



UNIVERZITET U NOVOM SADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET



Ekologija i suzbijanje *Xanthomonas* *campestris* pv. *campestris*

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor:
Prof. dr Mila Grahovac

Kandidat:
Mast. inž. polj. Slobodan Vlajić

Novi Sad, 2023. godine



UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF AGRICULTURE



Ecology and control of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

Doctoral Dissertation

Supervisor:
Professor dr Mila Grahovac

Candidate:
M.Sc. Slobodan Vlajić

Novi Sad, 2023

УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА

| | |
|---|--|
| Врста рада: | Докторска дисертација |
| Име и презиме аутора: | Слободан Влајић |
| Ментор (титула, име, презиме, звање, институција) | Др Мила Граховац, ванредни професор, Пољопривредни факултет, Универзитет у Новом Саду |
| Наслов рада: | Екологија и сузбијање <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> |
| Језик публикације (писмо): | Српски (ћирилица) |
| Физички опис рада: | Унети број: Страница 164 Поглавља 10 Референци 338 Табела 29 Слика 27 Графикона 5 Прилога 7 |
| Научна област: | Биотехнологија |
| Ужа научна област (научна дисциплина): | Фитопатологија |
| Кључне речи / предметна одредница: | бактерија, црна трулеж, екологија, сузбијање |
| Резиме на језику рада: | <p>У раду је проучавана екологија и сузбијање бактерије <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> (Хсс), проузроковача црне трулежи купусњача у Србији. Током 2014–2016. године прикупљени су узорци оболелих листова са купуса, карфиола, броколија, кеља и уљане репице са различитих локалитета на територији Републике Србије, као и узорци земљишта. Сакупљање узорака сертификованог и природног семена вршено је у периоду од три године (2015–2017). Различитим поступцима изолације је добијено 128 изолата: 82 пореклом из листа, 26 из земљишта и 20 са семена. На основу тестова патогености, морфолошких одлика и биохемијско – физиолошких тестова изолати су прелиминарно идентификовани као врста <i>X. c.</i> pv. <i>campestris</i>. Серолошка испитивања су обухватила примену директне имуноензимске методе на плочи (DAS-ELISA), која је потврдила антигенску униформност проучаваних сојева Хсс на купусњачама у Србији. У молекуларној анализи применом m-PCR, изведеног сетом прајмера Zup 2309/Zup 2310, као и DLH 120/DLH 125, код свих проучаваних изолата, и контролног референтног соја NCPPV 1144, амплификовани су фрагменти нуклеинских киселина величине 370 и 619 bp, респективно, који одговарају врсти Хсс. Умножавањем секвенци 16S rRNK гена, те њиховим поређењем са секвенцама из NCBI базе, утврђен је висок степен сличности (100%) са осталим сојевима Хсс, депонованим у ову базу. У циљу утврђивања епидемиологије и флукуације Хсс у земљишту, рађено је узорковање</p> |

| | |
|---|--|
| | <p>земљишта са исте парцеле, једном месечно у периоду од 24 месеца. Временски, бактерија <i>Xcc</i> је детектована у периоду од септембра до новембра, при опсегу средњих дневних температура на 5 cm висине од -0,1–12,8 °C, као и од априла до јуна са опсегом температура 1,8–14 °C. Присуство <i>Xcc</i> у земљишту није доказано у периоду од децембра до марта при температурном интервалу -5,1–1,5 °C, као и у јулу месецу у коме су забележене средње дневне температуре на 5 cm од 14,6 °C. Испитивањем осетљивости проучаваних сојева, утврђена је инхибиторна концентрација од 300 ppm за све испитиване облике бакра. При концентрацији бакра од 200 ppm, забележен је развој 42 изолата код бакар (II) – сулфата, 49 код бакар – хидроксида и 60 изолата код бакар – оксихлорида, од укупно 114 изолата. Концентрација 100 ppm испитиваних облика бакарних једињења, омогућила је развој свих испитиваних изолата. Испитивањем специфичности изолата бактериофага према врсти <i>Xcc</i>, утврђено је да су изолати ускоспецифични, испољавајући према поменутој врсти липолитичку активност. Испитивањем утицаја температуре на патогеност изолата у <i>in vitro</i> условима, установљено је да температуре у опсегу 24–32 °C обезбеђују појаву јасно видљивих симптома, док је температура од 28 °C оптимална за развој обољења. Температуре од 16 °C и 36 °C узрокују спорији развој симптома. Утврђивањем ефикасности бактерицида применом вештачке инокулације <i>Xcc</i> у пољским условима, најмањи интензитет заразе је забележен у третману са комбинацијом препарата бакар – хидроксид 0,5% + фосетил – Al 0,2% као и у третману са бакар – хидроксидом 0,5% + манкозебом 0,25%. У условима спонтане инфекције мањи интензитет заразе у односу на друге испитиване бактерициде, забележен је у истим третманима са наведеним комбинацијама препарата као и у условима вештачке инокулације. Већина испитиваних третмана у односу на контролни третман је статистички значајна или високо статистички значајна. Анализом утицаја третмана на просечну масу главице, утврђена је највећа маса од 1,94 kg током 2014. године у третману бакар – хидроксидом 0,5% + фосетил – Al 0,2%. У наредне две године испитивања у третману са бакар – хидроксидом 0,5% + манкозеб 0,25% забележена је највећа просечна масе главица 1,60 kg током 2015. године и 1,54 kg у 2016 години.</p> |
| <p>Датум прихватања теме од стране надлежног већа:</p> | <p>21.02.2020.</p> |
| <p>Датум одбране: (Попуњава одговарајућа служба)</p> | |
| <p>Чланови комисије: (титула, име, презиме, звање, институција)</p> | <p>Председник: _____ др Драгана Будаков, ванредни професор, Универзитет у Новом Саду, Пољопривредни факултет</p> <p>Ментор: _____ др Мила Граховац, ванредни професор, Универзитет у Новом Саду, Пољопривредни факултет</p> |

| | |
|-----------|---|
| | <p>Члан: _____ др Јелица Гвоздановић – Варга, научни саветник, Институт за ратарство и повртарство, Институт од националног значаја за Републику Србију, Нови Сад</p> <p>Члан: _____ др Маја Игњатов, научни саветник, Институт за ратарство и повртарство, Институт од националног значаја за Републику Србију, Нови Сад</p> |
| Напомена: | |

KEY WORD DOCUMENTATION

| | |
|--|---|
| Document type: | Doctoral dissertation |
| Author: | Slobodan Vlajić |
| Supervisor (title, first name, last name, position, institution) | Mila Grahovac, Ph.D, Associate professor, Faculty of Agriculture University of Novi Sad, |
| Thesis title: | Ecology and control of <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> |
| Language of text (script): | Serbian language (latin) |
| Physical description: | Number of: Pages 164 Chapters 10 References 338 Tables 29 Illustrations 27 Graphs 5 Appendices 7 |
| Scientific field: | Biotechnical Sciences |
| Scientific subfield (scientific discipline): | Phytopathology |
| Subject, Key words: | bacteria, black rot, ecology, control |
| Abstract in English language: | <p>In this paper, the bacterium <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> (<i>Xcc</i>) casual agent of black rot of Brassica vegetables in Serbia was studied. During 2014–2016, samples of infected leaves from cabbage, cauliflower, broccoli, kale and rapeseed from various localities in the territory of the Republic of Serbia and soil samples were collected. Collecting of samples of certified and natural seeds was performed over a period of three years (2015–2017). 128 isolates were obtained by different isolation procedures: 82 originating from leaves, 26 from soil and 20 from seeds. Based on pathogenicity tests, morphological characteristics and results of biochemical and physiological tests, the isolates were preliminarily identified as species <i>X. c.</i> pv. <i>campestris</i>. Serological research, included the application of the direct enzyme – linked immunosorbent assay (DAS-ELISA), and confirmed the antigenic uniformity of the studied <i>Xcc</i> strains in herbaceous vegetables in Serbia. In molecular test performed by the m-PCR with the primer set Zup 2309/Zup 2310 (370 bp), as well as DLH 120/DLH 125 (619 bp), in all studied isolates, and the control reference strain NCPPB 1144, nucleic acid fragments of sizes 370 and 619 bp were amplified, that corresponds to the identity of the strain <i>Xcc</i>. By determining and studying the sequences of the 16S rRNA gene, and comparing them with the sequences from the NCBI base, a high degree of similarity (100%) with other <i>Xcc</i> strains deposited in this base was also determined. In order to determine the epidemiology and fluctuation of the <i>Xcc</i> in the soil, soil sampling was performed from the same plot, once a month for a period of 24 months. Temporally, the bacterium <i>Xcc</i> was detected in the period from September to November, with a range of mean daily soil</p> |

| | |
|---|---|
| | <p>temperatures at 5 cm of -0.1–12.8 °C, as well as from April to June with a temperature range of 1.8–14 °C . The presence of <i>Xcc</i> in the soil was not proven in the period from December to March at the temperature interval - 5.1–1.5 °C, as well as in the month of July, in which mean daily temperatures at 5 cm of 14.6 °C were recorded. By testing the susceptibility of the studied strains, an inhibitory concentration of 300 ppm was determined for all tested forms of copper. At a copper concentration of 200 ppm, the development of 42 isolates in copper (II) – sulfate, 49 in copper hydroxide and 60 isolates in copper oxychloride was recorded of 114 isolates in total. The concentration of 100 ppm of the tested forms of copper compounds enabled the development of all isolates. By examining the specificity of bacteriophage isolates according to the <i>Xcc</i> species, it was determined that the isolates are narrowly specific according to the mentioned species, exhibiting lipolytic activity. Examining the effect of the temperature on the pathogenicity of isolates in vitro, it was concluded that the temperatures in the range from 24 to 32 °C influenced the appearance of clearly visible symptoms, while a temperature of 28 °C is optimal for the development of the disease. Temperatures of 16 and 36 °C affected the poor development of the disease and the appearance of the symptoms. By determining the effectiveness of the bactericide using artificial inoculation <i>Xcc</i> in field conditions, the lowest infection intensity was recorded in the treatment with the combination of copper hydroxide 0.5% + fosetyl – Al 0.2% as well as in the treatment with copper hydroxide 0.5% + mancozeb 0,25%. In the conditions of spontaneous infection, a lower intensity of infection compared to the other tested bactericides was recorded in the same treatments with the mentioned combinations of the product as in the conditions of artificial inoculation. Most of the investigated treatments compared to the control treatment are statistically significant or highly statistically significant. By analyzing the effect of the treatment on the average weight of the cabbage head, the highest weight of 1.94 kg was determined in 2014 in the treatment with copper hydroxide 0.5% + fosetyl – Al 0.2%. In the next two years of testing with copper hydroxide 0.5% + mancozeb 0.25%, the highest average cabbage head weight was achieved: 1.60 kg in 2015 and 1.54 kg in 2016.</p> |
| Accepted on Scientific Board on: | 21.02.2020. |
| Defended: (Filled by the faculty service) | |
| Thesis Defend Board: (title, first name, last name, position, institution) | <p>President: _____ Dragana Budakov, Ph.D, Associate professor, University of Novom Sadu, Faculty of Agriculture</p> <p>Supervisor: _____ Mila Grahovac, Ph.D, Associate professor, University of Novom Sadu, Faculty of Agriculture</p> <p>Member: _____ Jelica Gvozdanić – Varga, Ph.D, Principal Research Fellow, Institute of Field and Vegetable Crops, National Institute of the Republic of Serbia, Novi Sad</p> |

| | |
|-------|---|
| | <p>Member: _____ Maja Ignjatov, Ph.D, Principal Research Fellow, Institute of Field and Vegetable Crops, National Institute of the Republic of Serbia, Novi Sad</p> |
| Note: | |

ZAHVALNICA

U spomen mentoru prof. dr Stevanu Mašireviću, uz kog sam upoznao fitopatologiju, koji me je vodio kroz ovu disciplinu i pomogao da odaberem temu za disertaciju. Strpljenjem i podrškom preneo mi je neizmerno znanje, naučio me nauci i životu, učenju i radu, veri i dostojanstvu.

Velika zahvalnost mentoru prof. dr Mili Grahovac na nesebičnoj i svesrdačnoj pomoći u toku izrade ove disertacije.

Prof. dr Dragani Budakov se zahvaljujem na konstruktivnim savetima i sugestijama.

Dr Jelici Gvozdanić Varga velika zahvalnost na nesebičnoj i bezrezernoj pomoći, prenetom znanju i strpljenju.

Prof. dr Dragutinu Đukiću se zahvaljem, jer je savetima učinio da disertacija bude bolja i kvalitetnija.

Prof. dr Gordani Kozoderović se zahvaljujem na pomoći u savladavanju tehnika molekularnih metoda identifikacije.

Zahvaljujem se dr Maji Ignjatov, koja je koordinirala aktivnosti vezane za molekularnu identifikaciju i filogenetsku analizu proučavanih izolata u okviru projekta TR31030.

Zahvaljujem se dr Dragani Milošević, koja je koordinirala aktivnosti vezane za primenu serološke metode u cilju detekcije proučavanih izolata u okviru projekta TR31030.

Zahvaljujem se dr Gordani Tamindžić na angažmanu prilikom odabira i laboratorijskog proučavanja odabranih genotipova vrsta iz familije Brassicaceae.

Zahvaljujem se dr Žarku Ivanoviću na pomoći u filogenetskoj analizi proučavanih izolata. Takođe se zahvaljujem dr Miroslavu Zoriću na neizmernoj pomoći u statističkoj obradi podataka.

Zahvaljujem se prof. dr Alex Ignatov sa Peoples' Friendship University of Russia na sugestijama, literaturi i izvorima koji su korišćeni u disertaciji.

Na kraju, ali ne i manje bitno posebno se zahvaljujem mojoj Ani, porodici, kumovima i prijateljima na podršci i razumevanju.

*Mojima u spomen, jer su se suprostavili bolesti
koju nisu mogli pobediti, a moj život su ispunili ljubavlju*

Večno zahvalan

Slobodan A. Vlajić

SADRŽAJ

| | |
|--|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 2. PREGLED LITERATURE | 3 |
| 2. 1. Familija <i>Brassicaceae</i> | 3 |
| 2. 2. Bakterijska oboljenja biljaka familije <i>Brassicaceae</i> | 3 |
| 2. 3. Istorija pojave i rasprostranjenost <i>Xcc</i> | 5 |
| 2. 4. Ekonomski značaj | 7 |
| 2. 5. Taksonomska pozicija bakterije <i>X. campestris</i> | 8 |
| 2. 6. Simptomi bolesti | 10 |
| 2. 7. Morfološke i odgajivačke odlike..... | 12 |
| 2. 8. Biologija patogena..... | 12 |
| 2. 9. Biohemijsko – fiziološke odlike..... | 15 |
| 2. 10. Patogene odlike | 15 |
| 2. 11. Serološke odlike | 18 |
| 2. 12. Molekularne odlike | 19 |
| 2. 13. Suzbijanje..... | 20 |
| 3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA..... | 24 |
| 4. RADNA HIPOTEZA | 25 |
| 5. EKOLOŠKI USLOVI | 26 |
| 5. 1. Zemljišni uslovi..... | 26 |
| 5. 2. Klimatski uslovi | 27 |
| 6. MATERIJAL I METODE RADA | 30 |
| 6. 1. Lokaliteti i način uzorkovanja..... | 30 |
| 6. 2. Izolacija <i>Xcc</i> iz listova..... | 35 |
| 6. 3. Izolacija <i>Xcc</i> iz zemljišta..... | 35 |
| 6. 4. Izolacija <i>Xcc</i> iz semena kupusa | 36 |
| 6. 5. Izolacija bakteriofaga | 38 |
| 6. 6. Provera patogenosti izolata | 39 |
| 6. 7. Odgajivačke odlike izolata | 40 |
| 6. 8. Morfološke odlike izolata..... | 42 |
| 6. 9. Biohemijsko – fiziološke odlike izolata | 43 |

| | |
|--|-----|
| 6. 10. Serološke odlike izolata | 46 |
| 6. 11. Molekularna identifikacija izolata..... | 48 |
| 6. 12. Osetljivost izolata <i>Xcc</i> na bakarne preparate <i>in vitro</i> | 52 |
| 6. 13. Specifičnost bakteriofaga prema <i>Xcc</i> | 52 |
| 6. 14. Uticaj temperature na razvoj bolesti <i>in vitro</i> | 53 |
| 6. 15. Ispitivanje baktericida u poljskim uslovima..... | 55 |
| 7. REZULTATI..... | 59 |
| 7. 1. Sakupljanje uzoraka | 59 |
| 7. 2. Izolacija <i>Xcc</i> iz listova..... | 64 |
| 7. 3. Izolacija iz semena | 66 |
| 7. 4. Izolacija <i>Xcc</i> iz zemljišta..... | 67 |
| 7. 5. Izolacija bakteriofaga | 69 |
| 7. 6. Provera patogenosti izolata | 70 |
| 7. 7. Odgajivačke odlike..... | 78 |
| 7. 8. Morfološke odlike | 81 |
| 7. 9. Biohemijsko – fiziološke odlike izolata | 81 |
| 7. 10. Serološke odlike | 84 |
| 7. 11. Molekularna identifikacija | 85 |
| 7. 12. Analiza 16S rRNK sekvenci | 86 |
| 7. 13. Osetljivost izolata <i>Xcc</i> na bakarne preparate <i>in vitro</i> | 89 |
| 7. 14. Specifičnost bakteriofaga prema <i>Xcc</i> | 92 |
| 7. 15. Uticaj temperature na razvoj bolesti <i>in vitro</i> | 94 |
| 7. 16. Rezultati primene baktericida u poljskim uslovima | 94 |
| 8. DISKUSIJA..... | 105 |
| 9. ZAKLJUČAK | 116 |
| 10. LITERATURA..... | 118 |
| PRILOZI | 148 |
| BIOGRAFIJA | 161 |

1. UVOD

Kupusnjače predstavljaju značajnu grupu povrća, kako zbog visokih hranljivih vrednosti i sadržaja vitamina, minerala, tako i zbog više potencijalnih sastojaka koji imaju antikancerogeno dejstvo (Chun i sar., 2004). Obezbeđuju 14% svetskog povrća i čine treći najvažniji izvor jestivog ulja posle soje i palme (OECD, 2012). Jedan od poznatijih predstavnika ove porodice u savremenoj biologiji je *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh, koja predstavlja model organizma sa potpuno sekvenciranim genomom (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000). Tokom 2020. godine površine pod kupusom u svetu iznosile su 2.414.288 ha, a pod karfiolom i brokolijem 1.357.186 ha sa ukupnom proizvodnjom od 96.393.439 t (FAOSTAT, 2020). Isti izvor navodi gajenje kupusa u R. Srbiji na površini od 7.547 ha sa ukupnom proizvodnjom od 179.377 t. Prema podacima Republičkog zavoda za statistiku 2021. godine požnjevena površina uljane repice iznosila je 22.705 ha sa prosečnim prinosom od 3,0 t/ha, dok su površine pod kupusom i keljom iznosile 7.513 ha sa prosečnim prinosom od 24,7 t/ha (webrzs.stat.gov.rs.). Glavičasti kupus u Republici Srbiji predstavlja značajnu povrtarsku vrstu (Červenski i sar., 2018), njegova potrošnja iznosi 20 kg po stanovniku, što je znatno više od svetskog proseka (Vlahović, 2015).

Povećanje površina pod kupusnjačama, gajenje visokoprinosnih ali osetljivih genotipova i pogodni agroekološki uslovi, poslednjih godina doveli su do značajnije pojave brojnih prouzrokovaca oboljenja na kupusnjačama. Bolesti kupusnjača predstavljaju ograničavajući faktor uspešne proizvodnje, a gajenje kupusnjača u monokulturi značajno doprinosi pojavi problema fitopatološke prirode (Obradović i sar., 2000a; Singh i sar., 2018). Od setve do berbe i tokom čuvanja, na kupusnjačama parazitiraju različiti prouzrokovaci oboljenja: gljive, bakterije i virusi. Očuvanje useva zdravim, preduslov je za visok prinos (Obradović i sar., 2000b). Fitopatogene bakterije se izdvajaju kao bitna grupa prouzrokovaca oboljenja imajući u vidu da prouzrokuju značajne gubitke na povrtarskim gajenim biljkama, smanjujući njihov kvalitet i prinos (Arsenijević, 1997; Agrios, 2005). Takođe, štetnim posledicama bakterioza u poljoprivrednoj proizvodnji, pa i proizvodnji kupusnjača, značajno doprinosi njihovo otežano suzbijanje.

Bakterija *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (*Xcc*), prouzrokovac crne truleži kupusnjača, predstavlja ekonomski značajnog patogena pomenutih biljnih vrsta. Prisutna je na svim područjima gajenja kupusnjača: Afrika, Azija, Australija, Okeanija, Evropa,

Amerika i Karibi, naročito u uslovima umerenog klimata (Williams, 1980; Bradbury, 1986), pri temperaturnim uslovima sredine 20–30 °C (Mariano i sar., 2001), gde prouzrokuje značajne gubitke. U porodici kupusnjača, najvažniji domaćini ove bakterije su varijeteti vrste *Brassica oleracea*, kod kojih su zabeleženi gubici od 50–60% usled delovanja ovog patogena (Dhar i Singh, 2014; Saha i sar., 2016). Prema Mguni (1996) među predstavnicima roda *Brassica*, najosetljiviji su kupus (*Brassica oleracea* var. *capitata*) i karfiol (*Brassica oleracea* var. *botrytis*). U R. Srbiji ova bakterija se redovno javlja svake godine, parazitirajući najčešće lokalne populacije kupusnjača koje su cenjene u prerađivačkoj industriji. Na lokalitetima tradicionalnog gajenja kupusa, veoma često u monokulturi ili skraćenom vremenu rotacije useva i upotrebom naturalnog semena za setvu, problemi koje prouzrokuje ova bakterija su brojni, od smanjenja prinosa i tržišne vrednosti glavica, truleži na polju i u skladištu, do truleži tokom procesa prerade. U ovakvim uslovima, suzbijanje pomenutog patogena je veoma otežano usled gajenja osetljivih genotipova, nakupljanja inokuluma bakterije i malog broja efikasnih jedinjenja koja se mogu koristiti u zaštiti.

U okviru ove doktorske disertacije detaljno je izučen prouzrokovač crne truleži kupusnjača na teritoriji Srbije, potvrđeno je prisustvo bakterije na/u semenu i zemljištu, utvrđena osetljivost izolata *Xcc* prema različitim oblicima bakarnih jedinjenja i definisani su efikasni baktericidi za kontrolu bakterije u polju na osetljivom domaćinu.

2. PREGLED LITERATURE

2. 1. Familija *Brassicaceae*

Kako navodi Al Shehbaz (2012) porodicu kupusnjača (fam. *Brassicaceae*) ili krstašica (fam. *Cruciferae*) čine 321 rod i 3.360 vrsta koje se gaje na različitim geografskim širinama. Godinu dana ranije Soengas i sar. (2011) navode da je ova porodica grupisana u 350 rodova sa 3.000 vrsta. Predstavnici ovih rodova svrstani su u nekoliko grupa u odnosu na način korišćenja ili upotrebnu vrednost: biljke za proizvodnju ulja uljarice, biljke za proizvodnju stočne hrane, začina i povrće sa upotrebom različitih biljnih delova u ishrani (cvasti, listovi, stabljika, seme).

U svetu i kod nas, najčešće se gaje pripadnici rodova: *Brassica* L., *Raphanus* L.; *A Armoracia* G. Gaertn. et al.; *Lepidium* Fabr.; *Nasturtium* W. T. Aiton; *Eutrema* R. Br. i *Eruca* Mill. (Al – Shehbaz i sar., 2006). Rod *Brassica* ima najveći socio – ekonomski značaj za ljudsku ishranu, stočnu hranu, proizvodnju ulja i biodizela (Cardone i sar., 2002; Fu i sar., 2010). Vrste ovog roda su bogate antioksidansima, vitaminima, mineralima, vlaknima i ugljenim hidratima. Glukozinolati prisutni u kupusnjačama odgovorni su za karakterističan ljutkast i opor ukus (Mithen, 2001), ali omogućuju potencijalnu preventivnu zaštitu od karcinoma i koronarnih oboljenja (Chun i sar., 2004; Smith i sar., 2005), a imaju i izraženu antibakterijsku aktivnost prema *Helicobacter pylori* (Fahey i sar., 2002).

Vrsta *Brassica oleracea* uključuje sledeće varijetete: *B. oleracea* var. *capitata* (glavičasti kupus), *B. oleracea* var. *botrytis* (karfiol), *B. oleracea* var. *italic* (brokoli), *B. oleracea* var. *gemmifera* (kelj pupčar) i *B. oleracea* var. *acephala* (raštan) (Golicz i sar., 2016). *Brassica napus* (uljana repica) predstavlja najvažniji izvor biljnog jestivog ulja u Evropi, dok je u svetu druga po značaju (Marjanović – Jeromela i sar., 2018). Pojedine vrste se koriste u dekorativne svrhe kao što su *B. oleracea*, *B. rapa*, *B. napus* i *B. juncea* (Cartea i sar., 2011).

2. 2. Bakterijska oboljenja biljaka familije *Brassicaceae*

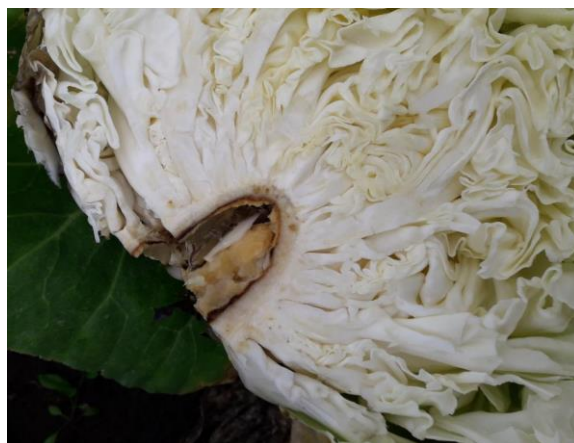
Od ekonomski značajnih bakterija na kupusnjačama navode se: *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* – prouzrokovatelj crne truleži kupusnjača (Williams, 1980); *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pectobacterium carotovorum* subsp.

atrosepticum, *Pseudomonas marginalis*, *P. fluorescens* – prouzrokovajući vlažne truleži (Canaday i sar., 1991; Koike i sar., 2007; Gašić i sar., 2014) i *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* – prouzrokovatelj biberaste pegavosti (Arsenijević, 1997; Balaž, 2001).

Vrste roda *Pectobacterium* (nekada rod *Erwinia*) koje predstavljaju najznačajnije prouzrokovatelje vlažne truleži na povrtarskim vrstama (Choi i Kim, 2013; Waleron i sar., 2014). *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* (danas *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*) navode se kao često prisutan parazit na povrtarskim vrstama u našim uslovima, koji prouzrokuje mrkocrnu trulež karfiola (Sl. 1) (Arsenijević i Obradović, 1996; Obradović, 1998). Pomenuta bakterija se pojavljuje i na ostalim vrstama iz porodice kupusnjača kao što su glavičasti kupus i brokoli (Sl. 2) (Gašić i sar., 2014; Vlajić i sar., 2017a). Canady i sar. (1991) navode bakteriju *P. marginalis* pv. *marginalis*. kao još jednog od prouzrokovatelja vlažne truleži cvasti brokolija.



Sl. 1: Mrkocrna trulež cvasti karfiola
(Foto: Vlajić)



Sl. 2: Simptomi truleži na kočanki kupusa
(Foto: Vlajić)

Prouzrokovatelj bakterijske biberaste pegavosti listova na kupusnjačama je bakterija *P. s.* pv. *maculicola*, opisana u Kanadi (Henry, 1974). Najčešće je prisutna na karfilolu, mada može parazitirati i ostale kupusnjače (Zhao i sar., 2000; Balaž, 2001).

Na listovima simptomi se manifestuju u vidu pega veličine 1–3 mm, okruglog oblika, tamno zelene boje sa ili bez hlorotičnog oreola. Uočljive su sa naličja listova, oko stominih otvora. Spajanjem brojnih sitnih pega, nastaje veća nekrotična površina, dok se jače zaraženi listovi suše i opadaju (Balaž, 2001).

Fluorescentni pseudomonasi (*P. fluorescens* i *P. viridiflava*) pojavljuju se na temperaturama ispod 4 °C i dovode do maceracije tkiva (Aremu i Babalola, 2015). *Pseudomonas viridiflava* je zabeležen kao prouzrokovatelj bakterijske truleži na Kineskom

kupusu u Japanu (Sayama i sar., 2001), a Wilkie i sar. (1973) pomenutu bakteriju opisuju kao patogena karfiola i većeg broja drugih biljaka. Na zaraženim biljkama primećuje se hloroza lista, rubovi liske su krhi a peteljka truli. Bakterija se često pojavljuje nakon ozleda od mraza i stresnih uslova za biljku (Gandhi, 2005). Arsenijević (1997) je navodi kao uslovnog potencijalnog patogena, s obzirom da epifitski naseljava mnoge biljne vrste.

Bora i sar. (2002) su proučavali mogućnost veštačke zaraze uljane repice bakterijom *Ralstonia solanacearum*, inokulacijim zemljišta u periodu oktobar – novembar. Prvi simptomi zaraze se manifestuju u vidu žućenja donjih listova počevši od vrha, a zatim pojavom crnila nerava. Na korenovom vratu uočavaju se simptomi truljenja tkiva, i uvenuće biljaka nastaje za 35 do 45 dana, dok se na vaskularnom tkivu beleži promena boje.

Po štetnosti i širokoj rasprostranjenosti u svetu, među prouzrokovateljima oboljenja bakteriozne prirode na kupusnjačama, izdvaja se bakterija *X. c. pv. campestris* (*Xcc*) prouzrokovatelj crne truleži ili sudovne bakterioze kupusa i drugih kupusnjača uključujući gajene i divlje forme (Williams, 1980; Arsenijević, 1997, Alvarez, 2000; Singh i Dhar, 2011).

2. 3. Istorija pojave i rasprostranjenost *Xcc*

Sudovna bakterioza kupusnjača odnosno crna trulež je prvi put zabeležena u Kentakiju, SAD od strane Garmana (1890; cit. po. Perišić i Panić, 1964). Izolacijom je dobijeno dva tipa kolonija iz obolelih biljaka, međutim etiologija oboljenja nije određena do kraja (Naher Tonu, 2013). Detaljniji opis beleži Louis Pammel 1893. godine u državi Njujork, na broskvi (*Brassica napus* var. *napobrassicae*) (Pammel, 1895). Russell (1898) i Smith (1897) dalje opisuju pojavu bolesti na kupusu i utvrđuju da je prouzrokovatelj patoloških promena bakterija koja na hranljivoj podlozi obrazuje kolonije žute boje. Ubrzo potom prisustvo bolesti je utvrđeno i u Rusiji (Ignatov, 2006). Na karfiolu je prvi put opisana u Norveškoj (Jorstad, 1922), od kada se bolest beleži na karfiolu i ostalim kupusnjačama u celom svetu (Tab. 1).

Prvi zabeleženi trag o pojavi crne truleži na našim prostorima bio je u Crnoj Gori na lokalitetu Titograd (Podgorica) gde je bakterija, tada nazivana *Bacillus campestre*, na jednoj parceli kupusa izazvala truljenje glavica na 50% biljaka (Mijušković, 1950). Čaturilo (1952) navodi pojavu istog patogena 1951. godine u pojedinim selima niškog sreza.

Tab. 1: Geografska rasprostranjenost *Xcc*

| Države | Izvor |
|---|---|
| Severna Australija | Samuel, 1925 |
| SAD | Rusel, 1898; Baker i Snider, 1950 |
| Mauricijus | Shepherd, 1930 |
| Bugarska | Kovačevski, 1934 |
| Rodezija | Hopkins, 1940 |
| Kvinslend | Blackford, 1944 |
| Mozambik | De Carvalho, 1949 |
| Grčka | Sarejanni i Demetriades, 1951 |
| Izrael | Chorin i sar., 1954 |
| Portugalija | Pinto – Ganhão, 1962 |
| Japan | Ohata i sar., 1982 |
| Tajland | Schaad i Thaveechai, 1983 |
| Istočna Indija | Kishun, 1984 |
| Koreja | Kim, 1986 |
| Nepal | Shakyimalla, 1988 loc. cit po Ignatov, 2006 |
| Kina pokrajina Zhejiang | Shen i Chen, 1990 |
| Italija | Scortichini i sar., 1994 |
| Ujedinjeno kraljevstvo | Redstone i sar., 1997 cit po Ignatov, 2006 |
| Centralna, Istočna Evropa, Rusija, Kina, Japan | Ignatov i sar., 1999a |
| Kuba | Corzo i sar., 2019 |

Detaljniji opis u našoj zemlji prvi put daju Perišić i Panić (1964), kada na stočnom kelju, poreklom sa semena iz Poljske, beleže pojavu *X. campestris* na 80% biljaka tokom maja. U izveštaju o stanju bolesti i štetočina na teritoriji SFRJ u 1979. godini navedena je pojava prouzrokovala crne truleži krstašica (*X. campestris*) u okolini Žepča, Orahovica na kupusu na kome je registrovan slab do srednji intenzitet pojave bolesti (Krnjajić i Grujić, 1980). Isti autori registruju pojavu bakterije na kupusu (30%) i karfiolu (10%) na 30 ha površine područja Beograda i Zemuna (Krnjajić i Grujić, 1983). Na lokalitetu Rimski šančevi (Vojvodina) beleži se jača pojava bakterije na karfiolu tokom vegetacije 1987. godine (Balaž, 1988). Isti autor navodi pojavu bakterije na ostalim kupusnjačama (kupus, brokoli, kelj, kelj pupčar) u Vojvodini (Balaž, 1989). Jovanović i sar. (1997) na osnovu rezultata dobijenih proučavanjem četiri izolata poreklom sa obolelog kupusa i podudarnosti njihovih odlika sa postojećim opisima u literaturnim izvorima postavljaju hipotezu da je *X. c. pv. campestris* prouzrokovalac patoloških promena na kupusu. U daljim navodima Obradović i Arsenijević (1999), bakterija je opisana kao značajan patogen

kupusa, karfiola i stočnog kelja, uz navode da može prouzrokovati značajne gubitke kako u komercijalnoj proizvodnji glavica tako i kod semenskih useva. Dalja proučavanja i utvrđivanje pojave *Xcc* kod nas sprovodi nekoliko domaćih autora (Obradović i Arsenijević, 1999; Obradović i sar., 2000a; Radunović i Balaž, 2012; Popović i sar., 2013a; Vlajić i sar., 2017b; Popović i sar., 2019; Popović i sar., 2020; Jelušić, 2022; Vlajić i sar., 2022).

2. 4. Ekonomski značaj

Bakterija *Xcc* prouzrokuje značajne gubitke u različitim delovima sveta: Brazil, Etiopija, Južna Afrika, Belgija, Nemačka, Švedska, Mađarska, Francuska, Holandija, Velika Britanija, Italija, Nepal, Kina, Tajvan, SAD, Kanada zajedno sa Australijom i Indijom (Saharan 1993; Mulema i sar., 2012; Singh i sar., 2016; Akhtar i sar., 2017). Massomo i sar. (2004) navode da je ovaj patogen limitirajući faktor gajenja kupusnjača u Keniji, Malaviju, Mozambiku, Južnoj Africi, Ugandi, Zambiji i Zimbabveu.

Procenjeni gubitak prinosa na kupusnjačama 1976. godine u SAD iznosio je 1 milion dolara (Kennedy i Alcorn, 1980). U Kanadi tokom zime 1979–1980. godine 60% useva broskve (*Brassica napus* var. *napobrassicae*) je propalo uticajem vaskularne bakterioze (McKeen, 1981), dok je u Zimbabveu zabeleženo smanjenje prinosa do 80% (Page i sar., 1985). Štete u zapadnom Sibiru kretale su se od 23,5 do 100% (Sukhorukova, 1987), dok su u drugim regionima Rusije gubici iznosili od 23 do 57% kod osetljivih genotipova kupusa (Dzalilov i sar., 1989; Ignatov, 2006). U severoistočnoj Aziji *Xcc* je bio prisutan na 84% pregledanih površina (Schaad i Taveechi, 1983). U Africi, u zavisnosti od godine, gubici pod uticajem ove bakterije kretali su se u opsegu 10–80% (Mguni, 1996). Epifitocija *Xcc* u Italiji, najznačajnijem regionu proizvodnje semena kupusa u Evropi, prouzrokovala je širenje patogena u celom svetu (Caponero i Iacobellis, 1994; Scortichini i sar., 1994; Catara i sar., 1999). U našim uslovima prinos može biti smanjen 40–50%, a dešava se da sve biljke na parceli budu zaražene (Josifović, 1956). Zaražene glavice kupusa gube tržišnu vrednost, a česta je pojava truleži na polju i u skladištu nakon seče (Massomo i sar., 2003). U slučaju zaraze neposredno po rasađivanju u polju, gubici prinosa mogu biti i do 90% (Dey i sar., 2015).

2. 5. Taksonomska pozicija bakterije *X. campestris*

Prvo zabeleženo opažanje fitopatogene bakterije, koja se danas odnosi na rod *Xanthomonas*, bilo je 1881. god. od strane Wakkera (1883), koji u kratkom izveštaju opisuje žutu bolest zumbula. U izveštaju navodi žutu boju i štapićast oblik bakterijske kolonije, te obilnu proizvodnju sluzi. Do objavljivanja prve edicije Manual of Bacterial Plant Pathogens (Elliott's, 1930), većina brojnih novootkrivenih bakterija svrstana je u rod *Phytophthora*. Burkholder (1930, 1939) je skrenuo pažnju na moguću heterogenost roda *Phytophthora*, a zatim je izdvojio pojedine vrste u nove grupe.

Dowson je prvi uveo poseban rod *Xanthomonas* za fitopatogene bakterije sa žutim kolonijama (Tešić, 1962). Isti autor je (1939, 1942, 1943) na osnovu Burkholderovih grupa formirao generičke oznake. Predložen je novi rod *Xanthomonas* sa sledećim opisom: neprozirne bakterije u obliku štapića, gram negativne, pokretne pomoću jedne polarne flagele (ređe dve) ili nepokretne, na hranjivom agaru kolonije žute boje, vrše hidrolizu skroba i stvaraju kiselinu iz laktoze (Elliott, 1951).

Fitopatogene bakterije, 23 roda, svrstane su u 7 grupa, a rod *Xanthomonas* je svrstan u grupu 4 (podgrupa 4a): gram negativni, aerobni/mikroaerofilni štapići i koke. Od postojećih sistema klasifikacije, najčešće se koristi sistematika prihvaćena od strane Američkog društva mikrobiologa opisana u "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology" (Boone i sar., 2005) (Tab. 2). Rod *Xanthomonas* predstavlja važnu grupu biljnih patogena, parazitirajući preko 400 domaćina, uključujući ekonomski značajne gajene vrste bilja (Buttner i Bonas, 2010; Ryan i sar., 2011). Izvorno svaka vrsta u okviru roda *Xanthomonas* koja prouzrokuje različite simptome bolesti ili ima različite domaćine, klasifikovana je kao posebna vrsta. Koncept „novi domaćin – nova vrsta” dovela je do složenog roda koji uključuje preko 100 vrsta (Starr, 1981). Fenotipska homogenost roda i tadašnja nedovoljna saznanja o patogenu koja su bila dostupna za specijalizaciju taksona, navela su Dye i Lelliotta (1974) na grupisanje većine vrsta roda u jedinstvenu vrstu *Xanthomonas campestris*. Young i sar. (1978) predlažu reklasifikaciju ranijih naziva i uvođenje patovara. Na osnovu iznetog predloga, u rodu *Xanthomonas* definisano je više od 140 patovara (Bradbury, 1986; Hayward, 1993).

Tab. 2: Taksonomska pozicija *Xanthomonas campestris*

| | |
|---------------------------|---|
| Kraljevstvo: | Bacteria |
| Razdeo: | Proteobacteria |
| Klasa: | Gammaproteobacteria |
| Red: | Xanthomonadales |
| Familija: | Xanthomonadaceae |
| Rod: | <i>Xanthomonas</i> |
| | <i>Bacillus campestris</i> Pammel (1895) |
| | <i>Pseudomonas campestris</i> (Pammel) Smith (1897) |
| | <i>Bacterium campestre</i> (Pammel) Smith (1897) |
| | <i>Bacterium campestris</i> (Pammel) Chester (1897) |
| | <i>Phytomonas campestris</i> (Pammel) Bergey (1923) |
| Binominalni naziv: | <i>Xanthomonas campestris</i> (Pammel) Dowson (1939)* |

*Manual of Bacterial Plant Pathogens (1951)

Činjenica da je patovar definisan jednom karakteristikom – patogenošću, u modernoj taksonomiji nije značajna (Vauterin i sar., 1996), dok svrstavanje nepatogenih predstavnika roda *Xanthomonas* ostaje nerešeno. Na osnovu elektroforeze proteina i kvantitativnog poređenja sadržaja masnih kiselina utvrđeno je da patovari u okviru vrste *X. campestris* fenotipski predstavljaju mnogo heterogeniju grupu nego što se ranije smatralo (Vauterin i sar., 2000). Analizom sekvence 16s ribozomalne RNK vrsta u okviru roda, utvrđeno je da rod *Xanthomonas* ima tri filogenetske loze: prva *X. arboricola*, *X. axonopodis*, *X. bromi*, *X. campestris*, *X. cassavae*, *X. cucurbitae*, *X. codiae*, *X. fragariae*, *X. hortorum*, *X. melonis*, *X. oryzae*, *X. pisi*, *X. populi*, *X. vasicola*, *X. vesicatoria*; druga *X. albilineans*, *X. hyacinthi*, *X. theicola*, *X. translucens*; treća samo vrstu *X. sacchari* (Hauben i sar., 1997). Reklasifikacija roda zasnovana na hibridizaciji DNK – DNK ukazuje da bi vrsta *X. campestris* trebalo da bude ograničena na *X. c. pv. campestris* i pet patovara koji prouzrokuju bolest kupusnjača: *X. c. pv. aberrans* (Knösel) Dye, *pv. armoraciae* (McCulloch) Dye, *pv. barbareae* (Burkholder) Dye, *pv. incanae* (Kendrick & Baker) Dye, i *pv. raphani* (White) Dye (Vauterin i sar., 1995). Prema Fargier i Manceau (2007) iz roda

Xanthomonas kao patogeni kupusnjača pojavljuju se dva varijeteta kod vrste *campestris*, i to pv. *campestris* koji prouzrokuju simptome crne truleži i pv. *raphani* koji je patogen lista. Uz ove navode, sve je više dokaza da mnogi nepatogeni predstavnici roda *Xanthomonas*, mogu postojati na biljnoj površini ili semenu i ne izazivati simptome bolesti kod domaćina sa koga su izolovani (Vauterin i sar. 1996)

2. 6. Simptomi bolesti

Zaraza biljaka sa *Xcc* moguća je tokom čitavog perioda vegetacije, od faze klijanja do potpunog zrenja (Arsenijević, 1997). Simptomi koje ova bakterija prouzrokuje zavise od biljne vrste, genotipa, faze razvoja i uticaja spoljašnje sredine (Williams i sar., 1972; Schaad i Alvarez, 1993; Franken, 1992b). Kod mladih biljaka u rasadu, crnilo se javlja duž ivice kotiledonih listova, koji kasnije venu i propadaju. Na zaraženim klijancima, poreklom iz zaraženog semena početni simptom je hloroza, koja kasnije prelazi u nekrozu kotiledonih listova (Matsumoto, 1975). Pri povoljnim uslovima za razvoj, bolest se širi zahvatajući stabljiku, koja dobija staklast izgled, razmekšava i trune (Balaž, 2001). Na odraslim biljkama u polju, po ivicama lista zapaža se hloroza tkiva, koja se širi klinasto duž sekundarnih nerava formirajući karakterističan simptom u obliku latiničnog slova „V”, što ujedno predstavlja tipičan simptom prouzrokovača crne truleži (Sl. 3) (Cook i sar., 1952).

U okviru zona hloroze sekundarni nervi, a kasnije i glavni, postaju crni. Crnilo nerava nastaje usled akumulacije melanina između ćelija ksilema (Sutton i Williams, 1970). Sušenje i crnilo sprovodnih sudova ne mora biti praćeno hlorozom listova (Ignatov, 2006). Spajanjem pega formira se veća hlorotična a potom i nekrotična površina, usled čega dolazi do nepravilnog porasta lista, a kasnije do sušenja i propadanja (Obradović i sar., 2000a). Ova promena boje sudovnih elemenata zahvata celokupnu lisku, pri čemu nastaju simptomi suve truleži (Sl. 4). Sa obolelog lista, bakterija se sudovnim elementima proširuje do stabla i korena.

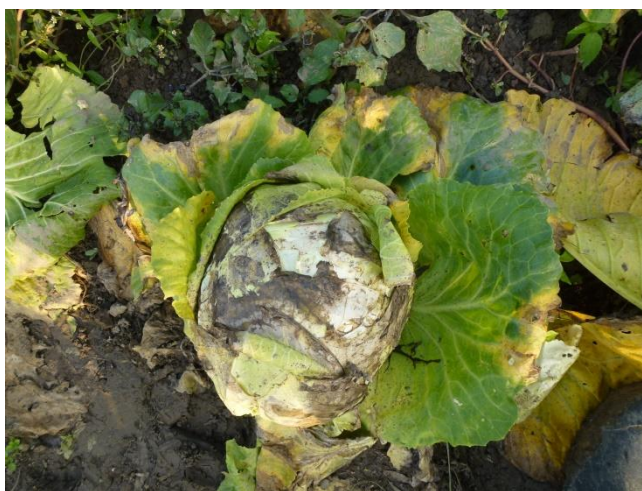


Sl. 3: Simptom na listu glavičastog kupusa
(Foto: Vlajić)



Sl. 4: Simptom bakterioze u polju
(Foto: Vlajić)

U sudovnim elementima bakterija se intenzivno razmnožava i obilno proizvodi polisaharid „xanthan” (Jeanes, 1973), čime se onemogućava normalan protok vode i asimilanata, a kao posledica nastaje zakržljavanje biljaka (Arsenijević, 1997). Usled toga izostaje formiranje glavice, te nastaju značajni gubici u proizvodnji. Širenje truleži unutar tkiva, glavice ili cvasti, nastavlja se tokom perioda skladištenja i čuvanja, a pod uticajem sekundarnih parazita (*Pectobacterium carotovorum*, *Pseudomonas* spp.) i drugih saprofitnih mikroorganizama (Dzalilov i sar., 1989; Agrios, 2005) (Sl. 5).



Sl. 5: Mešana zaraza *Xcc* i sekundarnih parazita (Foto: Vlajić)

2. 7. Morfološke i odgajivačke odlike

Xanthomonas campestris pv. *campestris* je gram negativna, aerobna štapićasta bakterija, veličine 0,4–0,6 x 0,8–2,0 µm sa jednom polarnom flagelom (Saddler i Bradburry, 2005), koja ne formira endospore (Arsenijević, 1997). Na podlogama sa glukozom, kvaščevim ekstraktom i kalcijum karbonatom (glucose – yeast – carbonate agar GYCY; yeast – dextrose – carbonate agar YDC) kolonije su okruglaste, sjajne i ispupčene, žute boje. Posle tri do pet dana razvoja na temperaturama od 25–28 °C kolonije postaju sluzaste (Vicente i Holub, 2013). Prema Bhide (1948) nakon sedam dana porasta na hranljivim podlogama kolonije dostižu prečnik od 10–12 mm. Moffett i Croft (1983) naglašavaju da je to bakterija koja u pojedinim uslovima sporo raste i kojoj je potrebno čak 7–14 dana da razvije kolonije. Proizvodi karakterističan žuti pigment ksantomonadin, na osnovu kog je čitav rod dobio ime, a što u doslovnom prevodu sa grčkog znači „žuta jedinica” (*xanthos* = žut; *monas* = jedinica). Ovi pigmenti su karakteristika čitavog roda *Xanthomonas*. Imaju ulogu u održavanju bakterije, štiteći ćelije od fotooksidativnog stresa. Biosinteza xantomonadin – a je kodirana genomskom regijom 18.6 kbp – *pig* genom (Poplawsky i sar., 1993). Mutacijom *pig* gena smanjuje se epifitno preživljavanje bakterije kao i infekcija preko hidatoda (Poplawsky i Chun, 1998). Većina predstavnika ovog roda proizvodi ekstracelularni kiseli heteropolisaharid xantan koji ga štiti od negativnih uticaja spoljašnje sredine, sprečavajući dehidraciju i povećavajući adheziju bakterijske ćelije za list. Zbog visoke viskoznosti xantana, u sprovodnim sudovima biljaka dolazi do pojave agregacija bakterijskih ćelija što prouzrokuje začepljenje sudova, a kao posledica toga dolazi do simptoma uvenuća (Rudolph i sar., 1987).

2. 8. Biologija patogena

Poznato je da se bakterije na povrtarskim vrstama održavaju na više načina, a najznačajniji izvori infekcije su zaraženo seme i sadni material (Balaž, 2005). Bakterija *Xcc* je patogen koje se prenosi semenom (Cook i sar., 1952; Vicente i sar., 2001; Taylor i sar., 2002), a održava u zemljištu nezavisno od domaćina (Schaad i White, 1974b), u biljnim ostacima i korovskim vrstama iz porodice kupusnjača (Walker, 1953; Schaad and Alvarez, 1993).

Početni inokulum sa semena je kritični faktor koji određuje intenzitet zaraze (Roberts i sar., 1999). Jedno zaraženo seme na 10.000 semena predstavlja potencijalnu opasnost za nastanak i širenje infekcije u povoljnim uslovima spoljašnje sredine. Zbog toga je potrebna nulta tolerancija u kontroli semena na prisustvo patogena. Procenat zaraženog semena je relativno mali ($< 0,1\%$) i retko prelazi 1% , dok do intenzivnije pojave simptoma u polju dolazi usled zaraze semena u opsegu od $0,01\%$ do $0,03\%$ (Schaad i sar., 1980). Patogen se održava na površini semena (semeni omotač) i u unutrašnjosti (endosperm). Infekcija cvetova na matičnim biljakama može dovesti do nastanka velike količine zaraženog semena (van der Wolf i sar., 2013). Ako je zaražena ljuska (siliqua), bakterija često penetrira kroz zid ljuske do semena ili se kreće vaskularnim sistemom biljke i vrši zarazu semena (Walker, 1952; Cook i sar., 1952). Sistemčno zaražene biljke propadaju pre sazrevanja semena (Ignatov, 2006). Zaraženo seme ne ispoljava vizuelne simptome, ali se ponekad može javiti diskretna promena boje i smanjena klijavost (Shekhawat i sar., 1982; Shiomi, 1991). Prema Clayton (1925), *Xcc* na semenu može da preživi do tri godine.

U istraživanjima Schaad i White (1974) i Dane i Shaw (1996) utvrđeno je održavanje *Xcc* u zemljištu, i to bez prisustva domaćina, 40 dana tokom zimskog i 20 dana tokom letnjeg perioda. Održavanje u zaraženim biljnim ostacima je moguće do njihovog potpunog raspada, od nekoliko meseci u tropskom klimatu pa do dve godine u suvim i hladnim regionima (Strandberg, 1973; Schultz i Gabrielson, 1986). Iz zemljišta, bakterija može izvršiti infekciju zdravih biljaka kroz povrede korena (Cook i sar., 1952). Korovske biljke iz familije kupusnjača mogu biti prirodno zaražene bez pojave simptoma oboljenja (Schaad i Dianese, 1981). Prema Dane i Shaw (1996) gajene kupusnjače predstavljaju izvor inokuluma za korove iz iste familije, dok Schaad i Thaveechia (1983) smatraju da korov nema značajnu ulogu u širenju bakterije. *Raphanus raphanistrum* je jedina korovska vrsta kod koje *Xcc* preživljava u filozferi 70 dana, dok kod vrste *Lepidium virginicum* preživljava 56 dana (Silva i sar., 2017). Na osnovu istraživanja isti autori navode da korovi u područjima na kojima se crna trulež pojavljuje u značajnijem intenzitetu, predstavljaju važan izvor inokuluma *Xcc* za gajene kupusnjače.

Bakterija se prirodnim putem širi do 12 m od izvora infekcije (Schaad i Dianese, 1981). Na kraća rastojanja se može prenositi vetrom, insektima, vodom za navodnjavanje, aerosolima, kišom, poljoprivrednim mašinama i putem radne snage (Vicente i Holub, 2013). Uloga insekata u prenošenju *Xcc* gotovo da nije poznata ali se navodi da insekti mogu imati značajnu ulogu u širenju bakterije na kraća i dalja rastojanja. Shelton i Hunter

(1985 loc. cit. po van der Wolf i sar., 2006) su istraživali ulogu *Phylotreta cruciferae* (fam. *Chrysomelidae*) u prenošenju bakterije, i ukazali da ona može u velikoj meri preneti bakteriju sa bolesnih na zdrave biljke. Bakterije može da preživi do 5 dana na insektima. Tokom ovog perioda se može prenositi na razdaljinu i veću od 20 km, inficirajući biljke kupusa na udaljenim područjima (van der Wolf i sar., 2006). Upotreba insekata u svrhu oprašivanja, u slučaju infestiranih insekata, rezultuje unutrašnjom zarazom semena. Pretpostavka je da bakterija pomoću stileta insekata dospeva unutar semena, nakon čega se u semenu širi. Ne može se u potpunosti tvrditi da je unutrašnja infekcija semena rezultat kretanja i transporta putem vaskularnog sistema, nakon infekcije lista. Strogo se preporučuje da se semenska proizvodnja kupusnjača udalji najmanje 20 km od drugih useva pod kupusnjačama (van der Wolf i sar., 2006).

Klijanjem zaraženog semena patogen zahvata vaskularno tkivo hipokotila i inficira listove, nakon čega se oslobodi u vidu kapljica, na rubovima listova (Alvarez, 2000). Na ovaj način se zaražavaju i zdrave biljke u fazi rasada, koje se kasnije iznose na obradive površine. Na polju se pojavljuju tipični simptomi rubnog žutila listova, međutim kod manje zaraženih biljaka simptomi nisu uočljivi. Oni se pojavljuju kada je koncentracija bakterija u međućelijskom prostoru oko 2.500–25.000 ćelija/cm² (Schultz i Gabrielson, 1986). Biranjem zaraženih glavica za proizvodnju izvodnica kod kupusa (cvetonosnog stabla u drugoj godini), patogen inficira seme i time se biološki ciklus zatvara.

Kod osetljive biljke domaćina *Xcc* prouzrokuje sistemičnu zarazu, prodirući kroz prirodne otvore (najčešće hidatode) ili rane u vaskularni sistem biljke (Ignatov i sar., 1999b). Ovo je utvrđeno pomoću tehnike imunofluorescentne i bioluminiscentne mikroskopije, uz korišćenje zelenog fluorescentnog proteina, pomoću koga su posmatrane epifitne faze *Xcc* na površini biljnih delova i način ostvarenja infekcije kroz prirodne otvore lista kupusa (So i sar., 2002). Schultz i Gabrielson (1986) su utvrdili da održavanje *Xcc* na listovima u epifitnoj fazi traje 73 dana. Kiše i noćne temperature ispod 6 °C smanjuju epifitnu populaciju patogena.

