

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Aleksandra D. Jelušić

**KARAKTERIZACIJA I BIOLOŠKA  
KONTROLA *XANTHOMONAS CAMPESTRIS*  
PV. *CAMPESTRIS* SA OZIME ULJANE REPICE  
(*BRASSICA NAPUS* L.)**

doktorska disertacija

Beograd, 2022.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Aleksandra D. Jelušić

**CHARACTERIZATION AND BIOLOGICAL  
CONTROL OF *XANTHOMONAS CAMPESTRIS*  
PV. *CAMPESTRIS* FROM WINTER OILSEED  
RAPE (*BRASSICA NAPUS* L.)**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2022

## MENTORI I ČLANOVI KOMISIJE

### Mentori:

**dr Tatjana Popović**, naučni savetnik  
Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu

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

### Članovi komisije:

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

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

**dr Petar Mitrović**, viši naučni saradnik  
Institut za ratarstvo i povrtarstvo –  
Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

Datum odbrane: \_\_\_\_\_

## Zahvalnica

*Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije je urađen na Institutu za zaštitu bilja i životnu sredinu, Odseku za bolesti bilja; laboratorijama Katedre za mikrobiologiju, Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu i na Institutu za ratarstvo i povrtarstvo – Institutu od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Odeljenju za uljanu repicu i ostalo industrijsko bilje.*

*Istraživanja su finansirana sa projekata Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije III 43010 pod nazivom „Modifikacije antioksidativnog metabolizma biljaka sa ciljem povećanja tolerancije na abiotički stres i identifikacija novih biomarkera sa primenom u remedijaciji i monitoringu degradiranih staništa“ i OI 173026 pod nazivom „Molekularna karakterizacija bakterija iz rodova Bacillus i Pseudomonas kao potencijalnih agenasa za biološku kontrolu“.*

*Neizmernu zahvalnost dugujem mentorki dr Tatjani Popović, naučnom savetniku Instituta za zaštitu bilja i životnu sredinu za svo nesebično preneto praktično i teorijsko znanje iz oblasti fitopatologije. Hvala vam za prelepu saradnju, ukazano poverenje i sve pružene prilike. Hvala vam na konstantnoj podršci i požrtvovanosti, kao i na izdvojenom vremenu i uloženom trudu za savladavanje svih prepreka tokom izvođenja celokupne disertacije.*

*Veliku zahvalnost dugujem mentorki prof. dr Tanji Berić, redovnom profesoru Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Hvala vam za preneto znanje i ukazano poverenje, za sve korisne savete i sugestije tokom izvođenja eksperimenata i kasnije, tokom pisanja naučnih radova i same disertacije. Hvala vam na lepoj saradnji, podršci, izdvojenom vremenu i uloženom trudu.*

*Veliku zahvalnost dugujem prof. dr Slaviši Stankoviću, redovnom profesoru Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Hvala vam što ste prepoznali moj trud i pružili mi mogućnost za bavljenje naučno-istraživačkim radom. Hvala za preneto znanje, sve stručne i korisne savete, lepu saradnju i kritičku ocenu doktorske disertacije.*

*Posebnu zahvalnost dugujem dr Petru Mitroviću, višem naučnom saradniku Instituta za ratarstvo i povrtarstvo – Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju za nesebičnu pomoć tokom terenskog rada, sakupljanja uzoraka i izvođenja oglada. Hvala vam na prenetom znanju, izdvojenom vremenu, lepoj saradnji i kritičkoj oceni doktorske disertacije.*

*Želim da se zahvalim prof. dr Jeleni Lozo, redovnom profesoru Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu na stručnoj saradnji i kritičkoj oceni doktorske disertacije.*

*Posebnu zahvalnost dugujem dr Ivici Dimkiću, višem naučnom saradniku Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Hvala vam što ste me upoznali sa laboratorijskim radom i zainteresovali za naučno-istraživački rad. Hvala za izdvojeno vreme i uloženi trud i za sve date savete, ideje i sugestije tokom izvođenja eksperimentalnog dela disertacije, obrade podataka i pisanja naučnih radova.*

*Želim da se zahvalim dr Ani Marjanović-Jeromeli, naučnom savetniku Instituta za ratarstvo i povrtarstvo – Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju za pomoć prilikom izvođenja eksperimentalnog dela doktorske disertacije i za obezbeđivanje sortimenta uljane repice neophodnih za istraživanja.*

*Hvala dr Črtomiru Tavzesu i dr Kelly Peeters sa Instituta Andrej Marušić, Univerziteta Primorska i dr Ani Miklavčić Višnjevec sa Fakulteta za matematiku, prirodne nauke i informacione tehnologije, Univerziteta Primorska za urađenu hemijsku analizu bakterijskih ekstrakata i pomoć tokom tumačenja dobijenih rezultata, koji su doprineli kvalitetu ove doktorske disertacije.*

*Veliku zahvalnost dugujem dr Sonji Veljović Jovanović, naučnom savetniku Instituta za multidisciplinarna istraživanja, Univerziteta u Beogradu na uključenju u naučno-istraživački rad, kao i na ukazanom poverenju i razumevanju tokom izrade ove doktorske disertacije.*

*Hvala kolegama sa Instituta za multidisciplinarna istraživanja, Univerziteta u Beogradu, Sanji Marković i Nikoli Šušiću za pomoć prilikom izrade disertacije, svakodnevnu podršku i prijateljstvo. Hvala kolegicama dr Mariji Vidović, dr Sonji Milić Komić, Bojani Živanović i Ani Sedlarević Zorić na kolegijalnosti i prijateljskoj atmosferi.*

*Želim da se zahvalim profesorima i saradnicima Katedre za mikrobiologiju Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, prof. dr Jeleni Knežević-Vukčević, prof. dr Branki Vuković-Gaćić, prof. dr Biljani Nikolić i dr Dragani Mitić Čulafić na pruženom teorijskom znanju. Hvala mladim kolegama dr Olji Medić, dr Stefani Cvetković, dr Ivanu Nikoliću, Tamari Pavlović, Stefani Đukanović, Jeleni Đorđević, Magdaleni Knežević, dr Tamari Janakiev, dr Jovani Jovanović Marić, dr Stoimiru Kolareviću, dr Karolini Sunjog, dr Jovani Kostić-Vuković, dr Bojani Vasilijević i dr Marini Jovanović na kolegijalnosti i prijatnoj atmosferi za rad.*

***Mojim roditeljima, sestri, tetki i prijateljima, za svu безусловnu ljubav koju mi svakodnevno pružate, za ogromnu podršku i razumevanje. Hvala što verujete u mene!***

## Karakterizacija i biološka kontrola *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* sa ozime uljane repice (*Brassica napus* L.)

### Sažetak

Bakterija *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* je nedavno opisana kao patogen ozime uljane repice u Srbiji. Istraživanja u ovom radu su sprovedena na kolekciji od 65 izolata dobijenih sa različitih genotipova ozime uljane repice tokom 2014., 2016. i 2018. godine sa 10 lokaliteta u Vojvodini. Postojanje intraspecijskog genetičkog diverziteta populacije je utvrđeno korišćenjem rep-PCR i MLST/MLSA metodologije. Rezultati su ukazali na postojanje sedam genetički različitih grupa kod testiranih izolata i postojanje pet tipova sekvenci (ST3, ST5, ST9, ST26 i ST47) na osnovu kombinacije determinisanih alelskih profila, među kojima je ST47 najzastupljeniji. Svi proučavani izolati su bili patogeni na uljanoj repici i utvrđena je osetljivost kod svih 50 testiranih linija, sorti i hibrida uljane repice kao i kod 6 testiranih *Brassica oleracea* (kupus, kelj, keleraba, brokoli, raštan, karfiol) domaćina. Rezultati patogenosti su ukazali na postojanje tri grupe izolata, visoke, srednje i slabe virulentnosti. Metabarkoding analiza uticaja bakterije *X. campestris* pv. *campestris* na sastav autohtonih mikrobijalnih zajednica filofsere i rizofsere uljane repice pokazala je da je kod obolelih biljaka dolazilo do smanjenja bakterijskog diverziteta filofsere i zastupljenosti potencijalno korisnih bakterijskih rodova. Izolacijom tri biokontrolna agensa (*Bacillus velezensis* izolat X5-2, *Bacillus megaterium* izolat X6-3 i *Pseudomonas orientalis* izolat X2-1P) poreklom sa filofsere zdravih i zaraženih biljaka uljane repice sprovedena su istraživanja mogućnosti suzbijanja bakterije *X. campestris* pv. *campestris* u *in vitro* i *in vivo* uslovima. Takođe, u radu je dokazan genetički potencijal ovih izolata za produkciju lipopeptida i antibiotika, što je potvrđeno i hemijskom analizom njihovih ekstrakata.

**Ključne reči:** *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, ozima uljana repica, genetički diverzitet, patogenost, krug domaćina, biološka kontrola, *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., metabarkoding

**Naučna oblast:** Biologija

**Uža naučna oblast:** Mikrobiologija, Fitopatologija

# Characterization and biological control of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* from winter oilseed rape (*Brassica napus* L.)

## Abstract

*Xanthomonas campestris* pv. *campestris* was described recently as a pathogen of winter oilseed rape in Serbia. This research was performed on a collection of 65 isolates obtained from different winter oilseed rape genotypes during 2014, 2016, and 2018 from 10 localities in Vojvodina. Intraspecies genetic diversity within the population was determined using rep-PCR and MLST/MLSA. Results indicated the existence of seven genetically distinct groups of tested isolates and five sequence types (ST3, ST5, ST9, ST26, and ST47) based on a combination of determined allelic profiles, with ST47 being the most common. All tested isolates were pathogenic on oilseed rape. All 50 tested lines, varieties, and hybrids of oilseed rape, as well as six tested *Brassica oleracea* (cabbage, kale, kohlrabi, broccoli, collard greens, cauliflower) hosts were susceptible to the tested isolates. The pathogenicity results indicated the existence of three groups of isolates showing high, medium, and low virulence. Metabarcoding analysis of the influence of the bacterium *X. campestris* pv. *campestris* on the composition of indigenous microbial communities of the oilseed rape phyllosphere and rhizosphere showed the reduction of bacterial diversity and abundance of potentially beneficial bacterial genera in the phyllosphere of diseased plants. By isolation of three biocontrol agents (*Bacillus velezensis* X5-2, *Bacillus megaterium* X6-3, and *Pseudomonas orientalis* X2-1P) from the phyllosphere of healthy and diseased oilseed rape plants, their possibility to control *X. campestris* pv. *campestris* was tested *in vitro* and *in vivo*. Within this work, the genetic potential of these isolates to produce lipopeptides and antibiotics was proven and confirmed by the chemical analysis of their extracts.

**Keywords:** *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, winter oilseed rape, genetic diversity, pathogenicity, host range, biological control, *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., metabarcoding

**Scientific field:** Biology

**Scientific subfield:** Microbiology, Plant pathology

## SADRŽAJ:

1. UVOD.....	1
1.1. Uljana repica ( <i>Brassica napus</i> L.).....	1
1.2. <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> (Pammel) Dowson.....	2
1.3. Primena molekularnih metoda za identifikaciju i karakterizaciju <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> .....	4
1.4. Mikrobiota/mikrobiom biljaka i DNK metabarkoding.....	6
1.5. Biološka kontrola <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> .....	8
2. CILJEVI RADA.....	11
3. MATERIJAL I METODE.....	12
3.1. Materijal .....	12
3.1.1. Bakterijski sojevi korišćeni u istraživanju .....	12
3.1.2. Hranljive podloge za kultivaciju bakterija.....	12
3.2. Metode.....	14
3.2.1. Uzorkovanje.....	14
3.2.1.1. Uzorkovanje biljnog materijala za izolaciju <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> .....	14
3.2.1.2. Sakupljanje uzoraka filofsere i rizofsere za metabarkoding analizu i izolaciju potencijalnih antagonističkih <i>Bacillus</i> spp. i <i>Pseudomonas</i> spp. izolata.....	15
3.2.2. Metode za izolaciju fitopatogenih i potencijalnih antagonističkih sojeva .....	15
3.2.2.1. Izolacija <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> .....	15
3.2.2.2. Izolacija potencijalnih antagonističkih sojeva bakterija.....	16
3.2.3. Metode za ispitivanje patogenosti i virulentnosti izolata <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> .....	17
3.2.3.1. Patogenost izolata <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> na ozimoj uljanoj repici.....	17
3.2.3.2. Određivanje kruga domaćina <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> .....	18
3.2.3.3. Ispitivanje osetljivosti sortimenta uljane repice prema <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> .....	18
3.2.4. <i>In vitro</i> i <i>in vivo</i> testovi za ispitivanje biokontrolnog potencijala izolata <i>Bacillus</i> spp. i <i>Pseudomonas</i> spp. ....	19
3.2.4.1. Ispitivanje antagonističke aktivnosti pune kulture izolata <i>in vitro</i> .....	19
3.2.4.2. Sposobnost izolata <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> da produkuju biofilm.....	19
3.2.4.3. Ispitivanje antagonističke aktivnosti supernatanata <i>in vitro</i> .....	20
3.2.4.4. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti <i>in vivo</i> .....	20
3.2.5. Molekularne metode za identifikaciju i karakterizaciju <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> .....	21
3.2.5.1. Izolacija DNK.....	21
3.2.5.2. Preliminarna molekularna identifikacija primenom specifičnih prajmera .....	21
3.2.5.3. Repetitive element palindromic PCR (rep-PCR).....	22
3.2.5.4. Genotipizacija i analiza sekvenci više genskih lokusa (MLST/MLSA) .....	23
3.2.5.5. Određivanje srodnosti izolata <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> primenom analize zasnovane na alelima .....	25
3.2.6. Molekularne metode za identifikaciju i karakterizaciju antagonističkih izolata .....	26
3.2.6.1. Izolacija DNK.....	26
3.2.6.2. Molekularna identifikacija i karakterizacija antagonističkih izolata .....	26
3.2.6.3. Filogenetska analiza.....	29



3.2.7. Ispitivanje sastava mikrobijalnih zajednica filofsere i rizofsere ozime uljane repice primenom metabarkoding analize .....	30
3.2.7.1. Izolacija totalne DNK i NGS sekvenciranje.....	30
3.2.7.2. Obrada podataka i taksonomska anotacija .....	31
3.2.8. Hemijska analiza sekundarnih metabolita antagonističkih izolata.....	31
3.2.8.1. Ekstrakcija sekundarnih metabolita antagonističkih izolata.....	31
3.2.8.2. Gasna hromatografija-masena spektrometrija (GC–MS).....	32
3.2.8.3. Tečna hromatografija visokih performansi spregnuta sa elektrosprej jonizacijom i kvadrupol TOF masenom spektrometrijom (HPLC-ESI-qTOF/MS) .....	32
3.2.9. Statistička obrada podataka .....	33
<b>4. REZULTATI.....</b>	<b>34</b>
4.1. Simptomi na ozimjoj uljanoj repici prouzrokovani sa <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> .....	34
4.2. Izolacija i preliminarna molekularna identifikacija <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> .....	35
4.3. Utvrđivanje genetičkog diverziteta <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> .....	36
4.3.1. Rep-PCR.....	36
4.3.2. MLST/MLSA .....	38
4.3.3. Analiza zasnovana na alelima .....	40
4.4. Patogenost <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> izolata sa ozime uljane repice .....	41
4.4.1. Patogenost na ozimjoj uljanoj repici .....	41
4.4.2. Krug domaćina.....	43
4.4.3. Ispitivanje osetljivosti sortimenata uljane repice na <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> .....	44
4.5. Metabarkoding analiza .....	47
4.5.1. Bakterijski diverzitet filofsere i rizofsere ozime uljane repice .....	47
4.5.2. Analiza sastava mikrobijalnih zajednica filofsere i rizofsere ozime uljane repice .....	51
4.6. Izolacija potencijalnih biokontrolnih sojeva .....	56
4.7. Ispitivanje antagonističke aktivnosti izolata <i>in vitro</i> .....	56
4.7.1. Ispitivanje antagonističke aktivnosti punih kultura izolata.....	56
4.7.2. Sposobnost <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> sojeva da produkuju biofilm.....	58
4.7.3. Ispitivanje antagonističke aktivnosti supernatanata izolata .....	58
4.8. Molekularna identifikacija antagonističkih izolata .....	59
4.9. Hemijska karakterizacija produkata antagonističkih izolata.....	61
4.9.1. GC-MS analiza .....	61
4.9.2. HPLC-ESI-qTOF/MS analiza.....	63
4.10. <i>In vivo</i> biokontrolna aktivnost odabranih antagonističkih izolata .....	68
<b>5. DISKUSIJA.....</b>	<b>70</b>
<b>6. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>78</b>
<b>7. LITERATURA.....</b>	<b>81</b>
<b>8. PRILOZI.....</b>	<b>99</b>

# **1. UVOD**

## 1. UVOD

### 1.1. Uljana repica (*Brassica napus* L.)

Uljana repica (fam. Brassicaceae) je prirodna hibridna vrsta [alelotetraploid (n=19, AACC)], koja je tokom evolucije nastala spontano, procesom aloploidije, nakon nekoliko nezavisnih događaja fuzije gena repe (*Brassica rapa* L.; n=10, AA genom) i mediteranskog kupusa (*Brassica oleracea* L.; n=9, CC genom) (Chalhoub et al., 2014; Sharma et al., 2014). Smatra se da je ova mlada biljna vrsta nastala tokom poslednjih 7500 godina ljudske istorije bavljenja poljoprivredom (Chalhoub et al., 2014; Mason & Snowdon, 2016). Poreklo je još uvek nepoznato; pojedini istraživači veruju da potiče iz Sredozemlja, dok drugi veruju da postoji više centara porekla (OECD, 2012; Rakow, 2004). Baranyk & Fábry (1999) tvrde da uljana repica vodi poreklo iz Jugoistočne Azije, Zapadne i Jugozapadne Evrope, smatrajući ova područja „genskim centrima“ na kojima su pronađeni najstariji podaci o poreklu ove biljne vrste. Evropa, Kanada, Kina, Indija i Australija su danas vodeća područja proizvodnje uljane repice u svetu (Zheng et al., 2020). Prema poslednjem popisu poljoprivrede u Republici Srbiji iz 2012. godine, uljana repica je pored suncokreta (*Helianthus annuus* L.; fam. Asteraceae) i soje (*Glycine max* L.) Merr.; fam. Fabaceae) opisana kao najznačajnija industrijska biljka (Republički zavod za statistiku, 2012). Na veliki značaj ove gajene kulture u Srbiji ukazuje i kontinuirani trend povećanja požnjevene površine pod uljanom repicom, koja je prema podacima Statističkog godišnjaka za Republiku Srbiju (*engl.* Statistical Yearbook of the Republic of Serbia 2018 and 2019, <https://www.stat.gov.rs>) povećana skoro četiri puta u periodu od 2015. (12,226 ha) do 2018. (45,628 ha) godine. Požnjevene površine uljane repice u 2019. i 2020. godini u Srbiji, redom su iznosile 30,804 ha i 24,638 ha (Statistički godišnjak Republike Srbije 2021). Iako agroekološki uslovi u Srbiji omogućavaju proizvodnju obe forme uljane repice (ozima i jara), ozima uljana repica je zbog većeg prinosa zastupljenija, dok se jara forma uzgaja samo za specifične namene (Marjanović-Jeromela & Prodanović, 2021). Uljana repica je značajna zbog produkcije semena sa visokim sadržajem ulja (40 – 48%) i proteina (18 – 25%), koje ima višestruku primenu, pre svega u prehrambenoj industriji, za proizvodnju ulja za ljudsku prehranu, ali se koristi i u tehničke svrhe, u industriji sapuna, boja, tekstila, kože, kozmetike, lekova i dr. (Marinković et al., 2009). Ova medonosna biljka je glavna sirovina za proizvodnju biodizela u Srbiji i u zemljama Evropske Unije (Tomić et al., 2009; EUBIA, 2019). Ostaci od ekstrakcije ulja (sačma), ali i kompletna biljna masa, koriste se za ishranu domaćih životinja (preživara i nepreživara) (Marinković et al., 2009).

Na prinos uljane repice mogu uticati razni abiotički i biotički faktori (Neik et al., 2017). Među bakterijskim patogenima se na uljanoj repici u literaturi navode *Pseudomonas destructans* (*Erwinia carotovora* var. *carotovora*, vlažna trulež), *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (lisna pegavost) i *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (simptomi nalik bakterioznoj plamenjači) (Balaž, 2007; Popović et al., 2013a, 2014, 2019; Francisco et al., 2016). Među najčešćim i najštetnijim bolestima mikozne prirode su suva trulež, prouzrokovana gljivom *Phoma lingam* (anamorfna forma; teleomorfne forme *Leptosphaeria maculans* i *L. biglobosa* – rak stabla i suva trulež korena uljane repice) i bela trulež prouzrokovana gljivom *Sclerotinia sclerotiorum* (Mitrović & Trkulja, 2010; Schmidt et al., 2021). U Evropi, Kanadi i Australiji, gde su patogene gljive *L. maculans* i *L. biglobosa* sveprisutne, gubici prinosa uljane repice se kreću između 5 i 50% (Zheng et al., 2020). Gubici prinosa prouzrokovani gljivom *Sclerotinia sclerotiorum* u Velikoj Britaniji procenjuju se na 50%, u Nemačkoj na 70%, a u Kini dostižu čak 80% (Koch et al., 2007; Zhou et al., 2014). Od drugih gljivičnih patogena lista uljane repice, značajni su *Alternaria brassicae* i *A. brassicicola* (crna pegavost lista i mahuna), *Peronospora parasitica* (plamenjača), *Albugo candida* (bela rđa) i *Erysiphe cruciferarum* (pepelnica) (Saharan et al., 2005; Antonijević & Mitrović, 2007; Mehta, 2019). Procenjeno je da gubici prinosa uljane repice usled zaraze *Erysiphe cruciferarum* dostižu 30% u Indiji, Turskoj, Poljskoj i Americi (Runno-Paurson et al., 2021). Od najznačajnijih štetnih insekata koji napadaju uljanu repicu opisani su mušica repičine (kopusne) ljuške (*Dasineura brassicae*), pipa repičine ljuške (*Ceutorhynchus assimilis*), mala i velika repičina pipa (*C. pallidactylus* i *C. napi*), crna repičina pipa (*C. picitarsis*), crvenoglavi repičin buvač (*Psylliodes*

*chrysocephala*), repičin sjajnik (*Brassicogethes aeneus*), buvači (*Phyllotreta* spp.), repičina lisna osa (*Athalia rosae*) (Alford et al., 2003; Mitrović et al., 2009; Milovanović et al., 2019).

### 1.2. *X. campestris* pv. *campestris* (Pammel) Dowson

Taksonomska pozicija:

Domen: Bacteria

Razdeo: Proteobacteria

Klasa: Gammaproteobacteria

Red: Xanthomonadales

Familija: Xanthomonadaceae

Rod: *Xanthomonas*

Vrsta: *X. campestris* pv. *campestris*

Bakterija *X. campestris* pv. *campestris* je prvi put detektovana od strane Pammel (1895a,b) 1892. godine na repi u Ajovi (SAD), kada je opisana kao *Bacillus campestris*. Nakon ovog nalaza, pojava *X. campestris* pv. *campestris* je primećena u svim područjima gajenja biljaka iz familije Brassicaceae (kupusnjače). Dowson je 1939. godine, nakon detaljnog ispitivanja odgajivačkih i biohemijskih karakteristika velikog broja Gram-negativnih fitopatogenih bakterija determinisao postojanje tri grupe/roda: (a) *Bacterium*, (b) *Pseudomonas* i (c) *Xanthomonas* (Dowson, 1939). U grupu/rod *Xanthomonas* svrstane su sve nesporulišuće, štapičaste, Gram-negativne bakterije sa jednom flagelom, retko biflagelarne ili nepokretne, koje formiraju krupne, žute, sluzave kolonije na hranljivom agaru. Na osnovu predložene klasifikacije, *Bacillus campestris* je preimenovan u *Xanthomonas campestris*. Ova vrsta je dalje podeljena na šest patovara (*aberrans*, *armoraciae*, *barbareae*, *campestris*, *incanae*, *raphani* i *plantaginis*) prema poreklu sa različitih kupusnjača (Vauterin et al., 1995).

Pored podele *X. campestris* na patovare, na osnovu biljke domaćina sa koje vode poreklo, *X. campestris* pvs. *campestris*, *raphani*, *malvacearum*, *phaseoli* i *vesicatoria* su dalje podeljeni na tipove (*engl.* physiological race) na osnovu interakcije (kompatibilne ili inkompatibilne) sa diferencijalnim sortama (Vicente et al., 2001; Cruz et al., 2017). Trenutno je opisano postojanje ukupno 11 *X. campestris* pv. *campestris* tipova (1 – 11) od strane različitih autora (Vicente & Holub, 2013; Afrin et al., 2019). Fitopatogena bakterija *X. campestris* pv. *campestris* je inicijalno bila podeljena na pet tipova (0 – 4) na osnovu interakcije sa diferencijalnim *Brassica* sortama: *B. oleracea* (Early Jersey Wakefield); *B. rapa* (Just Right Turnip, Tokyo Turnip Hybrid i Seven Top Turnip) i *B. juncea* (Florida Broad Leaf India Mustard) (Kamoun et al., 1992). Vicente et al. (2001) su naknadno, na osnovu ispitivanja većeg broja sojeva kolekcije *X. campestris* pv. *campestris* ukazali na postojanje ukupno šest *X. campestris* pv. *campestris* tipova (1 – 6). Dalja istraživanja su dovela do otkrivanja tri dodatna *X. campestris* pv. *campestris* tipa 7, 8 i 9 (Jensen et al., 2007, 2010; Fargier & Manceau, 2007), a Cruz et al. (2017) su nedavno u Portugalu determinisali još dva nova tipa, označena kao tip 10 i 11. Najzastupljeniji i najvirulentniji *X. campestris* pv. *campestris* tipovi u svetu su 1 i 4, dok su tipovi 2, 3, 5 i 6 veoma retki (Vicente & Holub, 2013). Tip-sorta specifičnost je zasnovana na specifičnoj interakciji između bakterijskih efektoru i biljnih receptora. Geni koji kodiraju efektore su podložni horizontalnom transferu, što dovodi do inkompatibilnosti između filogenetskih klastera i pripadnosti rasi. Novije studije otkrivaju da je horizontalni transfer gena imao važnu ulogu u evoluciji *X. campestris* i u stvaranju mozaične strukture *Xanthomonas* genoma (Lima et al., 2008).

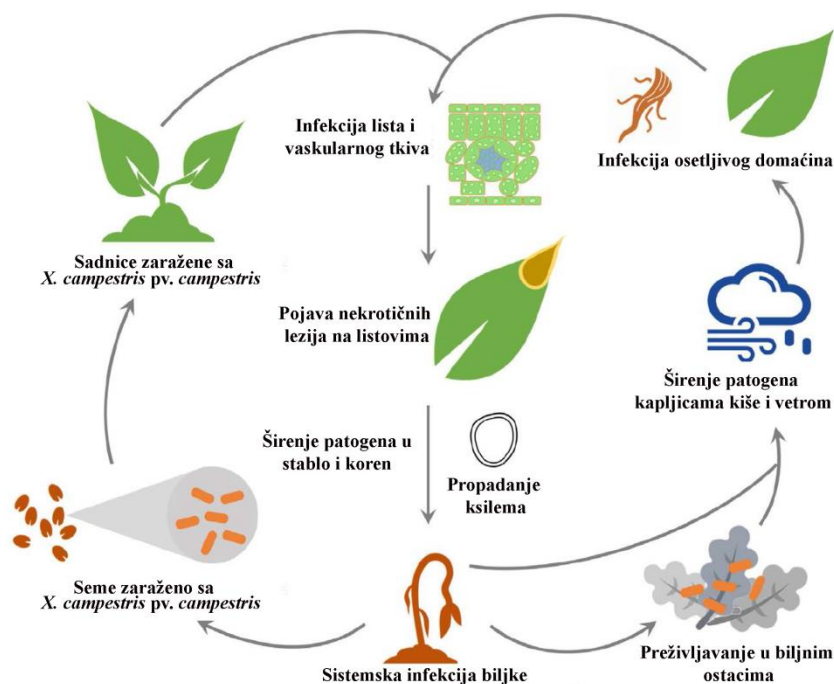
Bakterija *X. campestris* pv. *campestris* je širom sveta prisutna kao prouzrokovatelj crne truleži (*engl.* black rot) biljaka iz familije Brassicaceae (kupusnjača), pre svega različitih varijeteta *Brassica oleracea* [kupus (*B. oleracea* var. *capitata*), karfiol (*B. oleracea* var. *botrytis*), brokoli (*B. oleracea* var. *italica*), kelj (*B. oleracea* var. *sabauda*), prokelj (*Brassica oleracea* var. *gemmifera*), keleraba (*B. oleracea* var. *gongylodes*), raštan (*B. oleracea* var. *acephala*)], uljane repice, slačice (*Brassica nigra*), rotkvice (*Raphanus sativus*), hrena (*Rorippa armoracia*), kres salate (*Lepidium sativum*), određenih sorti model biljke *Arabidopsis thaliana* i određenih korovskih vrsta i ukrasnih biljaka (*Capsella bursa pastoris* i *Matthiola* spp.) (Swings et al., 1993; Vicente & Holub, 2013;

Popović et al., 2013a, 2013b, 2014, 2019). *Boerhaavia erecta* iz familije Nyctaginaceae je takođe opisana kao domaćin *X. campestris* pv. *campestris* (Swings et al., 1993).

Svojim negativnim uticajem na rast i razvoj domaćina, prinos i njegov kvalitet, bakterija *X. campestris* pv. *campestris* dovodi do značajnih ekonomskih gubitaka (Lema et al., 2011; Vicente & Holub, 2013; da Silva et al., 2018). Štete izazvane ovim patogenom procenjuju se na više od 50% na kupusu i između 50 – 70% na karfiolu (Gupta et al., 2013). Na osnovu dostupnih podataka Evropske i mediteranske organizacije za zaštitu bilja (*engl.* European and Mediterranean Plant Protection Organization, EPPO) prema štetama koje prouzrokuje, *X. campestris* pv. *campestris* se od 2013. godine nalazi na A2 listi u Jordanu, a od 2018. godine na listi karantinskih patogena u Brazilu i na A1 listi u Meksiku (<https://gd.eppo.int/taxon/XANTCA/categorization>).

*X. campestris* pv. *campestris* je Gram-negativna, aerobna bakterija, štapićastog oblika, sa jednom polarnom flagelom, nesorulišuća, oksidaza-negativna, katalaza-pozitivna, hidrolizuje želatin i eskulin, ne redukuje nitrate, obrazuje vodonik-sulfid, amonijak i indol i produkuje kiselinu iz arabinoze, glukoze, galaktoze ksiloze, manoze, maltoze, saharoze, laktoze, ali ne iz skroba, eskulina i dulcita (Arsenijević, 1997; Aksoy et al., 2018).

Bakterija *X. campestris* pv. *campestris* je vaskularni patogen koji u biljku ulazi preko hidatoda, vodenih pora na listu, sličnih stomama, koje su zadužene za gutaciju i koje su kod kupusnjača smeštene duž ivice lista (Kawamura et al., 2010; Cerutti et al., 2017). Pored hidatoda, kao glavnih mesta prodora, ova bakterija može inficirati biljku domaćina i preko stoma ili određenih mehanički nastalih ozleda na listu ili korenu biljke (Köhl & van der Wolf, 2005). Do transmisije *X. campestris* pv. *campestris* može doći i putem zaraženog semenskog materijala, raspadanjem zaraženih biljnih ostataka u zemljištu, kišnim kapima, insektima, korišćenjem nesterilnog alata ili sa susednih zaraženih biljaka (gajenih domaćina ili korovskih vrsta) (Slika 1; Kuan et al., 1986; Dzhililov & Tiwari, 1995; Cerutti et al., 2017).



**Slika 1.** Životni ciklus *X. campestris* pv. *campestris* (preuzeto i adaptirano iz An et al., 2020).

Dokazano je da nezavisno od domaćina ova bakterija može preživeti u zemljištu između 20 i 40 dana u zavisnosti od godišnjeg doba (leto/zima), ali i do dve godine ukoliko je vezana za biljne ostatke u zemljištu, na taj način služeći kao izvor inokuluma (Schaad & White, 1974; Dane & Shaw, 1996; An et al., 2020). Ciklus infekcije *X. campestris* pv. *campestris* može se podeliti na dve faze: (i) epifitnu, koja počinje kada bakterija dospe na lisnu površinu biljke domaćina i koja traje do njenog prodora u tkivo domaćina i (ii) endofitnu fazu koja počinje u trenutku kada bakterija prodre

u biljku domaćina i kolonizuje je (An et al., 2020). Na epifitno preživljavanje predstavnika iz roda *Xanthomonas* povoljno utiču nešto više temperature (25 – 35 °C), koje podstiču multiplikaciju bakterije, kao i visoka vlažnost, koja podstiče otvaranje stoma i hidatoda kod biljaka i na taj način doprinosi inicijalnoj infekciji i širenju patogena (Christiano et al., 2009; Zeng et al., 2010). Strategija za epifitno preživljavanje *Xanthomonas* spp. je produkcija žutog pigmenta ksantomonadina koji ima funkciju zaštite od intenzivnog sunčevog zračenja (UV-A i UV-B) koje oštećuje DNK, membrane i proteine (An et al., 2020). Za vezivanje za lisnu površinu, predstavnici iz roda *Xanthomonas* koriste različite adhezione strategije, kao što su bakterijski površinski polisaharidi, adhezioni proteini i pilusi tipa IV, a nakon inicijalnog vezivanja, održavaju se formiranjem struktura sličnih biofilmu (Petrocelli et al., 2012; Pradhan et al., 2012; Dunger et al., 2014; An et al., 2020).

Prema istraživanju Hugouvieux et al. (1998), pod povoljnim uslovima spoljašnje sredine, najčešće u jutarnjim časovima, kada se iz hidatoda na ivicama lista izlučuje obilna količina tečnosti u vidu kapljica (gutacija), može doći do kontaminacije sa epifitno prisutnim bakterijama. Povlačenjem tako kontaminiranih kapljica vode nazad u hidatodne šupljine, patogen dospeva u sprovodni (vaskularni) sistem biljke. Takođe, nakon dostizanja visoke gustine populacije u unutrašnjosti biljke, bakterija se vraća na lisnu površinu, odakle se prenosi na druge biljke putem vetra, kišnih kapi i na taj način započinje novi ciklus infekcije (Moreira et al. 2015). Po ulasku u hidatode i započinjanju endofitne faze životnog ciklusa, *X. campestris* pv. *campestris* se sistemski širi kroz ksilemske elemente, dovodeći do njihovog crnila usled nagomilavanja melanina (Sutton & Williams, 1970). Crnilo lisnih nerava je ujedno i prvi simptom koji ukazuje na prisustvo patogena *X. campestris* pv. *campestris* u biljci. Svojom multiplikacijom u sprovodnom tkivu domaćina i obilnom produkcijom ekstracelularnog polisaharida ksantana, patogen onemogućava protok vode kroz biljku, dovodeći do vodnog stresa (Gupta et al., 2013). Usled nemogućnosti prolaska kroz ksilemske sprovodne elemente, voda se nagomilava u listu, formirajući vodene pege, koje naknadno postaju hlorotične i finalno nekrotične. Nekrotične pege izazvane sa *X. campestris* pv. *campestris* kreću od ivica lista, a tokom progresije bolesti šire se ka lisnoj bazi, formirajući oblik latiničnog slova „V“. Usled povoljnih uslova spoljašnje sredine (visoka temperatura i vlažnost), koji omogućavaju prenamnožavanje bakterije, može doći do sistemske infekcije i truleži cele biljke.

Bakterija *X. campestris* pv. *campestris* je na teritoriji Srbije prvi put opisana kao prouzročivač crne truleži 1960-ih godina na usevima stočnog kelja (*B. oleracea* var. *sabellica*), kada je intenzitet zaraze u polju procenjen na 80% (Perišić & Panić, 1964). Kasnije su simptomi prouzrokovani sa *X. campestris* pv. *campestris* detektovani i na drugim gajenim kupusnjačama: kupusu, karfiolu i kelju (Jovanović et al., 1997; Obradović & Arsenijević, 1999). Popović et al. (2013a, 2019) su opisali pojavu *X. campestris* pv. *campestris* i na različitim jarim *B. oleracea* usevima (kupusu, karfiolu, brokoliju, kelju, kelerabi i raštanu ) u Srbiji. Prva pojava *X. campestris* pv. *campestris* na uljanoj repici u Srbiji, primećena je na samoniklom usevu domaće sorte ozime uljane repice Slavica (Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad) na teritoriji Bačke (Vojvodina) u septembru 2010. godine (Popović et al., 2013b, 2014). Nakon toga, od 2014. godine bolest se kontinuirano javlja na usevima ozime uljane repice (Popović et al., 2019). Oskudni su literaturni izvori o pojavi *X. campestris* pv. *campestris* na uljanoj repici u svetu i uglavnom predstavljaju samo prve nalaze (Leite et al., 1994; Gaetán & López, 2005) ili se odnose na ispitivanje osetljivosti/rezistentnosti ovog domaćina na *X. campestris* pv. *campestris* tipove (Ignatov et al., 2000; Lema et al., 2011; Islam et al., 2017).

### **1.3. Primena molekularnih metoda za identifikaciju i karakterizaciju *X. campestris* pv. *campestris***

Konvencionalne mikrobiološke tehnike za detekciju i identifikaciju fitopatogenih bakterija iz roda *Xanthomonas* podrazumevaju izolaciju organizma od interesa na polu-selektivnim i selektivnim podlogama, njegovo prečišćavanje do čiste bakterijske kulture i izvođenje unapred određenih biohemijskih i seroloških testova i testova patogenosti (Leite et al., 1994). Međutim, razlikovanje patovara na osnovu morfoloških i biohemijskih osobina nije moguće, a često je teško

čak i pomoću testova patogenosti (Bila et al. 2013). S odzirom da je kultivacija bakterija dugotrajan proces (3 – 10 dana), naročito kada su u pitanju sporo rastuće bakterije u koje spada i *X. campestris* pv. *campestris*, razvijanje PCR metoda za brzu detekciju je bilo od velikog značaja (Roohie & Umesha, 2012; Singh et al., 2014). Specifična PCR amplifikacija visoko konzerviranog gena *hrp* (*engl.* hypersensitive response and pathogenicity), koji je zadužen za hipersenzitivni odgovor i patogenost i koji je od ključne važnosti za uspostavljanje interakcije između fitopatogene bakterije i njenog domaćina, omogućava brzu preliminarnu detekciju *X. campestris* pv. *campestris* u uzorku. Primena specifičnih prajmera za rutinsku detekciju fitopatogenih bakterija je preporučena u većini protokola EPPO (Palacio-Bielsa et al. 2009; Peňázová et al., 2015). Takođe, Međunarodno udruženje za ispitivanje semena (*engl.* International Seed Testing Association, ISTA) je od 2013. godine predložilo upotrebu DNK markera kao alternativu testovima patogenosti u cilju lakšeg prevazilaženja problema razlikovanja *X. campestris* pv. *campestris* sojeva od blisko srodnih *Xanthomonas* patovara (ISTA, 2013). Za specifičnu identifikaciju *X. campestris* pv. *campestris* u različitim studijama, predloženi su parovi prajmera XCF/XCR, Dhrrp\_Xcc\_F/Dhrrp\_Xcc\_R i Zup2309/ Zup2310, koji umnožavaju različite regione *hrpF* gena (Park et al., 2004; Rijlaarsdam et al., 2004; Singh et al., 2016). Pored postojanja specifičnih prajmera za detekciju samog patogena u poslednje vreme se sve više pažnje posvećuje konstruisanju specifičnih prajmera koji bi mogli omogućiti determinaciju tipa *X. campestris* pv. *campestris*, bez potrebe za korišćenjem diferencijalnih *Brassica* sorti. Do sada su u literaturi poznati tip-specifični prajmeri za detekciju *X. campestris* pv. *campestris* tipova 1 – 6 (Rubel et al., 2017, 2019; Afrin et al., 2018, 2019, 2020).

*X. campestris* je izrazito genetički heterogena vrsta, koja se tokom evolucije značajno menjala (Fargier et al., 2011). Upravo zbog genetičke heterogenosti, za karakterizaciju i ispitivanje genetičkog diverziteta *X. campestris*, sve više se koriste različite molekularne metode, kao što su DNK profilisanje (*engl.* DNA fingerprinting), genotipizacija i analiza sekvenci više genskih lokusa (*engl.* Multilocus sequence typing/analysis, MLST/MLSA) i sekvenciranje genoma, koje zamenjuju (ili dopunjuju) konvencionalne mikrobiološke tehnike (Young et al., 2008; Almeida et al., 2010; Singh et al., 2016). Sekvenciranjem gena za 16S rRNK *Xanthomonas* spp., dobijaju se sekvence koje su ili potpuno homogene ili nisu dovoljno različite da bi mogle omogućiti razlikovanje blisko srodnih vrsta u okviru ovog roda. Minimalne nukleotidne razlike koje se mogu detektovati u sekvencama gena za 16S rRNK, predstavljaju slučajne mutacije koje su se zadržale u genomu bez (ili sa ograničenim) evolucionog pritiska (Hauben et al., 1997). Kako bi se stekao bolji uvid u genetičku stukturu velikog broja patogenih i nepatogenih bakterija, od 1998. godine intenzivno je počeo da se primenjuje MLST pristup za njihovu identifikaciju i karakterizaciju (Maiden, 2006). Ovaj pristup je zasnovan na sekvenciranju najmanje četiri (obično sedam ili osam) gena koji kodiraju esencijalne metaboličke funkcije (Maiden, 2006; Almeida et al., 2010). Smatra se da su mutacije na ovim genima neutralno selekcionisane zbog čega je verovatnije da će omogućiti tačan uvid u filogeniju sojeva (Gevers et al., 2005). Dve MLST šeme sa različitom kombinacijom konzerviranih gena su predložene za identifikaciju i genetičku karakterizaciju bakterija iz roda *Xanthomonas* i to: (i) Young et al. (2008): *dnaK* (molekularni šaperon DnaK), *fyuA* (tonB-zavisni receptor), *gyrB* (DNK žiraza B) i *rpoD* (RNK polimeraza sigma faktor RpoD); (ii) Almeida et al. (2010): *fusA* (elongacioni faktor G), *gapA* (glicerilalhid-3-fosfat dehidrogenaza A), *gltA* (citril sintaza), *gyrB*, *lacF* (PTS sistem laktoza-specifična EIIA komponenta), *lepA* (elongacioni faktor 4).

Podaci dobijeni primenom MLST metode se sve češće deponuju u javno dostupne elektronske baze podataka [NCBI (Nacionalni centar za biotehnoške informacije; *engl.* National Center for Biotechnology Information) i PAMDB (Baza podataka fitopatogenih bakterija, *engl.* Plant-Associated Microbes Database)], kako bi se istraživačima širom sveta omogućio pristup podacima i poređenje sekvenci sojeva bakterija, bez potrebe za transportom ili brige o karantinskim regulativama zemalja. Pored genetičkih podataka (sekvenci i genoma), u ove baze se za svaki soj takođe deponuju podaci o lokalitetu izolacije bakterije, datumu, kao i domaćinu sa koga sojevi vode poreklo. Sve ovo omogućava da se, pored istraživanja vezanih za evolucionu i populacionu genetiku, ispituje i epidemiologija bolesti (Almeida et al. 2010).

MLSA metoda se zasniva na primeni MLST pristupa za utvrđivanje filogenetskih odnosa između vrsta i omogućava detektovanje i merenje nivoa rekombinacija (Fargier et al., 2011). Utvrđivanje nivoa rekombinacija je od velike važnosti kod *Xanthomonas* vrsta jer je u njihovoj evolucionoj istoriji važnu ulogu imao horizontalni transfer gena (Patil et al., 2007). Vrste *X. campestris* pv. *campestris*, *X. campestris* pv. *raphani* i *X. campestris* pv. *incanae* se ekološki razlikuju po tipu interakcije sa svojim domaćinom i po krugu domaćina, na osnovu čega se može pretpostaviti da su *X. campestris* patovari zapravo ekotipovi, koji su evoluirali od iste inicijalne (predačke) populacije i adaptirali se na različite domaćine (Cohan et al., 2001; Fargier et al., 2011). Kod roda *Xanthomonas* posebno je evidentno da smene domaćina izazivaju genetičke adaptacije koje su povezane sa pozitivno selekcionisanim genima, naročito onim ključnim za infekciju biljaka (Lu et al., 2008; Huang et al., 2015). Kod *X. campestris* pv. *campestris* sojeva sa ozime uljane repice iz Srbije primećena je značajna genetička heterogenost. S druge strane, *X. campestris* pv. *campestris* sojevi izolovani sa jarih useva *B. oleracea* domaćina (brokoli, karfiol, keleraba, kelj, kupus, raštan), takođe iz Srbije, pokazali su genetičku homogenost, pri čemu determinisani genotip *X. campestris* pv. *campestris* izolata poreklom sa ovih domaćina nije odgovarao nijednom od tri determinisana genotipa za *X. campestris* pv. *campestris* izolate poreklom sa ozime uljane repice (Popović et al., 2019). Prilikom ispitivanja kruga domaćina *X. campestris* pv. *campestris* izolata sa ozime uljane repice, isti autori su dokazali da postoji veća specifičnost (veći i statistički značajan virulentni potencijal) prema uljanoj repici, nego prema drugim ispitivanim domaćinima (brokoli, karfiol, keleraba, kelj, kupus, raštan). Zbog svega navedenog, kao i zbog nedavne pojave *X. campestris* pv. *campestris* na ozimnoj uljanoj repici u Srbiji (Popović et al., 2013b), ova studija je bila usmerena na ispitivanje postojanja adaptivne evolucije *X. campestris* pv. *campestris* na ovog domaćina.

