
	II - wt vs. V - P21	0,7797	0,7099 do 0,8495	Da	<0,0001
	III - Δ tssA + P21 vs. IV - Δ tssA	-0,1775	-0,2473 do -0,1077	Da	<0,0001
	III - Δ tssA + P21 vs. V - P21	0,1793	0,1095 do 0,2491	Da	<0,0001
	IV - Δ tssA vs. V - P21	0,3568	0,2870 do 0,4266	Da	<0,0001

Prilog 4. Statistička značajnost razlika u ekspresiji gena biljnog imuniteta u sistemskom odgovoru

	Tukey's multiple comparisons test	Razlika između srednjih vrednosti	95,00% CI (interval poverenja)	Značajnost	Prilagođena p-vrednost
<i>npr1</i>	I - wt inf P21 vs. II - wt	-0,3512	-0,7153 do 0,01285	Ne	0,8597
	I - wt inf P21 vs. III - Δ tssA inf P21	-0,2606	-0,6246 do 0,1035	Ne	<0,0001
	I - wt inf P21 vs. IV - Δ tssA	-0,168	-0,5321 do 0,1961	Ne	<0,0001
	I - wt inf P21 vs. V- Inf P21	-0,3414	-0,7054 do 0,02272	Ne	0,1443
	II - wt vs. III - Δ tssA inf P21	0,09068	-0,2734 do 0,4548	Ne	<0,0001
	II - wt vs. IV - Δ tssA	0,1832	-0,1809 do 0,5473	Ne	<0,0001
	II - wt vs. V- Inf P21	0,009867	-0,3542 do 0,3739	Ne	0,5176
	III - Δ tssA inf P21 vs. IV - Δ tssA	0,09254	-0,2715 do 0,4566	Ne	0,6684
	III - Δ tssA inf P21 vs. V- Inf P21	-0,08081	-0,4449 do 0,2833	Ne	0,0004
	IV - Δ tssA vs. V- Inf P21	-0,1734	-0,5374 do 0,1907	Ne	<0,0001
<i>myc2</i>	I - wt inf P21 vs. II - wt	1,277	0,9682 do 1,586	Da	0,3847
	I - wt inf P21 vs. III - Δ tssA inf P21	0,01363	-0,2952 do 0,3225	Ne	<0,0001
	I - wt inf P21 vs. IV - Δ tssA	0,2395	-0,06933 do 0,5483	Ne	0,0056
	I - wt inf P21 vs. V- Inf P21	-0,6104	-0,9192 do -0,3016	Da	0,0018
	II - wt vs. III - Δ tssA inf P21	-1,263	-1,572 do -0,9546	Da	<0,0001
	II - wt vs. IV - Δ tssA	-1,038	-1,346 do -0,7287	Da	0,0004
	II - wt vs. V- Inf P21	-1,887	-2,196 do -1,579	Da	0,0002
	III - Δ tssA inf P21 vs. IV - Δ tssA	0,2259	-0,08295 do 0,5347	Ne	0,0283
	III - Δ tssA inf P21 vs. V- Inf P21	-0,624	-0,9328 do -0,3152	Da	0,0972
	IV - Δ tssA vs. V- Inf P21	-0,8499	-1,159 do -0,5411	Da	0,9251
<i>lox</i>	I - wt inf P21 vs. II - wt	0,06016	-0,1828 do 0,3031	Ne	>0,9999
	I - wt inf P21 vs. III - Δ tssA inf P21	-0,02235	-0,2653 do 0,2206	Ne	0,0765
	I - wt inf P21 vs. IV - Δ tssA	-0,2184	-0,4614 do 0,02456	Ne	0,0103
	I - wt inf P21 vs. V- Inf P21	0,02305	-0,2199 do 0,2660	Ne	0,0024
	II - wt vs. III - Δ tssA inf P21	-0,08251	-0,3255 do 0,1605	Ne	0,0761
	II - wt vs. IV - Δ tssA	-0,2786	-0,5215 do -0,03560	Da	0,0102
	II - wt vs. V- Inf P21	-0,03712	-0,2801 do 0,2059	Ne	0,0024
	III - Δ tssA inf P21 vs. IV - Δ tssA	-0,1961	-0,4390 do 0,04691	Ne	0,6949
	III - Δ tssA inf P21 vs. V- Inf P21	0,0454	-0,1976 do 0,2884	Ne	0,2207
	IV - Δ tssA vs. V- Inf P21	0,2415	-0,001514 do 0,4844	Ne	0,8504
<i>nced</i>	I - wt inf P21 vs. II - wt	0,5676	0,09748 do 1,038	Da	<0,0001
	I - wt inf P21 vs. III - Δ tssA inf P21	-0,1217	-0,5919 do 0,3484	Ne	<0,0001
	I - wt inf P21 vs. IV - Δ tssA	0,1328	-0,3374 do 0,6029	Ne	0,0537
	I - wt inf P21 vs. V- Inf P21	-0,2717	-0,7419 do 0,1984	Ne	<0,0001
	II - wt vs. III - Δ tssA inf P21	-0,6893	-1,159 do -0,2192	Da	<0,0001
	II - wt vs. IV - Δ tssA	-0,4349	-0,9050 do 0,03528	Ne	<0,0001
	II - wt vs. V- Inf P21	-0,8394	-1,309 do -0,3692	Da	<0,0001
	III - Δ tssA inf P21 vs. IV - Δ tssA	0,2545	-0,2157 do 0,7246	Ne	<0,0001
	III - Δ tssA inf P21 vs. V- Inf P21	-0,15	-0,6202 do 0,3201	Ne	<0,0001
	IV - Δ tssA vs. V- Inf P21	-0,4045	-0,8746 do 0,06564	Ne	<0,0001