2. 9. Biohemijsko – fiziološke odlike

Bakterija *Xcc* ima sledeće biohemijsko – fiziološke karakteristike: aerobna je, proizvodi katalazu i sumporvodoničnik, hidrolizuje škrob, eskulin i ester oleinske kiseline (Tween 80), ne redukuje nitrata u nitrite, ne stvara oksidazu i amonijak (Arsenijević, 1997; Deivamani i Muthamilan, 2016). Vršiti digestiju proteina i produkuje indol (Lelliott i Stead, 1987; Schaad i sar., 2001).

Kiselinu proizvodi iz glukoze, galaktoze, manoze, celobioze, arabinoze (Dye and Lelliott, 1974; Deivamani i Muthamilan, 2016). Soli raznih organskih kiselina može koristiti kao izvor ugljenika, 0,1% a najčešće 0,02% (Bradbury, 1986; Arsenijević, 1992).

Rast bakterije je zabeležen u intervalu pH 5,0–8,0 i temperaturi 10–37 °C (Deivamani i Muthamilan, 2016). Ispitivanjem deset izolata *Xcc* pri vrednostima pH 4,0; 4,5; 8,5; i 9,0 isti autori nisu zabeležili razvoj kolonija. Optimalan pH za razvoj je 6,8 (Bandyopadhyay i Chattopadhyay, 1986), međutim postoje vrste u okviru roda *Xanthomonas* tolerantne na kisele i alkalne vrednosti pH (Singh i Verma, 1980).

2. 10. Patogene odlike

Istraživanjem patogenih svojstava bakterija ustanovljeno je da su ona u direktnoj vezi sa postojanjem *hrp* gena (hypersensitive response and pathogenicity) koji je utvrđen kod bakterija roda *Xanthomonas* (Büttner i He, 2009; Boch i Bonas, 2010). Poređenjem na nivou genoma otkriveno je da mogu posedovati tri tipa sekrecije: tip II (T2SS), tip III (T3SS) i IV (T4SS) od ukupno šest poznatih.

Za transport proteina u ekstracelularni prostor odgovoran je T2SS. Ovaj sistem može da izlučuje enzime za razgradnju ćelijskog zida biljaka, uključujući celulozu, poligalakturonazu, ksilanazu i proteazu. Poznate su dve grupe T2SS tipa koje su identifikovane kod *Xanthomonas*-a: *xps* i *xcs*. *Xps* grupa je prisutna kod svih *Xanthomonas* genoma koji su do sada sekvencirani, ali su prisutni i u drugim rodovima. Geni *xps* su povezani sa patogenošću, dok geni *xcs* mogu imati i druge uloge koje nisu neophodne za patogenost (Vicente i Holub, 2013).

T4SS tip odgovoran je za sekreciju makromolekula. Gram negativne bakterije koriste ovaj sistem za transport proteinske i DNK strukture kroz omotač u ciljane ćelije (Souza i sar., 2011). Međutim, tačna uloga T4SS u patogenosti *Xcc* ostaje nejasna (Vicente i Holub, 2013).

Tip III sekrecije T3SS je najvažniji mehanizam patogenosti kod *Xcc*. Odgovoran je za nastanak bolesti kod osetljivih biljaka, i može biti uključen u proces izumiranja ćelija i drugih odbrambenih odgovora kod rezistentnih biljaka (Vicente i Holub, 2013). Ovaj sistem uvodi efektorske proteine u biljnu ćeliju. Pretpostavlja se da ovi efektori imaju čitav niz uloga unutar biljnih ćelija, izazivajući bakterijsku virulenciju i proliferaciju (Boch i Bonas, 2010). Moguće je da efektori izlaze iz fitopatogenih bakterija preko hrp puteva (Lindgren, 1997).

Kao i kod svih ostalih fitopatogenih bakterija i *Xcc* je podeljen u različite fiziološke rase, u zavisnosti od reakcije diferencijalnih linija. Do sada je utvrđeno da *Xcc* sadrži 11 fizioloških rasa (Kamoun i sar., 1992; Vicente i sar., 2001; Fargier i Manceau 2007; Cruz i sar., 2017). Prva istraživanja o rasnom sastavu *Xcc*, bazirana na interakciji između *Xcc* i četiri diferencijalna genotipa predložena su od strane Kamoun i sar. (1992). Izolati *Xcc* su inicijalno podeljeni u 5 rasa (numerisani od 0–4) u zavisnosti od reakcije različitih genotipova *B. rapa* i *B. juncea* (Ignatov i sar., 1998b). U daljim istraživanjima sprovedenim od strane Vicente i sar. (1998) dokazano je da se rasa 1 može podeliti u 3 rase (uslovno određeni kao 1a, 1b i 1c), u zavisnosti od procenjene reakcije *B. oleracea* i jednog *B. carinata*. U istraživanjima Ignatov i sar. (1998) razdvajaju grupu izolata, ranije uvršćenih u rasu 1 na dve rase (rasa 1 i 5) u zavisnosti od reakcije dva genotipa *B. oleracea*. Na osnovu ispitivanja mnogo veće kolekcije izolata poreklom iz Evrope, Afrike i Amerike, od strane Vicente i sar. (2001), dalja klasifikacija je revidirana u 6 rasa (1 - 6). Rase 1, 2 i 4 su zadržane iz klasifikacije od strane Kamoun i sar. (1992). Međutim nije pronađen nijedan ispitivani izolat koji je odgovarao rasi 3, te je ova rasa zanemarena i nije svrstavana u dalju klasifikaciju.

Uspostavljen je set od šest referentnih sojeva u cilju determinacije rasa. *Xcc* je grupisan u 6 rasa na osnovu postuliranog modela *gen za gen* (Vicente i sar., 2001; Kamoun, 1992). Model *gen za gen* se koristio kako bi objasnio interakciju između izolata bakterija i diferencijalnih genotipova. Geni koji daju otpornost na najzastupljenije rase (1 i 4) označeni su kao R1 i R4.

Model dozvoljava uključivanje dodatnih parova gena ukoliko se identifikuju nove rase i diferencijalne linije. Model je konstruisan na način da odražava poreklo alotetraploidnih vrsta kupusnjača (Nagaharu, 1935): R1 poreklom iz B genoma, R3 poreklom iz C i R4 poreklom iz A genoma. Predloženi model trebalo bi da bude podržan genetičkim i molekularnim podacima kako od biljke domaćina tako i od patogena, kako bi bio u

potpunosti tačan. U slučaju domaćina, rezultat ukrštanja za nasleđivanje otpornosti pojedinih rasa ukazuje da su R1, R3 i R4 jedinstveni dominantni geni (Vicente i sar., 2002).

Sličan model gen za gen predložen od strane He i sar. (2007), zasnovan je na interakciji između izolata *Xcc* i linija kupusnjača (*B. juncea*, *B. oleracea*, *B. rapa*), rotkvice (*Raphanus sativus*) i paprike (*Capsicum annuum*).

Rase 1 i 4 su dominantne u svetu, ali je njihova učestalost u usevima *B. oleracea* varirala u zavisnosti od geografskog područja. Kako navodi Vincente (2004) rasa 1 je učestalija u Ujedinjenom Kraljevstvu nego rasa 4, dok je rasa 4 dominantna u Portugaliji, severozapadnoj Španiji (Lema i sar., 2012) kao i u nekim istočnoafričkim državama, kao što su Tanzanija i Uganda (Mulema i sar., 2012). Rase 2 i 6 nisu bile prisutne u kolekciji izolata iz Japana i Rusije (Ignatov i sar., 1998a). Nepal i severozapadna Španija imaju različit diverzitet populacije *Xcc*, koji obuhvata 5 različitih diferencijalnih rasa identifikovanih u usevima *B. oleracea* (Jensen i sar., 2010; Lema i sar., 2012). Mala zastupljenost rase 3 u svetu može biti rezultat široke upotrebe linija koje su rezistentne prema ovoj rasi.

U daljim radovima Vincente i sar. (2006) opisuje 3 soja, kasnije potvrđenih kao rase u okviru *X. c. pv raphani*, zasnovanoj na virulentnosti širokog spektra diferencijalnih genotipova kupusnjača (rotkvice i šeboja). Ispostavilo se da su rase 1 i 3 najčešće u usevima *B. oleracea*, dok je rasa 2 najčešća kod *B. rapa*. Na osnovu uvida u genetički diverzitet izolata koji prouzrokuju pegavost i poređenja sa reprezentativnim izolatima *Xcc* i srodnih patovara, rezultati ukazuju da je *X. c. pv raphani* genetički različita od *Xcc*.

Fargier i Manceau (2007) reklasifikovali su postojeću klasifikaciju, i vrstu *X. c. pv. aberrans* preimenovali u rasu 7 vrste *Xcc*. Isti autori su uveli nove rase 8–9 u klasifikaciju koju predlaže Vicente. Od trenutno definisanih rasa *Xcc*, dokazano je da su rasa 1 i 4 najvirulentnije i najrasprostranjenije u svetu (Ignatov i sar., 1998b; Vicente i sar., 2001; Griesbach i sar., 2003; Vicente 2004; Griffiths i Roe 2005; Jensen i sar., 2010), čak i među korovskim vrstama (Ignatov i sar., 2007). Rase 2, 3 i 5 su nedefinisane, a rasa 6 je potvrđena samo na *Brassica rapa* (Vicente, 2004 loc.cit Lema i sar., 2012). Na osnovu ispitivanja patogenosti kolekcije od 33 izolata od strane Cruz et al (2017) identifikovane su rase 10 i 11 u Portugaliji. Rasni sastav u Srbiji je nepoznat, jer prema dostupnoj literaturi istraživanja u cilju identifikacije rasa, do sada nisu sprovedena.

Postojanje patogenih rasa umnogome otežava oplemenjivanje biljaka. Identifikacija rasnog sastava *Xcc* patogena kupusnjača na određenoj teritoriji neophodna je, radi uspostavljanja adekvatnih mera kontrole kod strategija oplemenjivanja na otpornost (Lema i sar., 2012).

2. 11. Serološke odlike

Identifikacija *Xcc* izolata iz blisko povezanih vrsta, nije moguća samo na osnovu morfoloških i biohemijskih karakteristika, kao ni na osnovu patogenih testova (Franken, 1992a). Zbog ove činjenice, u cilju preciznije identifikacije koriste se serološke i molekularne odlike. Primena seroloških tehnika u determinaciji fitopatogenih bakterija postala je aktuelna početkom XX veka, kada su i započeta proučavanja seroloških odlika vrsta roda *Xanthomonas* (Schaad, 1979).

Serološke metode se zasnivaju na reakcijama između antitela i antigena (Lelliot i Stead, 1987). Ove metode su našle širu primenu u fitopatologiji, s obzirom na potrebe za pouzdanom i brzom detekcijom patogena. Najzastupljenije serološke metode su: metoda aglutinacije (Agglutination test), enzimsko – imunoadsorpcioni (Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA) test i metoda imunofluorescencije (Immunofluorescence test, IF) (Hampton i sar., 1993).

Upotrebu monoklonalnih i poliklonalnih antitela u rutinskoj identifikaciji *Xcc* izolata navodi više autora (Franken, 1992b; Berg i sar., 2005; Chidamba i Benzuidelnout, 2012). Prema Alvarez i sar. (1994) na osnovu ELISA testa postoji mogućnost detekcije zaraženih kupusnjača u polju, kao i infekcije semena bakterijom *Xcc*. Upotrebom monoklonalnih antitela (PTA) – ELISA formalno su otkrivene serogrupe *Xcc* (Rabenstein i sar., 1999). Pored prednosti, serološke metode ponekad imaju nedostatke. U istraživanju Bila i sar. (2013) od 45 izolata *Xcc*, dva izolata nisu reagovala sa specifičnim antitelima, koja su kasnije identifikovana kao *Xcc* rasa 1. Postoji indicija da ova dva izolata *Xcc* mogu biti različita što antitela ne prepoznaju, i pri tom mogu prouzrokovati lažnu negativnu reakciju. Pored toga, opisane su unakrsne reakcije *Xcc* antitela sa drugim *X. campestris* patogenim varijetetima (Franken, 1992b; Berg i sar., 2005). Franken (1992a) je zaključio da se konačna identifikacija ne može vršiti samo na ELISA testovima, već bi je trebalo dopuniti i ostalim testovima.

2. 12. Molekularne odlike

Izučavanje molekularnih odlika primenom metode lančane reakcije polimeraze (PCR) se smatra rutinskom tehnikom i preporučuje se u većini protokola za detekciju i identifikaciju razvijenih od strane Evropske unije i Evropske i mediteranske organizacije za zaštitu bilja (EPPO) (Palacio-Bielsa i sar., 2009). Molekularne metode, zasnovane na hibridizaciji ili amplifikaciji DNK, omogućile su bolju specifičnost i osetljivost dijagnoze bolesti prouzrokovane *Xanthomonas* vrstama (Prokić, 2014). Prisustvo *hrp* gena je presudno za interakciju između bakterije i biljke domaćina, što prouzrokuje pojavu oboljenja kod osetljivih genotipova ili hipersenzitivnu reakciju kod otpornih (Walton, 1997).

Ova grupa gena je uglavnom prisutna u fitopatogenim bakterijama, jer kodiraju sisteme za sekreciju tipa III (Hueck, 1998). Prema navodima Bonas i sar. (1991) *hrp* geni su visoko konzervativni unutar roda. Unutar pomenute grupe gena, *hrpF* je jedan od manje konzervativnih. Gen *hrpF* je potvrđen kod *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, a njegova uloga je vezana za efektorne proteine koji učestvuju u interakciji bakterije i biljke domaćina (Rossier i sar., 2000; Büttner i sar., 2002). Kod *Xcc* *hrp* klaster se sastoji od 26 gena koji su između *hpa2* i *hrpF* (da Silva i sar., 2002). HrpF protein može igrati ulogu u određivanju specifičnosti domaćina patogenih *Xanthomonas* vrsta, a ukupna dužina *hrpF* gena kod *Xcc* iznosi 276 kb (Berg i sar., 2005).

Pojedini autori izdvajaju Zur gen koji reguliše unos cinka, kao gen od suštinskog značaja za virulenciju *Xcc* i zbog toga ga smatraju specifičnim za detekciju bakterije (Tang i sar., 2005; Eichmeier i sar., 2015). Postoji veća verovatnoća osetljivosti detekcije Zur sekvenci kada se porede sa predhodnim metodama zasnovanim na detekciji gena koji pripadaju *hrp* grupi (Huang i sar., 2009). Eichmeier i sar. (2019) navode da sistem koji je dizajnirao Berg i sar. (2006) ne radi sa visokom osetljivošću za detekciju *Xcc*, jer otkriva i niz drugih organizama koji se mogu pojaviti u uzorcima. Zbog toga je multipleks PCR zasnovan na detekciji *hrpF* i Zur gena pouzdaniji u odnosu na otkrivanje jednog gena.

U proučavanje bakterijske filogenije i taksonomije koristi se 16S rRNA sekvenca gena, koja predstavlja najčešće korišćeni deo genoma iz više razloga. Pre svega, prisutna je u gotovo svim poznatim bakterijama (Roohie i Umesha. 2012), funkcionisanje gena 16S rRNA tokom vremena se nije promenilo i gen od 1500bp je dovoljno velik da bude informativan za pomenutu svrhu (Patel, 2001). Pored visoko očuvanih delova, 16S rRNA

sekvence gena sadrže hiper promenljive regione koji mogu da daju tipične sekvencije specifične za vrstu, a mogu se koristiti za identifikaciju bakterije. Kao rezultat toga, sekvenciranje gena 16S rRNA postalo je preovlađujuće u medicinskoj mikrobiologiji, kao brza i tačna alternativa fenotipskim metodama identifikacije bakterija. Iako se prvobitno koristila za identifikaciju bakterija, otkriveno je da na osnovu sekvence 16S moguće uraditi reklasifikaciju bakterija u potpuno nove vrste, ili čak rodove. Takođe, ona sadrži promenljive regione koje se mogu koristiti za razlikovanje bakterija različitih rodova i vrsta (Roohie i Umesha. 2012).

2. 13. Suzbijanje

Kontrola bakterijskih oboljenja, predstavlja ozbiljan izazov usled nedostatka efikasnih baktericida, visoke varijabilnosti patogena, naglog povećanja populacije bakterija u povoljnim uslovima sredine, visoke stope mutacija što dovodi do brzog razvoja rezistentnosti, i visoke stope mutacija koje bakterijama omogućavaju prevazilaženje genetske otpornosti biljaka (Civerolo, 1982; Balogh i sar., 2010). Jedan od razloga ograničene proizvodnje povrća su značajni ekonomski gubici prouzrokovani fitopatogenim bakterijama (Khaliluev i Shpakovski, 2013). Zbog svega navedenog, kontrola *Xcc* se zasniva prevashodno na preventivnim merama. Suzbijanje prouzrokovala crne truleži uključuje upotrebu otpornih genotipova, seme bez prisustva patogena, plodored sa biljnim vrstama koje ne pripadaju istoj familiji, uklanjanje žetvenih ostataka kupusnjača sa parcela i mere hemijske kontrole (Trench i sar., 1992; Mishra i Arora, 2012; Vicente i Holub, 2013).

Gajenje genotipova otpornih na prouzrokovala crne truleži je dugo bila važna mere kontrole oboljenja, ali je sa praktičnog aspekta imala ograničen uspeh (Taylor i sar., 2002), usled postojanja većeg broja rasa, čija je geografska distribucija raznolika. Neki izvori ukazuju da je za otpornost odgovoran jedan dominantni gen (Bain, 1955; Bubeck i sar., 1993; Tsuji i sar., 1991), dok su drugi autori prikazali model u kome je otpornost određena sa više gena (Sharma i sar., 1972; Williams i sar., 1972). Temperature imaju uticaj na brzinu indukcije otpornosti; temperature od 20 do 24 °C su povoljne za rast i razvoj kupusnjača, a nepovoljne za razvoj bakterija i one promovišu brzu indukciju otpora (Staub i Williams, 1972). Sa druge strane temperature, između 30 i 32 °C, koje su optimalne za rast bakterija, daleko su iznad temperatura povoljnih za rast kupusnjača i usporiće stvaranje otpornosti.

S obzirom da se patogen prenosi semenom i održava na njemu (Lazarev, 2017), dezinfekcija je neophodna mera. Za unutrašnje (endogene) infekcije preporučuje se tretman toplom vodom 122 °F (50 °C) 25 min (Preporuka IPM Univerziteta u Konektikatu, Boucher i Nixon, 2004–2005 loc. cit. Balaž, 2005; Mandiriza i sar., 2018) i natrijumhipohloritom (NaOCl) u kombinaciji sa streptomycinom (Wukasch, 1997). Za tretman semena se još koristi: vodonik peroksid, zakišeljani bakar acetat ili cinkov sulfat i pojedini antibiotici (Miller i sar., 1996; Vicente i Holub, 2013;). Trenutno, nijedan baktericid nije registrovan za upotrebu kod tretmana semena za kontrolu bakterijskih patogena kao što je *Xcc* (Mandiriza i sar., 2018). Fungicidi na bazi bakra se u nekim slučajevima koriste za kontrolu takvih patogena (Pacific Northvest Ektension, 2015), ali su relativno neefikasni (Lenka i Ram, 1997; Mikicinski i sar., 2012). U nekim zemljama se koriste oksitetraciklin i gentamicin za suzbijanje *Xanthomonas* spp. na povrtnarskim vrstama, ali u našoj zemlji primena antibiotika nije dozvoljena (Obradović i Ivanović, 2007), odnosno zakonom je zabranjena. Kako nijedna od pomenutih mera nije ispoljila zadovoljavajući efekat, ili je zabranjena, razvila su se istraživanja o antibakterijskom uticaju raznih biljnih ekstrakata na patovare roda *Xanthomonas* (Satish i sar., 1999; Popović i sar., 2018). Kako je predhodno navedeno, da je *Xcc* patogen semena, biljni ekstrakti bi mogli imati ulogu u upotrebi kao sredstvo za tretman semena, međutim zastupljenost u proizvodnji je veoma mala.

Važan segment u merama suzbijanja je agrotehnika. Zbog činjenice da se patogen može održavati u zemljištu, preporuka je rotacija useva u vremenu od četiri godine, sve dok se ostaci kupusnjača ne razlože u zemljištu (Smart i Lange, 2010). Ako je moguće ostatke kupusnjača treba ukoniti, ili duboko zaorati (McGrath, 1994). Sistemi za navodnjavanje koji kvase listove i glavice biljaka, omogućavaju razvoj bakterije, pa stoga promena načina navodnjavanja na sisteme koji vodu dovode blizu zone korena može ograničiti širenje oboljenja (Roberts i sar., 2007). Treba izbegavati rad u polju kada su biljke vlažne, i obavezno je čišćenje, pranje alata i mehanizacije prilikom prelaska na nova polja (McGrath, 1994).

Bakteriofagi, kao biološki način suzbijanja, prvi put se dovode u vezu sa fitopatogenim bakterijama 1924 god., kada su Mallman i Hemstreet (1924) utvrdili da filtrat raspadnutog tkiva kupusa, inhibira rast „organizma sa kupusa” – bakteriju *Xcc* u *in vitro* ogledima. Dve godine kasnije Moore (1926) predlaže upotrebu bakteriofaga kao sredstva za kontrolu bolesti.

Bakteriofagi su uspešno korišćeni za prevenciju truleži krtola krompira prouzrokovane bakterijom *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (Kotila i Coons, 1925) i za tretman semena za prevenciju Stjuartovog uvenuća kukuruza koje prouzrokuje *Pantoea stewartii* (Thomas, 1935). Intenzivnija primena bakteriofaga počinje od 1990. godine, i koristi se kao efikasna mera u kontroli brojnih fitopatogenih bakterija iz sledećih rodova *Xanthomonas* (Balogh i sar., 2010); *Pseudomonas* (Munsch i Olivier, 1995), *Erwinia* (Schnabel i sar., 1999; Ravensdale i sar., 2007), *Ralstonia* (bakterijska uvelost duvana) i *Streptomyces* (McKenna i sar., 2001). U istraživanju De Silva i sar. (2019) izolovali su nov virus iz porodice Pbunavirus i nazvali ga „Xanthomonas virus XC 2”. Izolovani virus inficira samo *Xcc* izolate, što ukazuje na visoku specifičnost i omogućuje upotrebu u biološkoj kontroli.

Broj efikasnih hemijskih supstanci u suzbijanju bakterijskih oboljenja je veoma ograničen. Najefikasniji baktericidi su jedinjenja bakra, ali i biopesticidi koji poslednjih godina imaju sve veću primenu u kontroli fitopatogenih bakterija (Agrios, 2005; Alabouvette i sar., 2006). Assis i sar. (1996) su istraživali antagonizam 32 epifitna izolata *Bacillus* spp. sa kupusa, kelja i rotkvice, od kojih je 13 smanjilo 100% učestalost crne truleži na kelju u uslovima staklene bašte. U poljskim eksperimentima učestalost crne truleži na kupusu je smanjena za 48–78% primenom istih 13 izolata *Bacillus* spp. (Assis i sar., 1997). Predstavnici roda *Bacillus* spp. su uključeni u kontrolu biljnih bolesti preko različitih mehanizama delovanja kakvi su kompeticija za hranu i prostor, indukcija sistemичne otpornosti, proizvodnja antibiotika (Monteiro i sar., 2005). Među poznatim predstavnicima pomenutog roda, izdvaja se *B. subtilis*, koji produkuje brojne antibiotike (bacilisin i fengimicin, dificidin i oxidificidin, bacitracin, bacilin i balilomicin b i iturin) koji deluju na mnoge vrste aerobnih i anaerobnih bakterija (Grahovac i sar., 2009). Produkti metabolizma, lipopeptidi, deluju na različite komponente ćelijskog zida, sprečavajući prijanjanje patogena na biljne organe, dok enzim *subtilin* ometa razvoj patogena (Klokočar – Šmit i sar., 2003). Međutim, proizvodnja toksina koja usporava rast patogena – mehanizam antibioze, je jedan od najvažnijih mehanizama (Thomashow i Weller, 1996).

Studije u Keniji i Tanzaniji pokazale su da jedinjenja bakra mogu da smanje intenzitet crne truleži ako se tretman vrši u intervalima od jedne do dve nedelje (Onsando, 1988; Massomo, 2002). Balaž (1991) izdvaja bakar – hidroksid kao najefikasnije jedinjenje među bakarnim preparatima kod suzbijanja bakterioza.

U istraživanju Vlajić i sar. (2016) najbolja efikasnost u kontroli *Xcc* je zabeležena kod kombinacije bakar – hidroksida i etilenbis – ditiokarbamata. Na efikasnost ove kombinacije ukazuju i drugi autori, koji navode da se dodavanjem mankozeba u bakarne preparate poboljšava efikasnost (Marco i Stall, 1983), dok istraživanja Todorović i sar. (2006) ukazuju da kombinovanje bakarnih jedinjenja sa ditiokarbamatima ne povećava značajno efikasnost. Isti autori navode da je kombinacija opravdana u cilju smanjenja rezistentnosti bakterija na bakarne preparate. Zbog razvoja rezistentnih sojeva, primena bakarnih jedinjenja ima ograničenu efikasnost (Adaskaveg i Hine, 1985). Istraživanje u Trinidadu je pokazalo da usled više ponavljanja tretmana bakrom, *Xcc* postaje sve manje osetljiv na ovo jedinjenje i na kraju razvija otpornost (Lugo i sar., 2013).

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ciljevi istraživanja disertacije, uzimajući u obzir dosadašnja saznanja, bili su:

- Detekcija i identifikacija prouzrokovala crne truleži na kupusnjačama u R. Srbiji
- Utvrđivanje vremena pojave simptoma crne truleži kupusnjača i optimalnih uslova za razvoj infekcije.
- Utvrđivanje mogućnosti održavanja *Xcc* u/na semenu kupusnjača.
- Ispitivanje prisustva i fluktuacije *Xcc* u zemljištu.
- Definisane metoda klasične, serološke i molekularne identifikacije izolata *Xcc*.
- Izolacija bakteriofaga i definisanje osetljivost izolata *Xcc* na iste.
- Utvrđivanje osetljivosti izolata *Xcc* na različite oblike bakarnih jedinjenja (sulfatni, oksihloridni, hidroksilni).
- Definisane baktericida efikasnih u suzbijanju *Xcc* u poljskim uslovima na osetljivom domaćinu.

4. RADNA HIPOTEZA

Dosadašnja istraživanja ukazuju da bakterija *Xcc* na kupusnjačama prouzrokuje značajno smanjenje prinosa, kvaliteta i tržišne vrednosti. Uzimajući navedeno u obzir, postavljene su radne hipoteze:

- Pretpostavlja se da je prouzrokovatelj crne truleži kupusnjača u našim uslovima bakterija *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.
- Pretpostavlja se da bakterija zaražava seme na/u kome se može održavati.
- Zemljište je značajno u održavanju bakterije *Xcc* u našim agroekološkim uslovima.
- Konvencionalne, serološke i molekularne metode identifikacije imaju zadovoljavajuću specifičnost u identifikaciji izolata do nivoa vrste i patogenog varijeteta, *Xcc*.
- Pretpostavlja se da će izolovani bakteriofagi iz zemljišta blizu domaćina bakterije biti specifični za *Xcc*.
- Očekuje se različita osetljivost izolata na ispitivane oblike bakra u *in vitro* uslovima.
- Ispitivanjem baktericida u polju, očekuje se najveća efikasnost bakar – hidroksida u kombinaciji sa etilen – bis – ditiokarbamatima (mankozeb) i fosetil – Al.

5. EKOLOŠKI USLOVI

Ekološki uslovi predstavljaju veoma bitne činioce uspešne biljne proizvodnje, ali i značajne faktore koji omogućavaju infekciju biljaka i razvoj oboljenja. S obzirom da je deo oglada u ovom istraživanju izveden u poljskim uslovima i da je meren prinos kupusa, u ovom poglavlju dat je pregled zemljišnih i klimatskih uslova sa komentarima u odnosu na biološke zahteve gajene biljke i patogena. Padavine nisu predstavljale ograničavajući faktor, imajući u vidu da je ogled bio u sistemu navodnjavanja veštačkom kišom.

5. 1. Zemljišni uslovi

Kupus se gaji na zemljištima dobre plodnosti, sa povoljnim osobinama vodno – vazdušnog režima. Za uspešnu proizvodnju, pogoduju mu zemljišta neutralne do slabo kisele reakcije (pH 5,5–6,5/6,5–7,5) (Červenski i Takač, 2012). Ogled sa veštačkom inokulacijom kupusa sa *Xcc* postavljen je (2014, 2015 i 2016. godine) u Institutu za ratarstvo i povrtarstvo Novi Sad, ogledno polje Rimski šančevi, na zemljištu tipa karbonatni černozem. Prema hemijskim osobinama, navedeno zemljište je slabo alkalno, slabo karbonatno (1,68% CaCO_3) sa nižim sadržajem humusa (2,87%), i sa niskim sadržajem ukupnog azota (0,123%). Obezbeđenost zemljišta fosforom je optimalna (18,9 mg/100 g zemljišta), dok je obezbeđenost kalijumom visoka (26,4 mg/100 g zemljišta) (Tab. 3). S obzirom da prinos nije beležen na lokalitetu Futog gde je postavljen ogled, hemijska svojstva zemljišta za ovaj lokalitet nisu prikazana.

Tab. 3: Hemijska svojstva zemljišta (R. šančevi parcela T 29/3, 2014. godine)

| Dubina | pH | | CaCO_3 % | Humus % | Ukupan N % | mg/100g zemljišta | |
|---------|------------------------|-------|----------------------|------------|---------------|----------------------------|--------------------------|
| | u H_2O | u KCl | | | | Al- P_2O_5 | Al- K_2O |
| 0-30 cm | 8,23 | 7,43 | 1,68 | 2,87 | 0,123 | 18,9 | 26,4 |

5. 2. Klimatski uslovi

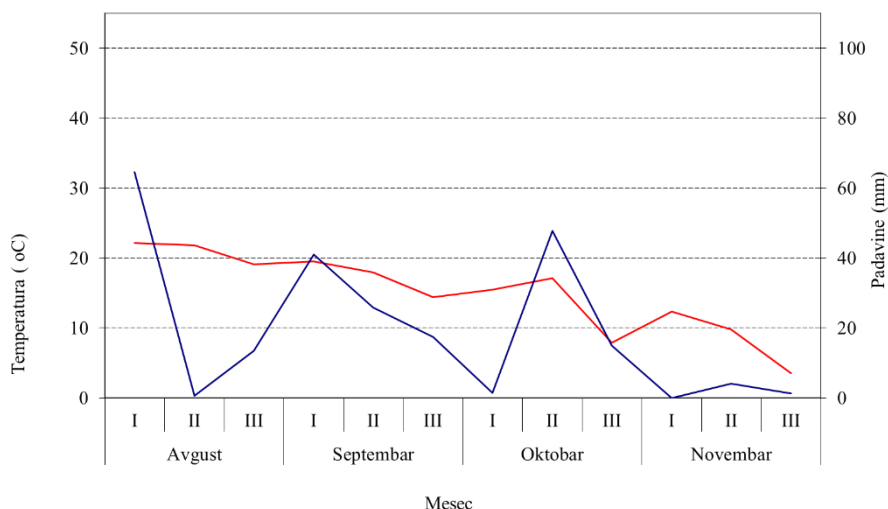
Kupus je povrtarska vrsta kojoj pogoduju hladnija i vlažnija područja gajenja. Optimalne temperature za rast i razvoj su između 15 i 18 °C, a pri temperaturi preko 25 °C se usporava rast i obrazovanje glavice (Červenski i Takač, 2012). Pripada biljnim vrstama koje imaju visoke zahteve za vodom. Najveća potreba za vodom je u fazi rasta listova rozete i obrazovanja glavice (Karagić, 1998).

U našim klimatskim uslovima navodnjavanje predstavlja jednu od neophodnih agrotehničkih mera u gajenju kupusa. Broj navodnjavanja kupusa zavisi od više ekoloških faktora, pre svega od rasporeda i količine padavina. Usled nedostatka vode, u fazi intenzivnog razvoja, ubrzava se razgradnja skroba do prostih šećera i belančevina do aminokiselina, što utiče na smanjenje prinosa a samim tim i pogoršanje kvaliteta (Červenski i Medić – Pap, 2018).

Bakteriji *Xcc* odgovara toplo i vlažno vreme. Prema istraživanjima Carrijo i Rêgo (2000) temperaturni opseg u kojem se patogen pojavljuje varira od 5–36 °C. Infekcija u polju se ostvaruje pri temperaturama 20–24 °C, a do pojave prvih simptoma dolazi pri višim temperaturama, 24–27 °C (Machaba, 1998). Prema navodima Ignatov (2006) optimalna temperatura za razvoj patogena je 24–30 °C. Pri takvim uslovima, simptomi se pojavljuju 7–14 dana nakon infekcije, u zavisnosti od osetljivosti biljke i agresivnosti patogenog soja.

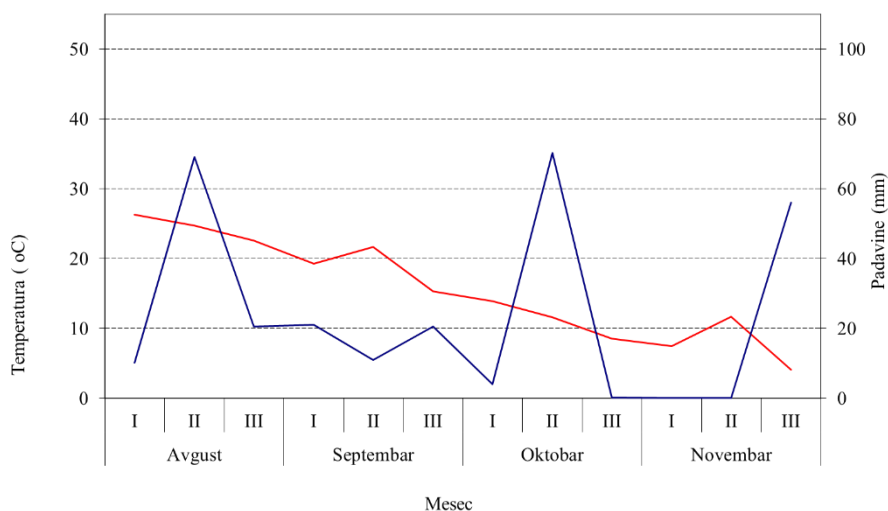
Podaci o srednjim dnevnim temperaturama (dekadno predstavljeni) i dekadnim padavinama za period avgust – novembar, u intervalu 2014–2016. god., prikazani su pomoću Walter dijagrama (Graf. 1, 2, 3). Preuzeti su sa meterološke stanice Rimski šančevi (<http://www.hidmet.gov.rs>).

Prosečna vrednost za temperaturu vazduha i sumu padavina u toku vegetacione sezone tokom 2014. godine iznosila je 15,07 °C i 232,3 mm. Najviša prosečna temperatura od 22,1 °C zabeležena je tokom prve dekade avgusta meseca, dok je najniža 3,5 °C zabeležena tokom treće dekade novembra. Najveća suma padavina je zabeležena tokom septembra – 84,3 mm, dok je najmanja zabeležena iznosila 5,2 mm, tokom novembra (Graf. 1).



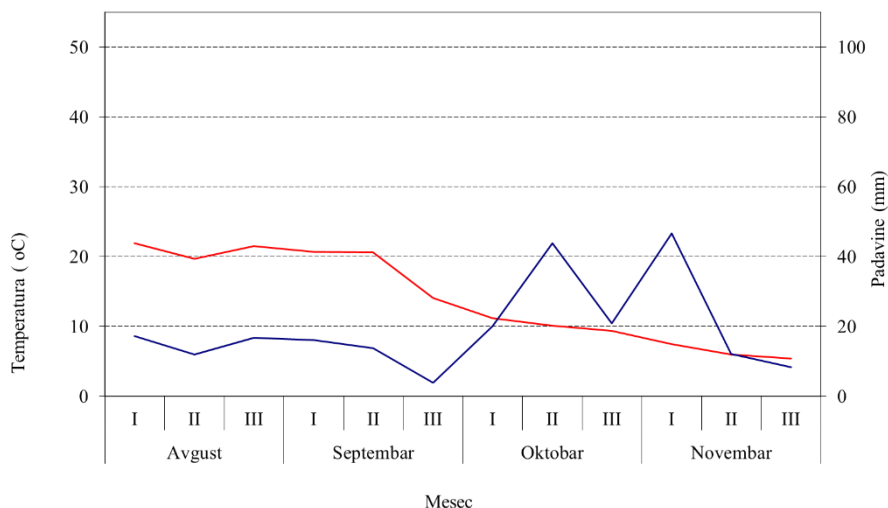
Graf. 1: Walter–ov klima dijagram agro – ekoloških uslova za vegetacioni period avgust – novembar 2014. god. na lokalitetu Rimski šančevi

Tokom vegetacione sezone 2015. godine, prosečna vrednost za temperaturu vazduha i sumu padavina iznosila je 15,6 °C i 283 mm. Najviša prosečna temperatura od 26,3 °C zabeležena je tokom prve dekade avgusta meseca, dok je najniža 4,1 °C zabeležena tokom treće dekade novembra. Najveća suma padavina je zabeležena tokom avgusta meseca – 99,7 mm, dok je najmanja zabeležena iznosila 52,6 mm, tokom septembra (Graf. 2).



Graf. 2: Walter–ov klima dijagram agro – ekoloških uslova za vegetacioni period avgust – novembar 2015. god. na lokalitetu Rimski šančevi

Vegetacionu sezonu 2016. godine karakterisale su prosečne vrednosti za temperaturu vazduha od 14 °C dok je suma padavina iznosila 231,4 mm. Najviša prosečna temperatura vazduha od 21,9 °C zabeležena je tokom prve dekade avgusta meseca, dok je najniža – 5,4 °C zabeležena tokom treće dekade novembra. Najveća suma padavina je zabeležena tokom oktobra 84,8 mm dok je najmanja zabeležena iznosila 33,7 mm tokom septembra (Graf. 3).



Graf. 3: Walter–ov klima dijagram agro – ekoloških uslova za vegetacioni period avgust – novembar 2016. god. na lokalitetu Rimski šančevi

6. MATERIJAL I METODE RADA

Eksperimenti predviđeni prijavom teme za izradu ove disertacije izvedeni su u laboratorijskim uslovima (Laboratorija za fitopatologiju, Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet) i poljskim uslovima (Rimski šančevi – Ogledno polje Odeljenja za povrtarstvo, Instituta za ratarstvo i povrtarstvo Novi Sad i Futog – poljoprivredni proizvođači) tokom 2014, 2015, 2016. i 2017. godine.

6.1. Lokaliteti i način uzorkovanja

Sakupljanje obolelih listova kupusnjača sa simptomima bakterioza, uzoraka semena i zemljišta je vršeno u periodu 2014–2017. godine. Listovi sa karakterističnim simptomima rubne hloroze, crnila sprovodnih sudova, su prikupljeni u papirne kese i u ručnom frižideru transportovani u laboratoriju u kojoj je vršena izolacija u roku od 48 sati. Uzorci su prikupljeni sa 23 lokaliteta na teritoriji R. Srbije (Kovilj, Rumenka, Rimski šančevi, Futog, Jasenovo, Despotovo, Golubinci, Kuzmin, Inđija, Voganj, Veternik, Zmajevo, Zvečka, Mužlja, Tabanovići, Aleksinac, Sokobanja, Šajkaš, Pirot, Niš, Leskovac, Mrčajevci, Begeč) jednog lokaliteta sa teritorije Federacije Bosne i Hercegovine (Vršani) i sa jednog lokaliteta sa teritorije R. Hrvatske (Erdut). Uzorak je činio jedan list (kupus, karfiol, brokoli, kelj, uljana repica) po biljci, sa tipičnim simptomima bakterioze i glavica (kupus) sa simptomima crne truleži. Tokom 2014. godine uzorci listova i glavica su prikupljeni sa četiri lokaliteta, po pet uzoraka kupusa (sorte Futoški) i dva uzorka karfiola (sorte Snežna grudva i lokalna populacija) (Tab. 4).

Tab. 4: Podaci o biljnim vrstama, sorti/hibridu, vremenu uzorkovanja u 2014. godini

| R. br. | Šifra uzorka | Biljna vrsta | Sorta/Hibrid | Lokalitet | Površina (ha) | Datum izolacije |
|--------|--------------|--------------|---------------|------------|---------------|-----------------|
| 1. | KS-1 | Kupus | Futoški | Rumenka | 0,75 | 16.07. |
| 2. | KS-2 | Kupus | Futoški | R. šančevi | 0,5 | 18.07. |
| 3. | KS-3 | Kupus | Futoški | Futog | 1,0 | 19.08. |
| 4. | KS-4 | Kupus | Futoški | Kovilj | 0,4 | 27.08. |
| 5. | KS-5 | Kupus | Futoški | Kovilj | 0,4 | 11.09. |
| 6. | KL-1 | Karfiol | Snežna grudva | Kovilj | 0,1 | 11.09. |
| 7. | KL-2 | Karfiol | Genotip* | Despotovo | 0,75 | 23.09. |

*Pod genotipom se podrazumeva nepoznati taksonomski rang između podvrste i forme

U 2015. godini sakupljeni su uzorci listova i glavica sa devet lokaliteta. Od biljnih vrsta najzastupljeniji je bio kupus sa 24 uzorka (sorte Futoški, Orion i lokalne populacije), karfiol 6 uzoraka (lokalne populacije), brokoli 1 uzorak (lokalna populacija) (Tab. 5).

Tab. 5: Podaci o biljnim vrstama, sorti/hibridu, vremenu uzorkovanja u 2015. godini

| R. br. | Šifra uzorka | Biljna vrsta | Sorta/Hibrid | Lokalitet | Površina (ha) | Datum izolacije |
|--------|--------------|--------------|--------------|------------|---------------|-----------------|
| 1. | KS-6 | Kupus | Futoški | R. šančevi | 0,75 | 29.08. |
| 2. | KS-7 | Kupus | Futoški | R. šančevi | 0,75 | 29.08. |
| 3. | KS-8 | Kupus | Futoški | R. šančevi | 0,75 | 29.08. |
| 4. | KS-9 | Kupus | Futoški | R. šančevi | 0,75 | 29.08. |
| 5. | KS-10 | Kupus | Genotip* | Jasenovo | 0,5 | 06.09. |
| 6. | KS-11 | Kupus | Genotip* | Jasenovo | 0,5 | 06.09. |
| 7. | KL-3 | Karfiol | Genotip* | Jasenovo | 0,3 | 06.09. |
| 8. | BL-1 | Brokoli | Genotip* | Jasenovo | 0,3 | 06.09. |
| 9. | KS-12 | Kupus | Genotip | Jasenovo | 0,5 | 06.09. |
| 10. | KS-13 | Kupus | Futoški | Rumenka | 1,0 | 08.10. |
| 11. | KS-14 | Kupus | Futoški | Rumenka | 1,0 | 08.10. |
| 12. | KS-15 | Kupus | Orion | R. šančevi | Rasad | 12.10. |
| 13. | KS-16 | Kupus | Orion | R. šančevi | Rasad | 12.10. |
| 14. | KS-17 | Kupus | Futoški | Futog | 0,2 | 26.10. |
| 15. | KS-18 | Kupus | Futoški | Futog | 0,2 | 26.10. |
| 16. | KS-19 | Kupus | Futoški | Futog | 0,2 | 26.10. |
| 17. | KL-4 | Karfiol | Genotip* | Futog | 0,1 | 29.10. |
| 18. | KL-5 | Karfiol | Genotip* | Futog | 0,1 | 29.10. |
| 19. | KS-20 | Kupus | Futoški | Mrčajevci | 0,2 | 29.10. |
| 20. | KS-21 | Kupus | Futoški | Mrčajevci | 0,5 | 29.10. |
| 21. | KS-22 | Kupus | Futoški | Despotovo | 0,5 | 29.10. |
| 22. | KL-6 | Karfiol | Genotip* | Despotovo | 0,5 | 29.10. |
| 23. | KL-7 | Karfiol | Genotip* | Despotovo | 0,5 | 29.10. |
| 24. | KL-8 | Karfiol | Genotip* | Despotovo | 0,5 | 29.10. |
| 25. | KS-23 | Kupus | Orion | Despotovo | 0,4 | 29.10. |
| 26. | KS-24 | Kupus | Futoški | Golubinci | 1,5 | 06.11. |
| 27. | KS-25 | Kupus | Futoški | Kuzmin | 0,75 | 12.11. |
| 28. | KS-26 | Kupus | Futoški | Kuzmin | 0,75 | 12.11. |
| 29. | KS-27 | Kupus | Futoški | Indija | 0,75 | 12.11. |
| 30. | KS-28 | Kupus | Futoški | Indija | 0,75 | 12.11. |
| 31. | KS-29 | Kupus | Futoški | Voganj | 0,75 | 12.11. |

*Pod genotipom se podrazumeva nepoznati taksonomski rang između podvrste i forme

Sakupljanje uzoraka tokom 2016. god. vršeno je na 16 lokaliteta sa 5 biljnih vrsta, od kojih je najzastupljeniji kupus sa 28 uzoraka (sorte Futoški, hibridi Bravo F1 i Fuego F1, lokalne populacije), karfiol 3 uzorka (hibridi Ferrare F1, Barcelona F1, lokalna populacija), uljana repica 3 uzorka (sorte Slavica) i po jedna uzorak brokolija (hibrid Naxos F1) i kelja (hibrid Jade F1) (Tab. 6).

Tab. 6: Podaci o biljnim vrstama, sorti/hibridu, vremenu uzorkovanja u 2016. godini

| R. br. | Šifra uzorka | Biljna vrsta | Sorta/Hibrid | Lokalitet | Površina (ha) | Datum izolacije |
|--------|--------------|--------------|--------------|------------|---------------|-----------------|
| 1. | UR-1 | U. repica | Slavica | R. šančevi | 0,25 | 19.04. |
| 2. | UR-2 | U. repica | Slavica | R. šančevi | 0,25 | 19.04. |
| 3. | UR-3 | U. repica | Slavica | R. šančevi | 0,25 | 20.05. |
| 4. | KS-30 | Kupus | Futoški | Veternik | 1,0 | 22.07. |
| 5. | KS-31 | Kupus | Futoški | Futog | Rasad | 22.07. |
| 6. | KS-32 | Kupus | Futoški | Futog | 0,5 | 22.07. |
| 7. | KS-33 | Kupus | Futoški | Futog | 1,0 | 22.07. |
| 8. | KS-34 | Kupus | Futoški | Zmajevu | 0,3 | 23.08. |
| 9. | KS-35 | Kupus | Futoški | Zmajevu | 0,5 | 23.08. |
| 10. | KS-36 | Kupus | Futoški | Zmajevu | 0,2 | 23.08. |
| 11. | BL-2 | Brokoli | Naxos F1 | Zvečka | 0,3 | 25.08. |
| 12. | KL-9 | Karfiol | Ferrare F1 | Mužja | 0,5 | 25.08. |
| 13. | KS-37 | Kupus | Bravo F1 | Mužja | 1,0 | 25.08. |
| 14. | KL-9 | Karfiol | Barcelona F1 | Zvečka | 0,5 | 25.08. |
| 15. | KS-38 | Kupus | Fuego F1 | Tabanović | 0,5 | 25.08. |
| 16. | KLJ-1 | Kelj | Jade F1 | Tabanović | 0,75 | 25.08. |
| 17. | KS-39 | Kupus | Genotip* | Aleksinac | 0,1 | 10.09. |
| 18. | KS-40 | Kupus | Genotip* | Aleksinac | 0,4 | 10.09. |
| 19. | KS-41 | Kupus | Genotip* | Sokobanja | 0,2 | 10.09. |
| 20. | KS-42 | Kupus | Genotip* | Sokobanja | 0,1 | 10.09. |
| 21. | KS-43 | Kupus | Genotip* | Vršani | 0,1 | 21.10. |
| 22. | KS-44 | Kupus | Genotip* | Vršani | 0,1 | 21.10. |
| 23. | KS-45 | Kupus | Futoški | Futog | 0,75 | 24.10. |
| 24. | KL-10 | Karfiol | Genotip* | Futog | 0,2 | 24.10. |
| 25. | KS-46 | Kupus | Genotip* | Futog | 0,4 | 24.10. |
| 26. | KS-47 | Kupus | Futoški | Kovilj | 1,0 | 02.11. |
| 27. | KS-48 | Kupus | Futoški | Šajkaš | 0,7 | 02.11. |
| 28. | KS-49 | Kupus | Genotip* | Kovilj | 0,3 | 04.11. |
| 29. | KS-50 | Kupus | Genotip* | Kovilj | 0,3 | 04.11. |
| 30. | KS-51 | Kupus | Genotip* | Pirot | 0,2 | 04.11. |
| 31. | KS-52 | Kupus | Genotip* | Pirot | 0,1 | 04.11. |
| 32. | KS-53 | Kupus | Genotip* | Niš | 0,75 | 07.11. |
| 33. | KS-54 | Kupus | Genotip* | Niš | 0,1 | 07.11. |
| 34. | KS-55 | Kupus | Genotip* | Leskovac | 0,75 | 07.11. |
| 35. | KS-56 | Kupus | Genotip* | Leskovac | 0,75 | 07.11. |
| 36. | KS-57 | Kupus | Futoški | Begeč | 0,75 | 14.11. |
| 37. | KS-58 | Kupus | Futoški | Begeč | 1,2 | 14.11. |

*Pod genotipom se podrazumeva nepoznati taksonomski rang između podvrste i forme

Tokom 2017. godine uzorci su prikupljeni sa 4 lokaliteta, 4 uzorka kupusa (sorte Futoški i Varaždinski) i 3 uzorka karfiola (lokalne populacije) (Tab. 7).

Tab. 7: Podaci o biljnim vrstama, sorti/hibridu, vremenu uzorkovanja u 2017. godini

| R. br. | Šifra uzorka | Biljna vrsta | Sorta/Hibrid | Lokalitet | Površina (ha) | Datum izolacije |
|--------|--------------|--------------|--------------|-----------|---------------|-----------------|
| 1. | KS-59 | Kupus | Futoški | Futog | 1,0 | 14.09. |
| 2. | KL-12 | Karfiol | Genotip* | Kovilj | 0,75 | 16.10. |
| 3. | KL-13 | Karfiol | Genotip* | Despotovo | 0,5 | 19.10. |
| 4. | KL-14 | Karfiol | Genotip* | Despotovo | 0,75 | 19.10. |
| 5. | KS-60 | Kupus | Futoški | Kovilj | 1,5 | 01.11. |
| 6. | KS-61 | Kupus | Varaždinski | Erdut | 0,1 | 27.10. |
| 7. | KS-62 | Kupus | Varaždinski | Erdut | 0,1 | 27.10. |

*Pod genotipom se podrazumeva nepoznati taksonomski rang između podvrste i forme

Sakupljanje uzoraka sertifikovanog i naturalnog semena je vršeno u periodu od tri godine (2015–2017). Uzorci naturalnog semena su poreklom sa dva lokaliteta (Futog i Despotovo), dok su deklarirani uzorci sakupljeni po poljoprivrednim apotekama. Tokom 2015. godine, sakupljeno je osam uzoraka semena; šest uzoraka naturalnog i dva uzorka sertifikovanog semena (Tab. 8).

Tab. 8: Uzorci sertifikovanog i naturalnog semena sakupljeni u 2015. godini

| Red. br. | Šifra uzorka | Datum izolacije | Biljna vrsta | Način proizvodnje* | Poreklo | Mesto uzorkovanja |
|----------|--------------|-----------------|--------------|--------------------|---------------------------|-------------------|
| 1. | S-1 | 08.06. | Kupus | N | Domaćinstvo | Futog |
| 2. | S-2 | 08.06. | Kupus | N | Domaćinstvo | Futog |
| 3. | S-3 | 08.06. | Kupus | N | Domaćinstvo | Futog |
| 4. | S-4 | 08.06. | Kupus | N | Domaćinstvo | Futog |
| 5. | S-5 | 08.06. | Kupus | N | Domaćinstvo | Futog |
| 6. | S-6 | 24.06. | Kupus | N | Domaćinstvo | Despotovo |
| 7. | S-7 | 29.06. | Kupus | S | Poljoprivredna apoteka | Novi Sad |
| 8. | S-8 | 14.07. | Kupus | S | Poljoprivredna apoteka | Novi Sad |

*S - sertifikovano seme: seme proizvedeno od semena poznatog genetičkog porekla i genetičke čistoće čija je proizvodnja kontrolisana; N - naturalno seme: nedorađeno i nedeklarirano seme (kategorizovano na osnovu Zakona o semenu „Sl. glasnik RS“ br. 45/2005)

U 2016. godini sakupljeno je sedam uzoraka semena i to četiri uzorka sertifikovanog i tri uzorka naturalnog semena (Tab. 9).

Tab. 9: Uzorci sertifikovanog i naturalnog semena sakupljeni u 2016. godini

| Red. br. | Šifra uzorka | Datum izolacije | Biljna vrsta | Način proizvodnje* | Poreklo | Mesto uzorkovanja |
|----------|--------------|-----------------|--------------|--------------------|------------------------|-------------------|
| 1. | S-9 | 05.04. | Kupus | S | Poljoprivredna apoteka | Novi Sad |
| 2. | S-10 | 05.04. | Karfiol | S | Poljoprivredna apoteka | Novi Sad |
| 3. | S-11 | 12.06. | Kupus | N | Domaćinstvo | Futog |
| 4. | S-12 | 12.06. | Kupus | N | Domaćinstvo | Futog |
| 5. | S-13 | 12.06. | Kupus | N | Domaćinstvo | Futog |
| 6. | S-14 | 02.08. | U. repica | S | Poljoprivredna apoteka | Novi Sad |
| 7. | S-15 | 02.08. | U. repica | S | Poljoprivredna apoteka | Novi Sad |

*S - sertifikovano seme: seme proizvedeno od semena poznatog genetičkog porekla i genetičke čistoće čija je proizvodnja kontrolisana; N - naturalno seme: neobrađeno i nedeklarisano seme (kategorizovano na osnovu Zakona o semenu „Sl. glasnik RS“ br. 45/2005)

Pet uzoraka semena sakupljeno je 2017. godine, jedan uzorak sertifikovanog i četiri uzorka naturalnog semena (Tab. 10).