Pored primene MLSA za interpretaciju rezultata MLST analize, Feil et al. (2004) su predložili korišćenje goeBURST (*engl.* globally optimized implementation of the eBURST algorithm) algoritma, zasnovanog na determinaciji alelskih profila za svaki od sekvenciranih (najčešće sedam) konzerviranih gena i određivanju njihove pripadnosti određenom tipu sekvence (*engl.* sequence type, ST) tj. genotipu na osnovu kombinacije alelskih profila. Primena ovog algoritma omogućava utvrđivanje predačkog genotipa i načina evolucije vrste. Analiza zasnovana na alelima primenjena je u nekoliko studija diverziteta bakterije *X. campestris* pv. *campestris*, ali sa različitim kombinacijama konzerviranih gena i to: (i) *atpD*, *dnaK*, *efp*, *fyuA*, *glnA*, *gyrB*, *rpoD* i *tpiA* (Fargier et al., 2011); (ii) *dnaK*, *fyuA*, *gyrB* i *rpoD* (Cruz et al., 2018; Popović et al., 2020); (iii) *atpD*, *dnaK*, *efp*, *fyuA*, *glnA*, *gyrB* i *rpoD* (Bella et al., 2019).

Kombinacija različitih molekularnih metoda je najbolji način za identifikaciju bakterija i za sticanje uvida u njihov genetički diverzitet, s obzirom da svaka metoda ima svoje prednosti i nedostatke u pogledu nivoa filogenetske i taksonomske rezolucije (Rademaker et al., 1998). Za ispitivanje genetičkog diverziteta, MLST se često koristi u kombinaciji sa rep-PCR (*engl.* Repetitive element palindromic PCR) metodom, zasnovanom na umnožavanju ponavljajućih sekvenci DNK koje su široko rasprostranjene u bakterijskim genomima (Versalovic et al., 1994). Korelacija između rezultata dobijenih primenom ove dve metode dostiže 70% (Popović et al., 2019; Chen et al., 2021). Najčešće korišćeni prajmeri za ispitivanje polimorfizma kod bakterija su zasnovani na REP (*engl.* Repetitive Extragenic Palindromic), ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) i BOX elementima.

#### **1.4. Mikrobiota/mikrobiom biljaka i DNK metabarkoding**

Mikrobiotu biljaka čine brojni mikroorganizmi (saprofiti i patogeni) koji mogu imati različit uticaj (direktan ili indirektan) na rast i zdravlje biljaka. Na sastav i diverzitet mikrobijalnih zajednica različitih biljnih organa utiču genotip biljke i različiti abiotski i biotski faktori (Song et al., 2020). Poljoprivredna praksa (način obrade zemljišta) takođe utiče na sastav i funkciju mikrobioma biljaka, ostavljajući pozitivne ili negativne posledice na rast biljaka (Hartman et al., 2018). Smatra se da „osnovni“ mikrobiom biljaka čine mikrobijalni taksoni koji su od ključne važnosti za preživljavanje biljke, a koji su kao takvi uspostavljeni kroz evolucione mehanizme



selekcije i neizostavan su deo holobionta određene biljne vrste ili određenog genotipa, bez obzira na spoljne uticaje (Lemanceau et al., 2017). Suprotno, „satelitski“ mikrobijalni taksoni su zastupljeni u malom broju, jer njihovo prisustvo direktno zavisi od specifičnosti staništa, ali oni i uprkos slaboj zastupljenosti imaju važnu ulogu u održavanju fitnesa biljaka kroz redukovanje broja neželjenih mikroorganizama (Compant et al., 2019).

Danas je sve više istraživanja usmereno na ispitivanje mikrobiote filofsfera i rizosfere biljaka, što direktno upućuje na značaj ova dva staništa. Kao što se koža kod ljudi i životinja smatra prvom linijom odbrane od patogena, filofsfera takođe ima ulogu u „odbrani“ biljaka od infekcije patogenima. Na uspostavljanje mikrobioma filofsfera utiču brojni disperzioni mehanizmi, kao što su kiša, taloženje aerosola posredovano vetrom, insekti, zemljište, prenos posredovan semenom itd. (Koskella, 2020). Međutim, direktna izloženost filofsfera promenljivim uslovima spoljašnje sredine [dostupnost vode i nutrijenata, UV radijacija, temperatura, aplikacija hemikalija (fertilizatora i pesticida)], ali i biotička komponenta (mikrobijalni kompetitori, predatori i paraziti) ne dozvoljavaju zadržavanje baš svih dospelih taksona na ovom staništu. Upravo zbog navedenih ograničavajućih faktora, filofsfera je manje bogata vrstama od rizosfere i zemljišta (Knief et al., 2012). Zemljište je povoljna niša za bakterije zbog relativno stabilne temperature i vlažnosti, ali ipak postoje brojne varijable koje oblikuju autohtone mikrobijalne zajednice ovog staništa: geografski položaj, struktura zemljišta, pH vrednost, veličina čestica zemlje, mineralni sastav, poljoprivredna praksa i sl. (Doornbos et al., 2012). Rizosfera je uzak sloj zemlje smešten neposredno uz koren, koji se smatra najkompleksnijim ekosistemom na zemlji, a koga čine bakterije, gljive, nematode, protozoe, alge, virusi, arhee i zglavkari (Raaijmakers et al., 2009). Na diverzitet mikroorganizama u rizosferi utiču genotip biljke i tip zemljišta koji je okružuje (Berendsen et al., 2012). Biljke direktno određuju mikrobijalni sastav rizosfere preko aktivne sekrecije komponenti (šećeri, organske kiseline, aminokiseline) iz korena, koje stimulišu ili potiskuju određene članove mikrobijalne zajednice (Doornbos et al., 2012). Interakcije između biljke i prisutih mikroorganizama u rizosferi i zemljištu mogu biti neutralne, korisne ili štetne, kada je reč o fitopatogenim mikroorganizmima (Raaijmakers et al., 2009). Mnoge nepatogene, zemljišne bakterije imaju sposobnost da podstiču rast biljaka (*engl.* plant growth-promoting rhizobacteria, PGPR), bilo direktno, preko produkcije fitohormona, solubilizacijom hranljivih materija i usvajanjem atmosferskog azota ili indirektno, supresijom zemljišnih patogena i štetnih organizama antagonističkim delovanjem (Dong et al., 2019) ili pokretanjem sistemske rezistencije biljke (*engl.* induced systemic resistance, ISR) (Kloepper et al., 2004).

Pojavom platformi za sekvenciranje naredne generacije (*engl.* next-generation sequencing, NGS), tehnologija sekvenciranja DNK je značajno unapređena, čime je omogućeno sticanje uvida u sastav mikrobijalnih zajednica različitih staništa, ali i u njihove kompleksne međusobne interakcije (Shendure & Ji, 2008; Joos et al., 2020). DNK metabarkoding tehnologija se najčešće koristi za utvrđivanje strukture i dinamike mikrobijalnih zajednica u određenom uzorku, kroz analizu relativne zastupljenosti i taksonomskog diverziteta (Peiffer et al., 2013; Degruene et al., 2017). Nastanak ove i sličnih tehnologija, kao što su metagenomika, metatranskriptomika i metaproteomika, podstaknut je nemogućnošću kultivacije velikog broja mikroorganizama (više od 99%) u laboratorijskim uslovima, usled čega se ne može proučavati i shvatiti njihova ekologija (Leveau, 2007). Imajući u vidu izneseno, utvrđivanje mikrobijalnog diverziteta je omogućeno izolacijom sredinske DNK (*engl.* environmental DNA, eDNA), koja predstavlja mešavinu genomskih DNK različitih organizama pronađenih u uzorku iz prirode (Ladin et al., 2021). Nakon izolacije DNK, sledeći korak u DNK metabarkoding analizi je amplifikacija i visokoprotočno sekvenciranje (*engl.* high-throughput sequencing) specifičnog barkod regiona: 16S za bakterije, 18S za većinu eukariota i ITS (*engl.* internal transcribed spacer) regiona za gljive (Abdelfattah et al., 2018). Uzorkovanje materijala, izolacija DNK i PCR amplifikacija se moraju izvesti sa velikom pažnjom, jer ove procedure mogu značajno uticati na kvalitet i diverzitet dobijenih sekvenci. Kako su mikroorganizmi sveprisutni, mora se voditi računa o kontaminaciji. Nepažljivo uzorkovanje, kao i kontaminacije rastvora, pufera i reagenasa koji se koriste tokom izolacije DNK, prečišćavanja i amplifikacije, mogu dovesti do pogrešnih rezultata i/ili porasta diverziteta (Salter et al., 2014).

Mnoge studije su pokazale da su istraživanja ovakvog tipa značajna za razumevanje rasta i zdravlja biljaka, ali i za uspostavljanje održive poljoprivredne prakse kroz otkrivanje prisustva potencijalno korisnih izolata koji bi mogli naći primenu u biološkoj kontroli (Berg et al., 2014; Dong et al., 2019). Platforme za visokoprotočno sekvenciranje koje se najviše koriste u studijama mikrobioma su 454 pirosekvenciranje, Illumina MiSeq, HiSeq i NextSeq sistemi i Thermo Fisher Scientific IonTorrent i IonProton sistemi (Beckers et al., 2016).

Nekoliko prethodnih studija je koristilo metode nezavisne od kultivacije, visokoprotočno sekvenciranje (454 pirosekvenciranje, HiSeq i MiSeq Illumina platforme) i RNK-stabilno targetiranje izotopa (*engl.* RNA-stable isotope probing) za ispitivanje mikrobioma korena, izdanaka i rizosfere uljane repice i zemljišta na kome se uljana repica uzgaja (Gkarmiri et al., 2017; Rathore et al., 2017; Tian et al., 2017; Monreal et al., 2018; Petrova et al., 2020). Međutim, nema literaturnih podataka o ispitivanju mikrobioma filofsfe uljane repice, kao ni o uticaju prisustva *X. campestris* pv. *campestris* na autohtone mikrobijalne zajednice filofsfe i rizosfere različitih sorti, linija i hibrida uljane repice.

### 1.5. Biološka kontrola *X. campestris* pv. *campestris*

Do sada su za suzbijanje crne truleži izazvane infekcijom *X. campestris* pv. *campestris* korišćeni različiti agrotehnički, fizički, hemijski i biološki pristupi koji pokazuju različitu efikasnost (Liu et al., 2016). Pod agrotehničkim merama se podrazumeva rotacija useva sa biljkama iz drugih familija koje nisu prirodni domaćini *X. campestris* pv. *campestris*, gajenje biljaka na poljima na kojima nisu gajene kupusnjače najmanje dve godine, drenaža i isušivanje zemljišta (Mew & Natural, 1993). Fizički tretman semena toplom vodom (na 50 °C u trajanju od 25 minuta) može značajno redukovati broj bakterija u semenu (Nega et al. 2003). Od hemijskih preparata za suzbijanje *X. campestris* pv. *campestris* trenutno se najviše koriste preparati na bazi bakra koji se smatraju najefikasnijim za suzbijanje patogena iz roda *Xanthomonas* (An et al., 2020). Međutim, prekomerna primena ovog teškog metala u kontroli patogena ostavlja negativne posledice na ljudsko zdravlje i biodiverzitet (Lamichhane et al., 2018). Pojava bakar-rezistentnih *X. campestris* pv. *campestris* sojeva je još jedan od neželjenih efekata do koga može doći usled prekomerne primene ovakvih baktericida, što na kraju dovodi do smanjenja njihove efikasnosti (Lugo et al., 2013; Behlau et al., 2017). U zemljama u kojima je dozvoljeno korišćenje antibiotika u zaštiti bilja, za suzbijanje *Xanthomonas* spp. se koriste antibiotici: streptomycin, oksitetraciklin, hinolon, kasugamicin i dr.; međutim, uprkos velikoj efikasnosti u početnim stadijumima korišćenja, njihova intenzivna upotreba brzo dovodi do razvijanja rezistentnosti (Vallad et al., 2010; Kim et al., 2016; Sundin & Wang, 2018). Shodno navedenom, hemijski preparati se sve više zamenjuju ekološki prihvatljivim i bezbednim biološkim baktericidima, koji podrazumevaju upotrebu mikroorganizama kao biokontrolnih agenasa u supresiji bolesti (Monteiro et al., 2005).

Za termin biokontrolni agens može se upotrebiti slična definicija kao za probiotik: „živi mikroorganizam/mi koji kada se primeni/e u adekvatnim količinama ima/ju koristan efekat na domaćina“ (Hill et al., 2014; Legein et al., 2020). Da bi ispoljili svoja korisna svojstva, biokontrolni agensi moraju biti adaptirani na abiotske (sredinske) i biotske (domaćin-specifične) faktore. Iako je faktor adaptacije često zanemaren u biokontrolnim istraživanjima, slaba efikasnost biokontrolnih agenasa u poljskim uslovima je najčešće uslovljena upravo njihovom neadekvatnom adaptacijom, pre nego lošom biokontrolnom aktivnošću (Zeriuouh et al., 2014). Kolonizacija i postojanost na biljnoj površini ili u zemljištu se smatraju glavnim izazovima kada je u pitanju primena bakterijskih biokontrolnih agenasa. Varijabilnost sredinskih faktora utiče na adaptibilnost biokontrolnih agenasa, a samim tim i na njihov uspeh u suzbijanju bolesti. Ovo je od posebne važnosti u suzbijanju patogena koji inficiraju nadzemne delove biljke, jer su oni izloženi velikim fluktuacijama u temperaturi, vlažnosti i dostupnosti nutrijenata, što ih čini izrazito nepristupačnim staništima. Kako bi prevazišle „problem“ nepristupačnih staništa, bakterije su razvile različite mehanizme, kao što su pokretljivost izazvana flagelama, formiranje biofilma i dr. (Harshey, 2003). Mikroorganizmi koji naseljavaju rizosferu smatraju se idealnim za primenu u biološkoj kontroli, jer rizosfera predstavlja prvu liniju odbrane korena od zemljišnih patogena (Weller, 1988). Takođe, autohtoni

bakterijski izolati sa filozofere mogu redukovati broj folijarnih patogena, što je ekološki efikasna strategija s obzirom da zauzimaju istu ekološku nišu kao i fitopatogeni (Thapa & Prasanna, 2018). Mikrobijalni biokontrolni agensi štite biljke od patogena direktno (interakcija biokontrolni agens – patogen) ili indirektno (biokontrolni agens – domaćin), primenom tri načina delovanja: (i) direktna antibioza koja podrazumeva produkciju sekundarnih metabolita sa antimikrobnom aktivnošću [isparljiva organska jedinjenja (*engl.* volatile organic compounds, VOCs), lipopeptide, antibiotike], (ii) kompeticija za prostor i neophodne nutrijente i (iii) indukcija sistemske rezistencije kod biljaka (Fira et al., 2018; Massawe et al., 2018; Calvo et al., 2020). Pod terminom indukovana sistemska rezistencija podrazumeva se indukovano stanje rezistentnosti kod biljaka koje je izazvano delovanjem bioloških ili hemijskih agenasa, a koje omogućava zaštitu neekspoziranih delova biljke od budućih napada patogenih mikroorganizama ili štetnih insekata (Pieterse et al., 2014). Produkcija antimikrobnih metabolita sa širokim spektrom aktivnosti detektovana je kod biokontrolnih bakterija iz rodova *Bacillus*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Serratia*, *Stenotrophomonas*, *Streptomyces* i dr. (Köhl et al., 2019). Pored navedenih antagonističkih mehanizama, poznato je da *Bacillus* spp. i *Pseudomonas* spp, imaju važnu ulogu i u promociji rasta biljaka, podstičući biosintezu biljnih hormona (giberelinska kiselina i indol-3-sirćetna kiselina) (Chen et al., 2007).

Vrste iz roda *Bacillus* su sveprisutne, kako u terestričnim, tako i u vodenim ekosistemima. Predstavnici ovog roda imaju sposobnost da se brzo dele, otporni su na nepovoljne uslove spoljašnje sredine usled jedinstvene sposobnosti da formiraju endospore i imaju širok spektar biokontrolne aktivnosti. Sa tehničke strane gledišta, *Bacillus* vrste se zbog sposobnosti da formiraju spore smatraju najboljim kandidatima za formulaciju efikasnih biopesticidnih proizvoda, jer imaju visok nivo rezistencije koja je neophodna za formulaciju stabilnog i dugotrajnog proizvoda (Ongena & Jacques, 2008). Od sekundarnih metabolita sa antimikrobnom aktivnošću koje produkuju predstavnici iz roda *Bacillus*, najveća pažnja se poklanja lipopeptidima iz porodica surfaktina, iturina [iturini (A–E), mikosubtilini, bacilomicini] i fengicina (ili plipastatina) sa dužinama lanaca masnih kiselina od C<sub>12</sub> – C<sub>16</sub>, C<sub>14</sub> – C<sub>17</sub>, C<sub>12</sub> – C<sub>19</sub>, redom (Ongena et al., 2007; Ongena & Jacques, 2008; Pathak et al., 2014a). Pored navedenih lipopeptida, 2000. godine je otkrivena i lipopeptidna familija kurstakina kod soja *Bacillus thuringiensis* sa biokontrolnom aktivnošću protiv *Stachybotrys charatum* (Hathout et al., 2000). U kojoj meri i koje sekundarne metabolite će bakterija proizvoditi skoro isključivo zavisi od uslova kultivacije (priroda staništa, temperatura, vlažnost itd.). Važno je istaći da navedena jedinjenja deluju inhibitory na patogene čak i u malim koncentracijama, kao i da njihova aktivnost može biti poboljšana ako deluju sinergistički (Nyvall, 2019).

Predstavnici iz roda *Pseudomonas* poseduju mnoge osobine koje ih čine pogodnim agensima za biokontrolu i promociju rasta biljaka: (i) brz rast – sposobnost masovne proizvodnje; (ii) sposobnost za brzim iskorišćavanjem eksudata semena i korena; (iii) brza kolonizacija i multiplikacija u različitim nišama (rizosfera, unutrašnjost biljke); (iv) proizvode širok spektar bioaktivnih metabolita (antibiotici, siderofore, isparljiva organska jedinjenja i supstance koje podstiču rast biljaka); (v) agresivni su kompetitori za resurse sa drugim mikroorganizmima i (vi) prilagođavaju se sredinskim stresovima (Weller, 2007). Glavne komponente koje su zaslužne za biokontrolnu aktivnost *Pseudomonas* spp. su fenazini, floriglukonoli, pioluteorini, pirolnitrini, ciklični lipopeptidi, cijanovodonik, litički enzimi i isparljiva organska jedinjenja (Gross & Loper, 2009).

Lipopeptidi koje produkuju *Bacillus* spp. i *Pseudomonas* spp. su pored direktnog antagonizma uključeni i u vezivanje bakterijskih ćelija za biljnu površinu, kao i u formiranje biofilma koji štiti mikroorganizme od nepovoljnih uticaja okoline. Neki antibiotici, posebno lipopeptidi, omogućavaju lakšu pokretljivost bakterija, najverovatnije menjanjem viskoznosti kolonizovanih površina (Köhl et al., 2019). Takođe, surfaktini i fengicini su nedavno opisani kao pokretači indukovane sistemske rezistencije u biljci domaćinu (Zeriuoh et al., 2014). Za fengicine i iturine je dokazano da uglavnom imaju izraženu antifungalnu aktivnost, a nešto slabiju antibakterijsku i antiviralnu, dok surfaktini imaju najizraženiju antibakterijsku i antiviralnu aktivnost (Deleu et al., 2008; Li et al., 2019).

Brojne dosadašnje studije su potvrdile sposobnost različitih *Bacillus* spp. (*B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. pumilus*, *B. thuringiensis*, *B. velezensis*, i dr.) i *Pseudomonas* spp. (*P. aeruginosa*, *P. fluorescens*) da suprimiraju zarazu sa *X. campestris* pv. *campestris* (Wulff et al., 2002; Massomo et al., 2004; Singh et al., 2010; Mishra and Arora, 2012; Liu et al., 2016). Ranija biokontrolna istraživanja patogena uljane repice uglavnom su bila zasnovana na suzbijanju različitih gljivičnih patogena (*A. brassicae*, *Botrytis cinerea*, *L. maculans*, *P. lingam*, *Verticillium longisporum*, *S. sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani*) primenom raznih *Bacillus* spp. (*B. amyloliquefaciens*, *B. endophyticus*, *B. subtilis*) i *Pseudomonas* spp. (*P. alcaligenes*, *P. fluorescens*, *P. chlororaphis*) sojeva u *in vitro* i/ili poljskim uslovima (Fiddaman & Rossall, 1995; Liu, 2003; Danielsson et al., 2007; Yang et al., 2009; Hu et al., 2011; Omar et al., 2012; Duke et al., 2017). Nema dostupnih podataka o primeni biokontrolnih agenasa za suzbijanje bakterioza na uljanoj repici.

## **2. CILJEVI RADA**

## 2. CILJEVI RADA

Imajući u vidu prvu pojavu 2010. godine, a nakon toga i redovnu pojavu bakterije *X. campestris* pv. *campestris*, na usevima ozime uljane repice u Srbiji, ciljevi ovog istraživanja bili su:

1. Formiranje kolekcije izolata *X. campestris* pv. *campestris* poreklom sa različitih sorti, linija i hibrida ozime uljane repice i sa različitih lokaliteta u Vojvodini (Srbija) tokom tri godine ispitivanja (2014, 2016. i 2018).
2. Ispitivanje genetičkog diverziteta populacija *X. campestris* pv. *campestris* poreklom sa uljane repice.
3. Ispitivanje patogenosti *X. campestris* pv. *campestris* izolata na ozimoj uljanoj repici i određivanje kruga domaćina u okviru gajenih vrsta iz porodice Brassicaceae (kupusnjača).
4. Utvrđivanje osjetljivosti sortimenta (sorti, linija i hibrida) uljane repice prema izolatima *X. campestris* pv. *campestris*.
5. Ispitivanje uticaja *X. campestris* pv. *campestris* na mikrobijalni diverzitet filofsere i rizofsere različitih sorti, linija i hibrida ozime uljane repice primenom metabarkoding analize.
6. Izolacija i identifikacija potencijalnih biokontrolnih agenasa iz rodova *Bacillus* i *Pseudomonas* sa filofsere i iz rizofsere različitih sorti, linija i hibrida ozime uljane repice sa i bez simptoma prouzrokovanih bakterijom *X. campestris* pv. *campestris*.
7. Ispitivanje biokontrolnog potencijala odabranih *Bacillus* i *Pseudomonas* vrsta i to njihovih punih kultura i supernatanata prema izolatima *X. campestris* pv. *campestris* u *in vitro* i *in vivo* uslovima.
8. Ispitivanje postojanja genetičkog potencijala odabranih antagonističkih izolata (*Bacillus* spp. i *Pseudomonas* spp.) za sintezu antimikrobnih supstanci (lipopeptida i antibiotika) i hemijska detekcija antimikrobnih supstanci u njihovim ekstraktima.

### **3. MATERIЈAL I METODE**

### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1. Materijal

##### 3.1.1. Bakterijski sojevi korišćeni u istraživanju

Sojevi *X. campestris* pv. *campestris* poreklom sa ozime uljane repice iz Srbije, koji su prethodno okarakterisani kao genetički različiti u studijama Popović et al. (2013, 2019), korišćeni su kao referentni u ovom istraživanju. Sojevi su preuzeti iz kolekcije fitopatogenih bakterija dr Tatjane Popović (Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Odsek za bolesti bilja, Beograd, Srbija). Šifre sojeva, lokalitet, godina izolacije, kao i tip ozime uljane repice sa koje sojevi vode poreklo, prikazani su u Tabeli 1.

Pored referentnih sojeva iz Srbije, u sva istraživanja je bio uključen i *X. campestris* pv. *campestris* patotip soj NCPPB528 (=P25, =ATCC33913, =DSM3586, =LMG568, =ICMP13, =PDDCC13, =CCUG47691), izolovan sa prokelja u Velikoj Britaniji 1957. godine. Patotip soj je poručen iz Nacionalne kolekcije fitopatogenih bakterija (*engl.* National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, Fera Science Ltd, NCPPB).

**Tabela 1.** Referentni sojevi *X. campestris* pv. *campestris* sa ozime uljane repice iz Srbije

Šifra soja	Tip ozime uljane repice	Lokalitet	Godina izolacije	Referenca
Xc2010 (=CFBP 8912)	Slavica	Novi Sad (Južnobački okrug)	2010	Popović et al. 2013
Xc6 (=NCPBP4678, =CFBP 8914)	Banačanka	Kovilj (Južnobački okrug)	2014	
Xc9 (=NCPBP4679, =CFBP 8915)	Banačanka	Kovilj (Južnobački okrug)	2014	
Xc20	Nepoznat	Novi Sad (Južnobački okrug)	2014	
Xc23 (=NCPBP4680, =CFBP 8916)	Nepoznat	Novi Sad (Južnobački okrug)	2014	Popović et al. 2019
Xc27 (=NCPBP4681, =CFBP 8917)	Nepoznat	Novi Sad (Južnobački okrug)	2014	
Xc30	Nepoznat	Novi Sad (Južnobački okrug)	2014	
Xc31 (=NCPBP4682, =CFBP 8918)	Nepoznat	Novi Sad (Južnobački okrug)	2014	
Xc32	Nepoznat	Novi Sad (Južnobački okrug)	2014	

NCPPB – Nacionalna kolekcija fitopatogenih bakterija (*engl.* National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, Fera Science Ltd)

CFBP – Francuska kolekcija fitopatogenih bakterija (*engl.* French Collection of Plant associated bacteria, INRA)

##### 3.1.2. Hranljive podloge za kultivaciju bakterija

##### Glukoza kvašćev ekstrakt kalcijum karbonat agar (*engl.* Yeast extract dextrose-calcium carbonate agar, YDC)

Ekstrakt kvasca	10 g
Glukoza	20 g
CaCO <sub>3</sub>	20 g
Agar	15 g
dH <sub>2</sub> O	1000 ml

##### Luria bujon (*engl.* Luria Broth, LB)

Tripton	10 g
Ekstrakt kvasca	5 g
NaCl	5 g
dH <sub>2</sub> O	1000 ml

##### Luria agar (LA)

Tripton	10 g
Ekstrakt kvasca	5 g
NaCl	5 g
Agar	15 g
dH <sub>2</sub> O	1000 ml



**LA soft**

Tripton	10 g
Ekstrakt kvasca	5 g
NaCl	5 g
Agar	7,5 g
dH <sub>2</sub> O	1000 ml

**Podloga za ukupan broj bakterija (engl. Plate Count Agar, PCA), HiMedia Laboratories**

PCA	23,5 g
dH <sub>2</sub> O	1000 ml

**Cetrimidni agar (engl. Cetrimide Agar), HiMedia Laboratories**

Cetrimidni agar	45,3 g
Glicerol	10 ml
dH <sub>2</sub> O	1000 ml

**Minimalni medijum MSM (engl. Mineral Salt Medium, pH 7,0)**

NaNO <sub>3</sub>	3 g
MgSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O	0,5 g
KCl	0,5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,1 g
FeSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O	0,01 g
Ekstrakt kvasca	5 g
Glicerol	1%
dH <sub>2</sub> O	1000 ml

**3.1.3. Rastvori****TE pufer, pH 7,6**

10 mM TRIS	0,036 g
0.5 mM EDTA	60 µl
dH <sub>2</sub> O	30 ml

**3% CTAB, pH 8,0**

CTAB	30 g
1M TRIS	121,14 g
1.4M NaCl	81,816 g
0.5 mM EDTA	40 ml
dH <sub>2</sub> O	1000 ml

**5 × TBE, pH 8,0**

0,5 M EDTA	10 ml
50 mM TRIS	54,48 g
Borna kiselina	27 g
dH <sub>2</sub> O	1000 ml

**Kristal violet**

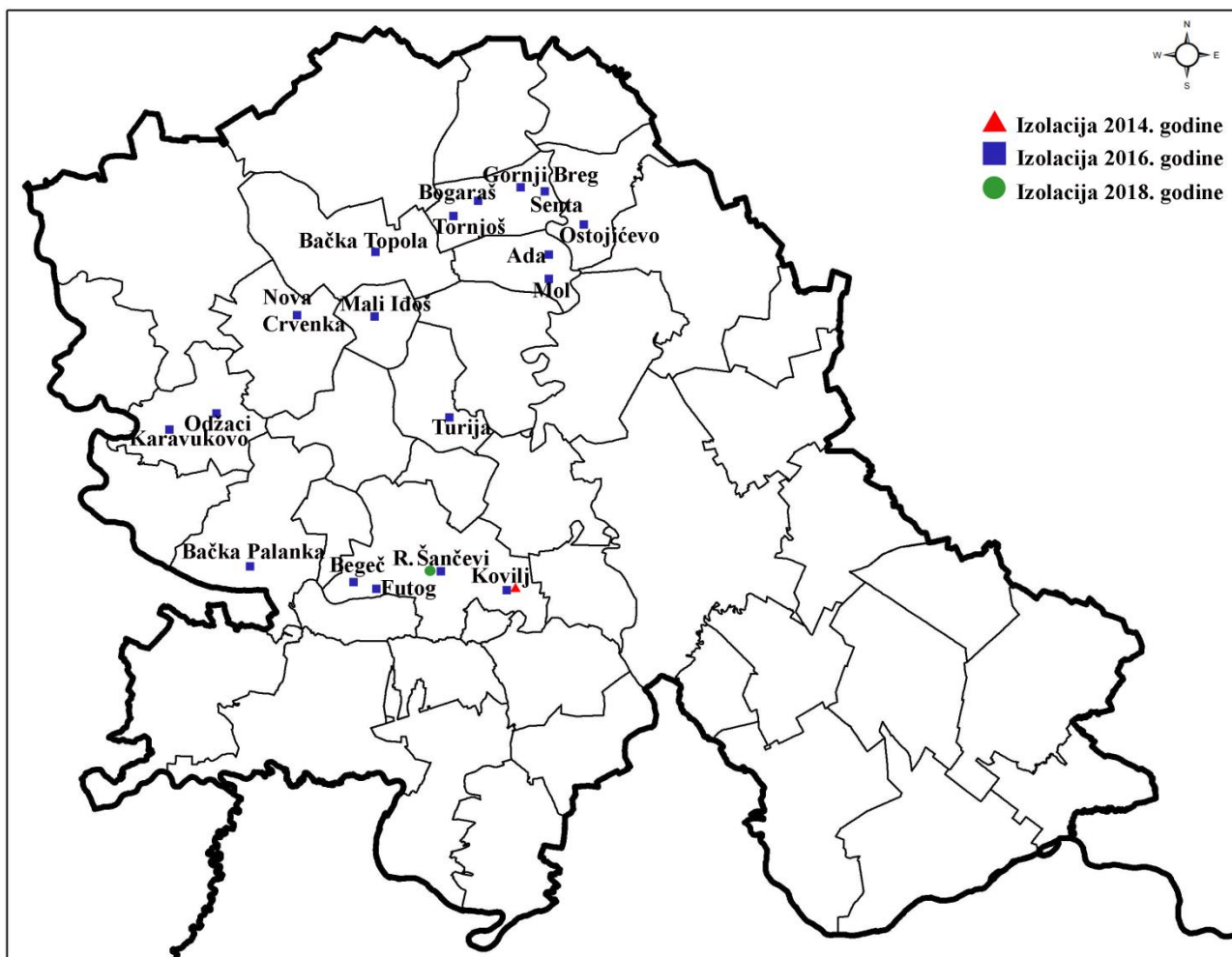
Kristal violet	2 g
Etanol 96%	20 ml
Amonijum oksalat	0,8 g
dH <sub>2</sub> O	80 ml

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Uzorkovanje

#### 3.2.1.1. Uzorkovanje biljnog materijala za izolaciju *X. campestris* pv. *campestris*

Tokom tri godine ispitivanja (2014, 2016. i 2018) sa različitih sorti, linija i hibrida ozime uljane repice, gajenih na različitim lokalitetima na teritoriji Vojvodine [regije Bačka (južna, severna i zapadna) i severni Banat], prikupljeni su uzorci u cilju formiranja kolekcije izolata bakterije *X. campestris* pv. *campestris* (Slika 2). Uzorci su se sastojali od lišća na kojima su bile vidljive nekrotične lezije u vidu latiničnog slova „V“ (Slika 3). Podaci o lokalitetima sa GPS koordinatama, godini uzorkovanja, sorti, liniji ili hibridu ozime uljane repice sa kojih je sakupljen biljni materijal za izolaciju, prikazani su u Tabeli 2.



**Slika 2.** Mapa Vojvodine sa lokalitetima uzorkovanja biljaka ozime uljane repice za izolaciju *X. campestris* pv. *campestris*. Izolacija 2014. godine ▲, izolacija 2016. godine ■, izolacija 2018. godine ●.

Sakupljanje uzoraka 2014. godine vršeno je na tri parcele na lokalitetu Kovilj u trenutku kada je ozima uljana repica (sorta Banačanka) bila u fenofazi početka izduživanja stabla (BBCH 30, Bleiholder et al., 2001).

Sakupljanje uzoraka tokom 2016. godine je vršeno tokom aprila i maja, na 18 lokaliteta na teritoriji Vojvodine, u trenutku kada je ozima uljana repica bila u fenofazama cvetanja (BBCH 60-69) i razvoja ploda (BBCH 71-79).

Sakupljanje uzoraka tokom 2018. godine vršeno je tokom maja sa sorti Kata i Nevena, linija SO 14 i jedne nepoznate linije i hibrida NS Ras, kada je ozima uljana repica bila u fenofazi razvoja

ploda (BBCH 75-79) na lokalitetu Rimski Šančevi (ekperimentalno polje Instituta za ratarstvo i povrtarstvo, Odeljenja za uljanu repicu i ostalo industrijsko bilje).

Sa svakog lokaliteta i/ili sorte, linije, hibrida ozime uljane repice, sakupljeno je po 10 biljaka za izolaciju bakterije *X. campestris* pv. *campestris*. Takođe, tokom rada praćeni su i klimatski uslovi (prosečna temperatura i količina padavina).



**Slika 3.** Simptomi na listovima ozime uljane repice prouzrokovani sa *X. campestris* pv. *campestris* (foto P. Mitrović; Jelušić et al., 2021a).

### **3.2.1.2. Sakupljanje uzoraka filofsere i rizofsere za metabarkoding analizu i izolaciju potencijalnih antagonističkih *Bacillus* spp. i *Pseudomonas* spp. izolata**

Tokom maja 2018. godine, paralelno sa sakupljanjem uzoraka za izolaciju *X. campestris* pv. *campestris*, sa istih biljaka su sakupljeni i uzorci filofsere i rizofsere koji su korišćeni za ispitivanje uticaja ove bakterije na sastav bakterijskih zajednica ova dva staništa, ali i za izolaciju potencijalnih antagonističkih sojeva iz rodova *Bacillus* i *Pseudomonas*. Pored biljaka sa ispoljenim simptomima infekcije (linija SO 14, sorte Kata i Nevena i hibrid NS Ras), sakupljeni su i uzorci sa sorte Zorica na kojoj simptomi zaraze sa *X. campestris* pv. *campestris* nisu bili vidljivi. Uzorci su se sastojali od po tri lista sa pet nasumično odabranih biljaka svake linije, sorte ili hibrida (ukupno 15 listova po jednom uzorku) i oko ukupno 10 g rizofsere (zbirno uzetih oko korena pet biljaka koje su činile dati uzorak).

### **3.2.2. Metode za izolaciju fitopatogenih i potencijalnih antagonističkih sojeva**

#### **3.2.2.1. Izolacija *X. campestris* pv. *campestris***

Neposredno pre početka izolacije, nečistoće sa sakupljenih listova su isprane pod tekućom vodom, nakon čega su listovi osušeni na sterilnom filter papiru na sobnoj temperaturi. Za izolaciju su uzimani sitni fragmenti listnog tkiva (veličine 2-3 mm), koji su obuhvatali prelazne zone između zdravog i nekrotičnog tkiva. Isećeni delovi su pomoću sterilnog tučka u avanu macerirani uz dodatak sterilne destilovane vode da bi se dobila suspenzija. Izolacija je vršena zasejavanjem dobijenog macerata metodom iscrpljivanja na YDC agar prethodno razliven u Petri kutije (prečnika 90 mm). Petri kutije su zatim inkubirane na temperaturi od  $26 \pm 1$  °C u trajanju od 72 sata. Pojedinačne kolonije koje su imale morfologiju nalik *X. campestris* pv. *campestris* (svetlo žute, konveksne i mukoidne bakterijske kolonije) su presejane na nove podloge kako bi se dobili izolati tj. čiste bakterijske kulture (Tabela 2). Svi izolati su dugoročno čuvani na  $-20$  °C u LB podlozi sa 30% (v/v) glicerola. Određena grupa izolata deponovana je u Francusku kolekciju fitopatogenih bakterija (*engl.* French Collection of Plant associated bacteria, INRA, Angers, Francuska, CFBP) (Tabela 2).

**Tabela 2.** Lista *X. campestris* pv. *campestris* izolata poreklom sa ozime uljane repice

Šifra izolata	Tip ozime uljane repice	Lokalitet	GPS koordinate	Godina izolacije	Potvrda specifičnim prajmerima
<b>Xc1</b> (=CFBP 8913) – Xc5	Banačanka	Kovilj (Južnobački okrug)	45°13'49.33"N 20° 0'50.00"E	2014	+
Xc7, Xc8	Banačanka	Kovilj (Južnobački okrug)	45°13'30.39"N 20° 0'39.06"E	2014	+
Xc14, Xc15	Banačanka	Kovilj (Južnobački okrug)	45°14'11.32"N 19°59'52.41"E	2014	+
Xc211 – Xc215	Nepoznat	Ada (Severnobanatski okrug)	45°49'31.11"N 20° 5'57.33"E	2016	+
Xc221 – Xc224	Nepoznat	Turija (Južnobački okrug)	45°31'41.33"N 19°49'57.66"E	2016	-
Xc231 – Xc234	Nepoznat	Senta (Severnobanatski okrug)	45°54'7.90"N 20° 5'5.53"E	2016	-
Xc241	Nepoznat	Mol (Severnobanatski okrug)	45°44'35.82"N 20° 7'3.31"E	2016	-
<b>Xc251</b> (=CFBP 8919) – Xc254	Nepoznat	Odžaci (Zapadnobački okrug)	45°29'10.01"N 19°17'51.77"E	2016	+
<b>Xc261</b> (=CFBP 8920) – Xc266	Nepoznat	Nova Crvenka (Zapadnobački okrug)	45°40'49.61"N 19°28'17.41"E	2016	+
<b>Xc271</b> (=CFBP 8921) – Xc275	Triangle	Karavukovo (Zapadnobački okrug)	45°29'51.41"N 19° 9'58.99"E	2016	+
Xc281 – Xc283	Nepoznat	Begeč (Južnobački okrug)	45°14'23.03"N 19°38'51.66"E	2016	-
<b>Xc291</b> (=CFBP 8922) – Xc294	Nepoznat	Futog (Južnobački okrug)	45°18'7.87"N 19°42'7.95"E	2016	+
<b>Xc301</b> (=CFBP 8923) – Xc305	Nepoznat	Kovilj (Južnobački okrug)	45°13'34.27"N 19°58'49.64"E	2016	+
Xc311 – Xc314	Banačanka	Rimski Šančevi (Južnobački okrug)	45°20'19.48"N 19°51'13.10"E	2016	+
<b>Xc321</b> (=CFBP 8924)	Nepoznat	Gornji Breg (Severnobanatski okrug)	45°54'58.13"N 20° 0'9.25"E	2016	+
Xc331	Nepoznat	Tornjoš (Severnobanatski okrug)	45°53'35.38"N 19°51'32.57"E	2016	-
<b>Xc341</b> (=CFBP 8925) – Xc343	Nepoznat	Bačka Topola (Severnobački okrug)	45°50'47.33"N 19°38'42.66"E	2016	+
<b>Xc361</b> (=CFBP 8926), Xc362	Nepoznat	Bačka Palanka (Južnobački okrug)	45°15'9.92"N 19°26'7.00"E	2016	+
Xc371	Nepoznat	Ostojićevo (Severnobanatski okrug)	45°53'28.87"N 20°11'11.14"E	2016	-
Xc381, Xc382	Nepoznat	Mali Idoš (Severnobački okrug)	45°41'39.82"N 19°41'4.69"E	2016	-
Xc391	Nepoznat	Bogaraš (Severnobanatski okrug)	45°54'42.89"N 19°56'10.45"E	2016	-
Xc412 – Xc416	SO 14	Rimski Šančevi (Južnobački okrug)	45°19'56.3"N 19°50'02.6"E	2018	+
Xc422 – Xc424	Nepoznat	Rimski Šančevi (Južnobački okrug)	45°19'51.6"N 19°50'02.7"E	2018	+
<b>Xc432</b> (=CFBP 8927) – Xc434	Kata	Rimski Šančevi (Južnobački okrug)	45°19'45.7"N 19°49'59.9"E	2018	+
Xc442, Xc443	Nevena	Rimski Šančevi (Južnobački okrug)	45°19'46.2"N 19°50'01.0"E	2018	+
Xc452 – Xc455	NS-Ras	Rimski Šančevi (Južnobački okrug)	45°19'46.4"N 19°50'02.2"E	2018	+

Izolati označeni sa „bold“ su odabrani kao reprezentativni za dalja istraživanja

### 3.2.2.2. Izolacija potencijalnih antagonističkih sojeva bakterija

Izolacija potencijalnih antagonističkih sojeva *Bacillus* spp. i *Pseudomonas* spp. rađena je sa filofsfera i iz rizofsfera biljaka ozime uljane repice sa ispoljenim simptomima zaraze sa *X. campestris* pv. *campestris* (linija SO 14, sorte Kata i Nevena, hibrid NS Ras) i sa zdravih biljaka, bez simptoma (sorta Zorica). Izolacija je rađena iz istih uzoraka koji su korišćeni za metabarkoding analizu.

Izolacija željenih bakterija iz uzoraka filofsfera rađena je na podlogama LA i cetrimidnom agaru, zasejavanjem po 50 µl suspenzija u 1 × PBS-u, koje su prethodno napravljene za metabarkoding analizu (potpoglavlje 3.2.7.1). Nakon zasejavanja, podloge su inkubirane preko noći na 30 °C.

Dodatno, protokol predložen u radu Berić et al. (2012) za termalnu inaktivaciju vegetativnih ćelija i njihovo razdvajanje od endospora, korišćen je za izolaciju *Bacillus* spp. sojeva iz filofsfera i rizofsfera. Priprema uzoraka za izolaciju rađena je u epruvenama sa 1 ml LB podloge u koje je stavljeno oko 1 g svakog od uzoraka. Termalna inaktivacija rađena je na 80 °C u trajanju od 1 minuta, nakon čega su uzorci inkubirani na 30 °C preko noći i zasejani na PCA podloge. Nakon 24 sata inkubacije, odabrane su sve kolonije koje su imale morfologiju nalik *Bacillus* sp. i *Pseudomonas* sp. i presejane na sveže LA podloge (Tabela 3). Prečišćeni izolati su dugoročno skladišteni na –20 °C u LB podlozi sa 30% (v/v) glicerola.