Biografija autora

Tamara V. Ranković (rođ. Pavlović) rođena je 03.09.1993. godine u Valjevu. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu, studijski program Biologija, modul Biologija, upisala je školske 2012/2013 godine, a diplomirala je 2017. godine sa prosečnom ocenom 9,28. Školske 2017/2018 upisala je Master akademske studije, studijski program Biologija, modul Biologija mikroorganizama. Master rad je odradila na Katedri za mikrobiologiju Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, a master tezu pod nazivom „Ispitivanje fenolnog profila, antioksidativne i antimikrobne aktivnosti ekstrakata cveta lipe“ je odbranila 2018. godine sa ocenom 10. Tokom master studija pohađala je stručnu praksu u kompaniji „Hemofarm“, Vršac, u Kontroli kvaliteta – Služba za mikrobiološka ispitivanja. Doktorske akademske studije, studijska grupa Biologija, modul Mikrobiologija, upisala je školske 2018/2019 godine. Od 2019. godine bila je angažovana kao istraživač-pripravnik na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (OI 173026) „Molekularna karakterizacija bakterija iz rodova *Bacillus* i *Pseudomonas* kao potencijalnih agenasa za biološku kontrolu“. Od 2021. godine je zaposlena na Biološkom fakultetu u svojstvu istraživača-saradnika. Učestvovala je na projektu „Razvoj jedinstvenih DNK markera za monitoring biokontrolnog soja *Bacillus amyloliquefaciens* SS-12.6 sa ciljem uspostavljanja koncepta evaluacije efikasnosti *in vivo*“ (2020-2021), finansiranim od strane Centra za razvoj liderstva u okviru programa „Pokreni se za nauku 2020“. Bila je učesnik na međunarodnom projektu „Development of bacterial inoculants for biological control of plant pathogens“ (2020-2022) finansiranog od strane ICGEB – Trieste Grant CRP/SRB19-02 i bilateralnom projektu između Republike Srbije i Republike Francuske „Očuvanje biljnog zdravlja: Razvoj kapaciteta za terenski nadzor *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* na usevima paradajza“ (2023-2024). Učesnik je bilateralnog projekta između Republike Srbije i Republike Slovenije „Stvaranje kapaciteta za nadzor biljnih patogena: Razvijanje qPCR testova za detekciju *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* patogena šećerne repe“ (2023-2025), kao i međunarodnog projekta „Functional characterization of the Type III secretion system in plant beneficial *Pseudomonas* associated with sugar beet (*Beta vulgaris* L.)“ (2024-2027), CRP/SRB23-04EC. Od školske 2018/2019. godine uključena je izvođenje praktične nastave na Katedri za mikrobiologiju na predmetima Mikrobiologija, Mikrobiološki praktikum i Metode u mikrobiologiji. Učestvovala je u izvođenju seminara u Istraživačkoj stanici Petnica, u svojstvu saradnika iz oblasti Biologija (uža oblast Mikrobiologija). Član je Srpskog biološkog društva, Udruženja mikrobiologa Srbije, Društva genetičara Srbije i Federacije evropskih mikrobioloških društava (FEMS). Dobitnica je FEMS Congress Attendance Grant-a za učešće na kongresu World Microbe Forum (2021). Dobila je sertifikat za pohađanje radionice Američkog društva za mikrobiologiju pod nazivom „ASM Workshop on Scientific Writing and Publishing“. Dobila je sertifikat za učešće u interaktivnoj radionici „U korak sa inovacijama“ u organizaciji kompanija PerkinElmer i Superlab. Do sada je objavila pet naučnih radova od kojih je jedan iz kategorije M21a, jedan iz kategorije M21, dva iz kategorije M22 i jedan iz kategorije M23. Takođe je učestvovala sa 14 saopštenja na nacionalnim i međunarodnim naučnim skupovima.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а _____ Тамара Ранковић _____

број индекса _____ Б3011/2018 _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Анализа генома одабраних фитопатогених сојева *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* и њихова биолошка контрола посредована Тип VI секреторним системом *Pseudomonas putida*

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

Потпис докторанда

У Београду, 10.03.2025.



Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Тамара Ранковић

Број индекса Б3011/2018

Студијски програм Биологија

Наслов рада Анализа генома одабраних фитопатогених сојева *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* и њихова биолошка контрола посредована Тип VI секреторним системом *Pseudomonas putida*

Ментор проф. др Славиша Станковић, др Иван Николић

Потписани/а Тамара Ранковић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 10.03.2025.



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Анализа генома одабраних фитопатогених сојева *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* и њихова биолошка контрола посредована Тип VI секреторним системом *Pseudomonas putida*

која је моје ауторско дело.

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

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
- ③ Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 10.03.2025.



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