Tab. 10: Uzorci sertifikovanog i naturalnog semena sakupljeni u 2017. godini

| Red. br. | Šifra uzorka | Datum izolacije | Biljna vrsta | Način proizvodnje* | Poreklo | Mesto uzorkovanja |
|----------|--------------|-----------------|--------------|--------------------|------------------------|-------------------|
| 1. | S-16 | 11.05. | Kupus | N | Domaćinstvo | Despotovo |
| 2. | S-17 | 11.05. | Kupus | N | Domaćinstvo | Futog |
| 3. | S-18 | 20.06. | Kupus | N | Domaćinstvo | Futog |
| 4. | S-19 | 16.06. | Kupus | N | Domaćinstvo | Futog |
| 5. | S-20 | 17.08. | U. repica | S | Poljoprivredna apoteka | Novi Sad |

*S - sertifikovano seme: seme proizvedeno od semena poznatog genetičkog porekla i genetičke čistoće čija je proizvodnja kontrolisana; N - naturalno seme: nedorađeno i nedeklarisano seme (kategorizovano na osnovu Zakona o semenu „Sl. glasnik RS“ br. 45/2005)

Za potrebe ispitivanja bioloških karakteristika *Xcc*, uzorci zemljišta sakupljeni su sa pet lokaliteta (Kovilj, Rimski šančevi, Futog, Despotovo, Gospođinci) (Tab. 11). prema metodi slučajnog uzorka. Sakupljen je veći broj poduzoraka sa dubine do 10 cm na više mesta po parceli, od kojih je sačinjen reprezentativni uzorak težine 0,5 kg (Jarak i Đurić, 2006). Uzorci su transportovani do laboratorije u PVC kesama i čuvani u frižideru na 4°C najduže 48 h od uzorkovanja. Cilj ispitivanja je bio utvrđivanje mogućnosti održavanja patogena u zemljištu.

Tab. 11: Uzorci zemljišta

| Red. br. | Šifra uzorka | Datum uzorkovanja | Plodosmena useva* | Usev u periodu uzorkovanja | Lokalitet |
|----------|--------------|-------------------|-------------------|----------------------------|------------|
| 1. | Z-1 | 02.09.2015. | 2 | Kupus | Kovilj |
| 2. | Z-2 | 17.09.2015. | 2 | Kupus | Kovilj |
| 3. | Z-3 | 17.09.2015. | 2 | Kupus | R. šančevi |
| 4. | Z-4 | 17.09.2015. | 1 | Kupus | Futog |
| 5. | Z-5 | 05.10.2015. | 3 | Kupus | Futog |
| 6. | Z-6 | 12.04.2016. | 1 | Pšenica | Futog |
| 7. | Z-7 | 12.04.2016. | 2 | Kupus | Kovilj |
| 8. | Z-8 | 05.09.2016. | 2 | Kupus | Despotovo |
| 9. | Z-9 | 05.09.2016. | 2 | Karfiol | Despotovo |
| 10. | Z-10 | 05.09.2016. | 3 | Kupus | Despotovo |
| 11. | Z-11 | 29.09.2016. | 2 | Kupus | R. šančevi |
| 12. | Z-12 | 20.09.2017. | 3 | Kupus | Futog |
| 13. | Z-13 | 02.10.2017. | 2 | Kupus | Gospođinci |

*1 – monokultura; 2 – dvogodišnja smena useva; 3 – druga godina postrni usev

6. 2. Izolacija *Xcc* iz listova

Po dopremanju u laboratoriju, uzorci listova kupusnjača sa simptomima bakterioza oprani su pod mlazom tekuće vode. Po sušenju listova, aseptično su uzimani fragmenti tkiva lista na prelazu između zdravog i obolelog dela koji su korišćeni za pripremu macerata. Bakteriološkom petljom, primenom metode iscrpljivanja, macerat je zasejan na podlogu od kvašćevog ekstrakta, dekstroze i CaCO₃ (Yeast Extract Dextrose Calcium Carbonate Agar – YDC, Schaad, 1988; Prilog 1) i podlogu mesopeptonski agar (MPA podloga; Prilog 1) u Petri kutije prečnika 90 mm (Arsenijević, 1997). Zasejane podloge su inkubirane u termostatu pri 27 °C u trajanju dva do tri dana.

Nakon inkubacije i razvoja kolonija, za dalja proučavanja odabrane su pojedinačne žute kolonije, za subkultivaciju, a nakon toga pojedinačne kolonije su presejane na zakošenu YDC podlogu i tako čuvane na 4 °C do početka rada.

6. 3. Izolacija *Xcc* iz zemljišta

Postupak izolacije bakterije iz zemljišta rađen je prema metodi koju je opisao Schaad i White (1974). Uzorci zemljišta su sadržali biljne ostatke u različitom stepenu razloženosti. Od prosečnog uzorka (0,5 kg) odmeravano je po 1 g zemljišta, u tri ponavljanja, koji je suspendovan u 9 ml sterilne vode.

Potom je vršeno potresanje pomoću vorteksa pri 1000 r.p.m., 5 sek i nakon toga zasejavanje na SX agar (Schaad i White, 1974) – po 100 µl pripremljene suspenzije u Petri kutije prečnika 90 mm. Nakon razvoja kolonija vršena je subkultivacija i formiranje kolekcije izolata poreklom iz zemljišta.

Za potrebe pozitivne kontrole i potvrdu efikasnosti metode korišćeno je veštački inokulisano sterilno zemljište. U 10 g zemljišta dodato je 1 ml bakterijske suspenzije 3×10^8 (utvđene pomoću McFarland skale). Nakon inkubacije od 5 dana na 27 °C, vršena je izolacija postupkom koji je predhodno naveden.

6. 3. 1. Periodična izolacija *Xcc* iz zemljišta

U cilju utvrđivanja fluktuacije *Xcc* u zemljištu, rađeno je 55 uzorkovanja zemljišta sa iste parcele, jednom mesečno tokom 24 meseca. Na osnovu uspešnosti izolacija odnosno prisustva bakterije ili odsustva bakterije u uzorcima zemljišta, utvrđena je fluktuacija *Xcc* za svaki mesec tokom kalendarske godine. Za ispitivanje je izabrana parcela u KO Futog površine 0,57 ha, na kojoj se kupus gaji u monokulturi. Uzorci zemljišta uzimani su sondom do dubine 15 cm. Uzorkovanje je vršeno dijagonalno na 12 mesta po parceli, a prosečni uzorak je činio 0,5 kg. Od prosečnog uzorka zemljišta izdvojeno je 5 g i rastvoreno u 50 ml sterilnog fiziološkog rastvora, nakon čega je pripremljena serija razređenja 1:10, 1:100 i 1:1000.

Iz svakog razređenja zasejano je po 100 µl na površinu podloge (Đukić i sar., 2010). Za potrebe izolacije korišćena je SX podloga. Inkubacija pri 27 °C trajala je 3–4 dana, u zavisnosti od vremena uzorkovanja zemljišta. Nakon razvoja kolonija vršena je subkultivacija, nakon čega je formirana kolekcija izolata.

6. 4. Izolacija *Xcc* iz semena kupusa

Ispitivanjima su obuhvaćena sertifikovana i naturalna semena. Za pozitivnu kontrolu upotrebljena su semena koja su hemijski dezinfikovana (4% rastvor NaClO), a potom potopljena 2 sata u suspenziju bakterije *Xcc* NCPPB 1144 koncentracije 3×10^8 ćel/ml (podešena pomoću McFarland skale), nakog čega su sušena 24 h na sterilnoj filter hartiji. Ispitivanja su sprovedena prema metodi koju opisuje International Seed Testing Association (ISTA) (Annexe to Chapter 7–019a: Seed Health Testing Methods) i Chitarra i sar. (2002).

6. 4. 1. Ekstrakcija *Xcc* iz semena kupusa

Uzorak semena je činio tri puta po 1000 semena (apsolutna masa 3–4 g). Maceracija 1000 semena pomoću avana i tučka je vršena u 10 ml sterilnog fiziološkog rastvora, kome je dodat Tween 20 (20 µl u 100 ml fiziološkog rastvora nakon sterilizacije). Nakon toga, macerat je prebačen u kolbe koje su postavljene na obrtni šejker 2 h pri 100–125 r.p.m. pri sobnoj temperaturi (23–25 °C). Po isteku predviđenog vremena macerat je preliven u sterline epruvete i centrifugiran 3 min pri 11000 obrtaja.

Iz supernatanta mikropipetom je preneto 500 µl suspenzije u 4,5 ml sterilnog fiziološkog rastvora, a nakon kratkog vorteksovanja je izvršeno još jedno razređenje po istom principu, kako bi se dobila razređenja 10^{-2} i 10^{-3} .

6. 4. 2. Izolacija na podlogu

Za izolaciju je upotrebljena YDC podloga u koju je dodat cikloheksamid (250 mg/l podloge) (Prilog 1), na koju je nanešeno po 100 µl nerazblaženog i razblaženog ekstrakta a potom razvučeno L – petljom. Ogled je postavljen u tri ponavljanja. Inkubacija je vršena 4 dana pri temperaturi 27 °C. Nakon porasta kolonija vršena je subkultivacija i formirana kolekcija izolata.

U daljim ispitivanjima korišćeni su izolati bakterija gajeni na YDC podlozi, starosti 48 h, gajeni pri temperaturi od 27 °C. Za uporedna ispitivanja korišćeni su kontrolni sojevi prikazani u Tab. 12.

Tab. 12: Kontrolni sojevi bakterija

| Šifra soja | Bakterija | Kolekcija | Kuratori |
|-------------------|---|---|---------------------------|
| KFB 29 | <i>Xanthomonas vesicatoria</i> | Kolekcija fitopatogenih bakterija Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet | Prof. dr Aleksa Obradović |
| NCPPB 1144 | <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> | National Collection of Plant Pathogenic Bacteria | |
| KBNS 201 | <i>Pseudomonas fluorescens</i> | Kolekcija fitopatogenih bakterija Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet | Prof. dr Jelica Balaž |
| KBNS 204 | <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> | | |
| KBNS 94 | <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> | Kolekcija fitopatogenih bakterija Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet | Dr Renata Iličić |
| ATCC 25922 | <i>Escherichia coli</i> | | |
| MRSA 82 | <i>Staphylococcus aureus</i> | Kolekcija humanih i animalnih patogenih bakterija Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet | Prof. dr Vesna Lalošević |

6. 5. Izolacija bakteriofaga

Izolacija bakteriofaga iz zemljišta tokom jeseni 2016. i 2017. godine, poreklom sa tri lokaliteta (Rimski šančevi, Futog, Kovilj), je rađena prema metodi obogaćivanja supstrata. Ova metoda omogućava selektivno umnožavanje bakteriofaga, specifičnih prema domaćinu koji se dodaje u podlogu (Crosse i Garrett, 1963). Zemljište je uzeto neposredno pored biljke domaćina bakterije. U postupku obogaćivanja upotrebljen je izolat *Xcc* (KS-17), izolovan i identifikovan na osnovu biohemijско – fizioloških karakteristika, seroloških i molekularnih metoda identifikacije, deponovan u GenBank Acc. No. MN56565.

Za izolaciju je uzeto 10 g zemljišta, 50 ml Nitrogen Yeast Glycerol Broth (NYGB) podloge i dodato 5 ml suspenzije izolata KS-17 koncentracije 10^6 CFU/ml. Pripremljena suspenzija je postavljena na rotacionu mešalicu u termostat pri 26 °C, u trajanju 24 h.

Ekstrakcija faga je izvršena centrifugiranjem 1 ml obogaćene suspenzije tokom 5 min na 16000g (Hermile Z 300 K). Supernatant je zatim prenet u tube i tretiran hloroformom (10:1 v/v) u trajanju 20 min, uz povremeno mešanje. Nakon taloženja hloroforma gornja faza suspenzije je dekantirana i prenet u nove tube obavijene Al – folijom, koje su čuvane u frižideru pri 4 °C, do upotrebe.

6. 6. Provera patogenosti izolata

6. 6. 1. Provera patogenosti infiltracijom bakterijske suspenzije u centralni nerv

Provera patogenosti izolata izvršena je veštačkom inokulacijom lista biljke domaćina (Obradović i Arsenijević, 1999; Radunović i Balaž, 2012). Bakterijska suspenzija 10^6 – 10^7 CFU/ml, pripremljena od kulture bakterija starosti 48h, gajene na YDC podlozi, pomoću medicinskog šprica i igle, ubrizgana je u centralni nerv lista kupusa sorte Futoški. Pozitivnu kontrolu činili su listovi kupusa inokulisani na isti način referentnim sojem *Xcc* NCPPB 1144, a negativnu kontrolu listovi kupusa u koje je infiltrirana sterilna destilovana voda. Inokulisani listovi postavljeni su u PVC kutije sa navlaženim filter papirom. Kutije su odložene u fitotrotonsku komoru gde su održavani konstantni uslovi temperature 25 °C. Rezultati su očitavani treći, peti i sedmi dan. Po završetku oglada, rađena je reizolacija bakterija, a potom reinokulacija opisanom metodom infiltracijom reizolata bakterije.

6. 6. 2. Provera patogenosti metodom prskanja

U test je uključeno pet biljnih vrsta familije kupusnjača: kupus sorte Futoški, karfiol sorte Snežna grudva, kelj sorte Gvozdena glava, brokoli hibrid Naxos F1 i uljana repica sorte Slavica. Za potrebe ispitivanja, biljke su gajene u kontejnerima tako što je seme biljaka dezinfikovano u mešavini preparata Funomil 0,07 % (tiofanat – metil 700 g/kg) i antibiotika streptomycin sulfata 0,02 % u trajanju od 5 min, a potom ispirano u destilovanoj vodi i sušeno na filter hartiji.

Nakon susenja seme je posejano u setvene kontejnere napunjene mešavinom sterilnog supstrata i peska u odnosu 3:1. Biljke su gajene pet nedelja u uslovima temperature 25 °C sa režimom svetla dan noć 16/8. Inokulacija je vršena u fenofazi četiri prava lista (BBCH 14), koju Fargier i Manceau (2007) navode kao najpogodniju za inokulaciju. Prskanje je izvedeno pomoću ručne prskalice, suspenzijom bakterije ($\leq 10^7$ CFU/ml) pripremljene iz kulture bakterija starosti 48 h, gajene na YDC podlozi.

Pozitivnu kontrolu činile su biljke inokulisane referentnim sojem NCPPB 1144, a negativnu kontrolu biljke koje su na isti način inokulisane sterilnom destilovanom vodom.

Nakon inokulacije biljke su držane u fitotronsnoj komori, pri istim uslovima temperature i svetlosti uz povećanje relativne vlažnosti vazduha. Promene na biljkama su praćene svakodnevno, a rezultati su očitavani petog, sedmog i dvanaestog dana nakon inokulacije.

6. 6. 3. Reizolacija bakterije na hranjive podloge

Reizolacija bakterije je vršena nakon pojave simptoma na inokulisanim delovima biljaka, prema metodi opisanoj u poglavlju 6. 2. Trećeg dana, nakon porasta kolonija, izvršeno je presejavanje na kosu YDC i formiranje kolekcije reizolata.

6. 6. 4. Hipersenzitivna reakcija na duvanu i muškati

Sposobnost izolata da prouzrokuju hipersenzitivnu reakciju na duvanu (*Nicotiana tabacum* L.) proverena je na sorti Virginia varijetetu PVH 2310. Biljke duvana su četiri dana pre inokulacije održavane pri temperaturi 16 °C, a dva dana nakon inokulacije pri temperaturi 33 °C (Jovanović i sar., 1997). Listovi duvana su inokulisani suspenzijom bakterije koncentracije 10⁸ CFU/ml, pomoću medicinskog šprica sa naličja listova. Kao pozitivna kontrola upotrebljeni su listovi inokulisani referentnim sojem NCPPB 1144, a kao negativna listovi inokulisani sterilnom destilovanom vodom.

Isti postupak je primenjen kod proučavanja hipersenzitivne reakcije na muškati (*Pelargonium hortorum*) sorte Sophia. Biljke su održavane pri temperaturi od 30 °C, a rezultati su beleženi nakon 24–48 h (Hildebrand i Riddle, 1971). Pojava nekroze na mestu inokulacije smatrana je pozitivnom reakcijom (Arsenijević, 1997).

6. 7. Odgajivačke odlike izolata

U cilju proučavanja odgajivačkih odlika izolata posmatran je izgled kolonija na standardnim hranjivim podlogama i stvaranje sluzi na hranjivom agaru (NA – Nutrient agar) sa 5% saharoze. Praćen je razvoj bakterija pri 37 °C, kao i uticaj različitih koncentracija NaCl i trifenil – tetrazolium hlorida (TTC) na porast bakterija.

6. 7. 1. Izgled kolonija na standardnim hranjivim podlogama

Zasejavanjem ispitivanih izolata na hranjive podloge MPA i YDC (Prilog 1), praćen je razvoj kolonija bakterija tokom 3–5 dana pri temperaturi od 27 °C. Posmatran je izgled, boja i veličina pojedinačnih kolonija.

6. 7. 2. Stvaranje sluzi na hranjivom agaru sa 5% saharoze

Ispitivani izolati su zasejavani na hranjivi agar (NA) sa dodatkom 5% saharoze (Prilog 1), tokom inkubacije tri do pet dana pri temperaturi 27 °C, praćen je razvoj kolonija i posmatrano stvaranje sluzi.

6. 7. 3. Razvoj pri 35 °C

Razvoj bakterija na 35 °C praćen je u tečnoj podlozi od kvasčevog ekstrakta i neorganskih soli (YS) (Fahy i Persely, 1983; Prilog 1). Podloga je razlivena u epruvete u količini od 10 ml i potom sterilisana. Nakon hlađenja do 35 °C, podloga je zasejana bakteriološkom petljom, punim zahvatom čiste kulture ispitivanih izolata u dva ponavljanja.

Zasejane podloge postavljene su u vodeno kupatilo na 35 °C. Uticaj temperature na porast je praćen tokom 7 dana nakon čega je ocenjeno prisustvo ili odsustvo bakterija. Za pozitivnu kontrolu upotrebljen je soj NCPPB 1144, dok je negativnu kontrolu činila nezasejana podloga. Zamućenje podloge usled razvoja bakterija smatrala se pozitivnom reakcijom, a bistra podloga bez zamućenja, negativnom.

6. 7. 4. Tolerantnost prema NaCl

Ispitivanje tolerantnosti prema NaCl izvršena je u tečnoj podlozi od kvasčevog ekstrakta i neorganskih soli (YS) (Prilog 2) pri koncentracijama NaCl 2, 5 i 7% (Fahy i Persley, 1983). Podloge su zasejavane punim zahvatom čiste kulture i potom inkubirane 7 dana na 27 °C. Za pozitivnu kontrolu upotrebljen je soj NCPPB 1144, dok je negativnu kontrolu činila nezasejana podloga. Zamućenje podloge ukazuje na pozitivan rezultat, a bistra podloga bez zamućenja, negativan.

6. 7. 5. Tolerantnost prema trifenil – tetrazolium hloridu – TTC

U destilovanoj vodi je pripremljen 5% rastvor TTC-a i sterilisan filtracijom koji je unet u odgovarajućoj količini u hranljivu podlogu (NA) rashlađenu do 50 °C kako bi se postigle koncentracije 0,02 i 0,1%. Podloge su razlivene u Petri kutije i nakon sušenja na podlogu je naneto po 3 µl bakterijske suspenzije (približno 10⁸ CFU/ml) pojedinačno za sve proučavane izolate, u vidu kapi, u tri ponavljanja. Porast kolonija pri temperaturi 26 °C praćen je svakodnevno tokom četiri dana (Tominaga i sar., 1978 loc. cit. po Arsenijević, 1997).

6. 8. Morfološke odlike izolata

6. 8. 1. Reakcija po Gramu

Reakcija po Gramu je izvedena pomoću KOH testa. Pun zahvat bakterijske kolonije starosti 48 sati, nanošen je na mikroskopske pločice i homogenizovan u 3% rastvoru KOH. Podizanjem bakteriološke petlje na kojoj se nalazi bakterijska kolonija uočava se pojava končića koji nastaje razgradnjom bakterijskih ćelija pod dejstvom KOH, što ukazuje da izolat pripada gramnegativnim bakterijama čiji ćelijski zid je osetljiv na delovanje baza. Kod Gram pozitivnih bakterija izostaje obrazovanje končića (Suslow i sar., 1982; Arsenijević i Jovanović, 1995). Kao kontrola korišćen je Gram pozitivan soj *Staphylococcus aureus* (MRSA 82) i Gram negativni soj *Xcc* (NCPBB 1144).

6. 8. 2. Pokretljivost

Pokretljivost bakterija praćena je u dubokoj podlozi od triptonu, natrijum hlorida i agara (Schaad i sar., 2001; Prilog 2). U sredinu epruvete pomoću bakteriološke eze, ubodom u podlogu su zasejani izolati starosti 48 sati. Procena pokretljivosti izvršena je na osnovu bakterijskog rasta, odnosno pokretni izolati prorastaju kroz podlogu difuzno od linije uboda eze, dok nepokretni sojevi rastu duž linije uboda. Pozitivni kontrolu činio je soj *Xcc* NCPBB 1144, a negativnu nezasejana podloga.

6. 8. 3. Oblik bakterija

Za pripremu preparata na mikroskopskoj ploči, upotrebljene su kolonije starosti 48 sati, fizički fiksirane plamenom i prelivene karbol – fuksinom, nakon čega je vršeno zagrevanje na plamenu do pojave pare. Potom je preparat ispran vodom i obezbojen upotrebom kiselog alkohola koncentracije 3%. Nakon ponovnog ispiranja vodom i susenja,

posmatranje ćelija je vršeno mikroskopskim pregledom pomoću uljne imerzije, korišćenjem uvećanja 10 x 100 (Karaklašević i sar., 1967; Jarak i Đurić, 2006).

6. 9. Biohemijsko – fiziološke odlike izolata

6. 9. 1. Oksidativno – fermentativni (O/F) metabolizam glukoze

Za ovaj test korišćena je Hugh – Leifson-ova podloga (1953) (Prilog 3) u koju je nakon hlađenja do 50 °C, filtracijom dodat rastvor glukoze do koncentracije 1%. Svaki izolat je zasejan u dve epruvete, od kojih je jedna za svaki izolat zalivena sterilnim parafinskim uljem radi stvaranja anaerobnih uslova. Druga epruveta za svaki izolat nije zalivena i u njoj je praćen aerobni proces metabolizma glukoze. Za pozitivnu kontrolu upotrebljen je soj NCPPB 1144.

Nakon inkubacije od 7 dana pri temperaturi na 27 °C očitavani su rezultati. Razlaganjem glukoze nastaje kiselina usled čega se menja pH vrednost podloge, što se manifestuje promenom boje bromtimol plavo indikatora koji se nalazi u podlozi. Promena boje podloge u žutu, u epruveti sa parafinskim uljem (anaerobni uslovi), označava da bakterija razlaže glukozu fermentativnim putem (anaerobni metabolizam). Promena boje u žutu u epruveti bez ulja, označava oksidativni put razlaganja glukoze (aerobni metabolizam) (Arsenijević, 1997).

6. 9. 2. Stvaranje H₂S iz peptona

Stvaranje H₂S iz peptona je praćeno u tečnoj podlozi sa kvasčevim ekstraktom i mineralnim solima (Yeast Salts Broth – YS) u koju je dodat pepton (Prilog 2) (Jerotijević, 1973).

Osušene trake filter papira, prethodno navlažene u 10% rastvoru olovo – acetata, pričvršćene su vatenim zatvaračem za rub vrha epruvete. Trake su postavljene tako da se donji kraj papira nalazi 0,5 cm iznad površine tečne podloge. Kulture su inkubirane u trajanju od dve nedelje pri temperaturi 27 °C. Rezultati su očitavani nakon 3, 6 i 14 dana. Kao kontrola korišćena su dva soja, za pozitivnu NCPPB 1144 i negativnu KBNS 94.

6. 9. 3. Stvaranje indola

Reakcija stvaranja indola je praćena u tečnoj podlozi sa triptonom (Prilog 3) (Sands, 1990). Bakterijske kulture starosti 48 h zasejane su u peptonsku vodu i inkubirane 10 dana pri temperaturi 27 °C. Nakon inkubacije, u svaku epruvetu je dodat Kovacs – indol reagens. Za kontrolu korišćen je soj NCPPB 1144 i nezasejana podloga.

6. 9. 4. Aktivnost oksidaze

Test aktivnosti oksidaze ispitivanih izolata, rađen je prema Kovacsev metodi (Kovacs, 1956 loc. cit po Arsenijević 1997). Na filter papiru navlaženom sa nekoliko kapi 1% (w/v) tetrametilparafenilendiamindihlorhidrata nanet je pun zahvat kolonije stare 24 h platinskom petljom. Pozitivnom reakcijom smatra se pojava tamnoljubičaste boje za 5–10 sekundi. Slabo pozitivna reakcija javlja se u vremenu od 30–40 sekundi. Kao pozitivna kontrola upotrebljen je soj KBNS 201 (*Ps. fluorescens*).

6. 9. 5. Aktivnost katalaze

Za dokazivanje sposobnosti stvaranja enzima katalaze korišćen je vodonikperoksid (H_2O_2). U kapi 20% H_2O_2 na mikroskopskoj pločici homogenizovan je pun zahvat bakteriološke petlje čiste kulture izolata. Pojava mehurića gasa nastala kao rezultat izdvajanja slobodnog kiseonika označava pozitivnu reakciju, odnosno prisustvo katalaze u ispitivanom uzorku (Dye, 1962).

6. 9. 6. Razlaganje želatina

Praćenje sposobnosti razlaganja želatina vršeno je prema metodi koju opisuju Lelliott i Stead (1987). Na podlogu sa želatinom (Prilog 3) bakteriološkom petljom razmazana je kolonija bakterije starosti 48 h. Nakon inkubacije pri 27 °C, sedmog dana su očitani rezultati uz dodavanje Frejzerovog reagensa (Prilog 3). Kao pozitivna kontrola korišćen je referentni soj NCPPB 1144, a kao negativna nezasejana podloga.

6. 9. 7. Hidroliza skroba

Ispitivanje aktivnosti fermenata amilaze odnosno sposobnosti hidrolize skroba vršeno je na podlozi koja sadrži 1% rastvorljivog skroba (Lelliott i Stead, 1987). Podloge su zasejane kulturama bakterija starim 48 h i inkubirane sedam dana.

Nakon isteka perioda inkubacije dodato je nekoliko kapi Lugolovog rastvora (Prilog 3). Po dodavanju reagensa, pojava žute boje oko bakterijske kolonije označava pozitivnu

reakciju, dok pojava plave boje označava da skrob nije hidrolizovan. Kao pozitivna kontrola upotrebljen je referentni soj NCPPB 1144, a kao negativna – nezasejana podloga.

6. 9. 8. Hidroliza eskulina

U tečnu podlogu sa eskulinom (Prilog 3), nakon sterilizacije, zasejani su ispitivani izolati bakterija (Jones, 1971). Rezultati su očitavani nakon 7 i 14 dana, a pozitivnom reakcijom je smatrana promena boje u tamnomrku do crne. Kao pozitivna kontrola upotrebljen je referentni soj NCPPB 1144, a kao negativna – nezasejana podloga.

6. 9. 9. Redukcija nitrata

Mogućnost izolata da vrše redukciju nitrata (NO_3) u nitrite (NO_2), ispitivana je zasejavanjem izolata u epruvete sa hranjivim bujonom i KNO_3 (Király et al., 1970; Prilog 3). Kao pozitivna kontrola korišćen je izolat bakterije *Echerichia coli* (ATCC 25922), a kao negativna – nezasejana podloga.

Pet dana nakon zasejavanja rezultati su očitani dodavanjem reagensa (Prilog 3). Trenutna pojava ćilibarne boje u podlozi označava pozitivnu reakciju, odnosno prisustvo nitrata (Arsenijević, 1997).

6. 9. 10. Razlaganje citrata

Za ovo ispitivanje korišćen je Simonsov citratni agar (Prilog 3). Promena boje iz zelene u plavu značila je da ispitivani izolat može da koristi citrate kao izvor energije (Knežević – Vukčević, 1999). Inkubacija je vršena 48 časova, pri 27 °C. Kao pozitivna kontrola upotrebljen je izolat bakterije *E. coli* (ATCC 25922), a kao negativna kontrola korišćena je nezasejana podloga.

6. 9. 11. Proteoliza mleka

U ovom testu upotrebljena je mesopeptonska podloga (NA) i mesopeptonska podloga sa dodatkom kvašćevog ekstrakta (YNA, Prilog 3). U Petri kutiju 90 mm, razliveno je 15 ml NA podloge. Nakon hlađenja preko nje je dodat tanji sloj podloge YNA, kojoj je aseptično dodato 15% (w/v) sterilnog obranog mleka.

Nakon sušenja, podloga je zasejavana razmazom. Posmatranje je vršeno tokom sedam dana. Pojava prosvetljene zone oko razvijenih kolonija znak je pozitivne reakcije (Arsenijević, 1997). Kao pozitivna kontrola upotrebljen je referentni soj NCPPB 1144, a kao negativna – nezasejana podloga.

6. 9. 12. Hidroliza estra oleinske kiseline (Aktivnost lipaze)

Nakon sterilizacije, mesopeptonskoj podlozi je dodat Tween 80 do krajnje koncentracije 1%. Nakon toga podloga je razlivena u Petri kutije (90 mm) i zasejana kulturom bakterije starom 48 h. Rezultati su očitavani nakon sedam dana razvoja, pri 27 °C. Pojava beličastog oreola oko kolonija bakterije, koji ukazuje na stvaranje kristala kalcijum-oleata, označava pozitivnu reakciju (Arsenijević, 1997). Kao pozitivna kontrola upotrebljen je referentni soj NCPPB 1144.

6. 9. 13. Stvaranje kiseline iz ugljenih hidrata

Za ispitivanje fermentacije ugljenikovih jedinjenja je korišćena Dye-ova podloga C (Dye, 1968). Nakon sterilizacije podloge dodavana su, filtracijom sterilisana, različita ugljenikova jedinjenja do koncentracije 0,5% (Arsenijević, 1997). Kao izvori ugljenika, korišćena su sledeća jedinjenja: arabinoza, celobioza, trehaloza, glukoza, galaktoza, laktoza, manoza, saharoza i dekstrin. Kao negativna kontrola, korišćena je nezasejana podloga. Aktivnost izolata je praćena 7, 14 i 21 dan. Promena boje podloge u žutu ukazuje na pozitivnu reakciju, odnosno na stvaranje kiseline iz određenog jedinjenja ugljenika.

6. 10. Serološke odlike izolata

Sakupljeni izolati testirani su primenom direktne imunoenzimske metode na ploči (DAS – ELISA). U testu su korišćene čiste kulture bakterije, starosti 48h, gajene na podlozi od hranjivog agara pri 27°C. Metoda je izvedena prema uputstvu proizvođača (Loewe Biochemica GmbH, Nemačka).

Izolati bakterija suspenzovani su i razređeni u puferu, u odnosu 1:20 do približne koncentracije 10^8 CFU/ml. Pored negativne kontrole koja je dobijena u sklopu kita (Loewe Biochemica GmbH, Nemačka), korišćen je soj KFB 29 bakterije *X. vesicatoria* i KBNS 94 soj *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. Kao pozitivna kontrola korišćen je referentni soj NCPPB 1144, kao i pozitivna kontrola dostupna u kitu. U testu su upotrebljena komercijalno dostupna poliklonalna antitela (IgG) specifična za detekciju *Xcc* i sekundarna antitela konjugovana enzimom (IgG-AP-Conjugate) u razređenju 1:200 u odgovarajućem puferu. Svaki uzorak kao i pozitivna i negativna kontrola su testirani u dva ponavljanja. Promena boje je praćena vizuelno, a zatim i merenjem ekstinkcije na talasnoj dužini 405 nm na spektrofotometru (Multiskan Ascent, Thermo Labsystems, Helsinki, Finland).

Test je izveden na polistirenskim mikrotitarskim pločama. U prvom koraku bunarčići su obloženi nanošenjem po 200 μ l specifičnih antitela, nakon čega su ploče postavljene u termostat na 37 °C u trajanju od 4 sata. Nakon perioda inkubacije, ploče su isprane četiri puta puferom za ispiranje. Na kraju svakog ciklusa ispiranja, sadržaj ploče je ispražnjen snažnim istresanjem po upijajućoj hartiji na čvrstoj podlozi. Zatim je u bunarčiće dodato po 200 μ l suspenzije bakterija u dva ponavljanja, kao i pozitivna i negativna kontrola. U testu su upotrebljene polistirenske mikrotitarske ploče Nunc sa 96 (8 x 12) bunarčića. Da bi se predupredila pojava većih vrednosti ekstinkcija prilikom očitavanja, u bunarčiće prve i poslednje kolone kao i prvog i drugog reda, na ploču nisu nanošeni ispitivani izolati. Inkubacija je vršena preko noći na 4 °C. Nakon odstranjivanja sadržaja iz bunarčića, predhodno opisanim postupkom, u bunarčiće je uneto po 200 μ l antitela konjugovanih sa alkalnom fosfatazom. Ploče su inkubirane 4 sata na 37 °C. Posle inkubacije, mikrotitarske ploče su isprane kako je predhodno navedeno, a zatim je u svaki bunarčić uneto po 200 μ l pripremljenog supstrata (p – nitrofenilfosfat) u supstratnom puferu (20 μ l/20 ml).

Ploče su inkubirane pri sobnoj temperaturi na tamnom mestu (1–2 sata), do pojave bojene reakcije. Intenzitet bojene reakcije je očitavan spektrofotometrijski na automatskom čitaču (Multiskan Ascent, Thermo Labsystems, Helsinki, Finland), merenjem ekstinkcije na talasnoj dužini 405 nm.

Rezultati za svaki uzorak su izračunati kao prosečna vrednost dva ponavljanja, uključujući kontrole. Pozitivnim su smatrani svi uzorci čija je vrednost apsorpcije bila dva ili više puta veća od negativne kontrole. Pozitivnim reakcijama smatraju se vrednosti čija je ekstinkcija najmanje dva puta viša od srednje vrednosti negativne kontrole tzv. „cut – off” vrednosti (Krstić i Tošić, 1994).

6. 11. Molekularna identifikacija izolata

6. 11. 1. Ekstrakcija DNK za m-PCR

Postupak izolacije DNK je vršen prema protokolu ISTA (Annexe to Chapter 7 – 019a: Seed Health Testing Methods). Pojedinačne kolonije bakterija starosti 48 h su prenete i homogenizovane u mikrotube zapremine 1,5 ml u kojima se nalazio 1 ml sterilnog fiziološkog rastvora. Nakon toga je vršeno centrifugiranje 5 min 8000 r.p.m. na 25 °C, a potom odlivanje supernatanta i dodavanje 500 µl 0,5 N NaOH. Posle inkubacije pri 65 °C 10 min i vorteksovanja na 1000 r.p.m., u nove mikrotube sa 495 µl DNA free vode preneto je 5 µl suspenzije. Izolovana DNK je čuvana u zamrzivaču na –20°C.

6. 11. 2. m-PCR

Pri identifikaciji izolata korišćen je multiplex-PCR (m-PCR) koji obuhvata istovremenu primenu 2 ili više setova prajmera za određene gene. Specifični prajmeri korišćeni u identifikaciji *Xcc* dati su u tabeli 14.

Za pozitivnu kontrolu upotrebljen je referentni soj *Xcc* NCPPB 1144, dok su za negativnu upotrebljeni sojevi KBNS 94 *P. s* pv. *syringae*, KFB 29 *X. vesicatoria*, *E. coli* soj ATCC 25922. Slepa proba bez DNK korišćena je pri svakoj PCR amplifikaciji.

Tab. 14: Prajmeri korišćeni u identifikaciji *Xcc*

| Naziv prajmera | Sekvenca | Dužina (bp) | Izvor |
|----------------|-------------------------------------|-------------|----------------------------|
| DLH 120 | 5' CCg.TAg.CAC.TTA.gTg.CAA.Tg 3' | 619 | Berg i sar., (2005) |
| DLH 125 | 5' gCA.TTT.CCA.TCg.gTC.ACg.ATT.g 3' | | |
| Zup 2309 | 5' AAA.TCA.ggg.ggA.TgC.ggT.gg 3' | 370 | Rijlaarsdam i sar., (2004) |
| Zup 2310 | 5' TCC.ggC.CAg.ggT.CgA.TAC.AgT.g 3' | | |

Konačna zapremina PCR smeše je iznosila 20 µl po uzorku, od date zapremine Master Mix je činio 10 µl, svaki od upotrebljenih prajmera po 0,25 µl, CL 2 µl, DNK 3 µl i voda 4 µl.

Umnožavanje DNK fragmenata u PCR aparatu je vršeno prema sledećem programu:

- Inicijalna denaturacija (95 °C 3 min, 1 ciklus)
- Denaturacija DNK (95 °C 40 sek, 6 ciklusa)
- Vezivanje prajmera (63 °C sa povećanjem od 1 °C po ciklusu 40 sek; 72 °C 40 sek; 95 °C 40 sek, 29 ciklusa)
- Ekstenzija (58 °C 40 sek; 72 °C 40 sek)
- Dodatna ekstenzija (72 °C 5 min)

Proizvodi PCR reakcije (7 µl) su razdvojeni elektroforezom (BlueMarine™ 200) na 2% agaroznom gelu u TBE puferu (Prilog 4). Elektroforeza je tekla 90 min pri naponu struje 90 V. Nakon toga gel je bojen u rastvoru destilovane vode i etidijum – bromida (EtBr) (0,5µl/10 ml vode) u trajanju 30 min a potom obezbojen u destilovanoj vodi u trajanju od 20 min. Po završenom obezbojenju, gel je posmatran pod UV svetlom i fotografisan.

Na osnovu upotrebljenog markera (SERVA FastLoad 100bp DNA Ladder, ServaElectrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany) određena je približna molekulska masa PCR proizvoda, a pozitivnim se smatrao svaki uzorak u kome su amplifikovani fragmenti veličine 370 i 619 bp.

6. 11. 3 Analiza 16S rRNK

6. 11. 3. 1. Ekstrakcija DNK

U postupku ekstrakcije DNK korišćene su čiste kulture bakterija starosti 48 h, gajenih na YDC podlozi pri temperaturi 27°C. Ekstrakcija genomske DNK rađena je prema modifikovanoj proceduri koju opisuju Aljanabi i Martinez (1997). Zahvatom plastične petlje, bakterije su suspendovane u 500 µl TE pufera (10 ml 0,1M Tris-Cl (pH 8.0); 0,2 ml EDTA (pH 6.0); 88,8 ml destilovane sterilne vode, a potom centrifugirane u trajanju 5 min pri 5000–8000 rpm. Odbacivanjem supernatanta, talog je suspendovan u 400 µl ekstrakcionog pufera (0,8 ml 5M NaCl; 1 ml 0,1M Tris-HCl (pH 8.0); 40 µl 0,5 EDTA (pH 8.0); 8,16 ml sterilne destilovane vode), a potom izmešan na vorteks mešalici. Posle toga, dodato je 8 µl rastvora proteinaze K (20 mg/ml) i promešano laganim pokretima ruke. Mikroeprevete su inkubirane u trajanju od 30 min, pri temperaturi 37 °C. Potom, dodato je 40 µl 20% natrijm dodecil sulfata (eng. sodium dodecyl sulphate, SDS) i intenzivno mešano na vorteks mešalici. Usledila je inkubacija u termobloku pri 55–65 °C,

u trajanju od 1,5 h. Zatim su uzorci postavljeni na led, u trajanju od 5 min. U svaku mikropruvetu dodato je 360 μ l 5M NaCl. Nakon mešanja na vorteks mešalici, uzorci su centrifugirani pri 13 200 rpm, u trajanju od 30 min. Dobijeni supernatant prebačen je u nove mikropruvete zapremine 2 ml, u koje je potom dodat 1 μ l RNA-ze (10 mg/ml). Potom je vršeno inkubiranje u trajanju 1h, pri temperaturi 37°C. Uzorci su ostavljeni da prenoće u zamrzivaču, pri temperaturi oko –20 °C. Nakon odmrzavanja, sadržaj mikropruveta je centrifugiran pri maksimalnom broju obrtaja u trajanju 15 min, supernatant je odstranjen, a dobijeni talog je ispran sa 250 μ l 70% etanola. Uzorci su centrifugirani na maksimalnom broju obrtaja, u trajanju 5 min, a potom je pipetom pažljivo odstranjen supernatant. Mikropruvete su ostavljene da se osuše. Rastvaranje dobijene prečišćene DNK izvršeno je pipetiranjem 100 μ l TE pufera u mikropruvete. Korišćenjem 50 μ l pufera za rastvaranje postiže se veća koncentracija DNK u rastvoru. Čuvana je pri temperaturi – 20 °C.

6. 11. 3. 2. Sekvenciona analiza 16S rRNK

Korišćenjem univerzalnih prajmera fD1/rP2 (Tab. 15) (Weisburg i sar., 1991), umnožena je sekvenca ribozomalnog gena dužine oko 1450 bp za 12 izolata: KS-1, KS-6, BL-1, KS-16, KS-17, KL-6, KS-24, UR-1, BL-2, KS-38, KLJ-1, KS-42, odabranih sa različitih domaćina i lokaliteta.

Tab. 15: Prajmeri korišćeni za umnožavanje sekvenci 16S rRNK

| Naziv i sekvenca prajmera (5'-3') | Veličina Fragmenta | Literatura |
|---|-----------------------|--------------------------|
| fD1: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG rP2: ACGGCTACCTTGTTACGACTT | ~ 1450 bp | Weisburg i sar., 1991 |

Smeša za reakciju konačne zapremine 50 μ l sadržala je: 38,7 μ l „nuclease free“ vode, 5 μ l 10 \times DreamTaq pufera sa 20 mM MgCl₂ (Thermo Scientific, Vilnius Lithuania), 1 μ l dNTPs (10mM), 1 μ M prajmera, 0,3 μ l DreamTaq DNK polimeraze (Thermo Scientific, Vilnius Lithuania) i 3 μ l uzorka DNK.

Odvijanje reakcije je bilo prema sledećem programu:

- Početna denaturacija 95 °C u trajanju 5 min,
- Denaturacija 35 ciklusa pri 94 °C u trajanju 1 min,
- Vezivanja prajmera 55 °C tokom 1 min
- Ekstenzija 72 °C u trajanju 1,5 min.

Poslednji ciklus ekstenzije trajao je 5 min, pri 72°C. Umnoženi DNK fragmenti odabranih sojeva sekvencirani su u oba smera (Macrogen Europe, Amsterdam, The Netherlands), korišćenjem istih prajmera koji su korišćeni za umnožavanje.

U cilju dalje karakterizacije izolata, odabrani izolati su poslani na uslužno prečišćavanje i sekvenciranje (Macrogen Europe, Holandija). Nakon obrade sekvenci u programu FinchTV Version 1.4.0., sekvence („forward” i „reverse”) su međusobno poređene u CLUSTAL W programu, integrisanom unutar programa MEGA verzija 5.0 (Tamura i sar., 2011) i analizirane pomoću BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) poređenjem sa sekvencama dostupnim u bazi banke gena (GenBank). Za filogenetske analize korišćen je softverski paket MEGA verzija 5.0. Sve dobijene sekvence su deponovane u GenBank bazu podataka, gde im je dodeljen pristupni broj od MN56561 do MN56572 (GenBank Accession number).

Filogenetska analiza za izolate KS-1, KS-6, BL-1, KS-16, KS-17, KL-6, KS-24, UR-1, BL-2, KS-38, KLJ-1, KS-42 izvedena je primenom „neighbor-joining“ (NJ) metode (Saitou i Nei, 1987), sa genetičkom udaljenošću između sekvenci izračunatom prema Kimura-2 modelu (Kimura, 1980). Stabilnost grananja dendograma testirana je „bootstrap” analizom sa 1000 ponavljanja. Filogenetsko stablo ukorenjeno je korišćenjem sekvence 16S rRNK gena sojeva *Xanthomonas euvesicatoria* KX512832, *Acidovorax citruli* NR041758, *Agrobacterium tumefaciens* AJ389906, *Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum* HM581688, *Pseudomonas syringae* LC164016 i *Pseudomonas syringae pv. maculicola* AB001444.

6. 12. Osetljivost izolata *Xcc* na bakarne preparate *in vitro*

Osetljivost proučavanih izolata na: bakar – hidroksid, bakar – oksihlorid, bakar (II) sulfat i antibiotik streptomycin – sulfat je ispitana prema metodi koju navode Ritchie i Dittapongpitch (1991). Za ispitivanje je korišćena podloga sa saharozom i peptonom (SPA; Lelliot i Stead, 1987; Prilog 5). U sterilisanu i prohlađenu podlogu (50 °C), dodati su filterom sterilisani rastvori bakra do konačne koncentracije od 100, 200 i 300 ppm i streptomycin – sulfat do koncentracije od 5, 10, 25, 50 ppm. Nakon homogenizacije na magnetnoj mešalici, podloga je razlivena u Petri kutije prečnika 90 mm.

Bakterijske kulture starosti 48 sati, gajene na YDC podlozi, suspendovane su u sterilnoj destilovanoj vodi do koncentracije približno 10^8 CFU/ml. Zasejavanje suspenzije na podlogu, vršeno je pipetiranjem po 3 μ l bakterijske suspenzije u vidu kapljica. Kao negativna kontrola zasejana je podloga bez inkorporacije baktericida. Zasejane podloge inkubirane su pri temperaturi 27 °C. Nakon 48 h, beleženo je prisustvo ili odsustvo kolonija. Ogled je postavljen u tri ponavljanja; jedna Petri kutija predstavljala je jedno ponavljanje.

6. 13. Specifičnost bakteriofaga prema *Xcc*

6. 13. 1. Prečišćavanje i određivanje titra bakteriofaga

Prečišćavanje bakteriofaga je urađeno prema metodi koju opisuju Gašić i sar. (2012), na osnovu izgleda plakova u podlozi. Suspenzija faga je razređena u sterilnoj vodi u odnosu 1:10. U dno Petri kutije dodato je 100 μ l suspenzije bakterije *Xcc* i 100 μ l suspenzije faga određenog razređenja. Potom je dodata NYA podloga, u količini dok dno nije prekriveno. Kružnim pokretima Petri kutije obezbeđena je ravnomerna distribucija faga i bakterije u podlozi. Petri kutije su postavljene u termostat pri 27 °C. Nakon 24 h inkubacije posmatrana je pojava i izgled pojedinačnih plakova. Blagim ubodom sterilnim štapićem u centar plaka, odvojen je deo plaka sa podlogom i resuspendovan u 100 μ l sterilne destilovane vode u mikroepruveti. Posle mešanja napravljena su još dva razređenja u odnosu 1:10 u sterilnoj vodi. Nakon toga, uzeto je po 100 μ l suspenzije faga svakog razređenja i 100 μ l suspenzije kompatibilnog soja bakterije u 0,01 M magnezijum-sulfatnom rastvoru, zasejano je u NYA podlozi kao što je prethodno opisano. Nakon 24 h inkubacije, formirani su plakovi. Opisani postupak je ponavljen još dva puta. Nakon pojave ujednačene forme plakova, podloga iz Petri kutije je prenetu u sterilnu kolbu i usitnjena. Dodato je 10 ml sterilne vode i zatim centrifugirano 20 min na 8 000 g, kako bi

se uklonili ostaci podloge. Nakon toga supernatant je odliven u sterilnu staklenu posudu i tretiran hloroformom (10:1 v/v). Po taloženju, nakon 1 h, pipetom je izdvojena gornja faza u kojoj se nalaze fagi. Fagi su čuvani u tamnoj posudi na 4 °C.

Određivanje titra bakteriofaga je rađeno prema modifikovanoj metodi koju opisuju Klement i sar. (1990). Serija deset razređenja suspenzije faga u sterilnoj vodi je napravljena u odnosu 1:10 (10^{-1} ; 10^{-2} ; 10^{-3} ; 10^{-4} ; 10^{-5} ; 10^{-6} ; 10^{-7} ; 10^{-8} ; 10^{-9} ; 10^{-10}). U epruvetu sa NYA podlogom, ohlađenu na 45 °C dodato je 100 µl izolata KS-17 i 100 µl suspenzije faga određenog razređenja. Nakon mešanja blagim pokretima, sadržaj epruvete je preliven u Petri kutije koje su postavljene u termostat, pri temperaturi od 27 °C. Nakon inkubacije od 24 h, posmatrani su i prebrojani plakovi u podlozi. Na osnovu broja formiranih plakova u određenim razređenjima, vršeno je izračunavanje titra faga izraženog u broju formiranih plakova po ml suspenzije (plaque forming units/ml, PFU/ml) prema formuli:

$$\text{titar bakteriofaga (PFU/ml)} = \text{broj formiranih plakova} \times 1/\text{razređenje} \times 10$$

6. 13. 2. Određivanje specifičnosti bakteriofaga prema *Xcc*

Za ovaj test, odabrano je nasumično 20 bakterijskih izolata. Ispitivanje specifičnosti bakteriofaga je rađena prema metodi Adams (1959) – *Spot test* (dvoslojni agar). Prvo je razliven ravan agar u svaku Petri kutiju sa po 30 ml podloge. Nakon sušenja, ravan agar je preliven sa 10 ml vršnog sloja agara (Top Layer Agar) u koji je nakon hlađenja do 45°C dodato po 0,1 ml bakterijske suspenzije koja je gajena u LTP podlozi (Prilog 5). U sterilnoj česmenskoj vodi pripremljena je suspenzija bakteriofaga, koncentracije približno 10^{10} PFU/ml. Po sušenju gornje podloge, mikropipetom dodato je 4 µl suspenzije izolovanih bakteriofaga. Pojava plaka je posmatrana nakon inkubacije na 27 °C u trajanju od 24 h.

6. 14. Uticaj temperature na razvoj bolesti *in vitro*

Za ovo ispitivanje odabrane su biljke kupusa sorte Futoški starosti 6 nedelja. Pre setve seme je dezinfikovano u rastvoru streptomycin-sulfata 0,02% i tiofanat – metila 0,01% u trajanju od pet minuta, a potom isprano pod mlazom česmenske vode i posejano u mešavinu supstrata (Klasmann 2) i sterilnog peska u odnosu 3:1. Biljke su gajene u fitotronu pri fotoperiodu u trajanju od 16 časova dana (svetla) i 8 časova mraka. Veštačka inokulacija je rađena u fenofazi 4 prava lista (BBCH 14), metodom prskanja suspenzijom bakterije (KS-17) u sterilnom fiziološkom rastvoru koncentracije 10^8 CFU/ml starosti 48h.

Kontrolnu varijantu činila je sterilna, destilovana voda primenjena na isti način kao i bakterijska suspenzija. Nakon inokulacije biljke su postavljene u fitotronske komore na različite temperature 16, 20, 24, 28, 32 i 36°C pri 100% RVV. Ogled je postavljen u tri ponavljanja, od po pet biljaka po ponavljanju.

Praćenje pojave simptoma na listovima je beleženo svakih pet dana (Machaba, 1998), određivanjem površine nekroze pomoću skale koju navodi Horsfall i Barratt (1945) (Tab. 17).

Tab. 17 : Horsfall-Barratt (1945) skala

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

Izračunavanje progresivne krive bolesti vršeno je pomoću AUDPC (Area Under Disease Progress Curve) (Anonimys). Vrednosti područja ispod krive napredovanja bolesti (AUDPC) su izračunate pomoću formule $\Sigma[(x_i + x_{i-1})/2](t_i - t_{i-1})$, gde je x_i ocena u svakom trenutku ocene i ($t_i - t_{i-1}$) je vreme između ocena (Shaner and Finney, 1977).

6. 15. Ispitivanje baktericida u poljskim uslovima

6. 15. 1. Lokaliteti i veličine osnovnih parcela

Poljski ogledi, u cilju ispitivanja efikasnosti odabranih baktericida u suzbijanju prouzrokovala crne truleži kupusnjača, izvedeni su na dva lokaliteta: Futog (uslovi spontane infekcije – poljoprivredni proizvođač) i Rimski šančevi – Odeljenje za povrtarstvo, Instituta za ratarstvo i povrtarstvo u Novom Sadu (uslovi veštačke inokulacije).

Ogledi su postavljeni u periodu od 2014 do 2016. godine na glavičastom kupusu sorte Futoški. Veličina osnovne parcele je iznosila 7 m², međuredno rastojanje 70 cm i rastojanje u redu 10 cm. Oglad je postavljen po slučajnom blok sistemu, u tri ponavljanja sa 30 biljaka. U tehnologiji gajenja primenjene su specifične agrotehničke mere za proizvodnju kasnog kupusa. Kontrola gljivičnih oboljenja je vršena upotrebom fungicida na bazi sledećih aktivnih supstanci: propamokarb – hidrohlorid + fosetil – aluminijum, mankozeb i hlorotalonil. U cilju kontrole štetočina kupusa primenjeni su insekticidi na bazi sledećih aktivnih supstanci: bifentrin, lambda – cihalotrin, hlorantraniliprol, hlorpirifos + cipermetrin, cipermetrin, acetamiprid, deltametrin, pimetozin i spirotetramat.

6. 15. 2. Ispitivani baktericidi

Baktericidi korišćeni u oglecima pripadaju različitim grupama. Iz grupe bakarnih preparata, odabrane su sledeće aktivne supstance: bakar – sulfat, bakar – oksihlorid i bakar – hidroksid. Iz grupe fungicida ditiokarbamata upotrebljen je preparat sa aktivnom supstancom mankozeb, a iz grupe fosfonata fosetil – aluminijum. Od antibiotika, odabrani su: streptomycin – sulfat (formulisan kao oralni prašak za primenu u veterini) i kasugamicin koji je formulisan kao preparat za primenu u zaštiti bilja (u Srbiji nema registraciju). Od bioloških preparata korišćen je *Bacillus subtilis* D26 (Tab. 18).

Tab. 18: Primljeni preparati i količine/koncentracije primene

| Tretmani | A. s.* | Preparat | Proizvođač | Ko/K* |
|----------|--|------------------------------|--|----------------------|
| 1 | Bakar-sulfat 200 g/kg Cu jona | BlueBordo | Cerex Agri | 0,5% |
| 2 | Bakar-sulfat 200 g/kg Cu jona | BlueBordo | Cerex Agri | 0,25% |
| 3 | Bakar-oksihlorid 350 g/kg | Cuprozin 35 WP | Spiess Urania | 0,5% |
| 4 | Bakar-oksihlorid 350 g/kg | Cuprozin 35 WP | Spiess Urania | 0,3% |
| 5 | Bakar-hidroksid 500 g/kg | Funguran-OH | Spiess Urania | 0,5% |
| 6 | Bakar-hidroksid 500 g/kg | Funguran-OH | Spiess Urania | 0,3% |
| 7 | Bakar-hidroksid 500 g/kg + Mankozebe 800 g/kg | Funguran OH + Mankogal 80 | Spiess Urania + Galenika-Fitofarmacija | 0,5% + 0,25% |
| 8 | Bakar-hidroksid 500 g/kg + Fosetil-aluminijum 800 g/kg | Funguran OH + Fostonic 80 WP | Spiess Urania + Arysta LifeScience | 0,5% + 0,2% |
| 9 | <i>Bacillus subtilis</i> D26 10 ⁸ ćel/ml | / | Zorka-Klotild-Agrotehnohem | 2 l ha ⁻¹ |
| 10 | Streptomycin-sulfat | Streptomycin-sulfat | Veterinarski zavod Subotica | 0,02% |
| 11 | Kasugamicin | Kasumin | Arysta LifeScience | 2 l ha ⁻¹ |
| Kontrola | Voda | / | / | / |

*A. s. – Aktivna supstanca; Ko/K – Količina/Koncentracija primenjenog preparata

6. 15. 3. Ispitivanje efikasnosti baktericida u uslovima spontane infekcije (lok. Futog)

Za potrebe ispitivanja efikasnosti baktericida, odabrana je parcela na kojoj se kupus gaji uzastopno dve godine u plodoredu sa pšenicom (GPS: N 50°12'86'' E 39°80'51''). Rasađivanje kupusa je vršeno u prvoj polovini avgusta (05.08.2014; 03.08.2015; 13.08.2016), u fazi razvoja tri do četiri prava lista (BBCH 13-14). Početak primene preparata je usledio dve nedelje po rasađivanju (20.08.2014; 18.08.2015; 29.08.2016). Kontrolnu varijantu je činio tretman vodom. Nakon prvog tretmana urađeno je još dva, u skladu sa vremenskim uslovima (29.08. i 08.09.2014; 28.08. i 09.09.2015; 08.09. i 19.09.2016).