**Tabela 3.** Lista potencijalnih antagonističkih izolata dobijenih sa filofsere i iz rizofsere različitih tipova ozime uljane repice sa ili bez simptoma zaraze sa *X. campestris* pv. *campestris*

Šifra izolata	Tip ozime uljane repice	Poreklo	Preživljavanje na 80 °C	Morfologija kolonija na LA podlozi
<b><i>Bacillus</i> sp. izolati</b>				
X1-1	linija SO 14	filosfera	+	Kremasto-bele, kožaste, ravne, nepravilne ivice, difuzan rast
X1-2	linija SO 14	filosfera	+	Bele, neprozirne, okrugle, ispupčene, glatke
X1-3	linija SO 14	filosfera	+	Bele, neprozirne, ravne, okrugle, nepravilne ivice
<b>X2-1</b>	linija SO 14	filosfera	+	Bele, neprozirne, ravne, okrugle, nepravilne ivice
X2-2	linija SO 14	filosfera	+	Bele, ispupčene, kožaste, okrugle
X2-3	linija SO 14	filosfera	+	Ravne kolonije sa belom, neprozirnom sredinom i prosvetljenom rozetom nepravilnog oblika
<b>X3-1</b>	sorta Kata	filosfera	+	Bele, ravne, prozirne, mat, nepravilne ivice
X3-2	sorta Kata	filosfera	+	Ravne kolonije sa belom, neprozirnom sredinom i prosvetljenom rozetom nepravilnog oblika
X4-1	sorta Nevena	filosfera	+	Bele, ravne, mat, nepravilne ivice
X4-2	sorta Nevena	filosfera	+	Kremasto-bele, ispupčene, okrugle, sluzave
X5-1	hibrid NS Ras	filosfera	+	Bele, kožaste, ispupčene, okrugle
<b>X5-2</b>	hibrid NS Ras	filosfera	+	Bele, kožaste, ravne, nepravilne ivice, difuzan rast
X6-1	sorta Zorica	filosfera	+	Bele, ispupčene, kožaste, okrugle
<b>X6-2</b>	sorta Zorica	filosfera	+	Ravne kolonije sa belom, neprozirnom sredinom i prosvetljenom rozetom nepravilnog oblika
<b>X6-3</b>	sorta Zorica	filosfera	+	Kremasto-bele, srednje do velike, okrugle, ispupčene
X7-1	linija SO 14	rizosfera	+	Bele, ispupčene, kožaste, okrugle
X7-2	linija SO 14	rizosfera	+	Bele, asimetrične, dlakave, difuzan rast u snopovima
X7-3	linija SO 14	rizosfera	+	Kremasto-bele, ravne, okrugle, nepravilne ivice
<b>X8-1</b>	linija SO 14	rizosfera	+	Bele, ispupčene, kožaste, okrugle
<b>X8-2</b>	linija SO 14	rizosfera	+	Kremasto-bele, kožaste, ravne, nepravilne ivice, difuzan rast
<b>X8-3</b>	linija SO 14	rizosfera	+	Ravne kolonije sa belom, neprozirnom sredinom i prosvetljenom rozetom nepravilnog oblika, sitne
X10-1	sorta Nevena	rizosfera	+	Bele, neprozirne, ispupčene, okrugle, sluzave
X10-2	sorta Nevena	rizosfera	+	Bele, kožaste, ispupčene, okrugle
<b>X11-1</b>	hibrid NS Ras	rizosfera	+	Kremasto-bele, kožaste, ravne, nepravilne ivice, difuzan rast
X11-2	hibrid NS Ras	rizosfera	+	Kremasto-bele, okrugle, oblik kratera, sitne
<b>X12-1</b>	sorta Zorica	rizosfera	+	Kremasto-bele, kožaste, ravne, nepravilne ivice, difuzan rast
X12-2	sorta Zorica	rizosfera	+	Bele, ispupčene, kožaste, okrugle
<b><i>Pseudomonas</i> sp. izolati</b>				
X1-1PB	linija SO 14	filosfera	-	Žute, ravne, srednje do velike, sredina neprozirna sa prozirnom rozetom nepravilnog oblika
X1-1PMF	linija SO 14	filosfera	-	Žute, ispupčene, okrugle, fluorescentne na CA podlozi
<b>X1-2PMF</b>	linija SO 14	filosfera	-	Žute, ravne, mat, nepravilne, fluorescentne na CA podlozi
<b>X2-1P</b>	linija SO 14	filosfera	-	Žute, ravne, mat, nepravilne, fluorescentne na CA podlozi
<b>X2-1PMF</b>	linija SO 14	filosfera	-	Žute, okrugle do ovalne, ravne, sredina neprozirna sa prozirnom rozetom, fluorescentne na CA podlozi
<b>X3-1P</b>	sorta Kata	filosfera	-	Žute, ispupčene, okrugle, sitne, fluorescentne na CA podlozi
<b>X4-1P</b>	sorta Nevena	filosfera	-	Žute, okrugle do ovalne, ravne, sredina neprozirna sa prozirnom rozetom, fluorescentne na CA podlozi
<b>X5-1PMF</b>	hibrid NS Ras	filosfera	-	Žute, ispupčene, okrugle, fluorescentne na CA podlozi

\*Za izolate označene sa „bold” dokazana je antagonistička aktivnost pune kulture *in vitro*, dok su izolati markirani sivo pokazali antagonističku aktivnost i u formi pune kulture i supernatanta u *in vitro* testovima.

\*CA -Cetrimidni agar

### 3.2.3. Metode za ispitivanje patogenosti i virulentnosti izolata *X. campestris* pv. *campestris*

#### 3.2.3.1. Patogenost izolata *X. campestris* pv. *campestris* na ozimnoj uljanoj repici

Patogenost 10 reprezentativnih *X. campestris* pv. *campestris* izolata (Xc1, Xc251, Xc261, Xc271, Xc291, Xc301, Xc321, Xc341, Xc361, Xc432) testirana je na sorti Zorica ozime uljane repice (Institut za ratarstvo i povrtarstvo, NS seme, Srbija). Eksperiment je postavljen u kontrolisanim uslovima staklenika (Slika 4). Biljke korišćene za eksperiment uzgajane su u sterilnom supstratu smeštenom u plastične saksije za rasad sa 66 (11 × 6) otvora (prečnik otvora 4 cm, dubina 5 cm). Inokulacija je vršena metodom prskanja mladih biljaka ozime uljane repice starosti tri nedelje (fenofaza razvoja listova, BBCH 12-13) bakterijskom suspenzijom testiranih izolata, koncentracije podešene na  $\sim 10^8$  CFU ml<sup>-1</sup>. Za prskanje je korišćena ručna prskalica sa

pumpom (Villager). Biljke su uniformo prskane sve dok cele površine listova nisu bile potpuno prekrivene suspenzijom. Eksperiment je postavljen u tri nezavisna ponavljanja, sa po šest biljaka po ponavljanju (ukupno 18 biljaka po izolatu). Tretmani su međusobno razdvojeni plastičnim barijerama kako bi se sprečila unakrsna kontaminacija tokom inokulacije, ali i kasnije tokom zalivanja mikrorasprskivačem. Patotip soj NCPPB528 i pet referentnih *X. campestris* pv. *campestris* sojeva sa ozime uljane repice iz Srbije (CFBP 8912, NCPPB4678, NCPPB4679, NCPPB4680 i NCPPB4682) korišćeni su kao pozitivne kontrole, dok je sterilna destilovana voda korišćena kao negativna kontrola. Tokom prvih 24 sata biljke su držane u uslovima visoke vlažnosti (RH 90–100%), kako bi se omogućio prodor bakterije u list. Nakon 24 sata, inokulisane biljke su bile držane u sledećim uslovima staklenika: dnevna temperatura 30±2 °C, noćna temperatura 20±2 °C, fotoperiod 12 h, vlažnost 50–60 %.

Ocena intenziteta zaraze (procenat lisne površine zahvaćen simptomima) vršena je 14 dana nakon inokulacije primenom Horsfall-Barratt (H-B) skale od 1 do 12 (1 = biljka bez simptoma; 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%) (Horsfall & Barratt, 1945).



**Slika 4.** Ogljed patogenosti u stakleniku (foto A. Jelušić)

### 3.2.3.2. Određivanje kruga domaćina *X. campestris* pv. *campestris*

Virulentni potencijal 10 reprezentivnih *X. campestris* pv. *campestris* izolata ispitan je na šest vrsta kupusnjača u okviru *Brassica oleracea*, koje su poznate kao domaćini ovog patogena u Srbiji: brokoli (sorta Corvet), kupus (sorta Futoški), karfiol (sorta Snežna grudva), raštan (nepoznata domaća sorta), kelj (sorta Gvozdena glava) i keleraba (sorta Golijat). Metod inokulacije i ocene simptoma, kao i korišćene kontrole (pozitivne i negativne) bili su isti kao što je prikazano za test patogenosti na uljanoj repici (potpoglavlje 3.2.3.1).

### 3.2.3.3. Ispitivanje osetljivosti sortimenta uljane repice prema *X. campestris* pv. *campestris*

Trideset pet linija, tri hibrida i 11 sorti ozime uljane repice, kao i jedna jara sorta uljane repice (Prilog 1), proizvedeni na Institutu za ratarstvo i povrtarstvo (Odeljenje za uljanu repicu, Rimski Šančevi) su testirani na osetljivost prema *X. campestris* pv. *campestris*. Od svih 15 testiranih *X. campestris* pv. *campestris* izolata sa ozime uljane repice iz Srbije (10 reprezentivnih i pet referentnih), za ovaj eksperiment su odabrana tri izolata, koji su na osnovu rezultata testa patogenosti determinisani kao visoko virulentan (NCPPB4679), srednje virulentan (Xc1) i slabo virulentan (Xc291). *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* patotip soj NCPPB528 korišćen je kao pozitivna kontrola, dok je sterilna destilovana voda korišćena kao negativna kontrola. Eksperiment je postavljen u kontrolisanim uslovima staklenika u tri ponavljanja, sa četiri biljke po ponavljanju (ukupno 12 biljaka za svaku liniju/hibrid/sortu po izolatu). Inokulacija i ocena vršeni su na isti način kao i za test patogenosti (potpoglavlje 3.2.3.1).

### 3.2.4. *In vitro* i *in vivo* testovi za ispitivanje biokontrolnog potencijala izolata *Bacillus* spp. i *Pseudomonas* spp.

#### 3.2.4.1. Ispitivanje antagonističke aktivnosti pune kulture izolata *in vitro*

*In vitro* antagonistička aktivnost punih kultura 27 *Bacillus* spp. i osam *Pseudomonas* spp. izolata, ispitana je na kolekciji od 19 *X. campestris* pv. *campestris* izolata poreklom sa ozime uljane repice iz Srbije i to na 10 reprezentativnih izolata (Xc1, Xc251, Xc261, Xc271, Xc291, Xc301, Xc321, Xc341, Xc361, Xc432) i devet referentnih sojeva (CFBP 8912, NCPPB4678, NCPPB4679, Xc20, NCPPB4680, NCPPB4681, Xc30, NCPPB4682, Xc32) (Tabele 1 i 2), kao i na *X. campestris* pv. *campestris* patotip soju NCPPB528. Suspenzije *X. campestris* pv. *campestris* izolata/sojeva i antagonističkih izolata napravljene su u LB medijumu uz inkubaciju na 27 °C u trajanju od 48 sati u slučaju *X. campestris* pv. *campestris*, odnosno na 30 °C u trajanju od 24 sata u slučaju potencijalnih antagonističkih izolata. Nakon inkubacije, optičke gustine (*engl.* optical density, OD) suspenzija su izmerene pomoću spektrofotometra UV-6300/6300PC double beam (MRC, Israel) na 600 nm. Suspenzije su zatim centrifugirane na 2000 × g u trajanju od 10 minuta, a dobijeni pelet je rastvoren u 10 mM MgSO<sub>4</sub> do 0.5 McFarland. Antagonistička aktivnost punih kultura *Bacillus* spp. i *Pseudomonas* spp. izolata testirana je stavljanjem kapi (5 µl) suspenzije na LA soft medijum (5 ml) koji je prethodno inokulisan sa 50 µl svakog *X. campestris* pv. *campestris* izolata/soja i razliven preko LA medijuma. Pojava zone inhibicije oko kapljica posmatrana je nakon 48 sati inkubacije na 30 °C. Antagonistička aktivnost izolata izražena je u milimetrima i ocenjena je kao: bez aktivnosti (-), slaba (≤9 mm, +), umerena (10–13 mm, ++) i izražena (≥14 mm, +++) antagonistička aktivnost.

#### 3.2.4.2. Sposobnost izolata *X. campestris* pv. *campestris* da produkuju biofilm

Kako bi se redukovao broj *X. campestris* pv. *campestris* izolata za dalja istraživanja (*in vitro* aktivnost supernatana i *in vivo* biokontrolne eksperimente), testirana je njihova sposobnost produkcije biofilma. Eksperiment je postavljen sa osam *X. campestris* pv. *campestris* izolata/sojeva (CFBP 8912, Xc1, NCPPB4679, NCPPB4681, Xc32, Xc261, Xc271, Xc291) koji su se pokazali kao najosetljiviji na pune kulture biokontrolnih izolata *in vitro*. Sposobnost produkcije biofilma testirana je prema protokolu datom u radu Stepanović et al. (2003). Za eksperiment su korišćene prethodno napravljene suspenzije (potpoglavlje 3.2.4.1) u 10 mM MgSO<sub>4</sub> (10<sup>8</sup> CFU ml<sup>-1</sup>). Eksperiment je rađen u tri nezavisna ponavljanja u mikrotitracionoj ploči (Thermo Scientific) sa 96 mesta i ravnim dnom. Bunarići mikrotitracione ploče naliveni su sa po 180 µl LB medijuma i po 20 µl bakterijske suspenzije. Bunarići naliveni samo sa LB medijumom (200 µl) služili su kao negativna kontrola. Ploča je inkubirana na 30°C u trajanju od 48 sati, nakon čega je sadržaj u bunarićima odliven. Bunarići su tri puta isprani sa po 300 µl 1 × PBS-a korišćenjem multikanalne pipete, vodeći računa da se biofilm ne ošteti. Nakon ispiranja, ploča je ostavljena na sušenju na sobnoj temperaturi u obrnutom položaju preko noći. Formirani biofilm je zatim fiksiran dodavanjem 200 µl metanola u svaki bunarić. Nakon 20 minuta metanol je odliven, nakon čega je usledilo sušenje na sobnoj temperaturi u trajanju od 30 minuta. Bunarići su zatim obojeni sa po 150 µl 2% kristal violeta u trajanju od 15 minuta. Višak boje ispran je pod tekućom vodom, a boja vezana za prilepljene bakterije je očitana na 570 nm u Multiskan FC čitaču (Thermo Fisher Scientific). Nakon očitavanja OD<sub>570</sub> izračunate su srednje vrednosti triplikata za sve testirane izolate.

Da bi se odredila kategorija produkcije biofilma, definisana je „cut off“ vrednost (OD<sub>c</sub>) koja predstavlja srednju vrednost apsorbance negativnih kontrola uvećane za vrednost 3 SD (srednja vrednost OD negativne kontrole + 3 SD). Na osnovu dobijenih vrednosti OD<sub>c</sub>, svaki izolat svrstan je u jednu od sledećih kategorija: OD ≤ OD<sub>c</sub> - nema produkcije biofilma (kategorija 0); OD<sub>c</sub> < OD ≤ 2 × OD<sub>c</sub> - slaba produkcija biofilma (kategorija 1 ili +); 2 × OD<sub>c</sub> < OD ≤ 4 × OD<sub>c</sub> - umerena produkcija biofilma (kategorija 2 ili ++); 4 × OD<sub>c</sub> < OD - izražena produkcija biofilma (kategorija 3 ili +++). Dobijeni rezultati kombinovani su sa prethodno dobijenim rezultatima testa virulentnosti na ozimom uljanoj repici (potpoglavlje 3.2.3.1). Na ovaj način su za dalji rad odabrana tri *X. campestris* pv. *campestris* izolata koja su se uklapala u sledeće grupe: (i) visoko virulentan/izražena

produkcija biofilma, (ii) srednje virulentan/umerena produkcija biofilma i (iii) slabo virulentan/slaba produkcija biofilma.

#### 3.2.4.3. Ispitivanje antagonističke aktivnosti supernatanata *in vitro*

U nastavku istraživanja, testirana je antagonistička aktivnost supernatanata samo onih *Bacillus* spp. i *Pseudomonas* spp. izolata koji su pokazali aktivnost pune kulture na bar jednom od testiranih *X. campestris* pv. *campestris* izolata/sojeva. Prekonoćne kulture odabranih antagonističkih izolata su centrifugirane na  $2000 \times g$  u trajanju od 10 minuta, a dobijeni supernatanti su profiltrirani kroz membranske filtere  $0.45 \mu m$  Durapore™ (Merck Millipore, Irska). Antagonistička aktivnost supernatanata testirana je „well-diffusion“ metodom (Dimkić et al., 2013) na tri odabrana *X. campestris* pv. *campestris* izolata/soja: Xc291 (slabo virulentan/slaba produkcija biofilma), Xc1 (srednje virulentan/umerena produkcija biofilma) i NCPPB4679 (visoko virulentan/izražena produkcija biofilma). Antagonistička aktivnost supernatanata testirana je u Petri kutijama prečnika 90 mm na LA soft podlozi (7 ml), prethodno inokulisanoj sa  $140 \mu l$  suspenzije svakog *X. campestris* pv. *campestris* izolata/soja i razlivenoj preko LA podloge. Bunarići u podlozi su napravljeni od sterilnih donjih delova nastavaka za automatsku pipetu od  $200 \mu l$ . U bunariće je nalivano po  $30 \mu l$  supernatanta svakog od izolata. Petri kutije su inkubirane na  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  tokom 48 sati. Antagonistička aktivnost izolata je ocenjena pojavom zone inhibicije oko bunarića u vidu prosvetljene zone (izražene u milimetrima).

#### 3.2.4.4. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti *in vivo*

*In vivo* eksperiment je postavljen na sorti ozime uljane repice Jasna (Institut za ratarstvo i povrtarstvo, NS seme, Srbija) sa tri odabrana antagonistička izolata: X5-2, X6-3 i X2-1P. Antagonistički potencijal odabranih izolata ispitan je na tri izolata *X. campestris* pv. *campestris*: NCPPB4679, Xc1 i Xc291, koji su redom okarakterisani kao izolati sa izraženom, umerenom i slabom produkcijom biofilma tj. kao visoko, srednje i slabo virulentni izolati. Biljke za eksperiment su gajene u sterilnom supstratu, a tretmani su rađeni u trenutku kada su biljke dostigle fenofazu razvoja 2-3 prava lista (BBCH 12-13). Suspenzije izolata *X. campestris* pv. *campestris* i antagonističkih izolata napravljene su u LB medijumu uz inkubaciju na  $26 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  u trajanju od 48 sati u slučaju *X. campestris* pv. *campestris* (koncentracije  $10^7 \text{ CFU ml}^{-1}$ ), odnosno na  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  u trajanju od 24 sata u slučaju antagonističkih izolata (koncentracije  $10^8 \text{ CFU ml}^{-1}$ ). Supernatanti antagonističkih izolata su izdvojeni centrifugiranjem prekonoćnih kultura na  $5000 \times g$  u trajanju od 20 minuta.

Sposobnost punih kultura i supernatanata antagonističkih izolata za kontrolu izolata *X. campestris* pv. *campestris* testirana je preko dva tipa tretmana, koji su podrazumevali aplikaciju antagonističkih izolata (i) 24 sata pre i (ii) 24 sata nakon inokulacije biljaka *X. campestris* pv. *campestris* izolatima. Biljke inokulisane samo sa testiranim *X. campestris* pv. *campestris* izolatima korišćene su kao kontrolni tretmani. Tretmani su međusobno razdvojeni plastičnim pregradama kako bi se izbegla unakrsna kontaminacija. Eksperiment je postavljen u kontrolisanim uslovima staklenika (temperatura  $23 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ ; fotoperiod 12 h; vlažnost 90–100 % tokom prva 24 sata nakon inokulacije sa *X. campestris* pv. *campestris*, kasnije 50–60%) u četiri nezavisna ponavljanja sa po šest biljaka po ponavljanju (ukupno 24 biljke po izolatu tj. tretmanu).

Ocena oglada je vršena 14 dana nakon inokulacije, korišćenjem H-B skale od 1 do 12 (potpoglavlje 3.2.3.1). Efikasnost primenjenih tretmana izračunata je preko Abbott-ove formule (Abbott, 1925):

$$\text{Efikasnost (\%)} = \frac{X - Y}{X} \times 100$$

gde je X – srednja vrednost intenziteta infekcije u kontroli; Y – srednja vrednost intenziteta infekcije u tretmanu.



### 3.2.5. Molekularne metode za identifikaciju i karakterizaciju *X. campestris* pv. *campestris*

#### 3.2.5.1. Izolacija DNK

Ukupna bakterijska DNK iz ukupno 82 dobijena izolata *X. campestris* pv. *campestris* (Tabela 2), pet referentnih *X. campestris* pv. *campestris* sojeva sa ozime uljane repice iz Srbije (CFBP 8912, NCPPB4678, NCPPB4679, NCPPB4680 i NCPPB4682) (Tabela 1) i jednog *X. campestris* pv. *campestris* patotip soja NCPPB528, izolovana je korišćenjem heksadecil trimetil amonijum bromid (CTAB) metode predložene od Le Marrec et al. (2000). Izolacija je rađena iz prekoćnih kultura gajenih na 30 °C u LB medijumu. Nakon centrifugiranja 5 minuta na 10000 × g (Hettich Zentrifugen MIKRO 22R, Nemačka), pelet je resuspendovan u miksu koji se sastojao od: 567 µl TE pufera, 30 µl 10% natrijum dodecil sulfata (*engl.* sodium dodecyl sulfate, SDS) i 3 µl proteinaze K (Sigma, Sent Luis, SAD) u finalnoj koncentraciji od 100 µg ml<sup>-1</sup>. Nakon 30 minuta inkubacije na 37 °C, uzorci su tretirani sa 100 µl 5M NaCl i 250 µl 3% CTAB pufera. Nakon ponovne inkubacije na 60 °C (20 minuta) u hitting bloku (Heating/Cooling Dry Block CH-100, Biosan, Letonija), DNK je prečišćena dodavanjem 800 µl hloroforma. Gornja faza koja se izdvojila nakon centrifugiranja (10 minuta na 10000 × g) prebačena je u nove tubice od 1,5 ml. Sledeći korak sastojao se iz dodavanja 1/10 volumena 3M natrijum acetata i 1 volumena ledeno-hladnog izopropanola. Nakon centrifugiranja 15 minuta na 10000 × g, pelet je ispran sa 1 ml 96% ledeno-hladnog etanola. Izolovana DNK je rastvorena u 50 µl TE pufera i dugoročno skladištena na -20 °C.

#### 3.2.5.2. Preliminarna molekularna identifikacija primenom specifičnih prajmera

Preliminarna molekularna identifikacija izolata vršena je primenom lančane reakcije polimeraze (*engl.* Polymerase Chain Reaction, PCR) korišćenjem visoko specifičnih parova prajmera za *X. campestris* (DLH109/DLH112 i DLH120/DLH125) i *X. campestris* pv. *campestris* (Dhrp\_Xcc\_F/Dhrp\_Xcc\_R i XCF/XCR), koji su napravljeni na osnovu različitih delova sekvenci *hrpF* gena. Nukleotidne sekvence korišćenih prajmera i njihove karakteristike prikazane su u Tabeli 4.

Za svaki od četiri para prajmera, napravljena je PCR reakciona smeša u totalnoj zapremini od 25 µl, koja se sastojala od sledećih komponenti: 12,5 µl 2 × PCR TaqNova-RED Master Mix (Blirt, DNA-Gdansk, Poljska), 9,5 µl PCR vode, 1 µl svakog od prajmera (10 µM) i 1 µl genomske DNK.

PCR amplifikacija za par prajmera **Dhrp\_Xcc\_F/Dhrp\_Xcc\_R** rađena je primenom programa predloženog u radu Singh et al. (2016):

inicijalna denaturacija	94 °C	3 min	
denaturacija	95 °C	40 sec	} × 40
hibridizacija	60 °C	40 sec	
elongacija	72 °C	40 sec	
finalna elongacija	72 °C	5 min	

Za PCR amplifikaciju para prajmera **XCF/XCR** korišćen je program predložen u radu Park et al. (2004):

inicijalna denaturacija	94 °C	5 min	
denaturacija	94 °C	15 sec	} × 35
hibridizacija	58 °C	15 sec	
elongacija	72 °C	30 sec	
finalna elongacija	72 °C	5 min	

Program Berg et al. (2005) korišćen je za PCR sa parovima prajmera **DLH109/DLH112** i **DLH120/DLH125**:

inicijalna denaturacija	95 °C	3 min	
denaturacija	95 °C	40 sec	} × 40
hibridizacija	63 °C	40 sec	
elongacija	72 °C	40 sec	
finalna elongacija	72 °C	5 min	

Kao pozitivne kontrole korišćeni su *X. campestris* pv. *campestris* patotip soj NCPPB528 i pet referentnih *X. campestris* pv. *campestris* sojeva sa ozime uljane repice iz Srbije (CFBP 8912, NCPPB4678, NCPPB4679, NCPPB4680 i NCPPB4682).

Vizualizacija dobijenih PCR produkata je izvršena na horizontalnom 1% agaroznom gelu, napravljenom otapanjem agaroze u  $0,5 \times$  TBE puferu uz dodavanje etidijum bromida u finalnoj koncentraciji  $0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ . Isti pufer je korišćen i za elektroforezu. PCR produkti zapremine  $5 \mu\text{l}$  naliveni su u bunariće gela, a elektroforeza je tekla pri konstantnom naponu od 90 V i jačini struje od 300 mA u trajanju od 90 minuta. Prisustvo PCR amplikona na očekivanim pozicijama na gelu je provereno pod UV osvetljenjem (260 nm) na transiluminatoru (Biometre, Getingen, Nemačka) u odnosu na DNK marker (200–10000 bp SmartLadder MW-1700-10, Eurogentec, Belgija) i pozitivne kontrole.

**Tabela 4.** Prajmeri korišćeni za preliminarnu identifikaciju *X. campestris* pv. *campestris*

Naziv prajmera	Sekvenca prajmera (5' – 3')	Veličina amplikona (bp)	Referenca
Dhrp_Xcc_F	GTGGCCATGTCGTCGACTC	769	Singh et al. (2016)
Dhrp_Xcc_R	GAATAAACTGTTTCCCCAATG		
XCF	CGATTTCGGCCATGAATGACT	535	Park et al. (2004)
XCR	CTGTTGATGGTGGTCTGCAA		
DLH109	ATGTCGCTCAACACGCTTTC	1400	Berg et al. (2005)
DLH112	GTTTTGCGTGTAGCCCTTTC		
DLH120	CCGTAGCACTTAGTGCAATG	619	Berg et al. (2005)
DLH125	GCATTTCCATCGGTCACGATTG		

### 3.2.5.3. Repetitive element palindromic PCR (rep-PCR)

Postojanje genetičkog diverziteta između 65 izolata koji su preliminarno identifikovani kao *X. campestris* pv. *campestris* primenom specifičnih prajmera, ispitano je umnožavanjem ponavljajućih sekvenci DNK (rep-PCR), korišćenjem tri para prajmera: BOXA1R (BOX-PCR), ERIC1R/ERIC2 (ERIC-PCR) i REP1R-I/REP2-I (REP-PCR). Nukleotidne sekvence korišćenih prajmera prikazane su u Tabeli 5. Neposredno pre amplifikacije, koncentracije DNK svih izolata su kvantifikovane spektrofotometrijski, merenjem apsorbancije na 260 nm uz pomoć NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, SAD) i ujednačene. Kao pozitivne kontrole, korišćeni su *X. campestris* pv. *campestris* patotip soj NCPPB528 i pet referentnih sojeva sa ozime uljane repice (CFBP 8912, NCPPB4678, NCPPB4679, NCPPB4680 i NCPPB4682) iz Srbije.

PCR smeša u totalnoj zapremini of 25  $\mu$ l sastojala se od KAPA Taq PCR Kit (Kapa Biosystems, Merck, Nemačka) komponenti: 10  $\times$  KAPA Taq Buffer B (2.5  $\mu$ l), 10 mM dNTP mix (0.5  $\mu$ l), 5U KAPA Taq DNA polymerase (0.2  $\mu$ l), 10  $\mu$ M prajmeri (svaki po 2  $\mu$ l), PCR voda (16.8  $\mu$ l) i genomska DNK (1  $\mu$ l).

PCR amplifikacije rađene su prema protokolu Louws et al. (1994):

inicijalna denaturacija	95 °C	7 min	
denaturacija	94 °C	1 min	} $\times$ 30
hibridizacija	53 °C (BOX), 52 °C (ERIC), 44 °C (REP)	8 min	
elongacija	65 °C	8 min	
finalna elongacija	65 °C	15 min	

Vizualizacija DNK profila ispitivanih izolata *X. campestris* pv. *campestris* sa ozime uljane repice i njihovo poređenje sa patotip i referentnim sojevima, vršena je na horizontalnom 1% agaroznom gelu. PCR produkti (5  $\mu$ l) pomešani su sa 1,5  $\mu$ l boje (6X DNA Gel Loading Dye, Thermo Fisher Scientific) i nanjeni na gel. Elektroforeza je tekla pri konstantnom naponu od 90 V i jačini struje od 300 mA u trajanju od 3 sata. Veličine dobijenih DNK fragmenata određivane su u odnosu na DNK marker 100–3000 bp DNA ladder (NIPPON Genetics).

DNK profili 65 testiranih izolata sa ozime uljane repice, dobijeni primenom svakog od tri korišćena para prajmera, upoređeni su sa profilima patotip soja i pet referentnih sojeva sa uljane repice iz Srbije korišćenjem Phylip 3.698 softvera. Nivo sličnosti između DNK profila izolata prikazan je na UPGMA (*engl.* Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) filogenetskom stablu, napravljenom u NJPLOT programu (Perrière & Gouy, 1996). U cilju što lakšeg poređenja rezultata dobijenih primenom sva tri rep-PCR prajmera (BOX-PCR, ERIC-PCR i REP-PCR) i odabira svih izolata koji bi mogli biti potencijalno genetički različiti, svakom klasteru je dodeljen broj.

**Tabela 5.** Prajmeri korišćeni za rep-PCR

Naziv prajmera	Sekvenca prajmera (5' – 3')	Veličina amplicona (bp)	Referenca
BOXA1R	CTACGGCAAGGCGACGCTGACG	100-3000	
ERIC1R	ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC	300-3000	
ERIC2	AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG		Louws et al. (1994)
REP1R-I	IIICGICGICATCIGGC	250-3000	
REP2-I	ICGICTTATCIGGCCTAC		

#### 3.2.5.4. Genotipizacija i analiza sekvenci više genskih lokusa (MLST/MLSA)

Na osnovu rezultata rep-PCR, za dalji rad je odabrano 10 reprezentativnih izolata (Xc1, Xc251, Xc261, Xc271, Xc291, Xc301, Xc321, Xc341, Xc361 i Xc432). Genotipizacija je vršena korišćenjem 7 parova prajmera metodom tipiziranja na osnovu sekvenci više lokusa (MLST). Prajmeri su napravljeni na osnovu parcijalnih sekvenci pet konzerviranih gena: *fyuA*, *gltA*, *gyrB*, *lepA* i *rpoD*, koji kodiraju tonB-zavisni receptor, citrat sintazu, DNK žirazu B, elongacioni faktor 4 i RNK polimeraza sigma faktor RpoD, redom, kao i dva para prajmera (*dnaK*-F/R i P-X-*dnaK*-F/R), napravljenih na osnovu različitih regiona sekvenci gena *dnaK*, koji kodira molekularni šaperon DnaK. Nukleotidne sekvence prajmera i njihove karakteristike prikazane su u Tabeli 6.

**Tabela 6.** Prajmeri korišćeni za MLST/MLSA

Naziv prajmera	Sekvenca prajmera (5' – 3')	Veličina ampikona (bp)	Referenca	
dnaK-F	GGTGGAAGACCTGGTCAAGA	940	Young et al. (2008)	
dnaK-R	TCCTTGACYTCGGTGAAGCTC			
fyuA -F	AGCTACGAYGTGCGYTACGA	698		
fyuA -R	GTTCACGCCRAACTGGTAG			
gyrB-F	ACGAGTACAACCCGGACAA	865		
gyrB-R	CCCATCARGGTGCTGAAGAT			
rpoD-F	TGGAACAGGGCTATCTGACC	875		
rpoD-R	CATTCYAGGTTGGTCTGRIT			
gltA-F	ATCTTGATCAGGTCACGCTCAAC	501		Almeida et al. (2010)
gltA-R	AGCATCTTCAGCACGGCTTCGTT			
lepA-F	AAGCSCAGGTGCTCGACTCCAAC	390		
lepA-R	CGTTCCTGCACGATTTCCATGTG			
P-X-dnaK-F	GGTATTGACCTCGGCACCAC	540	Fargier et al. (2011)	
P-X-dnaK-R	ACCTTCGGCATAACGGGTCT			

PCR reakcione smeše u totalnoj zapremini od 25 µl, sastojale su se od sledećih komponenti: 12,5 µl 2 × PCR TaqNova-RED Master Mix (Blirt, DNA-Gdansk, Poljska), 9,5 µl PCR vode, 1 µl svakog od prajmera (10 µM) i 1 µl genomske DNK.

PCR amplifikacija gena *dnaK*, *fyuA*, *gyrB* i *rpoD* rađena je korišćenjem sledećeg programa, predloženog od strane Young et al. (2008):

inicijalna denaturacija	94 °C	3 min	
denaturacija	94 °C	30 sec	} × 30
hibridizacija	54 °C	30 sec	
elongacija	72 °C	1 min	
finalna elongacija	72 °C	10 min	

Geni *gltA* i *lepA* amplifikovani su po programu datom u radu Almeida et al. (2010):

inicijalna denaturacija	94 °C	5 min	
denaturacija	94 °C	30 sec	} × 35
hibridizacija	58 °C	30 sec	
elongacija	72 °C	30 sec	
finalna elongacija	72 °C	7 min	

Program predložen od strane Fargier et al. (2011) korišćen je za PCR amplifikaciju para prajmera **P-X-dnaK-F/ P-X-dnaK-R**:

inicijalna denaturacija	94 °C	3 min	
denaturacija	94 °C	50 sec	} × 35
hibridizacija	62 °C	50 sec	
elongacija	72 °C	1 min	
finalna elongacija	72 °C	7 min	

PCR produkti su razdvojeni na 1% agaroznom gelu, a pozicija umnoženog regiona DNK proverena je u odnosu na DNK marker 100–3000 bp DNA ladder (NIPPON Genetics). PCR produkti su zatim prečišćeni korišćenjem kitova za prečišćavanje QIAquick PCR Purification i

QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) i sekvencirani bidirekciono u centru za sekvenciranje MacroGen Sequencing Service (Amsterdam, Holandija). Za amplifikaciju i sekvenciranje su korišćeni isti prajmeri. Kako bi izolati bili identifikovani do nivoa vrste i kako bismo dobili indikaciju o pripadnosti patovaru, kvalitet dobijenih sekvenci je manuelno pregledan, a zatim su sekvence upoređene sa već deponovanim sekvencama u bazi Nacionalnog centra za biotehnoške informacije (NCBI) primenom nukleotid BLAST (BLASTn) funkcije (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Sekvence su zatim deponovane u banku gena, a pristupne šifre su prikazane u Tabeli 7.

DNK sekvence šest gena: *dnaK*, *fyuA*, *gyrB*, *rpoD*, *gltA* i *lepA* korišćene su za filogenetsku analizu. Filogenetska analiza je rađena u cilju poređenja 10 reprezentativnih izolata sa ozime uljane repice iz Srbije sa pet referentnih sojeva sa ozime uljane repice iz Srbije (CFBP 8912, NCPPB4678, NCPPB4679, NCPPB4680 i NCPPB4682), pet sojeva *X. campestris* pv. *campestris* (CN18, 3811, ICMP 21080, B100 i 8004) poreklom sa različitih domaćina iz različitih zemalja i patotip sojem NCPPB528. Sekvence komparativnih sojeva preuzete su iz NCBI baze, a njihove pristupne šifre su prikazane u Prilogu 1. Pre konstruisanja filogenetskog stabla, sekvence svih gena, za sve izolate koji su korišćeni za poređenje poravnate su u BioEdit v. 7.0.5 programu i isečene do istih dužina (*dnaK* - 631 nt, *fyuA* - 610 nt, *gyrB* - 757 nt, *rpoD* - 725 nt, *gltA* - 547 nt, *lepA* - 775 nt), nakon čega su od njih napravljene konkatamerne sekvence dužine 4045 nt. „Neighbour-joining“ filogenetska stabla su napravljena za svaki od gena pojedinačno, ali i sa konkatamernim sekvencama korišćenjem Mega 7 softvera. Za ukorenjivanje filogenetskih stabala korišćen je soj *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* 15-088 (NZ\_CP044334) deponovan u NCBI bazi podataka. Genetičke distance na filogenetskim stablima izračunate su korišćenjem Kimura dvoparametarskog modela supstitucije nukleotida (Kimura, 1980).

**Tabela 7.** Pristupne šifre reprezentativnih izolata u NCBI bazi podataka

Šifra izolata	NCBI pristupne šifre						
	<i>rpoD</i>	<i>gyrB</i>	<i>dnak</i>	<i>fyuA</i>	<i>gltA</i>	<i>lepA</i>	P-X- <i>dnaK</i>
Xc1	MN872658	MN872647	MN872625	MN872636	MN872603	MN872614	MN876208
Xc251	MN872659	MN872648	MN872626	MN872637	MN872604	MN872615	MN876209
Xc261	MN872660	MN872649	MN872627	MN872638	MN872605	MN872616	MN876210
Xc271	MN872661	MN872650	MN872628	MN872639	MN872606	MN872617	MN876211
Xc291	MN872662	MN872651	MN872629	MN872640	MN872607	MN872618	MN876212
Xc301	MN872663	MN872652	MN872630	MN872641	MN872608	MN872619	MN876213
Xc321	MN872664	MN872653	MN872631	MN872642	MN872609	MN872620	MN876214
Xc341	MN872665	MN872654	MN872632	MN872643	MN872610	MN872621	MN876215
Xc361	MN872666	MN872655	MN872633	MN872644	MN872611	MN872622	MN876216
Xc432	MN872667	MN872656	MN872634	MN872645	MN872612	MN872623	MN876217

### 3.2.5.5. Određivanje srodnosti izolata *X. campestris* pv. *campestris* primenom analize zasnovane na alelima

Detaljnija analiza sekvenci rađena je primenom PubMLST (*engl.* Public databases for molecular typing and microbial genome diversity) neredundantne baze podataka (<https://pubmlst.org/analysis/nrdb.shtml>). Na ovaj način, 10 reprezentativnih izolata poreklom sa ozime uljane repice i pet referentnih sojeva sa ozime uljane repice iz Srbije (CFBP 8912, NCPPB4678, NCPPB4679, NCPPB4680 i NCPPB4682), upoređeno je sa 75 sojeva *Xanthomonas* spp. [1 *Xanthomonas* sp., 4 *X. campestris*, 56 *X. campestris* pv. *campestris*, 6 *X. campestris* pv. *incanae* (*Xci*) i 8 *X. campestris* pv. *raphani* (*Xcr*)] izolovanih u različitim zemljama sa različitim domaćina [*B. oleracea*; *B. oleracea* vars. *botrytis*, *costata*, *capitata* i *gemmafera*; *B. oleracea* convar. *bullata* var. *gemmafera*; *B. oleracea* convar. *acephala* var. *sabellica*; *B. oleracea* convar. *capitata* vars. *alba* i *sabauda*; *B. oleracea* convar. *botrytis* var. *botrytis*; *B. kaber* var. *pinnatifida*; *Iberis* sp.; *Raphanus sativus*; *Matthiolaincana*; *Erysimum* sp.; *Barbarea vulgaris*; *A Armoracia lapathifolia*; *Ranunculus* sp.; *Rorippa nasturtium-aquaticum*] (Prilozi 2 i 3). Svih 75 *X. campestris* pv. *campestris* sojeva korišćenih za poređenje, prethodno su okarakterisani u studiji strukture *X. campestris*, sprovedenoj od strane Cruz et al. (2018). Poređenje je rađeno na osnovu sekvenci četiri konzervirana gena: *fyuA*, *gyrB*, *rpoD* i *dnaK* (amplifikovanog prajmerima P-X-*dnaK*-F/ P-X-*dnaK*-

R), koji su takođe korišćeni u studiji Cruz et al. (2018) za ovakav tip analize. Sekvence sojeva korišćenih za poređenje preuzete su iz NCBI baze podataka. Nukleotidne sekvence za sva četiri lokusa su prvo poravnate u BioEdit v. 7.0.5 programu, isečene do istih dužina (P-X-*dnaK* - 470 nt, *fyuA* - 538 nt, *gyrB* - 418 nt, *rpoD* - 422 nt) i upoređene. Svakoj sekvenci koja se od drugih sekvenci istog lokusa razlikovala u jednom ili više nukleotida dodeljen je drugi alelski broj. Svaka nova kombinacija alelskih profila označena je kao novi tip sekvence (ST). Oznake ST dodeljene su u skladu sa oznakama datim u radu Cruz et al. (2018).

Kako bi se grafički predstavila veza između svih definisanih tipova sekvenci i utvrdio položaj 15 izolata *X. campestris* pv. *campestris* poreklom sa ozime uljane repice (10 reprezentativnih i pet referentnih) u odnosu na komparativne *Xanthomonas* spp. sojeve sa različitim domaćina i iz različitih zemalja, korišćen je PHYLOViZ softver (<http://www.phyloviz.net/goeburst/>) sa implementiranim eBURST (*engl.* global optimal eBURST, goeBURST) algoritmom predloženom od strane Feil et al. (2004). Primenom ove metode, determinisane su sve varijante sekvenci sa promenama u jednom (*engl.* single locus variants, SLVs), dva (*engl.* double locus variants, DLVs) ili tri (*engl.* triple locus variants, TLVs) lokusa, koje su nastale kao rezultat diverzifikacije od predačkog genotipa, na osnovu jednog, dva ili tri konzervirana gena, redom, što je prikazano na stablu sa minimalnim rasponom (*engl.* minimum spanning tree, MS). Svaki „čvor“ stabla predstavlja jedan tip sekvence (ST), a različite boje predstavljaju različite domaćine sa kojih poređeni izolati/sojevi vode poreklo. Veličina svakog čvora odgovara broju sojeva koji imaju dati tip sekvence. Boje linija koje povezuju čvorove predstavljaju razlike u jednom (plava), dva (zeleni) ili tri (svetlo sivi) lokusa ili lokuse koji nisu povezani (crna).

### 3.2.6. Molekularne metode za identifikaciju i karakterizaciju antagonističkih izolata

#### 3.2.6.1. Izolacija DNK

Totalna genomska DNK 10 *Bacillus* spp. i šest *Pseudomonas* spp. izolata, koji su pokazali antagonističku aktivnost pune kulture i supernatanata izolovana je primenom protokola Better et al. (1983). Za potrebe izolacije DNK, izolati su gajeni u LB medijumu na 30 °C u trajanju od 24 sata. Prekonoćne kulture (2 ml) izolata centrifugirane su na 10000 × g (Hettich Zentrifugen MIKRO 22R, Nemačka) u trajanju od 10 minuta, a dobijeni pelet ispran je sa 1 ml 1 × PBS-a. Suspenzija u PBS-u je zatim ponovo centrifugirana na 10000 × g u trajanju od 10 minuta. U slučaju *Pseudomonas* spp. izolata, pelet je ispran sa 400 µl TE pufera i 15 µl 10 mg ml<sup>-1</sup> lizozima (Serva GMBH, Hajdelberg, Nemačka), dok je pelet *Bacillus* spp. resuspendovan samo u TE puferu. DNK je prečišćena dodavanjem 15 µl RNAze (10 mg ml<sup>-1</sup>), 400 µl 2% SDS i 100 µl pronaze (5 mg ml<sup>-1</sup>). Nakon inkubacije uzoraka na 37 °C u trajanju od 10 – 60 minuta (dok suspenzija ne postane prozirna), suspenzija je vorteksovana 15 minuta na maksimalnoj brzini u Digital Disruptor Genie (Scientific Industries, Inc.) vorteksu. Izolacija je rađena u fenol:hloroform:izoamil alkoholu (25:24:1), a faze su razdvojene centrifugiranjem na 10000 × g u trajanju od 15 minuta. Nakon razdvajanja, gornja faza je prebačena u nove tubice od 1,5 ml. Druga izolacija je rađena dodavanjem jednake zapremine hlороforma i centrifugiranjem na 10000 × g u trajanju od 3 minuta. Gornja faza je ponovo prebačena u nove tubice od 1,5 ml, nakon čega je u DNK precipitirana dodavanjem 0.2 M NaCl-a i izopropanola. Tubice su invertovane nekoliko puta kako bi se izdvojila DNK. Suspenzija je zatim pažljivo odbačena, a DNK je isprana u ledeno-hladnom 70% etanolu (1 ml). Dobijena DNK je resuspendovana u 50 µL TE pufera i dugoročno skladištena na –20 °C.

#### 3.2.6.2. Molekularna identifikacija i karakterizacija antagonističkih izolata

Molekularna identifikacija svih 16 *Bacillus* spp. i *Pseudomonas* spp. izolata (Tabela 3) koji su pokazali antagonističku aktivnost rađena je parcijalnom amplifikacijom 16S rRNK gena, primenom univerzalnih prajmera fD1Funi-16S/rP2Runi-16S (Weisburg et al., 1991). Dodatno, DNK 10 *Bacillus* spp. izolata amplifikovana je sa parom prajmera tufGPF/tufGPR (Caamaño-Antelo et al., 2015) koji umnožavaju parcijalnu sekvencu *tuf* gena (elongacioni faktor Tu), dok je za

šest *Pseudomonas* spp. izolata korišćen par prajmera gyrBF/gyrBR (Sarkar & Guttman, 2008) koji umnožavaju parcijalnu sekvencu gena *gyrB*.