Tretmani su rađeni upotrebom ručne prskalice „Solo™ 426“ uz utrošak vode od 300 l ha⁻¹. U radnu tečnost, prilikom svakog tretmana, dodat je okvašivač Dash® (BASF) u količini od 0,75 l ha⁻¹.

6. 15. 4. Ispitivanje efikasnosti baktericida u uslovima veštačke inokulacije (lok. Rimski šančevi)

Za proizvodnju rasada kupusa upotrebljeno je dezinfikovano seme sa 2% NaOCl i 0,02 % streptomycin – sulfata. Rasađivanje je vršeno u fazi tri do četiri lista u prvoj polovini avgusta, dok je veštačka inokulacija biljaka prskanjem rađena u fazi 5 listova (BBCH 15). Za inokulum je upotrebljen izolat KS-1, koncentracije 10⁸ CFU/ml u sterilnom 0,9 % m/V rastvoru NaCl, starosti 48 h, gajen na YDC podlozi. Inokulacija je urađena jednom, u večernjim časovima (posle 19 h). Obračunata količina tečnosti za inokulaciju iznosila je proporcionalno količini tečnosti 300 l ha⁻¹ uz dodatak okvašivača Dash® (BASF) u količini 0,75 l ha⁻¹. Dva sata pre veštačke inokulacije preparati su primenjeni jednom 15.08.2014; 03.08.2015 i 09.08.2016. godine, a nakon toga na svakih 10 dana dva puta, korišćenjem ručne prskalice „Solo“ uz utrošak vode od 300 l ha⁻¹ i dodatak okvašivača Dash® (BASF) u količini 0,75 l ha⁻¹.

Nakon tehnološke zrelosti kupusa vršeno je merenje mase pojedinačnih glavica za svaki tretman posebno.

6. 15. 5. Ocena efikasnosti primenjenih baktericida

Stepen razvoja bolesti na listovima ocenjen je vizuelnom metodom, primenom Horsfall – Barratt skale (Horsfall i Barratt, 1945) (Tab. 6). Ocenjivanje je vršeno tri puta: neposredno pre drugog i trećeg tretmana i 14 dana nakon trećeg tretmana. Intenzitet zaraze je izračunat primenom Townsend – Heuberger's formule (Townsend i Heuberger, 1943):

$$IZ (\%) = \frac{\Sigma(nv)}{NV} \times 100$$

gde je:

IZ – intenzitet zaraze

n – broj listova u svakoj kategoriji infestacije

v – numeričke vrednosti za kategorije infestacije

N – najviši stepen zaraze

V – ukupan broj ocenjenih listova

6. 15. 6. Statistička analiza efikasnosti baktericida

Ostvareni rezultati u ogledima ispitivanja efikasnosti baktericida za suzbijanje sudovne bakterioze kupusnjača, koji se odnose na ocene nekroze površine lista na osnovu ordinalnih kategorijalnih skala, imaju uređen raspored vrednosti (ocena 1 < ocena 2 < ocena 3 < ocena 4). Ako se pretpostavi da promenljiva Y ima logičku raspodelu i da ocene oštećenja imaju ekvidistantna rastojanja na kontinuiranoj skali, u tom slučaju ocena oštećenosti 1 predstavljaće biljke sa $Y < \theta_1$, gde θ_1 predstavlja prvu ocenu logitfunkcije za prvu uređenu kategoriju (ocena 1). Verovatnoća (π_1) postizanja skora biljaka sa ocenom 1 je $P(Y < \theta_1)$. Ocena oštećenosti 2 predstavlja biljke između θ_1 i θ_2 i verovatnoćom (π_2) za skor biljaka sa ocenom definisanom kao $P(\theta_1 < Y < \theta_2)$.

Regresijom za ordinarne kategorijalne podatke ocenjuju se logiti za ordinalne ocene oštećenja i pripadajuće verovatnoće. Za skalu od dvanaest ordinalnih ocena (1–12) kakva je korišćena u ovim istraživanjima, potrebno je oceniti jedanaest logit vrednosti ($\theta_1, \dots, \theta_{12}$) i jedanaest verovatnoća (π_1, \dots, π_{12}).

Takođe ocenjene verovatnoće je moguće izraziti u formi kumulativnih verovatnoća ($\gamma_1, \dots, \gamma_{12}$) gde je $\gamma_1 = P(Y < \theta_1) = \pi_1$, $\gamma_2 = P(Y < \theta_2) = \pi_1 + \pi_2$, ..., $\gamma_{12} = P(Y < \theta_{12}) = \pi_1 + \pi_2 + \pi_3 + \dots + \pi_{12}$, dok je $\pi_{12} = P(Y \geq \theta_{11}) = 1 - \sum_{i=1}^{12} \pi_i$

Modeliranje kumulativnih verovatnoća zasniva se na sledećem ordinalnom logističkom modelu: $y_i = \frac{1}{1 + e^{-\theta_i - \beta_1 X_1}}$ gde θ_i predstavlja logit vrednosti a X_1 je nezavisna promenljiva tj. u ovom slučaju baktericidni tretman. Na logit skali model se može prikazati kao

$$\log\left(\frac{\gamma_i}{1 - \gamma_i}\right) = \theta_i - \beta_1 X_1, \dots, \log\left(\frac{\gamma_i}{1 - \gamma_i}\right) = \theta_i - \beta_1 X_1 \text{ intenzitete oštećenja } i = 1, 2, 3, 4, \dots, 12.$$

Efikasnost baktericidnih tretmana je u ovom istraživanju izražena pomoću kumulativnih verovatnoća. Svaki model je referenciran u odnosu na kontrolni tretman.

7. REZULTATI

7. 1. Sakupljanje uzoraka

U periodu 2014–2017. godine, na teritoriji Srbije izvršen je obilazak terena sa ciljem utvrđivanja pojave oboljenja bakteriozne prirode na gajenim kupusnjačama. Uzorci su sakupljeni sa 23 lokaliteta na teritoriji R. Srbije, jednog lokalita sa teritorije Federacije Bosne i Hercegovine (Vršani) i jednog lokaliteta sa teritorije R. Hrvatske (Erdut). Uzorke su činili listovi koji su sakupljeni nasumično po parceli. Tokom pomenutog perioda uzorkovanja, sakupljeno je 82 uzoraka listova. Za potrebe izolacije bakterije iz semena, sakupljeno je 20 uzoraka sertifikovanog i naturalnog semena, dok je za potrebe izolacije iz zemljišta sakupljeno 13 uzoraka zemljišta sa pet lokaliteta (Kovilj, Rimski šančevi, Futog, Despotovo, Gospođinci).

U odnosu na lokalitet uzorkovanja, zabeležen je različit intenzitet zaraze (Tab 19). Na mestima tradicionalnog gajenja kupusnjača (Futog, Veternik, Begeč, Despotovo, Leskovac i Mrčajevci) na pojedinim proizvodnim parcelama je zabeleženo preko 75% zaraženih biljaka (Sl. 5). Nasumičnim pregledom biljaka po čitavoj parceli, zabeležen je visok procenat prekrivenosti lista hlorotičnim ili nekrotičnim promenama. Biljke koje su bile sa većim procentom zaraze, imale su slabiji razvoj i sitnije glavice, koje su često bile parazitirane sekundarnim patogenima. Proizvodnju na pomenutim lokalitetima karakteriše upotreba lokalnih populacija kupusnjača, čije seme proizvođači sami održavaju.

Tab. 19: Intenzitet zaraze listova kupusnjača na lokalitetima na kojima su sakupljeni uzorci

| Intenzitet zaraze | Lokalitet |
|--|--|
| Nizak do 25% zaraženih biljaka na parceli | Aleksinac, Sokobanja |
| Srednji 25,1–50% zaraženih biljaka na parceli | Jasenovo, Kuzmin, Inđija, Voganj, Mužlja, Šajkaš, Pirot, Niš, Vršani (BiH), Erdut (RH) |
| Visok 50,1–75% zaraženih biljaka na parceli | Kovilj, Rumenka, Gospođinci, Rimski šančevi, Zmajev, Golubinci, Zvečka, Tabanovići |
| Izuzetno visok preko 75,1% zaraženih biljaka na parceli | Futog, Veternik, Begeč, Despotovo, Leskovac, Mrčajevci |



Sl. 5: Parcela pod kupusom na lokalitetu Despotovo, 2015 god., sorta Futoški proizvodnja iz naturalnog semena (foto: Vlajić)

7. 1. 1. Simptomi bolesti

Prilikom obilaska na proizvodnim parcelama i okućnicama utvrđena je pojava žutila listova, čiji simptomi podsećaju na bakterioznu prirodu oboljenja. Simptomi bakterioze na kupusnjačama beleženi su tokom čitavog perioda vegetacije na otvorenom polju. Najčešći simptom koji je uočen tokom obilaska terena je bila rubna hloroza listova (Sl. 6a), koja se postepeno sužava prema centralnom nervu lista, obrazujući karakterističan simptom u obliku latiničnog slova „V“ (Sl. 6b).



Sl. 6: a) Rubna hloroza lista kupusa, tipičan početni simptom zaraze kupusa bakterijom *X. campestris*; b) Hloroza i nekroza u obliku latiničnog slova „V“, tipičan simptom zaraze kupusa bakterijom *X. campestris* (foto: Vlajić)

U delovima lista zahvaćenim hlorozom, uočava se pojava crnila nerva, što ukazuje na razvoj patogena u sprovodnim elementima (Sl. 7). Spajanjem pega formira se veća hlorotična površina, koja prelazi u nekrozu.



Sl. 7: Patološka promena sprovodnog tkiva – crnilo nerava na listu kupusa (uvećanje 4x10; foto: Vlajić)

Na mladim biljkama u rasadu, simptomi hloroze se pojavljuju na kotiledonim listovima, dok je unutrašnjost stabla na poprečnom preseku crne boje. Na rasadu sa formirana dva prava lista, primarni simptomi su u vidu rubnog žutila liske koja se klinasto spušta do centralnog nerva (Sl. 8). Čest simptom kod rasada je pojava uvelosti, naročito kod proizvodnje u lejama.



Sl. 8: Rubno žutilo liske na rasadu kupusa (foto: Vlajić)

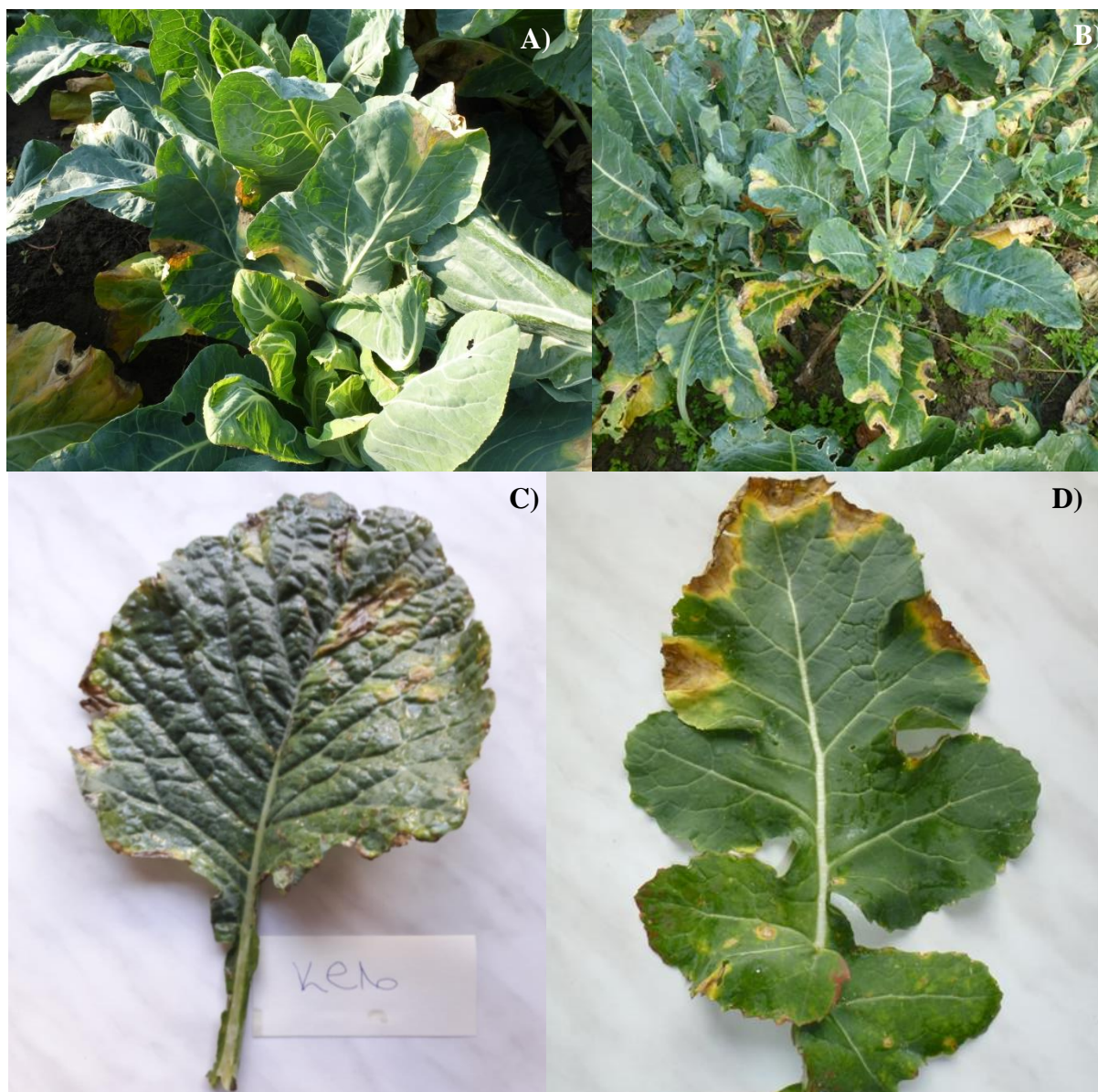
Nakon rasađivanja na proizvodne parcele, zaraženi listovi se obično suše usled čega biljka retrovegetira, a kao posledica toga zaostaje u porastu. Sprovodnim elementima bakterija se širi do stabla sprečavajući transport vode, usled čega dolazi do čitavog propadanja biljaka ili biljke ne formiraju glavicu. Kod formiranih glavica, usled jačeg napada razvija se simptom crne truleži, često i kao rezultat združene infekcije sa drugim patogenima ili saprofitima.

Na cvetonosnom stablu izvodnica kupusa, simptomi su u vidu rubne hloroze listova koja vremenom prelazi u nekrozu (Sl. 9). Razvojem bolesti, čitava liska nekrotira i list gubi fiziološku funkciju, što se odražava na kvalitet semena.



Sl. 9: Hloroza i nekroza oboda liske na cvetonosnom stablu kupusa (foto: Vlajić)

Simptomi na listovima karfiola, brokolija, kelja i uljane repice slični su simptomima koji se pojavljuju na listovima kupusa, u vidu hrolotične i nekrotične promene po ivicama listova sa formiranjem nekroza u obliku slova „V“ (Sl. 10). Simptomi na listovima uljane repice se pojavljuju tokom oktobra meseca, često veoma slabo izraženi po rubovima listova, dok se intenzivniji i uočljiviji simptomi pojavljuju u periodu mart – april, u zavisnosti od agroekoloških uslova. Intenzivnija pojava simptoma na karfiolu, brokoliju i kelju beleži se od maja meseca do kasne jeseni, a intenzitet zaraze zavisi od osetljivosti gajene biljke. Razvoj patogena na kupusu beleži se tokom čitave vegetacije, a intenzitet zavisi od lokaliteta i gajenog sortimenta.



Sl. 10: Simptomi bolesti na A) karfiolu; B) brokoliju; C) kelju, D) uljanoj repici

(foto: Vlajić)

Veoma često, simptomi *Xcc* se nalaze na samonikloj uljanoj repici, koja izrasta kao posledica osipanja semena usled pucanja ljuske (Sl. 11).



Sl. 11: Simptomi *Xcc* i oštećenja od insekata na samonikloj uljanoj repici (foto: Vlajić)

7. 2. Izolacija *Xcc* iz listova

Nakon inkubiranja razmaza macerata listova 2–3 dana pri temperaturi od 27 °C na YDC podlozi, uočena je pojava kolonija različitog izgleda. Za dalja proučavanja odabrane su okrugle i glatke kolonije žute boje, koje fenotipski podsećaju na predstavnike roda *Xanthomonas*. Kolonije su presejane nekoliko puta uzastopno, kako bi se dobili čisti izolati. Na ovaj način sakupljeno je 82 izolata poreklom iz lista različitih domaćina u okviru porodice Brassicaceae (Tab. 20).

Tab. 20: Spisak izolata poreklom sa lista kupusnjača

| Redni broj | Šifra izolata | Biljana vrsta | Lokalitet | Godina izolacije |
|------------|---------------|---------------|------------|------------------|
| 1. | KS-1 | Kupus | Rumenka | 2014 |
| 2. | KS-2 | Kupus | R. šančevi | 2014 |
| 3. | KS-3 | Kupus | Futog | 2014 |
| 4. | KS-4 | Kupus | Kovilj | 2014 |
| 5. | KS-5 | Kupus | Kovilj | 2014 |
| 6. | KL-1 | Karfiol | Kovilj | 2014 |
| 7. | KL-2 | Karfiol | Despotovo | 2014 |
| 8. | KS-6 | Kupus | R. šančevi | 2015 |
| 9. | KS-7 | Kupus | R. šančevi | 2015 |
| 10. | KS-8 | Kupus | R. šančevi | 2015 |
| 11. | KS-9 | Kupus | R. šančevi | 2015 |
| 12. | KS-10 | Kupus | Jasenovo | 2015 |
| 13. | KS-11 | Kupus | Jasenovo | 2015 |

| | | | | |
|-----|-------|-----------|------------|------|
| 14. | KL-3 | Karfiol | Jasenovo | 2015 |
| 15. | BL-1 | Brokoli | Jasenovo | 2015 |
| 16. | KS-12 | Kupus | Jasenovo | 2015 |
| 17. | KS-13 | Kupus | Rumenka | 2015 |
| 18. | KS-14 | Kupus | Rumenka | 2015 |
| 19. | KS-15 | Kupus | R. šančevi | 2015 |
| 20. | KS-16 | Kupus | R. šančevi | 2015 |
| 21. | KS-17 | Kupus | Futog | 2015 |
| 22. | KS-18 | Kupus | Futog | 2015 |
| 23. | KS-19 | Kupus | Futog | 2015 |
| 24. | KL-4 | Karfiol | Futog | 2015 |
| 25. | KL-5 | Karfiol | Futog | 2015 |
| 26. | KS-20 | Kupus | Mrčajevci | 2015 |
| 27. | KS-21 | Kupus | Mrčajevci | 2015 |
| 28. | KS-22 | Kupus | Despotovo | 2015 |
| 29. | KL-6 | Karfiol | Despotovo | 2015 |
| 30. | KL-7 | Karfiol | Despotovo | 2015 |
| 31. | KL-8 | Karfiol | Despotovo | 2015 |
| 32. | KS-23 | Kupus | Despotovo | 2015 |
| 33. | KS-24 | Kupus | Golubinci | 2015 |
| 34. | KS-25 | Kupus | Kuzmin | 2015 |
| 35. | KS-26 | Kupus | Kuzmin | 2015 |
| 36. | KS-27 | Kupus | Indija | 2015 |
| 37. | KS-28 | Kupus | Indija | 2015 |
| 38. | KS-29 | Kupus | Voganj | 2015 |
| 39. | UR-1 | U. repica | R. šančevi | 2016 |
| 40. | UR-2 | U. repica | R. šančevi | 2016 |
| 41. | UR-3 | U. repica | R. šančevi | 2016 |
| 42. | KS-30 | Kupus | Veternik | 2016 |
| 43. | KS-31 | Kupus | Futog | 2016 |
| 44. | KS-32 | Kupus | Futog | 2016 |
| 45. | KS-33 | Kupus | Futog | 2016 |
| 46. | KS-34 | Kupus | Zmajevo | 2016 |
| 47. | KS-35 | Kupus | Zmajevo | 2016 |
| 48. | KS-36 | Kupus | Zmajevo | 2016 |
| 49. | BL-2 | Brokoli | Zvečka | 2016 |
| 50. | KL-9 | Karfiol | Mužja | 2016 |
| 51. | KS-37 | Kupus | Mužja | 2016 |
| 52. | KL-9 | Karfiol | Zvečka | 2016 |
| 53. | KS-38 | Kupus | Tabanović | 2016 |
| 54. | KLJ-1 | Kelj | Tabanović | 2016 |
| 55. | KS-39 | Kupus | Aleksinac | 2016 |
| 56. | KS-40 | Kupus | Aleksinac | 2016 |
| 57. | KS-41 | Kupus | Sokobanja | 2016 |
| 58. | KS-42 | Kupus | Sokobanja | 2016 |
| 59. | KS-43 | Kupus | Vršani | 2016 |
| 60. | KS-44 | Kupus | Vršani | 2016 |
| 61. | KS-45 | Kupus | Futog | 2016 |
| 62. | KL-10 | Karfiol | Futog | 2016 |

| | | | | |
|-----|-------|---------|-----------|------|
| 63. | KS-46 | Kupus | Futog | 2016 |
| 64. | KS-47 | Kupus | Kovilj | 2016 |
| 65. | KS-48 | Kupus | Šajkaš | 2016 |
| 66. | KS-49 | Kupus | Kovilj | 2016 |
| 67. | KS-50 | Kupus | Kovilj | 2016 |
| 68. | KS-51 | Kupus | Pirot | 2016 |
| 69. | KS-52 | Kupus | Pirot | 2016 |
| 70. | KS-53 | Kupus | Niš | 2016 |
| 71. | KS-54 | Kupus | Niš | 2016 |
| 72. | KS-55 | Kupus | Leskovac | 2016 |
| 73. | KS-56 | Kupus | Leskovac | 2016 |
| 74. | KS-57 | Kupus | Begeč | 2016 |
| 75. | KS-58 | Kupus | Begeč | 2016 |
| 76. | KS-59 | Kupus | Futog | 2017 |
| 77. | KL-12 | Karfiol | Kovilj | 2017 |
| 78. | KL-13 | Karfiol | Despotovo | 2017 |
| 79. | KL-14 | Karfiol | Despotovo | 2017 |
| 80. | KS-60 | Kupus | Kovilj | 2017 |
| 81. | KS-61 | Kupus | Erdut | 2017 |
| 82. | KS-62 | Kupus | Erdut | 2017 |

7. 3. Izolacija iz semena

Izolacijom bakterije iz uzoraka semena kupusa, karfiola i uljane repice na YDC podlozi sa dodatkom cikloheksamida (250 mg/l) dobijen je veći broj različitih kolonija. Za dalja proučavanja izabrano je 19 izolata poreklom od žutih, sluzastih i ispučenih kolonija, veličine 2–3 mm, koji fenotipski podsećaju na predstavnike roda *Xanthomonas* (Tab. 21).

Tab. 21: Spisak izolata poreklom sa semena kupusnjača

| Redni broj | Šifra izolata | Biljna vrsta | Poreklo | Mesto uzorkovanja | Godina izolacije |
|------------|---------------|--------------|---------------------------|-------------------|------------------|
| 1. | S-1 | Kupus | Domaćinstvo | Futog | 2015 |
| 2. | S-2 | Kupus | Domaćinstvo | Futog | 2015 |
| 3. | S-3 | Kupus | Domaćinstvo | Futog | 2015 |
| 4. | S-4 | Kupus | Domaćinstvo | Futog | 2015 |
| 5. | S-5 | Kupus | Domaćinstvo | Futog | 2015 |
| 6. | S-6 | Kupus | Domaćinstvo | Despotovo | 2015 |
| 7. | S-7 | Kupus | Poljoprivredna apoteka | Novi Sad | 2015 |
| 8. | S-8 | Kupus | Poljoprivredna apoteka | Novi Sad | 2015 |
| 9. | S-9 | Kupus | Poljoprivredna apoteka | Novi Sad | 2016 |
| 10. | S-10 | Karfiol | Poljoprivredna apoteka | Novi Sad | 2016 |
| 11. | S-11 | Kupus | Domaćinstvo | Futog | 2016 |
| 12. | S-12 | Kupus | Domaćinstvo | Futog | 2016 |
| 13. | S-13 | Kupus | Domaćinstvo | Futog | 2016 |
| 14. | S-14 | U. repica | Poljoprivredna apoteka | Novi Sad | 2016 |
| 15. | S-15 | U. repica | Poljoprivredna apoteka | Novi Sad | 2016 |
| 16. | S-16 | Kupus | Domaćinstvo | Despotovo | 2017 |
| 17. | S-17 | Kupus | Domaćinstvo | Futog | 2017 |
| 18. | S-18 | Kupus | Domaćinstvo | Futog | 2017 |
| 19. | S-19 | Kupus | Domaćinstvo | Futog | 2017 |
| 20. | S-20 | U. repica | Poljoprivredna apoteka | Novi Sad | 2017 |

7. 4. Izolacija *Xcc* iz zemljišta

Izolacijama iz uzoraka zemljišta na selektivnu SX podlogu, nakon 3 dana inkubacije pri 27 °C zabeležena je pojava sitnih kolonija sa svetlom zonom, kao posledica hidrolize skroba. Nakon pet dana prečnik kolonije je iznosio 2–3 mm, dok je zona hidrolize iznosila 7–9 mm. Iz veštački inokulisanog zemljišta, zabeležen je porast kolonija, što ukazuje na pouzdanost metode. Kolonije su mukoidne i ispupčene, plavičasto – ljubičaste boje. Na ovaj način dobijen je veći broj izolata od kojih je za dalja istraživanja izabrano 13 (Tab. 22).

Tab. 22: Spisak izolata poreklom iz zemljišta

| Redni broj | Šifra izolata | Lokalitet | Tip zemljišta | Godina izolacije |
|------------|---------------|------------|---------------|------------------|
| 1. | Z-1 | Kovilj | Ritska crnica | 2015 |
| 2. | Z-2 | Kovilj | Černozem | 2015 |
| 3. | Z-3 | R. šančevi | Černozem | 2015 |
| 4. | Z-4 | Futog | Černozem | 2015 |
| 5. | Z-5 | Futog | Černozem | 2015 |
| 6. | Z-6 | Futog | Černozem | 2016 |
| 7. | Z-7 | Kovilj | Černozem | 2016 |
| 8. | Z-8 | Despotovo | Černozem | 2016 |
| 9. | Z-9 | Despotovo | Černozem | 2016 |
| 10. | Z-10 | Despotovo | Černozem | 2016 |
| 11. | Z-11 | R. šančevi | Černozem | 2016 |
| 12. | Z-12 | Futog | Černozem | 2017 |
| 13. | Z-13 | Gospođinci | Černozem | 2017 |

7. 4. 1. Periodična izolacija *Xcc* iz zemljišta

Periodičnom izolacijom iz zemljišta, prisustvo bakterije u zemljištu je potvrđeno u septembru, oktobru, novembru 2015. i 2016. godine, kao i aprilu, maju i junu 2016. godine i maju i junu 2017. godine. Prisustvo bakterije u zemljišti nije utvrđeno u decembru 2015. i 2016. godine, januaru, februaru i martu 2016. i 2017. godine kao i aprilu 2017. godine (Tab. 23).

Tab. 23: Rezultati periodične izolacije *Xcc* iz zemljišta prikazani po mesecima

| Mesec | Godina | Datum izolacije | Uspešnost izolacije* | Šifra izolata |
|-----------|--------|-----------------|----------------------|---------------|
| Januar | 2016 | 22.01. | - | / |
| | 2017 | 24.01. | - | / |
| Februar | 2016 | 23.02. | - | / |
| | 2017 | 24.02. | - | / |
| Mart | 2016 | 25.03. | - | / |
| | 2017 | 20.03. | - | / |
| April | 2016 | 20.04. | + | Z-2016/4 |
| | 2017 | 26.04. | - | / |
| Maj | 2016 | 23.05. | + | Z-2016/5 |
| | 2017 | 17.05. | + | Z-2017/5 |
| Jun | 2016 | 14.06. | + | Z-2016/6 |
| | 2017 | 26.06. | + | Z-2017/6 |
| Jul | 2016 | 21.07. | - | / |
| | 2017 | 24.07. | - | / |
| Avgust | 2016 | 24.08. | + | Z-2016/8 |
| | 2017 | 28.08. | + | Z-2017/8 |
| Septembar | 2015 | 17.09. | + | Z-2015/9 |
| | 2016 | 20.09. | + | Z-2016/9 |
| Oktobar | 2015 | 20.10. | + | Z-2015/10 |
| | 2016 | 17.10. | - | Z-2016/10 |
| Novembar | 2015 | 18.11. | + | Z-2015/11 |
| | 2016 | 22.11. | + | Z-2016/11 |
| Decembar | 2015 | 22.12. | - | / |
| | 2016 | 18.12. | - | / |

* + pozitivne izolacije; - negativne izolacije

7. 5. Izolacija bakteriofaga

U periodu 2016. i 2017. godine sakupljeni su uzorci zemljišta u neposrednoj blizini biljaka sa simptomima crne truleži ili sudovne bakterioze. Primenom metode obogaćivanja supstrata dobijeno je 15 izolata faga (Tab. 24). Dobijeni bakteriofagi čuvani su u zatamnjenoj sterilnoj boci, pri temperaturi od 4 °C.

Tab. 24: Izolati bakteriofaga izolovani iz zemljišta tokom 2016. i 2017. godine

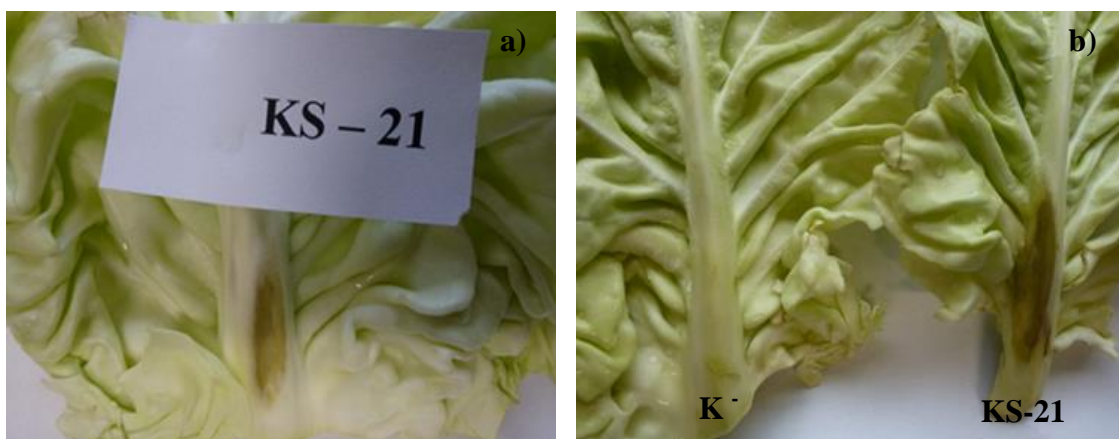
| Šifra bakteriofaga | Lokalitet | Biljna vrsta | Godina izolacije |
|--------------------|------------|--------------|------------------|
| FXcc1/1 | Futog | Kupus | 2016 |
| FXcc1/2 | Futog | Kupus | 2016 |
| FXcc1/3 | Futog | Kupus | 2016 |
| FXcc1/4 | Futog | Karfiol | 2016 |
| FXcc1/5 | Futog | Kupus | 2016 |
| FXcc2/1 | R. šančevi | Kupus | 2016 |
| FXcc2/2 | R. šančevi | Kupus | 2016 |
| FXcc2/3 | R. šančevi | Kupus | 2017 |
| FXcc2/4 | R. šančevi | Kupus | 2017 |
| FXcc2/5 | R. šančevi | Kupus | 2017 |
| FXcc3/1 | Futog | Kupus | 2017 |
| FXcc3/2 | Futog | Kupus | 2017 |
| FXcc3/3 | Futog | Kupus | 2017 |
| FXcc3/4 | Futog | Karfiol | 2017 |
| FXcc3/5 | Futog | Kupus | 2017 |

7. 6. Provera patogenosti izolata

Patogenost izolata poreklom iz listova, semena i zemljišta je dokazana infiltracijom suspenzije u centralni nerv lista kupusa i metodom prskanja mladih biljaka kupusa.

7. 6. 1. Provera patogenosti infiltracijom bakterijske suspenzije u centralni nerv

Primenom metode infiltracije bakterijske suspenzije, u centralnom nervu lista kupusa treći dan nakon inokulacije zabeležena je promena boje i pojava vlažnih pega koja se širi od mesta uboda duž lisne drške (Sl. 12a). Nakon 5 dana površina razmekšanog tkiva se povećava i postaje mrke boje (Sl. 12b).



Sl. 12: a) Početni simptom na listu kupusa tri dana nakon inokulacije sa izolatom KS-21; b) Razvoj simptoma na listu kupusa pet dana nakon inokulacije izolatom KS-21 i neinokulisana kontrola (K-) (foto: Vlajić)

Sedmi dan zabeležena je pojava crne linije na prelazu zdravog u obolelo tkivo, pojava žućkastog eksudata, i početak truljenja tkiva (Sl. 13). U neinokulisanoj kontroli, gde je umesto bakterijske suspenzije u list uneta sterilna voda, nije registrovana pojava simptoma do kraja perioda inkubacije.



Sl. 13: Simptom na listu kupusa, sedam dana nakon inokulacije izolatom KS-21 (foto: Vlajić)

Znatno manje vlažne pege i razmekšavanje tkiva zabeleženo je kod listova koji su inokulisani izolatima poreklom iz uljane repice (UR-1; UR-2; UR-3), u odnosu na simptome patogenosti ostalih izolata (Sl. 14).



Sl. 14: Simptom na listu kupusa sedmog dana nakon inokulacije izolatom poreklom iz uljane repice UR-1 (foto: Vlajić)

7. 6. 2. Provera patogenosti metodom prskanja

Prvi simptomi na biljkama kupusa primenom metode prskanja su zabeleženi petog dana od inokulacije, u vidu sitnih vodenastih pega raspoređenih po ivici lista (Sl. 15). Sedmog dana pege su počele širenje ka unutrašnjosti, i zabeleženo je njihovo blago uvećavanje. Dvanaestog dana na ivici listova obrazovani su tipični simptomi u obliku slova „V“, na prelazu zdravog u obolelo tkivo zabeležena je pojava žute površine (Sl. 16).



Sl. 15: Promene na licu lista kupusa, pet dana nakon inokulacije (foto: Vlajić)



Sl. 16: Širenje pega ka unutrašnjosti lista i pojava tipičnog simptoma u obliku slova „V“ 12 dana nakon inokulacije (foto: Vlajić)

Većina ispitanih izolata je prouzrokovala pojavu simptoma na ispitivanim biljkama domaćinima. Jedino izolati poreklom iz zemljišta Z7, Z10 i Z13, nisu prouzrokovali simptome na listovima testiranih biljaka (Tab. 25).

Tab. 25: Rezultati provere patogenosti ispitivanih izolata

| Šifra izolata | Poreklo izolata | Reprodukovani simptomi metodom infiltracije | Reprodukovani simptomi metodom prskanja |
|---------------|-----------------|---|---|
| KS-1 | list | + | + |
| KS-2 | list | + | + |
| KS-3 | list | + | + |
| KS-4 | list | + | + |
| KS-5 | list | + | + |
| KL-1 | list | + | + |
| KL-2 | list | + | + |
| KS-6 | list | + | + |
| KS-7 | list | + | + |
| KS-8 | list | + | + |
| KS-9 | list | + | + |
| KS-10 | list | + | + |
| KS-11 | list | + | + |
| KL-3 | list | + | + |
| BL-1 | list | + | + |
| KS-12 | list | + | + |
| KS-13 | list | + | + |
| KS-14 | list | + | + |
| KS-15 | list | + | + |
| KS-16 | list | + | + |
| KS-17 | list | + | + |

| | | | |
|-------|------|---|---|
| KS-18 | list | + | + |
| KS-19 | list | + | + |
| KL-4 | list | + | + |
| KL-5 | list | + | + |
| KS-20 | list | + | + |
| KS-21 | list | + | + |
| KS-22 | list | + | + |
| KL-6 | list | + | + |
| KL-7 | list | + | + |
| KL-8 | list | + | + |
| KS-23 | list | + | + |
| KS-24 | list | + | + |
| KS-25 | list | + | + |
| KS-26 | list | + | + |
| KS-27 | list | + | + |
| KS-28 | list | + | + |
| KS-29 | list | + | + |
| UR-1 | list | + | + |
| UR-2 | list | + | + |
| UR-3 | list | + | + |
| KS-30 | list | + | + |
| KS-31 | list | + | + |
| KS-32 | list | + | + |
| KS-33 | list | + | + |
| KS-34 | list | + | + |
| KS-35 | list | + | + |
| KS-36 | list | + | + |
| BL-2 | list | + | + |
| KL-9 | list | + | + |
| KS-37 | list | + | + |
| KL-9 | list | + | + |
| KS-38 | list | + | + |
| KLJ-1 | list | + | + |
| KS-39 | list | + | + |
| KS-40 | list | + | + |
| KS-41 | list | + | + |
| KS-42 | list | + | + |
| KS-43 | list | + | + |
| KS-44 | list | + | + |
| KS-45 | list | + | + |
| KL-10 | list | + | + |
| KS-46 | list | + | + |
| KS-47 | list | + | + |
| KS-48 | list | + | + |
| KS-49 | list | + | + |
| KS-50 | list | + | + |
| KS-51 | list | + | + |
| KS-52 | list | + | + |
| KS-53 | list | + | + |
| KS-54 | list | + | + |

| | | | |
|----------|-------------------------------------|---|---|
| KS-55 | list | + | + |
| KS-56 | list | + | + |
| KS-57 | list | + | + |
| KS-58 | list | + | + |
| KS-59 | list | + | + |
| KL-12 | list | + | + |
| KL-13 | list | + | + |
| KL-14 | list | + | + |
| KS-60 | list | + | + |
| KS-61 | list | + | + |
| KS-62 | list | + | + |
| Z-1 | zemljište | + | + |
| Z-2 | zemljište | + | + |
| Z-3 | zemljište | + | + |
| Z-4 | zemljište | + | + |
| Z-5 | zemljište | + | + |
| Z-6 | zemljište | + | + |
| Z-7 | zemljište | + | - |
| Z-8 | zemljište | + | + |
| Z-9 | zemljište | + | + |
| Z-10 | zemljište | + | - |
| Z-11 | zemljište | + | + |
| Z-12 | zemljište | + | + |
| Z-13 | zemljište | + | - |
| S-1 | seme | + | + |
| S-2 | seme | + | + |
| S-3 | seme | + | + |
| S-4 | seme | + | + |
| S-5 | seme | + | + |
| S-6 | seme | + | + |
| S-7 | seme | + | + |
| S-8 | seme | + | + |
| S-9 | seme | + | + |
| S-10 | seme | + | + |
| S-11 | seme | + | + |
| S-12 | seme | + | + |
| S-13 | seme | + | + |
| S-14 | seme | + | + |
| S-15 | seme | + | + |
| S-16 | seme | + | + |
| S-17 | seme | + | + |
| S-18 | seme | + | + |
| S-19 | seme | + | + |
| S-20 | seme | + | + |
| Z-2016/4 | zemljište - periodična izolacija | + | + |
| Z-2016/5 | zemljište - periodična izolacija | + | + |
| Z-2017/5 | zemljište - periodična izolacija | + | + |

| Z-2016/6 | zemljište - periodična izolacija | + | + |
|-----------|-------------------------------------|---|---|
| Z-2017/6 | zemljište - periodična izolacija | + | + |
| Z-2016/8 | zemljište - periodična izolacija | + | + |
| Z-2017/8 | zemljište - periodična izolacija | + | + |
| Z-2015/9 | zemljište - periodična izolacija | + | + |
| Z-2016/9 | zemljište - periodična izolacija | + | + |
| Z-2015/10 | zemljište - periodična izolacija | + | + |
| Z-2016/10 | zemljište - periodična izolacija | + | + |
| Z-2015/11 | zemljište - periodična izolacija | + | + |
| Z-2016/11 | zemljište - periodična izolacija | + | + |

7. 6. 3. Reizolacija

Nakon inokulacionih oglada, uspešno je urađena reizolacija bakterija. Na YDC podlozi nakon 48 h zabeležen je razvoj žutih, sluzastih i glatkih kolonija koje fenotipski odgovaraju vrstama roda *Xanthomonas* (Tab. 26). Reizolacija je rađena za svaki uzorak pojedinačno, a iz svake grupe u odnosu na domaćina i poreklo izolata su odabrani reisolati koji su čuvani u kolekciji. Reisolati su uključeni u postupak ispitivanja biohemijsko – fizioloških karakteristika sa izolatima poreklom iz lista, semena i zemljišta. Patogenost reisolata je dokazana infiltracijom u centralni nerv lista kupusa, reprodukujući iste simptome kao nakon inokulacije izolatima.

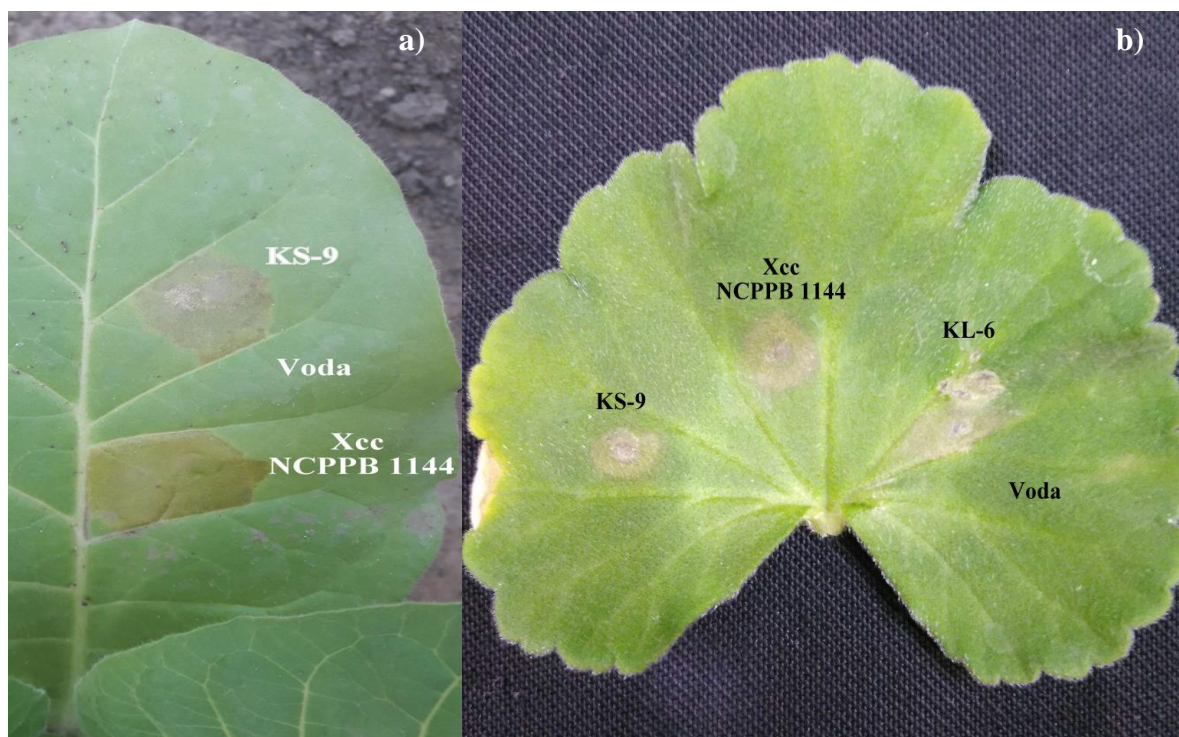
Tab. 26: Kolekcija reizolata

| Redni broj | Reizolat | Izolat sa kojim je vršena inokulacija |
|-------------------|-----------------|--|
| 1. | KS-1/1 | KS-1 |
| 2. | KS-9/1 | KS-9 |
| 3. | BL-1/1 | BL-1 |
| 4. | KL-4/1 | KL-4 |
| 5. | UR-1/1 | UR-1 |
| 6. | KL-9/1 | KL-9 |
| 7. | KS-39/1 | KS-39 |
| 8. | KLJ-1/1 | KLJ-1 |
| 9. | KS-43/1 | KS-43 |
| 10. | KL-10/1 | KL-10 |
| 11. | KS-48/1 | KS-48 |
| 12. | KS-51/1 | KS-51 |
| 13. | KS-56/1 | KS-56 |
| 14. | KL-12/1 | KL-12 |
| 15. | KS-62/1 | KS-62 |
| 16. | Z1/1 | Z1 |
| 17. | Z2/1 | Z2 |
| 18. | Z5/1 | Z5 |
| 19. | Z9/1 | Z9 |
| 20. | Z10/1 | Z10 |
| 21. | Z12/1 | Z12 |
| 22. | S2/1 | S2 |
| 23. | S3/1 | S3 |
| 24. | S4/1 | S4 |
| 25. | S5/1 | S5 |
| 26. | S7/1 | S7 |
| 27. | S8/1 | S8 |
| 28. | S11/1 | S11 |
| 29. | S14/1 | S14 |
| 30. | S18/1 | S18 |
| 31. | S20/1 | S20 |
| 32. | Z-2015/9/1 | Z-2015/9 |
| 33. | Z -2016/10/1 | Z -2016/10 |
| 34. | Z-2017/5/1 | Z-2017/5 |

Svi izolati za koje je primenom obe metode provere patogenosti potvrđena patogenost uključeni su u dalja ispitivanja.

7. 6. 4. Hipersenzitivna reakcija na duvanu i muškatli

Nakon inkubacije inokuliranih listova duvana i muškatile u trajanju 48 h, zabeleženi su simptomi nekroze i naglog izumiranja tkiva na mestima inokulacije, bez daljeg širenja, što predstavlja znak pozitivne reakcije. (Sl. 17). Na mestu inokulacije sterilnom destilovanom vodom nije bilo promena. Svi ispitani izolati prouzrokovali si isti odgovor na listovima duvana i muškatile.



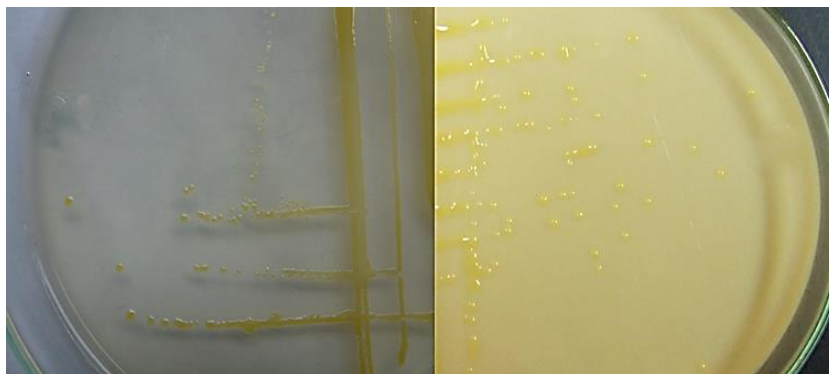
Sl. 17: Promene na lisnom tkivu nakon infiltracije suspenzije bakterije: a) nekroza lisnog tkiva duvana nakon inkubacije od 48 h; b) nekroza lisnog tkiva muškatile nakon inkubacije od 48 h (foto: Vlajić)

7. 7. Odgajivačke odlike

Odgajivačke odlike ispitane su za sve izolate koji su ispoljili patogenost.

7. 7. 1. Izgled kolonija na standardnim hranjivim podlogama

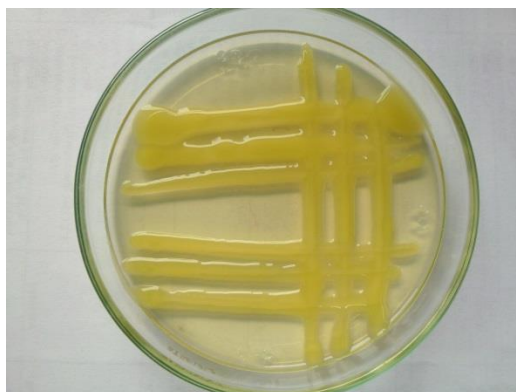
Svi proučavani izolati na MPA podlozi nakon 48h obrazuju žute, ispupčene sitne kolonije prečnika 1–2 mm, sjajnog izgleda. Na YDC podlozi kolonije su žute, ispupčene, prečnika 2–3 mm, sluzaste konzistencije i sjajnog izgleda (Sl. 18). Ovakav izgled kolonija je zabeležen i kod kontrolnog soja NCPPB 1144.



Sl. 18: Detalj: levo) izgled kolonija na MPA podlozi posle 48h inkubacije; desno) izgled kolonija na podlozi sa kvašćevim ekstraktom i CaCO₃ posle 48h inkubacije (foto: Vlajić)

7. 7. 2. Stvaranje sluzi na hranljivom agaru sa 5% saharoze

Ispitivani izolati i kontrolni soj NCPPB 1144 na podlozi od hranljivog agara (NA) sa dodatkom 5% saharoze, trećeg dana su formirali krupne sluzaste kolonije. Petog dana inkubacije kolonije su međusobno srasle formirajući obilje sluzi (Sl. 19).



Sl. 19: Izgled kolonija petog dana na NA podlozi sa 5% saharoze (foto: Vlajić)

7. 7. 3. Razvoj na 37 °C

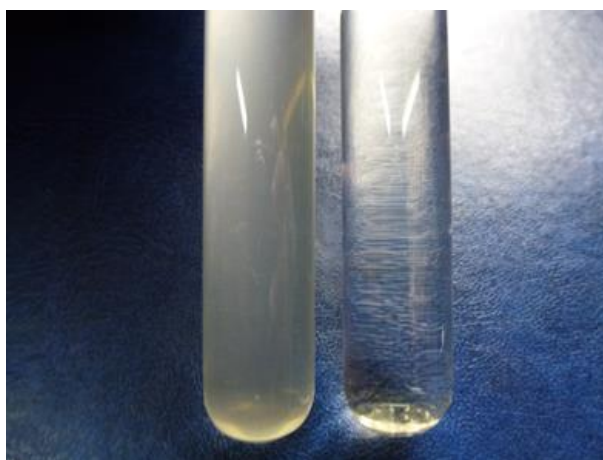
Svi ispitivani izolati, razvijaju se na temperaturi od 37 °C, usled čega dolazi do zamućenja podloge. Isto je zabeleženo kod kontrolnog soja NCPPB 1144, dok je nezasejana podloga bez zamućenja (Sl. 20).



Sl. 20: Nezasejana YS podloga (levo) i razvoj izolata KS-46 na temperaturi 37 °C (desno) (foto: Vlajić)

7. 7. 4. Tolerantnost na NaCl

Razvoj proučavanih izolata i referentnog soja NCPPB 1144 je zabeležen u podlozi sa 2 i 5% NaCl u vidu zamućenja. Kod podloge sa 7% NaCl i negativne kontrole nije zabeleženo zamućenje podloge (Sl. 21).



Sl. 21: Tolerantnost na NaCl: porast kolonija proučavanog izolata KS-36 u podlozi sa 5% NaCl (levo); b) odsustvo razvoja proučavanog izolata KS-36 na podlozi sa 7% NaCl (desno) (foto: Vlajić)

7. 7. 5. Tolerantnost na trifenil – tetrazolium hlorid – TTC

Proučavani izolati i referentni soj NCPPB 1144 nisu pokazali tolerantnost prema koncentraciji 0,02% i 0,1% TTC, odnosno nije zabeležen razvoj kolonija.

7. 8. Morfološke odlike

7. 8. 1. Reakcija po Gramu

Nakon homogenizacije kolonija u kapi 3% KOH, proučavani izolati i referentni soj NCPPB 1144, pri povlačenju bakteriološke petlje na kojoj se nalazila bakterijska kolonija, obrazovali su sluzasti končić što ukazuje na pripadnost grupi Gram negativnih bakterija. Kod *S. aureus* (soj MRSA 82) nije došlo do formiranja končića nakon homogenizacije u 3% KOH.

7. 8. 2. Pokretljivost

Svi ispitivani izolati i referentni soj NCPPB 1144 su pokretljivi, odnosno nakon inkubacije od 48 h došlo je do zamućenja podloge.

7. 8. 3. Oblik bakterija

Mikroskopskim pregledom ustanovljeno je da su bakterije štapićastog oblika, asporogene sa jednom polarnom cilijom.

7. 9. Biohemijsko – fiziološke odlike izolata

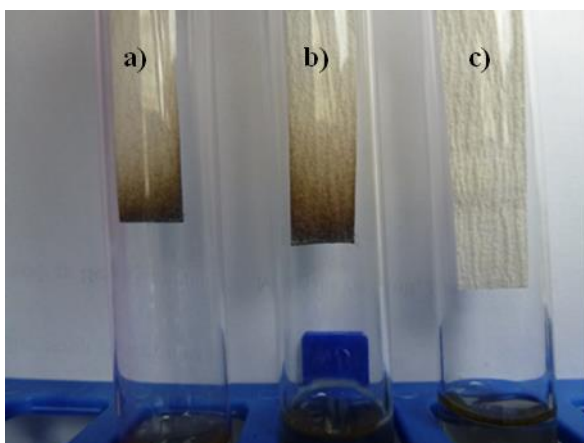
Rezultati proučavanja pokazali su homogenost svih ispitivanih izolata u pogledu biohemijsko – fizioloških karakteristika. Glukožu metabolišu samo u aerobnim uslovima (oksidativim putem), produkuju indol i stvaraju H₂S iz peptona, oksidaza je negativna, katalaza pozitivna, razlažu želatin, hidrolizuju skrob, eskulin i Tween 80. Izolati ne redukuju nitrate u nitrite, razlažu citrate i vrše proteolizu mleka (Sl. 22). Kiselinu iz ugljenih hidrata stvaraju iz: arabinoze, celobioze, trehaloze, glukoze, galaktoze, laktoze, manoze, saharoze i dekstrina (Tab. 27).

U svim navedenim biohemijsko – fiziološkim testovima dobijeni su isti rezultati kod kontrolnog referentnog soja NCPPB 1144, na osnovu čega je preliminarno zaključeno da izolati pripadaju vrsti *X. c. pv. campestris*.

Tab. 27: Biohemijsko – fiziološke odlike ispitivanih izolata i kontrolnih sojeva

| Testovi | Proučavani izolati (n=128), i reizolati (n=34) | Kontrolni sojevi | | | | |
|--------------------------|---|------------------|-------------|------------|---------------|----|
| | | NCPPB 1144 | KBNS 201 | KBNS 94 | ATCC 25922 | |
| O/F test | O | O | ni | ni | ni | |
| Stvaranje | indola | + | + | ni | ni | ni |
| | H ₂ S | + | + | ni | - | ni |
| Aktivnost | oksidaze | - | - | + | ni | ni |
| | katalaze | + | + | ni | ni | ni |
| Razlaganje želatina | + | + | ni | ni | ni | |
| Hidroliza | skroba | + | + | ni | ni | ni |
| | eskulina | + | + | ni | ni | ni |
| | Tween 80 | + | + | ni | ni | ni |
| Redukcija nitrata | - | - | ni | ni | + | |
| Razlaganje citrata | + | + | ni | ni | + | |
| Proteoliza mleka | + | + | ni | ni | ni | |
| Stvaranje kiseline iz | arabinoze | + | + | ni | ni | ni |
| | celobioze | + | + | ni | ni | ni |
| | trehaloze | + | + | ni | ni | ni |
| | glukoze | + | + | ni | ni | ni |
| | galaktoze | + | + | ni | ni | ni |
| | laktoze | + | + | ni | ni | ni |
| | manoze | + | + | ni | ni | ni |
| | saharoze | + | + | ni | ni | ni |
| dekstrina | + | + | ni | ni | ni | |

Legenda: O – oksidativni metabolizam glukoze; + pozitivna reakcija; - negativna reakcija; ni – nije ispitivano



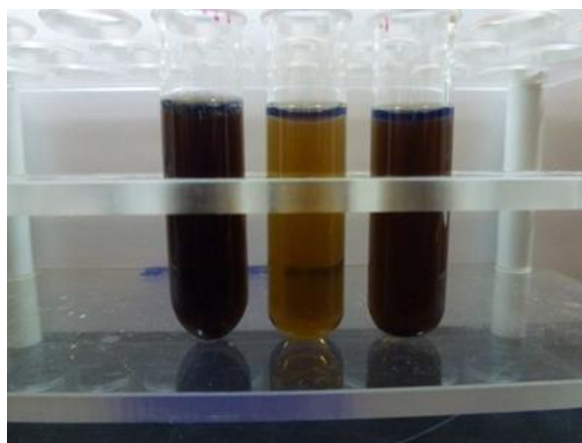
H₂S: a) izolat KL-9; b) soj NCPPB 1144; c) nezasejana podloga



Razlaganje želatina: a) nezasejana podloga; b) izolat Z-12



Hidroliza skroba: a) referentni soj NCPPB 1144; b) izolat KS-28; c) nezasejana podloga



Hidroliza eskulina: a) referentni soj NCPPB 1144; b) nezasejana podloga; c) izolat S-9



Razlaganje citrata: a) nezasejana podloga; b) izolat KS-11; c) referentni soj NCPPB 1144



Proteoliza mleka izolat KS-1

Sl. 22: Biohemijsko – fiziološke odlike izolata (foto: Vlajić)

7. 10. Serološke odlike

Serološka istraživanja sprovedena u cilju detekcije i utvrđivanja prisustva bakterije *Xcc* na kupusnjačama u Srbiji, obuhvatila su primenu direktne imunoenzimske metode na ploči (DAS – ELISA), korišćenjem komercijalnih poliklonalnih antiseruma (Loewe Biochemica GmbH, Nemačka) specifičnih za detekciju ove bakterije.

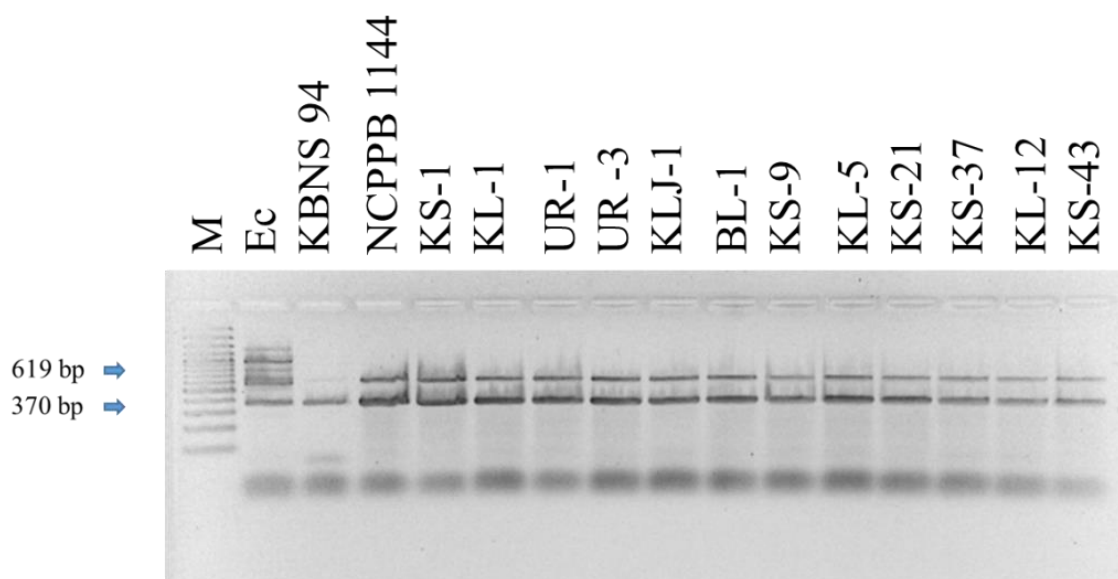
Srednje vrednosti ekstinkcija proučavanih sojeva kretale su se u granicama od 1,210 do 1,971, dok su vrednosti ekstinkcija komercijalne pozitivne kontrole (Loewe Biochemica GmbH, Nemačka) i referentnog izolata (NCPBP 1144B) bile u granicama od 0,859 do 1,256. Srednje vrednosti ekstinkcija komercijalne negativne kontrole (Loewe Biochemica GmbH, Nemačka), izolata *Xanthomonas euvesicatoria* (KFB 29) kao i izolata *P. s. pv. syringae* (KBNS 94) kretale su se u granicama od 0,112 do 0,189. S obzirom na to da su se pozitivnim smatrali uzorci čija je vrednost ekstinkcije na 405 nm bila dva i više puta veća od srednje vrednosti ekstinkcije negativne kontrole, svi ispitivni izolati: 82 sa lista različitih domaćina, 26 iz zemljišta, 20 sa semena, 34 reizolata, pokazali su pozitivnu reakciju na prisustvo bakterije *Xcc* (Sl. 23).



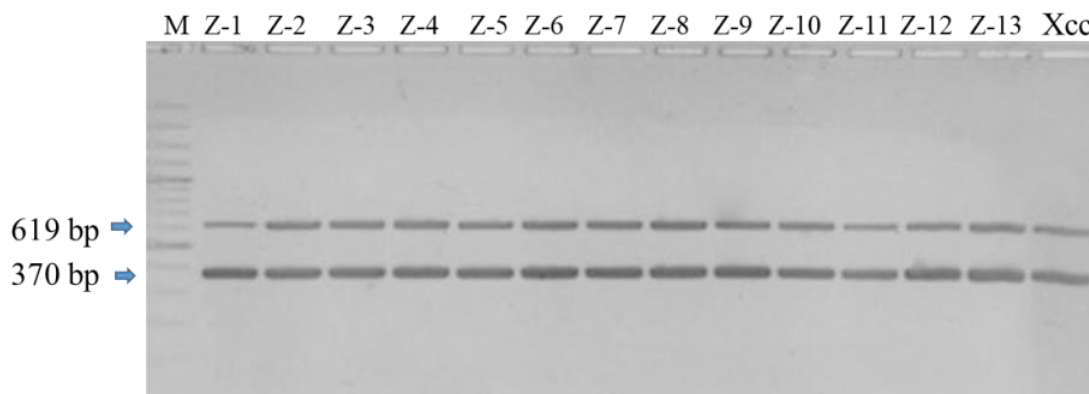
Slika 23: DAS - ELISA test – pojava žute boje u bunarčiću mikrotitarske ploče znak je pozitivne reakcije; 2B-C – 10B-C i 2D-G – 9D-G – ispitivani izolati; 10D i 10E – pozitivna kontrola (Loewe Biochemica GmbH, Nemačka); 10F i 10G pozitivna kontrola (referentni NCPBP 1144B); 11B i 11C – negativna kontrola (Loewe Biochemica GmbH, Nemačka); 11D i 11E – negativna kontrola (*Xanthomonas. euvesicatoria*, KFB 29); 11F i 11G – negativna kontrola (*P. s. pv. syringae*, KBNS 94).

7. 11. Molekularna identifikacija

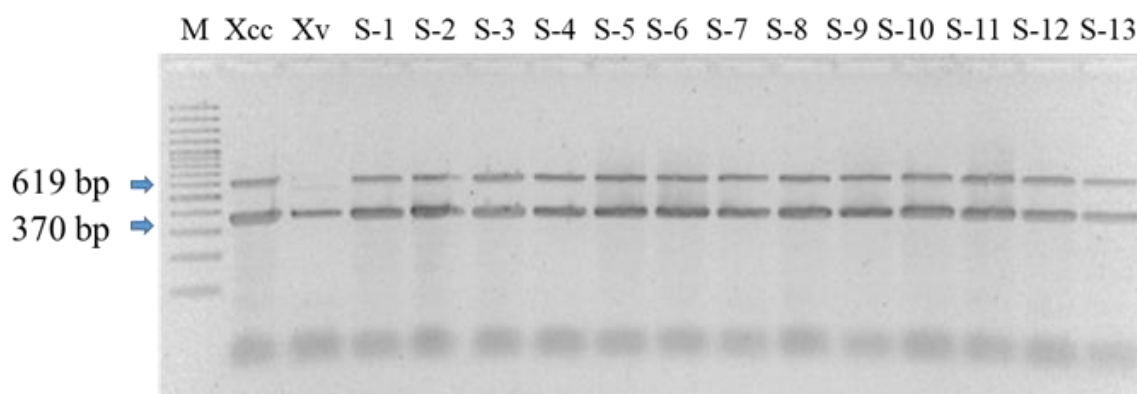
Analizom dobijenih rezultata mPCR-a, izvedenog setom specifičnih prajmera DLH 120/DLH 125 (619 bp), kao i Zup 2309/Zup 2310 (370 bp), kod svih proučavanih izolata i reizolata, kao i kontrolnog referentnog soja NCPPB 1144, amplifikovani su fragmenti nukleinskih kiselina veličine 619 i 370 bp (Sl. 24, 25, 26). Kod negativne kontrole *E. coli*, *P. s. pv. syringae* KBNS 94 (Sl. 24) i *X. vesicatoria* KFB 29 (Sl. 26) nije zabeležena amplifikacija pomenutih fragmenata.



Sl. 24: Identifikacija *Xcc* izolata poreklom iz listova prajmerima DLH 120/125 (619 bp) i Zup 2309/2310 (370 bp). M – marker (SERVA FastLoad 100bp DNK Ladder, Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany); ATCC 25922 – *E. coli* (Ec); KBNS 94 – *P. s. pv. syringae*; NCPPB 1144 – referentni soj *Xcc*; KS-1, KL-1, UR-1, UR-3, KLJ-1, BL-1, KS-9, KL-5, KS-21, KS-37, KL-12, KS-43 izolati



Sl. 25: Identifikacija *Xcc* izolata poreklom iz zemljišta prajmerima DLH 120/125 (619 bp) i Zup 2309/2310 (370 bp). M – marker (SERVA FastLoad 100bp DNA Ladder , Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany); Z1 – Z13 izolati, *Xcc* – referentni soj NCPPB 1144.



Sl. 26: Identifikacija *Xcc* izolata poreklom sa semena prajmerima DLH 120/125 (619 bp) i Zup 2309/2310 (370 bp). M – marker (SERVA FastLoad 100bp DNA Ladder , Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany); *Xcc* – referentni soj NCPPB 1144; *Xv* – *X. vesicatoria* KFB 29; S1 – S13 izolati.

7. 12. Analiza 16S rRNK sekvenci

Sekvencionana analiza 16S rRNK gena primenjena je za sedam izolata (KS-1; KS-6; KS-16; KS-17; KS-24; KS-34; KS-42) poreklom iz lista kupusa, 2 izolata (BL-1; BL-2) iz lista brokolija i za po jedan izolat sa listova kelja (KLj-1), karfiola (KL-6) i uljane repice (UR-1) (Tab. 28).

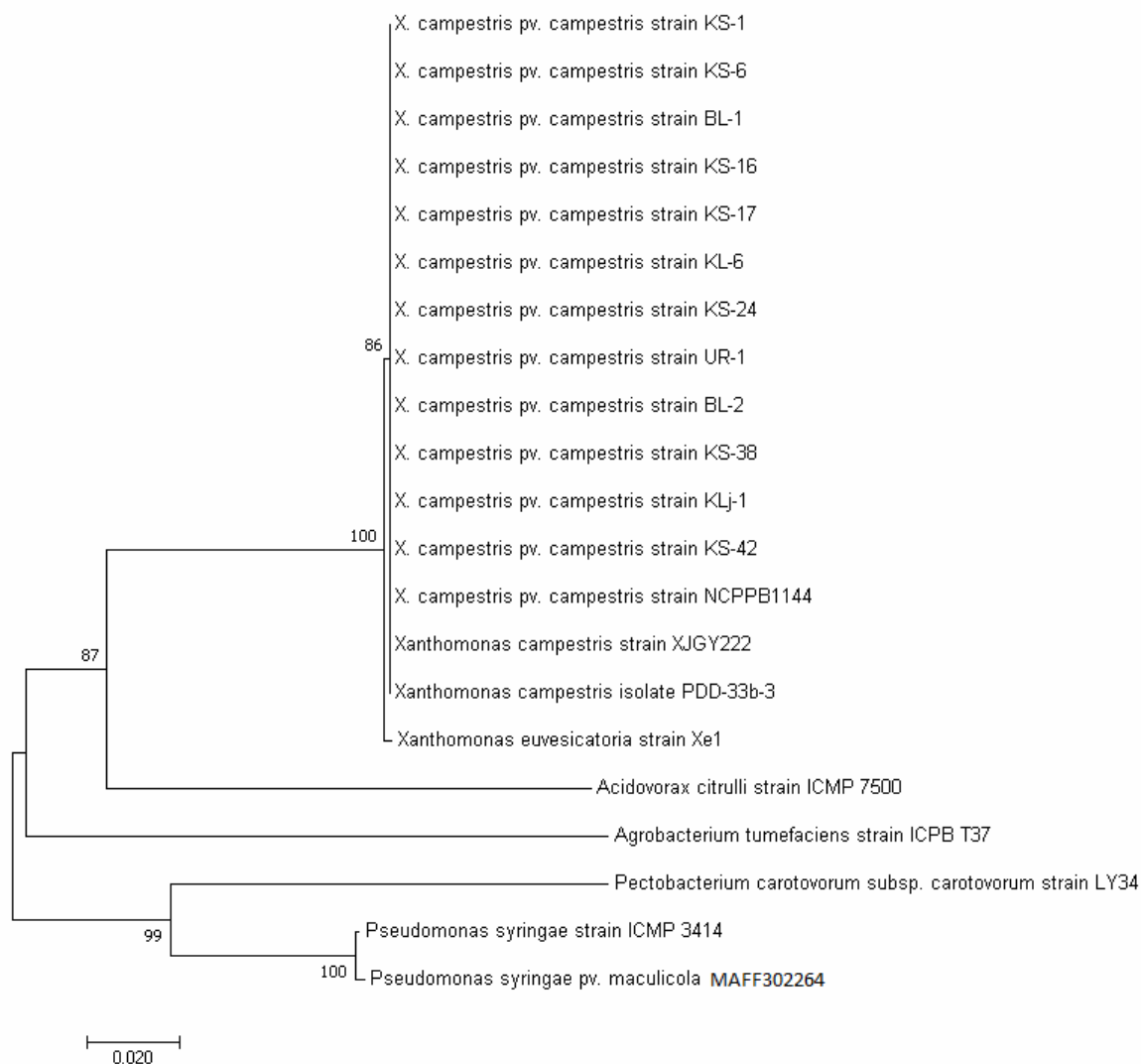
Tab 28: Sojevi čije su 16S rRNK sekvence korišćene za filogenetsku analizu

| Bakterija | Naziv izolata | Geografsko poreklo | Biljka domaćin | GenBank Acc. No. |
|---|---------------|--------------------|----------------|------------------|
| <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> | KS-1 | Srbija | Kupus | MN56561 |
| | KS-6 | Srbija | Kupus | MN56562 |
| | BL-1 | Srbija | Brokoli | MN56563 |
| | KS-16 | Srbija | Kupus | MN56564 |
| | KS-17 | Srbija | Kupus | MN56565 |
| | KL-6 | Srbija | Karfiol | MN56566 |
| | KS-24 | Srbija | Kupus | MN56567 |
| | UR-1 | Srbija | Uljana repica | MN56568 |
| | BL-2 | Srbija | Brokoli | MN56569 |
| | KS-38 | Srbija | Kupus | MN56570 |
| | KLJ-1 | Srbija | Kelj | MN56571 |
| | KS-42 | Srbija | Kupus | MN56572 |
| | NCPPB1144 | - | - | - |
| | XJGY222 | - | - | KR708907 |
| PDD-33b-3 | Francuska | - | HQ256868 | |
| <i>Xanthomonas euvesicatoria</i> | Xe1 | Srbija | Paprika | KX512832 |
| <i>Acidovorax citrulli</i> | ICMP 7500 | | | NR041758 |
| <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | ICPB T37 | Kalifornija | Orah | AJ389906 |
| <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> | LY34 | - | - | HM581688 |
| <i>Pseudomonas syringae</i> | ICMP 3414 | Japan | Crni luk | LC164016 |
| <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>maculicola</i> | MAFF302264 | Novi Zeland | Karfiol | AB001444 |

Legenda: – nije pronađen podatak

Filogenetsko stablo konstruisano je primenom „neighbor – joining“ (NJ) metode (Saitou i Nei, 1987). Genetičke udaljenosti izračunate su primenom metode Kimura 2 modela i nalaze se u jedinicama broja supstitucija baze po mestu. U analizi je učestvovala 21 nukleotidna sekvenca. Ukupno je bilo 794 pozicija u krajnjem skupu podataka. Upoređivanjem sekvenci, utvrđen je visok stepen identičnosti (100%) izolata međusobno poreklom sa različitih domaćina, kao i izolata iz NCBI baze (XJGY 222 i PDD-33b-3) (Sl. 27).

Svi ispitani izolati su se stabilnim grananjem (100 bootstrap-ova), zajedno sa referentnim izolatom NCPPB1144 izdvojili u jedan genetički klaster, i izdvojili od korišćenih „outgroup” vrsta (*Acidovorax citrulli*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum*, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas syringae pv. maculicola*).



Sl. 27: Dendrogram konstruisan na osnovu sekvence 16S rRNK gena korišćenjem NJ metode

7. 13. Osetljivost izolata *Xcc* na bakarne preparate *in vitro*

Ispitivanjem osetljivosti proučavanih sojeva, uvrđeno je da koncentracija od 300 ppm kod svih ispitivanih oblika bakra deluje inhibitorno na sve testirane izolate. Pri koncentraciji bakra od 200 ppm, zabeležen je razvoj 42 izolata kod bakar (II) – sulfata, 49 kod bakar – hidroksida i 60 izolata kod bakar – oksihlorida. Koncentracija od 100 ppm ispitivanih oblika bakarnih jedinjenja, omogućila je razvoj svih izolata.

U pogledu osetljivosti prema streptomycin – sulfatu, pri koncentracijama od 25 i 50 ppm nije zabeležen razvoj izolata, dok je pri koncentraciji 10 ppm zabeležen razvoj 72 izolata, odnosno 114 izolata pri koncentraciji od 5 ppm (Tab. 29).

Tab. 29: Osetljivost proučavanih izolata na različite koncentracije bakra i streptomycin sulfata

| Šifra izolata | Bakar-hidroksid | | | Bakar- oksid | | | Bakar (II)-sulfat | | | Streptomycin-sulfat | | | | Kontrola* |
|------------------|-----------------|------------|------------|-----------------|------------|------------|-------------------|------------|------------|---------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | 100 ppm | 200 ppm | 300 ppm | 100 ppm | 200 ppm | 300 ppm | 100 ppm | 200 ppm | 300 ppm | 5 ppm | 10 ppm | 25 ppm | 50 ppm | |
| KS-1 | + | - | - | + | - | - | + | - | - | + | + | - | - | + |
| KS-2 | + | - | - | + | - | - | + | - | - | + | + | - | - | + |
| KS-3 | + | + | - | + | + | - | + | - | - | + | + | - | - | + |
| KS-4 | + | + | - | + | + | - | + | + | - | + | + | - | - | + |
| KS-5 | + | - | - | + | - | - | + | - | - | + | + | - | - | + |
| KL-1 | + | - | - | + | - | - | + | - | - | + | - | - | - | + |
| KL-2 | + | + | - | + | - | - | + | - | - | + | - | - | - | + |
| KS-6 | + | - | - | + | + | - | + | - | - | + | + | - | - | + |
| KS-7 | + | + | - | + | + | - | + | + | - | + | + | - | - | + |
| KS-8 | + | + | - | + | + | - | + | + | - | + | + | - | - | + |
| KS-9 | + | + | - | + | + | - | + | + | - | + | + | - | - | + |
| KS-10 | + | - | - | + | - | - | + | - | - | + | + | - | - | + |
| KS-11 | + | - | - | + | - | - | + | - | - | + | + | - | - | + |
| KL-3 | + | - | - | + | - | - | + | - | - | + | - | - | - | + |
| BL-1 | + | - | - | + | - | - | + | - | - | + | - | - | - | + |
| KS-12 | + | - | - | + | - | - | + | - | - | + | - | - | - | + |
| KS-13 | + | + | - | + | + | - | + | + | - | + | + | - | - | + |
| KS-14 | + | - | - | + | - | - | + | - | - | + | + | - | - | + |
| KS-15 | + | + | - | + | + | - | + | - | - | + | + | - | - | + |
| KS-16 | + | + | - | + | + | - | + | - | - | + | + | - | - | + |
| KS-17 | + | + | - | + | + | - | + | + | - | + | + | - | - | + |
| KS-18 | + | + | - | + | + | - | + | + | - | + | + | - | - | + |
| KS-19 | + | + | - | + | + | - | + | + | - | + | + | - | - | + |
| KL-4 | + | + | - | + | + | - | + | + | - | + | + | - | - | + |
| KL-5 | + | + | - | + | + | - | + | - | - | + | + | - | - | + |
| KS-20 | + | + | - | + | + | - | + | + | - | + | + | - | - | + |
| KS-21 | + | + | - | + | - | - | + | + | - | + | + | - | - | + |
| KS-22 | + | + | - | + | + | - | + | + | - | + | + | - | - | + |
| KL-6 | + | + | - | + | + | - | + | + | - | + | + | - | - | + |
| KL-7 | + | + | - | + | + | - | + | + | - | + | + | - | - | + |
| KL-8 | + | + | - | + | + | - | + | + | - | + | + | - | - | + |
| KS-23 | + | - | - | + | - | - | + | - | - | + | + | - | - | + |
| KS-24 | + | - | - | + | - | - | + | - | - | + | + | - | - | + |
| KS-25 | + | - | - | + | + | - | + | - | - | + | + | - | - | + |
| KS-26 | + | - | - | + | + | - | + | - | - | + | + | - | - | + |
| KS-27 | + | + | - | + | + | - | + | + | - | + | + | - | - | + |
| KS-28 | + | + | - | + | + | - | + | + | - | + | + | - | - | + |
| KS-29 | + | - | - | + | - | - | + | - | - | + | + | - | - | + |
| UR-1 | + | - | - | + | - | - | + | - | - | + | - | - | - | + |
| UR-2 | + | - | - | + | - | - | + | - | - | + | - | - | - | + |
| UR-3 | + | - | - | + | - | - | + | - | - | + | - | - | - | + |
| KS-30 | + | - | - | + | + | - | + | + | - | + | + | - | - | + |
| KS-31 | + | + | - | + | + | - | + | + | - | + | + | - | - | + |
| KS-32 | + | + | - | + | + | - | + | + | - | + | + | - | - | + |
| KS-33 | + | + | - | + | + | - | + | + | - | + | + | - | - | + |
| KS-34 | + | - | - | + | + | - | + | + | - | + | + | - | - | + |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| KS-35 | + | + | - | + | - | - | + | + | - | + | + | - | - | + |
| KS-36 | + | - | - | + | + | - | + | - | - | + | + | - | - | + |
| BL-2 | + | - | - | + | - | - | + | - | - | + | - | - | - | + |
| KL-9 | + | - | - | + | - | - | + | - | - | + | - | - | - | + |
| KS-37 | + | - | - | + | + | - | + | - | - | + | - | - | - | + |
| KL-9 | + | - | - | + | - | - | + | - | - | + | - | - | - | + |
| KS-38 | + | - | - | + | + | - | + | + | - | + | - | - | - | + |
| KLJ-1 | + | - | - | + | - | - | + | - | - | + | - | - | - | + |
| KS-39 | + | + | - | + | + | - | + | - | - | + | + | - | - | + |
| KS-40 | + | + | - | + | + | - | + | - | - | + | + | - | - | + |
| KS-41 | + | - | - | + | + | - | + | + | - | + | - | - | - | + |
| KS-42 | + | - | - | + | - | - | + | + | - | + | - | - | - | + |
| KS-43 | + | - | - | + | - | - | + | + | - | + | - | - | - | + |
| KS-44 | + | + | - | + | - | - | + | + | - | + | + | - | - | + |
| KS-45 | + | + | - | + | + | - | + | - | - | + | + | - | - | + |
| KL-10 | + | - | - | + | + | - | + | - | - | + | - | - | - | + |
| KS-46 | + | - | - | + | - | - | + | - | - | + | - | - | - | + |
| KS-47 | + | + | - | + | - | - | + | - | - | + | + | - | - | + |
| KS-48 | + | - | - | + | - | - | + | - | - | + | - | - | - | + |
| KS-49 | + | - | - | + | + | - | + | - | - | + | - | - | - | + |
| KS-50 | + | + | - | + | + | - | + | + | - | + | + | - | - | + |
| KS-51 | + | + | - | + | + | - | + | + | - | + | + | - | - | + |
| KS-52 | + | - | - | + | - | - | + | - | - | + | - | - | - | + |
| KS-53 | + | - | - | + | + | - | + | - | - | + | - | - | - | + |
| KS-54 | + | - | - | + | + | - | + | - | - | + | - | - | - | + |
| KS-55 | + | - | - | + | - | - | + | - | - | + | - | - | - | + |
| KS-56 | + | - | - | + | - | - | + | + | - | + | - | - | - | + |
| KS-57 | + | + | - | + | + | - | + | + | - | + | + | - | - | + |
| KS-58 | + | + | - | + | + | - | + | + | - | + | + | - | - | + |
| KS-59 | + | + | - | + | - | - | + | + | - | + | + | - | - | + |
| KL-12 | + | - | - | + | + | - | + | - | - | + | - | - | - | + |
| KL-13 | + | - | - | + | + | - | + | - | - | + | + | - | - | + |
| KL-14 | + | - | - | + | - | - | + | - | - | + | - | - | - | + |
| KS-60 | + | - | - | + | + | - | + | + | - | + | - | - | - | + |
| KS-61 | + | + | - | + | - | - | + | - | - | + | + | - | - | + |
| KS-62 | + | + | - | + | + | - | + | + | - | + | + | - | - | + |
| Z-1 | + | - | - | + | - | - | + | - | - | + | + | - | - | + |
| Z-2 | + | - | - | + | + | - | + | - | - | + | + | - | - | + |
| Z-3 | + | - | - | + | - | - | + | - | - | + | - | - | - | + |
| Z-4 | + | - | - | + | - | - | + | - | - | + | - | - | - | + |
| Z-5 | + | + | - | + | - | - | + | - | - | + | + | - | - | + |
| Z-6 | + | + | - | + | - | - | + | - | - | + | + | - | - | + |
| Z-8 | + | - | - | + | - | - | + | - | - | + | + | - | - | + |
| Z-9 | + | - | - | + | - | - | + | - | - | + | - | - | - | + |
| Z-10 | + | + | - | + | - | - | + | - | - | + | - | - | - | + |
| Z-11 | + | - | - | + | + | - | + | - | - | + | + | - | - | + |
| Z-12 | + | + | - | + | - | - | + | - | - | + | + | - | - | + |
| Z-13 | + | - | - | + | - | - | + | - | - | + | + | - | - | + |
| Z-14 | + | + | - | + | - | - | + | - | - | + | + | - | - | + |
| S-2 | + | - | - | + | + | - | + | - | - | + | - | - | - | + |
| S-3 | + | + | - | + | + | - | + | + | - | + | + | - | - | + |
| S-4 | + | - | - | + | + | - | + | - | - | + | + | - | - | + |
| S-5 | + | - | - | + | + | - | + | - | - | + | - | - | - | + |
| S-6 | + | + | - | + | - | - | + | + | - | + | + | - | - | + |
| S-7 | + | - | - | + | - | - | + | - | - | + | - | - | - | + |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| S-8 | + | - | - | + | - | - | + | - | - | + | - | - | - | + |
| S-9 | + | + | - | + | + | - | + | + | - | + | + | - | - | + |
| S-10 | + | - | - | + | + | - | + | - | - | + | - | - | - | + |
| S-11 | + | - | - | + | + | - | + | - | - | + | - | - | - | + |
| S-12 | + | - | - | + | - | - | + | - | - | + | - | - | - | + |
| S-13 | + | - | - | + | + | - | + | - | - | + | - | - | - | + |
| S-14 | + | - | - | + | - | - | + | - | - | + | - | - | - | + |
| S-15 | + | - | - | + | - | - | + | - | - | + | - | - | - | + |
| S-16 | + | - | - | + | - | - | + | - | - | + | - | - | - | + |
| S-17 | + | + | - | + | + | - | + | + | - | + | + | - | - | + |
| S-18 | + | + | - | + | + | - | + | + | - | + | + | - | - | + |
| S-19 | + | + | - | + | + | - | + | + | - | + | + | - | - | + |
| S-20 | + | - | - | + | - | - | + | - | - | + | - | - | - | + |

Legenda: + normalan razvoj bakterije na podlozi; - bez razvoja bakterije na podlozi.

*Kontrola predstavlja podlogu (SPA) bez dodatka baktericida ili antibiotika

7. 14. Specifičnost bakteriofaga prema *Xcc*

Nakon prečišćavanja faga, iz pojedinačnih plakova koji su morfološki identični, dobijena je identična forma plaka u podlozi. Titar faga nakon prečišćavanja iznosio je između 10^8 – 10^9 PFU/ml.

Ispitivani izolati bakteriofaga ispoljili su lipolitičku aktivnost prema svim proučavanim izolatima *X. c. pv. campestris* i referentnom soju NCPPB 1144. Nijedan ispitivani izolat bakteriofaga nije ispoljio aktivnost prema kontrolnim sojevima KFB 29 (*X. vesicatoria*) i KBNS 94 (*P. s. pv. syringae*) (Tab. 30), odnosno potvrđena je njihova visoka specifičnost prema *Xcc*.

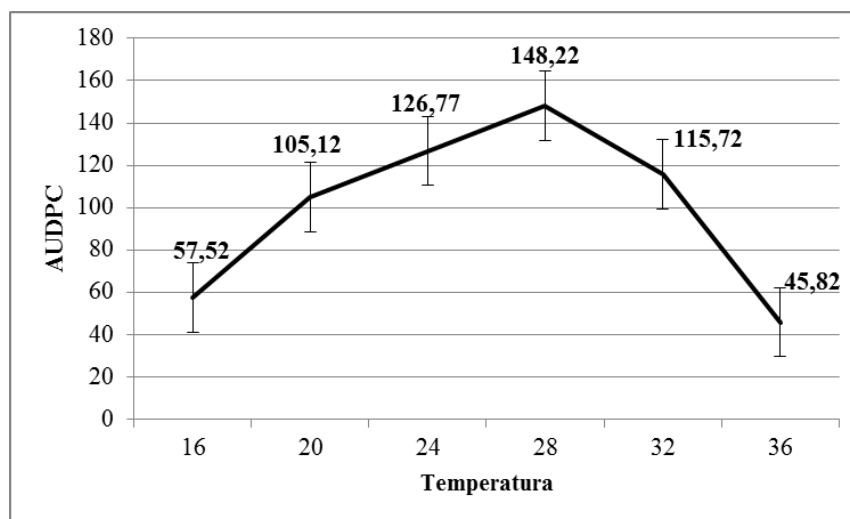
Tab. 30: Rezultati lipolitičke aktivnosti izolata bakteriofaga prema ispitivanim izolatima

| Šifra izolata/soja | Izolati bakteriofaga | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------------|----------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | FXcc 1/1 | FXcc 1/2 | FXcc 1/3 | FXcc 1/4 | FXcc 1/5 | FXcc 2/1 | FXcc 2/2 | FXcc 2/3 | FXcc 2/4 | FXcc 2/5 | FXcc 3/1 | FXcc 3/2 | FXcc 3/3 | FXcc 3/4 | FXcc 3/5 |
| KS-1 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| KS-5 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| KL-1 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| KL-3 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| BL-1 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| KS-21 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| KS-29 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| UR-2 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| BL-2 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| KLJ-1 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| KL-13 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| KS-62 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Z-1 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Z-5 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Z-9 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Z-12 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| S-3 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| S-7 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| S-11 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| S-18 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| NCPPB1144 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| KFB 29 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| KBNS 94 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

Legenda: + formiranje prozračnog plaka; - izostanak formiranja plaka

7. 15. Uticaj temperature na razvoj bolesti *in vitro*

Gajenjem biljaka nakon inokulacije pri različitim temperaturnim uslovima, utvrđen je uticaj temperature na razvoj bolesti. Najviša vrednost AUDPC je zabeležena pri temperaturi 28 °C, a najniža vrednost pri temperaturi od 36 °C. Temperature od 16 i 36 °C uticale su na slab razvoj bolesti i pojavu simptoma, dok su simptomi bili jasno vidljivi pri temperaturnom intervalu od 24–32 °C (Graf. 4).



Graf. 4: Uticaj temperature na AUDPC vrednosti izračunate na osnovu nekroze lisne površine nakon veštačke inokulacije sa *Xcc* (izolat KS-17)

7. 16. Rezultati primene baktericida u poljskim uslovima

Efikasnost ispitivanih baktericida praćena je preko vrednosti indeksa zaraze (IZ). Niže vrednosti indeksa ukazuju na višu efikasnost baktericida i obratno.

Na lokalitetu Rimski šančevi u 2014. godini tokom prve ocene, najniži IZ (15,56%) je utvrđen u tretmanu u kome je primenjena kombinacija preparata na bazi aktivnih supstanci bakar – hidroksid + fosetil – Al (T8), dok je najveći IZ (23,61%) u tretmanu u kome je primenjen bakar – sulfat 0,25% (T2). U drugoj oceni najniži IZ od 24,17% utvrđen je u istom tretmanu kao i tokom prve ocene. Najviši IZ (32,78%) je zabeležen u tretmanu sa bakar – sulfatom 0,25% (T2), ali i u tretmanu u kome je primenjen biološki preparat na bazi bakterije *B. subtilis* (T9). U trećoj oceni najniži IZ (30,28%) je utvrđen u tretmanu u kojem je primenjen antibiotik streptomycin – sulfat (T10). Tretman u kome je primenjen antibiotik kasugamicin imao je najveći IZ (41,94%) (T11). Tokom druge godine (2015)

ogleda, duž celog perioda ocenjivanja, najniži IZ (9,17%; 10,28%; 12,50%) je zabeležen u tretmanu bakar – hidroksid + mankozeb (T7). Isti trend je i sa najvećim IZ (15,56%; 20,00%; 27,52%) u tretmanu sa bakar – sulfatom 0,25% (T2). U poslednjoj godini ogleda (2016) najniži IZ (16,11%; 28,61%) je utvrđen u prvoj i trećoj oceni kod tretmana bakar – hidroksid + mankozeb (T7), dok je u drugoj oceni najniži IZ (21,67%) zabeležen kod tretmana bakar – hidroksid + fosetil – Al (T8). Najveći IZ (27,22%) je zabeležen u tretmanu bakar – sulfatom 0,5% (T1) u prvoj oceni, dok je IZ (31,67%; 37,78%) u drugoj i trećoj oceni zabeležen u tretmanu bakar – sulfatom 0,5% (T1) i bakar – sulfatom 0,25% (T2). U kontroli tokom sve tri ocene IZ je bio uglavnom veći u odnosu na ispitivane tretmane i kretao se od 32,22% do 48,99% u 2014. godini, od 15,83% do 33,06% tokom 2015. godine i od 33,06% do 45,56% u 2016 godini (Tab. 31).

Tab. 31: Vrednosti indeksa zaraze (IZ%) tokom ispitivanog perioda u uslovima veštačke inokulacije (lok. Rimski šančevi)

| Godina ispitivanja | 2014 | | | 2015 | | | 2016 | | |
|--------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | I | II | III | I | II | III | I | II | III |
| T1* | 21,39 | 31,11 | 38,33 | 12,90 | 15,56 | 19,44 | 27,22 | 31,67 | 37,78 |
| T2 | 23,61 | 32,78 | 33,33 | 15,56 | 20,00 | 27,52 | 26,39 | 31,67 | 37,78 |
| T3 | 22,22 | 31,39 | 37,78 | 12,22 | 18,06 | 23,61 | 23,61 | 23,83 | 31,94 |
| T4 | 23,06 | 29,72 | 41,11 | 12,78 | 19,17 | 26,67 | 23,89 | 29,72 | 35,00 |
| T5 | 19,72 | 28,61 | 35,83 | 10,83 | 13,61 | 18,06 | 21,39 | 25,28 | 31,11 |
| T6 | 20,00 | 30,83 | 37,50 | 12,78 | 18,06 | 23,61 | 21,94 | 28,89 | 32,22 |
| T7 | 15,83 | 25,28 | 31,67 | 9,17 | 10,28 | 12,50 | 16,11 | 23,06 | 28,61 |
| T8 | 15,56 | 24,17 | 31,94 | 10,56 | 12,78 | 15,28 | 18,06 | 21,67 | 28,89 |
| T9 | 24,44 | 32,78 | 41,94 | 14,17 | 19,44 | 19,45 | 26,39 | 33,06 | 38,89 |
| T10 | 16,67 | 25,56 | 30,28 | 10,83 | 12,50 | 15,83 | 18,89 | 28,89 | 31,11 |
| T11 | 19,72 | 26,94 | 35,83 | 10,83 | 14,72 | 19,72 | 19,17 | 28,89 | 31,12 |
| T12 | 32,22 | 39,44 | 48,99 | 15,83 | 23,33 | 33,06 | 33,06 | 38,06 | 45,56 |

*T – tretmani prikazani u tab. 18

U uslovima prirodne zaraze, na lokaciji Futog tokom 2014. godine u tretmanu bakar – hidroksid + fosetil – Al (T8) zabeležene su najniže vrednosti IZ u sve tri ocene (9,41%, 11,02% i 13,78%). Najveće vrednosti IZ su utvrđene u tretmanu u kome je primenjen biološki preparat na bazi *B. subtilis* (T9). Prema ocenama, ove vrednosti iznosile su 11,02%, 25,83% i 33,89%. U drugoj godini ispitivanja (2015), tokom prve ocene najniža vrednost IZ od 9,44% utvrđena je u tretmanu u kome je primenjena kombinacija bakar – hidroksida + mankozeba (T7), dok je najveća vrednost IZ od 12,50% zabeležena u tretmanu sa *B. subtilis* (T9). Vrednosti IZ za ostale baktericide bile su veoma slične, s tim da su iste vrednosti IZ od 11,67% imali tretmani sa bakar – oksihloridom 0,3% (T4) i streptomycin – sulfatom 0,02% (T10). Vrednost IZ od 11,94% bila je ista za tretmane sa bakar – sulfatom 0,5% (T1), bakar – hidroksidom 0,3% (T6) i kasugamicinom – 2 l ha⁻¹. U drugoj oceni iste godine najniža vrednost IZ od 10,56% je utvrđena u tretmanu sa bakar – hidroksidom + fosetil – Al (T8), a najveći IZ 23,84% u tretmanu sa bakar – sulfatom 0,25% (T2). Tokom treće ocene najniži IZ od 13,61% je utvrđen u istom tretmanu kao i tokom druge ocene, dok je najveći u IZ od 28,06% u tretmanu sa kasugamicinom (T11). Treće godine (2016) ispitivanja u prvoj oceni najniže vrednosti IZ od 9,84% su zabeležene u tretmanu sa bakar – hidroksidom 0,5% + fosetil – Al 0,2% (T8), a najveći IZ od 13,06 u tretmanu sa biološkim agensom *B. subtilis* (T9). Iste godine u drugoj oceni najniže vrednosti IZ od 21,67% zabeležene su u istom tretmanu (T8) kao i tokom prve ocene, kao i najveći IZ od 30,83 u istom tretmanu (T9) kao tokom prve ocene. Tokom treće ocene najniži IZ od 17,50% utvrđen je u tretmanu bakar – hidroksidom 0,5% + mankozeb 0,25% (T7), dok je najveći IZ od 38,06% zabeležen u tretmanu (T9) kao i tokom predhodne dve ocene. U kontroli, IZ tokom sve tri ocene je bio znatno veći u odnosu na ispitivane tretmane i kretao se od 21,11 do 43,33% u 2014. godini, od 17,78 do 35,56% tokom 2015. godini i od 22,22 do 46,67% u 2016. godini (Tab. 32).

Tab. 32: Vrednosti indeksa zaraze (IZ%) tokom ispitivanog perioda u uslovima prirodne infekcije (lok. Futog)

| Godina ispitivanja | 2014 | | | 2015 | | | 2016 | | |
|--------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | I | II | III | I | II | III | I | II | III |
| T1* | 12,22 | 16,94 | 25,83 | 11,94 | 14,72 | 15,00 | 14,44 | 20,00 | 28,89 |
| T2 | 17,50 | 24,44 | 33,06 | 11,95 | 23,84 | 33,61 | 18,33 | 27,22 | 35,28 |
| T3 | 12,78 | 16,94 | 24,17 | 11,11 | 13,33 | 24,17 | 14,45 | 19,17 | 28,61 |
| T4 | 17,78 | 21,67 | 29,44 | 11,67 | 16,39 | 25,28 | 19,44 | 24,44 | 32,50 |
| T5 | 10,56 | 15,00 | 20,83 | 11,14 | 12,22 | 19,17 | 12,50 | 18,06 | 23,89 |
| T6 | 14,44 | 18,61 | 25,28 | 11,94 | 16,39 | 24,72 | 16,11 | 21,11 | 29,17 |
| T7 | 10,00 | 12,78 | 16,67 | 9,44 | 11,39 | 18,33 | 11,39 | 14,72 | 17,50 |
| T8 | 9,41 | 11,02 | 13,78 | 9,72 | 10,56 | 13,61 | 9,84 | 13,06 | 18,89 |
| T9 | 18,61 | 25,83 | 33,89 | 12,50 | 20,28 | 22,33 | 21,67 | 30,83 | 38,06 |
| T10 | 12,78 | 21,11 | 27,78 | 11,67 | 15,83 | 20,83 | 13,06 | 22,50 | 28,61 |
| T11 | 13,33 | 20,28 | 28,61 | 11,94 | 18,33 | 28,06 | 13,61 | 21,39 | 30,56 |
| T12 | 21,11 | 31,39 | 43,33 | 17,78 | 23,89 | 35,56 | 22,22 | 32,78 | 46,67 |

*T - tretmani prikazani u tab. 18

7. 16. 1. Statistička analiza efikasnosti baktericida

Tretmani baktericidima na lokalitetu Rimsku šančevi su pokazali statistički značajnu ($P < 0,05$) ili visoko statistički značajnu ($P < 0,01$) razliku u odnosu na netretiranu kontrolnu varijantu. Kod primene bakar – sulfata koncentracije 0,25% (T2) tokom 2015. godine nije zabeležena statistički značajna razlika u odnosu na netretiranu kontrolu, kao i kod primene *B. subtilis* (T9) u prvoj oceni tokom iste godine (Tab. 33). Numeričke vrednosti inferencija prikazane su u Prilogu 7.

Tab. 33: Poređenje primenjenih tretmana sa netretiranom kontrolom za parametar intenzitet nekroze lista na lokalitetu Rimski šančevi

| | 2014. godina | | | 2015. godina | | | 2016. godina | | |
|------------|--------------|----|----|--------------|----|----|--------------|----|----|
| | M1 | M2 | M3 | M1 | M2 | M3 | M1 | M2 | M3 |
| T1 | ** | ** | ** | ** | ** | ** | ** | ** | ** |
| T2 | ** | ** | ** | | | ** | ** | * | ** |
| T3 | ** | ** | ** | * | ** | ** | ** | ** | ** |
| T4 | ** | ** | ** | * | * | ** | ** | ** | ** |
| T5 | ** | ** | ** | ** | ** | ** | ** | ** | ** |
| T6 | ** | ** | ** | * | ** | ** | ** | ** | ** |
| T7 | ** | ** | ** | ** | ** | ** | ** | ** | ** |
| T8 | ** | ** | ** | ** | ** | ** | ** | ** | ** |
| T9 | ** | ** | ** | | * | * | ** | ** | * |
| T10 | ** | ** | ** | ** | ** | ** | ** | ** | ** |
| T11 | ** | ** | ** | ** | ** | ** | ** | ** | ** |

*statistički značajna razlika na nivou ($P < 0,05$)

**visoko statistički značajna razlika na nivou ($P < 0,01$)

T - tretmani prikazani u tab. 17; M - ocene

Na lokalitetu Futog, u uslovima prirodne infekcije, većina tretmana je ispoljila značajan uticaj na intenzitet zaraze u odnosu na netretiranu kontrolnu varijantu; uticaj je bio statistički značajan ($P < 0,05$) ili visoko statistički značajan ($P < 0,01$). Tretman sa *B. subtilis* (T9) u prvoj oceni 2014. godine nije pokazao statističku značajnost u odnosu na kontrolu, kao i u drugoj i trećoj oceni 2015. godine i prvoj i drugoj oceni tokom 2016. godine. Statistički značajnu razliku nije pokazao ni tretman sa bakar – sulfatom koncentracije 0,25 % (T2) u drugoj i trećoj oceni 2015. godine. Isto je zabeleženo i u prvoj oceni tretmana sa bakar – oksihloridom koncentracije 0,3% (T4) 2016. godine (Tab. 34). Numeričke vrednosti inferencija prikazane u Prilogu 7.

Tab. 34: Poređenje primenjenih tretmana sa netretiranom kontrolom za parametar intenzitet nekroze lista na lokalitetu Futog

| | 2014. godina | | | 2015. godina | | | 2016. godina | | |
|------------|--------------|----|----|--------------|----|----|--------------|----|----|
| | M1 | M2 | M3 | M1 | M2 | M3 | M1 | M2 | M3 |
| T1 | ** | ** | ** | ** | ** | ** | ** | ** | ** |
| T2 | ** | ** | ** | ** | | | ** | ** | ** |
| T3 | ** | ** | ** | ** | ** | ** | ** | ** | ** |
| T4 | * | ** | ** | ** | ** | ** | | ** | ** |
| T5 | ** | ** | ** | ** | ** | ** | ** | ** | ** |
| T6 | ** | ** | ** | ** | ** | ** | ** | ** | ** |
| T7 | ** | ** | ** | ** | ** | ** | ** | ** | ** |
| T8 | ** | ** | ** | ** | ** | ** | ** | ** | ** |
| T9 | | ** | ** | ** | | | | | ** |
| T10 | ** | ** | ** | ** | ** | ** | ** | ** | ** |
| T11 | ** | ** | ** | ** | ** | ** | ** | ** | ** |

*statistički značajna razlika na nivou ($P < 0,05$)

**visoko statistički značajna razlika na nivou ($P < 0,01$)

T - tretmani prikazani u tab. 17; M - ocene

Kumulativne verovatnoće su prikazane u tab. 29 (numeričke vrednosti prikazane u prilogu 7) za lokalitet Rimski šančevi. One ukazuju na verovatnoće da će ispitivani tretmani biti klasifikovani u određenu kategoriju. U 2014. godini najveće kumulativne verovatnoće za najefikasnije tretmane bile su u oceni 1 (bakar – hidroksid 0,5% + fosetil – Al 0,2%) tokom prve ocene, oceni 3 (bakar – hidroksid 0,5%; bakar – hidroksid 0,3%; bakar – hidroksid 0,5% + mankozeb 0,25%; streptomycin – sulfat 0,02%; kasugamicin 2 l ha⁻¹) tokom druge i oceni 4 (bakar – oksihlorid 0,5%; bakar – hidroksid 0,5%; bakar – hidroksid 0,3%; bakar – hidroksid 0,5% + mankozeb 0,25%; bakar – hidroksid 0,5% + fosetil – Al 0,2%; streptomycin – sulfat 0,02%; kasugamicin 2 l ha⁻¹) tokom treće ocene. Kumulativne verovatnoće najveće za kontrolnu varijantu iste godine, bile su u oceni 4 tokom prve ocene, oceni 6 tokom druge i treće ocene. Druge godine u prvoj oceni najveće kumulativne verovatnoće bile su u oceni 1 za većinu tretmana, dok su za kontrolnu varijantu i bakar – sulfat 0,25% bile u ocenu 2.

Iste godine tokom druge ocene u tretmanima bakar – sulfat 0,5%; bakar – hidroksid 0,5%; bakar – hidroksid 0,5% + mankozeb 0,25%; bakar – hidroksid 0,5% + fosetil – Al 0,2%; *B. subtilis* 2 l ha⁻¹ i streptomycin – sulfat 0,02% najveće kumulativne verovatnoće su bile u oceni 1, dok je za kontrolu najveća kumulativna verovatnoća bila u oceni 3. U trećoj oceni za tretmane: bakar – hidroksid 0,5% + mankozeb 0,25%; bakar – hidroksid 0,5% + fosetil – Al 0,2%; i streptomycin – sulfat 0,02% najveća kumulativna verovatnoća je bila u oceni 1, dok je u kontrolnoj varijanti najveća verovatnoća bila u oceni 4.

U 2016. godini najveće kumulativne verovatnoće za tretmane: bakar – hidroksid 0,5% + mankozeb 0,25%; bakar – hidroksid 0,5% + fosetil – Al 0,2%; i streptomycin – sulfat 0,02% su bile u oceni 1, dok su najveće verovatnoće za kontrolnu varijantu bile u oceni 4. Tretmani bakarnim preparatima različitih koncentracija imali su isti najveći kumulativ verovatnoće u oceni 3. U drugoj oceni iste godine najveći kumulativ verovatnoće u oceni 2 imao je samo tretman bakar – hidroksid 0,5% + fosetil – Al 0,2%; dok je kontrolna varijanta imala u oceni 5. Prilikom treće ocene tretmani bakar – hidroksid 0,5%; bakar – hidroksid 0,5% + mankozeb 0,25%; bakar – hidroksid 0,5% + fosetil – Al 0,2% imali su najveći kumulativ u oceni 3, dok je kontrolna varijanta imala u oceni 6. Tretmani bakarnim preparatima (osim bakar – hidroksid 0,5%) imali su najveći kumulativ verovatnoće u oceni 4, kao i primenjeni antibiotici (streptomycin i kasugamicin).

Kumulativne verovatnoće za lokalitet Futog su prikazane u tab. 29 (numeričke vrednosti prikazane u prilogu 7). Tokom 2014. godine za tretmane sa višim koncentracijama bakarnih preparata (bakar – sulfat 0,5%; bakar – oksihlorid 0,5%; bakar – hidroksid 0,5%), kombinacijama bakra sa drugim fungicidima (bakar – hidroksid 0,5% + mankozeb 0,25%; bakar – hidroksid 0,5% + fosetil – Al 0,2%) i antibioticima (streptomycin – sulfat 0,02% i kasugamicin 2 l ha⁻¹), najveća ocena kumulativnih verovatnoća bila je u oceni 1, dok je u kontrolnoj varijanti bila u oceni 3. Prilikom druge ocene najveći kumulativ verovatnoće za tretmane: bakar – hidroksid 0,5% + mankozeb 0,25% i bakar – hidroksid 0,5% + fosetil – Al 0,2% je bio u oceni 1, dok je za kontrolnu varijantu bio u oceni 4. Vise koncentracije bakra su imale kumulativ verovatnoće u oceni 2 (bakar – sulfat 0,5%; bakar – oksihlorid 0,5%; bakar – hidroksid 0,5%) a niže u oceni 3 (bakar – sulfat 0,25% i bakar – oksihlorid 0,3%), izuzev bakar – hidroksid 0,3% koji je imao kumulativ u istoj oceni kao i više koncentracije.

Kumulativ kontrolne varijante je bio u oceni 4. Najveći kumulativ verovatnoće u trećoj oceni za bakar – hidroksid 0,5% + mankozeb 0,25% i bakar – hidroksid 0,5% + fosetil – Al 0,2% je bio u oceni 1, dok je za bakarne preparate (bakar – sulfat 0,5%; bakar – oksihlorid

0,5%; bakar – hidroksid 0,5% i bakar – hidroksid 0,3%) i antibiotike (streptomycin i kasugamicin) bio u oceni 3, osim bakar – sulfat 0,25% kod koga je kumulativ u oceni 4. Kumulativ kontrolne varijante je bio u oceni 5.

Druge godine ispitivanja najveći kumulativ verovatnoće za sve tretmane bio je u oceni 1, dok je za kontrolnu varijantu bio u oceni 2. U drugoj oceni, iste godine više koncentracije bakarnih preparata (bakar – sulfat 0,5%; bakar – oksihlorid 0,5% i bakar – hidroksid 0,5%) kao i niža – bakar – hidroksid 0,3%, kombinacije bakarnih preparata i drugih fungicida (bakar – hidroksid 0,5% + mankozeb 0,25% i bakar – hidroksid 0,5% + fosetil – Al 0,2%) kao i antibiotici imali su najveći kumulativ verovatnoće u oceni 1, a kontrolna varijanta u oceni 3.