PCR reakcija sa univerzalnim prajmerima **fD1Funi-16S/rP2Runi-16S** rađena je prema programu:

inicijalna denaturacija	95 °C	5 min	
denaturacija	95 °C	40 sec	} × 30
hibridizacija	54 °C	40 sec	
elongacija	72 °C	90 sec	
finalna elongacija	72 °C	7 min	

PCR amplifikacija *tuf* gena rađena je prema protokolu Chavagnat et al. (2002):

inicijalna denaturacija	95 °C	8 min	
denaturacija	95 °C	30 sec	} × 35
hibridizacija	55 °C	1 min	
elongacija	72 °C	30 sec	
finalna elongacija	72 °C	10 min	

*GyrB* gen amplifikovan je prema sledećem PCR programu:

inicijalna denaturacija	95 °C	2 min 30 sec	
denaturacija	95 °C	30 sec	} × 35
hibridizacija	58 °C	1 min	
elongacija	72 °C	1 min	
finalna elongacija	72 °C	7 min	

Dalja molekularna karakterizacija na prisustvo gena uključenih u biosintezu različitih sekundarnih metabolita (lipopeptida i antibiotika), rađena je samo za dva *Bacillus* spp. (X5-2 i X6-3) i tri *Pseudomonas* spp. (X2-1P, X2-1PMF i X5-1PMF) izolata koji su pokazali *in vitro* antagonističku aktivnost i u formi pune kulture i supernatanta. Odabrani *Bacillus* izolati testirani su na prisustvo gena za lipopeptide: *fenD* za fengicin sintetazu (Ramarathnam et al., 2007); *sfp* za surfaktin sintetazu (Hsieh et al., 2004); *krsA*, *krsB* i *krsC* za kurstakin sintetazu (Abderrahmani et al., 2011); *bamC* za bacilomicin D sintetazu (Ramarathnam et al., 2007) i *ituA* i *ituB* za iturin operon (Tsuge et al., 2005). *Pseudomonas* izolati testirani su na prisustvo gena za biosintezu antibiotika: *hcnBC* za cijanovodoničnu kiselinu (Ramette et al., 2003); *prmD* za pirolnitrin, *pltC* za pioluteorin (de Souza & Raaijmakers, 2003) i *phcA* za fenazin-1-karboksilnu kiselinu (Raaijmakers et al., 1997).

Nukleotidne sekvence svih prajmera korišćenih za identifikaciju, kao i za detekciju gena za antibiotike i lipopeptide i njihove karakteristike, prikazani su u Tabeli 8.

Sve navedene PCR amplifikacije su rađene u totalnom volumenu od 25 µl koja se sastojao od sledećih komponenti: 12,5 µl 2 × PCR TaqNova-RED Master Mix (Blirt, DNA-Gdansk, Poljska), 9,5 µl PCR vode, 1 µl svakog od prajmera (10 µM) i 1 µl genomske DNK.

PCR amplifikacije su rađene prema sledećim programima:

**FEND1-F/FEND1-R (*fenD*):**

inicijalna denaturacija	94 °C	3 min	
denaturacija	94 °C	1 min	} × 45
hibridizacija	62 °C	1 min	
elongacija	72 °C	1 min 45 sec	
finalna elongacija	72 °C	6 min	

**BACC1-F/BACC1-R (*bamC*):**

inicijalna denaturacija	94 °C	3 min	
denaturacija	94 °C	1 min	} × 35
hibridizacija	60 °C	30 sec	
elongacija	72 °C	1 min 45 sec	
finalna elongacija	72 °C	6 min	

**Sfp-F/sfp-R (*sfp*):**

inicijalna denaturacija	94 °C	2 min	
denaturacija (autoekstenzija)	94 °C	15 sec	} × 10
hibridizacija (autoekstenzija)	45 °C	15 sec	
elongacija (autoekstenzija)	68 °C	3 min	
denaturacija	94 °C	15 sec	} × 25
hibridizacija	45 °C	15 sec	
elongacija	68 °C	3 min	
finalna elongacija	72 °C	10 min	

**AKS-F/TKS-R (*krsA*, *krsB* i *krsC*):**

inicijalna denaturacija	94 °C	3 min	
denaturacija	94 °C	1 min	} × 30
hibridizacija	44.4 °C	40 sec	
elongacija	72 °C	2 min	
finalna elongacija	72 °C	10 min	



**ITUP1-F/ITUP2-R (*ituA* i *ituB*):**

inicijalna denaturacija	96 °C	5 min	
denaturacija	96 °C	30 sec	} × 30
hibridizacija	60 °C	30 sec	
elongacija	72 °C	2 min 30 sec	
finalna elongacija	72 °C	10 min	

**HCN-F/HCN-R (*hcnBC*):**

inicijalna denaturacija	94 °C	2 min 30 sec	
denaturacija	94 °C	30 sec	} × 30
hibridizacija	63 °C	30 sec	
elongacija	72 °C	1 min	
finalna elongacija	72 °C	10 min	

**PLTC1-F/PLTC2-R (*pltC*) i PRND1-F/PRND2-R (*prnD*):**

inicijalna denaturacija	95 °C	2 min	
denaturacija	95 °C	1 min	} × 30
hibridizacija	67 °C ( <i>pltC</i> ), 68 °C ( <i>prnD</i> )	1 min	
elongacija	72 °C	1 min	
finalna elongacija	72 °C	10 min	

**PhCA-F/PhCA-R (*phcA*):**

inicijalna denaturacija	94 °C	2 min	
denaturacija	94 °C	1 min	} × 30
hibridizacija	67 °C	45 sec	
elongacija	72 °C	1 min	
finalna elongacija	72 °C	10 min	

Prisustvo amplikona na odgovarajućim pozicijama provereno je na horizontalnom 1% agaroznom gelu u odnosu na DNK marker 200–10000 bp SmartLadder MW-1700-10. PCR produkti su prečišćeni korišćenjem Qiagen kitova QIAquick PCR Purification i Gel Extraction Kit, nakon čega su poslani na sekvenciranje u Eurofins Genomics sequencing service (Hamburg, Nemačka). Kvalitet dobijenih sekvenci je manuelno pregledan, a sekvence su upoređene sa dostupnim sekvencama u NCBI bazi korišćenjem BLASTn funkcije, kako bi se dobila indikacija o pripadnosti određenim vrstama.

**3.2.6.3. Filogenetska analiza**

Filogenetsko stablo maksimalne sličnosti (*engl.* maximum likelihood) konstruisano je sa konkatamernim sekvencama gena *tuf*, 16S rRNK i *sfp* za *Bacillus* izolate X5-2 i X6-3, dok su za identifikaciju *Pseudomonas* X2-1P korišćene konkatamerne sekvence gena *gyrB*, 16S rRNK i *phcA*.

U filogenetsku analizu su uključeni referentni sojevi [*Bacillus velezensis* (K26 i SRCM102755), *Bacillus megaterium* (5-3 i JX285), *Bacillus amyloliquefaciens* DH8030, *Bacillus aryabhatai* KNU10, *Pseudomonas orientalis* (F9 i R4-35-08) i *Pseudomonas synxantha* 30B) iz NCBI baze, sa kojima su testirani izolati pokazali najveću homologiju. Pre pravljjenja konkatamernih sekvenci i konstruisanja filogenetskog stabla, pojedinačne sekvence svih gena su trimovane do istih dužina i poravnate korišćenjem ClustalW funkcije BioEdit (v.7.2) programa. Filogenetsko stablo je konstruisano u Mega X programu, a genetičke distance su izračunate primenom Tamura-3-parametarskog modela.

**Tabela 8.** Prajmeri korišćeni za identifikaciju i za detekciju gena za antibiotike i lipopeptide *Bacillus* i *Pseudomonas* izolata

Naziv prajmera	Sekvenca prajmera (5' – 3')	Veličina amplikona (bp)	Referenca
<b>Prajmeri za identifikaciju</b>			
fD1Funi-16S rP2Runi-16S	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG ACGGCTACCTTGTTACGACTT	1500	Weisburg et al. (1991)
tufGPF tufGPR	ACGTTGACTGCCAGGACAC GATACCAGTTACGTCAGTTGTACGGA	791	Caamaño-Antelo et al. (2015)
gyrBF gyrBR	MGGCGGYAAGTTCGATGACAAYTC TRATBKCAGTCARACCTTCRCGSGC	610	Sarkar & Guttman (2008)
<b>Prajmeri za specifičnu detekciju gena uključenih u biosintezu lipopeptida kod <i>Bacillus</i> spp. izolata</b>			
FEND1-F FEND1-R	TTTGGCAGCAGGAGAAGTTT GCTGTCCGTTCTGCTTTTTTC	964	Ramarathnam et al. (2007)
BACC1-F BACC1-R	GAAGGACACGGCAGAGAGTC CGCTGATGACTGTTCATGCT	875	Ramarathnam et al. (2007)
sfp-F sfp-R	ATGAAGATTTACGGAATTTA TTATAAAAGCTCTTCGTACG	675	Hsieh et al. (2004)
AKS-F TKS-R	TCHACWGGRAATCCAAAGGG CCACCDKTCAAARKWATC	1125, 1152, 1161, 1167, 1173	Abderrahmani et al. (2011)
ITUP1-F ITUP2-R	AGCTTAGGGAACAATTGTCATCGGGGCTTC TCAGATAGGCCCATATCGGAATGATTCCG	2000	Tsuge et al. (2005)
<b>Prajmeri za specifičnu detekciju gena uključenih u biosintezu antibiotika <i>Pseudomonas</i> spp. izolata</b>			
HCN-F HCN-R	ACTGCCAGGGCGGATGTGC ACGATGTGCTCGGCGTAC	587	Ramette et al. (2003)
PRND1-F PRND2-R	GGGCGGGCCGTGGTGATGGA YCCCGSGCCTGYCTGGTCTG	786	de Souza & Raaijmakers (2003)
PLTC1-F PLTC2-R	AACAGATCGCCCCGGTACAGAACG AGGCCCGGACACTCAAGAACTCG	438	de Souza & Raaijmakers (2003)
PhCA-F PhCA-R	TTGCCAAGCCTCGCTCCAAC CCGCGTTGTTCTCGTTCAT	1150	Raaijmakers et al. (1997)

### 3.2.7. Ispitivanje sastava mikrobijalnih zajednica filofsere i rizofsere ozime uljane repice primenom metabarkoding analize

#### 3.2.7.1. Izolacija totalne DNK i NGS sekvenciranje

Priprema uzoraka filofsere (Ph1 – SO 14, Ph2 – Kata, Ph3 – Nevena, Ph4 – NS Ras i Ph5 – Zorica) za metabarkoding analizu rađena je prema protokolu predloženom u radu Janakiev et al. (2019a). Sakupljeni listovi ozime uljane repice, prvo su isprani u sterilnom 1 × fosfatnom puferu (*engl.* Phosphate Buffered Saline, PBS, Sigma Aldrich, Velika Britanija) uz šejkiranje na 200 rpm u trajanju od 10 minuta. Nakon ispiranja, listovi su ponovo potopljeni u svež 1 × PBS i tretirani u ultrazvučnom kupatilu (Bandelin Sonorex RK 103H, Nemačka) u trajanju od 2 minuta, a zatim stavljani na šejkiranje u trajanju od 15 minuta. Dobijena suspenzija u 1 × PBS-u (100 ml), profiltrirana je kroz 0.22 µm polikarbonatni membranski filter (Isopore™ Membrane Filter, Merck

Millipore, Irska). Totalna DNK uzoraka filosofere, izolovana je korišćenjem Quick-DNA™ Fungal/Bacterial Miniprep Kit-a (Zymo Research), dok je PowerSoil® DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Inc., SAD) korišćen je za izolaciju totalne DNK iz pet uzoraka rizosfere (R1 – SO 14, R2 – Kata, R3 – Nevena, R4 – NS Ras i R5 – Zorica). Izolacija totalne DNK iz oba tipa uzoraka, rađena je primenom protokola predloženih od strane proizvođača. Koncentracije DNK kvantifikovane su na Qubit 4 fluorometru (Invitrogen™, SAD), nakon čega su uzorci poslani na sekvenciranje u FISABIO Sequencing Service (Valensija, Španija). Sekvenciranje je rađeno na MiSeq sekvencijatoru korišćenjem Illumina protokola za pripremu biblioteka metagenomskih sekvenci (Cod. 15044223 Rev. A) sa parom prajmera (For-5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3'; Rev-5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3') koji umnožavaju V3 i V4 regione 16S rDNK (Klindworth et al., 2013).

### 3.2.7.2. Obrada podataka i taksonomska anotacija

Procena kvaliteta sekvenci rađena je u Prinseq-lite programu (Schmieder et al., 2011) korišćenjem sledećih parametara: minimalna dužina 50 bp, sečenje 3' kraja sa pragom 30 bp, srednjim tipom ocene kvaliteta i kvalitetom trimovanja 10 bp. Forward (R1) i reverzna (R2) očitavanja dobijena nakon Illumina sekvenciranja spojena su u programu Fastq-join (Aronesty, 2013). Analiza podataka urađena je korišćenjem *ad-hoc* pipeline u RStatistics environment programu (R Core Team, 2012). Uklanjanje šumova, spajanje uparenih krajeva i uklanjanje hitera rađeno je počevši od podataka o sparenim krajevima, korišćenjem programa DADA2 pipeline (Callahan et al. 2016). RDP\_classifier segment u okviru Ribosomal Database Project baze (RDP; <http://rdp.cme.msu.edu/>) korišćen je za taksonomsku anotaciju (Cole, et al., 2009).

Alfa diverzitet (bakterijski diverzitet unutar uzorka) je procenjen na osnovu analize operativnih taksonomskih jedinica (*engl.* operational taxonomic unit, OTU) i predstavljen korišćenjem Shannon, Simpson, invSimpson i fisherAlpha indeksa. Uočeno bogatstvo vrsta unutar svakog od uzoraka prikazano je preko OBS (*engl.* observed OTU) vrednosti, dok je procenjeno bogatstvo predstavljeno CHAO1 i ACE (*engl.* Abundance-based coverage estimator) indeksima. Rarefakciona analiza je urađena kako bi se na osnovu dobijenih sekvenci procenio ukupan diverzitet na nivou razdela, familije i roda [broj sekvenci (x-osa) vs. broj taksona (y-osa)].

Beta diverzitet (bakterijski diverzitet između različitih uzoraka) je procenjen korišćenjem sledećih analiza: analiza glavnih komponenti (*engl.* Principal Components Analysis, PcoA), analiza grupisanja (*engl.* Clustering) i kanonska analiza korespondencije (*engl.* Canonical Correspondence Analysis, CCA). Sve tri analize rađene su sa matricama udaljenosti za nivo razdela, familije i roda. Podaci dobijeni nakon sekvenciranja deponovani su u BioProject NCBI bazu podataka pod šifrom PRJNA718174 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/?term=PRJNA718174>).

Krona program za interaktivnu vizualizaciju korišćen je za grafičko predstavljanje distribucije taksona u uzorcima. Distribucija očitavanja po uzorcima prikazana je Prilogu 4. Relativna zastupljenost različitih razdela (a) i rodova (b) u uzorcima filosofere (Ph1-Ph5) i rizosfere (R1-R5) prikazana je u Prilogu 5.

### 3.2.8. Hemijska analiza sekundarnih metabolita antagonističkih izolata

#### 3.2.8.1. Ekstrakcija sekundarnih metabolita antagonističkih izolata

Ekstrakcija sekundarnih metabolita iz supernatanata izolata *Bacillus* (X5-2 i X2-1P) i *Pseudomonas* X2-1P rađena je primenom etil acetata, prema protokolu opisanom u radu Dimkić et al. (2013). Izolati su gajeni u LB medijumu (500 ml) na 30 °C u trajanju od 24 sata uz šejkiranje, nakon čega su ćelije oborene centrifugiranjem 20 minuta na 5000 × g (Sorvall RC-5B superspeed centrifuge). Ekstrakcija je rađena dodavanjem etil acetata (Sigma-Aldrich, SAD) u razmeri 1:1. Nakon razdvajanja frakcija u levku za razdvajanje, etil acetatna frakcija je izdvojena i potpuno isparena na rotacionom uparivaču (Buchi Rotavapor R-114, Švajcarska).

Benzenova ekstrakcija prema protokolu Janakiev et al. (2019b), dodatno je rađena za ekstrakciju antimikrobnih jedinjenja iz *Pseudomonas* izolata X2-1P. Za potrebe ovog tipa ekstrakcije, bakterijska suspenzija je napravljena u minimalnom MSM medijumu uz šejkiranje na

28 °C u trajanju od 4 dana. Bakterijska kultura je oslobođena od ćelija centrifugiranjem 20 minuta na  $5000 \times g$ , a dobijeni supernatant je acidifikovan na pH 2.0 koncentrovanom hlorovodoničnom kiselinom. Ekstrakcija je rađena dva puta, dodavanjem jednake zapremine benzena (Sigma-Aldrich, SAD). Benzenova frakcija je zatim razdvojena u levku za razdvajanje i potpuno uparena.

Suvi sirovi ekstrakti, dobijeni primenom obe metode ekstrakcije, rastvoreni su u metanolu do finalne koncentracije  $20 \text{ mg ml}^{-1}$  i korišćeni za dalju hemijsku analizu.

### 3.2.8.2. Gasna hromatografija-masena spektrometrija (GC-MS)

Sva četiri dobijena ekstrakta su podeljena u dve frakcije za detekciju ukupnih koncentracija pojedinačnih komponenti. Prva frakcija je direktno injektirana u GC-MS, dok je druga frakcija korišćena za merenje prisutnih polarnih jedinjenja. Rastvarač je prvo uparen pod blagim protokom azota, nakon čega je dodato  $100 \mu\text{l}$  hloro trimetil silan, N,O-bis (trimetilsilil)trifluoroacetamida sa 1% trimetil hloro silanom (BSTFA: TMCS 99:1; CAS: 25561-30-2, Supelco). GC-MS analiza je rađena na gasnom hromatografu Agilent 5890 opremljenom sa autosemplerom (Gerstel Inc.) kuplovanim za detektor mase sa jednim kvadrupolom (Agilent 5977B High Efficiency Source). Uzorci u zapremini  $1 \mu\text{l}$  su injektirani u „splitless“ modu. Temperatura za injektovanje je podešena na  $250 \text{ }^\circ\text{C}$ . Uzorci su razdvojeni u kapilarnoj koloni HP5-MS [ $30 \text{ m} \times 0.25 \text{ mm}$  (unutrašnji prečnik),  $0,25 \mu\text{m}$ ] sa helijumom kao nosačem gasa (protok:  $1,2 \text{ ml min}^{-1}$ ). Početna temperatura za gasnu hromatografiju podešena je na  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  u trajanju od 1 minuta, nakon čega je postepeno ( $5 \text{ }^\circ\text{C/ min}$ ) povećavana do  $350 \text{ }^\circ\text{C}$ , ponovo u trajanju od 1 minut. Temperature prenosa, jonskog izvora i kvadrupolnog analizatora održavane su na  $290 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $230 \text{ }^\circ\text{C}$  i  $150 \text{ }^\circ\text{C}$ , redom. Vreme kašnjenja zbog rastvarača iznosilo je 4 minuta. U režimu potpunog skeniranja izmeren je maseni spektar elektronske jonizacije (*engl.* Electron Ionization, EI) na  $70 \text{ eV}$  u opsegu od  $33 - 600 (m/z)$ . Maseni spektar EI komponenti eluiranih iz kolone upoređen je sa masenim spektrima EI iz baze podataka Nacionalnog instituta za standarde i tehnologiju (*engl.* National Institute of Standards and Technology, NIST) i na taj način identifikovan.

Metoda mikroekstrakcije u čvrstoj fazi - uzorkovanje iz gasovite faze (*engl.* Headspace-solid phase microextraction, HS-SPME) korišćena je za detekciju poluisparljivih jedinjenja, izlaganjem uzorka temperaturama od  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  i  $60 \text{ }^\circ\text{C}$ . Temperatura pećnice gasnog hromatografa podešena je u rasponu od  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  (u trajanju od 2 minuta) do  $280 \text{ }^\circ\text{C}$  (u trajanju od 1 minut) sa promenom od  $15 \text{ }^\circ\text{C/min}$ . Za poboljšanje rezolucije gasne hromatografije i minimalizaciju širenja pikova korišćen je ulaz specifičan za SPME. Isparljiva organska jedinjenja koja produkuju izolati X5-2, X6-3 i X2-1P u ukupnim koncentracijama i prilikom izlaganja  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  i  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  vizuelno su predstavljena na toplotnoj karti napravljenoj u R programskom jeziku.

### 3.2.8.3. Tečna hromatografija visokih performansi spregnuta sa elektrosprej jonizacijom i kvadrupol TOF masenom spektrometrijom (HPLC-ESI-qTOF/MS)

Detekcija cikličnih lipopeptida prisutnih u etil acetatnim ekstraktima *Bacillus* izolata X5-2 i X6-3 rađena je prema protokolu opisanom u radu Dimkić et al. (2013), dok je detekcija cikličnih lipopeptida u etil acetatnom i benzenovom ekstraktu *Pseudomonas* X2-1P izolata rađena po protokolu Janakiev et al. (2019b). Sva razdvajanja su rađena i prilagođena koloni (Poroshell 120 column EC-C18;  $2,7 \mu\text{m}$ ;  $3,0 \times 150 \text{ mm}$ ) pri protoku od  $0,5 \text{ ml/min}$  korišćenjem  $25 \mu\text{l}$  injekcionog volumena. Elucioni gradijent za etil acetatne ekstrakte *Bacillus* (X5-2 i X6-3) izolata sastojao se od acetonitrila i  $10 \text{ mM}$  amonijum-acetata ( $40:60, v/v$ ). Mobilna faza ekstrakata (etil acetatanog i benzenovog) *Pseudomonas* X2-1P izolata, sastojala se od (A) ultračiste vode i (B)  $0,2\%$  mravlje kiseline i acetonitrila korišćenih na sledeći način:  $0,0-1,0$  minut  $5\%$  B,  $1,0-16$  minuta od  $5$  do  $95\%$  B,  $16,0-16,1$  minuta od  $95$  do  $5\%$  B, zatim  $5\%$  B u trajanju od 6 minuta. Razdvajanje cikličnih jedinjenja prvo je praćeno primenom detektora sa nizom dioda ( $260 \text{ nm}$ , diode-array detector – DAD). Skeniranja masenih spektara rađena su u pozitivnom modu u opsegu  $m/z$   $800-1700$  (Dimkić et al., 2017), dok je skeniranje masenih spektara za *Pseudomonas* ekstrakte rađeno u opsegu  $m/z$   $40-1000$  u negativnom modu uz sledeće uslove: kapilarni napon  $3,0 \text{ kV}$ ; temperatura gasa  $250 \text{ }^\circ\text{C}$ ; gas za sušenje  $8 \text{ l/min}$ ; temperatura nosećeg gasa  $375 \text{ }^\circ\text{C}$ ; protok nosećeg gasa  $11 \text{ l/min}$ . U ovim uslovima uređaj bi trebalo da generiše podatke sa tačnošću oko  $\pm 3 \text{ ppm}$ . Svi podaci su obrađeni pomoću

Qualitative Workflow B.08.00 i Qualitative Navigator B.080.00 softvera. Obrada podataka zasnovana je na dostupnim literaturnim podacima i čistim standardima iturina i surfaktina.

### **3.2.9. Statistička obrada podataka**

Dobijeni rezultati ispitivanja patogenosti i virulentnosti *X. campestris* pv. *campestris* izolata na ozimoj uljanoj repici i *B. oleracea* domaćinima (brokoli, kupus, karfiol, raštan, kelj i keleraba) (potpoglavlja 3.2.3.1, 3.2.3.2. i 3.2.3.3), kao i ispitivanje biokontrolnog potencijala antagonističkih izolata *in vivo* (potpoglavlje 3.2.4.4), statistički su obrađeni u programima STATISTICA v. 7 (StatSoft, Inc.) i SPSS STATISTICS v. 20 (SPSS, Inc.). Kolmogorov–Smirnov test korišćen je za testiranje normalnosti raspodele, dok je Levinov test korišćen za ispitivanje jednakosti varijansi. Dobijeni podaci su podvrgnuti analizi varijanse (ANOVA). Izdvajanje srednjih vrednosti postignuto je primenom Tukey's HSD (*engl.* honest significant difference) testa. Rezultati su smatrani statistički značajnim u slučaju kada je vrednost  $P < 0,05$ .

## **4. REZULTATI**

## 4. REZULTATI

### 4.1. Simptomi na ozimnoj uljanoj repici prouzrokovani sa *X. campestris* pv. *campestris*

Tokom petogodišnjeg perioda (2014–2018) praćenja pojave i razvoja simptoma prouzrokovanih fitopatogenom bakterijom *X. campestris* pv. *campestris* na ozimnoj uljanoj repici na teritoriji Vojvodine, primećeno je da se prvi simptomi javljaju krajem septembra i početkom oktobra, kada je ozima uljana repica u fenofazi razvoja listova (BBCH 13-19) i to u vidu hlorotičnih lezija različitih veličina, koje su polazile od ivica listova. Kako bolest napreduje, lezije se povećavaju i postaju nekrotične, dovodeći na kraju do sušenja kompletne lisne površine. Takođe, na listovima se mogla uočiti pojava crnila lisnih nerava, što je direktno ukazivalo na prisustvo patogena u njima (Slika 5). Primećeno je da pojava simptoma za posledicu ima redukciju rasta, a u nekim slučajevima i propadanje zaraženih biljaka. Početkom proleća naredne godine (početak aprila), tj. tokom drugog dela vegetacije, kada je ozima uljana repica u fenofazi razvoja cvasti (BBCH 51-59), simptomi nastavljaju da se šire, dovodeći do sušenja i opadanja listova sve do fenofaze razvoja ploda (BBCH 71-79).

Podaci o vremenskim uslovima koji su prethodili pojavi simptoma (prosečna temperatura i količina padavina) na ozimnoj uljanoj repici, prikazani su u Prilogu 6. Podaci su preuzeti sa sajta Republičkog hidrometeorološkog zavoda Srbije (RHMZ, <http://www.hidmet.gov.rs/eng/osmotreni/naslovna.php>) za meteorološke stanice, koje su najbliže mestima uzorkovanja [Novi Sad (Kovilj, Futog, Rimski Šančevi, Bačka Palanka), Sombor (Odžaci, Nova Crvenka, Karavukovo), Palić (Bačka Topola), Kikinda (Ada, Gornji Breg)]. Uočeno je da su temperatura i količina padavina bile relativno visoke tokom posmatranih meseci/godina. Ekstremno toplo i kišovito vreme zabeleženo je 2014. i 2018. godine, u odnosu na višegodišnji proseak od 1951. godine.



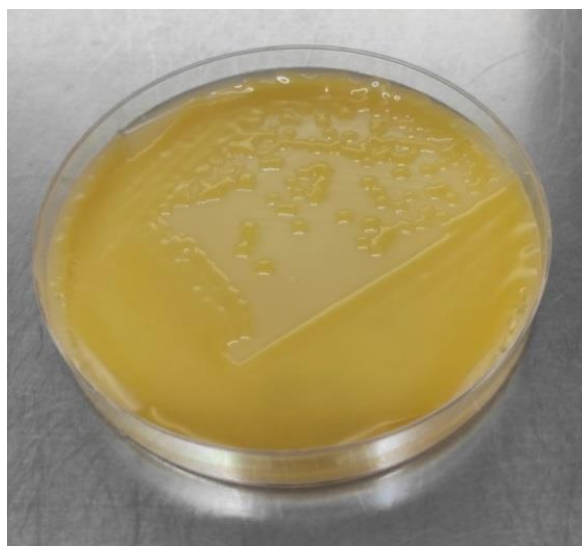
**Slika 5.** *X. campestris* pv. *campestris*, prirodna infekcija ozime uljane repice [foto P. Mitrović (levo) i A. Jelušić (desno)]

#### 4.2. Izolacija i preliminarna molekularna identifikacija *X. campestris* pv. *campestris*

Tokom tri godine uzorkovanja (2014, 2016. i 2018) biljaka ozime uljane repice sa simptomima prouzrokovanim fitopatogenom bakterijom *X. campestris* pv. *campestris* sa 18 lokaliteta na teritoriji Vojvodine [regije Bačka (južna, severna i zapadna) i severni Banat], izolovano je ukupno 82 izolata, koji su formirali svetlo žute, sjajne, konveksne i mukoidne bakterijske kolonije na YDC hranljivoj podlozi (Slika 6). Lista izolata, tip ozime uljane repice sa koje izolati vode poreklo i lokalitet uzorkovanja, prikazani su u Tabeli 2.

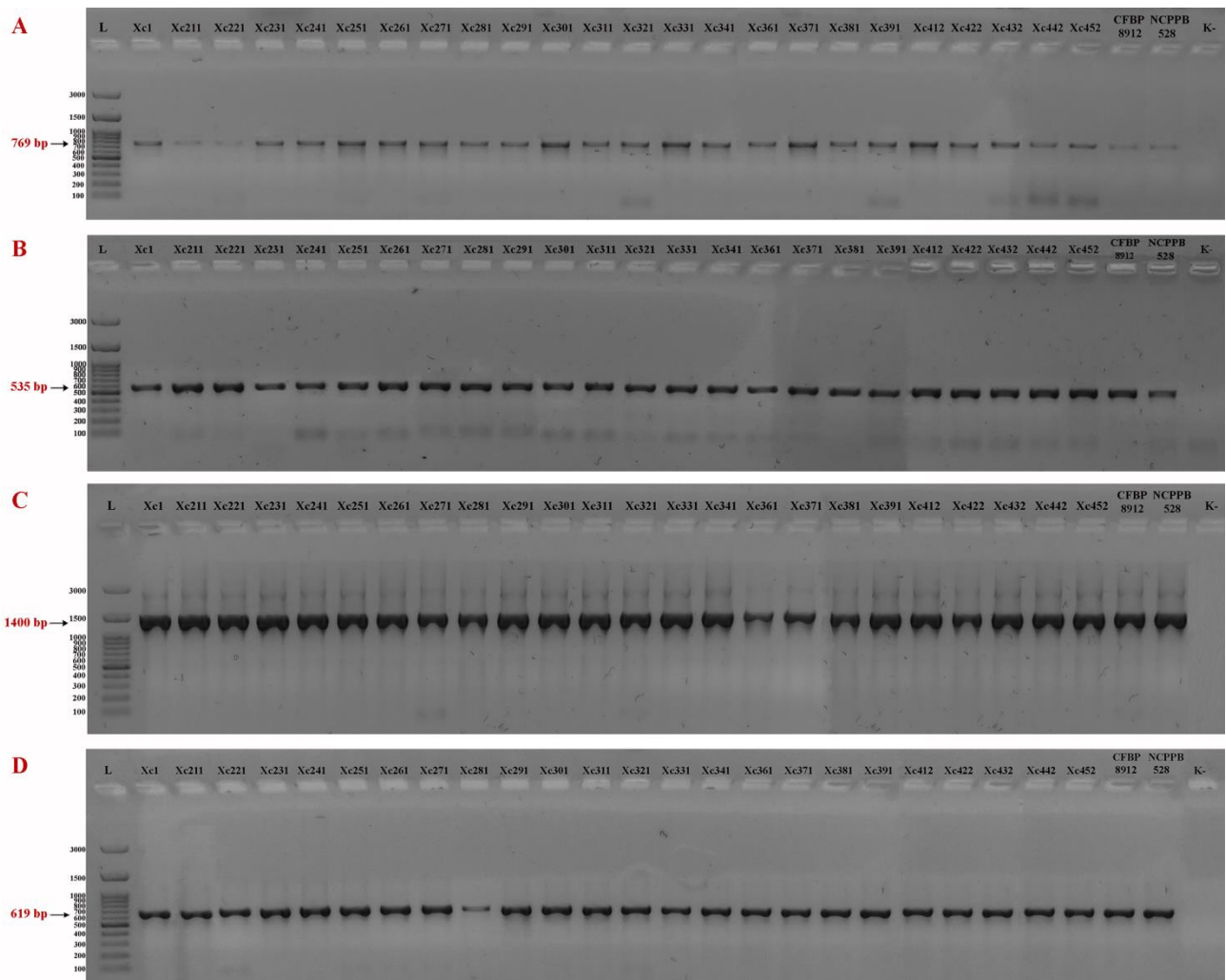
Nakon amplifikacije DNK iz svih izolata sa *X. campestris*- i *X. campestris* pv. *campestris*-specifičnim prajmerima, prisustvo umnoženog regiona DNK očekivane dužine od 1400 bp (DLH109/DLH112), 619 bp (DLH120/DLH125), 769 bp (Dhrp\_Xcc\_F/Dhrp\_Xcc\_R) i 535 bp (XCF/XCR) dokazano je za ukupno 65 izolata (Tabela 2, Slika 7). Prisustvo *X. campestris* pv. *campestris* dokazano je u uzorcima sakupljenim na 10 lokaliteta [Južnobački okrug (Bačka Palanka, Futog, Kovilj i Rimski Šančevi), Zapadnobački okrug (Karavukovo, Nova Crvenka i Odžaci), Severnobački okrug (Bačka Topola), Severnobanatski okrug (Ada i Gornji Breg)].

Od ukupno 65 izolata, tokom 2014. godine sa lokaliteta Kovilj (sorta Banačanka) izolovano je ukupno devet. Tokom 2016. godine, sa lokaliteta Ada (pet izolata), Odžaci (četiri izolata), Nova Crvenka (šest izolata), Karavukovo (pet izolata), Futog (četiri izolata), Kovilj (pet izolata), Rimski Šančevi (četiri izolata), Gornji Breg (jedan izolat), Bačka Topola (tri izolata) i Bačka Palanka (dva izolata), izolovano je ukupno 39 izolata sa „Nepoznatih“ sorti ozime uljane repice i sorti Triangle (Karavukovo) i Banačanka (Rimski Šančevi). Takom 2018. godine, izolovano je ukupno 17 *X. campestris* pv. *campestris* izolata sa „Nepoznate“ sorte (tri izolata), sorti Kata (tri izolata) i Nevena (dva izolata), linije SO 14 (pet izolata) i hibrida NS Ras (četiri izolata) ozime uljane repice, sakupljenih na lokalitetu Rimski Šančevi. Sedamnaest izolata dobijenih sa osam lokaliteta [Južnobački okrug (Begeč i Turija), Severnobački okrug (Mali Idoš), Severnobanatski okrug (Bogaraš, Mol, Ostojićevo, Senta, Tornjoš)], a morfologije nalik *Xanthomonas*, primenom specifičnih prajmera nisu identifikovani kao bakterija *X. campestris* pv. *campestris*, zbog čega su isključeni iz daljih istraživanja (Tabela 2).



**Slika 6.** Izgled kolonija *X. campestris* pv. *campestris* na YDC hranljivoj podlozi (foto A. Jelušić)





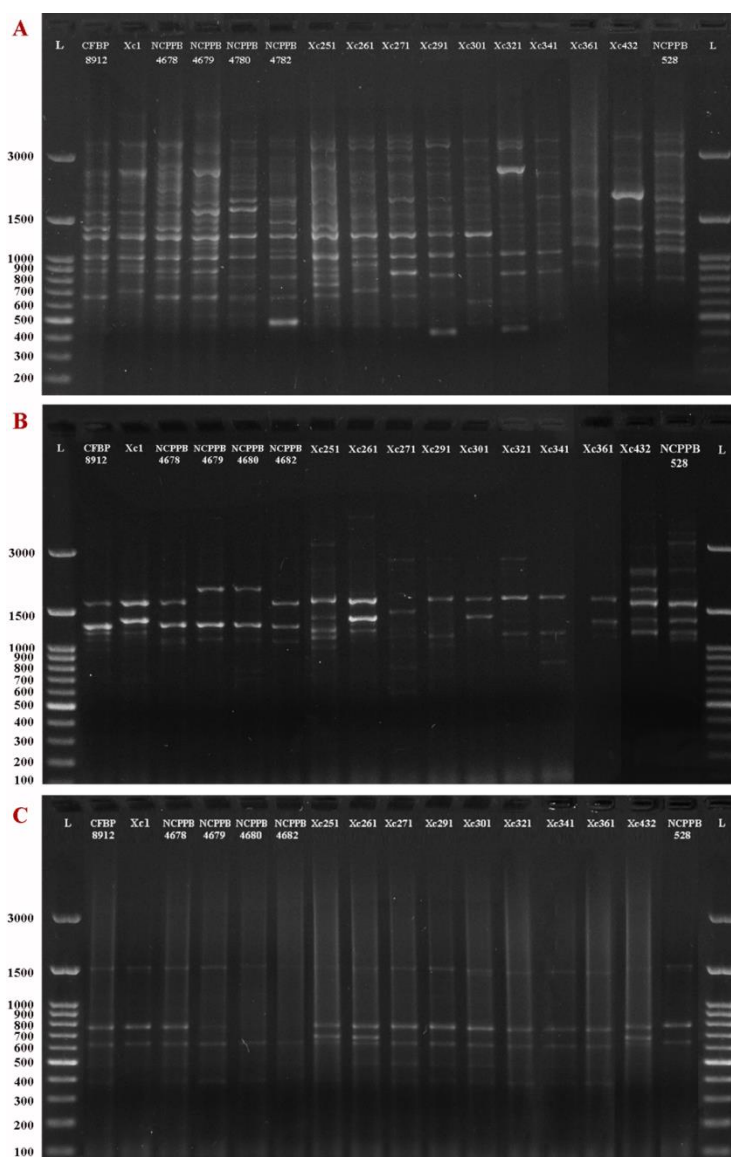
**Slika 7.** Pozicija umnoženog regiona DNK kod 24 odabrana izolata poreklom sa ozime uljane repice, izolovanih sa 10 različitih lokaliteta i sa različitih tipova ozime uljane repice (sorti, hibrida, linija), koji su preliminarno identifikovani kao *X. campestris* pv. *campestris* nakon primene *X. campestris* pv. *campestris*- (A: Dhrp\_Xcc\_F/Dhrp\_Xcc\_R i B: XCF/XCR) i *X. campestris*- (C: DLH109/DLH112 i D: DLH120/DLH125) specifičnih prajmera. Pozicije umnoženih regiona prikazane su u odnosu na DNK marker 100–3000 bp DNA ladder (NIPPON Genetics) i pozitivne kontrole CFBP 8912 i NCPPB528.

### 4.3. Utvrđivanje genetičkog diverziteta *X. campestris* pv. *campestris*

#### 4.3.1. Rep-PCR

UPGMA filogenetska stabla konstruisana na osnovu dobijenih BOX-, ERIC- i REP-PCR profila u cilju utvrđivanja postojanja genetičkog diverziteta između 65 testiranih *X. campestris* pv. *campestris* izolata poreklom sa ozime uljane repice, redom su prikazana u Prilozima 7, 8 i 9. Prikazani rezultati jasno ukazuju na postojanje genetičkog diverziteta između *X. campestris* pv. *campestris* izolata sa ozime uljane repice iz Srbije. Najveći broj vizuelno različitih DNK profila dobijen je primenom BOXA1R (14 različitih profila) i ERIC1R/ERIC2 (10 različitih profila) prajmera, dok su primenom REP1R-I/REP2-I prajmera dobijena samo četiri različita profila. DNK profili dobijeni primenom BOX-, ERIC- i REP-PCR prajmera prikazani su na Slici 8. Za svaki profil tj. za svaki klaster filogenetskog stabla dodeljen je broj: BOX (I – XIV), ERIC (I – X), REP (I – IV) tj. determinisana je pripadnost određenoj rep-PCR grupi. Pripadnost izolata određenoj rep-PCR grupi, prikazana je u Tabeli 9. Primenom BOX-PCR prajmera, od ukupno 14 (I – XIV) determinisanih i vizuelno različitih DNK profila, 10 profila (V – XIV) se razlikovalo od četiri (profili I – IV) profila koji su determinisani za pet referentnih *X. campestris* pv. *campestris* sojeva (CFBP 8912, NCPPB4678, NCPPB4679, NCPPB4680 i NCPPB4682) sa ozime uljane repice iz Srbije. BOX-PCR profil VII bio je najzastupljeniji među testiranim *X. campestris* pv. *campestris*

izolatima i to kod 11 izolata, dok su ostali profili bili zastupljeni kod devet (profil V), osam (profili VIII i XIII), sedam (profil XI), pet (profil X), četiri (profili VI i IX) i jednog (XII) izolata *X. campestris* pv. *campestris* (Prilog 7, Tabela 9). Primenom ERIC-PCR prajmera, od 10 (I – X) vizuelno različitih DNK profila, šest (profili V – X) se razlikovalo od četiri profila (profili I – IV) koji su determinisani za pet referentnih sojeva sa ozime uljane repice. ERIC-PCR profil V je bio najzastupljeniji i to kod 15 testiranih *X. campestris* pv. *campestris* izolata, dok su profili VII, VIII, X, IX i VI bili slabije zastupljeni i to kod 11, 10, osam, pet i četiri *X. campestris* pv. *campestris* izolata, redom (Prilog 8, Tabela 9). REP-PCR je generisao pet različitih DNK profila (I – V) od kojih su se profili IV i V razlikovali od profila (I – III) koji su determinisani za referentne sojeve sa ozime uljane repice. REP-PCR profil I, bio je najzastupljeniji među testiranim izolatima, a pored referentnih sojeva CFBP 8912 i NCPPB4678, ovaj profil su imala 34 testirana *X. campestris* pv. *campestris* izolata (Prilog 9, Tabela 9).



**Slika 8.** DNK profili za 10 reprezentivnih izolata (Xc1, Xc251, Xc261, Xc271, Xc291, Xc301, Xc321, Xc341, Xc361 i Xc432), pet referentnih sojeva (CFBP 8912, NCPPB4678, NCPPB4679, NCPPB4680 i NCPPB4682) i *X. campestris* pv. *campestris* patotip soj NCPPB528, dobijeni primenom (A) BOX-, (B) ERIC- i (C) REP-PCR prajmera. Pozicije profila prikazane su u odnosu na DNK marker 100–3000 bp DNA ladder (NIPPON Genetics).

Na osnovu dobijenih rezultata, za dalji rad je odabrano 10 *X. campestris* pv. *campestris* izolata (Xc1, Xc251, Xc261, Xc271, Xc291, Xc301, Xc321, Xc341, Xc361 i Xc432) sa različitim DNK profilima, koji su se razlikovali od profila dobijenih za pet referentnih *X. campestris* pv. *campestris* sojeva (CFBP 8912, NCPPB4678, NCPPB4679, NCPPB4680 i NCPPB4682) sa ozime uljane repice iz Srbije. Nije pronađena korelacija između geografskog porekla izolata i utvrđenih rep-PCR grupa.