U trećoj oceni samo je tretman bakar – hidroksidom 0,5% + fosetil – Al 0,2% imao najveći kumulativ u oceni 1, a kontrolna varijanta sa tretmanom *B. subtilis* 2 l ha⁻¹ u oceni 5. U 2016. godini, prilikom prve ocene tretmani bakar – hidroksid 0,5%; bakar – hidroksid 0,5% + mankozeb 0,25%; bakar – hidroksid 0,5% + fosetil – Al 0,2%; streptomycin – sulfat 0,02% i kasugamicin 2 l ha⁻¹ imali su najveći kumulativ verovatnoće u oceni 1, dok je kontrola imala u oceni 3. Bakarni preparati viših i nižih koncentracija (bakar – sulfat 0,5%; bakar – sulfat 0,25%; bakar – oksihlorid 0,5%; bakar – oksihlorid 0,3%; bakar – hidroksid 0,3%) imali su isti kumulativ u oceni 2. Tokom druge ocene, kumulativ verovatnoće u oceni 1 imali su tretmani bakar – hidroksid 0,5% + mankozeb 0,25% i bakar – hidroksid 0,5% + fosetil – Al 0,2%. Više koncentracije bakra klasifikovane su u ocenu 2, dok su niže u ocenu 3 kumulativnih verovatnoća, i kontrolna varijanta u oceni 4. U trećoj oceni samo za tretman bakar – hidroksid 0,5% + mankozeb 0,25% kumulativ verovatnoće je u oceni 1, a kontrolne varijante u oceni 6. Kumulativ verovatnoće za više koncentracije bakra je u oceni 3, a za niže koncentracije u oceni 4.

Tab. 35: Poređenje tretmana za parametar kumulativnih verovatnoća za lokalitet Rimske šančeve i Futog

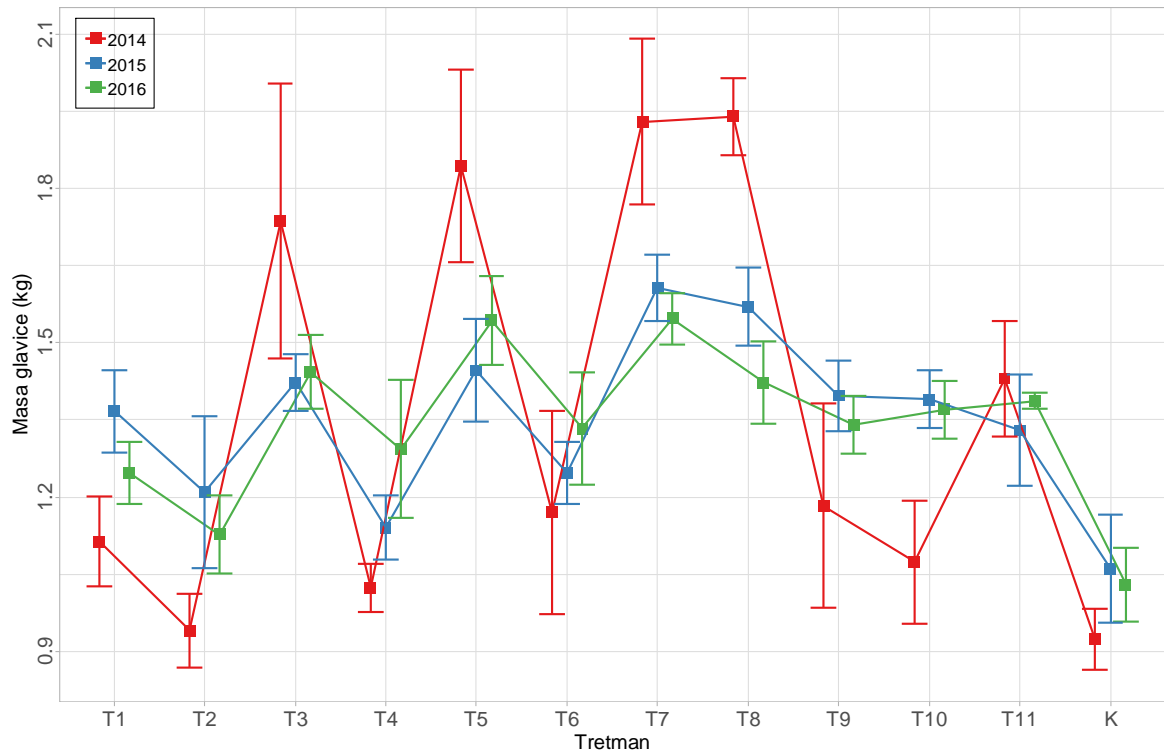
| Godina | Ocena | K | T1 | T2 | T3 | T4 | T5 | T6 | T7 | T8 | T9 | T10 | T11 |
|-----------------------------------|-------|--|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| | | <i>Rimski šančevi – Veštačka inokulacija</i> | | | | | | | | | | | |
| 2014 | I | π_4 | π_3 | π_3 | π_3 | π_3 | π_2 | π_2 | π_2 | π_1 | π_3 | π_2 | π_2 |
| | II | π_6 | π_4 | π_4 | π_4 | π_4 | π_3 | π_4 | π_3 | π_3 | π_4 | π_3 | π_3 |
| | III | π_6 | π_5 | π_5 | π_4 | π_2 | π_4 | π_4 | π_4 | π_4 | π_5 | π_4 | π_4 |
| 2015 | I | π_2 | π_1 | π_2 | π_1 | π_1 | π_1 | π_1 | π_1 | π_1 | π_1 | π_1 | π_1 |
| | II | π_3 | π_1 | π_3 | π_2 | π_3 | π_1 | π_2 | π_1 | π_1 | π_3 | π_1 | π_1 |
| | III | π_4 | π_2 | π_3 | π_3 | π_3 | π_2 | π_3 | π_1 | π_1 | π_3 | π_1 | π_2 |
| 2016 | I | π_4 | π_3 | π_3 | π_3 | π_3 | π_3 | π_3 | π_2 | π_2 | π_3 | π_2 | π_3 |
| | II | π_5 | π_4 | π_4 | π_3 | π_4 | π_3 | π_3 | π_3 | π_2 | π_4 | π_3 | π_3 |
| | III | π_6 | π_4 | π_4 | π_4 | π_4 | π_3 | π_4 | π_3 | π_3 | π_4 | π_4 | π_4 |
| <i>Futog – Spontana infekcija</i> | | | | | | | | | | | | | |
| 2014 | I | π_3 | π_1 | π_2 | π_1 | π_2 | π_1 | π_2 | π_1 | π_1 | π_2 | π_1 | π_1 |
| | II | π_4 | π_2 | π_3 | π_2 | π_3 | π_2 | π_2 | π_1 | π_1 | π_3 | π_3 | π_2 |
| | III | π_5 | π_3 | π_4 | π_3 | π_3 | π_3 | π_3 | π_1 | π_1 | π_4 | π_3 | π_3 |
| 2015 | I | π_2 | π_1 | π_1 | π_1 | π_1 | π_1 | π_1 | π_1 | π_1 | π_1 | π_1 | π_1 |
| | II | π_3 | π_1 | π_3 | π_1 | π_2 | π_1 | π_1 | π_1 | π_1 | π_3 | π_1 | π_1 |
| | III | π_5 | π_3 | π_4 | π_3 | π_3 | π_2 | π_3 | π_2 | π_1 | π_5 | π_2 | π_3 |
| 2016 | I | π_3 | π_2 | π_2 | π_2 | π_2 | π_1 | π_2 | π_1 | π_1 | π_2 | π_1 | π_1 |
| | II | π_4 | π_2 | π_3 | π_2 | π_3 | π_2 | π_3 | π_1 | π_1 | π_4 | π_3 | π_3 |
| | III | π_6 | π_3 | π_4 | π_3 | π_4 | π_3 | π_4 | π_1 | π_2 | π_5 | π_3 | π_4 |

7. 16. 2. Uticaj primenjenih baktericida na masu glavice kupusa

Poređenjem sve tri godine ispitivanja, najveća varijacija mase glavice kupusa zabeležena je u 2014. godini, da bi iste godine bila registrovana i najveća prosečna masa od 1,94 kg, u tretmanu gde je primenjena kombinacija bakar – hidroksid 0,5 % + fosetil – Al 0,2% (T8). Neznatno manja prosečna masa glavice, od 1,93 kg, je zabeležena iste godine u tretmanu sa kombinacijom bakar – hidroksida 0,5% i mankozeba 0,25% (T7), dok je u tretmanu gde je primenjen sam bakar – hidroksid 0,5% (T5) prosečna masa glavice iznosila 1,84 kg. Najmanja masa glavice od 0,94 kg, tokom pomenute godine ispitivanja, je zabeležena u tretmanu u kome je primenjen bakar – sulfat 0,25% (T2). U 2015. godini najveća masa glavice, 1,60 kg zabeležena je u tretmanu T7 (bakar – hidroksid 0,5 % + mankozeb 0,25%), nešto manja masa glavice 1,57 kg je zabeležena u tretmanu T8 (bakar-hidroksid 0,5% + fosetil – Al 0,2%), dok je najmanja 1,14 kg u tretmanu T4 u kome je primenjen sam bakar – oksihlorid 0,3%.

Tokom 2016. godine najveća masa glavice je zabeležena u istom tretmanu kao i predhodne godine i iznosila je 1,54 kg, dok je najmanja 1,29 kg zabeležena u tretmanu sa bakar – oksihloridom 0,3% (T4).

U kontrolnoj varijanti (K) prosečna masa glavice je iznosila 0,92 kg 2014. godine, 1,06 kg 2015. godine i 1,03 kg 2016. godine. (Graf. 5)



Graf. 5: Masa glavice prikazana u odnosu na godine i tretmane

8. DISKUSIJA

Biljne vrste fam. *Brassicaceae* u našoj zemlji imaju dugu tradiciju gajenja, naročito glavičasti kupus koji se na pojedinim lokalitetima gaji duži niz godina. Intenzivnija proizvodnja karfiola, brokolija i kelja je novijeg datuma, kao i povećanje proizvodnih površina pod uljanom repicom. Kvalitet proizvoda i stabilne prinose ograničavaju različiti faktori biotičke i abiotičke prirode. Usled smanjene rotacije useva i sve češće monokulture, na pojedinim lokalitetima nastali su ozbiljni problemi fitopatološke i entomološke prirode.

Posmatrajući fitopatološke probleme na teritoriji Srbije, ustanovljena je pojava patogena iz različitih sistematskih grupa mikroorganizama. Monitoringom je utvrđena najčešća pojava sedam prouzrokovaca mikoza: *Plasmodiophora brassicae*, *Phoma lingam*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans*, *Peronospora parasitica*, *Alternaria brassicae*, *Pythium* spp., *Sclerotinia sclerotiorum*; i dva prouzrokovaca bolesti bakterijske prirode: *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. (Gašić i sar., 2014; Popović i sar., 2013a; Vlajić i sar., 2016; 2017; Todorčić i sar., 2017). Prisustvo prouzrokovaca sudovne bakterioze zabeleženo je na svim lokalitetima gajenja kupusnjača, a intenzitet zaraze na lokalitetima gde se biljke iz ove familije gaje u monokulturi (Futog, Begeč, Despotovo) bio je viši za 30–45% u odnosu na lokalitet gde se ove biljne vrste gaje u sistemu plodoreda. Takođe, znatno viši intenzitet zaraze beleži se na lokalnim populacijama, u odnosu na gajene hibride. Kod populacije kupusa poznate pod nazivom Futoški, zaraza je utvrđena na preko 75% biljaka na jednom polju. Za ovu populaciju je poznata osetljivost prema bakteriji *Xcc*, što je opisano u predhodnim istraživanjima Vlajić i sar. (2016; 2017). Drugi razlog je, verovatno, sve češća upotreba semena koje proizvođači sami umnožavaju, sa značajnim procentom prisustva bakterije (Vlajić i sar., 2019). Prisustvo inokuluma i uslovi spoljašnje sredine imaju najveći značaj za progresiju oboljenja, usled činjenice da penetracija bakterije zavisi od gutacije i bakterijskog umnožavanja (Williams, 1980). U odnosu na period godine, veći intenzitet infekcije na uljanoj repici je zabeležen u proleće u odnosu na jesen, dok je kod kupusa, karfiola, brokolija i kelja – suprotno. Vicente (2004) ukazuje da su proizvodnje ranih i kasnih kupusnjača manje podložne napadu bakterije, u odnosu na proizvodnju srednje ranih kupusnjača, verovatno usled izlaganja višim temperaturama.

Kod nas je u ranoj proizvodnji kupusnjača zastupljeno gajenje hibrida, zbog kraće vegetacije i dužeg perioda jarovizacije, dok u setvenoj strukturi kasne proizvodnje značajno mesto zauzimaju lokalne populacije koje su pogodne i cenjene u preradi.

Sa 23 lokaliteta sakupljeni su listovi sa simptomima koji podsećaju na prouzrokovala bakteriozne prirode. Simptomi kod mladih biljaka zabeleženi su na kotiledonim listovima u obliku svetložutih paga po obodu. Na prvim pravim listovima beležena je pojava klinastog spuštanja nekroze do centralnog nerva, formirajući tako karakterističan simptom u obliku slova „V” koji navode mnogi autori kao tipičan simptom za prouzrokovala sudovne bakterioze (Sutton i Williams, 1970; Williams, 1980; Obradović i sar., 2000a; Vicente i Holub, 2013). Pri jačem intenzitetu zaraze listovi se suše i opadaju a biljka zaostaje u porastu, usled čega izostaje formiranje glavice. Na biljkama u polju čest simptom je rubno žutilo i nekroza u obliku slova „V”. Izolacijom na podlogu od saharoze sa kvaščevim ekstraktom (YDC), dobijene su kolonije žute boje koje morfološki podsećaju na predstavnike roda *Xanthomonas*. Na ovaj način izdvojeno je 82 izolata poreklom sa listova kupusa, karfiola, brokolija, kelja i uljane repice. Žute kolonije na YDC podlozi oko kojih je formirana prosvetljena zona usled trošenja CaCO_3 , nisu izdvajane jer se smatra da su saprofiti poreklom sa biljnog materijala.

Gajenjem lokalnih populacija kupusa i proizvodnje semena bez stručnog nadzora, u periodu 2015–2017. god. sakupljani su uzorci semena iz naturalne i sertifikovane proizvodnje. Ispitivani uzorci semena su bili starosti od 4 do 24 meseca. Bandopadhyay i Chattopadhyay (1986) ukazuju na preživljavanje patogena u naturalnom zaraženom semenu 18 i 28 meseci, a u veštački inokulisanom semenu 13 i 19 meseci, ukoliko se ono skladišti na temperaturi od 10 °C. Navedeni podaci predstavljaju bitnu činjenicu, s obzirom da se seme kupusnjača čuva duži niz godina u kontrolisanim uslovima. Utvrđivanje prisustva bakterija na semenu vršeno je prema ISTA protokolu. Ovim postupkom je dobijeno 20 izolata poreklom sa semena, i to 13 sa naturalnog i 7 sa sertifikovanog. Posebno je zabrinjavajuća činjenica da je bakterija prisutna na semenskim usevima, odnosno na semenu iz sertifikovane proizvodnje. Uvozom zaraženog semena, omogućuje se introdukcija novih patogena i rasa patogena, što potvrđuje Pinto – Ganhão, (1962). Zbog toga je potrebno da međunarodni proizvođači semena kupusnjača testiraju svoje partije semena prema poznatim protokolima, kombinujući biološke testove na biljkama domaćinima, imunoflorescenciju, poluselektivne i selektivne podloge, PCR analizama upotrebom specifičnih prajmera (Franken, 1992b; Berg i sar., 2005; Roberts i

Koenraad, 2006; Asma i sar., 2014). Većina autora smatra seme primarnim izvorom inokuluma vaskularne bakterioze kod kupusnjača (Russel, 1898; Walker, 1952; Randhawa i Schaad, 1984; Schultz i Gabrielson, 1986).

U cilju ispitivanja održavanja patogena u zemljištu i njegovih epidemioloških karakteristika, zemljište je sakupljeno sa pet lokaliteta. Dva uzorka zemljišta su poreklom sa parcela na kojima se kupus gaji treću godinu (Z4) i drugu godinu (Z6) uzastopno, bez međukulture. Osam uzoraka zemljišta je poreklom sa parcela na kojima se kupus i karfiol gaje nakon druge godine i tri uzorka zemljišta na kojima se kupus gaji druge godine, ali kao postrni usev. Iz ovih uzoraka zemljišta dobijeno je 13 izolata. Naši rezultati ukazuju da se bakterija *Xcc* može održavati u zemljištu, što je u skladu sa navodima nekoliko autora (Schaad i White, 1974; Arias i sar., 1996). Na osnovu rezultata opravdano se sumnja da zemljište može biti jedan od izvora inokuluma, isto potvrđuju istraživanja Dane i Shaw (1996), ali i navode da zemljište može služiti kao izvor infekcije ne duže od dva meseca. Kocks i Zadoks (1996) ukazuju da sveži biljni ostaci kupusnjača (stari dve nedelje) imaju veću efikasnost u širenju bakterije nego stariji biljni ostaci (više od 4 meseca). Usled povećanja količine svežih biljnih ostataka kupusnjača u zemljištu, dolazi do sve većeg prisustva bakterije (Kocks, 1996). Ignatov (2006) navodi da se biljke inficiraju kroz oštećen koren, dok Vicente i Holub (2013) tvrde da penetracija putem korenovog sistema bakterije *Xcc* nikada nije dokazana. S obzirom da zemljište predstavlja složen sistem u kome mikroorganizmi imaju značajnu ulogu. Pedosfera pruža najpovoljnije uslove za život mikroorganizama i predstavlja rezervoar za ostale biogeosfere korisnih i patogenih mikroorganizama (Jemcev i Đukić, 2000; Đukić i sar., 2011).

Periodičnim izolacijama iz zemljišta, u periodu od 24 meseca, zabeležena je različita uspešnost izolacija koje ukazuje na prisustvo patogena. Uspešne izolacije su bile u septembru (2015 i 2016), oktobru (2015 i 2016), novembru (2015 i 2016), aprilu, maju i junu (2016), avgustu mesecu (2016 i 2017) i maju i junu (2017 godine). Slične rezultate uspešnosti izolacija iz zemljišta utvrđuju Graham i sar. (1989) za vrstu *X. c. pv. citri*, oni navode da su uspešne izolacije bile 1986. godine u julu, avgustu i oktobru, dok su neuspešne bile u septembru. Isti autori 1987. godine navode uspešne izolacije u maju, junu i oktobru a neuspešne u julu, avgustu i septembru. Izolacije *Xcc* sa parcele u Futogu tokom januara, februara, marta (2016. i 2017), aprila (2017), jula (2016. i 2017), avgusta (2015) i decembra (2015. i 2016. godine) nisu bile uspešne. Uzrok može biti smanjena brojnost populacije *Xcc* u zemljištu usled različitih faktora sredine (temperatura i vlažnost).

Temperatura na 5 cm iznad površine zemljišta tokom januara i decembra 2016. godine bila je $-3,4$ °C odnosno $-5,1$ °C, dok je tokom decembra 2017. godine bila $-9,6$ °C (www.hidmet.gov.rs), što je ekstremno nisko za razvoj bakterije. Niže, ali pozitivne temperature zabeležene su tokom februara i marta, dok su nasuprot tome više temperature tokom jula meseca i zagrevanje površinskog sloja zemljišta takođe negativno uticale na razvoj bakterije. López i sar. (1999) inokulacijom sterilnog i svežeg zemljišta, zaključuju da je smanjenje broja ćelija *Xcc* drastično brže u svežem zemljištu, usled konkurentskih odnosa drugih mikroorganizama, u odnosu na sterilno zemljište gde je faktor konkurencije isključen. Ovu tvrdnju potkrepljuju ranija istraživanja Habte i Alexander (1975) koji predlažu upotrebu protozoa za smanjenje populacije *X. campestris* u zemljištu. Otkrivanje prisustva i perzistencije *Xcc* u zemljištu ima ključnu ulogu u sprečavanju nastanka bolesti i kontroli, kao i smanjenju ekonomskih gubitaka. Ekologija pojedinih biljnih patogena nije razjašnjena do kraja, usled nedostatka osetljivih metoda za praćenje patogena u zemljištu (Schaad i White, 1974).

Provera patogenosti proučavanih izolata je potvrđena na glavičastom kupusu sorte Futoški, upotrebom metode infiltracije bakterijske suspenzije u centralni nerv. Trećeg dana od infiltracije zabeležena je promena boje i pojava vlažnih pega, da bi sedmog dana bila uočljiva izrazita pojava razmekšavanja tkiva i simptoma truleži, što potvrđuju i drugi autori (Obradović i Arsenijević, 1999; Obradović i sar., 2000a; Radunović i Balaž, 2012). Izolati poreklom sa uljane repice UR-1, UR-2, UR-3 ispoljili su znatno manje vlažne pege u okviru kojih je tkivo razmekšano. Primenom metode prskanja svih biljaka domaćina, ispitivani izolati su prouzrokovali pojavu simptoma, bez obzira na domaćina od koga su izvorno izolovani, što je u skladu sa istraživanjima Popović i sar. (2019). Prvi simptomi su bili u vidu vodenastih pega, koje su tamnile i spajajući obrazovale lezije sa žutim ivicama. Isti razvoj simptoma navode Fargier i Manceau (2007) primenom prskanja kao metode inokulacije. Izolati poreklom iz zemljišta Z7, Z10, Z13 nisu prouzrokovali simptome na listovima testiranih domaćina primenom metode prskanja, međutim primenom metode infiltracije u centralni nerv, navedeni izolati su prouzrokovali iste simptome kao i drugi ispitivani izolati. Postoji mogućnost da su pomenuti izolati vremenom provedenim u zemljištu smanjili aktivnost T2SS sistema, odnosno smanjili izlučivanje enzima koji su potrebni za razgradnju ćelijskog zida (Vicente i Holub, 2013; Leng i sar., 2019). Međutim, pri mehaničkoj povredi tkiva, bakterija nesmetano prodire i prouzrokuje simptome. Na biljkama koje su inokulisane vodom, do kraja ogleda nisu uočene patološke promene.

Reizolacijom dobijen je 31 reizolat, koji su uključeni u sve testove kao i izolati. Reizolati su na osnovu patogenih, morfoloških, biohemijsko – fizioloških i molekularnih odlika identifikovani kao vrsta *Xcc* i time je završen postupak dokazivanja patogenosti izolata po Kohovim postulatima.

Upotrebom test biljaka duvana i muškatile je proučena pojava hipersenzitivne reakcije, koja je zabeležena kod svih analiziranih izolata nakon 24 časa. Rezultati testa HR ukazuju da se ispitivani izolati nalaze u inkompatibilnom odnosu sa test biljkama duvanom i muškatlom, a razlike u sposobnosti bakterija da prouzrokuju ovu reakciju navodi više istraživača (Klement i sar., 1990; Arsenijević, 1992; 1997; Obradović i sar., 2000a).

Proučavani izolati na MPA podlozi formirali su sitne kolonije, žute boje, dok su na YDC podlozi kolonije krupnije ispučene, sluzaste konzistencije i sjajnog izgleda. Ovakav opis kolonija, tipičan za predstavnike roda *Xanthomonas*, navodi više autora (Lelliot i Stead, 1987; Klement i sar., 1990, Arsenijević 1992; 1997; Obradović i sar., 2000a; Soudi i sar., 2011). Između proučavanih izolata nisu zabeležene bitnije razlike, dok je pomenuti izgled zabeležen kod kontrolnog soja NCPPB 1144.

Utvrđeni razvoj na 37 °C proučavanih izolata je u saglasnosti sa navodima Radunović i Balaž (2012). Isti autori navode odsustvo porasta izolata *Xcc* na podlozi sa 0,02 i 0,1% TTC, što je u skladu sa rezultatima ostvarenim u ovom istraživanju i rezultatima koje navode Popović i sar. (2013b). Ispitivani izolati i referentni soj su pokazali tolerantnost prema 2 i 5% NaCl, dok u YS podlozi sa 7% NaCl nije zabeleženo zamućenje tj. rast, što potvrđuju rezultati Obradović i sar. (2000). Ispitivanjem 57 izolata žutih kolonija iz zemljišta na kojima se gaji kupus, zabeležen je rast samo patogenih izolata *Xcc* u podlozi sa 4% NaCl (Soudi i sar., 2011).

Proučavanjem biohemijsko – fizioloških karakteristika ispitivanih izolata utvrđen je visok stepen homogenosti. Izolati proizvode indol i stvaraju H₂S iz peptona, oksidaza je negativna, katalaza pozitivna, razlažu želatin, hidrolizuju škrob i eskulin. Vauterin i sar. (1995) navode da je reakcija hidrolize skroba bitna diferencijalna odlika većine pripadnika roda *Xanthomonas*, koja može poslužiti za preliminarnu identifikaciju. Kod svih ispitivanih izolata uočena je zona hidrolize skroba, što ukazuje na proizvodnju enzima amilaze, na šta ukazuju istraživanja Maji i Nath (2015). Glukozu metabolišu samo u aerobnim uslovima (oksidativin putem), razlažu citrate i vrše proteolizu mleka. Kod ispitivanih izolata utvrđeno je odsustvo redukujućih supstanci, jer je negativna reakcija

redukcije nitrata u nitrite. Kiselinu iz ugljenih hidrata stvaraju iz: arabinoze, celobioze, trehaloze, glukoze, galaktoze, laktoze, manoze, saharoze i dekstrina. Ovakve rezultate biohemijско – fizioloških reakcija potvrđuju i drugi autori (Lelliott i Stead, 1987; Arsenijević, 1992, 1997; Schaad i sar., 2001; Radunović i Balaž, 2012; Popović i sar., 2013b; Roohie i Umesha, 2013).

Primenom DAS – ELISA testa, utvrđena je antigena uniformnost 128 izolata, 34 reizolata i referentnog soja NCPPB 1144, što je osnov za identifikaciju bakterija serološkim putem, imajući u vidu da je cilj dokazivanje zajedničkih antigenskih struktura koje su uslovljene hemijskom građom (Arsenijević. 1997). Kod *X. vesicatoria* (soja KFB 29) i *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (soj KBNS 94) utvrđena je negativna reakcija. Radunović i Balaž (2012) navode serološku metodu kao brzu i preciznu u identifikaciji *Xcc*, dok Schaad i sar. (2001) kao prednost te metode navode smanjenje vremena potrebnog za identifikaciju bakterija, i mogućnost opservacije većeg broja uzoraka. Usled upotrebe poliklonalnih seruma, ovaj vid identifikacije se ne može smatrati dovoljno pouzdanim, što potvrđuju i navodi Franken (1992a).

U cilju identifikacije izolata bakterija poreklom sa različitih kupusnjača ispitane su fenotipske, serološke i genotipske karakteristike. Opšte metode za detekciju biljnih patogena, koje se zasnivaju na izolaciji bakterije upotrebom selektivnih podloga i serološkim tehnikama, dovoljno su pouzdane za rutinsko otkrivanje. U poređenju sa molekularnim metodama identifikacije, nedostatak ovih metoda je duže vremensko čekanje rezultata, prisustvo drugih organizama koji vrše supresiju razvoja ciljanog organizma ili manja osetljivost ELISA testa (Park i sar., 2004). Zbog povećane distribucije semenskog materijala po različitim zemljama sveta, ukazala se potreba za razvojem brzih i pouzdanih protokola za detekciju i identifikaciju patogena na semenu. Danas su razvijene brojne DNK probe i specifični prajmeri za veliki broj fitopatogenih bakterija, uključujući vrste roda *Xanthomonas* (Rasmussen i Reeves, 1992; Leite i sar., 1994).

Primenom PCR para prajmera DLH 120/125, kod svih proučavanih izolata i kontrolnog soja NCPPB 1144 detektovan je fragment veličine 619 bp koji odgovara *hprF* genu. Park i sar. (2004) navode da su sekvence *hprF* gena među vrstama roda *Xanthomonas* visoko konzervativne. Navedeni gen je omogućio pouzdanu detekciju *X. campestris* patovara primenom PCR tehnika. Avirulentnoj grupi *Xanthomonas* vrsta koja može da naseljava porodicu kupusnjača nedostaje *hprF* gen, pa se ovim parom prajmera mogu odvojiti patogene od avirulentnih (saprofitnih) vrsta iz pomenute familije (Berg i sar., 2005). Prema

Singh i sar. (2011), upotrebom para prajmera DLH 120/125 na svim izolatima *Xcc* poreklom sa kupusnjača amplifikovan je fragment veličine 619 bp, dok amplifikacija nije zabeležena kod sojeva *X. oryzae* pv. *oryzae* i *X. axonopodis* pv. *citri*.

S obzirom da je predhodno izvršena provera patogenosti, kod svih ispitivanih izolata utvrđeno je prisustvo specifičnog *hprF* gena, osim kod izolata koji pripadaju drugim bakterijskim vrstama *X. vesicatoria* (soj KFB 29) i drugim rodovima *E. coli* (ATCC 25922) i *P. s.* pv. *syringae* (soj KBNS 94). Fargier i Manceau (2007) navode da parovi prajmera Zup 2309/2310 koje su dizajnirali Rijlaarsdam i sar. (2004), imaju uzan opseg detekcije ako se samostalno koriste, jer ciljana DNK sekvenca nije visoko specifična za vrstu *Xcc*. Isti autori navode da upotreba para prajmera Zup 2309/2310 i kombinovanje sa drugim setovima prajmera može pomoći u brzjoj identifikaciji *X. campestris* vrsta. Peňázová i sar. (2015) navode primenu prajmera DLH 120/125 za određivanje vrste *X. campestris*, dok je za potrebe utvrđivanja patogenog varijeteta potrebno kombinovanje sa prajmerima Zup 2309/2310, navodeći da je pouzdanost rezultata u 99,6 % slučajeva.

U skladu sa ISTA (2013/7-019a) protokolom, u identifikaciji sakupljenih izolata primenom m-PCR korišćeni su setovi prajmera DLH 120/125 i Zup 2309/2310 koji su rezultirali amplifikacijom fragmenata veličine 619 bp i 370 bp kod svih ispitivanih izolata i referentnog soja NCPPB 1144. Kod drugih bakterijskih vrsta i rodova primenom pomenutih prajmera amplifikovan je jedan (*X. vesicatoria* KFB 29; *P. s.* pv. *syringae* – KBNS 94) fragment veličine od 370 bp ili više (*E. coli* – ATCC 25922) fragmenata različitih molekulskih masa, od kojih jedan odgovara predhodno pomenutoj veličini, dok ostali ne odgovaraju.

Proučavanje 16S rRNA i integrisanog regiona 16S–23S obično se koristi za identifikaciju *Xcc* sojeva do nivoa roda i vrsta (Rathaur i sar., 2015). Poređenjem sekvenci 16S rRNK gena proučavanih izolata, sa sekvencama koje se nalaze u NCBI bazi, utvrđen je visok stepen identičnosti (100%) sa sojem poreklom iz Francuske (PDD-33b-3), sojem iz Engleske (NCPPB1144) i sojem nepoznatog porekla (XJGY222). Singh i sar. (2016) navode 99,9 % indeks sličnosti sojeva iz Indije između sebe i soja ATCC 33913 poreklom iz Velike Britanije. Popović i sar. (2013), takođe su utvrdili sličnost između 16S RNA sekvenci između sojeva poreklom iz Srbije i soja ATCC 33913 poreklom iz Velike Britanije. Na osnovu ovih saznanja, može se pretpostaviti da su sojevi bakterije preneti između zemalja zahvaljujući distribuciji semena. Proučavanjem izolata *Xcc*8004 gajenog na različitim podlogama, je utvrđeno da su geni 16S rRNA najnestabilniji u pomenutom

soju, verovatno zbog činjenice da rRNA čini 85–90% ukupne RNA u ćelijama (Yan i sar., 2019). Međutim, je utvrđeno da se i drugi geni rRNA, uključujući 28S rRNA, 30S rRNA, 60S rRNA, ne preporučuju kao kontrole, jer su pokazivali diferencijalnu ekspresiju pod različitim uslovima (Tang i sar., 2007).

U cilju utvrđivanja *in vitro* osetljivosti na bakarne preparate, odabrana su jedinjenja bakra: sulfat, hidroksid i oksihlorid koji se u proizvodnji koriste za kontrolu bakterijskih oboljenja. Bakar i derivati bakra pokazali su dobru efikasnost protiv mnogih fitopatogenih bakterija (Singh i sar., 2005; Canteros, 2004; Graham i Leite, 2004; Das i Shyam, 2003; Dixon i sar., 2000; Helling i sar., 2000). U ovom istraživanju koncentracija 300 ppm testiranih jedinjenja bakra pokazala se kao inhibitorna za sve ispitivane izolate, dok je koncentracija od 100 ppm omogućila razvoj svih izolata. Kod koncentracije 200 ppm utvrđen je različit stepen inhibicije u odnosu na ispitivano jedinjenje bakra. Tako je kod bakar (II) – sulfata zabeležen razvoj 42 izolata, kod bakar – hidroksida 49 i bakar – oksihlorida 60 izolata. Na osnovu rezultata zaključeno je da bakar (II) – sulfat ima nešto veće inhibitorno delovanje u odnosu na bakar – hidroksid i bakar – oksihlorid. Međutim, bakar (II) – sulfat u proizvodnji se ređe koristi zbog čestog fitotoksičnog delovanja, već se koristi u smeši sa kalcijum – hidroksidom koja se naziva Bordovska čorba (Janjić, 2009). Znatno manja upotreba sulfatnog jedinjenja bakra u odnosu na hidroksilni i oksihloridni, može biti uzrok veće osetljivosti bakterije. Takođe, izolati (UR-1; UR-2; UR-3) poreklom sa useva u kojima se bakarni preparati ne primenjuju, imaju veću osetljivost u odnosu na izolate (KS-7; KS-8; KS-9) poreklom sa useva u kojima se bakarni preparati primenjuju nekoliko puta u toku iste vegetacije. Proučavajući osetljivost *Xcc* izolata poreklom sa kupusa, kelja i karfiola Obradović i sar. (2000a) navode izostanak razvoja izolata pri koncentraciji pomenute supstance od 200 mg/l rastvora. Na osnovu ovih rezultata, može se zaključiti da je u periodu 2000–2014. godine došlo do pojave rezistentnosti prema bakru, što može dalje da predstavlja ozbiljan problem u strategiji kontrole bakterioza. Inhibitorna koncentracija streptomycin – sulfata za sve ispitivane izolate iznosila je 25 ppm, dok je koncentracija 10 ppm bila inhibitorna za razvoj 45 izolata.

Specifičnost 15 izolata bakteriofaga i spektar domaćina proučeni su upotrebom 20 izolata *Xcc*, referentnog soja *Xcc* NCPPB 1144, *X. vesicatoria* (soj KFB 29) i *P. s. pv. syringae* (soj KBNS 94). Kod svih izolata bakteriofaga utvrđeno je lipolitičko delovanje samo na izolate *Xcc* i referentni soj NCPPB 1144. Prema drugim sojevima uključenim u ispitivanje aktivnost nije utvrđena. Weiss i sar. (1994) testiranjem 15 uzoraka zemljišta sa

12 lokacija u Merilendu, potvrdili su prisustvo *Xanthomonas* faga na 5 lokacija. Isti autori navode da *Xanthomonas* fagi iz zemljišta imaju često širok krug domaćina, što nije u saglasnosti sa našim rezultatima. Činjenica da su izolovani bakteriofagi u našim istraživanjima specifični prema vrsti *Xcc*, ukazuje na mogućnost njihove upotrebe u identifikaciji pomenutog patogena. Upotrebu bakteriofaga u cilju identifikacije biljnih patogena navodi više autora (Cupples, 1984; Klement i sar., 1990; Arsenijević, 1997; Obradović, 2009; Zlatković, 2018). Renu i sar. (2017) proučavali su 31 izolat bakteriofaga, poreklom iz zemljišta, vode i sa lista u Indiji, koji su pokazali jasne zone lipolitičke aktivnosti prema izolatima *Xcc*. Autori navode da su izolati većinom poreklom iz zemljišta, zbog poteškoća u izolaciji sa lista zbog brze inaktivacije bakteriofaga usled UV svetlosti i isušivanja. Ove navode potvrđuju i drugi istraživači u različitim studijama (Flaherty i sar., 2001; Gill i sar., 2003; Obradović, 2009; Gašić i sar., 2011). S obzirom da su ispitivani izolati *Xcc* pokazali osetljivost prema izolatima bakteriofaga, opravdano se smatra da ovi bakteriofagi mogu biti iskorišćeni u cilju biološke kontrole. Ograničenja šire primene u poljoprivrednoj proizvodnji nastaju usled negativnog uticaja spoljašnje sredine (Obradović, 2009), ali dodavanjem obranog mleka i saharoze utvrđeno je značajno povećanje efikasnosti bakteriofaga (Obradović i sar., 2004). Isto navode Balogh i sar. (2003), potvrđujući da mešavina bakteriofaga i obranog mleka sa saharozom, pokazuje dobru efikasnost u suzbijanju pegavosti paradajza na Floridi.

Uslovi spoljašnje sredine su od najveće važnosti za progresiju bakterije, usled činjenice da penetracija bakterije zavisi od gutacije i bakterijskog umnožavanja. Infekcija može biti latentna ukoliko su uslovi nepogodni za razvoj. U polju, infekcija nastaje kada su visoke temperature i visoka vlažnost vazduha, što je i ustanovljeno u tropskim, suptropskim i humidnim regionima (Williams, 1980). U uslovima visoke vlažnosti, biljke otvaraju stome i hidatode da bi održale homeostazu vode, usled čega se stvara slobodan put za prodor bakterije u biljku. Gutaciona tečnost koja izlazi iz hidatoda, lako se kontaminira bakterijama; mineralne materije, ugljeni hidrati i aminokiseline i pH 7,0 čine ga idealnim sredstvom za rast *Xcc* (Kohl i van der Volf, 2004). Najviše vrednosti AUDPC su dobijene na temperaturi od 28 °C, što je u saglasnosti sa rezultatima koje navodi Machaba (1998). Ignatov (2006) navodi 24–30 °C kao optimalnu temperaturu za razvoj patogena, dok Schultz i Gabrielson (1986) ukazuju da se simptomi bolesti ne pojavljuju ukoliko su temperature ispod 18–20 °C. Rezultati naših istraživanja beleže pojavu simptoma na temperaturi od 16 °C, dok je najslabija pojava simptoma zabeležena na temperaturi od 36

°C. Na osnovu dobijenih rezultata i agroekoloških uslova tokom ispitivanih godina, može se zaključiti da se najizraženija pojava simptoma na kupusnjačama očekuje tokom maja i juna, a zatim u avgustu, septembru i oktobru. Shodno tome, u navedenom periodu može da se preporuči i okvirni početak primene zaštite upotrebom hemijskih i bioloških sredstava.

Tehnologija zaštite kupusnjača u našim uslovima, bazira se na dominantnoj primeni hemijskih mera kontrole bolesti, štetočina i korova. U proizvodnji glavičastog kupusa, karfiola, kelja, brokolija dominira primena fungicida i insekticida, dok u proizvodnji uljane repice dominira primena insekticida i herbicida. Hemijska kontrola bakterioza biljaka trenutno se zasniva na primeni bakarnih jedinjenja i antibiotika (Zlatković, 2018). S obzirom da su antibiotici u našoj zemlji zakonom zabranjeni (Obradović i Ivanović, 2007) preparati na bazi bakra zauzimaju značajno mesto. Međutim razvojem rezistentnih sojeva njihova efikasnost opada. Ispitvanjem različitih oblika bakra u kontroli *Xcc*, utvrđen je različiti stepen intenziteta zaraze u primenjenim tretmanima. Najmanji intenzitet zaraze yabeležen je u tretmanu gde je primenjen bakar – hidroksid i to viša koncentracija, u odnosu na bakar – sulfat i oksihlorid. Takođe, kombinacija bakra sa ditiokarbamatima i fosfonata smanjila je intenzitet zaraze na kupusu u uslovima veštačke inokulacije ali i prirodne zaraze. Hausbeck i sar. (2000) utvrđuju da upotreba bakar hidroksida i mankozeba inhibira razvoj bakterijskog raka paradajza *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, što je i potvrđeno sinergističkim efektom, jer odvojena primena mankozeba nije smanjila populaciju i širenje date bakterije. Drugi autori navode da bakar – hidroksid u kombinaciji sa mankozebom poboljšava kontrolu bakterijskih oboljenja i smanjuje epifitociju populacije bakterija, u poređenju sa upotrebom samog bakra (Jones i sar., 1991; Marco i Stall, 1983).

Bakar se većinom koristi kao protektivna mera, u cilju smanjenja inokuluma na biljnom tkivu čime se smanjuje infekcija. Efikasan je kao sredstvo za zaštitu bilja samo ako je prisutan na površini biljke. Postoje brojni agensi koji indukuju otpornost biljaka. Među njima su i soli fosfata (Walters i sar., 2005). Mešanjem fosetil – Al sa bakarnim preparatima u našim istraživanjima dobijena je veća efikasnost bakar – hidroksida, u odnosu na samostalnu primenu. Vrednosti indeksa oboljenja, u tretmanu gde je primenjena pomenuta kombinacija, bila je manja u uslovima spontane infekcije u odnosu na veštačku inokulaciju. Takođe manje vrednosti indeksa oboljenja su zabeležene i 14 dana nakon poslednje primene preparata. Primena *B. subtilis* u našim istraživanjima nije dala zadovoljavajuće rezultate. Međutim u pojedinim godinama utvrđene su značajne statističke

razlike u poređenju ovog tretmana sa kontrolnom varijantom. Mguni (1996) navodi da primena *Bacillus* spp. smanjuje učestalost crne truleži na kupusima na kojima je pomenuti biološki agens primenjen. Razlog slabije efikasnosti verovatno je posledica kratkog vremena između primene agensa i veštačke inokulacije bakterijom *Xcc*, što isto važi i za uslove spontane infekcije. Da bi agens ispoljio pun efekat, mora biti potpuno razvijen na biljnom tkivu kako bi mogao konkurisati patogenu za hranu i prostor. S obzirom da je *Xcc* vaskularni patogen, upotreba epifitnih bakterija kao bioloških agenasa ima ograničenu efikasnost. Wulff i sar. (2002) predlažu upotrebu epiendofitnih bakterija u biološkoj kontroli, dok drugi autor navodi da su ove bakterije otpornije na UV zračenja, promene temperature i vlažnosti (Chen i sar., 1995).

Rezultati istraživanja uticaja primenjenih baktericida na masu glavice ukazuju da kombinacije preparata bakar – hidroksid + fosetil – aluminijum i bakar – hidroksid + mankozeb imaju pozitivno dejstvo na masu glavice u poređenju sa drugim baktericidima. Najmanja masa glavice kod posmatranih baktericida je zabeležena kod bakar – sulfata, što može imati veze sa fitotoksičnošću pomenutog jedinjenja. Bakar je potreban biljkama u malim količinama, jer nedostatak dovodi do smanjena prinosa, dok suvišak inhibira različite biološke procese (Monnet i sar., 2001). Prema istraživanju Tomazela i sar. (2006) bakar u biljkama utiče na otpornost prema različitim patogenima.

Na osnovu rezultata istraživanja može se zaključiti da je bakterija *Xcc* raširena na teritoriji Srbije, naročito na lokalitetima tradicionalnog gajenja kupusa, gde pričinjava značajne štete. Prenosi se semenom i saznanja da se zadržava u zemljištu predstavljaju bitnu kariku u epidemiološkom lancu. Zbog toga je neophodna upotreba deklarisanog semena i plodored kao osnovni vid borbe. Strategija zaštite kupusnjača treba da se zasniva na integralnom konceptu, s obzirom da nema dovoljno preparata registrovanih za kontrolu patogena. Neophodno je nastaviti istraživanja na praćenju osetljivosti bakterije prema bakarnim preparatima, proceniti osetljivost gajenog sortimenta i utvrditi rasni sastav patogena.

9. ZAKLJUČAK

Na osnovu rezultata višegodišnjih istraživanja, izvedeni su sledeći zaključci:

- ✓ Prouzrokovatelj sudovne bakterioze kupusnjača se pojavljuje na proizvodnim parcelama u agroekološkim uslovima Republike Srbije svake godine u većem ili manjem intenzitetu. Na mestima tradicionalnog gajenja kupusa, gajenjem osetljivog genotipa može se očekivati intenzitet zaraze preko 75%.
- ✓ Izolacijom iz listova, sa semena i zemljišta, sakupljeno je 128 izolata, koji su na osnovu rezultata provere patogenosti, odgajivačkih i biohemijsko – fizioloških odlika preliminarno identifikovani kao vrsta *X. c. pv. campestris*.
- ✓ Prisustvo bakterije na naturalnom i sertifikovanom semena kupusnjača, ukazuje na značaj semena u epidemiologiji *Xcc* u našim agroekološkim uslovima.
- ✓ Periodičnim izolacijama *Xcc* iz zemljišta utvrđeno je da bakterija ima sposobnost održavanja u zemljištu sa izraženim fluktuacijama, u zavisnosti od temperatura koja se pojavljuje kao ograničavajući faktor smanjenja populacije.
- ✓ Primenom DAS-ELISA testa potvrđeno je da proučavani izolati *Xcc* prisutni na kupusnjačama u našoj zemlji poseduju zajedničke antigene karakteristike kao i kontrolni soj NCPPB 1144.
- ✓ Primenom molekularnih metoda mPCR-a, izvedenog setom prajmera, Zup 2309/Zup 2310 (370 bp) kao i DLH 120/DLH 125 (619 bp), kod svih proučavanih izolata i reizolata, kao i kontrolnog referentnog soja NCPPB 1144, amplifikovani su fragmenti nukleinskih kiselina veličine 370 i 619 bp, što ukazuje na pripadnost vrsti *X. c. pv. campestris*.
- ✓ Utvrđivanjem i proučavanjem sekvenci 16S rRNK gena, i njihovim poređenjem sa sekvencama iz NCBI baze, utvrđen je visok stepen sličnosti (100%) sa drugim sojevima *Xcc*, poreklom sa drugih geografskih prostora i domaćina.
- ✓ Inhibitorna koncentracija svih ispitivanih oblika bakra (sulfatni, hloridni, oksihloridni) za populaciju *Xcc* prisutnu na kupusnjačama u Srbiji iznosi 300 ppm. U pogledu osetljivosti prema streptomycin – sulfatu, pri koncentracijama od 25 i 50 ppm ne dolazi do razvoja izolata *Xcc*.

-
- ✓ Prisustvo bakteriofaga potvrđeno je izolacijom iz zemljišta u neposrednoj blizini zaraženih biljaka. Ispitivani izolati bakteriofaga pokazali su lipolitičku aktivnost samo prema izolatima *Xcc*, dok prema kontrolnim sojevima KFB 29 (*X. vesicatoria*) i KBNS 94 (*P. s. pv. syringae*) aktivnost nije zabeležena.
 - ✓ Na osnovu rezultata AUDPC vrednosti utvrđena je najpovoljnija temperatura za razvoj *Xcc* i ona iznosi 28 °C, a simptomi postaju jasno vidljivi u temperaturnom intervalu od 24 do 32 °C, dok temperature od 16 i 36 °C dovode do slabog razvoja patogena i slabog ispoljavanja simptoma.
 - ✓ Ispitivanjem efikasnosti baktericida primenom veštačke inokulacije *Xcc*, najmanji intenzitet zaraze je zabeležen u kombinacijama bakar – hidroksid 0,5% + fosetil – Al 0,2% i bakar – hidroksid 0,5% + mankozeb 0,25%. Isti rezultati su dobijeni i u uslovima prirodne infekcije. Kombinovanje bakarnih preparata sa mankozebom i fosetil – Al, uticalo je na povećanje efikasnosti. Primena kombinacija pomenutih preparata usporava nastajanje rezistencije na bakarne preparate.
 - ✓ Navedeni podaci, ostvareni u istraživanju, ukazuju na pozitivan efekat preparata sa najvišom efikasnošću na prosečnu masu glavice. Najveća prosečna masa glavice od 1,94 kg ostvarena je u 2014. godini u tretmanu sa bakar – hidroksidom 0,5% + fosetil – Al 0,2%. U 2015. i 2016. godini u tretmanu sa bakar – hidroksidom 0,5% + mankozeb 0,25% utvrđene su najveće prosečne mase glavica od 1,60 kg, odnosno 1,54 kg.

10. LITERATURA

1. Adams M.H. (1959): Bacteriophages. Interscience, New York.
2. Adaskaveg J.E., Hine R.B. (1985): Copper tolerance and zinc sensitivity of Mexican strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* causal agent of bacterial spot of pepper. *Plant Disease*, 69: 993 – 996.
3. Agrios G.N. (2005): *Plant Pathology*. 5th edition, Elsevier Academic Press, Burlington, Massachusetts, USA.
4. Akhtar J., Singh B., Kandan A., Kumar P., Chand D., Maurya A.K., Dubey S.C. (2017): Interception of pathogens during quarantine processing: an effort towards safe introduction of oilseed and vegetable Brassicas germplasm in Indian. *Journal Oilseed Brassica*, 8: 120 – 130.
5. Alabouvette C., Olivain C., Steinberg C. (2006): Biological control of plant diseases: the European situation. *European Journal of Plant Pathology*, 114: 329 – 341.
6. Al-Shehbaz I.A., Beilstein M.A., Kellogg, E.A. (2006): Systematics and phylogeny of the Brassicaceae (Cruciferae): an overview. *Plant Systematics and Evolution*, 259: 89 – 120.
7. Alvarez A.M., Benedict A.A., Mizumoto C.Y., Hunter J.E., Gabriel D.W. (1994): Serological, pathological and genetic diversity among strains of *Xanthomonas campestris* infecting crucifers. *Phytopathology*, 84: 1449 – 1457.
8. Alvarez A.M. (2000) Black rot of crucifers. In: Slusarenko A., Fraser R.S.S., van Loon L.C. (eds.) *Mechanisms of Resistance to Plant Diseases*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 21 – 52.
9. Al-Shehbaz I.A. (2012): A generic and tribal synopsis of the *Brassicaceae* (Cruciferae). *Taxon*, 61: 931 – 954.
10. Aljanabi S.M., Martinez I. (1997): Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic acids research* 25 (22): 4692 – 4693.
11. Anonimys: <https://www.apsnet.org/edcenter/disimpactmngmnt/topc/EcologyAndEpidemiologyInR/DiseaseProgress/Pages/audpc.aspx>
12. Aremu B.R., Babalola O.O. (2015): Classification and Taxonomy of Vegetable Macergens. *Frontiers in Microbiology*, 6: 1361.

13. Arias R.S., Mochizuki G., Fukui R., Alvarez A.M. (1996): Most probable number method to enumerate bioluminescent *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 28: 1725 – 1728.
14. Arsenijević M. (1992): Fitopatogene bakterije. Naučna knjiga, Beograd
15. Arsenijević M., Jovanović O. (1995): Nov postupak razlikovanja bakterija po Gramu. *Zaštita bilja*, 211: 57 – 62.
16. Arsenijević M., Obradović A. (1996): Occurrence of bacterial wilt and soft rot of seed cabbage plants (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.) in Yugoslavia. *Journal of Phytopathology*, 144: 315 – 319.
17. Arsenijević M. (1997): Bakterioze biljaka. S-Print, Novi Sad.
18. Assis S.M.P., Mariano R.L.R., Michereff S.J., Coelho R.S.B. (1997): Antagonism of *Bacillus* spp. to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* on cabbage phyloplane in the field. *Proceedings of the Fourth International Workshop on Plant Growth-Promoting Rhizobacteria – Present Status and Future Prospects*. Japan : OECD, 345 – 348.
19. Assis S.M.P., Mariano R.L.R., Michereff S.J., Coelho R.S.B. (1996): Biocontrol of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* on kale with *Bacillus* spp. and endophytic bacteria. In: T. Wenhua et al. (Eds.). *Advances in Biological Control of Plant Diseases*. Beijing, 347 – 353.
20. Asma M., Koenraadt H.M.S., Politikou A. (2014): Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* on *Brassica* spp. disinfested / disinfected seed with grinding. In: *International Rules for Seed Testing*, 1 – 14.
21. Bain D.C. (1955): Resistance of cabbage to black rot. *Phytopathology*, 45: 35 – 37.
22. Baker K.F., Snyder W.C. (1950): Plant diseases: restrictive effect of California climate on some vegetable, flower, grain diseases. *California Agriculture*, 8: 15 – 16.
23. Balaž J. (1988): Pojava novih i nekih manje poznatih bakterioza u Jugoslaviji tokom 1987. godine. XII Seminar iz zaštite bilja Vojvodine, Arandjelovac, 58 – 60.
24. Balaž J. (1989): Neki aktuelni problemi bakterioza povrća i mogućnosti njihovog suzbijanja. Seminar iz Zaštite bilja Vojvodine (XIII), 16-19 januar, Arandjelovac, Rezime referata.
25. Balaž J. (1991): Ispitivanje mogućnosti hemijskog suzbijanja *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (Smith) Dye parazita pasulja. *Pesticidi*, 6: 171 – 173.
26. Balaž J. (2001): Bakterioze kupusnjača. *Biljni lekar*, 29 (6): 555 – 560.

27. Balaž J. (2005): Seme kao izvor primarnog inokuluma za nastanak bakterioza povrća i integrisane mere zaštite. *Pesticidi i fitomedicina*, 20 (2): 79 – 88.
28. Balogh B., Jones J., Momol M.T., Olson S.M., Obradović A., King B., Jackson L.E. (2003): Improved efficacy of newly formulated bacteriophages for management of bacterial spot on tomato. *Plant Disease*, 87: 949 – 954.
29. Balogh B., Jones J., Iriarte F., Momol M. (2010): Phage Therapy for Plant Disease Control. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 11 (1): 48 – 57.
30. Bandyopadhyay S., Chattopadhyay S.B. (1986): Survival of *Xanthomonas campestris* in the host tissue. *Indian Journal Mycology Resrch*, 24 (1): 57 – 63.
31. Berg T., Tesoriero L., Hailstones D.L. (2005): PCR-based detection of *Xanthomonas campestris* pathovars in Brassica seed. *Plant Pathology*, 54: 416 – 427.
32. Bhide V.P. (1948): A comparative study of some wilt producing phytopathogenic bacteria. *Indian phytopathology*, 1: 70 – 91.
33. Bila J., Mortensen C N., Andresen M., Vicente J.G., Wulff E.G. (2013): *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* race 1 is the main causal agent of black rot of Brassicas in Southern Mozambique. *African Journal of Biotechnology*, 12 (6): 602 – 610.
34. Blackford F.W. (1944): Black rot and black leg of cabbage and cauliflower. *Queensland Agricultural Journal*, 59: 287 – 289.
35. Boch J., Bonas U. (2010): *Xanthomonas* AvrBs3 family-type III effectors: discovery and function. *Annual Review of Phytopathology*, 48: 419 – 436.
36. Bonas U., Schulte R., Fenselau S., Minsavage G.V., Staskawicz B.J., Stall R.E. (1991): Isolation of a gene cluster from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that determines pathogenicity and the hypersensitive response on pepper and tomato. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 4: 81 – 88.
37. Boone D.R., Castenholz R.W., Brenner D.J., et al. (2005): *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The Proteobacteria*. – Springer, New York, 2: 1106.
38. Bora L.C., Minku D., Das M. (2002): Occurrence of bacterial wilt of castor, repeseed, ginger and spinach in Assam. *Plant Disease Research*, 17: 107 – 110.
39. Bradbury J.F. (1986): *Xanthomonas* Dowson 1939. In: *Guide to Plant Pathogenic Bacteria*. CAB International Mycological Institute, Slough, England, 198 – 260.
40. Bubeck D.M., Goodman M.M., Beavis W.D., Grant D. (1993): Quantitative loci controlling resistance to gray leaf spot in maize. *Crop Science*, 33: 838 – 847.