**Tabela 9.** Rep-PCR grupe *X. campestris* pv. *campestris* sa ozime uljane repice iz Srbije.

Šifra izolata	Lokalitet	Rep-PCR grupa		
		BOX	ERIC	REP
<b>Xc1 (=CFBP 8913)</b> – Xc5	Kovilj (Južnobački okrug)	V	V	IV
Xc7, Xc8	Kovilj (Južnobački okrug)	V	V	IV
Xc14, Xc15	Kovilj (Južnobački okrug)	V	V	IV
Xc211 – Xc215	Ada (Severnobački okrug)	I	I	I
<b>Xc251 (=CFBP 8919)</b> – Xc254	Odžaci (Zapadnobački okrug)	VI	VI	V
<b>Xc261 (=CFBP 8920)</b> – Xc266	Nova Crvenka (Zapadnobački okrug)	VII	V	V
<b>Xc271 (=CFBP 8921)</b> – Xc275	Karavukovo (Zapadnobački okrug)	VIII	VII	I
<b>Xc291 (=CFBP 8922)</b> – Xc294	Futog (Južnobački okrug)	IX	VIII	I
<b>Xc301 (=CFBP 8923)</b> – Xc305	Kovilj (Južnobački okrug)	X	IX	I
Xc311 – Xc314	Rimski Šančevi (Južnobački okrug)	XI	IV	I
<b>Xc321 (=CFBP 8924)</b>	Gornji Breg (Severnobački okrug)	XII	III	I
<b>Xc341 (=CFBP 8925)</b> – Xc343	Bačka Topola (Severnobački okrug)	XI	VIII	I
<b>Xc361 (=CFBP 8926)</b> , Xc362	Bačka Palanka (Južnobački okrug)	XIII	IV	I
Xc412 – Xc416	Rimski Šančevi (Južnobački okrug)	VII	X	I
Xc422 – Xc424	Rimski Šančevi (Južnobački okrug)	VIII	VIII	V
<b>Xc432 (=CFBP 8927)</b> – Xc434	Rimski Šančevi (Južnobački okrug)	XIV	X	V
Xc442, Xc443	Rimski Šančevi (Južnobački okrug)	XIII	VII	IV
Xc452 – Xc455	Rimski Šančevi (Južnobački okrug)	XIII	VII	IV
<b>Referentni sojevi</b>				
Xc2010 (=CFBP 8912)	Novi Sad (Južnobački okrug)	I	I	I
Xc6 (=NCPBP4678, =CFBP 8914)	Novi Sad (Južnobački okrug)	I	II	I
Xc9 (=NCPBP4679, =CFBP 8915)	Novi Sad (Južnobački okrug)	II	III	II
Xc23 (=NCPBP4680, =CFBP 8916)	Novi Sad (Južnobački okrug)	III	III	III
Xc31 (=NCPBP4682, =CFBP 8918)	Novi Sad (Južnobački okrug)	IV	IV	III

Izolati označeni sa „bold“ uzeti su kao reprezentativni za dalja istraživanja

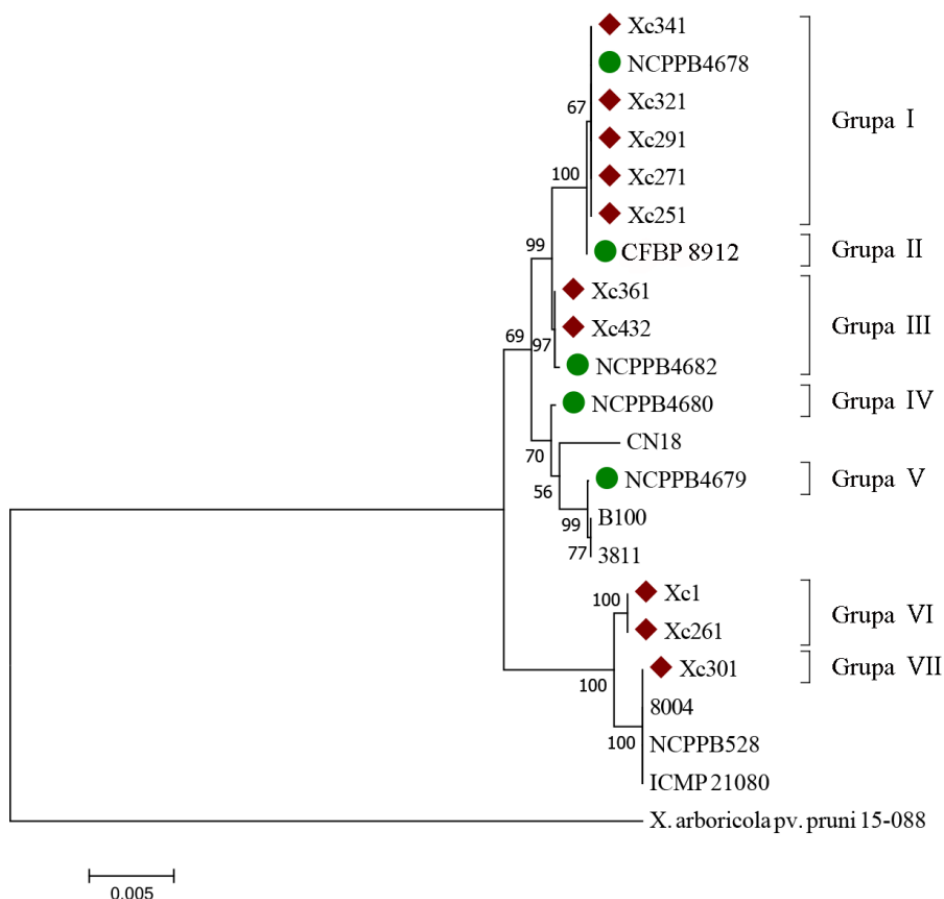
#### 4.3.2. MLST/MLSA

Svih 10 reprezentativnih izolata (Xc1, Xc251, Xc261, Xc271, Xc291, Xc301, Xc321, Xc341, Xc361 i Xc432) sa ozime uljane repice iz Srbije identifikovano je kao *X. campestris* pv. *campestris* na osnovu BLASTn analize, pokazujući procenat identiteta 100% sa različitim *X. campestris* pv. *campestris* sojevima deponovanim u NCBI bazi podataka. Pripadnost izolata bakteriji *X. campestris* pv. *campestris* potvrđena je na osnovu sekvenci svih šest (*dnaK*, *fyuA*, *gyrB*, *rpoD*, *gltA* i *lepA*) sekvenciranih gena.

„Neighbour-joining“ filogenetska stabla konstruisana na osnovu svih šest sekvenciranih gena pojedinačno, prikazana su u Prilogu 10, dok je filogenetsko stablo konstruisano na osnovu konkatamernih sekvenci datih gena prikazano na Slici 9. Genetička heterogenost između 15 poređenih *X. campestris* pv. *campestris* izolata sa ozime uljane repice (10 reprezentativnih i pet referentnih) dokazana je na osnovu svih gena, osim gena *fyuA*, na osnovu koga su svi *X. campestris* pv. *campestris* izolati grupisani u jedan klaster (Prilog 10). Na osnovu sekvenci gena *lepA*, testirani izolati su razdvojeni u tri grupe [I (Xc1, Xc251, Xc261, Xc271, Xc291, Xc321, Xc341, Xc361,

Xc432, CFBP8912, NCPPB4678, NCPPB4682), II (NCPPB4679), III (Xc301, NCPPB4680)], a na osnovu sekvenci *gyrB* u četiri grupe [I (NCPPB4679), II (Xc1, Xc261, Xc301, Xc361, Xc432, NCPPB4680, NCPPB4682), III (CFBP8912), IV (Xc251, Xc271, Xc291, Xc321, Xc341, NCPPB4678)] na filogenetskom stablu. Na osnovu sekvenci gena *dnaK* i *gltA* izolati su razdvojeni u dve grupe [I (NCPPB4679), II (Xc1, Xc251, Xc261, Xc271, Xc291, Xc301, Xc321, Xc341, Xc361, Xc432, CFBP8912, NCPPB4678, NCPPB4680, NCPPB4682)], kao i na osnovu gena *rpoD* [I (Xc251, Xc271, Xc291, Xc321, Xc341, Xc361, Xc432, CFBP8912, NCPPB4678, NCPPB4680, NCPPB4682), II (Xc1, Xc261, Xc301)].

Na osnovu filogenetskog stabla napravljenog od konkatamernih sekvenci, *X. campestris* pv. *campestris* izolati (reprezentativni i referentni) sa ozime uljane repice iz Srbije, razvrstani su u sedam genetički različitih grupa. Determinisane su tri nove grupe [II (CFBP 8912), VI (Xc1, Xc261) i VII (Xc301)], koje su bile različite od četiri prethodno okarakterisane za referentne sojeve sa ozime uljane repice iz Srbije [I (NCPPB4678, Xc251, Xc271, Xc291, Xc321, Xc341), III (NCPPB4682, Xc361, Xc432), IV (NCPPB4680) i V (NCPPB4679)] (Slika 9). Referentni sojevi *X. campestris* pv. *campestris* CN18, B100 i 3811 iz NCBI baze podataka, bili su genetički najbliži referentnom soju NCPPB4679 sa ozime uljane repice iz Srbije, dok su patotip soj NCPPB528 i sojevi 8004 i ICMP 21080 grupisani u klaster sa izolatom Xc301 (grupa VII) na filogenetskom stablu. *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* 15-088 grupisan je na monofiletskoj grani kao autgrupa na svim filogenetskim stablima, osim na filogenetskom stablu konstruisanom na osnovu gena *rpoD*. Korelacija između dobijenih MLSA grupa i lokaliteta uzorkovanja nije utvrđena.



**Slika 9.** „Neighbour-joining“ filogenetsko stablo konstruisano na osnovu konkatamernih sekvenci šest konzerviranih gena (*dnaK*, *fyuA*, *gyrB*, *rpoD*, *gltA* i *lepA*) za 15 *X. campestris* pv. *campestris* izolata sa ozime uljane repice iz Srbije [10 reprezentativnih ◆ i pet referentnih ●], patotip soj NCPPB528 i pet *X. campestris* pv. *campestris* sojeva (CN18, B100, 3811, 8004 i ICMP21080) iz NCBI baze podataka. Stablo je ukorenjeno sa *X. arboricola* pv. *pruni* sojem 15-088, koji je korišćen kao autgrupa (Jelušić et al., 2021a).

### 4.3.3. Analiza zasnovana na alelima

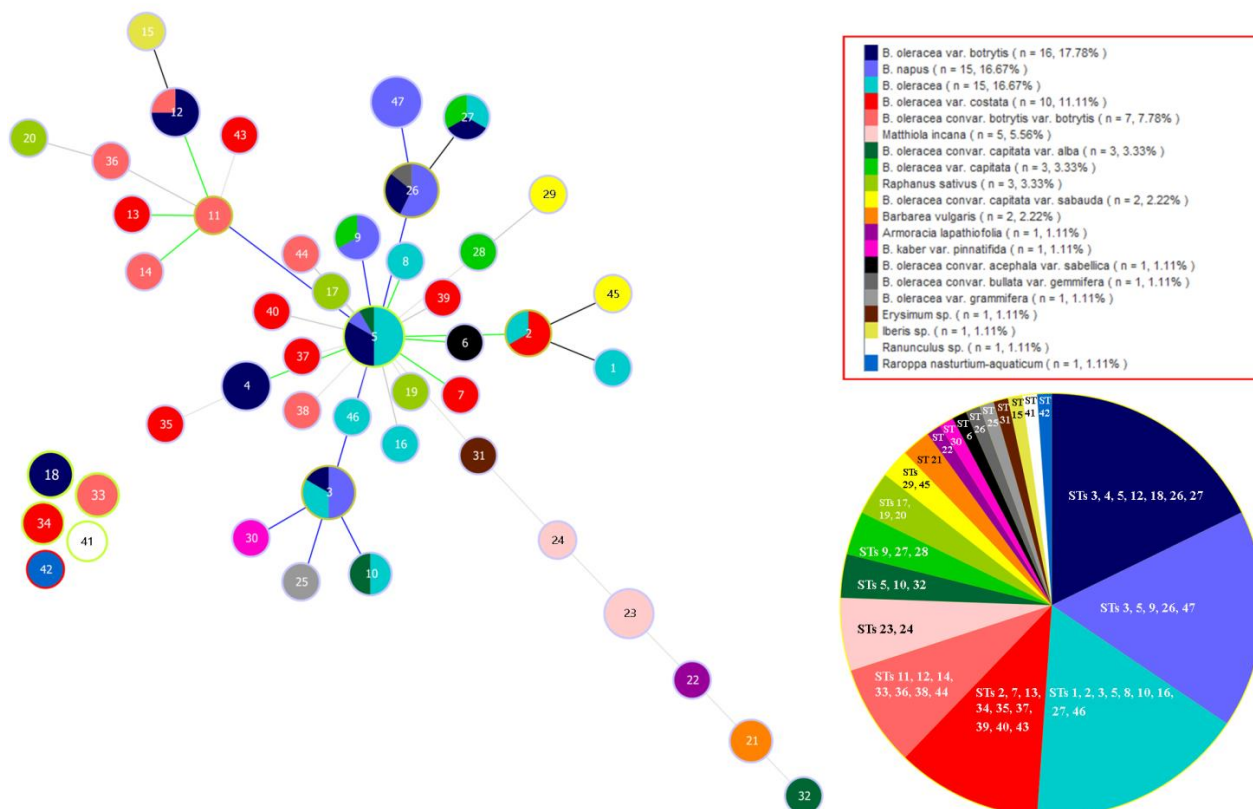
Rezultati analize zasnovane na alelima za 10 reprezentativnih i pet referentnih *X. campestris* pv. *campestris* izolata sa ozime uljane repice iz Srbije, dobijeni na osnovu sekvenci četiri konzervirana gena (P-X-*dnaK*, *fyuA*, *gyrB* i *rpoD*) prikazani su u Tabeli 10. Dobijeni rezultati potvrđuju postojanje nukleotidnih promena u parcijalnim sekvencama ispitivanih gena. Za gene P-X-*dnaK* (alelski profili 1 i 9), *gyrB* (alelski profili 1 i 3) i *rpoD* (alelski profili 4 i 11) dokazano je postojanje po dva različita alelska profila, dok je za gen *fyuA* dokazano postojanje samo jednog alelskog profila (alelski profil 3). Kao rezultat kombinovanja dobijenih alelskih profila, dokazano je postojanje pet tipova sekvenci (ST) kod 15 testiranih izolata i to: **ST3** (izolati Xc1, Xc261 i Xc301), **ST5** (izolat Xc432), **ST9** (izolati Xc251 i Xc341), **ST26** (izolati NCPPB4679, NCPPB4680, NCPPB4682 i Xc361) i tip sekvence **ST47=AP12** (izolati CFBP 8912, NCPPB4678, Xc271, Xc291 i Xc321). Tip sekvence ST47 je bio najzastupljeniji među testiranim izolatima sa ozime uljane repice. Pozicija pet determinisanih tipova sekvenci (ST3, ST5, ST9, ST26 i ST47) *X. campestris* pv. *campestris* izolata/sojeva sa ozime uljane repice iz Srbije u odnosu na druge opisane tipove sekvenci za *Xanthomonas* spp. (*Xanthomonas* sp., *X. campestris*, *X. campestris* pv. *campestris*, *X. campestris* pv. *incanae*, *X. campestris* pv. *raphani*) poreklom sa različitih domaćina, prikazana je na filogenetskom stablu sa minimumom raspona (Slika 10). Četiri tipa sekvenci (ST3, ST5, ST9 i ST26), dobijena za *X. campestris* pv. *campestris* izolate sa ozime uljane repice iz Srbije, bili su prisutni i kod *X. campestris* pv. *campestris* sojeva poreklom sa *B. oleracea* var. *botrytis* (**ST3** – CFBP 4956; **ST5** – CFBP 4952, CFBP 4953, CFBP 1119, CFBP 5815; **ST26** – CFBP 4954, CFBP 4955), *B. oleracea* (**ST3** – CFBP 5820, CFBP 6650; **ST5** – CPBF 279, CFBP 5130, CFBP 1869, CFBP 5127, CFBP 5128, CFBP 5129), *B. oleracea* convar. *capitata* var. *alba* (**ST5** – CPBF 1135), *B. oleracea* var. *capitata* (**ST9** – CFBP 6865) i *B. oleracea* convar. *bullata* var. *gemmifera* (**ST26** – CFBP 1121) (Prilog 3). Tip sekvence ST47 bio je prisutan samo kod izolata sa ozime uljane repice iz Srbije.

**Tabela 10.** Alelski profili 15 *X. campestris* pv. *campestris* izolata sa ozime uljane repice iz Srbije (10 reprezentativnih i pet referentnih: CFBP 8912, NCPPB4678, NCPPB4679, NCPPB4680 i NCPPB4682) izolovanih u periodu od 2010. do 2018. godine.

Šifra izolata	Godina izolacije	Tip sekvence (ST)	Alelski profil			
			P-X- <i>dnaK</i>	<i>fyuA</i>	<i>gyrB</i>	<i>rpoD</i>
CFBP 8912	2010	ST47 <sup>a</sup>	9	3	3	11
Xc1	2014	ST3	1	3	1	4
NCPPB4678	2014	ST47 <sup>a</sup>	9	3	3	11
NCPPB4679	2014	ST26	9	3	1	11
NCPPB4680	2014	ST26	9	3	1	11
NCPPB4682	2014	ST26	9	3	1	11
Xc251	2016	ST9	1	3	3	11
Xc261	2016	ST3	1	3	1	4
Xc271	2016	ST47 <sup>a</sup>	9	3	3	11
Xc291	2016	ST47 <sup>a</sup>	9	3	3	11
Xc301	2016	ST3	1	3	1	4
Xc321	2016	ST47 <sup>a</sup>	9	3	3	11
Xc341	2016	ST9	1	3	3	11
Xc361	2016	ST26	9	3	1	11
Xc432	2018	ST5	1	3	1	11

Oznake ST3, ST5, ST9 i ST26 odgovaraju oznakama opisanim u radu Cruz et al. (2018)

<sup>a</sup>ST47 odgovara prethodno opisanom tipu sekvence AP12 u radu Bella et al. (2019)



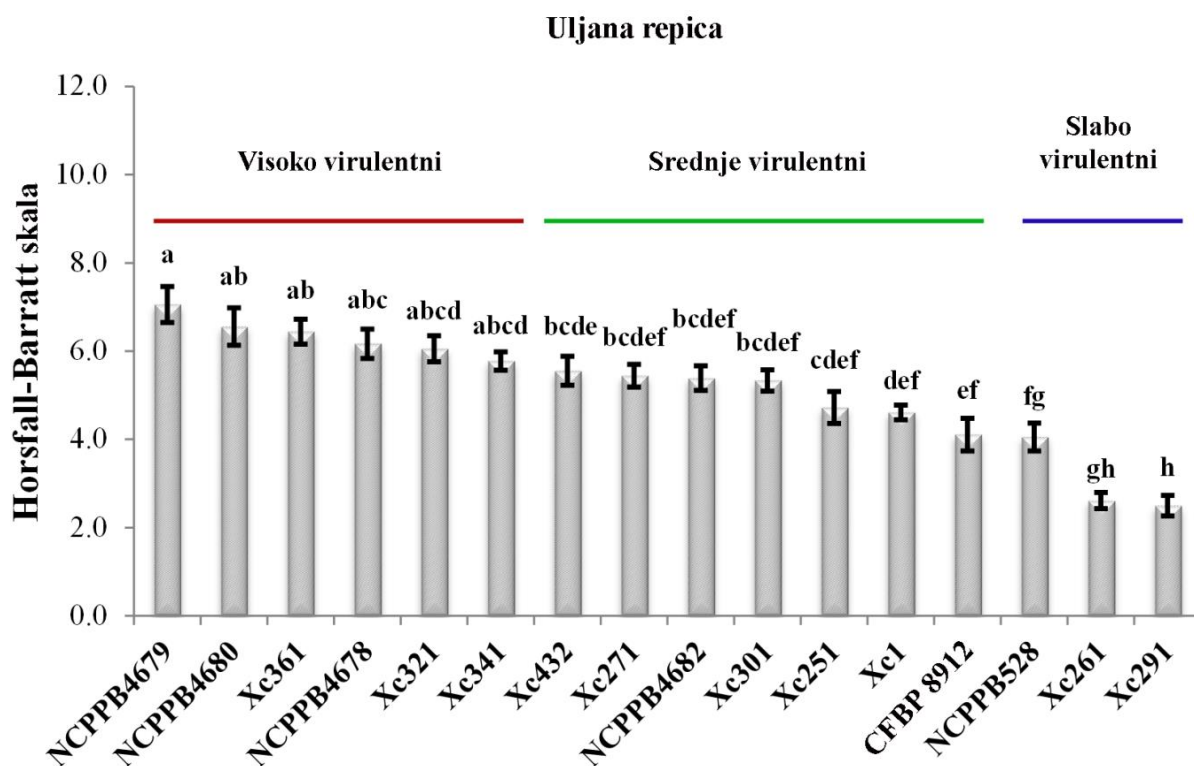
**Slika 10.** Filogenetsko stablo sa minimalnim rasponom koje prikazuje distribuciju 47 tipova sekvenci (ST) dobijenih na osnovu četiri konzervirana gena (*PX-dnaK*, *fyuA*, *gyrB* i *rpoD*) za 15 *X. campestris* pv. *campestris* izolata sa ozime uljane repice iz Srbije [10 reprezentativnih i pet referentnih (CFBP 8912, NCPPB4678, NCPPB4679, NCPPB4680 i NCPPB4682)] i 75 *Xanthomonas* spp. sojeva (*Xanthomonas* sp., *X. campestris*, *X. campestris* pv. *campestris*, *X. campestris* pv. *incanae* i *X. campestris* pv. *raphani*) izolovanih sa različitih domaćina u različitim zemljama. Svaki „čvor“ stabla predstavlja određeni tip sekvence, a njegova veličina odgovara broju sojeva (brojevi u zagradi) koji imaju dati tip sekvence. Različite boje „čvorova“ predstavljaju različite domaćine sa kojih izolati/sojevi vode poreklo. Boje linija koje povezuju „čvorove“ predstavljaju razlike u jednom (plava), dva (zelena) ili tri (svetlo siva) lokusa ili lokuse koji nisu povezani (crna) (Jelušić et al., 2021a).

#### 4.4. Patogenost *X. campestris* pv. *campestris* izolata sa ozime uljane repice

##### 4.4.1. Patogenost na ozimnoj uljanoj repici

Rezultati testa patogenosti za 15 testiranih izolata/sojeva [10 reprezentativnih (Xc1, Xc251, Xc261, Xc271, Xc291, Xc301, Xc321, Xc341, Xc361 i Xc432) i pet referentnih (CFBP 8912, NCPPB4678, NCPPB4679, NCPPB4680 i NCPPB4682)] sa ozime uljane repice iz Srbije, dobijeni 14 dana nakon inokulacije na sorti ozime uljane repice Zorica, prikazani su na Slici 11. Svi testirani izolati su prouzrokovali početne simptome u vidu nekrotičnih lezija na listovima ozime uljane repice sedam dana nakon inokulacije (Slika 12).

Na osnovu uočenog intenziteta infekcije na biljkama ocenjenim 14 dana nakon inokulacije, izolati su podeljeni u tri grupe: visoko, srednje i slabo virulentni. U grupu visoko virulentnih svrstano je šest izolata (Xc341, Xc321, NCPPB4678, Xc361, NCPPB4680 i NCPPB4679) čiji je intenzitet zaraze iznosio od 5,8 do 7,1 (Slika 11, Tabela 11). Za sedam izolata (CFBP 8912, Xc1, Xc251, Xc301, NCPPB4682, Xc271 i Xc432) je utvrđeno da su srednje virulentni (intenzitet infekcije 4,1 – 5,6), dok su samo dva izolata (Xc291 i Xc261) i patotip soj NCPPB528 svrstani u grupu slabo virulentnih izolata (2,5 – 4,05). Od svih 15 testiranih izolata/sojeva sa ozime uljane repice iz Srbije, referentni soj NCPPB4679 je bio najvirulentniji, dok je izolat Xc291 bio najmanje virulentan ( $P < 0,05$ ).



**Slika 11.** Patogenost 15 *X. campestris* pv. *campestris* izolata sa ozime uljane repice iz Srbije [10 reprezentativnih i pet referentnih (CFBP 8912, NCPPB4678, NCPPB4679, NCPPB4680 i NCPPB4682)] i patotip soja *X. campestris* pv. *campestris* NCPPB528 na sorti Zorica ozime uljane repice. Simptomi su ocenjivani 14 dana nakon inokulacije na osnovu Horsfall-Barratt skale (1–12). Vrednosti označene istim slovima nisu statistički značajne prema Tukey's HSD testu (Jelušić et al., 2021a).



**Slika 12.** Nekrotične lezije na listovima sorte ozime uljane repice Zorica nastale 14 dana nakon inokulacije sa testiranim *X. campestris* pv. *campestris* izolatima u kontrolisanim uslovima staklenika (foto A. Jelušić).

#### 4.4.2. Krug domaćina

Rezultati ispitivanja kruga domaćina 15 testiranih izolata (10 reprezentativnih i pet referentnih) sa ozime uljane repice dobijeni 14 dana nakon inokulacije, prikazani su u Tabeli 11. Gotovo svi testirani *X. campestris* pv. *campestris* izolati/sojevi sa ozime uljane repice iz Srbije izazivali su početne simptome u vidu nekrotičnih lezija po obodu lišća na svih šest *B. oleracea* domaćina (brokoli, karfiol, keleraba, kelj, kupus i raštan) sedam dana nakon inokulacije (Slika 13). Svi izolati/sojevi su pokazali statistički značajno ( $P < 0,05$ ) veće vrednosti nekroze listova na ozimnoj uljanoj repici u poređenju sa ostalim ispitivanim domaćinima, sa srednjim vrednostima u opsegu od 2,5 (Xc291) do 7,1 (NCPBP4679). U slučaju testiranih domaćina, najveći virulentni potencijal je pokazao referentni soj NCPBP4680 za brokoli, karfiol i kelerabu i izolat Xc341 za kupus, kelj i raštan. Oba izolata pripadaju grupi visoko virulentnih sojeva/izolata sa ozime uljane repice iz Srbije. Izolat Xc261 nije prouzrokovao simptome na brokoliju, a Xc291 na raštanu. Pored slabe virulentnosti ovih izolata na ozimnoj uljanoj repici, Xc261 je od svih testiranih izolata bio najslabije virulentan na kelju (1,3) i karfiolu (1,1), a Xc291 na karfiolu (1,1), kao i na kupusu (1,2) i kelerabi (1,2). Patotip soj NCPBP528 je prouzrokovao simptome na svim testiranim domaćinima (2,8 – 4,2) ne pokazujući postojanje statistički značajne razlike u virulentnosti između testiranih domaćina.

**Tabela 11.** Srednje vrednosti ocene (srednja vrednost  $\pm$  SE, n=6) intenziteta zaraze listova šest *B. oleracea* domaćina i ozime uljane repice 14 dana nakon inokulacije biljaka sa 15 *X. campestris* pv. *campestris* izolata

Domaćin	Izolati							
	CFBP 8912	Xc1	NCPBP4678	NCPBP4679	NCPBP4680	NCPBP4682	Xc251	Xc261
U. repica	<b>4,1 <math>\pm</math> 0,37<sup>a</sup></b>	<b>4,6 <math>\pm</math> 0,16<sup>a</sup></b>	<b>6,2 <math>\pm</math> 0,34<sup>a</sup></b>	<b>7,1 <math>\pm</math> 0,41<sup>a</sup></b>	<b>6,6 <math>\pm</math> 0,42<sup>a</sup></b>	<b>5,4 <math>\pm</math> 0,28<sup>a</sup></b>	<b>4,7 <math>\pm</math> 0,36<sup>a</sup></b>	<b>2,6 <math>\pm</math> 0,18<sup>a</sup></b>
Kupus	2,6 $\pm$ 0,40 <sup>bc</sup>	1,9 $\pm$ 0,29 <sup>b</sup>	4,1 $\pm$ 0,32 <sup>b</sup>	4,9 $\pm$ 0,43 <sup>b</sup>	4,2 $\pm$ 0,48 <sup>c</sup>	2,7 $\pm$ 0,20 <sup>bc</sup>	3,4 $\pm$ 0,34 <sup>ab</sup>	1,3 $\pm$ 0,14 <sup>b</sup>
Kelj	2,2 $\pm$ 0,31 <sup>bc</sup>	1,8 $\pm$ 0,23 <sup>b</sup>	3,3 $\pm$ 0,37 <sup>bc</sup>	4,4 $\pm$ 0,54 <sup>b</sup>	4,6 $\pm$ 0,37 <sup>bc</sup>	2,6 $\pm$ 0,18 <sup>bc</sup>	2,4 $\pm$ 0,23 <sup>bc</sup>	1,3 $\pm$ 0,18 <sup>b</sup>
Karfiol	3,7 $\pm$ 0,35 <sup>ab</sup>	1,2 $\pm$ 0,12 <sup>b</sup>	3,3 $\pm$ 0,33 <sup>bc</sup>	5,4 $\pm$ 0,39 <sup>ab</sup>	5,9 $\pm$ 0,36 <sup>ab</sup>	3,4 $\pm$ 0,23 <sup>b</sup>	2,8 $\pm$ 0,37 <sup>bc</sup>	1,1 $\pm$ 0,06 <sup>b</sup>
Brokoli	1,9 $\pm$ 0,31 <sup>c</sup>	1,1 $\pm$ 0,11 <sup>b</sup>	2,8 $\pm$ 0,47 <sup>bc</sup>	3,8 $\pm$ 0,38 <sup>b</sup>	3,8 $\pm$ 0,43 <sup>c</sup>	1,9 $\pm$ 0,17 <sup>c</sup>	1,9 $\pm$ 0,22 <sup>c</sup>	1,0 $\pm$ 0,00 <sup>b</sup>
Raštan	2,7 $\pm$ 0,40 <sup>abc</sup>	1,9 $\pm$ 0,25 <sup>b</sup>	3,8 $\pm$ 0,34 <sup>bc</sup>	3,8 $\pm$ 0,42 <sup>b</sup>	4,2 $\pm$ 0,37 <sup>c</sup>	3,2 $\pm$ 0,25 <sup>b</sup>	1,9 $\pm$ 0,36 <sup>c</sup>	1,4 $\pm$ 0,16 <sup>b</sup>
Keleraba	1,8 $\pm$ 0,24 <sup>c</sup>	1,3 $\pm$ 0,18 <sup>b</sup>	2,5 $\pm$ 0,28 <sup>c</sup>	3,8 $\pm$ 0,40 <sup>b</sup>	4,9 $\pm$ 0,37 <sup>abc</sup>	1,9 $\pm$ 0,24 <sup>c</sup>	2,1 $\pm$ 0,28 <sup>bc</sup>	1,4 $\pm$ 0,16 <sup>b</sup>
	Xc271	Xc291	Xc301	Xc321	Xc341	Xc361	X432	NCPBP528
U. repica	<b>5,4 <math>\pm</math> 0,26<sup>a</sup></b>	<b>2,5 <math>\pm</math> 0,23<sup>a</sup></b>	<b>5,3 <math>\pm</math> 0,24<sup>a</sup></b>	<b>6,1 <math>\pm</math> 0,30<sup>a</sup></b>	<b>5,8 <math>\pm</math> 0,21<sup>a</sup></b>	<b>6,4 <math>\pm</math> 0,28<sup>a</sup></b>	<b>5,6 <math>\pm</math> 0,33<sup>a</sup></b>	4,1 $\pm$ 0,32 <sup>a</sup>
Kupus	2,4 $\pm$ 0,23 <sup>b</sup>	1,2 $\pm$ 0,13 <sup>b</sup>	4,9 $\pm$ 0,24 <sup>ab</sup>	2,7 $\pm$ 0,21 <sup>bc</sup>	5,0 $\pm$ 0,37 <sup>ab</sup>	3,2 $\pm$ 0,22 <sup>b</sup>	3,6 $\pm$ 0,36 <sup>bc</sup>	3,1 $\pm$ 0,27 <sup>a</sup>
Kelj	2,0 $\pm$ 0,21 <sup>b</sup>	1,4 $\pm$ 0,15 <sup>b</sup>	4,7 $\pm$ 0,27 <sup>abc</sup>	2,4 $\pm$ 0,15 <sup>bc</sup>	4,8 $\pm$ 0,36 <sup>abc</sup>	2,7 $\pm$ 0,18 <sup>b</sup>	3,2 $\pm$ 0,29 <sup>bc</sup>	3,6 $\pm$ 0,35 <sup>a</sup>
Karfiol	2,2 $\pm$ 0,22 <sup>b</sup>	1,1 $\pm$ 0,06 <sup>b</sup>	4,6 $\pm$ 0,29 <sup>abcd</sup>	2,7 $\pm$ 0,16 <sup>b</sup>	5,4 $\pm$ 0,30 <sup>a</sup>	3,6 $\pm$ 0,22 <sup>b</sup>	4,6 $\pm$ 0,30 <sup>ab</sup>	3,4 $\pm$ 0,34 <sup>a</sup>
Brokoli	2,6 $\pm$ 0,22 <sup>b</sup>	1,2 $\pm$ 0,12 <sup>b</sup>	3,6 $\pm$ 0,34 <sup>cd</sup>	2,5 $\pm$ 0,15 <sup>bc</sup>	3,7 $\pm$ 0,29 <sup>bc</sup>	3,0 $\pm$ 0,16 <sup>b</sup>	2,9 $\pm$ 0,46 <sup>c</sup>	2,8 $\pm$ 0,21 <sup>a</sup>
Raštan	2,7 $\pm$ 0,21 <sup>b</sup>	1,0 $\pm$ 0,00 <sup>b</sup>	4,0 $\pm$ 0,20 <sup>bcd</sup>	2,3 $\pm$ 0,18 <sup>bc</sup>	4,6 $\pm$ 0,28 <sup>abc</sup>	3,0 $\pm$ 0,26 <sup>b</sup>	2,8 $\pm$ 0,38 <sup>c</sup>	4,2 $\pm$ 0,47 <sup>a</sup>
Keleraba	2,1 $\pm$ 0,24 <sup>b</sup>	1,2 $\pm$ 0,13 <sup>b</sup>	3,4 $\pm$ 0,33 <sup>d</sup>	1,9 $\pm$ 0,18 <sup>c</sup>	3,6 $\pm$ 0,33 <sup>c</sup>	3,2 $\pm$ 0,10 <sup>b</sup>	2,8 $\pm$ 0,27 <sup>c</sup>	2,9 $\pm$ 0,37 <sup>a</sup>

Statistički značajne vrednosti su označene sa „bold”. Vrednosti koje imaju isto slovo u okviru jedne kolone nisu statistički značajne prema Tukey’s HSD testu.





**Slika 13.** Nekrotične lezije na listovima šest testiranih *B. oleracea* domaćina [brokoli (a), karfiol (b), keleraba (c), kelj (d), raštan (e), kupus (f)], nastale 14 dana nakon inokulacije testiranim sojevima *X. campestris* pv. *campestris* poreklom sa ozime uljane repice u kontrolisanim uslovima staklenika (foto A. Jelušić).

#### 4.4.3. Ispitivanje osetljivosti sortimenata uljane repice na *X. campestris* pv. *campestris*

Rezultati ispitivanja osetljivosti 50 različitih tipova uljane repice (sorti, hibrida i linija) na tri odabrana *X. campestris* pv. *campestris* izolata sa ozime uljane repice iz Srbije različite virulentnosti (NCPB4679 – visoko virulentan, Xc1 – srednje virulentan i Xc291 – slabo virulentan) i patotip soja NCPB528 prikazani su u Tabeli 12. Prema dobijenim rezultatima nisu zabeležene statistički značajne razlike u osetljivosti između tri testirana hibrida ozime uljane repice (NS Vid, NS Pek i NS Ras) ni na jedan od testiranih *X. campestris* pv. *campestris* izolata. Izolati Xc1 i NCPB4679 izazvali su približno isti intenzitet zaraze na sva tri hibrida, pri čemu su oba izolata/soja bila najmanje virulentna na hibridu NS Ras (Xc1 – 4,3 i NCPB4679 – 4,8), dok je soj NCPB4679 prouzrokovao isti intenzitet infekcije (4,8) i na hibridu NS Pek. Izolat Xc291 je bio najmanje virulentan, sa vrednostima intenziteta zaraze od 1,8 na hibridima NS Vid i NS Pek do 2,3 na hibridu NS Ras.

Rezultati ispitivanja osetljivosti 12 sorti uljane repice su pokazali da su sve sorte osetljive na tri testirana *X. campestris* pv. *campestris* izolata. Izolat NCPB4679 se pokazao kao najvirulentniji na skoro svim testiranim sortama uljane repice, osim na jaroj sorti Jovana, koja je bila najosetljivija na izolat Xc1. Izolati Xc1 i Xc291 su se na ispitivanim sortama redom pokazali kao srednje i slabo virulentni. Od svih testiranih sorti uljane repice, jara sorta Jovana je bila najotpornija na izolat NCPB4679 (4,3), dok su sorte Slavica i Kata bile najotpornije na izolat X291 (1,4). U tretmanima sorti sa izolatom Xc1, nisu uočene statistički značajne razlike u osetljivosti.

Statistički značajne razlike su uočene u osetljivosti između 35 testiranih linija ozime uljane repice na tri testirana *X. campestris* pv. *campestris* izolata. Izolati Xc1 i NCPB4679 izazvali su približno isti intenzitet zaraze na testiranim linijama i pokazali se kao virulentniji od izolata Xc291, koji se pokazao kao najmanje virulentan na svim linijama. Linije DB2-7, DB2-5 i P-2 su redom bile najosetljivije na tri testirana izolata NCPB4679 (6,3), Xc1 (6,2) i Xc291 (3,3), dok su linije A10 AMJ-3, DB1-5 i DBV1-2 bile najmanje osetljive na izolate NCPB4679 (3,1), Xc1 (2,7) i Xc291 (1,0), redom.

Patotip soj NCPPB528 prouzrokovao je simptome na svim testiranim hibridima, sortama i linijama uljane repice. Statistički značajne razlike u virulentnosti patotip soja na hibride nisu uočene. Sorta Zlatna (4,5) se pokazala kao najosetljivija, a sorta Kata (2,6) kao najmanje osetljiva, a od svih testiranih linija, P-3 (1,9) je bila najmanje osetljiva, a DBV1-6 (4,4) najosetljivija na patotip soj.

Kumulativne srednje vrednosti virulentnosti tri testirana *X. campestris* pv. *campestris* izolata sa ozime uljane repice (NCPB4679, Xc1 i Xc291) i patotip soja NCPPB528 na hibride, sorte i linije uljane repice, prikazane su na Slici 14. Izolat NCPB4679 je pokazao statistički značajno najveći virulentni potencijal na sortama i linijama. Izolati NCPB4679 i Xc1 su na hibridima pokazali sličan virulentni potencijal bez statističkih razlika. Izolat Xc291 je bio statistički značajno najmanje virulentan, pokazujući virulentnost manju i od patotip soja NCPPB528.

**Tabela 12.** Srednje vrednosti (srednja vrednost  $\pm$  SE, n=6) intenziteta zaraze kod 50 testiranih hibrida, sorti i linija uljane repice sa Instituta za ratarstvo i povrtarstvo (Odeljenje za uljanu repicu, Rimski Šančevi) 14 dana nakon inokulacije sa tri *X. campestris* pv. *campestris* izolata poreklom sa ozime uljane repice iz Srbije i patotip sojem NCPPB528.

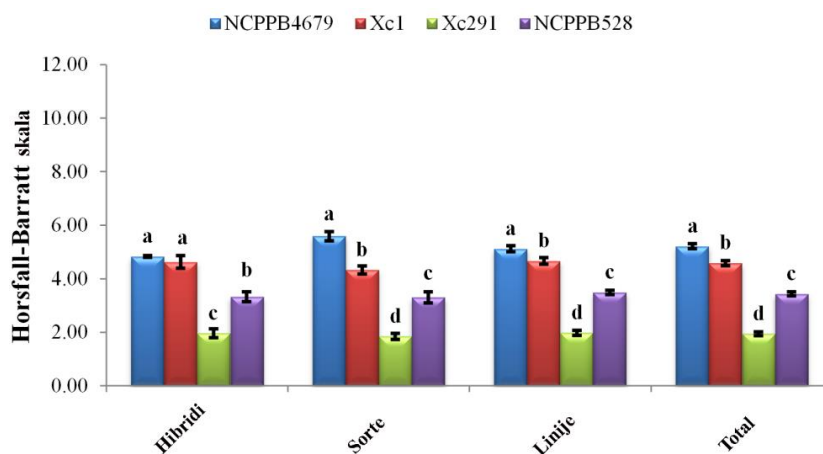
Tip uljane repice	Izolati			
	NCPB4679	Xc1	Xc291	NCPB528
<b>Hibridi</b>				
NS Vid	4,9 <sup>a</sup> $\pm$ 0,19	4,5 <sup>a</sup> $\pm$ 0,31	1,8 <sup>a</sup> $\pm$ 0,18	3,2 <sup>a</sup> $\pm$ 0,17
NS Pek	4,8 <sup>a</sup> $\pm$ 0,32	5,1 <sup>a</sup> $\pm$ 0,38	1,8 <sup>a</sup> $\pm$ 0,24	3,7 <sup>a</sup> $\pm$ 0,14
NS Ras	4,8 <sup>a</sup> $\pm$ 0,30	4,3 <sup>a</sup> $\pm$ 0,33	2,3 <sup>a</sup> $\pm$ 0,30	3,1 <sup>a</sup> $\pm$ 0,23
<b>Sorte</b>				
Kata	6,4 <sup>a</sup> $\pm$ 0,31	4,7 <sup>a</sup> $\pm$ 0,33	1,4 <sup>b</sup> $\pm$ 0,15	<b>2,3<sup>e</sup> <math>\pm</math> 0,18</b>
Branka	6,4 <sup>a</sup> $\pm$ 0,31	4,6 <sup>a</sup> $\pm$ 0,23	1,9 <sup>ab</sup> $\pm$ 0,19	2,6 <sup>de</sup> $\pm$ 0,23
Zorica	6,1 <sup>a</sup> $\pm$ 0,26	4,3 <sup>a</sup> $\pm$ 0,43	2,3 <sup>ab</sup> $\pm$ 0,26	4,3 <sup>ab</sup> $\pm$ 0,22
Jasna	6,1 <sup>a</sup> $\pm$ 0,19	4,1 <sup>a</sup> $\pm$ 0,48	1,9 <sup>ab</sup> $\pm$ 0,26	4,1 <sup>abc</sup> $\pm$ 0,45
Nevena	5,6 <sup>a</sup> $\pm$ 0,19	3,6 <sup>a</sup> $\pm$ 0,31	1,5 <sup>b</sup> $\pm$ 0,23	3,2 <sup>bcd</sup> $\pm$ 0,39
Anna	5,5 <sup>ab</sup> $\pm$ 0,31	3,3 <sup>a</sup> $\pm$ 0,41	1,9 <sup>ab</sup> $\pm$ 0,26	3,2 <sup>bcd</sup> $\pm$ 0,21
Svetlana	5,5 <sup>ab</sup> $\pm$ 0,26	5,1 <sup>a</sup> $\pm$ 0,45	<u>2,8<sup>a</sup> <math>\pm</math> 0,27</u>	2,7 <sup>de</sup> $\pm$ 0,19
Slavica	5,4 <sup>ab</sup> $\pm$ 0,36	4,6 <sup>a</sup> $\pm$ 0,43	1,4 <sup>b</sup> $\pm$ 0,15	3,3 <sup>abcde</sup> $\pm$ 0,22
Zlatna	5,3 <sup>ab</sup> $\pm$ 0,26	4,5 <sup>a</sup> $\pm$ 0,38	1,7 <sup>b</sup> $\pm$ 0,26	<u>4,5<sup>a</sup> <math>\pm</math> 0,19</u>
Ilija	5,3 <sup>ab</sup> $\pm$ 0,18	4,1 <sup>a</sup> $\pm$ 0,61	1,9 <sup>ab</sup> $\pm$ 0,23	2,9 <sup>cde</sup> $\pm$ 0,34
Jelena	5,2 <sup>ab</sup> $\pm$ 0,21	4,2 <sup>a</sup> $\pm$ 0,21	2,0 <sup>ab</sup> $\pm$ 0,28	3,8 <sup>abcd</sup> $\pm$ 0,21
Jovana	4,3 <sup>b</sup> $\pm$ 0,35	4,9 <sup>a</sup> $\pm$ 0,47	1,5 <sup>b</sup> $\pm$ 0,19	2,8 <sup>cde</sup> $\pm$ 0,24
<b>Linije</b>				
DB2-7	<u>6,3<sup>a</sup> <math>\pm</math> 0,19</u>	4,8 <sup>abcde</sup> $\pm$ 0,35	2,0 <sup>bcdefghij</sup> $\pm$ 0,25	3,7 <sup>abcd</sup> $\pm$ 0,14
DB2-6	6,0 <sup>ab</sup> $\pm$ 0,28	4,7 <sup>abcde</sup> $\pm$ 0,33	1,1 <sup>ij</sup> $\pm$ 0,08	2,9 <sup>cde</sup> $\pm$ 0,23
P-3	5,9 <sup>ab</sup> $\pm$ 0,26	4,8 <sup>abcde</sup> $\pm$ 0,62	2,4 <sup>abcdef</sup> $\pm$ 0,31	<b>1,9<sup>e</sup> <math>\pm</math> 0,19</b>
DB2-1	5,8 <sup>ab</sup> $\pm$ 0,44	4,6 <sup>abcde</sup> $\pm$ 0,47	1,9 <sup>bcdefghij</sup> $\pm$ 0,15	3,8 <sup>abcd</sup> $\pm$ 0,24
R1	5,8 <sup>ab</sup> $\pm$ 0,22	4,8 <sup>abcd</sup> $\pm$ 0,24	1,3 <sup>ghij</sup> $\pm$ 0,13	2,8 <sup>de</sup> $\pm$ 0,13
DB2-5	5,8 <sup>ab</sup> $\pm$ 0,28	<u>6,2<sup>a</sup> <math>\pm</math> 0,34</u>	2,3 <sup>bcdefg</sup> $\pm$ 0,18	3,2 <sup>bcd</sup> $\pm$ 0,24
DB2	5,7 <sup>ab</sup> $\pm$ 0,22	4,9 <sup>abcd</sup> $\pm$ 0,29	2,5 <sup>abcde</sup> $\pm$ 0,31	4,0 <sup>abc</sup> $\pm$ 0,21
DB1-2	5,7 <sup>ab</sup> $\pm$ 0,22	4,1 <sup>abcde</sup> $\pm$ 0,45	2,9 <sup>ab</sup> $\pm$ 0,19	3,4 <sup>abcd</sup> $\pm$ 0,19
DBV1-4	5,6 <sup>ab</sup> $\pm$ 0,26	5,6 <sup>ab</sup> $\pm$ 0,31	1,8 <sup>cdefghij</sup> $\pm$ 0,22	3,6 <sup>abcd</sup> $\pm$ 0,19
DBV1-3	5,6 <sup>ab</sup> $\pm$ 0,19	4,8 <sup>abcde</sup> $\pm$ 0,39	1,2 <sup>hij</sup> $\pm$ 0,11	3,3 <sup>bcd</sup> $\pm$ 0,13
DB1	5,5 <sup>ab</sup> $\pm$ 0,38	4,8 <sup>abcde</sup> $\pm$ 0,49	2,3 <sup>abcdef</sup> $\pm$ 0,22	3,7 <sup>abcd</sup> $\pm$ 0,19

(nastavljeno)

Tabela 12.

Tip uljane repice	Izolati			
	NCPB4679	Xc1	Xc291	NCPB528
<b>Linije</b>				
DBV2-2	5,5 <sup>ab</sup> ± 0,26	5,2 <sup>abcd</sup> ± 0,32	2,1 <sup>bcdefghi</sup> ± 0,19	3,3 <sup>abcd</sup> ± 0,19
DBV1-2	5,5 <sup>ab</sup> ± 0,31	4,8 <sup>abcde</sup> ± 0,22	<b>1,0<sup>j</sup> ± 0,00</b>	3,7 <sup>abcd</sup> ± 0,19
P-1	5,4 <sup>ab</sup> ± 0,31	3,9 <sup>bcde</sup> ± 0,36	2,8 <sup>abc</sup> ± 0,18	3,2 <sup>bcd</sup> ± 0,17
R3	5,4 <sup>ab</sup> ± 0,31	4,3 <sup>abcde</sup> ± 0,45	2,7 <sup>abcd</sup> ± 0,14	3,8 <sup>abcd</sup> ± 0,17
R.F	5,4 <sup>ab</sup> ± 0,26	4,4 <sup>abcde</sup> ± 0,29	1,5 <sup>efghij</sup> ± 0,15	3,4 <sup>abcd</sup> ± 0,19
DBV2-1	5,3 <sup>abcd</sup> ± 0,28	5,4 <sup>abc</sup> ± 0,26	2,3 <sup>bcdefg</sup> ± 0,18	3,5 <sup>abcd</sup> ± 0,23
DB1-4	5,3 <sup>abc</sup> ± 0,38	3,3 <sup>cde</sup> ± 0,53	2,1 <sup>bcdefghi</sup> ± 0,26	3,3 <sup>bcd</sup> ± 0,28
DBV1-6	5,2 <sup>abcd</sup> ± 0,21	3,8 <sup>bcde</sup> ± 0,44	1,9 <sup>bcdefghij</sup> ± 0,23	<u>4,4<sup>a</sup> ± 0,29</u>
DBV2-5	5,0 <sup>abcd</sup> ± 0,25	5,4 <sup>abc</sup> ± 0,29	1,1 <sup>ij</sup> ± 0,08	3,8 <sup>abcd</sup> ± 0,28
DB1-1	5,0 <sup>abcd</sup> ± 0,21	3,2 <sup>de</sup> ± 0,39	1,7 <sup>defghij</sup> ± 0,14	3,1 <sup>bcd</sup> ± 0,19
DBV1-1	5,0 <sup>abcd</sup> ± 0,25	4,8 <sup>abcd</sup> ± 0,39	1,8 <sup>cdefghij</sup> ± 0,21	3,2 <sup>bcd</sup> ± 0,17
DB1-6	4,9 <sup>abcd</sup> ± 0,31	4,0 <sup>bcde</sup> ± 0,39	2,2 <sup>bcdefgh</sup> ± 0,17	3,8 <sup>abcd</sup> ± 0,22
DB1-5	4,8 <sup>abcde</sup> ± 0,41	<b>2,7<sup>e</sup> ± 0,31</b>	2,3 <sup>abcdef</sup> ± 0,26	4,0 <sup>abc</sup> ± 0,12
P-2	4,8 <sup>abcde</sup> ± 0,30	5,7 <sup>ab</sup> ± 0,41	<u>3,3<sup>a</sup> ± 0,19</u>	3,4 <sup>abcd</sup> ± 0,26
DBV1-5	4,8 <sup>abcd</sup> ± 0,30	4,6 <sup>abcde</sup> ± 0,31	2,3 <sup>bcdefg</sup> ± 0,22	3,3 <sup>abcd</sup> ± 0,22
A15 AMJ-4	4,8 <sup>abcd</sup> ± 0,21	4,1 <sup>abcde</sup> ± 0,51	1,9 <sup>bcdefghij</sup> ± 0,23	3,3 <sup>bcd</sup> ± 0,18
DB2-4	4,8 <sup>abcd</sup> ± 0,34	5,2 <sup>abcd</sup> ± 0,37	1,5 <sup>efghij</sup> ± 0,19	3,3 <sup>abcd</sup> ± 0,14
DBV1-7	4,8 <sup>abcd</sup> ± 0,30	5,2 <sup>abcd</sup> ± 0,30	2,0 <sup>bcdefghij</sup> ± 0,12	3,6 <sup>abcd</sup> ± 0,19
DB2-3	4,7 <sup>abcde</sup> ± 0,51	5,0 <sup>abcd</sup> ± 0,28	1,3 <sup>ghij</sup> ± 0,13	4,0 <sup>abc</sup> ± 0,21
DB2-2	4,5 <sup>bcde</sup> ± 0,45	4,0 <sup>bcde</sup> ± 0,43	1,6 <sup>efghij</sup> ± 0,19	4,2 <sup>ab</sup> ± 0,11
A4 AMJ-2	4,4 <sup>bcde</sup> ± 0,31	5,1 <sup>abcd</sup> ± 0,36	2,4 <sup>abcdef</sup> ± 0,23	3,3 <sup>bcd</sup> ± 0,18
A3 AMJ-1	3,7 <sup>cde</sup> ± 0,26	5,4 <sup>abc</sup> ± 0,45	1,4 <sup>fghij</sup> ± 0,19	3,0 <sup>cde</sup> ± 0,17
AK60	3,6 <sup>de</sup> ± 0,42	4,8 <sup>abcde</sup> ± 0,33	2,1 <sup>bcdefghi</sup> ± 0,19	3,8 <sup>abcd</sup> ± 0,24
A10 AMJ-3	<b>3,1<sup>e</sup> ± 0,34</b>	5,1 <sup>abcd</sup> ± 0,42	2,4 <sup>abcdef</sup> ± 0,19	4,2 <sup>ab</sup> ± 0,24

Statistički značajne vrednosti koje predstavljaju najmanju osetljivost određenog tipa uljane repice na neke od izolata označeni su sa „bold“, dok su vrednosti koje ukazuju na najveću osetljivost podvučene. Vrednosti koje imaju isto slovo u okviru jedne kolone za svaku grupu (hibridi, sorte, linije) nisu statistički značajne prema Tukey's HSD testu.



**Slika 14.** Kumulativne srednje vrednosti intenziteta zaraze na hibridima, sortama i linijama uljane repice dobijene 14 dana nakon inokulacije biljaka izolatima NCPB4679, Xc1 i Xc291 i patotip sojem NCPB528. Vrednosti označene istim slovima nisu statistički značajne prema Tukey's HSD testu (Jelušić et al., 2021a).

## 4.5. Metabarkoding analiza

### 4.5.1. Bakterijski diverzitet filofsere i rizofsere ozime uljane repice

Podaci o alfa diverzitetu testiranih uzoraka filofsere (Ph1-Ph5) i rizofsere (R1-R5) ozime uljane repice sa prisutnim simptomima bolesti sa *X. campestris* pv. *campestris* [linija SO 14 (1), sorti Kata (2) i Nevena (3) i hibrida NS Ras (4)] kao i uzoraka bez simptoma bolesti [sorta Zorica (5)], dobijeni nakon sekvenciranja 16S rDNK gena primenom Illumina MiSeq NGS platforme, prikazani su u Tabeli 13. Među testiranim uzorcima filofsere, najveće OBS vrednosti su dobijene za uzorak Ph5 (bez simptoma) na svim ispitivanim taksonomskim nivoima (razdeo, familija, rod). Indeksi diverziteta, Shannon i Fisher Alpha i indeksi koji ukazuju na bogatstvo CHAO1 i ACE, takođe su pokazali najveće vrednosti za uzorak Ph5, naročito na nivou roda. Na osnovu indeksa Simpson i Shannon, uzorci Ph1 i Ph4 su imali najmanji diverzitet na sva tri ispitivana taksonomska nivoa. Dobijeni rezultati su takođe ukazali na veći bakterijski diverzitet i bogatstvo taksona (razdela, familija, rodova) u uzorcima rizofsere u odnosu na uzorke filofsere. Značajne razlike u bogatstvu (broj taksonomskih grupa) između uzoraka rizofsere nisu uočene bez obzira na njihovo poreklo.

Rarefacione krive koje prikazuju alfa diverzitet uzoraka filofsere i rizofsere ozime uljane repice na sva tri ispitivana taksonomska nivoa, prikazane su u Prilozima 11 (razdeo), 12 (familija) i 13 (rod). Prikazane rarefacione krive pokazuju da je u uzorcima rizofsere došlo do povećanja broja taksonomskih jedinica (razdela, familija i rodova) tj. ukupnog diverziteta paralelno sa povećanjem broja očitanih sekvenci [88 100 (R1) – 100 649 (R4)]. Povećanje je bilo značajno više nego kod testiranih uzoraka filofsere, kod kojih je plato (broj različitih razdela, familija, rodova) značajno niži u odnosu na uzorke rizofsere, bez obzira na povećanje broja očitanih sekvenci. Suprotno uzorcima filofsere sa ispoljenim simptomima bolesti (Ph1-Ph4), koji su imali broj očitavanja sekvenci između 83 213 (Ph2) i 99 684 (Ph1), uzorak filofsere bez simptoma bolesti (Ph5) imao je značajno manji broj očitavanja sekvenci (46 475), ali veći ukupni diverzitet na sva tri ispitivana taksonomska nivoa.

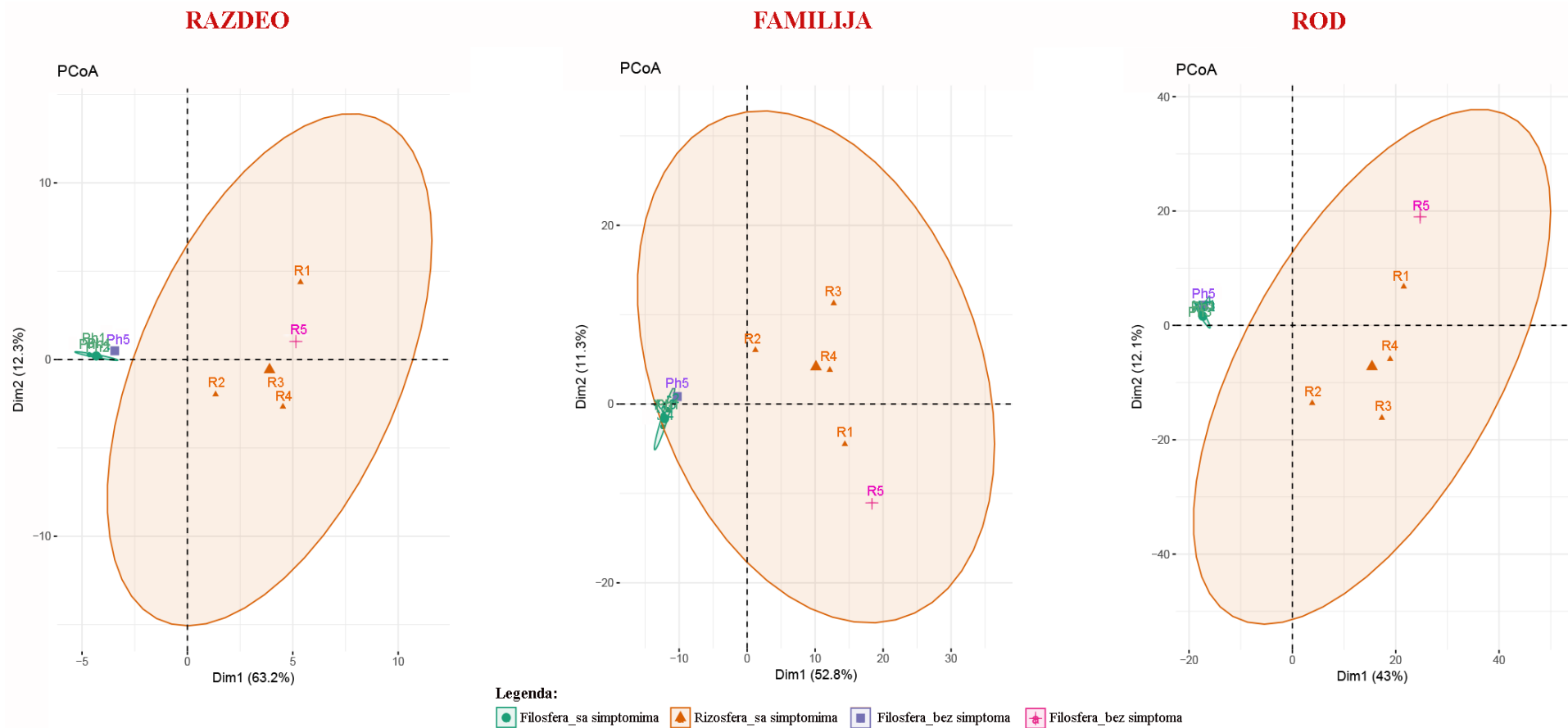
Rezultati PCoA analize, koja ukazuje na razlike između testiranih uzoraka filofsere i rizofsere prikazani su na Slici 15. Na osnovu PCoA analize, prva dimenzija (Dim1: 43% – 63,2% u zavisnosti od taksonomskog nivoa) jasno je razdvojila uzorke filofsere (levo) od uzoraka rizofsere (desno). Druga dimenzija (Dim2: 11,3% – 12,3% u zavisnosti od taksonomskog nivoa) je razdvojila uzorke rizofsere u dve grupe: R1 i R5 (grupa 1) i R2, R3 i R4 (grupa 2), ukazujući na njihovu veću međusobnu sličnost na sva tri posmatrana taksonomska nivoa. Druga dimenzija nije pokazala razdvajanje između uzoraka filofsere na nivou razdela i roda, ali na nivou familije je dokazana veća međusobna sličnost između uzoraka Ph1-Ph4 (filosfera sa simptomima) u odnosu na uzorak Ph5 (filosfera bez simptoma).

Slika 16. prikazuje rezultate analize grupisanja za testirane uzorke filofsere i rizofsere ozime uljane repice. Na osnovu dobijenih rezultata, uzorci filofsere i rizofsere su jasno razdvojeni u dve zasebne grupe na sva tri ispitivana taksonomska nivoa (razdeo, familija, rod). Ovim tipom analize jasno je prikazano postojanje razlika u sastavu bakterijskih zajednica između uzorka filofsere Ph5 (bez simptoma bolesti) i ostalih testiranih uzoraka filofsere (Ph1-Ph4) sa simptomima bolesti. Na nivou roda i familije, uzorci Ph1 i Ph4 i uzorci Ph2 i Ph3 grupisani su zajedno. Na nivou razdela nisu uočena slična grupisanja. Dobijeni rezultati takođe ukazuju i na jasno razlikovanje uzorka rizofsere R2 od ostalih uzoraka rizofsere (R1, R3-R5), na sva tri ispitivana taksonomska nivoa. Na nivou familije i roda, uzorci R1 i R5 i uzorci R3 i R4 grupisani su zajedno.

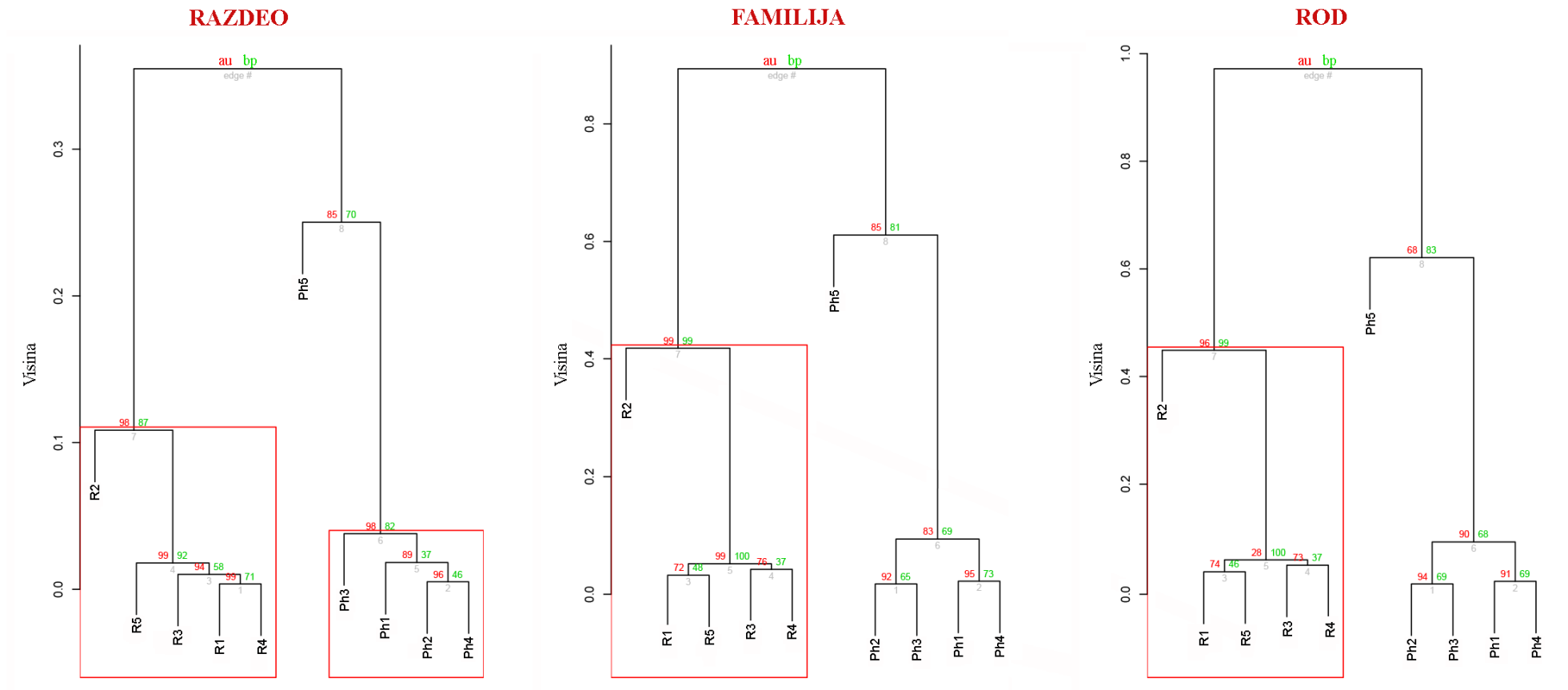
Na osnovu rezultata kanonske analize korespondencije (CCA), prikazanih u Prilogu 14, takođe je pokazano postojanje razlika u sastavu i distribuciji taksona (razdela, familija i rodova), kako između, tako i unutar testiranih uzoraka filofsere i rizofsere. Uzorci Ph5 (filosfera) i R2 (rizosfera), jasno su razdvojeni od ostalih uzoraka filofsere (Ph1-Ph4), odnosno rizofsere (R1-R4) na nivou familije i roda, dok je na nivou razdela pored dva pomenuta uzorka izdvojen i uzorak Ph3.

**Tabela 13.** Alfa diverzitet uzoraka filofsere (Ph) i rizofsere (R) biljaka ozime uljane repice sa ispoljenim simptomima zaraze sa *X. campestris* pv. *campestris* (1 – linija SO 14, 2 – sorta Kata, 3 – sorta Nevena, 4 – hibrid NS Ras) i bez simptoma (5 – sorta Zorica) na nivou razdela, familije i roda.

Sample	razdeo/familija/rod								
	Shannon	Simpson	invSimpson	FisherAlpha	OBS	CHAO1	CHAO1.SE	ACE	ACE.SE
	<b>0,34</b>	<b>0,16</b>	<b>1,19</b>	<b>1,05</b>	<b>12</b>	<b>12,25</b>	<b>0,73</b>	<b>13,17</b>	<b>1,73</b>
Ph1	1,03	0,43	1,75	7,83	74	108,5	19,27	106,68	5,76
	1,18	0,44	1,79	13,85	123,00	171,24	20,24	178,93	7,54
	<b>0,74</b>	<b>0,42</b>	<b>1,72</b>	<b>0,87</b>	<b>10</b>	<b>16</b>	<b>7,14</b>	<b>22,89</b>	<b>1,37</b>
Ph2	1,77	0,76	4,11	8	74	104,67	16,94	111,02	6,42
	1,96	0,77	4,28	13,65	119,00	168,40	21,40	180,91	7,63
	<b>0,74</b>	<b>0,46</b>	<b>1,86</b>	<b>1,16</b>	<b>13</b>	<b>16</b>	<b>4,53</b>	<b>14,96</b>	<b>1,69</b>
Ph3	1,46	0,68	3,13	8,95	82	136,17	30,5	111,88	5,45
	1,57	0,69	3,19	15,04	130,00	188,57	25,08	170,29	6,46
	<b>0,56</b>	<b>0,32</b>	<b>1,47</b>	<b>1,16</b>	<b>13</b>	<b>13,5</b>	<b>1,28</b>	<b>13,97</b>	<b>1,76</b>
Ph4	1,29	0,58	2,4	11,84	105	128,88	11,7	135,01	6
	1,50	0,60	2,50	20,98	174,00	223,68	17,50	242,81	8,46
	<b>1,19</b>	<b>0,64</b>	<b>2,75</b>	<b>1,66</b>	<b>17</b>	<b>17</b>	<b>0,12</b>	<b>18,12</b>	<b>1,96</b>
Ph5	2,06	0,74	3,86	19,26	150	157,77	4,88	161,28	6,22
	2,38	0,76	4,11	40,44	285,00	328,98	14,65	334,44	9,01
	<b>2,1</b>	<b>0,84</b>	<b>6,23</b>	<b>2,48</b>	<b>26</b>	<b>26,5</b>	<b>1,29</b>	<b>27,23</b>	<b>2,15</b>
R1	4,15	0,97	38,57	28,64	230	242,36	7,95	240,23	6,85
	4,62	0,98	52,61	73,81	523,00	594,08	21,85	576,96	11,65
	<b>1,76</b>	<b>0,76</b>	<b>4,17</b>	<b>2,18</b>	<b>23</b>	<b>23,5</b>	<b>1,29</b>	<b>25,24</b>	<b>1,96</b>
R2	3,7	0,95	19,25	26,83	216	225,5	5,86	228,76	7,04
	4,30	0,97	29,47	66,18	473,00	527,02	16,47	536,62	11,30
	<b>2,12</b>	<b>0,84</b>	<b>6,38</b>	<b>2,3</b>	<b>24</b>	<b>24</b>	<b>0,1</b>	<b>24,55</b>	<b>1,99</b>
R3	4,11	0,97	36,48	28,53	226	245,5	9,9	254,29	7,32
	4,59	0,98	51,10	71,21	499,00	603,65	29,21	588,05	11,79
	<b>2,07</b>	<b>0,83</b>	<b>5,94</b>	<b>2,34</b>	<b>25</b>	<b>26,5</b>	<b>2,58</b>	<b>27,84</b>	<b>2,11</b>
R4	4,13	0,97	38,25	27,97	229	250,08	11,66	246,86	7,19
	4,62	0,98	53,65	72,88	527,00	622,23	26,54	611,25	12,12
	<b>2,09</b>	<b>0,83</b>	<b>6,05</b>	<b>2,27</b>	<b>24</b>	<b>24</b>	<b>0,12</b>	<b>24,67</b>	<b>1,63</b>
R5	4,17	0,97	37,38	29,75	238	259,23	11,47	257,32	7,07
	4,60	0,98	47,28	76,21	538,00	631,07	25,89	621,43	12,30



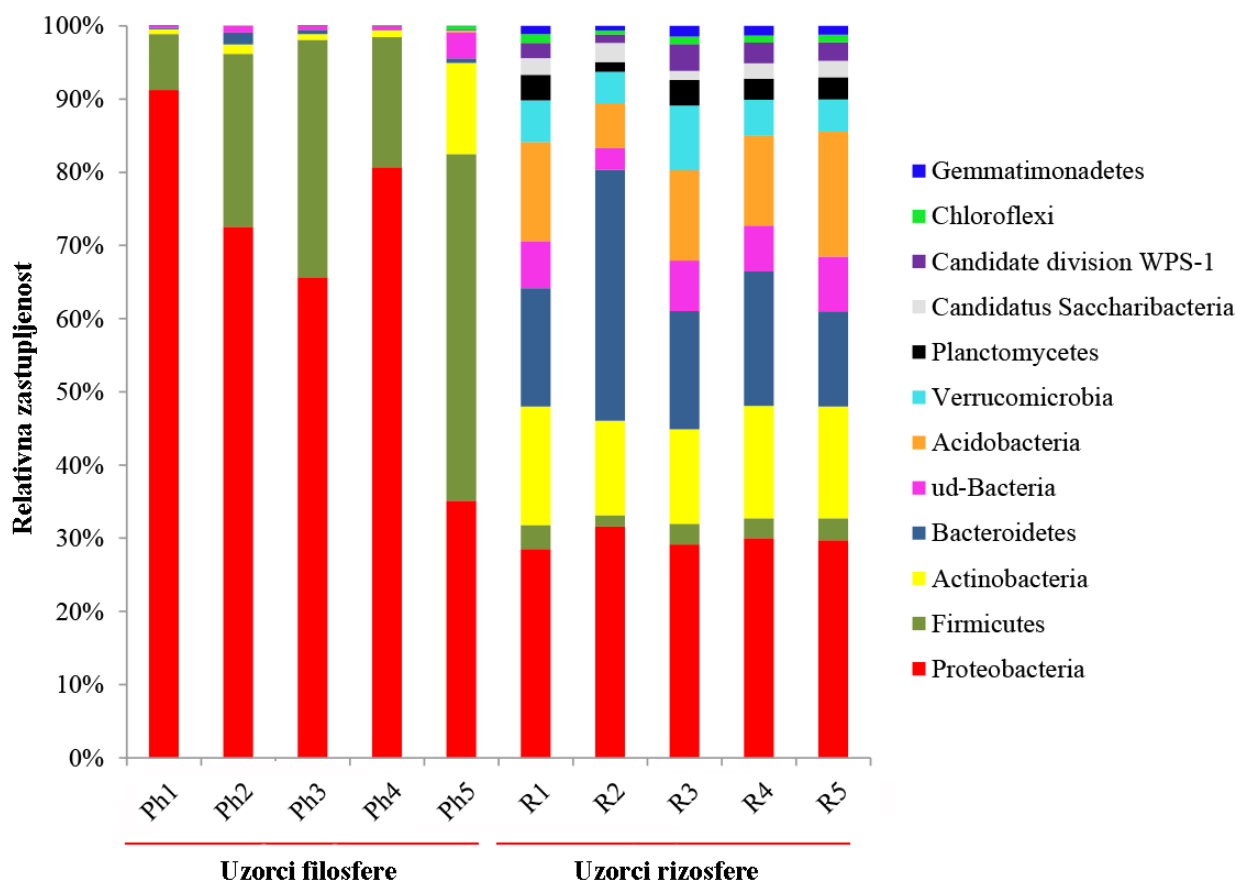
**Slika 15.** Analiza glavnih komponenti (PCoA) koja prikazuje razlike između uzoraka filofsere (Ph1-Ph5) i rizosfere (R1-R5) biljaka ozime uljane repice sa ispoljenim simptomima bolesti (1 – linija SO 14; 2 – sorta Kata; 3 – sorta Nevena; 4 – hibrid NS Ras) i bez simptoma bolesti (5 – sorta Zorica) na nivou razdela, familije i roda (Jelušić et al., 2021b).



**Slika 16.** Analiza grupisanja koja prikazuje razlike između uzoraka filozofere (Ph1-Ph5) i rizosfere (R1-R5) biljaka ozime uljane repice sa ispoljenim simptomima bolesti (1 – linija SO 14; 2 – sorta Kata; 3 – sorta Nevena; 4 – hibrid NS Ras) i bez simptoma bolesti (5 – sorta Zorica) na nivou razdela, familije i roda. Vrednosti „au“, označene crvenom bojom predstavljaju približno nepristrasne p-vrednosti, a vrednosti „bp“, označene zelenom bojom predstavljaju vrednosti verovatnoće pokretanja. Crveni okviri ukazuju na približno nepristrasne p-vrednosti veće od 95% (Jelušić et al., 2021b).

#### 4.5.2. Analiza sastava mikrobijalnih zajednica filofsere i rizofsere ozime uljane repice

Rezultati analize sastava bakterijskih zajednica kod 10 testiranih uzoraka filofsere (Ph1-Ph5) i rizofsere (R1-R5) ozime uljane repice, posmatrani na nivou razdela, prikazani su na Slici 17 i u Prilogu 5a. Dobijeni rezultati ukazuju na veći diverzitet razdela u uzorcima rizofsere u odnosu na uzorke filofsere. Razdeo Proteobacteria je bio najdominantniji u sva četiri (Ph1-Ph4) uzorka filofsere sa simptomima bolesti [65,64% (Ph3) – 91,25% (Ph1)], dok je njegovo prisustvo u uzorku filofsere bez simptoma (Ph5) bilo značajno manje (35,10%). Razdeo Proteobacteria je takođe dominirao u svim uzorcima rizofsere u odnosu na ostale detektovane razdele, ali sa značajno manjom zastupljenošću [28,32% (R1) – 31,47% (R2)] u odnosu na uzorke filofsere. Razdeo Firmicutes je bio najzastupljeniji (47,31%) u uzorku filofsere Ph5 (bez simptoma bolesti), dok je u uzorcima filofsere sa simptomima bolesti (Ph1-Ph4), ovaj razdeo bio drugi po zastupljenosti [7,64% (Ph1) – 32,45% (Ph3)]. Razdeo Firmicutes je u uzorcima rizofsere bio slabo zastupljen [1,50 (R2) – 3,24% (R1)]. Pored Proteobacteria, kao najzastupljenijeg razdela u uzorcima rizofsere, razdeli Actinobacteria, Bacteroidetes i Acidobacteria su takođe bili zastupljeni u visokom procentu u svim uzorcima rizofsere, kao i Verrucomicrobia u uzorku R3. Razdeo Actinobacteria je takođe bio prisutan u značajnom procentu (12,44%) u uzorku filofsere Ph5. Svih 12 detektovanih razdela u uzorcima rizofsere, bili su zastupljeni u približno istom procentu u svim uzorcima. Uzorci R2 (34%) i Ph2 (1,62%) sa sorte Kata su se razlikovali od ostalih uzoraka po većoj zastupljenosti Bacteroidetes u odnosu na ostale testirane uzorke rizofsere i filofsere.



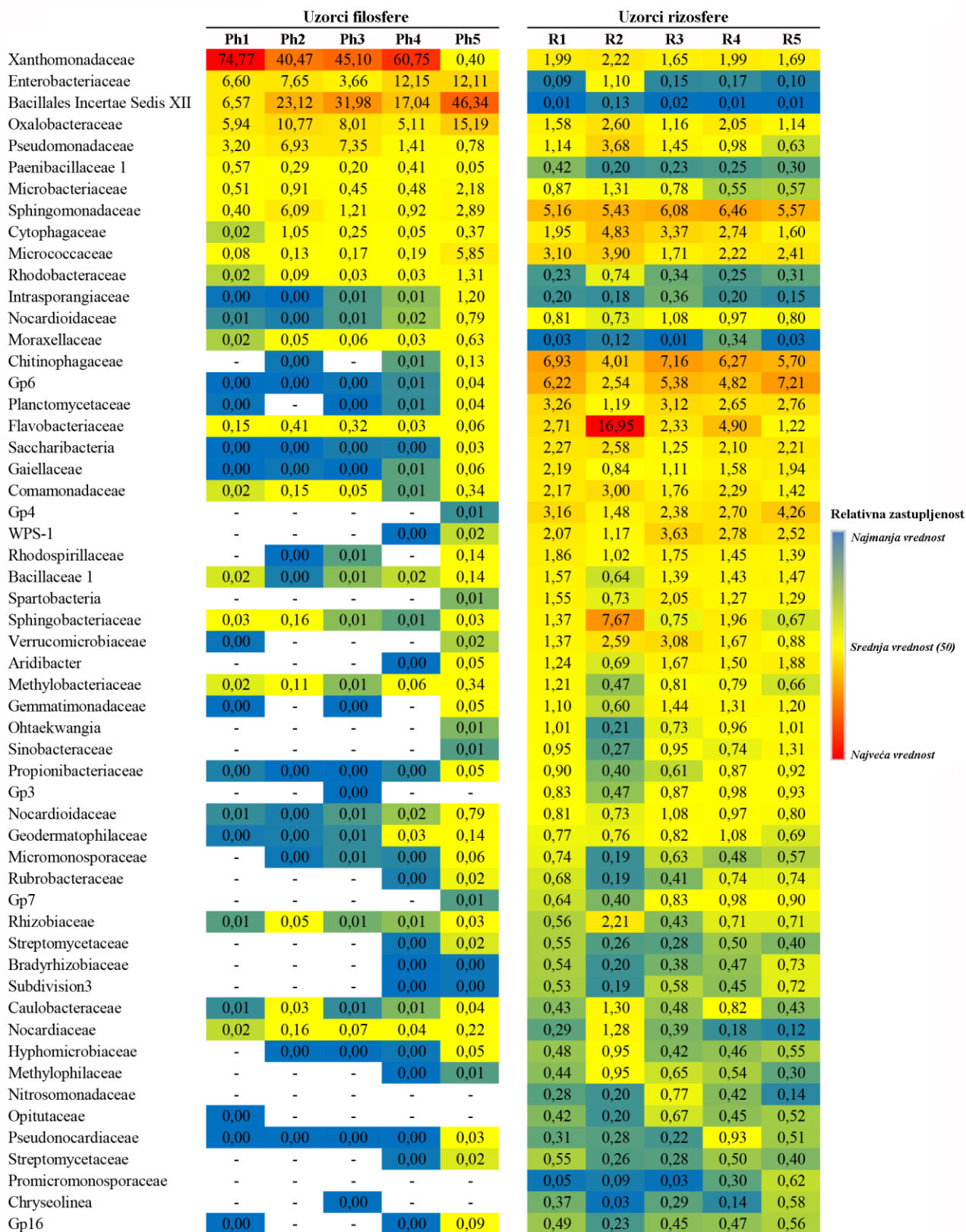
**Slika 17.** Analiza beta diverziteta koja pokazuje sastav i distribuciju različitih bakterijskih razdela u uzorcima filofsere (Ph1-Ph5) i rizofsere (R1-R5) biljaka ozime uljane repice sa simptomima bolesti (1 – linija SO 14; 2 – sorta Kata; 3 – sorta Nevena; 4 – hibrid NS Ras) i bez simptoma bolesti (5 – sorta Zorica) (Jelušić et al., 2021b).



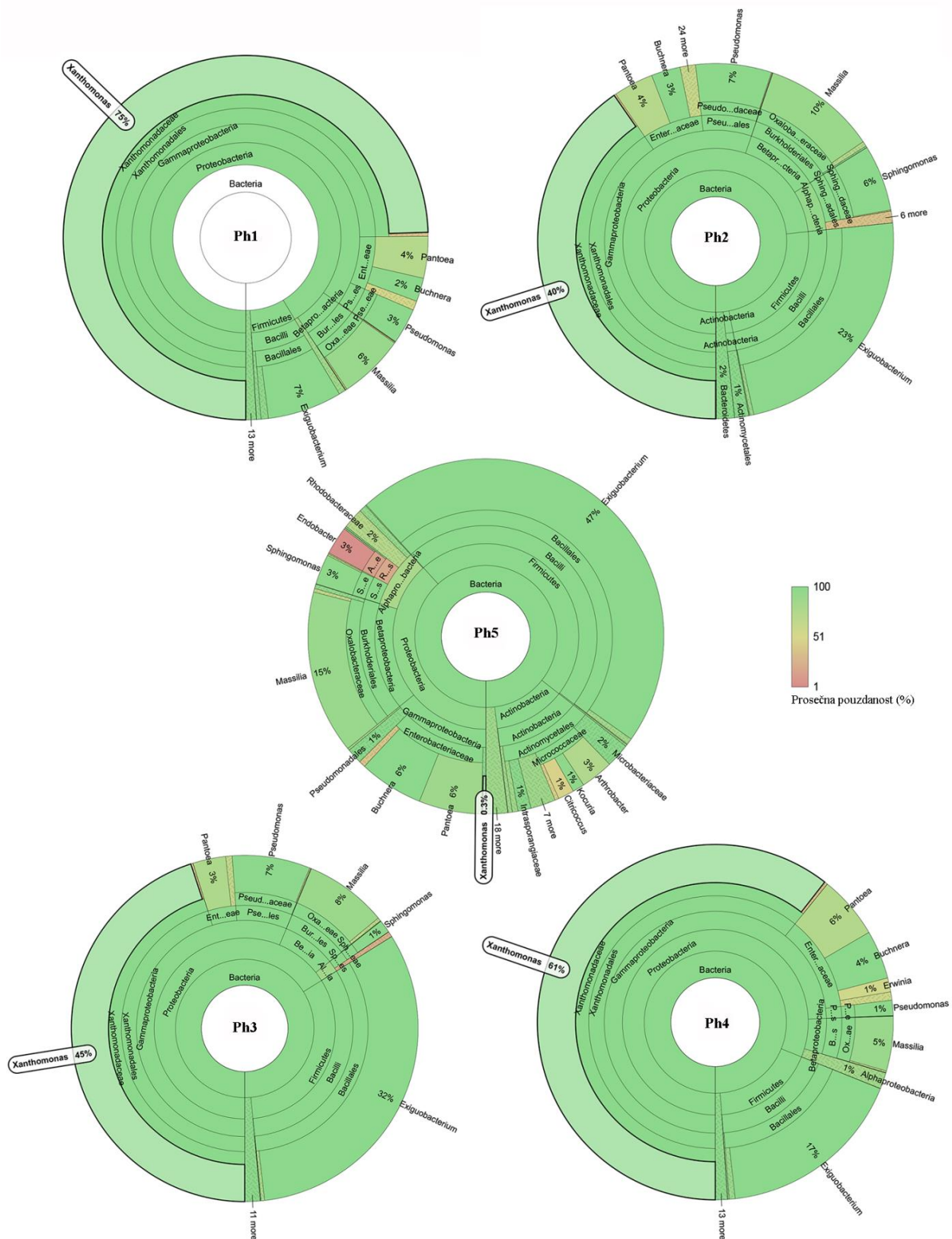
Ukupan broj detektovanih familija u testiranim uzorcima, takođe je ukazao na veći bakterijski diverzitet u uzorcima rizosfere (55 familija) u odnosu na uzorke filofsere [33 (Ph2) – 50 (Ph5) familija] (Slika 18). Razlike u zastupljenosti različitih familija primećene su u uzorku rizosfere R2 u odnosu na ostale uzorke rizosfere (R1, R3-R5). U ovom uzorku je zapažena značajno veća relativna zastupljenost familija Flavobacteriaceae i Sphingobacteriaceae, ali i Cytophagaceae, Pseudomonadaceae, Rhizobiaceae, Oxalobacteraceae, Xanthomonadaceae, Enterobacteriaceae, Microbacteriaceae, Comamonadaceae, Caulobacteraceae, Nocardiaceae u odnosu na ostale testirane uzorke rizosfere. Razlike u pogledu zastupljenosti različitih familija između uzoraka rizosfere uzetih oko korena biljaka sa (R1-R4) i bez (R5) simptoma zaraze nisu pronađene. Suprotno uzorcima rizosfere, razlike između uzoraka filofsere sa simptomima bolesti (Ph1-Ph4) i bez simptoma bolesti (Ph5) bile su izražene i na nivou familije. Familija Xanthomonadaceae je bila najdominantnija u uzorcima filofsere Ph1-Ph4 sa simptomima bolesti (40 – 75%), dok je relativna zastupljenost ove familije u uzorku Ph5 iznosila samo 0,4%. Najdominantnija familija u uzorku Ph5 bila je Bacillales familija XII Incertae Sedis (46,34%), ali i familije Oxalobacteraceae (15,19%), Enterobacteriaceae (12,11 %) i Micrococcaceae (5,85%).

Relativna zastupljenost rodova u testiranim uzorcima filofsere i rizosfere prikazana je u Prilogu 5b, kao i redom na Slikama 19 i 20. Najzastupljeniji rod u uzorcima filofsere sa simptomima bolesti bio je *Xanthomonas* (Ph1 – 75%, Ph2 – 40%, Ph3 – 45%, Ph4 – 61%), prisutan u uzorku filofsere Ph5 sa samo 0,31%, i u uzorcima rizosfere [0,01 (R5) – 0,25% (R2)]. Pored roda *Xanthomonas*, rodovi *Exiguobacterium*, *Massilia*, *Pseudomonas* i *Sphingomonas* su bili prisutni u značajnom procentu u uzorcima filofsere sa simptomima (Ph1-Ph4). Dobijeni rezultati ukazuju na trend smanjivanja relativne zastupljenosti roda *Exiguobacterium* u uzorcima filofsere sa simptomima zaraze sa *X. campestris* pv. *campestris* (Ph1-Ph4) paralelno sa povećanjem zastupljenosti roda *Xanthomonas*. Suprotno, rod *Exiguobacterium* je bio najdominantniji (46,34%) u uzorku filofsere Ph5 bez simptoma bolesti (Slika 12, Prilog 5b). Pored roda *Exiguobacterium*, rodovi *Massilia* (13,62%), *Buchnera* (5,84%) i *Pantoea* (4,34%) su bili najdominantniji u uzorku filofsere Ph5.

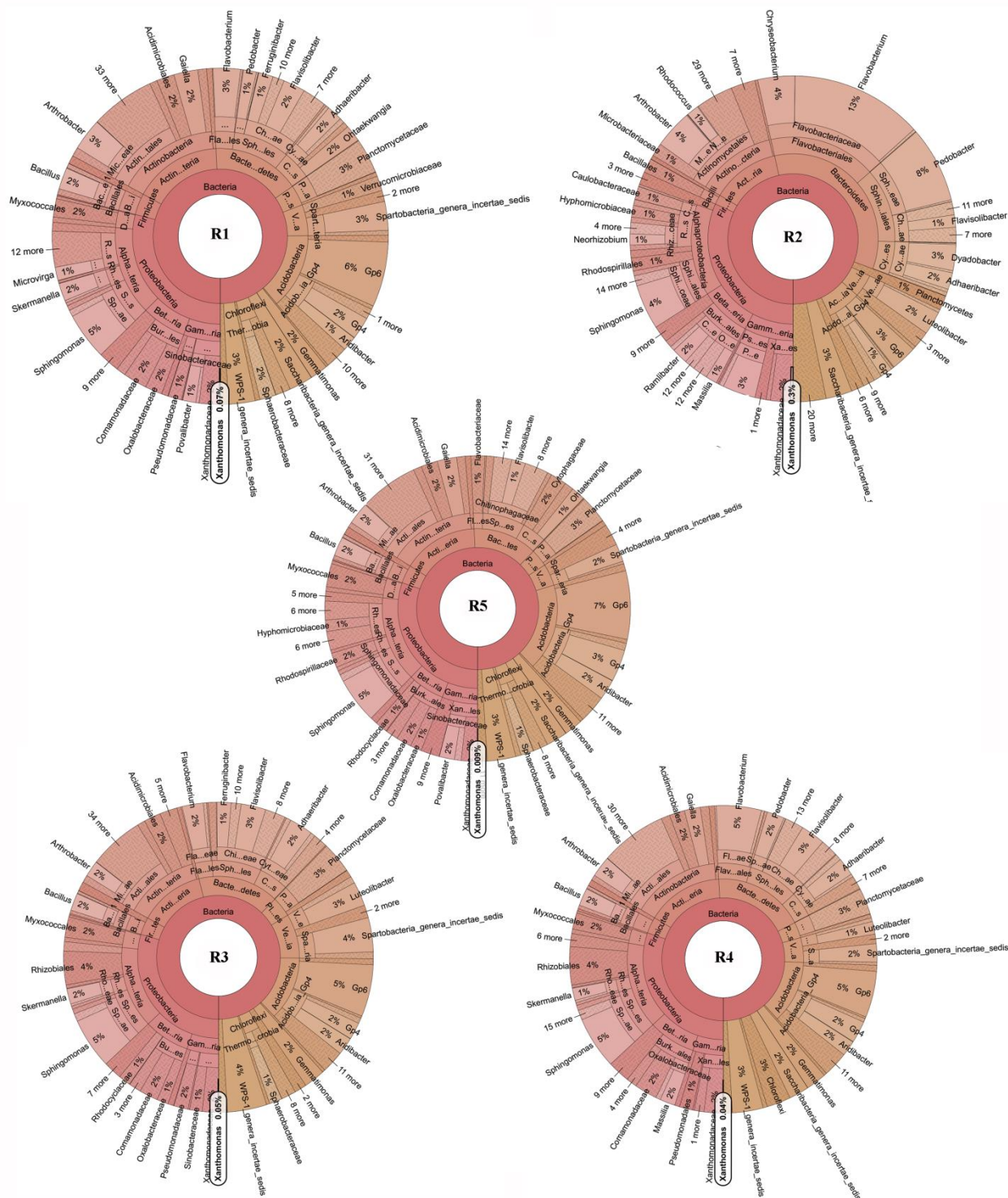
U poređenju sa uzorcima filofsere, veći diverzitet rodova uočen je u rizosferi, gde ih je detektovano ukupno 88. Nisu uočene značajne razlike u relativnoj zastupljenosti rodova između uzoraka rizosfere, bez obzira na poreklo. Kao najzastupljeniji rodovi u rizosferi izdvojili su se Gp6 iz razdela Acidobacteria (2,54 – 7,21%) i *Sphingomonas* (2,94 – 3,62%), kao i *Flavobacterium* (13,03%) i *Pedobacter* (7,42%) u uzorku R2.



**Slika 18.** Relativna zastupljenost različitih bakterijskih familija u uzorcima filofsere (Ph1-Ph5) i rizofsere (R1-R5) biljaka ozime uljane repice sa simptomima bolesti (1 – linija SO 14; 2 – sorta Kata; 3 – sorta Nevena; 4 – hibrid NS Ras) i bez simptoma bolesti (5 – sorta Zorica) (Jelušić et al., 2021b).