41. Burkholder W. H. (1930): The genus *Phytomonas*. *Phytopathology*, 20: 1 – 23.
42. Burkholder W. H. (1939): The taxonomy and nomenclature of the phytopathogenic bacteria. *Phytopathology*, 29: 128 – 136.
43. Büttner D., Nennstiel D., Klüsener B., Bonas U. (2002): Functional analysis of HrpF, a putative type III translocon protein from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Journal of Bacteriology*, 184: 2389 – 2398.
44. Büttner D., He Y.S. (2009): Type III Protein Secretion in Plant Pathogenic Bacteria. *Plant Physiology*, 150: 1656 – 1664.
45. Büttner D., Bonas U. (2010): Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. *FEMS Microbiology Reviews*, 34 (2): 107 – 133.
46. Canaday C.H., Wyatt J.E., Mullins J.A. (1991): Resistance in broccoli to bacterial soft rot caused by *Pseudomonas marginalis* and fluorescent *Pseudomonas* species. *Plant Disease*, 75: 715 – 720.
47. Canteros B.I. (2004): Management of citrus canker in Argentina. A review. *Proc. Intn. Soc. Citric. 10th International Citrus Congress, Agadir, Morocco*, 90.
48. Caponero A., Iacobellis N.S. (1994): Foci of 'black rot' on cauliflower in Basilicata. *Informatore Agrario*, 50 (25): 67 – 68.
49. Cardone M., Prati M.V., Rocco V., Seggiani M., Senatore A., Vitolo S. (2002): *Brassica carinata* as an Alternative Oil Crop for the Production of Biodiesel in Italy: Engine Performance and Regulated and Unregulated Exhaust Emissions. *Environmental Science & Technology*, 36 (21): 4656 – 4662.
50. Carrijo I.V., Rêgo A.M. (2000): Doenças das brássicas. In: Zambolim L., Vale F.X.R., Costa H. *Controle de doenças de plantas-hortaliças*, 1 – 444.
51. Cartea M.E., Lema M., Francisco M., Velasco P. (2011): Basic information on vegetable Brassica crops. In: Sadowski J., Kole C. (eds.) *Genetics, genomics and breeding of vegetable Brassicas*. Enfield, New Hampshire: Science Publishers, 1 – 33.
52. Catara V., Branca F., Bella P. (1999): Outbreak of 'black rot' of Brassicaceae in Sicily. *Informatore-Fitopatologico*, 49 (1-2): 7 – 10.
53. Chen C., Bauske E.M., Musson G., Rodriguez-Kabana R., Kloepper J.W. (1995): Biological control of *Fusarium* wilt on cotton by use of endophytic bacteria. *Biological Control*, 5: 83 – 91.

-
54. Chidamba L., Bezuidenhout C.C. (2012): Characterization of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* isolates from South Africa using genomic DNA fingerprinting and pathogenicity tests. *European Journal of Plant Pathology*, 133: 811 – 818.
 55. Chitarra L.G., Langerak C.J., Bergervoet J.H.W., van den Bulk R.W. (2002): Detection of the Plant Pathogenic Bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in Seed Extracts of *Brassica* sp. Applying Fluorescent Antibodies and Flow Cytometry. *Cytometry*, 47: 118 – 126.
 56. Choi O., Kim J. (2013): *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* causing soft rot on paprika in Korea. *Journal Phytopathology*, 161: 125 – 127.
 57. Chorin M., Palti J., Mocller S. (1954): Leaf, stem and fruit diseases of vegetables of *Cucurbitaceae*, *Cruciferae*, *Umbelliferae* and *Liliaceae* in Israel. *Sifriath Massadeh*, 5: 75.
 58. Chun O.K., Smith N., Sakagawa A., Lee C.Y. (2004): Antioxidant properties of raw and processed cabbages. *International journal of food sciences and nutrition*, 55 (3): 191 – 199.
 59. Civerolo E.L. (1982): Disease management my cultural practices and environmental control. In: *Phytopathogenic Prokaryotes*, Mount M.S., Lacy G.H. (eds.), Academic Press: New York, 343 – 360.
 60. Clayton E.E. (1925): Second progress report of black rot (*Pseudomonas campestris*) investigations on Long Island; seed infection and seasonal development. *Phytopathology*, 15: 48 – 49.
 61. Cook A.A., Walker J.C., Larson R.H. (1952): Studies on the disease cycle of black rot of crucifers. *Phytopathology*, 42: 162 – 167.
 62. Corzo M., Quiñones M.L., Pauls K.P. (2019): First report of *Xanthomonas campestris* causing black rot of chard in Cuba. *New Disease Reports*, 39: 13
 63. Crosse J.E., Garrett C.M.E. (1963): Studies on the bacteriophage of *Pseudomonas mors-prunorum*, *Ps. syringae* and related organisms. *Journal of Applied Bacteriology* 26: 159 – 177.
 64. Cruz J., Tenreiro R., Cruz L. (2017): Assessment of diversity of *Xanthomonas campestris* pathovars affecting cruciferous plants in Portugal and disclosure of two novel *X. campestris* pv. *campestris* races. *Journal of Plant Pathology*, 99: 403 – 414.

-
65. Cupples D.A. (1984): The use of pathovar-indicative bacteriophage leaf and fruit lesions. *Phytopathology*, 74: 891 – 894.
66. Červenski J., Takač A. (2012): Growing Cabbage As a Double Crop in Serbia. *Ratarstvo i Povrtarstvo*, 49: 75 – 79.
67. Červenski J., Danojević D., Medić – Pap S., Savić A. (2018): Gustina sadnje kasnog kupusa. *Selekcija i semenarstvo*, 24 (2): 26 – 31.
68. Červenski J., Medić-Pap S. (2018): *Proizvodnja kupusa – monografija*. Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad.
69. Čaturilo S. (1952): Štetočine i bolesti biljaka u N.R. Srbiji u 1951. godini. *Zaštita bilja*, 11: 21 – 42.
70. da Silva A.C.R., Ferro J.A., Reinach F.C., Farah C.S., Furlan L.R., Quaggio R.B. et al. (2002): Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature*, 417 (6887): 459 – 463.
71. da Silva F.P., Xavier A.D.S., Bruckner F.P., de Rezende R.R., Vidigal P.M.P., Alfenas-Zerbini P. (2019): Biological and molecular characterization of a bacteriophage infecting *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, isolated from brassica fields. *Archives of Virology*, 164 (7): 1857 – 1862.
72. Dane F., Shaw J.J. (1996): Survival and persistence of bioluminescent *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* on host and non-host plants in the field environment. *Journal of Applied Bacteriology*, 80: 73 – 80.
73. Das A.K., Shyam S. (2003): Integration of chemicals and cultural practices for management of bacterial canker (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*) in acid lime (*Citrus aurantifolia*). *Indian Journal of Agricultural Sciences*, 73 (10): 570 – 571.
74. de Carvalho K. (1949): The vein blackening (bacterial rot) disease of cabbages, turnips etc. (*Xanthomonas campestris* (Pam.) Dowson). *Gaz. Agric. Mozambique*, 1: 79 – 82.
75. Deivamani M., Muthamilan M. (2016): Morphological, Physiological and Biochemical characteristics of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* by black rot of cabbage. *Journal of innovative*, 3 (1): 10 – 18.
76. Dey S.S., Sharma K., Dey R.B., Kumar G.M.S., Singh D., Kumar R., et al. (2015): Inter specific hybridization (*Brassica carinata* × *Brassica oleracea*) for introgression of black rot resistance genes into Indian cauliflower (*B. oleracea* var. *botrytis* L.). *Euphytica*, 204: 149 – 162.

77. Dhar S., Singh D. (2014): Performance of cauliflower genotypes for yield and resistance against black rot (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*). Indian Journal of Horticulture, 71: 197 – 201.
78. Dixon W.N., Levy L., Gottwald T. R. (2000): Proceedings of the International Citrus Canker Research Workshop, Ft. Pierce, FL, USDA, ARS.
79. Dowson W.J. (1939): On the systematic position and the generic names of the gram negative bacterial plant pathogens. Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten, Abt. 2 (100): 177 – 193.
80. Dowson W.J. (1942): On the generic name of the Gram-positive bacterial plant pathogens. Transactions of the British Mycological Society, 25: 311 – 313.
81. Dowson W.J. (1943): On the generic names *Pseudomonas*, *Xanthomonas* and *Bacterium* for certain bacterial plant pathogens. Transactions of the British Mycological Society, 26: 4 – 14.
82. Dye D.W. (1962): The Inadequacy of the Usual Determinative Tests for the Identification of *Xanthomonas* spp. New Zealand Journal of Science, 5: 393 – 416.
83. Dye D.W. (1968): The taxonomic study of the genus *Erwinia*. I. The „amylovora“ group. New Zealand Journal of Science, 11 (4): 590-607.
84. Dye D.W., Lelliott, R.A. (1974): Genus II. *Xanthomonas*. In: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th ed. Buchanan R.E., Gibbons N. E. (eds.) Williams & Wilkins, Baltimore, 243 – 249.
85. Dzhililov F.S., Tiwari R.D., Andreeva E.I., Amosova S.V., Ivanova N.I. (1989): Effectivnost' gidrotermicheskoi obrabotki pro travlivaniyasemyan kapusty protiv sosudistogo bakterioza. - Izvestia TSKhA5: 102 – 105.
86. Đukić D., Mandić L., Stanojković A. (2010): Praktikum iz mikrobiologije. Budućnost, Novi Sad.
87. Đukić D., Jemcev V., Mandić L. (2011): Sanitarna mikrobiologija zemljišta. Univerzitet u Kragujevcu, Agronomski fakultet Čačak.
88. Eichmeier A., Čechová J., Peňázová E. (2015): Genetic diversity of partial *hrpF* and *Zur* genes in populations of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in *Brassica oleracea* convar. *capitata* in the Czech Republic. Acta Horticulturae, 180 – 188.

89. Eichmeier A., Peňázová E., Pokluda R., Vicente, J. G. (2019): Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* through a real-time PCR assay targeting the Zur gene and comparison with detection targeting the hrpF gene. *European Journal of Plant Pathology*, 155(3): 891 – 902.
90. Elliott C. (1930): *Manual of bacterial plant pathogens*. Baltimore: Williams & Wilkins.
91. Elliott C. (1951): *Manual of bacterial plant pathogens*. Waltham, Mass. USA, 1 – 147.
92. Fahey J.W., Haristoy X., Dolan P.M., Kensler T.W., Scholtus I., Stephenson K.K., Talalay P., Lozniewski A. (2002): Sulforaphane inhibits extracellular, intracellular, and antibiotic-resistant strains of *Helicobacter pylori* and prevents benzo[a]pyrene-induced stomach tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99 (11): 7610 – 7615.
93. Fahy P.C., Persely G.J. (1983): *Plant Bacterial Diseases. A Diagnostic Guide*. Academic Press, Australia.
94. FAOSTAT data (2020): <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>
95. Fargier E., Manceau C. (2007): Pathogenicity assays restrict the species *Xanthomonas campestris* into three pathovars and reveal nine races within *X. campestris* pv. *campestris*. *Plant Pathology*, 56: 805 – 818.
96. Flaherty J.E., Harbaugh B.K., Jones J.B., Somodi G.C., Jackson L.E. (2001): H-mutant bacteriophages as a potential biocontrol of bacterial blight of geranium. *Horticultural Science*, 36: 98 – 100.
97. Franken A.A.J.M. (1992a): Application of polyclonal and monoclonal antibodies for the detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in crucifer seeds using immunofluorescence microscopy. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 98: 95 – 106.
98. Franken A.A.J.M. (1992b) Immunofluorescence microscopy and dilution-plating for the detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in crucifer seeds – methods to determine seed health and seed infection. Ph.D. Thesis. Wageningen Agricultural University, 164.
99. Fu L., Xu B.T., Xu X.R., Qin X.S., Gan R.Y., Li H.B. (2010): Antioxidant capacities and total phenolic contents of 56 wild fruits from South China. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 15 (12): 8602 – 8619.

100. Gandhi S.K. (2005): Bacterial diseases of rapeseed - Mustard. In: Saharan G.S., Naresh Mehta, Sangwan M.S. editors: Diseases of oilseed crops. Indus publishing company, 87 – 100.
101. Gašić K., Ivanović M., Ignjatov M., Calić A., Obradović A. (2011): Isolation and characterization of *Xanthomonas euvesicatoria* bacteriophages. Journal of Plant Pathology, 93: 415 – 423.
102. Gašić K., Gavrilović V., Dolovac N., Trkulja N., Živković S., Ristić D., Obradović A. (2014): *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* - the causal agent of broccoli soft rot in Serbia. Pesticides and Phytomedicine, 29 (4): 249 – 255.
103. Gill J.J., Svircev A.M., Smith R., Castle A.J. (2003): Bacteriophages of *Erwinia amylovora*. Applied and Environmental Microbiology, 69: 2133 – 2138.
104. Golicz A.A. et al., (2016): The pangenome of an agronomically important crop plant *Brassica oleracea*. Nature communications, 7: 13390.
105. Graham J.H., Gottwald T.R., Civerolo E.L., McGuire R.G. (1989): Population dynamics and survival of *Xanthomonas campestris* in soil in citrus nurseries in Maryland and Argentina. Plant Disease, 73: 423 – 427.
106. Graham J.H., Leite R.P.J. (2004): Lack of control of citrus canker by induced systemic resistance compounds. Plant Disease, 88 (7): 745 – 750.
107. Grahovac M., Inđić D., Lazić S., Vuković S. (2009): Biofungicidi i mogućnosti primene u savremenoj poljoprivredi. Pesticidi i fitomedicina, 24 (4): 245 – 258.
108. Griesbach E., Loptien H., Miersch U. (2003): Resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Pammel) Dowson in cabbage *Brassica oleracea* L. Journal of Plant Diseases and Protection, 110: 461 – 475.
109. Griffiths P.D., Roe C. (2005): Response of *Brassica oleracea* var. *capitata* to wound and spray inoculations with *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Hortscience, 40: 47 – 49.
110. Habte M., Alexander M. (1975): Protozoa as agents responsible for the decline of *Xanthomonas campestris* in soil. Journal of Applied Microbiology, 29: 159 – 164.
111. Hampton R., Ball E., De Boer S. (1993): Serological Methods for Detection and Identification of Viral and Bacterial Plant Pathogens, A Laboratory Manual. APS Press, St. Paul, Minnesota USA, 295 – 298.

-
112. Hauben L., Vauterin L., Swings J., Moore E.R.B. (1997): Comparison of 16S ribosomal DNA sequences of all *Xanthomonas* species. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47: 328 – 335.
113. Hausbeck M.K., Bell J., Medina-Mora C., Podolsky R., Fulbright D.W. (2000): Effect of bactericides on population sizes and spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on tomatoes in the greenhouse and on disease development and crop yield in the field. *Phytopathology*, 90: 38 – 44.
114. Hayward A.C. (1993): The hosts of *Xanthomonas*. In: *Xanthomonas*, Swings J.G., Civerolo E.L. (eds.) Chapman & Hall, London, 1 – 119.
115. He Y.Q., Zhang L., Jiang B.L., Zhang Z.C., Xu R.Q., Tang D.J., Qin J., Jiang W., Zhang X., Liao J., Cao J.R., Zhang S.S., Wei M.L., Liang X.X., Lu G.T., Feng J.X., Chen B., Cheng J., Tang, J.L. (2007): Comparative and functional genomics reveals genetic diversity and determinants of host specificity among reference strains and a large collection of Chinese isolates of the phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Genome Biology*, 8, R218.
116. Helling B., Reinecke S.A., Reinecke A.J. (2000). Effects of the Fungicide Copper Oxychloride on the Growth and Reproduction of *Eisenia fetida* (Oligochaeta). *Ecotoxic. Environ. Safety*, 46 (1): 108 – 116.
117. Henry A.W. (1974): Bacterial pod spot of rape in Alberta. *Canadian Plant Disease Survey*, 49: 674.
118. Hildebrand D.D., Riddle B. (1971): Influence of environmental conditions on reactions induced by infiltration of bacteria into plant leaves. *Hilgardia*, 41: 33 – 43.
119. Hopkins J.C.F. (1940): Diseases of fruit, flowers and vegetables in S. Rhodesia: black rot disease of cabbages and cauliflowers. *Rhodesia Agricultural Journal*, 37: 207 – 210.
120. Horsfall J.G., Barratt R.W. (1945): An Improved Grading System for Measuring Plant Disease. *Phytopathology*, 35: 655.
121. Huang D.L., Tang D.J., Liao Q., Li X.Q., He Y.Q., Feng J.X., Jiang B.L., Lu G.T., Tang J.L. (2009): The Zur of *Xanthomonas campestris* is involved in hypersensitive response and positively regulates the expression of the hrp cluster via hrpX but not hrpG. *Mol Plant Microbe Interact.*, 22 (3): 321 – 329.

-
122. Hueck C J. (1998): Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62: 379 – 433.
123. Hugh R., Leifson E. (1953): The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram-negative bacteria. *Journal of Bacterology*, 66: 24 – 26.
124. Ignatov A., Hida K., Kuginuki Y. (1998a): Black rot of crucifers and sources of resistance in Brassica crops. *Japan Agricultural Research Quarterly*, 32: 167 – 172.
125. Ignatov A., Kuginuki Y., Hida K. (1998b): Race-specific reaction of resistance to black rot in *Brassica oleracea*. *European Journal of Plant Pathology*, 104: 821 – 827.
126. Ignatov A., Kuginuki Y., Hida K. (1999a): Pathotypes of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in Japan. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*, 34 (3): 177 – 181.
127. Ignatov A., Kuginuki Y., Hida K. (1999b): Vascular stem resistance to black rot in Brassica oleracea. *Canadian Journal of Botany*, 77: 442 – 446.
128. Ignatov A., Sechler A., Schuenzel E.L., Agarkova I., Oliver B., Vidaver A.K., Schaad N.W. (2007): Genetic diversity in populations of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in cruciferous weeds in central coastal California. *Phytopathology*, 97: 803 – 812.
129. Janjić V. (2009): Mehanizam delovanja pesticida. Društvo za zaštitu bilja Srbije, Beograd.
130. Jarak M., Đurić S. (2006): Praktikum iz mikrobiologije. Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.
131. Jeanes A. (1973): Extracellular microbial polysaccharides: new hydrocolloides having both fundamental and practical importance. In: *Polymer Science and Technology*, Bikales N.M. (ed.). Vol. 2 by New York: Plenum Press.
132. Jelušić A. (2022): Karakterizacija i biološka kontrola *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* sa ozime uljane repice (*Brassica napus* L.). Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet.
133. Jemcev V., Đukić D. (2000): Mikrobiologija. Vojnoizdavački zavod, Beograd.

134. Jensen B.D., Vicente J.G., Manandhar H.K., Roberts S.J. (2010): Occurrence and diversity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in vegetable *Brassica* fields in Nepal. *Plant Diseases*, 94: 298 – 305.
135. Jerotijević H. (1973): Praktikum za mikrobiologiju. Privredni Pregled, Beograd.
136. Jones A.L. (1971): Bacterial canker of sweet cherry in Michigan. *Plant Disease Reporter*, 55 (11): 961 – 965.
137. Jones J.B., Woltz S.S., Jones J.P., Portier K.L. (1991): Population dynamics of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* on tomato leaflets treated with copper bactericides. *Phytopathology*, 81: 714 – 719.
138. Jorstad I. (1922): Report of agricultural and horticultural plant diseases during 1920–21. In: *Cereal Crops and Vegetables*. Reprinted from the Report of the Minister of Agriculture, Norway, 72.
139. Josifović M. (1956): Poljoprivredna fitopatologija. III izmenjeno i dopunjeno izdanje.
140. Jovanović O., Antonijević D., Jakovljević D. (1997): Karakteristike izolata *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* poreklom sa kupusa. *Zaštita bilja*, 48 (3): 175 – 181.
141. Kamoun S., Kadmar H.V., Tola E., Kado C.I. (1992): Incompatible interaction between crucifers and *Xanthomonas campestris* involves a vascular hypersensitive response: Role of the *hrpX* locus. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 5: 22 – 33.
142. Karagić Đ. (1998): Evapotranspiracija, prinos i kvalitet kupusa u zavisnosti od predzalivne vlažnosti i roka sadnje. Magistarski rad, Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet.
143. Karakašević B. i sar. (1967): Priručnik standardnih metoda za mikrobiološki rutinski rad. Treće izdanje, Beograd-Zagreb Medicinska knjiga.
144. Kennedy B.W., Alcorn S.M. (1980): Estimates of US crop losses to prokaryote plant pathogens. *Plant Disease*, 64: 674 – 676.
145. Khaliluev M.R., Shpakovski G.V. (2013): Genetic engineering strategies for enhancing tomato resistance to fungal and bacterial pathogens. *Russian Journal Plant Physiology*, 60 (6): 721 – 732.

146. Kim B.S. (1986): Testing for detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in crucifer seeds and seed disinfection. Korean Journal of Plant Pathology, 2 (2): 96 – 101.
147. Kimura M. (1980): A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. Journal of Molecular Evolution, 16: 111 – 120.
148. Király Z., Klement Z., Solymosy F., Vöröš J. (1970): Methods in Plant Pathology, Budapest.
149. Kishun R. (1984): Seed treatment for control of cabbage black rot. Journal of Turkish Phytopathology, 13(2/3): 81 – 86.
150. Klement Z., Rudolph K., Sands D.C. (1990): Methods in Phytobacteriology. Akademia Kiado. Budapest.
151. Klokočar-Šmit Z., Đurić T., Indić D., Peričević D., Bočarov A., Nikolić N. (2003): Efekat *Bacillus subtilis* ST-DP (BEČ) u zaštiti i bioregulaciji nekih povrtarskih vrsta. Šesto savetovanje o zaštiti bilja, Zlatibor 24-28.novembar, Zbornik rezimea, 68.
152. Knežević – Vukčević J., Simić D. (1999): Metode u mikrobiologiji. Praktikum, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu.
153. Kocks C.G., Zadoks J.C. (1996): Cabbage refuse piles as sources of inoculum for black rot epidemics. Plant Diseases, 80: 789 – 792.
154. Kohl J., van der Wolf J. (2004): *Alternaria brassisicola* and *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* on organic seed production of Brassicae: Epidemiology and seed infection, edited by P. R. International: WageningenUR.
155. Koike S.T., Gladders P., Paulus A.O. (2007): Vegetable disease: A color handbook. Burlington, MA: Academic Press.
156. Kotila J.E., Coons G.H. (1925): Investigations on the blackleg disease of potato. Michigan Agr. Exper. Sta. Tech. Bull., 67: 3 – 29.
157. Kovacevski I.C. (1934): The black rot of crucifers in Bulgaria, *Bacterium campestre* (Pammel) E.F. Smith. J. Agric. Exp. Sta. Bulgaria, Sofia. 6: 25 – 39.
158. Krnjajić Đ., Grujić D. (1980): Stanje biljnih bolesti i štetočina na teritoriji SFRJ u 1979. godini. Glasnik zaštite bilja, 7 – 9: 209 – 328.
159. Krnjajić Đ., Grujić D. (1983): Stanje biljnih bolesti i štetočina na teritoriji SFRJ u 1982. godini. Glasnik zaštite bilja, 7 – 8: 226 – 340.

160. Krstić, B., Tošić, M. (1994): Biljni virusi, neke osobine i dijagnoza. Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet.
161. Leite Jr., R.P., Minsavage G.V., Bonas U., Stall R.E. (1994): Detection and identification of phytopathogenic *Xanthomonas* strains by amplification of DNA sequences related to the hrp genes of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Applied and Environmental Microbiology*, 60 (4): 1068 – 1077.
162. Lelliott R.A., Stead D.E. (1987): *Methods for the Diagnosis of Bacterial Diseases of Plant Pathology*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, Edinburgh.
163. Lema M., Cartea M.E., Sotelo T., Velasco P., Soengas P., (2012): Discrimination of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* races among strains from northwestern Spain by *Brassica* spp. genotypes and rep-PCR. *European Journal of Plant Pathology*, 133: 159 – 169.
164. Leng M., Lu Z., Qin Z., Qi Y., Lu G., Tang J. (2019): Flp, a Fis-like protein, contributes to the regulation of type III secretion and virulence processes in the phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Molecular Plant Pathology*, 20 (8): 1119 – 1133.
165. Lenka S., Ram S. (1997): A note on the efficacy in vivo of various antibiotics and fungicide chemicals against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* causing black rot of cauliflower. *Orissa J Hort*, 25: 90 – 92.
166. Lindgren P.B. (1997): The role of hrp genes during plant–bacterial interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.* 35: 129 – 152
167. López I.N., Haedo A.S., Méndez B.S. (1999): Evaluation of *Xanthomonas campestris* survival in a soil microcosm system. *International microbiology*, 2: 111 – 114.
168. Lugo A.J., Elibox W., Jones J.B., Ramsuhag A. (2013). Copper resistance in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* affecting crucifers in Trinidad. *European Journal of Plant Pathology*, 136: 61 – 70.
169. Machaba K.P. (1998): The ephidemiology and control of crucifer chocolate spot. MSc thesis, University of Natal, Faculty of Science, Pietermaritzburg, South Africa, 1 – 116.
170. Maji A., Nath R. (2015). A study on pathological aspects of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* causing black rot of cabbage under red lateritic zone of West Bengal. *Journal of Applied and Natural Science*, 7: 780 – 785.

-
171. Mallmann W.L., Hemstreet C. (1924): Isolation of an inhibitory sub-stance from plants. *Journal of Agricultural Research*, 28: 599 – 602.
172. Mandiriza G., Kritzing Q., Aveling T.A.S. (2018): The evaluation of plant extracts, biocontrol agents and hot water as seed treatments to control black rot of rape in South Africa. *Crop Protection*, 114: 129 – 136.
173. Marco G.M., Stall R.E. (1983): Control of bacterial spot of pepper initiated by strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that differ in sensitivity to copper. *Plant Diseases*, 67: 779 – 781.
174. Mariano R.L.R., Silveira E.B, Assis S.M.P., Gomes A.M.A., Oliveira I.S., Peixoto A.R. (2001): Diagnose e manejo de fitobacterioses de importância no nordeste brasileiro. In: Michereff, S.J. & Barros, R. (Orgs.) *Desafios da proteção de plantas na agricultura sustentável*. Recife. UFRPE 141 – 169.
175. Marjanović - Jeromela A., Ž. Milovac, A. Dimitrijević, D. Stojanović, D. Rajković, M. Rajković, D. Miladinović, V. Miklič (2018): Rezultati ispitivanja proizvodne i upotrebne vrednosti hibrida uljane repice tolerantnih na herbicide iz grupe imidazolinona. *Acta herbologica*, 27 (1): 65 – 72.
176. Massomo S.M.S. (2002): Black rot of cabbage in Tanzania: Characterisation of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* and disease management strategies. PhD Thesis. The Royal Veterinary and Agricultural University, Copenhagen, Denmark, 215.
177. Massomo S.M.S., Mabagala R.B., Mortensen C.N., Mansfeld-Giese K., Nielsen H., Hockenhull J. (2003): Identification and characterization of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* strains from Tanzania by pathogenicity tests, Biolog, rep-PCR and fatty acid methyl ester analysis. *European Journal of Plant Pathology*, 109: 775 – 789.
178. Matsumoto T.T. (1975): Crucifers. Seed field phytosanitary certification training aid and plant pathological study notes for significant seed-borne diseases. State of California, Department of Food and Agriculture. Division of Plant Industry Exclusion and Detection. CRR, 1 – 2.
179. McGrath M.T. (1994): Black rot of crucifers. Fact Sheet page 730.40. Cooperative Extension of New York State, Cornell University, Ithaca, NY. http://vegetablemdonline.ppath.cornell.edu/factsheets/Crucifers_BR.htm
180. McKeen W.E. (1981): Black rot of rutabaga in Ontario and its control. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 3: 244 – 246.

181. McKenna F., El-Tarabily K.A., Hardy G.E.S.T., Dell B. (2001): Novel *in vivo* use of a polyvalent *Streptomyces* phage to disinfest *Streptomyces* scabies-infected seed potatoes. *Plant Pathology*, 50 (6): 666 – 675.
182. Mguni C.M. (1996): Bacterial black rot (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) of vegetable brassicas in Zimbabwe. Ph.D thesis, The Royal Veterinary and Agricultural University and Danish Government Institute of Seed Pathology
183. Mijušković M. (1950): Biljne bolesti u N.R. Crnoj Gori u 1949. godini. *Zaštita bilja*, 1: 94 – 106.
184. Mikicinski A., Sobiczewski P., Berczynski S. (2012): Efficacy of fungicides and essential oils against bacterial diseases of fruit trees. *Journal of Plant Protection Research*, 52: 467 – 471.
185. Miller S.A., Sahin F., Rowe R.C. (1996): Black rot of crucifers. Extension Factsheet, Ohio State University. Department of Plant Pathology.
186. Mishra, S., Arora, N.K. (2012): Evaluation of rhizospheric *Pseudomonas* and *Bacillus* as biocontrol tool for *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *World Journal Microbiol. Biotechnol.* 28: 693 – 702.
187. Mithen R.F. (2001): Glucosinolates and their degradation products. *Advances Botanical Research*, 35: 213 – 262.
188. Moffett M.I., Croft, B.J. (1983): *Xanthomonas*. In: *Plant Bacterial Diseases. A diagnostic Guide* (Fahy P.C., Persley G.J., eds.), Publishers Academic Press, 189 – 228.
189. Monnet F., Vailant N., Vernay P., Coudret A., Sallanon H., Hitmi A. (2001): Relationship between PSII activity, CO₂ fixation and Zn, Mn and Mg contents of *Lolium perenne* under zinc stress. *Journal of Plant Physiology*, 158: 1137 – 1144.
190. Monteiro L., Mariano R., Souto-Maior A. (2005): Antagonism of *Bacillus* spp. against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48 (1): 23 – 29.
191. Moore E.S. (1926): D'Herelle's bacteriophage in relation to plant parasites. *South African Journal of Science*, 23: 306.
192. Mulema J.K., Vicente J.G., Pink D.A.C., Jackson A., Chacha D.O., Wasilwa L., Kinyua Z.M., Karanja D.K., Holub E.B., Hand, P. (2012); Characterisation of isolates that cause black rot of crucifers in East Africa. *Eur. J. Plant Pathol.* 133, 427 – 438.

-
193. Munsch P., Olivier J.M. (1995): Biocontrol of Bacterial Blotch of the Cultivated Mushroom with Lytic Phages: Some Practical Considerations. In: Science and Cultivation of Edible Fungi, Proceedings of the 14th International Congress, Elliott, T. J. Ed.; Balkema, AA., Rotterdam, The Netherlands: vol. II: 595 – 602.
194. Nagaharu U. (1935): Genome analysis in Brassica with special reference to the experimental formation of *B. napus* and peculiar mode of fertilization. Japanese Journal of Botany, 7, 389 – 452.
195. Naher Tonu N. (2013): Genetic Analysis of Resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris* in *Brassica oleracea*. Niigata University, Graduate School of Science and Technology.
196. Obradović A. (1998): Identifikacija bakterija rodova *Pseudomonas* i *Erwinia* patogena salate i karfiola. Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet.
197. Obradović A., Arsenijević M. (1999): First report of black rot of cauliflower and kale caused by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in Yugoslavia. Plant Disease, 83 (10): 965.
198. Obradović A., Arsenijević M., Ivanović M. (2000a): *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* patogen kupusnjača u Srbiji. Zaštita bilja, 51 (3 – 4): 255 – 267.
199. Obradović A., Arsenijević M., Mijatović M., Ivanović M. (2000b): Sve učestalija pojava *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* parazita paradajza u Srbiji. 11. jugoslovenski simpozijum o zaštiti bilja, Zlatibor. Zbornik rezimea: 51.
200. Obradović A., Jones J.B., Momol M.T., Balogh B., Olson, S.M. (2004): Management of tomato bacterial spot in the field by foliar applications of bacteriophages and SAR inducers. Plant Disease, 88: 736 – 740.
201. Obradović A., Ivanović M. (2007): O primeni antibiotika u zaštiti bilja. Biljni lekar, 35 (1): 52 – 59.
202. Obradović A. (2009): Bakteriofagi kao baktericidi u zaštiti bilja. Pesticidi i fitomedicina, 24: 9 – 17.
203. OECD (2012): Consensus document on the biology of the Brassica crops (*Brassica* spp.). OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology, No. 54. Paris:

- Environment Directorate, Organisation for Economic Co-operation and Development
204. Ohata K.I., Azegami K., Tsuchiya Y. (1982): Clip inoculation, a brief evaluation method for the black rot resistance of cabbage varieties. Bulletin of the National Institute of Agricultural Science, 36: 89 – 96.
205. Onsando J.M. (1992): Black rot of Crucifers. Pp. 243-252. In Chaube H.S., Singh U.S., Mukhopadyay A.N., Kumar J. (eds.): Plant Diseases of International Importance. Diseases of Vegetables and Oil Seed Crops. Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey, USA
206. Pacific Northwest Extension (2015): Plant Disease Management Handbook. Oregon State University. <http://www.pnwhandbooks.org/plantdisease/cabbage-and-cauliflowerbrassica-sp-black-rot>, Accessed date: 11 November 2015.
207. Page J.L.S., Mguni C.M., Sithole S.Z. (1985): Pests and Diseases of Crops in the Communal Areas of Zimbabwe. London, UK: Overseas Development Administration Technical Report, 1 – 203.
208. Palacio-Bielsa A., Cambra A., López M.M. (2009): PCR detection and identification of plant-pathogenic bacteria: updated review of protocols (1989–2007). J. Plant Pathol., 91 (2): 249 – 297.
209. Pammel L.H. (1895): Bacteriosis of rutabaga (*Bacillus campestris* n. sp.). Microscopical Journal, 16: 145 – 151.
210. Park Y.J., Lee B.M., Ho-Hahn J., Lee G.B., Park D.S. (2004): Sensitive and specific detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* by PCR using species specific primers based on *hrpF* gene sequences. Microbiological Research, 159: 419 – 423.
211. Patel J. B. (2001): 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. Molecular Diagnostic, 6: 313 – 321.
212. Peňázová E., Eichmeier A., Čechová J., Baránek M., Pokluda R. (2015): Evaluation of different methods of DNA extraction for detection of bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in cabbage leaves. Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus, 14 (6): 141 – 150.
213. Perišić M., Panić M (1964): Prilog proučavanju kupusa u našoj zemlji (*Xanthomonas campestris* (Pammel) Dowson). Mikrobiologija, 1: 39 – 47.
214. Pinto-Ganhão J. (1962): *Xanthomonas campestris* (Pammel) Dowson - Uma nova bacteriose para Portugal. Agros, 45: 167 – 168.

-
215. Poplawsky A.R., Kawalek M.D., Schaad, N.W. (1993): A xanthomonadin encoding gene cluster for the identification of pathovars of *Xanthomonas campestris*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 6: 545 – 552.
216. Poplawsky A.R., Chun W. (1995): Strains of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* with atypical pigmentation isolated from commercial crucifer seeds. *Plant Disease* 79: 1021 – 1024.
217. Popović T., Balaž J., Starović M., Trkulja N., Ivanović Z., Ignjatov M., Josić D. (2013a): First report of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* as the causal agent of black rot on oilseed rape (*Brassica napus*) in Serbia. *Plant Disease*, 97(3): 418.
218. Popović T., Jošić D., Starović M., Milovanović P., Dolovac N., Poštić D., Stanković S. (2013b): Phenotypic and genotypic characterization of *Xanthomonas campestris* strains isolated from cabbage, kale and broccoli. *Archives of Biological Science*, 65: 585 – 593.
219. Popović T., Milićević Z., Oro V., Kostić I., Radović V., Jelušić A., Krnjajić S. (2018): Preliminarna ispitivanja antibaktericidnog delovanja etarskih ulja na ekonomski značajne fitopatogene bakterije. *Pesticidi i fitomedicina*, 33 (3 – 4): 185 – 195.
220. Popović T., Mitrović P., Jelušić A., Dimkić I., Marjanović-Jeromela A., Nikolić I., Stanković S. (2019): Genetic diversity and virulence of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* isolates from *Brassica napus* and six *Brassica oleracea* crops in Serbia. *Plant pathology*, 68 (8): 1448 – 1457.
221. Popović T., Jelušić A., Mitrović P., Iličić R., Marković S. (2020): Allelic profile of Serbian *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* isolates from cabbage. *Pesticide and Phytomedicine*, 35(1): 19 – 26.
222. Prokić A. (2014): *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina* - identifikacija patogena i biodiverzitet populacije. Univerzitet u Beogradu, poljoprivredni fakultet, doktorska disertacija.
223. Rabenstein F., Nachtigall M., Proll E. (1999): Production and characterization of monoclonal antibodies against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. — Proc. 6th Symposium on New Aspects of Resistance Research on Cultivated Plants November 18 – 19, 1998 Aschersleben, Germany. *Beiträge zur Züchtungsforschung* 5. Jahrg., Heft 1: 4 – 6.

-
224. Radunović D., Balaž J. (2012): Pojava *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Pammel, 1895) Dowson 1939, na kupusnjačama u Crnoj Gori. *Pesticidi i fitomedicina*, 27 (2): 131 – 140.
225. Randhawa P., Schaad N.W. (1984): Selective isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* from crucifer seeds. *Phytopathology*, 68: 249 – 252.
226. Rasmussen O.F., Reeves J.C., (1992): DNA probes for the detection of plant pathogenic bacteria. *Journal of Biotechnology*, 25: 203 – 220.
227. Rathaur P.S., Singh D., Raghuvanshi R., Yadava D.K. (2015): Pathogenic and Genetic Characterization of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* Races Based on Rep-PCR and Multilocus Sequence Analysis. *Journal of Plant Pathology & Microbiology*, 6: 317.
228. Ravensdale M., Blom T.J., Gracia-Garza J.A., Svircev A.M., Smith R. J. (2007): Bacteriophages and the control of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 29: 121 – 130.
229. Renu M.S. Boyar, Singh U.B, Sahu U., Nagrale D.T, Sahu P.K. (2017): Characterization of lytic bacteriophage Xcc9SH3. *Journal of plant pathology*, 99: 233 – 238.
230. Republički zavod za statistiku (2021): [http://: www. data.stat.gov.rs](http://www.data.stat.gov.rs).
231. Rijlaarsdam A., Woudt B., Simons G., Koenraadt H., Osterhof J., Asma M., Buddiger P., Roorda P., Grimault V., De Koning, J. (2004): Development of specific primer for the molecular detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. EPPO Conference on Quality of Diagnosis and New Diagnostic Methods for Plant Pests. Noordwijkerhout, the Netherlands, 19 – 22 April.
232. Ritchie D.F., Dittapongpitch V. (1991): Copper and streptomycin resistant strains and host differentiated races of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in North Carolina. *Plant Disease* 75: 733 – 736.
233. Roberts S.J., Brough J., Hunter P.J. (2007): Modelling the spread of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in module-raised brassica transplants. *Plant Pathology*, 56: 391 – 401.
234. Roberts S.J., Koenraadt H. (2006). 7-019a: Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* on Brassica spp. In: International Rules for Seed Testing. Bassersdorf: International Seed Testing Association (ISTA), 1 – 16.
235. Roberts S.J., Hiltunen L.H., Hunter P.J., Brough J. (1999): Transmission from seed to seedling and secondary spread of *Xanthomonas campestris* pv.

- campestris*. *Brassica* transplants: effects of dose and watering regime. *European Journal of Plant Pathology*, 105: 879 – 889.
236. Roohie R.K., Umesha S. (2012): Development of multiplex PCR for the specific detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in cabbage and correlation with disease incidence. *Journal of Plant Pathology & Microbiology*, 3(4): 1 – 10.
237. Roohie R.K., Umesha S. (2013): DNA polymorphism analysis of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* using single-strand conformation polymorphism (SSCP) and random amplified polymorphic DNA (RAPD). *African Journal of Biotechnology*, 12 (50): 6913 – 6921.
238. Rossier O., Van den Ackerveken G., Bonas U., (2000): HrpB2 and HrpF from *Xanthomonas* are type III-secreted proteins and essential for pathogenicity and recognition by the host plant. *Molecular Microbiology*, 38: 828 – 838.
239. Rudolph K., Ebrahim-Nesbat F., Mendgen K., Thiele C. (1987): Cytological observations of leaf spot-causing bacteria in susceptible and resistant hosts. In: Civerolo EL, Collmer A, Davis RE, Gillaspie AG (eds) *Plant pathogenic bacteria*, 604 – 612.
240. Russel, H.L. (1898): A bacterial rot of cabbage and allied plants. *Wisconsin Agric. Exp. Station Bull.*, 65: 1 – 39.
241. Ryan R.P., Vorholter F.J., Potnis N., Jones J.B., Van Sluys M.A., Bogdanove A.J., Dow J.M. (2011): Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium–plant interactions. *Nature Reviews Microbiology* 9: 344 – 355.
242. Saddler G.S., Bradburry J.F. (2005): Order III: Xanthomonadales ord. nov. In: Brenner G.G., Don J., Krieg N.R. & Staley J.R. (eds.), *Bergey's manual of systematic bacteriology* (2nd edition). Volume 2: The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria. 63 – 122.
243. Saha P., Kalia P., Sharma M., Singh D. (2016): New source of black rot disease resistance in *Brassica oleracea* and genetic analysis of resistance. *Euphytica*, 207: 35 – 48.
244. Saharan G.S. (1996): Disease resistance. In: K.S. Labana, S.S. Banga, S.K.Banga (Eds.), *Breeding Oilseed Brassicas*, Monographs on Theoretical and Applied Genetics, vol. 19, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 181 – 205.
245. Saitou N., Nei M. (1987): The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406 – 425.

-
246. Samuel G. (1925): Annual report of the lecture on Plant Pathology. Reprinted from Rept. Min. Agric. S. Australia for the year ending 30th June, pp. 2.
247. Sands D.C. (1990): Physiological Criteria-Determinative Tests. In: Methods in Phytobacteriology, eds. Klement, Z., Rudolph, K., Sands, D.C., pp. 134 – 143). Academiai Kiado, Budapest.
248. Sarejanni J.A., Demetriades S.D. (1951): Annotated list No. 2 of the fungi and bacteria occurring on cultivated plants in Greece. Annales de l' Institut Phytopathologique Benaki, 5: 5 – 11.
249. Satish S., Raveesha K.A., Janardhana G.R. (1999): Antibacterial activity of plant extracts on phytopathogenic *Xanthomonas campestris* pathovars. Letters in Applied Microbiology, 28: 145 – 147.
250. Sayama A., Shinokora H., Fujii N., Nishiyoma K. (2001): A new disease of Chinese mustard caused by *Pseudomonas viridiflava*. 52nd Annual Report Society Plant Protection of North Japan, 59 – 62.
251. Schaad N.W., White C. W. (1974a): A selective medium for soil isolation and enumeration of *Xanthomonas campestris*. Phytopathology, 64: 876 – 880.
252. Schaad N.W., White W.C. (1974b): Survival of *Xanthomonas campestris* in soil. Phytopathology, 64: 1518 – 1520.
253. Schaad N.W. (1979): Serological identification of plant pathogenic bacteria. Annual Review of Phytopathology, 17: 123 – 147.
254. Schaad N.W., Gabrielson R.L., Mulanax M.W. (1980): Hot acidified cupric acetate soaks for eradication of *Xanthomonas campestris* from crucifer seeds. Applied and Environmental Microbiology, 39(4): 803 – 807.
255. Schaad N.W., Dianese J.C. (1981): Cruciferous weeds as sources of inoculum of *Xanthomonas campestris* in black rot of crucifers. Phytopathology, 71 (11): 1215 – 1220.
256. Schaad N.W., Thaveechai N. (1983): Black rot of crucifers in Thailand. Plant Disease, 67 (11): 1231 – 1234.
257. Schaad N.W. (1988): Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. Second Edition, The American Phytopathological Society, Minnesota, USA, pp. 164.
258. Schaad N.W., Alvarez A. (1993): *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*: cause of black rot of crucifers. In: *Xanthomonas* (Swings, J.G. and Civerolo, E.L., eds), pp. 51 – 55. London: Chapman & Hall

-
259. Schaad N.W., Jones J.B., Chun W. (2001): Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria, Third Edition, APS Press.
260. Schnabel E.L., Fernando W.G.D., Meyer M.P., Jones A.I. (1999): Bacteriophage of *Erwinia amylovora* and their Potential for Bio-control. In: Proceedings of the 8th International Workshop on Fire Blight, Mornol, M. T., Saygili, H., Eds.; ISHS: Leuven, Belgium, 649 – 653.
261. Schultz T., Gabrielson R.L. (1986): *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in western Washington crucifer seed fields: occurrence and survival. *Phytopathology*, 76: 1306 – 1309.
262. Scortichini M., Rossi M.P., Ruggini L., Cinti S. (1994): Recurrent infections of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in Cruciferae in some areas of central-southern Italy. *Informatore Fitopatologico*, 44: 48 – 50.
263. Shaner G., Finney R.E. (1977): The effect of nitrogen fertilizer on the expression of slow mildewing resistance in Knox wheat. *Phytopathology*, 67: 1051 – 1056.
264. Sharma B.R., Swarup V., Chatterjee S.S. (1972): Inheritance of resistance to black rot in cauliower. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 14: 363 – 370.
265. Shekhawat P.S., Jain M.L., Chakravarti B.P. (1982): Detection and seed transmission of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* causing black rot of cabbage and cauliflower and its control by seed treatment. *Indian Phytopathology*, 35 (3): 442 – 447.
266. Shen F.J., Chen W.L. (1990): Preliminary study on cruciferous black rot in Zhejiang. *Acta Agriculturae Universitatis Zhejianensis* 16: 252 – 257.
267. Shepherd E.F.S. (1930): Botanical division. Ann. Rept. Mauritius Dept. of Agric. For the year 1928. pp. 10 – 13.
268. Shiomi T. (1991): Dry heat sterilization for seed stain of cabbage black rot disease. *Agriculture and Horticulture*, 66 (10): 1177 – 1180.
269. Silva J.C., Silva Junior T.A.F., Soman J.M., Tomasini T.D., Sartori M.M.P., Maringoni A. C. (2017): Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in the phyllosphere and rhizosphere of weeds. *Plant Pathology*, 66: 1517 – 1526.

270. Singh D., Dhar S. (2011): Bio-PCR based diagnosis of *Xanthomonas campestris* pathovars in black rot infected leaves of crucifers. *Indian Phytopathology*, 1: 7 – 11.
271. Singh D., Dhar S., Yadava D.K. (2011). Genetic and Pathogenic Variability of Indian Strains of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* Causing Black Rot Disease in Crucifers. *Current Microbiology*, 63 (6): 551 – 560.
272. Singh D., Rathaur P.S., Vicente J.G. (2016): Characterization, genetic diversity and distribution of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* races causing black rot disease in cruciferous crops of India. *Plant Pathology*, 65: 1411 – 1418.
273. Singh D., Singh R.S., Kaur K. (2005): Biological management of citrus scab in Panjab. *Plant Disease Research*, 20 (1): 76 – 82.
274. Singh S., Dey S.S., Bhatia R., Batley J., Kumar R. (2018): Molecular breeding for resistance to black rot [*Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Pammel) Dowson] in Brassicas: recent advances. *Euphytica*, 214: 196 – 214.
275. Singh, R.P., Verma J.P. (1980): Influence of pH on the growth of Xam. *Indian Phytopatology*, 33: 120.
276. Smart C.D., Lange H.W. (2010): Managing black rot of cabbage and other crucifer crops in organic farming systems. Cornell University, eXtension. <http://www.extension.org/pages/29925/managing-black-rot-of-cabbage-and-other-crucifer-crops-in-organic-farming-systems>
277. Smith E.F. (1897): *Pseudomonas campestris* (Pammel) the cause of brown rot in cruciferous plants. *Centralbl. F. Bakt. Abt. II*, 3: 281 – 291; 408 – 415; 478 – 486.
278. Smith T.K., Lund E.K., Clarke R.G., Bennet R.N., Johnson I.T. (2005): Effects of Brussels sprout juice on the cell cycle and adhesion of human colorectal carcinoma cells (HT29) in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 3895 – 3901.
279. So J.S., Lim H.T., Oh E.T., Heo T.R., Koh S.C., Leung K.T. (2002): Visualizing the infection process of *Xanthomonas campestris* in cabbage using green fluorescent protein. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18: 17 – 21.

-
280. Soengas P., Sotelo T., Velasco P., Cartea M. E. (2011). Antioxidant Properties of Brassica Vegetables. *Functional Plant Science and Biotechnology*, 5 (2): 43 – 55.
281. Soudi M.R., Alimadadi N., Ghadam P. (2011): Minimal phenotypic test for simple differentiation of *Xanthomonas campestris* from other yellow-pigmented bacteria isolated from soil. *Indian Journal of Microbiology*, 3 (2): 84 – 91.
282. Souza D.P., Andrade M.O., Alvarez-Martinez C.E., Arantes G.M., Farah C.S., Salinas R.K. (2011): A component of the Xanthomonadaceae type IV secretion system combines a VirB7 motif with a N0 domain found in outer membrane transport proteins. *PLoS Pathogens*, 7(5),e1002031.
283. Starr M.P. (1981): The genus *Xanthomonas*. In *The Prokaryotes*. Starr M.P., Stolp H., Trüper H.G., Balows A., Schlegel H.G., eds. Springer Verlag, Berlin, pp. 742 – 763.
284. Staub T., Williams P.H. (1972): Factors influencing black rot lesion development in resistant and susceptible cabbage. *Phytopathology*, 62: 722 – 728.
285. Strandberg J. (1973): Spatial distribution of cabbage black rot and the estimation of diseased plant populations. *Phytopathology*, 63 (8): 998 – 1003.
286. Sukhorukova N.S. (1985): Vascular bacteriosis of white head-cabbage in Western Siberia. In: Gvozdyak R.I., ed. *Bacterial diseases of plants (Abstracts of reports)*. Part 2. Kiev: Naukova Dumka, pp. 72.
287. Suslow T.V., Schroth M.N., Isaka M. (1982): Application of a rapid method for Gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. *Phytopathology*, 72: 917 – 918.
288. Sutton J.C., Williams P.H. (1970): Relation of xylem plugging to black rot lesion development in cabbage. *Canadian Journal of Botany*, 48: 391 – 401.
289. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. (2011): MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28: 2731 – 2739.
290. Tang D. J., Li X. J., He Y. Q., Feng J. X., Chen B., Tang J. L. (2005): The zinc uptake regulator Zur is essential for the full virulence of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 18: 652 – 658.

-
291. Tang R, Dodd A, Lai D, McNabb WC, Love DR (2007): Validation of zebrafish (*Danio rerio*) reference genes for quantitative real-time RT-PCR normalization. *Acta Biochim Biophys Sin (Shang-hai)*, 39 (5): 384 – 390.
292. Taylor J.D., Conway J., Roberts S.J., Astley D., Vicente J.G. (2002): Sources and origin of resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in Brassica genomes. *Phytopathology*, 92: 105 – 111.
293. Tešić Ž. (1962): Problemi postanka i klasifikacije fitopatogenih bakterija. *Arhiv za poljoprivredne nauke*, 50: 1 – 22.
294. Thomas R.C.(1935): A bacteriophage in relation to Stewart's disease of corn. *Phytopathology*, 25: 371 – 372.
295. Thomashow L.S., Weller, D. M. (1996): Current concepts in the use of introduced bacteria for biological disease control: mechanisms and antifungal metabolites. In: Stacey, G. and Keen, N. T. (Eds.). *Plant-Microbe Interactions*. New York : Chapman and Hall., 1: 187 – 235.
296. Todoric S., Vlajić S., Maširević S., Barać R., Stošić N., Iličić R. (2017): Pojava kile kupusa (*Plasmidiophora brassicae* Wornin) na lokalitetu Futog tokom 2016. godine. *Letopis naučnih radova / Annals of agronomy*, 41 (1): 16 - 21.
297. Todorović B., Milijašević S., Rekanović E., Balaž J. (2006): Mogućnost zaštite pasulja od *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* primenom bakarnih preparata i aktivatora otpornosti. *Pesticidi i fitomedicina*, 21: 239 – 244.
298. Tomazela A.L., Favarin J.L., Fancelli A.L., Martin T.N., Dourado Net D., Reis R.R.D. (2006): Rates of Nitrogen and Sources of Supplementary Cu and Mn on the Severity of the Rust and Morphologic Attributes. *Revista Brasileira De Milho E Sorgo*, 5: 192 – 201.
299. Townsend G.R., Heuberger J.V. (1943): Methods for estimating losses caused by diseases in fungicide experiments. *Plant Disease Reporter*, 27: 340 – 343.
300. Trench T.N., Wilkinson D.J., Esterhuysen S.P. (1992): *South African Plant Disease Control Handbook*. Farmer Support Group, University of Natal. Strachan (Pvt) Ltd, Pietermaritzburg, South Africa.
301. Tsuji J., Sommerville S.C., Hammerschmidt R. (1991): Identification of a gene in *Arabidopsis thaliana* that controls resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 38: 57 – 65.