**Slika 19.** Krona interaktivni prikaz relativne zastupljenosti različitih bakterijskih rodova u uzorcima filofsere (Ph1-Ph5) biljaka ozime uljane repice sa simptomima bolesti (1 – linija SO 14; 2 – sorta Kata; 3 – sorta Nevena; 4 – hibrid NS Ras) i bez simptoma bolesti (5 – sorta Zorica) (Jelušić et al., 2021b).



**Slika 20.** Krona interaktivni prikaz relativne zastupljenosti različitih bakterijskih rodova u uzorcima rizosfere (R1-R5) biljaka ozime uljane repice sa simptomima bolesti (1 – linija SO 14; 2 – sorta Kata; 3 – sorta Nevena; 4 – hibrid NS Ras) i bez simptoma bolesti (5 – sorta Zorica) (Jelušić et al., 2021b).

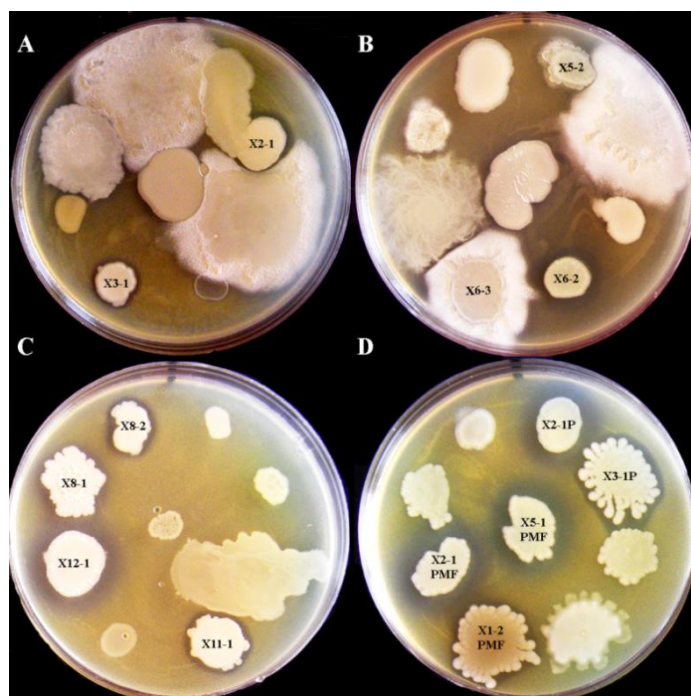
#### 4.6. Izolacija potencijalnih biokontrolnih sojeva

Sa sakupljenih uzoraka filofsere, kao i iz rizofsere biljaka ozime uljane repice sa prisutnim simptomima zaraze sa *X. campestris* pv. *campestris* (linija SO 14, sorte Kata i Nevena i hibrid NS Ras) i bez simptoma (sorta Zorica), izolovano je ukupno 35 potencijalnih antagonističkih *Bacillus* spp. i *Pseudomonas* spp. izolata (Tabela 3). Od ukupnog broja izolata, 27 (15 sa filofsere i 12 iz rizofsere) je imalo morfologiju nalik *Bacillus* sp., dok je osam izolata, poreklom sa filofsere, imalo morfologiju nalik *Pseudomonas* sp. Lista potencijalnih antagonističkih izolata, njihovo poreklo, tip ozime uljane repice sa koje su izolovani i morfologije kolonija, prikazani su u Tabeli 3.

#### 4.7. Ispitivanje antagonističke aktivnosti izolata *in vitro*

##### 4.7.1. Ispitivanje antagonističke aktivnosti punih kultura izolata

Primarna selekcija antagonističkih izolata za dalja istraživanja vršena je ispitivanjem *in vitro* antibakterijske aktivnosti prekonocnih kultura 27 *Bacillus* sp. i osam *Pseudomonas* sp. izolata na 19 *X. campestris* pv. *campestris* izolata poreklom sa ozime uljane repice iz Srbije i patotip soju NCPPB528. Dobijene zone inhibicije su prikazane na Slici 21. Antagonistička aktivnost izolata ocenjena je kao: bez aktivnosti (-), slaba ( $\leq 9$  mm, +), umerena (10–13 mm, ++) i izražena ( $\geq 14$  mm, +++) antagonistička aktivnost, a dobijeni rezultati su prikazani u Tabeli 14. Od svih testiranih *Bacillus* spp. izolata, izolat X6-3, izolovan sa filofsere sorte Zorica, pokazao je najjači antagonistički potencijal, dok je od osam testiranih *Pseudomonas* spp. izolata, izolat X2-1P, poreklom sa filofsere linije SO 14 ozime uljane repice ispoljio najjaču antagonističku aktivnost. Četiri izolata: X8-2, X2-1P, X3-1P i X2-1PMF su inhibirala rast svih 19 proučavanih izolata sa uljane repice. Slabu do umerenu antagonističku aktivnost imalo je 14 izolata od kojih je devet pripadalo grupi *Bacillus* spp. izolata (X2-1, X3-1, X5-2, X6-2, X8-1, X8-2, X8-3, X11-1 i X12-1), a pet grupi *Pseudomonas* spp. izolata (X3-1P, X4-1P, X1-2PMF, X2-1PMF i X5-1PMF). Preostalih 19 izolata (X1-1, X1-2, X1-3, X2-2, X2-3, X3-2, X4-1, X4-2, X5-1, X6-1, X7-1, X7-2, X7-3, X10-1, X10-2, X11-2, X12-2, X1-1PB, X1-1PMF) nije pokazalo antibakterijsku aktivnost ni na jednom od testiranih *X. campestris* pv. *campestris* izolata.



**Slika 21.** *In vitro* antagonistička aktivnost punih kultura devet *Bacillus* spp. [A: (X2-1, X3-1); B: (X5-2, X6-2, X6-3); C: (X8-1, X8-2, X11-1 i X12-1)] i pet *Pseudomonas* spp. izolata (D: X1-2PMF, X2-1PMF, X2-1P, X3-1P, X5-1PMF) prema izolat Xc271 (foto A. Jelušić).

**Tabela 14.** *In vitro* antagonistička aktivnost punih kultura 27 *Bacillus* spp. i osam *Pseudomonas* spp. izolata prema 19 *X. campestris* pv. *campestris* izolata poreklom sa ozime uljane repice ocenjena kao: bez aktivnosti (-), slaba ( $\leq 9$  mm, +), umerena (10–13 mm, ++) i izražena ( $\geq 14$  mm, +++) antagonistička aktivnost.

Antagonista / Patogen	CFBP 8912	Xc1	NCPBP 4678	NCPBP 4679	Xc20	NCPBP 4680	NCPBP 4681	Xc30	NCPBP 4682	Xc32	Xc251	Xc261	Xc271	Xc291	Xc301	Xc321	Xc341	Xc361	X432
X1-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X1-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X1-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>X2-1</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	-	<b>+</b>	<b>+</b>
X2-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X2-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>X3-1</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>++</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	-	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>++</b>
X3-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X4-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X4-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X5-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>X5-2</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>+</b>	<b>+</b>	-	<b>+</b>	-	-	-	-
X6-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>X6-2</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>+</b>	-	<b>+</b>	<b>+</b>	-	-	-	-	-
<b>X6-3</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>++</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>++</b>	<b>++</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>++</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>
X7-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X7-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X7-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>X8-1</b>	-	-	-	-	-	-	-	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	-	-	-	-	-	-
<b>X8-2</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>
<b>X8-3</b>	-	-	-	-	<b>+</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X10-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X10-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>X11-1</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	-	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	-	-	<b>+</b>
X11-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>X12-1</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	-	-	-	-	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>++</b>	<b>++</b>	<b>++</b>	<b>++</b>	<b>++</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	-	-	-	-
X12-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X1-1PB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>X2-1P</b>	<b>++</b>	<b>++</b>	<b>++</b>	<b>++</b>	<b>++</b>	<b>++</b>	<b>+</b>	<b>++</b>	<b>++</b>	<b>++</b>	<b>+</b>	<b>++</b>	<b>++</b>	<b>++</b>	<b>++</b>	<b>++</b>	<b>++</b>	<b>++</b>	<b>++</b>
<b>X3-1P</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>
<b>X4-1P</b>	<b>+</b>	-	-	<b>+</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X1-1PMF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>X1-2PMF</b>	<b>+</b>	-	-	<b>+</b>	-	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	-	<b>+</b>	-	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>++</b>
<b>X2-1PMF</b>	<b>++</b>	<b>+</b>	<b>++</b>	<b>++</b>	<b>++</b>	<b>++</b>	<b>++</b>	<b>++</b>	<b>++</b>	<b>++</b>	<b>++</b>	<b>++</b>	<b>++</b>	<b>+</b>	<b>++</b>	<b>+</b>	<b>++</b>	<b>+</b>	<b>++</b>
<b>X5-1PMF</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>++</b>	<b>+</b>	<b>++</b>	<b>++</b>	<b>++</b>	<b>++</b>	<b>++</b>	<b>++</b>	<b>++</b>	<b>++</b>	<b>++</b>	<b>+</b>	<b>++</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	-	<b>++</b>

Izolati označeni „bold” su pokazali *in vitro* antagonističku aktivnost pune kulture i odabrani su za dalja istraživanja

#### 4.7.2. Sposobnost *X. campestris* pv. *campestris* sojeva da produkuju biofilm

Svih osam testiranih izolata/sojeva (CFBP 8912, Xc1, NCPPB4679, NCPPB4681, Xc32, Xc261, Xc271, Xc291) poreklom sa ozime uljane repice, pokazali su sposobnost produkcije biofilma. Na osnovu utvrđene sposobnosti da formiraju biofilm, izolati/sojevi su podeljeni u tri kategorije: (i)  $OD_c < OD \leq 2 \times OD_c$  u koju su svrstana tri *X. campestris* pv. *campestris* izolata/soja (CFBP 8912, Xc261 i Xc291) koja su pokazala slabu sposobnost produkcije biofilma (kategorija 1 ili +); (ii)  $2 \times OD_c < OD \leq 4 \times OD_c$  u koju su svrstana tri izolata/soja (Xc1, NCPPB4681 i Xc271) koja su pokazala umerenu sposobnost produkcije biofilma (kategorija 2 ili ++); (iii)  $4 \times OD_c < OD$  u koju su svrstana dva izolata/soja (NCPPB4679 i Xc32) sa izraženom produkcijom biofilma (kategorija 3 ili +++). Nakon kombinovanja dobijenih rezultata sa prethodno dobijenim rezultatima testa virulentnosti na ozimnoj uljanoj repici (potpoglavlje 4.4.1.), za dalji rad (ispitivanje *in vitro* antagonističke aktivnosti supernatanata i *in vivo* antagonističke aktivnosti biokontrolnih izolata) su odabrana tri izolata/soja: NCPPB4679, Xc1 i Xc291, koja su se redom uklapala u sledeće grupe: (i) visoko virulentan izolat/izražena produkcija biofilma, (ii) srednje virulentan izolat/umerena produkcija biofilma i (iii) slabo virulentan izolat/slaba produkcija biofilma.

**Tabela 15.** Sposobnost testiranih *X. campestris* pv. *campestris* izolata/sojeva da formiraju biofilm.

Izolat/ Produkcija biofilma	$OD \leq OD_c$	$OD_c < OD \leq 2 \times OD_c$	$2 \times OD_c < OD \leq 4 \times OD_c$	$4 \times OD_c < OD$
CFBP 8912		0.128 < 0.183 < 0.256		
Xc1			0.256 < 0.292 < 0.512	
NCPPB4679				0.512 < 0.620
NCPPB4681			0.256 < 0.282 < 0.512	
Xc32				0.512 < 0.717
Xc261		0.128 < 0.236 < 0.256		
Xc271			0.256 < 0.290 < 0.512	
Xc291		0.128 < 0.195 < 0.256		

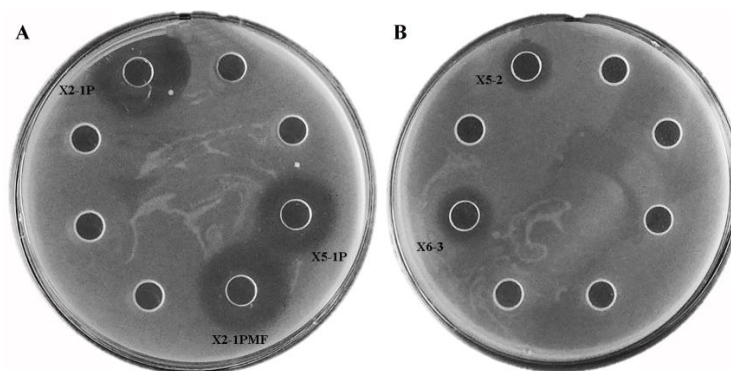
\* $OD \leq OD_c$  - ne produkuje biofilm;  $OD_c < OD \leq 2 \times OD_c$  - slaba produkcija biofilma;  $2 \times OD_c < OD \leq 4 \times OD_c$  - umerena produkcija biofilma;  $4 \times OD_c < OD$  - izražena produkcija biofilma

#### 4.7.3. Ispitivanje antagonističke aktivnosti supernatanata izolata

Rezultati ispitivanja antibakterijske aktivnosti supernatanata 10 *Bacillus* spp. i šest *Pseudomonas* spp. izolata koji su prethodno pokazali aktivnost punih kultura, prikazani su u Tabeli 16. Od svih testiranih izolata, samo su dva *Bacillus* spp. izolata (X5-2 i X6-3) i tri *Pseudomonas* spp. izolata (X2-1P, X2-1PMF i X5-1PMF) pokazali potencijal za suzbijanje tri testirana *X. campestris* pv. *campestris* izolata/soja (NCPPB4679, Xc1 i Xc291) u formi supernatanta. Zone inhibicije, nastale kao rezultat antagonističke aktivnosti supernatanata testiranih *Bacillus* spp. i *Pseudomonas* spp. izolata prema *X. campestris* pv. *campestris*, prikazane su na Slici 22. Na osnovu izmerenih zona inhibicije, izolati Xc1 (srednje virulentan izolat/umerena produkcija biofilma) i Xc291 (slabo virulentan izolat/slaba produkcija biofilma) bili su najosetljiviji na supernatante pet antagonističkih izolata ( $\phi$ 18-22 mm).

**Tabela 16.** *In vitro* antagonistička aktivnost supernatanata dva *Bacillus* spp. (X5-2 i X6-3) i tri *Pseudomonas* spp. (X2-1P, X2-1PMF i X5-1PMF) izolata na tri testirana izolata *X. campestris* pv. *campestris*.

Antagonista/Patogen	Prečnik zone inhibicije (mm)		
	Xc1	NCPPB4679	Xc291
X5-2	20	13	20
X6-3	21	11	21
X2-1P	22	17	19
X2-1PMF	22	17	19
X5-1PMF	19	16	18



**Slika 22.** *In vitro* antagonistička aktivnost supernatanata tri *Pseudomonas* spp. (**A:** X2-1P, X2-1PMF, X5-1P) i dva *Bacillus* spp. izolata (**B:** X5-2 i X6-3) prema *X. campestris* pv. *campestris* soju NCPPB4679 (foto A. Jelušić).

#### 4.8. Molekularna identifikacija antagonističkih izolata

Svi izolati koji su pokazali *in vitro* antagonističku aktivnost pune kulture su determinisani do nivoa vrste na osnovu BLASTn analize sređenih parcijalnih sekvenci gena za 16S rRNK i *tuf* (*Bacillus* spp.) i 16S rRNK i *gyrB* (*Pseudomonas* spp.) (Tabela 17). Na osnovu dobijenih sekvenci gena za 16S rRNK i *tuf* gena, nije bilo moguće izvršiti determinaciju do nivoa vrste za četiri *Bacillus* spp. izolata (X3-1, X8-2, X11-1 i X12-1). Korišćenjem BLASTn analize za ove izolate dobijen je isti procenat identiteta za dve blisko srodne vrste, *B. cereus* i *B. thuringiensis*. Preostalih šest *Bacillus* spp. izolata: X2-1, X5-2, X6-2, X6-3, X8-1 i X8-3 redom su identifikovani kao *B. luti*, *B. velezensis*, *B. wiedmannii*, *B. megaterium*, *B. halotolerans* i *B. circulans* (Tabela 17).

Dva *Pseudomonas* spp. izolata, X3-1P i X4-1P, su na osnovu gena za 16S rRNK i *gyrB* gena identifikovani do nivoa roda (*Pseudomonas* sp.), dok su ostali *Pseudomonas* spp. izolati (X2-1P, X1-2PMF, X2-1PMF i X5-1PMF) identifikovani kao *P. orientalis*. Od 16 sekvenciranih izolata, za dalji rad je odabrano pet izolata, koji su pripadali vrstama *B. velezensis* (X5-2), *B. megaterium* (X6-3) i *P. orientalis* (X2-1P, X2-1PMF i X5-1PMF).

**Tabela 17.** BLASTn identifikacija izolata koji su pokazali *in vitro* antagonističku aktivnost pune kulture prema izolatima *X. campestris* pv. *campestris*.

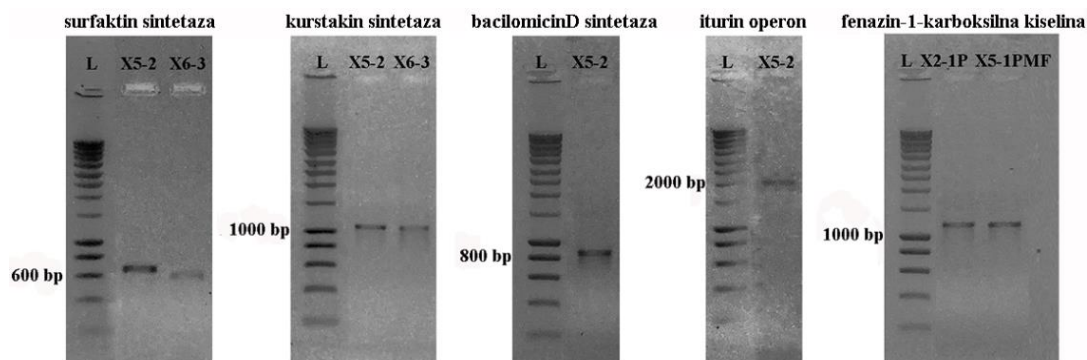
Šifra izolata	Procenat identiteta (%)	Vrsta (16S rRNK i <i>tuf</i> ili <i>gyrB</i> )
X2-1	100	<i>B. luti</i>
X3-1	99.59	<i>B. cereus/B. thuringiensis</i>
<b>X5-2</b>	100	<i>B. velezensis</i>
X6-2	100	<i>B. wiedmannii</i>
<b>X6-3</b>	100	<i>B. megaterium</i>
X8-1	99.59	<i>B. halotolerans</i>
X8-2	99.59	<i>B. cereus/B. thuringiensis</i>
X8-3	98.36	<i>B. circulans</i>
X11-1	99.59	<i>B. cereus/B. thuringiensis</i>
X12-1	100	<i>B. cereus/B. thuringiensis</i>
<b>X2-1P</b>	99.88	<i>P. orientalis</i>
X3-1P	99.49	<i>Pseudomonas</i> sp.
X4-1P	100	<i>Pseudomonas</i> sp.
X1-2PMF	100	<i>Pseudomonas</i> sp./ <i>P. orientalis</i>
<b>X2-1PMF</b>	100	<i>Pseudomonas</i> sp./ <i>P. orientalis</i>
<b>X5-1PMF</b>	100	<i>P. orientalis</i>

Izolati označeni „bold“ su ispoljili antagonističku aktivnosti i u formi pune kulture i supernatanta

Dalja molekularna karakterizacija pet antagonističkih izolata: *B. velezensis* X5-2, *B. megaterium* X6-3 i *P. orientalis* (X2-1P, X2-1PMF i X5-1PMF), koji su pokazali aktivnost i u formi pune kulture i supernatanta podrazumevala je PCR skrining izolata na prisustvo gena uključenih u biosintezu različitih sekundarnih metabolita (lipopeptida i antibiotika). Dobijeni rezultati su prikazani na Slici 23. Na osnovu prisustva segmenata umnožene DNK na odgovarajućim pozicijama, pokazano je da izolat *B. velezensis* X5-2 ima genetički potencijal za

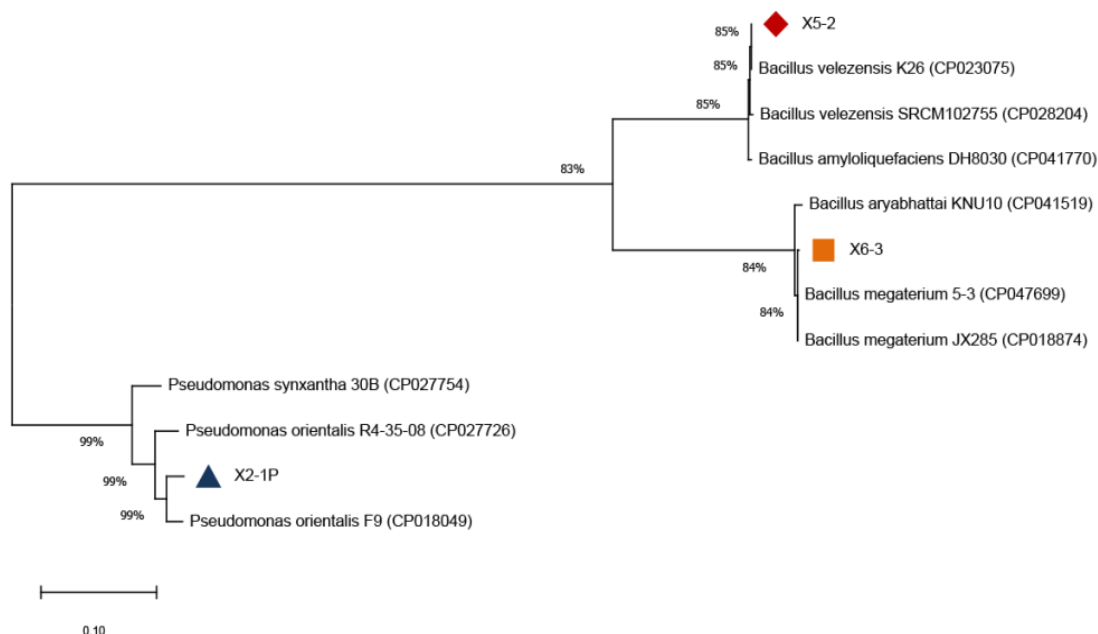


produkciju lipopeptida surfaktina, kurstakina, bacilomicina D i iturina. Kod izolata *B. megaterium* X6-3 detektovani su geni za surfaktin i kurstakin sintetazu. Kod izolata *P. orientalis* X2-1P i X5-1PMF amplifikovan je samo gen *phcA* koji kodira za fenazin-1-karboksilnu kiselinu, dok kod izolata X2-1PMF nije dokazano prisustvo nijednog od testiranih gena za produkciju antibiotika.



**Slika 23.** PCR skринing izolata na prisustvo gena uključenih u biosintezu lipopeptida (*B. velezensis* X5-2 i *B. megaterium* X6-3) i gena za fenazin-1-karboksilnu kiselinu (*P. orientalis* X2-1P i X5-1PMF). Pozicije segmenata umnožene DNK prikazane su u odnosu na DNK marker 200-10000 bp SmartLadder (Eurogentec) (Jelušić et al., 2021b).

Filogenetsko stablo maksimalne sličnosti („maximum likelihood“) konstruisano za ispitivanje filogenetske srodnosti tri odabrana antagonistička izolata (X5-2, X6-3 i X2-1P) prikazano je na Slici 24. Na osnovu konkatamernih sekvenci gena *tuf*, gena za 16S rRNK i *sfp* za *Bacillus* izolate i gena *gyrB*, 16S rRNK i *phcA* za *Pseudomonas* izolate, potvrđena je pripadnost odabranih izolata vrstama *B. velezensis* (X5-2), *B. megaterium* (X6-3) i *P. orientalis* (X2-1P). Izolat X5-2 je na osnovu filogenetskog stabla pokazao najveću genetičku sličnost sa referentnim sojem *B. velezensis* K26, ali i sojem SRCM102755 iz NCBI baze podataka, dok je izolat X6-3 grupisan sa referentnim *B. megaterium* sojevima 5-3 i JX285. Na osnovu filogenetske analize, izolat X2-1P bio je najbliži referentnom soju *P. orientalis* F9.

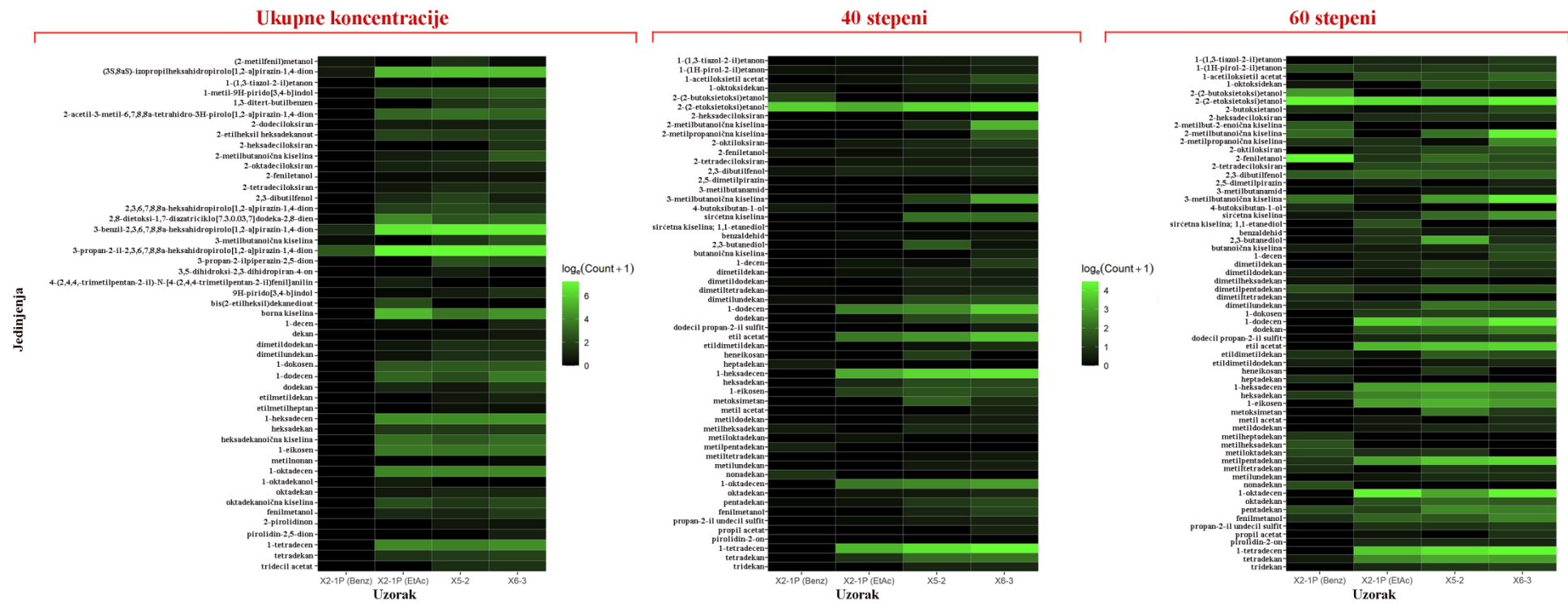


**Slika 24.** Filogenetsko stablo maksimalne sličnosti konstruisano na osnovu parcijalnih sekvenci gena *tuf*, za 16S rRNA i *sfp* za *Bacillus* izolate X5-2 i X6-3 i gena *gyrB*, za 16S rRNA i *phcA* za izolat *Pseudomonas* X2-1P. Šest referentnih *Bacillus* spp. sojeva i tri referentna *Pseudomonas* spp. soja preuzeti su iz NCBI baze podataka (Jelušić et al., 2021b).

## 4.9. Hemijska karakterizacija produkata antagonističkih izolata

### 4.9.1. GC-MS analiza

Rezultati GC-MS analize etil-acetatnih (*B. velezensis* X5-2, *B. megaterium* X6-3 i *P. orientalis* X2-1P) i benzenovih (*P. orientalis* X2-1P) ekstrakata prikazani su na Slici 25. Prikazane toplotne karte ukazuju na razlike u distribuciji i zastupljenosti detektovanih isparljivih organskih jedinjenja između testiranih izolata u ukupnim koncentracijama i nakon izlaganja temperaturama od 40 °C i 60 °C. Liste isparljivih organskih jedinjenja koja su bila zastupljena u visokoj koncentraciji u testiranim ekstraktima, njihova retencionna vremena, molekulske formule i molekulske mase prikazani su u Prilozima 15a (ukupne koncentracije), 15b (40 °C) i 15c (60 °C). Na osnovu hemijske strukture, najzastupljenija jedinjenja u testiranim ekstraktima pripadala su acetatima, alkoholima, alkanima, alkenima, benzenima, karboksilnim kiselinama, estrima, etrima, indolima i pirazinima. Isparljiva organska jedinjenja koja su imala najveće vrednosti površine pika u ukupnim koncentracijama etil-acetatnih ekstrakata tri testirana izolata *B. velezensis* X5-2, *B. megaterium* X6-3 i *P. orientalis* X2-1P bili su različiti pirazini (3-propan-2-il-2,3,6,7,8,8a-heksahidropirololo[1,2-a]pirazin-1,4-dion; 3-benzil-2,3,6,7,8,8a-heksahidropirololo[1,2-a]pirazin-1,4-dion; (3S,8aS)-3-izopropilheksahidropirololo[1,2-a]pirazin-1,4-dion; 2-acetil-3-metil-6,7,8,8a-tetrahidro-3H-pirololo[1,2-a]pirazin-1,4-dion i 2,8-dietoksi-1,7-diazatriciklo[7.3.0.03,7]dodeka-2,8-dien), alkeni (1-dodecen, 1-tetradecen, 1-heksadecen, 1-oktadecen, 1-eikosen i 1-dokosen), karboksilne kiseline (borna, heksadekanoinična i oktadekanoinična kiselina) i indoli (1-metil-9H-pirido[3,4-b]indol). Suprotno diverzitetu isparljivih organskih jedinjenja detektovanih u etil-acetatnim ekstraktima, samo dva isparljiva organska jedinjenja, sa nešto većim vrednostima površine pika, su detektovana u testiranom benzenovom ekstraktu (3-propan-2-il-2,3,6,7,8,8a-heksahidropirololo[1,2-a]pirazin-1,4-dion i 3-benzil-2,3,6,7,8,8a-heksahidropirololo[1,2-a]pirazin-1,4-dion). Diverzitet isparljivih organskih jedinjenja detektovanih nakon izlaganja temperaturama od 40 °C i 60 °C bio je veći u poređenju sa ukupnim koncentracijama. Isparljiva organska jedinjenja sa najvećim vrednostima površine pika u sva tri etil-acetatna ekstrakta na obe temperature bili su alkeni (1-dodecen, 1-tetradecen, 1-heksadecen, 1-oktadecen i 1-eikosen samo na 60 °C) i alkohol 2-(2-etoksietoksi)etanol. Isparljiva organska jedinjenja po kojima se razlikuje etil-acetatni ekstrakt izolata *B. megaterium* X6-3 od ostalih ekstrakata/izolata bili su 2-metilbutanoična kiselina, 3-metilbutanoična kiselina i 2-metilpropanoična kiselina na obe temperature i sirćetna kiselina na 60°C. Jedinjenja po kojima se razlikuje etil-acetatni ekstrakt izolata *B. velezensis* X5-2 od ostalih testiranih ekstrakata/izolata su 2,3-butanediol, metoksimetan i heneikosan na obe temperature. Iako su bili prisutni na obe temperature, alkani (dodekan, tetradekan, pentadekan, heksadekan i oktadekan) su imali veće vrednosti površine pika na 60 °C. Jedinjenja sa najvećim vrednostima površine pika u benzenovim ekstraktima *P. orientalis* X2-1P bili su alkoholi 2-(2-butoksietoksi)etanol i 2-(2-etoksietoksi)etanol na obe temperature, kao i 2-feniletanol na 60 °C.



**Slika 25.** Toplotne karte koje prikazuju isparljiva organska jedinjenja detektovana u etil-acetatnim (*B. velezensis* X5-2, *B. megaterium* X6-3, *P. orientalis* X2-1P) i benzenovim (*P. orientalis* X2-1P) ekstraktima ispitivanih supernatanata izolata primenom gasne hromatografije-masene spektrometrije u ukupnim koncentracijama i nakon izlaganja temperaturama od 40 °C i 60 °C (Jelušić et al., 2021b).

#### 4.9.2. HPLC-ESI-qTOF/MS analiza

Rezultati HPLC-ESI-qTOF/MS analize etil-acetatnih ekstrakata dva testirana *Bacillus* spp. izolata, *B. velezensis* X5-2 i *B. megaterium* X6-3 prikazani su u Tabeli 18. HPLC-ESI-qTOF/MS analizom supernatanta izolata *B. velezensis* X5-2, dokazano je prisustvo jedinjenja koji odgovaraju kurstakinima (C11 – C13), surfaktinima (C12 – C15), iturinima (C15 i C16) i bacilomicinu D (C14 i C15), redom sa uočenim masama u rangu od  $m/z$  915 – 939,  $m/z$  1008 – 1054,  $m/z$  1057 – 1109 i  $m/z$  1053 – 1067. U etil-acetatnom ekstraktu izolata *B. megaterium* X6-3 detektovani su samo surfaktini sa dužinama lanaca masnih kiselina od C12 do C16 i uočenim masama u rangu od  $m/z$  994 do  $m/z$  1090. U ekstraktima oba *Bacillus* spp. izolata detektovani su joni na  $m/z$  1008,66, koji su identifikovani kao protonovani adukti različitih varijanti surfaktina: C12 ( $L/I^4$ ,  $D^6$ ), C13 ( $V^4$ ,  $D^6$ ) i C14 ( $V^{4,7}$ ,  $D^6$ ) i joni na  $m/z$  1016,63, koji su identifikovani kao natrijumovi adukti surfaktina C13. Kod oba *Bacillus* spp. izolata su takođe detektovani protonovani adukti surfaktina C14 ( $L/I^4$ ), C14 ( $L/I^4$ ,  $D^7$ ), C15 ( $V^4$ ) i C15 ( $V^4$ ,  $D^7$ ) na  $m/z$  1054,7.

Rezultati HPLC-ESI-qTOF/MS analize etil-acetatnog i benzenovog ekstrakta izolata *P. orientalis* X2-1P prikazani su u Tabeli 19. U oba ekstrakta su detektovana jedinjenja 2-(hidroksimetil)benzoeva kiselina, benzoeva kiselina i 2-amino-3-metoksi-benzoeva kiselina sa jonima na  $m/z$  152,047,  $m/z$  122,037 i  $m/z$  167,058, redom. Ostala detektovana jedinjenja [5-Nitro-2-fenilpropilamino benzoeva kiselina; (1a,5b,6a)-7-protoiluden-1,5,6,14-tetrol 14-(2,4-dihidroksi-6-metilbenzoeva kiselina); 4-hidroksi-3-fenilbenzoeva kiselina glukozid; 2-Hidroksi-6-tridecilbenzoeva kiselina; 4-acetamidobenzoeva kiselina; 2-metilbenzoeva kiselina i 4-hidroksibenzoeva kiselina] su pripadala različitim derivatima benzoeve kiseline, osim 2-hidroksifenil nitrita, koji je detektovan u etil-acetatnom ekstraktu. Jedinjenje sa pikom jona na  $m/z$  225,067, koje je detektovano u benzenovom ekstraktu, nije identifikovano.

**Tabela 18.** Lista lipopeptidnih jedinjenja identifikovanih u etil-acetatnim ekstraktima izolata *B. velezensis* X5-2 i *B. megaterium* X6-3 primenom HPLC-ESI-qTOF/MS analize.

Retenciono vreme (RT)	Monoizotopska masa	Uočena masa (m/z)	Abundanca	Lipopeptidni molekul	Molekularna formula	Referenca	X5-2	X6-3
18,466	914,4685	915,4758	18271,2	Kurstakin C12 [M+Na] <sup>+</sup>	C <sub>40</sub> H <sub>66</sub> N <sub>11</sub> O <sub>12</sub>	Dimkić et al., 2017	+	-
9,436	915,374	916,3813	6264,62	Kurstakin C11 [M + K] <sup>+</sup>	C <sub>39</sub> H <sub>64</sub> N <sub>11</sub> O <sub>12</sub>	Abdellaziz et al., 2018	+	-
17,891	938,5004	939,5075	77371,23	Kurstakin iC13 [-OH(3)]	C <sub>41</sub> H <sub>68</sub> N <sub>11</sub> O <sub>12</sub>	Béchet et al., 2012	+	-
17,004	993,6370	994,6430	2376512,25	Surfaktin C13 [M+H] <sup>+</sup>	C <sub>51</sub> H <sub>89</sub> N <sub>7</sub> O <sub>13</sub>	Ndlovu et al., 2017	-	+
17,844	993,6374	994,6443	1168660,38				-	+
17,298	1007,653	1008,6598	496229,03	Surfaktin C12 (L/I <sup>4</sup> ,D <sup>6</sup> ) [M+H] <sup>+</sup> , Surfaktin C13 (V <sup>4</sup> ,D <sup>6</sup> ) [M+H] <sup>+</sup> , Surfaktin C14 (V <sup>4,7</sup> ,D <sup>6</sup> ) [M+H] <sup>+</sup> ; Surfaktin C13 [M+H] <sup>+</sup> ; Surfaktin C14 [M+H] <sup>+</sup>	C <sub>50</sub> H <sub>87</sub> N <sub>7</sub> O <sub>13</sub> ; C <sub>51</sub> H <sub>89</sub> N <sub>7</sub> O <sub>13</sub> ; C <sub>52</sub> H <sub>91</sub> N <sub>7</sub> O <sub>13</sub>	Pathak et al., 2014a; Dimkić et al., 2017; Ndlovu et al., 2017	-	+
18,627	1007,6529	1008,6602	1871640,5				+	-
16,7	993,6368	1016,6259	445391,88	Surfaktin C13 [M+Na] <sup>+</sup>	C <sub>51</sub> H <sub>89</sub> N <sub>7</sub> O <sub>13</sub>	Ndlovu et al., 2017	-	+
18,661	993,6375	1016,6268	341505,84				+	-
18,473	1021,6683	1022,6748	2145361,5	Surfaktin C13 (L/I <sup>4</sup> ,D <sup>6</sup> ) [M+H] <sup>+</sup> , Surfaktin C14 (V <sup>4</sup> , D <sup>6</sup> ) [M+H] <sup>+</sup> , Surfaktin C15 (V <sup>4,7</sup> ,D <sup>6</sup> ) [M+H] <sup>+</sup> ; Surfaktin C14 [M+H] <sup>+</sup> ; Surfaktin C15 [M+H] <sup>+</sup>	C <sub>51</sub> H <sub>89</sub> N <sub>7</sub> O <sub>13</sub> ; C <sub>52</sub> H <sub>91</sub> N <sub>7</sub> O <sub>13</sub> ; C <sub>53</sub> H <sub>93</sub> N <sub>7</sub> O <sub>13</sub>	Pathak et al., 2014b; Dimkić et al., 2017; Ndlovu et al., 2017	-	+
18,969	1007,6527	1030,6416	961323,88	Surfaktin C13 (V <sup>4</sup> ) [M+Na] <sup>+</sup> ; Surfaktin C13 [M+Na] <sup>+</sup>	C <sub>51</sub> H <sub>89</sub> N <sub>7</sub> O <sub>13</sub>	Pathak & Keharia, 2014; Dimkić et al., 2017	+	-
18,627	1007,6529	1030,6420	1769776,25				+	-
18,915	1035,6848	1036,6925	1472448,13	Surfaktin C14 (L/I <sup>4</sup> , D <sup>6</sup> ) [M+H] <sup>+</sup> , Surfaktin C15 (V <sup>4</sup> , D <sup>6</sup> ) [M+H] <sup>+</sup> , Surfaktin C14 (L/I <sup>4</sup> ) [M+H] <sup>+</sup> , Surfaktin C15 (V <sup>4</sup> ) [M+H] <sup>+</sup> ; Surfaktin C15 [M+H] <sup>+</sup>	C <sub>52</sub> H <sub>91</sub> N <sub>7</sub> O <sub>13</sub> ; C <sub>53</sub> H <sub>93</sub> N <sub>7</sub> O <sub>13</sub>	Pathak et al., 2014a; Ndlovu et al., 2017; Dimkić et al., 2017	-	+
15,266	1039,6795	1040,6873	114764,23	Surfaktin C13 (L/I <sup>4</sup> ) [M+H] <sup>+</sup> , Surfaktin C14 (V <sup>4</sup> ) [M+H] <sup>+</sup> , Surfaktin C15 (V <sup>4,7</sup> ) [M+H] <sup>+</sup>	C <sub>51</sub> H <sub>89</sub> N <sub>7</sub> O <sub>13</sub> ; C <sub>52</sub> H <sub>91</sub> N <sub>7</sub> O <sub>13</sub> ; C <sub>53</sub> H <sub>93</sub> N <sub>7</sub> O <sub>13</sub>	Pathak et al., 2014a	-	+
17,363	1043,6503	1044,6574	395226,25	Surfaktin C14 [M+Na] <sup>+</sup>	C <sub>52</sub> H <sub>91</sub> N <sub>7</sub> O <sub>13</sub>	Dimkic et al., 2017	-	+
18,817	1049,6995	1050,7068	2083152,25	Surfaktin C14 (L/I <sup>4</sup> ,OmetD <sup>6</sup> ) [M+H] <sup>+</sup> , Surfaktin C15 (L/I <sup>4</sup> ,D <sup>6</sup> ) [M+H] <sup>+</sup> , Surfaktin C15 (L/I <sup>4</sup> ) [M+H] <sup>+</sup> , Surfaktin C16 (V <sup>4</sup> ,D <sup>6</sup> ) [M+H] <sup>+</sup> , Surfaktin C16 (V <sup>4</sup> ) [M+H] <sup>+</sup> , Surfaktin C16 (V <sup>7</sup> ) [M+H] <sup>+</sup> ; Surfaktin C16 [M+H] <sup>+</sup>	C <sub>52</sub> H <sub>91</sub> N <sub>7</sub> O <sub>13</sub> ; C <sub>53</sub> H <sub>93</sub> N <sub>7</sub> O <sub>13</sub> ; C <sub>54</sub> H <sub>95</sub> N <sub>7</sub> O <sub>13</sub>	Pathak et al., 2014a; Ndlovu et al., 2017	-	+

(nastavljeno)

Tabela 18.

Retenciono vreme (RT)	Monoizotopska masa	Uočena masa (m/z)	Abundanca	Lipopeptidni molekul	Molekularna formula	Referenca	X5-2	X6-3
17,896	1053,6937	1054,7007	12884,66	Surfaktin C14 (L/I <sup>4</sup> ) [M+H] <sup>+</sup> , Surfaktin C14 (L/I <sup>4</sup> , D <sup>7</sup> ) [M+H] <sup>+</sup> , Surfaktin C15 (V <sup>4</sup> ) [M+H] <sup>+</sup> , Surfaktin C15 (V <sup>4</sup> , D <sup>7</sup> ) [M+H] <sup>+</sup>	C <sub>52</sub> H <sub>91</sub> N <sub>7</sub> O <sub>13</sub> ; C <sub>53</sub> H <sub>93</sub> N <sub>7</sub> O <sub>13</sub>	Pathak et al., 2014b	+	-
16,095	1053,6955	1054,7031	116458,74				-	+
18,915	1035,6848	1058,6730	241168,44	Surfaktin C15, [M+Na] <sup>+</sup>	C <sub>53</sub> H <sub>93</sub> N <sub>7</sub> O <sub>13</sub>	Dimkić et al., 2017	-	+
17,768	1059,6258	1060,6335	35842,65	Surfaktin C14 (V <sup>4</sup> ) [M+K] <sup>+</sup>	C <sub>52</sub> H <sub>91</sub> N <sub>7</sub> O <sub>13</sub>	Pathak & Keharia, 2014	-	+
18,817	1049,6995	1072,6893	331434,78	Surfaktin C16 [M+Na] <sup>+</sup>	C <sub>54</sub> H <sub>95</sub> N <sub>7</sub> O <sub>13</sub>	Ndlovu et al., 2017	-	+
17,388	1079,7218	1080,7291	77668,24	Surfaktin standard			-	+
16,512	1081,7269	1082,7339	140196,38	Surfaktin C16 (L/I <sup>4</sup> )	C <sub>54</sub> H <sub>95</sub> N <sub>7</sub> O <sub>13</sub>	Pathak et al., 2014b	-	+
16,901	1067,7105	1090,6997	148786,47	Surfaktin [M+Na] <sup>+</sup>		Ma et al., 2016	-	+
18,979	1052,7062	1053,7135	35088,23	Bacilomicin D C14 [M+Na] <sup>+</sup>		Kefi et al., 2015	+	-
17,801	1056,6686	1057,6760	49757,18	Iturin C15 [M+H] <sup>+</sup>	C <sub>49</sub> H <sub>76</sub> N <sub>12</sub> O <sub>14</sub>	Nastro et al., 2013	+	-
17,801	1056,6686	1079,6576	16943,59	Iturin A C15 [M+Na] <sup>+</sup> ; Iturin A C15/Mikosubtilin C15 [M+Na] <sup>+</sup> ; Iturin A C15 [M+Na] <sup>+</sup>	C <sub>49</sub> H <sub>76</sub> N <sub>12</sub> O <sub>14</sub>	Arguelles-Arias et al., 2009; Jemil et al., 2017; Chen et al., 2020	+	-
17,521	1108,5602	1109,5672	16844,89	Iturin C16 [M+K] <sup>+</sup>	C <sub>50</sub> H <sub>78</sub> N <sub>12</sub> O <sub>14</sub>	Athukorala et al., 2009	+	-
17,517	1066,5553	1067,5644	18292,00	Bacilomicin D C15 [M+Na] <sup>+</sup>		Jemil et al., 2017	+	-
18,985	1066,7229	1067,7302	18275,75	Bacilomicin D C15 [M+Na] <sup>+</sup>		Nam et al., 2021	+	-

**Tabela 19.** Lista identifikovanih jedinjenja u etil-acetatnom i benzenovom ekstraktu izolata *P. orientalis* X2-1P primenom HPLC-ESI-qTOF/MS analize.