-
302. van der Wolf J. M., van der Zouwen P.S., Garbeva P., Köhl J. (2006): Transmission of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* by the fly *Calliphora vomitoria* to blooming cauliflower plants (*Brassica oleracea*). Poster at: Joint Organic Congress, Odense, Denmark, May 30 – 31.
303. van der Wolf J.M., van der Zouwen P.S., van der Heijden L. (2013): Flower infection of *Brassica oleracea* with *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* results in high levels of seed infection. *European Journal of Plant Pathology*, 136: 103 – 111.
304. Vauterin L., Hoste B., Kersters K., Swings J, (1995): Reclassification of *Xanthomonas*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45: 472 – 489
305. Vauterin L., Yang P., Alvarez A., Takikawa Y., Roth D.A., Vidaver A.K., Stall R. E., Kersters K., Swings J. (1996): Identification of non-pathogenic *Xanthomonas* strains associated with plants. *Systematic and Applied Microbiology*, 19: 96 – 105.
306. Vauterin L., Rademaker J., Swings J. (2000): Synopsis on the taxonomy of the genus *Xanthomonas*. *Phytopathology*, 90: 677 – 682.
307. Vicente J. G., Ignatov A., Conway J., Roberts S. J., Taylor J. D. (1998): Development of an improved Brassica differential series for the identification of races of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. In: *International Congress in Plant Pathology*.
308. Vicente J.G., Conway J., Roberts S.J., Taylor J.D. (2001): Identification and origin of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* races and related pathovars. *Phytopathology*, 91: 492 – 499.
309. Vicente J.G., Taylor J.D., Sharpe A.G., Parkin I.A.P., Lydiate D.J., King G.J. (2002): Inheritance of race-specific resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in Brassica genomes. *Phytopathology*, 92: 1134 – 1141.
310. Vicent, J. G. (2004): Black rot of crucifers. In G. Lopes (Ed.), *A podridão negra das crucíferas* Alcobaça: COTHN Centro Operativo e Tecnológico Hortofrutícola
311. Vicente J. G., Everett B., Roberts S.J. (2006): Identification of isolates that cause a leaf spot disease of brassicas as *Xanthomonas campestris* pv. *raphani* and pathogenic and genetic comparison with related pathovars. *Phytopathology*, 96: 735 – 745

312. Vicente J.B., Houb E.B. (2013): *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (cause of black rot of crucifers) in the genomic era is still a worldwide threat to brassica crops. *Molecular Plant Pathology*, 14 (1): 2 – 18.
313. Vlahović B. (2015): Tržište agroindustrijskih proizvoda. Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad, 1 – 339.
314. Vlajić S., Maširević S., Iličić R., Gvozdanović – Varga J., Červenski J., Božić V. (2016): Efikasnost nekih preparata u kontroli crne truleži kupusnjača (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*). XXI Savetovanje o biotehnologiji sa međunarodnim učešćem, 11 – 12 mart, Čačak, 411 – 416.
315. Vlajić S., Iličić R., Maširević S., Barać R., Gvozdanović–Varga J. (2017a): The appearance of *Pectobacterium carotovorum* subsp. on some brassica plants. 3rd International symposium for agriculture and food – ISAF, 18-20 October 2017, Ohrid, Republic of Macedonia, 382.
316. Vlajić S., Maširević S., Barać R., Iličić R., Gvozdanović – Varga J., Božić V. (2017b): Bolesti kupusa tokom 2016. godine. XXII Savetovanje o biotehnologiji, Zbornik radova I, 10 – 11. mart, Čačak, 309 – 314.
317. Vlajić S., Gvozdanović – Varga J., Maširević S., Iličić R., Božić V., Ignjatov M., Milošević D. (2019): Utvrđivanje prisustva bakterije *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* na semenu kupusa. XXIV Savetovanje o biotehnologiji sa međunarodnim učešćem, Čačak, 15 – 16. Marta. Zbornik radova, 421 – 426.
318. Vlajić S., Iličić R., Gvozdanović – Varga J., Maširević S., Kozoderović G., Ignjatov M., Jošić D. (2022): Study of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* isolates originating from soil and *Brassica* spp. seeds. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 35(10): 827 – 835.
319. Wakker J.H. (1883): Vorläufige Mittheilungen über Hyacinthenkrankheiten. *Botanisches Centralblatt*, 14: 315 – 317.
320. Waleron M., Waleron K., Lojkowska E. (2014): Characterization of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *odoriferum* causing soft rot of stored vegetables. *European Journal of Plant Pathology*, 139: 457 – 469.
321. Walker J.C. (1952): Diseases of Vegetable Crops. New York, USA. -C. McGraw-Hill Book Company, Inc
322. Walker J.C.(1953): Cauliflower, cabbage, and others. In: Plant Diseases. The Yearbook of Agriculture 1953, pp. 425 – 430. Washington: US Department of Agriculture

-
323. Walters D., Walsh D., Newton A., Lyon G. (2005): Induced resistance for plant disease control: maximizing the efficacy for resistance elicitors. *Phytopathology*, 95: 1368 – 1373.
324. Walton J.D. (1997): Biochemical plant pathology. In: Dey PM, Harborne JB, eds. *Plant Biochemistry*. San Diego, Ca, USA: Academic Press, 487 – 502.
325. Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D. A., Lane D.J. (1991): 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173 (2): 697 – 703.
326. Weiss B.D., Capage M.A., Kessel M., Benson S.A. (1994): Isolation and characterization of a generalized transducing phage for *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Journal of Bacteriology*, 176 (11): 3354 – 3359.
327. Wilkie J.P., Dye D.W., Watson D.R. (1973): Further hosts of *Pseudomonas viridiflava*. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 16: 315 – 123.
328. Williams P.H., Staub T., Sutton J.C. (1972): Inheritance of resistance in cabbage to black rot. *Phytopathology*, 62: 247 – 252.
329. Williams P.H. (1980): Black rot: A continuing threat to world crucifers. *Plant Disease*, 64: 736 – 742.
330. Wollum A.G. (1982): Cultural methods for soil microorganisms, *Methods of Soil Analysis, Part 2, Chemical and Microbiological properties - Agronomy monograph 9* (2nd Edition).
331. Wukasch R.T. (1997): Bacterial diseases of cruciferous crops. London: Ministry of Agriculture, Food and Fisheries, <http://www.gov.on.ca/OMAFRA/english/crops/facts/86-046-htm>
332. Wulff E.G., Mguni C.M., Mortensen C.N., Keswani C.L., Hockenhull J. (2002): Biological control of black rot (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) of brassicas with an antagonistic strain of *Bacillus subtilis* in Zimbabwe. *European Journal of Plant Pathology*, 108 (4): 317 – 325.
333. Yan X., Zhang Q., Zou J., He C., Tao J. (2019): Selection of Optimized Reference Genes for qRT-PCR Normalization in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* Cultured in Different Media. *Current Microbiology*, 76: 613 – 619.
334. Young J.M., Dye D.W., Bradbury J.F., Panagopoulos C.G., Robbs C.F. (1978): A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 21: 153 – 177.

-
335. Zhao Y., Damicone J.P., Demezes D.H., Rangaswamy V., Bender C.L. (2000): Bacterial leaf spot of leafy crucifers in Oklahoma caused by *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*. *Plant Diseases*, 84: 1015 – 1020.
336. Zlatković N. (2018): Detekcija i identifikacija bakterija parazita biljaka familije Cucurbitaceae klasičnim i molekularnim metodama. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, poljoprivredni fakultet.
337. Игнатов А. (2006): Генетическое разнообразие фитопатогенных ксантомонад вида *Xanthomonas campestris* и устойчивость к ним растений семейства Brassicaceae. ВАК 06.01.11, Москва
338. Лазарев А.М. (2017): Ареал и зона вредоносности сосудистого бактериоза капусты. *Вестник защиты растений*, 1 (91): 52 – 55.

11. PRILOZI

Prilog 1: Podloge za izolaciju

Podloga od kvašćevog ekstrakta, dekstroze i kalcijum karbonata (YDC) (Schaad, 1988)

| | |
|-------------------------------------|---------|
| Dekstroza | 20 g |
| Kvašćev ekstrakt | 10 g |
| Kalcijum-karbonat CaCO ₃ | 20 g |
| Agar | 20 g |
| Destilovana voda | 1000 ml |

Mesopeptonski agar (Fahy i Hayward, 1983 loc. cit. po Arsenijević, 1997)

| | |
|-----------------------|---------|
| Ekstrakt govedeg mesa | 1 g |
| Pepton | 5 g |
| NaCl | 5 g |
| Agar | 10 g |
| Destilovana voda | 1000 ml |

SX agar (Schaad i White, 1974a)

| | |
|--------------------|---------|
| Rastvorljivi skrob | 10 g |
| Mesni ekstrakt | 1 g |
| Amonijum hlorid | 5 g |
| Kalijum-difosfat | 2 g |
| Metil-violet B | 1 ml |
| Metil-green | 2 ml |
| Agar | 15 g |
| Destilovana voda | 1000 ml |

Nakon autoklaviranja i hlađenja do temperature od 50°C dodat je cycloheximide 250 mg.

NYGB podloga

| | |
|------------------|---------|
| Pepton | 5 g |
| Kvašćev ekstrakt | 3 g |
| Glicerin | 20 ml |
| Destilovana voda | 1000 ml |

Prilog 2: Podloge za proučavanje odgajivačkih odlika izolata***Podloga od ekstrakta kvasca i neorganskih soli (YS)***

| | |
|--|---------|
| (NH ₄)H ₂ PO ₄ | 0,5 g |
| K ₂ HPO ₄ | 0,5 g |
| MgSO ₄ x 7H ₂ O | 0,2 g |
| NaCl | 5 g |
| Kvašćev ekstrakt | 5 g |
| Destilovana voda | 1000 ml |

Hranjivi agar NA (Nutrient agar) sa 5% saharoze

| | |
|-----------------------|---------|
| Hranjivi agar u prahu | 41,3 g |
| Saharoza | 50 g |
| Destilovana voda | 1000 ml |

Podloga od triptona, natrijum hlorida i agara (Schaad i sar., 2001)

| | |
|------------------|---------|
| Tripton | 10 g |
| NaCl | 5 g |
| Agar | 5 g |
| Destilovana voda | 1000 ml |

Prilog 3: Podloge i reagensi za ispitivanje biohemijsko – fizioloških odlika izolata***Hugh – Leifson-ova podloga za O/F test (Hugh – Leifson, 1953)***

| | |
|---------------------------------|---------|
| Pepton | 2 g |
| NaCl | 5 g |
| KH ₂ PO ₄ | 0,3 g |
| Agar | 3 g |
| Bromtimol plavo | 0,03 g |
| Destilovana voda | 1000 ml |

Tečna podloga sa triptonom

| | |
|------------------|---------|
| Tripton | 10 g |
| Destilovana voda | 1000 ml |

| | |
|---------------------------|-------|
| Kovacs-indol reagens | |
| P-dimetilaminobenzaldehid | 5 g |
| Amil alkohol | 75 ml |
| Koncentrovana HCl | 25 ml |

Podloga sa želatinom

| | |
|------------------|---------|
| Kvašćev ekstrakt | 3 g |
| Pepton | 5 g |
| Želatin | 120 g |
| Destilovana voda | 1000 ml |

Frejzerov reagens za ispitivanje želatina

| | |
|-------------------|--------|
| HgCl ₂ | 15 g |
| HCl konc. | 20 ml |
| Destilovana voda | 100 ml |

Podloga za hidrolizu skroba

| | |
|--------------------|---------|
| Mesni ekstrakt | 3 g |
| Pepton | 5 g |
| Rastvorljivi skrob | 2 g |
| Agar | 15 g |
| Destilovana voda | 1000 ml |

Lugolov rastvor

| | |
|------------------|--------|
| Jod | 1 g |
| Kalijum jodid | 2 g |
| Destilovana voda | 100 ml |

Podloga za hidrolizu eskulina

| | |
|---------------------|---------|
| Pepton | 20 g |
| NaCl | 5 g |
| Eskulin | 1 g |
| Feriamonijum-citrat | 0,5 g |
| Destilovana voda | 1000 ml |

Podloga za test redukciju nitrata

| | |
|------------------|---------|
| Pepton | 5 g |
| Kvašćev ekstrakt | 3 g |
| KNO ₃ | 1 g |
| Agar | 15 g |
| Destilovana voda | 1000 ml |

Reagens

| | |
|-----------------------|------|
| 0,5% rastvor skroba | 1 ml |
| 0,4% kalijum jodid | 1 ml |
| 50% sumporna kiselina | 5 ml |

Simonsov citratni agar

| | |
|---|---------|
| Magnezijum-sulfat | 0,2 g |
| Amonijum-dihidrofosfat (K ₂ NH ₄ H ₂ PO ₄) | 1 g |
| Dikalijum-fosfat (K ₂ HPO ₄) | 1 g |
| NaCl | 5 g |
| Natrijum-citrat | 2 g |
| Agar | 15 g |
| Brom timol plavo | 0,08 g |
| Destilovana voda | 1000 ml |

Mesopektonska podloga sa kvašćevim ekstraktom (YNA)

| | |
|-----------------------|---------|
| Ekstrakt govedeg mesa | 1 g |
| Kvašćev ekstrakt | 1 g |
| Pepton | 5 g |
| NaCl | 5 g |
| Agar | 10 g |
| Destilovana voda | 1000 ml |

Podloga C (Dye, 1968)

| | |
|--|---------|
| NH ₄ H ₂ PO ₄ | 0,5 g |
| K ₂ HPO ₄ | 0,5 g |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 0,2 g |
| NaCl | 5 g |
| Kvašček ekstrakt | 1 g |
| Agar | 12 g |
| Purpurni bromkrezol (1,5% rastvor etanola) | 0,7 ml |
| Destilovana voda | 1000 ml |

*Sterilisati i podesiti pH na 6,8.

Prilog 4: Pufferi**TBE puffer**

| | |
|---|---------|
| Tris baza | 54 g |
| Borna kiselina | 27,5 g |
| EDTA 0,5 M (pH 8) | 20 ml |
| Destilovana voda | 1000 ml |
| Podešavanje pH na 8,3 hlorovodoničnom kiselinom (HCl) | |

Prilog 5: Podloge za ispitivanje osetljivosti izolata**Podloga sa saharozom i peptonom (SPA)**

| | |
|--|---------|
| Saharoza | 20 g |
| Bacto pepton | 5 g |
| K ₂ HPO ₄ | 0,5 g |
| MgSO ₄ · x 7H ₂ O | 0,25 g |
| Bacto agar | 15 g |
| Destilovana voda | 1000 ml |

*Sterilisati u autoklavu 15 min na temperaturi od 121 °C (pH 7,2-7,4)

Ravan agar

| | |
|------------------|---------|
| Bacto tripton | 10 g |
| Kvašček ekstrakt | 5 g |
| NaCl | 5 g |
| Glukoza | 1 g |
| Agar | 20 g |
| Destilovana voda | 1000 ml |

Top Layer Agar

| | |
|------------------|---------|
| NaCl | 5 g |
| Polipepton | 10 g |
| Agar | 5 g |
| Destilovana voda | 1000 ml |

LTP podloga

| | |
|------------------|---------|
| Bacto tripton | 10 g |
| Kvašček ekstrakt | 5 g |
| NaCl | 5 g |
| Glukoza | 1 g |
| Destilovana voda | 1000 ml |

Prilog 6: Spisak objavljenih 16S rRNA sekvenci *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

1. Vlajić S., Maširević S. (2019): *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* strain KS-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. GenBank: MN565561.1. www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MN565561
2. Vlajić S., Maširević S. (2019): *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* strain KS-6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. GenBank: MN565562.1. www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MN565562
3. Vlajić S., Maširević S. (2019): *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* strain BL-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. GenBank: MN565563.1. www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MN565563
4. Vlajić S., Maširević S. (2019): *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* strain KS-16 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. GenBank: MN565564.1. www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MN565564
5. Vlajić S., Maširević S. (2019): *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* strain KS-17 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. GenBank: MN565565.1. www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MN565565
6. Vlajić S., Maširević S. (2019): *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* strain KL-6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. GenBank: MN565566.1. www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MN565566
7. Vlajić S., Maširević S. (2019): *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* strain KS-24 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. GenBank: MN565567.1. www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MN565567
8. Vlajić S., Maširević S. (2019): *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* strain UR-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. GenBank: MN565568.1. www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MN565568
9. Vlajić S., Maširević S. (2019): *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* strain BL-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. GenBank: MN565569.1. www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MN565569

-
10. Vlajić S., Maširević S. (2019): *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* strain KS-38 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. GenBank: MN565570.1. www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MN565570
11. Vlajić S., Maširević S. (2019): *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* strain KLj-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. GenBank: MN565571.1. www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MN565571
12. Vlajić S., Maširević S. (2019): *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* strain KS-42 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. GenBank: MN565572.1. www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MN565572

Prilog 7: Tabele statističke obrade podataka

Tab. Poređenje tretmana sa kontrolnom varijantom lokalitet Rimski šančevi

| Tretman | M1 | M2 | M3 |
|---------|--------------|----------|----------|
| | 2014. godina | | |
| T2 | -3,042** | -2,081** | -2,319** |
| T3 | -2,372** | -1,768** | -1,862** |
| T4 | -2,807** | -1,975** | -2,528** |
| T5 | -2,519** | -2,456** | -1,682** |
| T6 | -3,493** | -2,787** | -3,112** |
| T7 | -3,407** | -2,244** | -2,630** |
| T8 | -4,622** | -3,671** | -3,821** |
| T9 | -4,507** | -3,703** | -3,944** |
| T10 | -2,318** | -1,765** | -1,595** |
| T11 | -4,282** | -3,482** | -4,287** |
| T12 | -3,481** | -3,139** | -2,993** |
| | | | |
| | 2015. godina | | |
| T2 | -1,468** | -2,056** | -2,774** |
| T3 | -0,174 | -0,799 | -1,725** |
| T4 | -1,004* | -1,306** | -1,966** |
| T5 | -1,089* | -1,015* | -1,639** |
| T6 | -1,833** | -2,319** | -3,197** |
| T7 | -1,089* | -1,306** | -1,966** |
| T8 | -2,847** | -3,436** | -4,648** |
| T9 | -2,062** | -2,676** | -3,747** |
| T10 | -0,526 | -1,032* | -1,120* |
| T11 | -1,976** | -2,905** | -3,588** |
| T12 | -1,604** | -2,034** | -2,757** |
| | | | |
| | 2016. godina | | |
| T2 | -1,621** | -1,706** | -1,388** |
| T3 | -1,862** | -1,244* | -1,226** |
| T4 | -2,493** | -3,869** | -2,491** |
| T5 | -2,541** | -2,003** | -1,815** |
| T6 | -3,127** | -3,264** | -2,701** |
| T7 | -2,860** | -2,318** | -2,350** |
| T8 | -4,664** | -3,806** | -3,057** |
| T9 | -4,085** | -4,403** | -2,987** |
| T10 | -2,021** | -1,294** | -1,195* |
| T11 | -3,857** | -2,196** | -2,608** |
| T12 | -2,732** | -2,205** | -1,769** |

** $P < 0.01$; * $P < 0.05$

Tab. Poređenje tretmana sa kontrolnom varijantom lokalitet Futog

| Tretman | M1 | M2 | M3 |
|---------|--------------|----------|----------|
| | 2014. godina | | |
| T2 | -3.356** | -3.680** | -3.853** |
| T3 | -1.373** | -1.822** | -2.330** |
| T4 | -3.059** | -3.637** | -4.198** |
| T5 | -1.228* | -2.452** | -3.007** |
| T6 | -4.237** | -4.235** | -4.847** |
| T7 | -2.481** | -3.260** | -3.932** |
| T8 | -4.651** | -5.097** | -5.969** |
| T9 | -4.987** | -5.562** | -6.580** |
| T10 | -0.995 | -1.382** | -2.290** |
| T11 | -3.173** | -2.604** | -3.654** |
| T12 | -3.042** | -2.866** | -3.247** |
| | | | |
| | 2015. godina | | |
| T2 | -2.160** | -2.285** | -2.816** |
| T3 | -2.425** | -0.058 | -0.738 |
| T4 | -2.479** | -2.538** | -2.576** |
| T5 | -2.212** | -1.691** | -2.410** |
| T6 | -2.578** | -2.896** | -3.876** |
| T7 | -2.239** | -1.848** | -2.524** |
| T8 | -3.582** | -3.123** | -3.781** |
| T9 | -3.401** | -3.559** | -5.142** |
| T10 | -1.978** | -0.821 | -0.505 |
| T11 | -2.215** | -1.912** | -3.665** |
| T12 | -2.160** | -1.381** | -1.883** |
| | | | |
| | 2016. godina | | |
| T2 | -2.551** | -3.242** | -3.843** |
| T3 | -1.278** | -1.492** | -2.541** |
| T4 | -2.519** | -3.394** | -3.926** |
| T5 | -0.741 | -2.079** | -3.076** |
| T6 | -3.309** | -3.632** | -4.693** |
| T7 | -1.965** | -2.882** | -3.740** |
| T8 | -3.709** | -4.623** | -6.079** |
| T9 | -4.727** | -4.993** | -5.744** |
| T10 | -0.112 | -0.459 | -1.892** |
| T11 | -3.068** | -2.544** | -3.937** |
| T12 | -2.937** | -2.903** | -3.441** |

** $P < 0.01$; * $P < 0.05$

Tabela kumulativnih verovatnoća lokalitet R. šančevi

| GODINA | M1 | OCENA | | | | | | | |
|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---|---|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| 2014 | K | 0.0053 | 0.0313 | 0.2411 | 0.5707 | 0.1516 | | | |
| | T1 | 0.1000 | 0.3431 | 0.4465 | 0.1020 | 0.0085 | | | |
| | T2 | 0.0538 | 0.2356 | 0.5154 | 0.1788 | 0.0164 | | | |
| | T3 | 0.0807 | 0.3053 | 0.4782 | 0.1251 | 0.0107 | | | |
| | T4 | 0.0618 | 0.2587 | 0.5063 | 0.1590 | 0.0142 | | | |
| | T5 | 0.1484 | 0.4068 | 0.3714 | 0.0679 | 0.0054 | | | |
| | T6 | 0.1379 | 0.3961 | 0.3867 | 0.0735 | 0.0059 | | | |
| | T7 | 0.3503 | 0.4440 | 0.1807 | 0.0232 | 0.0018 | | | |
| | T8 | 0.3247 | 0.4503 | 0.1971 | 0.0259 | 0.0020 | | | |
| | T9 | 0.0511 | 0.2273 | 0.5178 | 0.1866 | 0.0173 | | | |
| | T10 | 0.2773 | 0.4559 | 0.2321 | 0.0322 | 0.0025 | | | |
| T11 | 0.1469 | 0.4054 | 0.3735 | 0.0687 | 0.0055 | | | | |
| GODINA | M2 | OCENA | | | | | | | |
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| 2014 | K | 0.0007 | 0.0098 | 0.0555 | 0.2623 | 0.5391 | 0.1326 | | |
| | T1 | 0.0054 | 0.0725 | 0.2833 | 0.4354 | 0.1847 | 0.0187 | | |
| | T2 | 0.0040 | 0.0542 | 0.2343 | 0.4487 | 0.2334 | 0.0254 | | |
| | T3 | 0.0049 | 0.0657 | 0.2665 | 0.4418 | 0.2004 | 0.0208 | | |
| | T4 | 0.0079 | 0.1016 | 0.3419 | 0.3994 | 0.1363 | 0.0129 | | |
| | T5 | 0.0109 | 0.1352 | 0.3878 | 0.3542 | 0.1026 | 0.0093 | | |
| | T6 | 0.0064 | 0.0841 | 0.3092 | 0.4222 | 0.1623 | 0.0160 | | |
| | T7 | 0.0260 | 0.2669 | 0.4420 | 0.2156 | 0.0456 | 0.0039 | | |
| | T8 | 0.0268 | 0.2728 | 0.4416 | 0.2108 | 0.0442 | 0.0038 | | |
| | T9 | 0.0039 | 0.0540 | 0.2338 | 0.4487 | 0.2340 | 0.0255 | | |
| | T10 | 0.0216 | 0.2337 | 0.4412 | 0.2443 | 0.0545 | 0.0047 | | |
| T11 | 0.0154 | 0.1804 | 0.4239 | 0.2989 | 0.0748 | 0.0066 | | | |
| GODINA | M3 | OCENA | | | | | | | |
| | | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | | |
| 2014 | K | 0.0011 | 0.0099 | 0.0596 | 0.2409 | 0.5126 | 0.1760 | | |
| | T1 | 0.0106 | 0.0908 | 0.3345 | 0.3857 | 0.1579 | 0.0206 | | |
| | T2 | 0.0067 | 0.0599 | 0.2617 | 0.4161 | 0.2234 | 0.0321 | | |
| | T3 | 0.0130 | 0.1089 | 0.3656 | 0.3625 | 0.1332 | 0.0168 | | |
| | T4 | 0.0056 | 0.0506 | 0.2336 | 0.4188 | 0.2532 | 0.0382 | | |
| | T5 | 0.0231 | 0.1764 | 0.4311 | 0.2799 | 0.0801 | 0.0094 | | |
| | T6 | 0.0144 | 0.1190 | 0.3798 | 0.3495 | 0.1222 | 0.0151 | | |
| | T7 | 0.0459 | 0.2903 | 0.4401 | 0.1776 | 0.0415 | 0.0047 | | |
| | T8 | 0.0516 | 0.3126 | 0.4327 | 0.1621 | 0.0369 | 0.0041 | | |
| | T9 | 0.0052 | 0.0467 | 0.2206 | 0.4181 | 0.2679 | 0.0415 | | |
| | T10 | 0.0712 | 0.3753 | 0.4002 | 0.1238 | 0.0266 | 0.0029 | | |
| T11 | 0.0206 | 0.1605 | 0.4213 | 0.2979 | 0.0891 | 0.0106 | | | |

| GODINA | M1 | OCENA | | | | | | | |
|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | | | | |
| 2015 | K | 0.3394 | 0.4131 | 0.2400 | 0.0076 | | | | |
| | T1 | 0.6903 | 0.2392 | 0.0687 | 0.0018 | | | | |
| | T2 | 0.3794 | 0.4040 | 0.2102 | 0.0064 | | | | |
| | T3 | 0.5836 | 0.3088 | 0.1048 | 0.0028 | | | | |
| | T4 | 0.6043 | 0.2960 | 0.0971 | 0.0026 | | | | |
| | T5 | 0.7626 | 0.1874 | 0.0488 | 0.0012 | | | | |
| | T6 | 0.6043 | 0.2960 | 0.0971 | 0.0026 | | | | |
| | T7 | 0.8985 | 0.0828 | 0.0183 | 0.0004 | | | | |
| | T8 | 0.8015 | 0.1583 | 0.0392 | 0.0010 | | | | |
| | T9 | 0.4651 | 0.3722 | 0.1583 | 0.0045 | | | | |
| | T10 | 0.7876 | 0.1688 | 0.0425 | 0.0011 | | | | |
| T11 | 0.7186 | 0.2193 | 0.0605 | 0.0015 | | | | | |
| GODINA | M2 | OCENA | | | | | | | |
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | | |
| 2015 | K | 0.100 | 0.215 | 0.456 | 0.219 | 0.010 | | | |
| | T1 | 0.463 | 0.319 | 0.181 | 0.035 | 0.001 | | | |
| | T2 | 0.197 | 0.308 | 0.377 | 0.113 | 0.005 | | | |
| | T3 | 0.290 | 0.339 | 0.297 | 0.072 | 0.003 | | | |
| | T4 | 0.234 | 0.325 | 0.344 | 0.093 | 0.004 | | | |
| | T5 | 0.529 | 0.294 | 0.148 | 0.027 | 0.001 | | | |
| | T6 | 0.290 | 0.339 | 0.297 | 0.072 | 0.003 | | | |
| | T7 | 0.774 | 0.160 | 0.056 | 0.009 | 0.000 | | | |
| | T8 | 0.616 | 0.253 | 0.110 | 0.019 | 0.001 | | | |
| | T9 | 0.237 | 0.326 | 0.341 | 0.092 | 0.004 | | | |
| | T10 | 0.669 | 0.225 | 0.090 | 0.015 | 0.001 | | | |
| T11 | 0.458 | 0.320 | 0.184 | 0.036 | 0.001 | | | | |
| GODINA | M3 | OCENA | | | | | | | |
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | |
| 2015 | K | 0.0172 | 0.0573 | 0.2290 | 0.4000 | 0.2386 | 0.0284 | 0.0295 | |
| | T1 | 0.2189 | 0.3445 | 0.3114 | 0.0996 | 0.0218 | 0.0019 | 0.0019 | |
| | T2 | 0.0894 | 0.2219 | 0.3985 | 0.2203 | 0.0590 | 0.0055 | 0.0054 | |
| | T3 | 0.1111 | 0.2541 | 0.3917 | 0.1874 | 0.0472 | 0.0043 | 0.0042 | |
| | T4 | 0.0827 | 0.2106 | 0.3986 | 0.2325 | 0.0638 | 0.0059 | 0.0059 | |
| | T5 | 0.2997 | 0.3636 | 0.2510 | 0.0688 | 0.0144 | 0.0013 | 0.0012 | |
| | T6 | 0.1111 | 0.2541 | 0.3917 | 0.1874 | 0.0472 | 0.0043 | 0.0042 | |
| | T7 | 0.6460 | 0.2476 | 0.0849 | 0.0175 | 0.0034 | 0.0003 | 0.0003 | |
| | T8 | 0.4258 | 0.3476 | 0.1752 | 0.0415 | 0.0084 | 0.0007 | 0.0007 | |
| | T9 | 0.0509 | 0.1470 | 0.3739 | 0.3073 | 0.1012 | 0.0099 | 0.0098 | |
| | T10 | 0.3875 | 0.3569 | 0.1959 | 0.0481 | 0.0098 | 0.0009 | 0.0008 | |
| T11 | 0.2160 | 0.3432 | 0.3137 | 0.1011 | 0.0222 | 0.0020 | 0.0019 | | |

| GODINA | M1 | OCENA | | | | | | | |
|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | | |
| 2016 | K | 0.0039 | 0.0289 | 0.2451 | 0.4462 | 0.2759 | | | |
| | T1 | 0.0193 | 0.1270 | 0.5144 | 0.2692 | 0.0700 | | | |
| | T2 | 0.0244 | 0.1546 | 0.5334 | 0.2317 | 0.0559 | | | |
| | T3 | 0.0449 | 0.2456 | 0.5326 | 0.1463 | 0.0306 | | | |
| | T4 | 0.0470 | 0.2536 | 0.5294 | 0.1408 | 0.0292 | | | |
| | T5 | 0.0815 | 0.3544 | 0.4618 | 0.0858 | 0.0164 | | | |
| | T6 | 0.0636 | 0.3080 | 0.4988 | 0.1082 | 0.0214 | | | |
| | T7 | 0.2921 | 0.4902 | 0.1938 | 0.0203 | 0.0036 | | | |
| | T8 | 0.1878 | 0.4804 | 0.2899 | 0.0355 | 0.0064 | | | |
| | T9 | 0.0285 | 0.1750 | 0.5403 | 0.2081 | 0.0481 | | | |
| | T10 | 0.1554 | 0.4603 | 0.3322 | 0.0441 | 0.0080 | | | |
| T11 | 0.0564 | 0.2858 | 0.5131 | 0.1205 | 0.0242 | | | | |
| GODINA | M2 | OCENA | | | | | | | |
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | |
| 2016 | K | 0.0004 | 0.0116 | 0.0952 | 0.3586 | 0.3888 | 0.1169 | 0.0285 | |
| | T1 | 0.0022 | 0.0603 | 0.3354 | 0.4296 | 0.1424 | 0.0247 | 0.0053 | |
| | T2 | 0.0014 | 0.0390 | 0.2537 | 0.4575 | 0.2017 | 0.0384 | 0.0084 | |
| | T3 | 0.0192 | 0.3481 | 0.4845 | 0.1247 | 0.0198 | 0.0029 | 0.0006 | |
| | T4 | 0.0030 | 0.0795 | 0.3885 | 0.3951 | 0.1115 | 0.0185 | 0.0039 | |
| | T5 | 0.0106 | 0.2302 | 0.5177 | 0.1995 | 0.0355 | 0.0053 | 0.0011 | |
| | T6 | 0.0041 | 0.1055 | 0.4399 | 0.3490 | 0.0850 | 0.0136 | 0.0029 | |
| | T7 | 0.0181 | 0.3348 | 0.4909 | 0.1314 | 0.0211 | 0.0031 | 0.0007 | |
| | T8 | 0.0324 | 0.4651 | 0.4099 | 0.0787 | 0.0118 | 0.0017 | 0.0004 | |
| | T9 | 0.0015 | 0.0408 | 0.2621 | 0.4562 | 0.1947 | 0.0366 | 0.0080 | |
| | T10 | 0.0037 | 0.0946 | 0.4208 | 0.3678 | 0.0946 | 0.0153 | 0.0033 | |
| T11 | 0.0037 | 0.0954 | 0.4223 | 0.3664 | 0.0938 | 0.0152 | 0.0032 | | |
| GODINA | M3 | OCENA | | | | | | | |
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| 2016 | K | 0.0006 | 0.0071 | 0.0466 | 0.1631 | 0.2798 | 0.3269 | 0.1504 | 0.0255 |
| | T1 | 0.0023 | 0.0278 | 0.1568 | 0.3397 | 0.2718 | 0.1510 | 0.0441 | 0.0065 |
| | T2 | 0.0020 | 0.0238 | 0.1378 | 0.3226 | 0.2849 | 0.1699 | 0.0513 | 0.0076 |
| | T3 | 0.0070 | 0.0787 | 0.3236 | 0.3610 | 0.1524 | 0.0599 | 0.0152 | 0.0022 |
| | T4 | 0.0036 | 0.0419 | 0.2151 | 0.3698 | 0.2283 | 0.1078 | 0.0294 | 0.0042 |
| | T5 | 0.0086 | 0.0951 | 0.3573 | 0.3444 | 0.1311 | 0.0494 | 0.0124 | 0.0018 |
| | T6 | 0.0061 | 0.0692 | 0.3005 | 0.3686 | 0.1676 | 0.0680 | 0.0175 | 0.0025 |
| | T7 | 0.0122 | 0.1294 | 0.4080 | 0.3055 | 0.0994 | 0.0355 | 0.0087 | 0.0012 |
| | T8 | 0.0114 | 0.1219 | 0.3989 | 0.3140 | 0.1052 | 0.0379 | 0.0093 | 0.0013 |
| | T9 | 0.0019 | 0.0231 | 0.1344 | 0.3191 | 0.2871 | 0.1737 | 0.0528 | 0.0078 |
| | T10 | 0.0078 | 0.0874 | 0.3425 | 0.3525 | 0.1404 | 0.0539 | 0.0136 | 0.0019 |
| T11 | 0.0034 | 0.0402 | 0.2084 | 0.3678 | 0.2332 | 0.1119 | 0.0307 | 0.0044 | |

Tabela kumulativnih verovatnoća lokalitet Futog

| GODINA | M1 | OCENA | | | | | | |
|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | | 1 | 2 | 3 | | | | |
| 2014 | K | 0.0445 | 0.3838 | 0.5717 | | | | |
| | T1 | 0.5717 | 0.3838 | 0.0445 | | | | |
| | T2 | 0.1552 | 0.5921 | 0.2527 | | | | |
| | T3 | 0.4981 | 0.4430 | 0.0589 | | | | |
| | T4 | 0.1372 | 0.5818 | 0.2810 | | | | |
| | T5 | 0.7632 | 0.2179 | 0.0189 | | | | |
| | T6 | 0.3575 | 0.5421 | 0.1005 | | | | |
| | T7 | 0.8298 | 0.1577 | 0.0126 | | | | |
| | T8 | 0.8721 | 0.1188 | 0.0090 | | | | |
| | T9 | 0.1080 | 0.5528 | 0.3392 | | | | |
| | T10 | 0.5265 | 0.4206 | 0.0529 | | | | |
| T11 | 0.4938 | 0.4463 | 0.0599 | | | | | |
| GODINA | M2 | OCENA | | | | | | |
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | |
| 2014 | K | 0.0096 | 0.0523 | 0.2865 | 0.5075 | 0.1442 | | |
| | T1 | 0.2783 | 0.4452 | 0.2314 | 0.0408 | 0.0042 | | |
| | T2 | 0.0567 | 0.2331 | 0.4780 | 0.2057 | 0.0265 | | |
| | T3 | 0.2698 | 0.4451 | 0.2383 | 0.0425 | 0.0044 | | |
| | T4 | 0.1015 | 0.3324 | 0.4274 | 0.1244 | 0.0143 | | |
| | T5 | 0.4019 | 0.4182 | 0.1535 | 0.0239 | 0.0024 | | |
| | T6 | 0.2021 | 0.4301 | 0.3008 | 0.0606 | 0.0064 | | |
| | T7 | 0.6141 | 0.3011 | 0.0735 | 0.0103 | 0.0010 | | |
| | T8 | 0.7167 | 0.2282 | 0.0479 | 0.0065 | 0.0006 | | |
| | T9 | 0.0373 | 0.1708 | 0.4723 | 0.2790 | 0.0406 | | |
| | T10 | 0.1161 | 0.3552 | 0.4071 | 0.1093 | 0.0123 | | |
| T11 | 0.1459 | 0.3909 | 0.3670 | 0.0868 | 0.0095 | | | |
| GODINA | M3 | OCENA | | | | | | |
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| 2014 | K | 0.0017 | 0.0052 | 0.0347 | 0.1323 | 0.4478 | 0.3541 | 0.0242 |
| | T1 | 0.0742 | 0.1728 | 0.4247 | 0.2366 | 0.0789 | 0.0122 | 0.0005 |
| | T2 | 0.0172 | 0.0496 | 0.2419 | 0.3751 | 0.2602 | 0.0535 | 0.0024 |
| | T3 | 0.1018 | 0.2150 | 0.4263 | 0.1903 | 0.0576 | 0.0087 | 0.0004 |
| | T4 | 0.0333 | 0.0902 | 0.3442 | 0.3420 | 0.1611 | 0.0280 | 0.0012 |
| | T5 | 0.1782 | 0.2920 | 0.3768 | 0.1170 | 0.0312 | 0.0046 | 0.0002 |
| | T6 | 0.0798 | 0.1823 | 0.4269 | 0.2257 | 0.0734 | 0.0113 | 0.0005 |
| | T7 | 0.3996 | 0.3319 | 0.2130 | 0.0436 | 0.0105 | 0.0015 | 0.0001 |
| | T8 | 0.5509 | 0.2830 | 0.1352 | 0.0244 | 0.0057 | 0.0008 | 0.0000 |
| | T9 | 0.0165 | 0.0479 | 0.2360 | 0.3749 | 0.2667 | 0.0555 | 0.0025 |
| | T10 | 0.0617 | 0.1504 | 0.4147 | 0.2638 | 0.0940 | 0.0149 | 0.0006 |
| T11 | 0.0419 | 0.1099 | 0.3757 | 0.3164 | 0.1329 | 0.0222 | 0.0010 | |

| GODINA | M1 | OCENA | | | | | | |
|--------|-----|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--|
| | | 1 | 2 | 3 | | | | |
| 2015 | K | 0.1498 | 0.5644 | 0.2858 | | | | |
| | T1 | 0.6045 | 0.3514 | 0.0441 | | | | |
| | T2 | 0.6657 | 0.3001 | 0.0342 | | | | |
| | T3 | 0.6775 | 0.2900 | 0.0325 | | | | |
| | T4 | 0.6168 | 0.3412 | 0.0420 | | | | |
| | T5 | 0.6988 | 0.2717 | 0.0295 | | | | |
| | T6 | 0.6232 | 0.3359 | 0.0409 | | | | |
| | T7 | 0.8636 | 0.1254 | 0.0110 | | | | |
| | T8 | 0.8408 | 0.1460 | 0.0132 | | | | |
| | T9 | 0.5601 | 0.3874 | 0.0525 | | | | |
| | T10 | 0.6168 | 0.3412 | 0.0420 | | | | |
| | T11 | 0.6045 | 0.3514 | 0.0441 | | | | |
| GODINA | M2 | OCENA | | | | | | |
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | |
| 2015 | K | 0.0920 | 0.2205 | 0.4480 | 0.2107 | 0.0289 | | |
| | T1 | 0.4989 | 0.3181 | 0.1519 | 0.0280 | 0.0030 | | |
| | T2 | 0.0970 | 0.2281 | 0.4458 | 0.2018 | 0.0273 | | |
| | T3 | 0.5619 | 0.2900 | 0.1238 | 0.0219 | 0.0023 | | |
| | T4 | 0.3548 | 0.3567 | 0.2336 | 0.0494 | 0.0055 | | |
| | T5 | 0.6471 | 0.2445 | 0.0913 | 0.0155 | 0.0016 | | |
| | T6 | 0.3916 | 0.3512 | 0.2100 | 0.0426 | 0.0047 | | |
| | T7 | 0.6971 | 0.2146 | 0.0746 | 0.0124 | 0.0013 | | |
| | T8 | 0.7807 | 0.1604 | 0.0500 | 0.0080 | 0.0008 | | |
| | T9 | 0.1872 | 0.3210 | 0.3701 | 0.1088 | 0.0129 | | |
| | T10 | 0.4066 | 0.3479 | 0.2010 | 0.0401 | 0.0044 | | |
| | T11 | 0.2872 | 0.3566 | 0.2828 | 0.0660 | 0.0074 | | |
| GODINA | M3 | OCENA | | | | | | |
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | |
| 2015 | K | 0.0066 | 0.0330 | 0.1333 | 0.2919 | 0.4347 | 0.1004 | |
| | T1 | 0.1005 | 0.3077 | 0.3692 | 0.1581 | 0.0578 | 0.0066 | |
| | T2 | 0.0138 | 0.0657 | 0.2248 | 0.3407 | 0.3043 | 0.0507 | |
| | T3 | 0.0808 | 0.2710 | 0.3814 | 0.1862 | 0.0721 | 0.0084 | |
| | T4 | 0.0693 | 0.2457 | 0.3846 | 0.2067 | 0.0838 | 0.0099 | |
| | T5 | 0.2439 | 0.4219 | 0.2440 | 0.0669 | 0.0210 | 0.0023 | |
| | T6 | 0.0771 | 0.2631 | 0.3829 | 0.1925 | 0.0756 | 0.0089 | |
| | T7 | 0.2268 | 0.4175 | 0.2574 | 0.0727 | 0.0230 | 0.0025 | |
| | T8 | 0.5335 | 0.3425 | 0.0968 | 0.0205 | 0.0060 | 0.0007 | |
| | T9 | 0.0110 | 0.0531 | 0.1933 | 0.3327 | 0.3468 | 0.0631 | |
| | T10 | 0.2071 | 0.4102 | 0.2736 | 0.0804 | 0.0258 | 0.0028 | |
| | T11 | 0.0421 | 0.1714 | 0.3654 | 0.2721 | 0.1323 | 0.0167 | |

| GODINA | M1 | OCENA | | | | | | |
|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | | | |
| 2016 | K | 0.0447 | 0.3408 | 0.5405 | 0.0740 | | | |
| | T1 | 0.3748 | 0.5146 | 0.1044 | 0.0062 | | | |
| | T2 | 0.1439 | 0.5488 | 0.2856 | 0.0217 | | | |
| | T3 | 0.3674 | 0.5188 | 0.1074 | 0.0064 | | | |
| | T4 | 0.0894 | 0.4790 | 0.3950 | 0.0367 | | | |
| | T5 | 0.5615 | 0.3835 | 0.0521 | 0.0029 | | | |
| | T6 | 0.2502 | 0.5671 | 0.1716 | 0.0111 | | | |
| | T7 | 0.6564 | 0.3060 | 0.0356 | 0.0020 | | | |
| | T8 | 0.8410 | 0.1451 | 0.0132 | 0.0007 | | | |
| | T9 | 0.0497 | 0.3627 | 0.5209 | 0.0666 | | | |
| | T10 | 0.5015 | 0.4295 | 0.0653 | 0.0037 | | | |
| T11 | 0.4687 | 0.4534 | 0.0737 | 0.0042 | | | | |
| GODINA | M2 | OCENA | | | | | | |
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | |
| 2016 | K | 0.0076 | 0.0402 | 0.2299 | 0.4732 | 0.2491 | | |
| | T1 | 0.1636 | 0.3983 | 0.3458 | 0.0795 | 0.0128 | | |
| | T2 | 0.0329 | 0.1495 | 0.4485 | 0.2996 | 0.0694 | | |
| | T3 | 0.1856 | 0.4135 | 0.3206 | 0.0693 | 0.0110 | | |
| | T4 | 0.0577 | 0.2288 | 0.4682 | 0.2055 | 0.0398 | | |
| | T5 | 0.2242 | 0.4304 | 0.2809 | 0.0557 | 0.0087 | | |
| | T6 | 0.1201 | 0.3522 | 0.4005 | 0.1090 | 0.0183 | | |
| | T7 | 0.4378 | 0.3985 | 0.1388 | 0.0217 | 0.0032 | | |
| | T8 | 0.5299 | 0.3510 | 0.1018 | 0.0151 | 0.0022 | | |
| | T9 | 0.0120 | 0.0616 | 0.3047 | 0.4485 | 0.1733 | | |
| | T10 | 0.0887 | 0.3010 | 0.4406 | 0.1443 | 0.0254 | | |
| T11 | 0.1224 | 0.3553 | 0.3974 | 0.1070 | 0.0179 | | | |
| GODINA | M3 | OCENA | | | | | | |
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| 2016 | K | 0.0013 | 0.0033 | 0.0177 | 0.0771 | 0.3296 | 0.4526 | 0.1185 |
| | T1 | 0.0558 | 0.1210 | 0.3386 | 0.3220 | 0.1349 | 0.0249 | 0.0029 |
| | T2 | 0.0158 | 0.0393 | 0.1691 | 0.3590 | 0.3217 | 0.0845 | 0.0105 |
| | T3 | 0.0603 | 0.1289 | 0.3470 | 0.3122 | 0.1260 | 0.0229 | 0.0026 |
| | T4 | 0.0267 | 0.0639 | 0.2399 | 0.3745 | 0.2371 | 0.0517 | 0.0062 |
| | T5 | 0.1214 | 0.2129 | 0.3790 | 0.2101 | 0.0646 | 0.0108 | 0.0012 |
| | T6 | 0.0506 | 0.1117 | 0.3274 | 0.3332 | 0.1465 | 0.0275 | 0.0032 |
| | T7 | 0.3559 | 0.3117 | 0.2411 | 0.0710 | 0.0173 | 0.0027 | 0.0003 |
| | T8 | 0.2833 | 0.3063 | 0.2872 | 0.0950 | 0.0240 | 0.0038 | 0.0004 |
| | T9 | 0.0083 | 0.0213 | 0.1016 | 0.2912 | 0.4103 | 0.1473 | 0.0199 |
| | T10 | 0.0609 | 0.1299 | 0.3480 | 0.3110 | 0.1249 | 0.0227 | 0.0026 |
| T11 | 0.0380 | 0.0876 | 0.2901 | 0.3593 | 0.1841 | 0.0366 | 0.0043 | |

BIOGRAFIJA

Slobodan A. Vlajić rođen je 26.09.1989. godine u Novom Sadu, gde je završio osnovnu školu. Srednju poljoprivrednu školu završio je u Futogu, nakon čega upisuje Poljoprivredni fakultet Univerziteta u Novom Sadu – smer Fitomedicina. Nakon odbrane diplomskog rada 2012. godine po naslovom: „Uticaj prouzrokovaca rđe (*Puccinia* spp.) na kvalitativne i kvantitativne karakteristike jesenjeg belog luka (*Allium sativum* L.)” i prosečne ocene 9,29 upisuje master studije na modulu Fitopatologija. Master rad pod naslovom: „Intenzitet pojave rđe (*Puccinia* spp.) na genotipovima jesenjeg belog luka (*Allium sativum* L.)” brani 2013. godine sa prosečnom ocenom 10,00, i upisuje na istom fakultetu doktorske studije. Od 2013. godine kao doktorand i stipendista Ministarstva nauke, prosvete i tehnološkog razvoja radio je u Laboratoriji za fitopatologiju Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu. Učestvovao je u izvođenju vežbi na predmetima: Mikoze ratarsko – povrtarskih biljaka, Mikoze biljaka I, Abiotičke bolesti i Ekologija fitopatogenih mikroorganizama.

Kao istraživač saradnik, bio je angažovan na realizaciji nacionalnog projekata Ministarstva prosvete, nauke i tehnoloskog razvoja: „Stvaranje sorata i hibrida povrća za gajenje na otvorenom polju i u zaštićenom prostoru” (TR31030). Od 2017. godine zaposlen je u Institutu za ratarstvo i povrtarstvo u Novom Sadu.

Slobodan Vlajić do sada je kao autor ili koautor objavio i saopštio preko 100 naučnih radova u domaćim i međunarodnim časopisima. Aktivno je učestvovao na brojnim naučnim skupovima u zemlji i inostranstvu, predstavljajući rezultate rada usmeno ili u vidu postera. Govori engleski jezik. Član je Društva za zaštitu bilja Srbije kao i Mikrobiološkog društva Srbije.

План третмана података

| |
|--|
| Назив пројекта/истраживања |
| Екологија и сузбијање <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> |
| Назив институције/институција у оквиру којих се спроводи истраживање |
| а) Пољопривредни факултет, Универзитет у Новом Саду б) Институт за ратарство и повртарство Нови Сад, Институт од националног значаја за Р. Србију |
| Назив програма у оквиру ког се реализује истраживање |
| Докторске студије, смер Агрономија |
| 1. Опис података |
| 1.1 Врста студије Експериментална студија |
| 1.2 Врсте података а) квантитативни б) квалитативни |
| 1.3. Начин прикупљања података а) анкете, упитници, тестови б) клиничке процене, медицински записи, електронски здравствени записи в) генотипови: навести врсту г) административни подаци: навести врсту д) узорци ткива: навести врсту ђ) снимци, фотографије: навести врсту е) текст, навести врсту ж) мапа, навести врсту з) остало: описати : Метод истраживања је обухватио праћење популације <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> (Xcc) на различитим гајеним купусњачама на територији Р. Србије, проучавање одгајивачких, морфолошких, биохемијско–физиолошких и серолошких одлика сакупљених изолата. Идентификација молекуларним методама и утврђивање специфичности бактериофага према Xcc изолатима. Испитивање утицаја примењених бактерицида на смањење заразе бактеријом и утицај на масу главице кроз статистичку обраду података. |

1.3 Формат података, употребљене скале, количина података

1.3.1 Употребљени софтвер и формат датотеке:

- a) **Excel фајл, датотека**
- b) SPSS фајл, датотека
- c) **PDF фајл, датотека**
- d) **Текст фајл, датотека**
- e) **JPG фајл, датотека**
- f) Остало, датотека

1.3.2. Број записа (код квантитативних података)

- a) број варијабли **велики број варијабли**
- b) број мерења (испитаника, процена, снимака и сл.) **се разликовао код различитих параметара и био је у већем броју понављања. Број мерења је описан у дисертацији за сваки параметар.**

1.3.3. Поновљена мерења

- a) **да**
- b) **не**

Уколико је одговор да, одговорити на следећа питања:

- a) временски размак између поновљених мера је **дефинисан стандардним процедурама научно истраживачког рада како у пољским тако и у лабораторијским условима, зависно од параметара испитивања**
- b) варијабле које се више пута мере односе се **на све анализе**
- v) нове верзије фајлова који садрже поновљена мерења су именоване као **нису именоване нове верзије фајлова**

Напомене: /

Да ли формати и софтвер омогућавају дељење и дугорочну валидност података?

- a) **Да**
- b) **Не**

Ако је одговор не, образложити

2. Прикупљање података

2.1 Методологија за прикупљање/генерисање података

2.1.1. У оквиру ког истраживачког нацрта су подаци прикупљени?

- а) експеримент, навести тип: **пољски огледи и лабораторијска испитивања**
- б) корелационо истраживање, навести тип
- ц) анализа текста, навести тип: **тумачење добијених резултата и поређење са литературним подацима**
- д) остало, навести шта

2.1.2 Навести врсте мерних инструмената или стандарде података специфичних за одређену научну дисциплину (ако постоје).

2.2 Квалитет података и стандарди

2.2.1. Третман недостајућих података

- а) Да ли матрица садржи недостајуће податке? Да **Не**

Ако је одговор да, одговорити на следећа питања:

- а) Колики је број недостајућих података?
- б) Да ли се кориснику матрице препоручује замена недостајућих података? Да **Не**
- в) Ако је одговор да, навести сугестије за третман замене недостајућих података

2.2.2. На који начин је контролисан квалитет података? Описати

Контрола добијених података је извршена логички, методом анализе садржаја, статистичким тестовима и понављањем експерименталних резултата.

2.2.3. На који начин је извршена контрола уноса података у матрицу?

Контрола је извршена провером сваког појединачног податка након уноса у матрицу, статистичком контролом, као и употежењем података са литературним подацима из предходних истраживања.

3. Третман података и пратећа документација

3.1. Третман и чување података

3.1.1. Подаци ће бити депоновани у **Репозиторијуму докторских дисертација на Универзитету у Новом Саду**

3.1.2. URL адреса <https://cris.uns.ac.rs/searchDissertation.jsf>

3.1.3. DOI

3.1.4. Да ли ће подаци бити у отвореном приступу?

а) Да

б) Да, али после ембарга који ће трајати до _____

в) Не

Ако је одговор не, навести разлог

3.1.5. Подаци неће бити депоновани у репозиторијум, али ће бити чувани.

Образложење

3.2 Метаподаци и документација података

3.2.1. Који стандард за метаподатке ће бити примењен? **Описни**

3.2.1. Навести метаподатке на основу којих су подаци депоновани у репозиторијум.

Назив фајла: Дисертација – Слободан Влајић, Универзитет у Новом Саду, Пољопривредни факултет

Ако је потребно, навести методе које се користе за преузимање података, аналитичке и процедуралне информације, њихово кодирање, детаљне описе варијабли, записа итд.

3.3 Стратегија и стандарди за чување података

3.3.1. До ког периода ће подаци бити чувани у репозиторијуму? **Трајно**

3.3.2. Да ли ће подаци бити депоновани под шифром? Да **Не**

3.3.3. Да ли ће шифра бити доступна одређеном кругу истраживача? Да **Не**

3.3.4. Да ли се подаци морају уклонити из отвореног приступа после извесног времена?

Да **Не**

Образложити:

4. Безбедност података и заштита поверљивих информација

Овај одељак МОРА бити попуњен ако ваши подаци укључују личне податке који се односе на учеснике у истраживању. За друга истраживања треба такође размотрити заштиту и сигурност података.

4.1 Формални стандарди за сигурност информација/података

Истраживачи који спроводе испитивања с људима морају да се придржавају Закона о заштити података о личности (https://www.paragraf.rs/propisi/zakon_o_zastiti_podataka_o_licnosti.html) и

одговарајућег институционалног кодекса о академском интегритету.

4.1.2. Да ли је истраживање одобрено од стране етичке комисије? Да **Не**

Ако је одговор Да, навести датум и назив етичке комисије која је одобрила истраживање

4.1.2. Да ли подаци укључују личне податке учесника у истраживању? Да **Не**

Ако је одговор да, наведите на који начин сте осигурали поверљивост и сигурност информација везаних за испитанике:

- a) Подаци нису у отвореном приступу
- b) Подаци су анонимизирани
- ц) Остало, навести шта

5. Доступност података

5.1. Подаци ће бити

a) јавно доступни

b) доступни само уском кругу истраживача у одређеној научној области

ц) затворени

Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести под којим условима могу да их користе:

Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести на који начин могу приступити подацима:

5.4. Навести лиценцу под којом ће прикупљени подаци бити архивирани.

Ауторство – некомерцијално – без прераде

6. Улоге и одговорност

6.1. Навести име и презиме и мејл адресу власника (аутора) података

Слободан Влајић, svlajic89@gmail.com

6.2. Навести име и презиме и мејл адресу особе која одржава матрицу с подацима

Слободан Влајић, svlajic89@gmail.com

6.3. Навести име и презиме и мејл адресу особе која омогућује приступ подацима другим истраживачима

Слободан Влајић, svlajic89@gmail.com