Naziv jedinjenja	Molekularna formula [M-H] <sup>-</sup>	Retenciono vreme (RT)	Monoizotopska masa [M-H] <sup>-</sup>	Uočena masa [M-H] <sup>-</sup>	Abundanca	Fragmenti CE 10 (abundanca)	Fragmenti CE 20 (abundanca)	Fragmenti CE 40 (abundanca)	Očekivani fragmenti	Potvrda
<b>Etil-acetatni ekstrakt</b>										
2-(hidroksimetil)benzoeva kiselina	C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> O <sub>3</sub>	5,018	151,04	152,047	68559	151.04 (809) 107.049 (330) 105.035 (250)	105.034 (425) 77.040 (289) 121.027 (217)	92.026 (365) 93.031 (214) 77.038 (126)	CE10: 77, 121	Nije potvrđen (nedostaje fragment 77)
Benzoeva kiselina	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>2</sub>	6,837	121,03	122,037	142090				CE20: 77, 121	
5-Nitro-2-fenilpropilamino benzoeva kiselina [Nppb]	C <sub>16</sub> H <sub>15</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	6,933	413,096	300,113	31783				CE10: 91, 137, 151, 163, 255, 299 CE20: 46, 91, 106, 122, 137, 151, 163, 255, 299 CE40: 46, 91, 107, 122, 137, 151, 163	Nije potvrđen
4-hidroksi-3-fenilbenzoeva kiselina glukozid		8,146	413,143	368,145	8395	89.023 (575) 323.113 (570) 275.106 (423) 122.018 (48)	89.025 (851) 275.104 (546) 277.117 (251)	89.024 (1308) 71.048 (171) 146.080 (163)	CE10: 107, 122, 151, 166	Potvrđen
2-amino-3-metoksi-benzoeva kiselina	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> NO <sub>3</sub>	9,652	166,051	167,058	74311	150.945 (32) 166.050 (2126)			CE20: 107, 151	
(1a,5b,6a)-7-protoiluden-1,5,6,14-tetrol 14-(2,4-dihidroksi-6-metilbenzoeva kiselina)	C <sub>23</sub> H <sub>29</sub> O <sub>7</sub>	15,46	463,196	418,197	6181	111.979 (742) 463.193 (639) 140.006 (408) 365.236 (1500)	67.986 (396) 111.976 (280) 140.003 (166) 365.237 (1387)	59.013 (338) 67.991 (197) 231.180 (115) 96.960 (839)		
2-Hidroksi-6-tridecilbenzoeva kiselina	C <sub>20</sub> H <sub>31</sub> O <sub>3</sub>	17,2	365,235	320,237	14803	220.143 (141) 221.153 (125)	220.147 (349) 96.960 (134)	220.146 (233) 205.123 (169)		
2-Hidroksifenil nitrit	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	18,694	138,019	139,026	8753	108.021 (393)	108.021 (899)	108.015 (67)	A: 108	Potvrđen

(nastavljeno)

Tabela 19.

Naziv jedinjenja	Molekularna formula [M-H] <sup>-</sup>	Retenciono vreme (RT)	Monoizotopska masa [M-H] <sup>-</sup>	Uočena masa [M-H] <sup>-</sup>	Abundanca	Fragmenti CE 10 (abundanca)	Fragmenti CE 20 (abundanca)	Fragmenti CE 40 (abundanca)	Očekivani fragmenti	Potvrda
<b>Benzenov ekstrakt</b>										
Benzoeva kiselina	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>2</sub>	6,9	121,029	122,037	17500				CE10: 77, 121 CE20: 77, 121	Nije potvrđen (nedostaje fragment 77)
2-(Hidroksimetil) benzoeva kiselina	C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> O <sub>3</sub>	7,3	151,039	152,047	2497	107.050 (1191) 130.999 (123)	107.049 (1264) 45.000 (87.13)	44.998 (98) 64.030 (69)		
4-Acetamidobenzoeva kiselina	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> NO <sub>3</sub>	8,3	178,051	179,058	41112	151.042 (152) 134.059 (806) 92.049 (288) 41.004 (275)	80.960 (73.73) 92.051 (875) 134.06 (117) 41.999 (108)	107.049 (63.1) 92.049 (882) 41.001 (54) 422.729 (25)	A: 136, 134	Potvrđen
2-Metilbenzoeva kiselina	C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> O <sub>2</sub>	8,8	135,044	136,052	48084	136.041 (100) 91.054 (1625) 135.000 (121)	136.038 (60) 91.054 (313) 135.047 (16)		CE10: 91, 135 CE20: 91, 135	Potvrđen
4-Hidroksibenzoeva kiselina	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub>	9	137,025	138,032	137720	65.039 (24) 93.035 (2211) 137.024 (1214)	65.040 (61) 93.035 (3072)	49.001 (11) 65.041 (325) 75.026 (37) 93.035 (593)	CE10: 65, 93, 137 CE20: 65, 93 CE40: 39, 49, 65, 75, 93 A: 109, 93	Potvrđen
2-Amino-3-metoksi-benzoeva kiselina	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> NO <sub>3</sub>	9,6	166,051	167,058	39 325	166.050 (1879)			CE10: 107, 122, 151, 166 CE20: 107, 151	Potvrđen
C2 (C13 H9 N2 O2)		11	224,061	225,067	4581	180.068 (317)	180.068 (172)		A: 181, 180	Potvrđen



#### 4.10. *In vivo* biokontrolna aktivnost odabranih antagonističkih izolata

Rezultati ispitivanja sposobnosti tri odabrana antagonistička izolata, *B. velezensis* X5-2, *B. megaterium* X6-3 i *P. orientalis* X2-1P da redukuju pojavu simptoma na ozimjoj uljanoj repici (sorta Jasna) prouzrokovanih sa *X. campestris* pv. *campestris* sojevima/izolatima NCPPB4679, Xc1 i Xc291 u kontrolisanim uslovima staklenika, prikazani su u Tabeli 20. Intenzitet zaraze kod najvirulentnijeg soja NCPPB4679 iznosio je 41,13%, dok je kod srednje virulentnog Xc1 i slabo virulentnog izolata Xc291 iznosio redom 23,92% i 4,54%. Dobijeni rezultati su bili u korelaciji sa rezultatima dobijenim za test virulentnosti izolata i njihov kapacitet za formiranje biofilma.

Svi kontrolni tretmani (inokulisane biljke bez primene antagonista) su se statistički razlikovali od primenjenih biokontrolnih tretmana. Nije bilo statistički značajnih razlika između primenjenih biokontrolnih tretmana, bez obzira na vreme primene (24 sata pre i 24 sata posle) ili tip tretmana (puna kultura i supernatant).

Efikasnost tretmana punim kulturama antagonističkih izolata 24 sata pre tretmana izolatima/sojevima *X. campestris* pv. *campestris* bila je između 66,96% (*B. megaterium* X6-3) i 82,37% (*P. orientalis* X2-1P), dok je ocenjena efikasnost istih tretmana sa supernatantima bila između 61,05% (*B. megaterium* X6-3) i 79,33% (*B. velezensis* X5-2), u zavisnosti od izolata. Efikasnost tretmana punim kulturama antagonističkih izolata 24 sata nakon tretmana izolatima/sojevima *X. campestris* pv. *campestris* kretala se između 49,60 (*B. megaterium* X6-3) – 72,47% (*P. orientalis* X2-1P), dok su isti tretmani sa supernatantima imali efikasnost u rangu od 54,51% (*B. megaterium* X6-3) do 71,15% (*B. megaterium* X6-3). Biokontrolni izolat *B. velezensis* X5-2 pokazao je efikasnost od 71,07 – 79,33% u tretmanima 24 sata pre i 53,08 – 60,13% u tretmanima 24 sata nakon inokulacije *X. campestris* pv. *campestris* izolata/sojeva (Tabela 20). Efikasnost tretmana sa biokontrolnim izolatom *B. megaterium* X6-3, iznosila je između 61,05 – 70,32% nakon aplikacije 24 sata pre i 49,60 – 71,15% prilikom aplikacije 24 sata nakon tretmana izolatima/sojevima *X. campestris* pv. *campestris*. Izolat *P. orientalis* X2-1P pokazao je efikasnost između 71,86 – 82,37% u tretmanima 24 sata pre i 63,34 – 72,47% kada je apliciran 24 sata nakon tretmana izolatima/sojevima *X. campestris* pv. *campestris*.

**Tabela 20.** Intenzitet zaraze (srednja vrednost  $\pm$  SE, n=6) kod inokulisane ozime uljane repice (sorta Jasna) i efikasnost biokontrolnih tretmana.

Tretmani		<i>X. campestris pv. campestris</i> izolati											
		NCPB4679				Xc1				Xc291			
		24 sata pre inokulacije patogena		24 sata nakon inokulacije patogena		24 sata pre inokulacije patogena		24 sata nakon inokulacije patogena		24 sata pre inokulacije patogena		24 sata nakon inokulacije patogena	
		Intenzitet infekcije (%)	Ef. (%)	Intenzitet infekcije (%)	Ef. (%)	Intenzitet infekcije (%)	Ef. (%)	Intenzitet infekcije (%)	Ef. (%)	Intenzitet infekcije (%)	Ef. (%)	Intenzitet infekcije (%)	Ef. (%)
Sr. vrednost $\pm$ SE		Sr. vrednost $\pm$ SE		Sr. vrednost $\pm$ SE		Sr. vrednost $\pm$ SE		Sr. vrednost $\pm$ SE		Sr. vrednost $\pm$ SE			
<i>B. velezensis</i> X5-2	Puna kultura	8,69 $\pm$ 0,50 c	<b>78,87</b>	19,11 $\pm$ 1,17 b	<b>53,54</b>	6,92 $\pm$ 0,30 b	<b>71,07</b>	11,08 $\pm$ 1,07 b	<b>53,68</b>	1,25 $\pm$ 0,34 b	<b>72,47</b>	2,13 $\pm$ 0,30 b	<b>53,08</b>
	Supernatant	8,50 $\pm$ 0,60 c	<b>79,33</b>	16,54 $\pm$ 1,22 bc	<b>59,79</b>	6,67 $\pm$ 0,43 b	<b>72,12</b>	10,17 $\pm$ 0,82 b	<b>57,48</b>	0,94 $\pm$ 0,21 b	<b>79,30</b>	1,81 $\pm$ 0,24 b	<b>60,13</b>
<i>B. megaterium</i> X6-3	Puna kultura	12,59 $\pm$ 0,50 b	<b>69,39</b>	20,73 $\pm$ 1,07 b	<b>49,60</b>	7,10 $\pm$ 0,27 b	<b>70,32</b>	10,86 $\pm$ 0,80 b	<b>54,60</b>	1,50 $\pm$ 0,31 b	<b>66,96</b>	1,56 $\pm$ 0,12 b	<b>65,64</b>
	Supernatant	16,02 $\pm$ 0,82 b	<b>61,05</b>	18,71 $\pm$ 0,68 b	<b>54,51</b>	7,67 $\pm$ 0,53 b	<b>67,93</b>	9,65 $\pm$ 0,59 b	<b>59,66</b>	1,60 $\pm$ 0,36 b	<b>64,76</b>	1,31 $\pm$ 0,46 b	<b>71,15</b>
<i>P. orientalis</i> X2-1P	Puna kultura	7,25 $\pm$ 0,42 b	<b>82,37</b>	12,67 $\pm$ 1,04 b	<b>69,20</b>	5,38 $\pm$ 0,26 b	<b>77,51</b>	8,31 $\pm$ 0,47 b	<b>65,26</b>	1,06 $\pm$ 0,21 b	<b>76,65</b>	1,25 $\pm$ 0,27 b	<b>72,47</b>
	Supernatant	8,52 $\pm$ 0,39 b	<b>79,29</b>	12,79 $\pm$ 0,76 b	<b>68,90</b>	6,73 $\pm$ 0,80 b	<b>71,86</b>	8,77 $\pm$ 0,49 b	<b>63,34</b>	1,19 $\pm$ 0,26 b	<b>73,79</b>	1,56 $\pm$ 0,34 b	<b>65,64</b>
<b>Kontrola</b>	-	41,13 $\pm$ 4,58 a	-	41,13 $\pm$ 4,58 a	-	23,92 $\pm$ 1,95 a	-	23,92 $\pm$ 1,95 a	-	4,54 $\pm$ 0,27 a	-	4,54 $\pm$ 0,27 a	-

Ef. – efikasnost; SE – standardna greška; Vrednosti koje imaju isto slovo nisu statistički značajne prema Tukey's post hoc testu.

## **5. DISKUSIJA**

## 5. DISKUSIJA

Fitopatogena bakterija *X. campestris* pv. *campestris* predstavlja pretnju za profitabilno gajenje kupusnjača širom sveta, izazivajući značajne gubitke prinosa, a samim tim i ekonomske štete (Vicente & Holub, 2013). Prilikom karakterizacije *X. campestris* pv. *campestris* izolata dobijenih 2014. godine sa šest jarih useva *B. oleracea* (brokoli, karfiol, keleraba, kupus, kelj i raštan) kao i sa ozime uljane repice, kao novog domaćina u Srbiji, primećeno je da osim što su izolati poreklom sa ozime uljane repice genetički heterogeni, oni pokazuju i veću specifičnost za domaćina sa koga vode poreklo u poređenju sa genetički homogenom populacijom sojeva poreklom sa *B. oleracea* (Popović et al., 2019). Na temeljima iznesenog zapažanja, postavljena je hipoteza sadašnjeg istraživanja: „Usled proširivanja opsega domaćina *X. campestris* pv. *campestris*, tj. sa prelaskom patogena na novu ekološku nišu, sa jarih formi kupusnjača (brokoli, karfiol, keleraba, kupus, kelj i raštan) na kojima je do sada bio prisutan, na ozimu uljanu repicu, koja je specifična po svom hibridnom poreklu i produkciji ulja, došlo je do pojave novog ekotipa *X. campestris* pv. *campestris*, prilagođenog na ozimu uljanu repicu.” U cilju dokazivanja hipoteze, sadašnja studija je bila usmerena na formiranje novije kolekcije *X. campestris* pv. *campestris* izolata sa različitih sorti, hibrida i linija ozime uljane repice na različitim lokalitetima u Vojvodini (Srbija) u periodu od tri godine (2014, 2016. i 2018) i na njihovu karakterizaciju na osnovu genetičkih i patogenih osobina.

S obzirom da je *X. campestris* pv. *campestris* patogen semena i da se lako prenosi i širi na veće razdaljine, postoji potreba za pronalaženjem metoda za brzu i pouzdanu rutinsku detekciju ovog patogena. Konvencionalne bakteriološke metode, pored toga što su sporije, često mogu dati nezadovoljavajuće rezultate, naročito prilikom testiranja semena sa niskim intenzitetom infekcije ili ukoliko je patogen u vijabilnom ali nekultivabilnom stanju (*engl.* viable but nonculturable condition, VBNC), kada je njegova detekcija moguća samo korišćenjem PCR metodologije (Ghezzi & Steck, 1999; Berg et al., 2005). Brza detekcija patogena je omogućena konstruisanjem *X. campestris*- i *X. campestris* pv. *campestris*-specifičnih parova prajmera na osnovu različitih regiona *hrpF* gena, koji je deo visoko konzerviranog *hrp* genskog klastera, zaduženog za hipersenzitivni odgovor i patogenost (Huang et al., 2016). Ovaj genski klaster je uglavnom prisutan kod svih fitopatogenih bakterija i od ključne je važnosti za uspostavljanje interakcija između patogena i domaćina (Singh et al., 2016). Korišćenjem *X. campestris*- (DLH109/DLH112 i DLH120/DLH125) i *X. campestris* pv. *campestris*-specifičnih (Dhrp\_Xcc\_F/Dhrp\_Xcc\_R i XCF/XCR) parova prajmera u ovoj studiji, urađena je preliminarna identifikacija izolata dobijenih sa ozime uljane repice i od ukupno 82 izolata sa morfologijom nalik *Xanthomonas* na YDC hranljivoj podlozi, 65 izolata je identifikovano kao *X. campestris* pv. *campestris*. Singh et al. (2014) su u studiji detekcije *X. campestris* pv. *campestris* iz semena i različitih biljnih organa pokazali da je par prajmera Dhrp\_Xcc\_F/Dhrp\_Xcc\_R visoko specifičan samo za patogene izolate *X. campestris* pv. *campestris*. U studiji Berg et al. (2005), dokazana je specifičnost parova prajmera DLH109/DLH112 i DLH120/DLH125 za *X. campestris* sojeve i predložena je njihova primena za brzu detekciju ovog patogena u semenu, listu ili stablu, kao i za razdvajanje ove vrste od ostalih blisko srodnih predstavnika iz roda *Xanthomonas*.

Postojanje genetičkog diverziteta između 65 izolata poreklom sa ozime uljane repice utvrđeno je primenom tri para rep-PCR prajmera (BOX, ERIC i REP). Diverzitet je bio najizraženiji u slučaju BOX- i ERIC-PCR prajmera, čijom primenom su generisani kompleksniji i vizuelno različitiji profili u poređenju sa dobijenim REP-PCR profilima. Tri navedena para prajmera su takođe uspešno korišćena u brojnim ranijim studijama za ispitivanje genetičkog diverziteta *X. campestris* pv. *campestris* sojeva iz Izraela (Valverde et al., 2007), Italije (Zaccardelli et al., 2008), Nepala (Jensen et al., 2010) i Njujorka (Lange et al., 2016), takođe ukazujući na postojanje genetičke heterogenosti između sojeva poreklom sa različitih kupusnjača.

Detaljnija slika o promenama u genomima *X. campestris* pv. *campestris* izolata sa ozime uljane repice dobijena je nakon sekvenciranja protein-kodirajućih gena. Kombinovani rezultati MLST analize 6 konzerviranih gena (*dnaK*, *fyuA*, *gyrB*, *rpoD*, *gltA* i *lepA*) za 10 reprezentativnih izolata (Xc1, Xc251, Xc261, Xc271, Xc291, Xc301, Xc321, Xc341, Xc361 i Xc432) i pet referentnih sojeva (CFBP 8912, NCPPB4678, NCPPB4679, NCPPB4680 i NCPPB4682) sa ozime

uljane repice iz Srbije (Popović et al., 2013; 2019), ukazali su na postojanje sedam filogenetski blisko srodnih grupa između testiranih izolata/sojeva, od kojih su otkrivene tri nove grupe, različite od četiri prethodno okarakterisane za referentne sojeve u studiji Popović et al. (2019). Svi geni, osim *fyuA* su bili polimorfni, ukazujući na postojanje dve (*dnaK*, *gltA*, *rpoD*), odnosno tri (*lepA* i *gyrB*) genetički različite grupe izolata. Nagomilavanje više nukleotidnih promena na određenom konzerviranom genu/genima mogla bi ukazati na usmereniju mikroevoluciju (evoluciju unutar vrste) na taj gen, koja bi mogla biti posledica odgovora na određene selekzione pritiske. Jedan od najznačajnijih aspekata MLSA je upravo sposobnost ovakve analize da pruži uvid u evoluciju unutar određene vrste, praćenjem različitih tipova rekombinacija. Utvrđivanje postojanja rekombinacija i njihove učestalosti može pomoći u razumevanju načina evolucije sojeva unutar vrste, načina adaptacije klonova na nove uslove životne sredine i na nove domaćine, na taj način pružajući uvid u evoluciju novih patogenih sojeva (Fargier et al., 2011). Sve nukleotidne promene do kojih dolazi tokom mikroevolucije, moraju biti ili pozitivno- ili neutralno-selekcionisane kako bi se zadržale u genomu, na osnovu čega se može pretpostaviti da su neke od uočenih promena na istaknutim genima ili sve zajedno, omogućile sojevima kolonizaciju nove ekološke niše, koja je različita od one koju su prvobitno naseljavali. Huang et al. (2015) ističu da je akumulacija pozitivno-selekcionisanih gena, od kojih je većina stečena događajima homologne rekombinacije, omogućila različitim *Xanthomonas* vrstama da „istraže” nove ekološke niše u ekosistemu i odgovore na sredinski stres, što je za posledicu imalo adaptivnu diverzifikaciju vrsta u okviru ovog roda.

Na genetičku heterogenost između 15 *X. campestris* pv. *campestris* izolata/sojeva takođe je ukazalo izdvajanje pet tipova sekvenci (ST3, ST5, ST9, ST26 i ST47) od kombinacije alelskih profila četiri sekvencirana gena (P-X-*dnaK*, *fyuA*, *gyrB* i *rpoD*). Najzastupljeniji alelski profil, koji je bio prisutan kod 33% testiranih izolata, bio je ST47 (aleli 9-3-3-11 za gene P-X-*dnaK*, *fyuA*, *gyrB* i *rpoD*, redom), koji je nedavno determinisan u radu Bella et al. (2019) za *X. campestris* pv. *campestris* soj ISCI 122 izolovan sa kelja u Kampaniji (Italija). Najslabije zastupljen tip sekvence među *X. campestris* pv. *campestris* sojevima sa ozime uljane repice bio je ST5, koji je determinisan samo za izolat Xc432. Na osnovu ista četiri gena, Cruz et al. (2018) su utvrdili postojanje 30 različitih tipova sekvenci (od kojih je 26 tipova sekvenci bilo jedinstveno) za 56 testiranih *X. campestris* pv. *campestris* sojeva poreklom sa 12 različitih domaćina (*B. oleraceae*; *B. oleracea* vars. *botrytis*, *capitata*, *costata*, *gemmafera*; *B. oleracea* convar. *bullata* var. *gemmafera*; *B. oleracea* convar. *acephala* var. *sabellica*; *B. oleracea* convar. *capitata* var. *alba*; *B. oleracea* convar. *botrytis* var. *botrytis*; *B. oleracea* convar. *capitata* var. *sabauda*; *B. kaber* var. *pinnatifida* i *Iberis* sp.), od kojih je najzastupljeniji tip sekvence bio ST5. Na osnovu centralne pozicije ST5 na filogenetskom stablu sa minimalnim rasponom, dokazano je da je ST5 predački genotip za izolate poreklom sa uljane repice. Cruz et al. (2018) su utvrdili i da ne postoji povezanost između tipa sekvence (ST) i domaćina. Značajno je istaći da je ST26 (aleli 9-3-1-11) veza između predačkog genotipa ST5 (aleli 1-3-1-11) i genotipa ST47 (aleli 9-3-3-11), koji se razlikuju u jednom (SLV) lokusu (PX-*dnaK*), odnosno u dva (DLV) lokusa (PX-*dnaK* i *gyrB*), redom. S obzirom na dominantnost genotipa ST47 među *X. campestris* pv. *campestris* izolatima sa ozime uljane repice iz Srbije, može se pretpostaviti da je ovaj genotip postepeno divergirao od predačkog genotipa ST5. Do diverzifikacije novog genotipa je moglo doći usled nagomilavanja mutacija ili rekombinacijom, tokom procesa adaptacije na ozimu uljanu repicu kao novog domaćina ili je nastanak novog genotipa mogao biti rezultat nasumičnog genetičkog drifta (Francisco et al., 2009). Shodno tome, može se pretpostaviti da je došlo do povećanja brojnosti populacija *X. campestris* pv. *campestris* sa novim genotipom (ST47) usled njihove veće adaptivne vrednosti na novu ekološku nišu. Studija Fargier et al. (2011), u kojoj je rađena determinacija alelskih profila *X. campestris* pv. *campestris* sojeva na osnovu sekvenci osam gena (*atpD*, *dnaK*, *efP*, *fyuA*, *glnA*, *gyrB*, *rpoD* i *tpiA*) ukazala je na prisustvo 15 tipova sekvenci (ST1 – ST7, ST12, ST16 – ST22) za 30 testiranih sojeva izolovanih sa devet različitih domaćina (*B. oleracea*; *B. oleracea* vars. *botrytis* i *gemmafera*; *B. oleracea* cv. *capitata*; *B. oleracea* var. *botrytis* cvs. *aviso*, *cortes* i *spacestar*; *B. oleracea* cv. *bullata* *gemmafera*; *Iberis* sp.), među kojima je genotip ST17 [koji je isti kao genotip ST5 iz sadašnje studije i studije Cruz et al. (2018)]

bio najzastupljeniji. Slična studija, urađena od strane Bella et al. (2019) za 31 soj *X. campestris* pv. *campestris* iz Italije, poreklom sa osam domaćina (brokoli, karfiol, kelj, keleraba, kupus, raštan, savojski kupus, bela repa) na osnovu sekvenci sedam gena (*atpD*, *dnaK*, *efp*, *fyuA*, *glnA*, *gyrB*, *rpoD*) ukazala je na prisustvo 14 tipova sekvenci (AP1 – AP14), među kojima je tip sekvence AP1 = ST17 (Fargier et al., 2011) = ST5 [sadašnja studija i studije Cruz et al. (2018)] takođe bio najzastupljeniji. U ovom radu je uočena veza između dobijenog konkatamernog „Neighbour-joining” filogenetskog stabla konstruisanog na osnovu šest gena (*dnaK*, *fyuA*, *gyrB*, *rpoD*, *gltA* i *lepA*) i MS filogenetskog stabla konstruisanog na osnovu četiri gena (P-X-*dnaK*, *fyuA*, *gyrB* i *rpoD*). Od svih pet dobijenih tipova sekvenci za 15 testiranih *X. campestris* pv. *campestris* izolata/sojeva (10 reprezentativnih i pet referentnih) sa ozime uljane repice, izolati sa genotipom ST3 su na MS stablu bili najudaljeniji od predačkog genotipa ST5 i od ostala tri genotipa (ST9, ST26 i ST47). Isti rezultati su dobijeni na „Neighbour-joining” filogenetskom stablu, gde su *X. campestris* pv. *campestris* izolati sa genotipom ST3 formirali najudaljeniju grupu (VI i VII), dok su ostali genotipovi (ST5, ST9, ST26 i ST47) bili filogenetski srodniji (I – V). Takođe, na oba stabla je dokazano da je najzastupljeniji genotip (ST47) bio najrodniji izolatima sa genotipom ST9 (grupe I i II na „Neighbour-joining” filogenetskom stablu). Izolati sa genotipovima ST5 i ST26 formirali su grupe III, IV i V na „Neighbour-joining” filogenetskom stablu.

Rezultati testa patogenosti na ozimnoj uljanoj repici pokazali su da je svih 10 reprezentativnih izolata i pet referentnih *X. campestris* pv. *campestris* sojeva poreklom sa ozime uljane repice, izolovanih u periodu od devet godina (2010 – 2018) bilo patogeno na uljanoj repici, pokazujući tri različita stepena virulentnosti (visoko, srednje i slabo virulentni). Izolat NCPPB4679 bio je najvirulentniji, a izolat Xc291 najslabije virulentan. Svi testirani izolati su takođe bili patogeni na šest testiranih *B. oleracea* domaćina (brokoli, karfiol, keleraba, kupus, kelj i raštan), ukazujući na to da imaju širi krug domaćina, ali su i dalje pokazivali najveći virulentni potencijal na uljanoj repici. Dobijeni rezultati podržavaju predloženu hipotezu, da je u toku određena vrsta specijalizacije vrste *X. campestris* pv. *campestris* na ozimu uljanu repicu. Izolati NCPPB4679, NCPPB4680 i Xc361 iz grupe visoko virulentnih izolata pripadaju grupi izolata sa genotipom ST26, determinisanoj na osnovu sekvenci četiri gena (P-X-*dnaK*, *fyuA*, *gyrB*, *rpoD*). Ovakav tip korelacije nije pronađen kod ostalih testiranih izolata. Izolati Xc291 i Xc261 su bili najslabije virulentni na svim testiranim domaćinima, i na ozimnoj uljanoj repici. U sličnoj studiji, urađenoj od strane Popović et al. (2019), gde je test patogenosti rađen kod 18 *X. campestris* pv. *campestris* izolata poreklom sa različitih domaćina (brokoli, karfiol, keleraba, kupus, kelj, raštan, ozima uljana repica) izolovanih 2014. godine, pokazano je da izolati poreklom sa ozime uljane repice, karfiola, kelja i kelerabe pokazuju najveću virulentnost baš na domaćinima sa kojih i vode poreklo.

Tri odabrana *X. campestris* pv. *campestris* izolata (Xc1, NCPPB4679 i Xc291) su prouzrokovali simptome na svim testiranim hibridima, sortama i linijama uljane repice, ukazujući na to da potpuno rezistentni tipovi ove gajene vrste ne postoje u Srbiji. Gen-za-gen model, koji su predložili Vicente et al. (2001), mogao bi pomoći da se uspostave uspešni programi za uzgoj rezistentnih sorti na *X. campestris* pv. *campestris*. Model objašnjava interakcije između tipova *X. campestris* pv. *campestris* i različitih *Brassica* sorti [*B. oleracea* (Wirosa F1 i Miracle F1), *B. rapa* (Just Right Hybrid Turnip i Seven Top Turnip), *B. napus* (Cobra linija 14R), *B. carinata* (PI 199947) i *B. juncea* (Florida Broad Leaf Mustard)] i zasnovan je na interakciji između najmanje četiri podudarna para gena, avirulentnih gena (A1 – A4) i gena za rezistenciju specifičnih za rasu (R1 – R4). Prema autorima modela, rezistencija linije 14R od sorte Cobra uljane repice objašnjena je interakcijom gena R4 (poreklom od A genoma repe) i A4 avirulentnog gena. Prema datom modelu, geni koji su ključni za otpornost na najvažnije *X. campestris* pv. *campestris* tipove (1 i 4) su geni R1 i R4. Ignatov et al. (2000) su ukazali na postojanje rezistencije specifične za tip kod različitih tipova uljane repice, gde je većina testiranih tipova uljane repice bila visoko rezistentna na bar jedan od tri testirana *X. campestris* pv. *campestris* tipa (1, 4 i 5). Još jedna studija autora Vicente et al. (2002), opisuje tri linije uljane repice (jednu ozimu, dobijenu od sorte Cobra i dve jare linije CrGC5 i N-o-1) kao rezistentne na *X. campestris* pv. *campestris* rasu 4, ukazujući da je njihova rezistentnost kontrolisana pojedinačnim dominantnim genom *Xca4*. U istraživanju Taylor et al.

(2002), različite sorte ozime i jare uljane repice su se pokazale kao rezistentne na *X. campestris* pv. *campestris* rasu 4, ali je dokazano da jari usevi imaju tendenciju za parcijalnu rezistenciju. Isti autori su kod useva *B. napus* i *B. rapa* uočili postojanje varijabilne rezistencije na *X. campestris* pv. *campestris* tipove 3 i 5. Imajući u vidu navedeno, od značaja bi bilo utvrditi pripadnost testiranih *X. campestris* pv. *campestris* izolata sa ozime uljane repice iz Srbije određenom(im) tipu(ovima), kako bi se proizvođači mogli informisati o uzgoju određenih sorti/linija/hibrida otpornih na utvrđeni(e) tip(ove).

Zavisno od genotipa biljke, ali i od faktora spoljašnje sredine (abiotičkih i biotičkih), najrazličitiji mikroorganizmi naseljavaju rizosferu i filosferu biljaka, pri čemu mogu imati različit uticaj na njihov porast i zdravstveno stanje (Brader et al., 2017; Dong et al., 2019). S obzirom na relativno skoru pojavu *X. campestris* pv. *campestris* na uljanoj repici u Srbiji, od velikog značaja je bilo ispitati uticaj ovog patogena na sastav autohtonih mikrobijalnih zajednica. Sekvenciranjem gena za 16S rRNK, primenom Illumina platforme za NGS, u ovom radu je pružen potpuni uvid u kompleksne bakterijske zajednice filofsere i rizosfere različitih linija, sorti i hibrida ozime uljane repice sa simptomima zaraze sa *X. campestris* pv. *campestris* i bez vidljivih simptoma bolesti. Ukazano je na direktan uticaj patogena na smanjenje ukupnog bogatstva bakterija, odnosno alfa diverziteta u uzorcima filofsere sa ispoljenim simptomima bolesti (linija SO 14, sorte Kata i Nevena i hibrid NS Ras) u poređenju sa uzorkom bez vidljivih simptoma (sorta Zorica). Uticaj patogena na smanjenje bakterijskog diverziteta u uzorcima filofsere bio je najizraženiji kod uzoraka Ph1 (linija SO 14) i Ph4 (hibrid NS Ras), kod kojih je zabeležen najveći intenzitet infekcije, 75% i 61%, redom. Ista pojava je takođe potvrđena u studiji Manching et al. (2014), gde je primećeno da je do smanjenja bogatstva i diverziteta bakterijskih vrsta na filosferi kukuruza (*Zea mays* L.) došlo usled razvoja južne lisne plamenjače, izazvane fitopatogenom gljivom *Cochliobolus heterostrophus* (Drechs.). Sadašnja studija je takođe ukazala i na manji bakterijski diverzitet u uzorcima filofsere u poređenju sa rizosferom. Takav rezultat je očekivan, jer je opšte poznato da je diverzitet mikroorganizama filofsere manji u odnosu na druge biljne delove, upravo zbog izloženosti ovog staništa ekstremnim varijacijama fizičkih (temperatura, vlažnost, radijacija, itd.) i nutritivnih uslova, koji direktno utiču na mikrobijalnu strukturu i diverzitet (Turner et al., 2013). Razdeli Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria i ud-Bacteria su detektovani u svim testiranim uzorcima filofsere (Ph1 – Ph5), ali u različitim procentima. Razdeo Proteobacteria je bio najdominantniji u uzorcima filofsere sa simptomima bolesti (Ph1 – Ph4), dok su razdeli Firmicutes i Actinobacteria dominirali u uzorku filofsere bez simptoma (Ph5). Ranije studije zasnovane na NGS gena za 16S rRNK takođe ističu da četiri pomenuta bakterijska razdela (Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes i Actinobacteria) dominiraju u filosferi, ali i da su među njima razdeli Proteobacteria ( $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$ ) i Firmicutes najdominantniji (Sivakumar et al., 2020). Prema studiji Tian et al. (2017), razdeo Proteobacteria je izdvojen kao najdominantniji na listovima uljane repice gajene u kontrolisanim uslovima fitotrona. Razlika u zastupljenosti roda *Xanthomonas* i rodova u koje su svrstane potencijalno „korisne” vrste bakterija bila je vidljiva između uzoraka filofsere sa i bez simptoma bolesti. Dok je rod *Xanthomonas* dominirao u sva četiri uzorka filofsere sa simptomima, potvrđujući prisustvo patogena, rodovi *Exiguobacterium*, *Massilia*, *Buchnera* i *Pantoea* su dominirali u uzorku filofsere bez simptoma. Dobijeni rezultati ukazuju da je došlo do smanjenja zastupljenosti potencijalno „korisnih” bakterijskih rodova (*Exiguobacterium*, *Massilia* i *Pantoea*) usled prisustva patogena. Uzorci filofsere Ph2 (sorta Kata) i Ph3 (sorta Nevena), razlikovali su se od ostalih uzoraka filofsere po značajno većoj relativnoj zastupljenosti roda *Pseudomonas* i *Sphingomonas*, samo u uzorku Ph2. Rastogi et al. (2013) su istakli da rodovi *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Methylobacterium*, *Bacillus*, *Massilia*, *Arthrobacter* i *Pantoea* čine „osnovnu” zajednicu filofsere različitih biljnih vrsta. Rod *Exiguobacterium* je prethodno opisan kao najzastupljeniji rod u filosferama pirinča (*Oryza sativa* L.) uzgajanog u polju i paradajza (*Solanum lycopersicum* L.) (Romero et al., 2016; Venkatachalam et al., 2016). Za pojedine vrste ovog roda su dokazana brojna korisna svojstva, usled kojih bi mogle naći primenu u biotehnologiji, bioremedijaciji, industriji i poljoprivredi (Vishnivetskaya et al., 2009). Copeland et al. (2015) su ispitali uticaj vegetacijskog perioda na sastav mikrobijalnih zajednica soje (*Glycine max* (L.)

Merr.), uljane repice (*Brassica napus* L.) i pasulja (*Phaseolus vulgaris* L.). Korišćenjem „network co-occurrence” analize, utvrdili su postojanje pozitivne korelacije između bakterija koje podstiču rast biljaka (PGPR), *Exiguobacterium* i *Bacillus* i njihovu negativnu korelaciju sa potencijalnim patogenima *Erwinia* i *Pseudomonas*. U studiji Rastogi et al. (2012), visoka zastupljenost *Xanthomonas campestris* pv. *vitians* (*Xcv*) na listovima rimske zelene salate (*Lactuca sativa* L.) gajene u polju, bila je u negativnoj korelaciji sa potencijalnim antagonističkim bakterijama iz rodova *Bacillus* i *Pantoea*. Suprotno, na listovima gde *Xcv* nije bio prisutan, rodovi potencijalnih antagonističkih bakterija su bili dominantniji. Povećanje brojnosti mikroorganizama sa protektivnim osobinama u ukupnom mikrobiomu može poslužiti kao prva linija odbrane od patogena, redukujući njihov pritisak, čime indirektno dolazi do povećanja produktivnosti (Teixeira et al., 2019).

Od 12 razdela koji su detektovani u pet uzoraka rizosfere (R1 – R5) biljaka ozime uljane repice testiranih u sadašnjoj studiji, najdominantniji su bili Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes i Acidobacteria. Uzorak rizosfere R2 (sorta Kata) izdvojio se u odnosu na ostale uzorke rizosfere po dva puta većoj relativnoj zastupljenosti Bacteroidetes i isto toliko manjoj zastupljenosti Acidobacteria. Suprotno, u uzorku rizosfere R3 (sorta Nevena), razdeo Verrucomicrobia je bio najdominantniji. Uzorak R2 se na nivou familije razlikovao od drugih testiranih uzoraka rizosfere po visokoj relativnoj zastupljenosti familija Flavobacteriaceae (rod *Flavobacterium*) i Sphingobacteriaceae (rod *Pedobacter*), dok se uzorak R3 izdvojio po najvećoj relativnoj zastupljenosti familija Verrucomicrobiaceae i WPS-1. S obzirom da rizosfera nije prirodno stanište *X. campestris* pv. *campestris*, rod *Xanthomonas* je detektovan u uzorcima rizosfere sa jako malom relativnom zastupljenošću [0,01% (R5, sorta Zorica bez simptoma bolesti) – 0,25 (R2, sorta Kata sa simptomima bolesti)]. U istraživanju mikrobioma rizosfere ozime uljane repice, Rathore et al. (2017) su takođe potvrdili dominantnost razdela Proteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria, Acidobacteria, Verrucomicrobia i Chloroflexi. Najzastupljeniji razdeli detektovani u rizosferi uljane repice gajene u Kanadskoj preriji bili su Proteobacteria ( $\gamma$  i  $\alpha$ ), Actinobacteria, Planctomycetes i Bacteroidetes (Lay et al., 2018). Prema radu Kolton et al. (2012), na osnovu različitih metoda, zavisnih i nezavisnih od kultivacije, *Flavobacterium* spp. je determinisan kao dominantan rod u rizosferi različitih useva, sa značajnom ulogom u promociji rasta biljaka i stimulaciji rezistencije biljaka na bolesti. Predstavnici roda *Pedobacter* su opisani kao jedni od važnijih endofita prisutnih u korenu uljane repice u fazi cvetanja, koji pokazuju sposobnost da produkuju indol sirćetnu kiselinu (IAA) koja podstiče cvetanje i na taj način može doprineti povećanju prinosa (de Campos et al., 2013; Lay et al., 2018). Prema An et al. (2020), zastupljenost roda *Xanthomonas* u mikrobiomima rizosfere i zemljišta najčešće je ispod nivoa detekcije ili dostiže 0,7%. Rezultati istraživanja da Silva et al. (2021), vezani za zastupljenost *X. campestris* pv. *campestris* u rizosferi, odgovaraju rezultatima sadašnjeg istraživanja, takođe pokazujući da je rizosfera nepovoljno stanište za ovog biljnog patogena.

Usled score pojave i nedostatka podataka o štetama koje mogu nastati kao posledica infekcije *X. campestris* pv. *campestris* na ozimoj uljanoj repici, kao i zbog negativnog efekta koji hemijski preparati mogu imati na životnu sredinu i zdravlje ljudi, jedan od ciljeva ovog rada je bio razmatranje alternativnih metoda kontrole ovog patogena. U tu svrhu sprovedena su ispitivanja potencijala autohtonih *Bacillus* spp. i *Pseudomonas* spp. izolata poreklom sa filofsere i iz rizosfere biljaka ozime uljane repice (sa i bez simptoma bolesti) u *in vitro* i *in vivo* testovima. Tri antagonistička izolata iz ove studije, identifikovana kao *B. velezensis* X5-2, *B. megaterium* X6-3 i *P. orientalis* X2-1P poreklom sa filofsere ozime uljane repice hibrida NS Ras (sa simptomima bolesti), sorte Zorica (bez simptoma bolesti) i linije SO 14 (sa simptomima bolesti), redom, pokazala su aktivnost u formi pune kulture i supernatanta. Odabir izolata rađen je na osnovu dokazane antagonističke aktivnosti, ali i na osnovu njihove pripadnosti rizičnoj grupi 1 biološke bezbednosti (ne nosi nikakav ili niski rizik po pojedinca i zajednicu) na osnovu nemačke klasifikacije (TRBA 466, 2010). Od tri *P. orientalis* izolata (X2-1P, X2-1PMF i X5-1PMF) sa antagonističkom aktivnošću pune kulture i supernatanta, zbog genetičke homogenosti na osnovu sekvenci gena 16S rRNK i *gyrB*, za dalja istraživanja nasumično je odabran izolat X2-1P. *In vitro* antagonistički potencijal odabranih izolata bio je najizraženiji na slabo i umereno virulentnim



izolatima *X. campestris* pv. *campestris*, odnosno onim koji su imali slabu i umerenu sposobnost produkcije biofilma. *In vivo* testovi nisu pokazali značajne razlike u biokontrolnoj aktivnosti prema testiranim *X. campestris* pv. *campestris* izolatima/sojevima, bez obzira na njihov stepen virulentnosti. S obzirom da je *B. velezensis* X5-2 pokazao slabu *in vitro* antagonističku aktivnost pune kulture, ali dobru aktivnost supernatanta, može se pretpostaviti da njegova aktivnost leži u sposobnosti da produkuje određeni(e) sekundarni(e) metabolit(e) sa antibakterijskom aktivnošću. PCR analizom je potvrđen genetički potencijal *B. velezensis* X5-2 za biosintezu različitih cikličnih lipopeptida (surfaktina, kurstakina, bacilomicina D i iturina). HPLC-ESI-qTOF/MS analizom etil-acetatnog ekstrakta izolata *B. velezensis* X5-2 detektovani su pikovi koji odgovaraju različitim izoformama surfaktina (C12 – C15), kurstakina (C11 – C13), bacilomicina D (C14 i C15) i iturina (C15 i C16). GC-MS analiza isparljivih organskih jedinjenja pokazala je najveće vrednosti površine pika za pirazine, alkene, karboksilne kiseline i indole u ukupnim koncentracijama, dok su na 40 °C i 60 °C alkeni i alkohol 2-(2-etoksietoksi)etanol bili najdominantniji. Etil-acetatni ekstrakt *B. velezensis* X5-2 razlikovao se od ekstrakata ostalih testiranih izolata po visokoj zastupljenosti isparljivih organskih jedinjenja 2,3-butanediola, metoksimetana i heneikosana. Antagonistička aktivnost *B. velezensis* je ranije opisana na *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, prouzrokovaču citrusnog raka limete (*Citrus aurantifolia* L.) i *Xanthomonas euvesicatoria*, prouzrokovaču bakteriozne pegavosti na biberu (*Piper nigrum* L.) (Pajčin et al., 2020; Sudyoung et al., 2020). Grady et al. (2019) su identifikovali [Leu<sup>7</sup>] surfaktin C14 i [Leu<sup>7</sup>] surfaktin C15 kod *B. velezensis* soja 9D-6 koji je pokazao biokontrolnu aktivnost na različitim patogenima. Od ukupno osam izoformi surfaktina koje su detektovane kod *Bacillus* spp., dokazano je da surfaktini C14 i C15 imaju najveći potencijal za suzbijanje bolesti (Wang et al., 2018). U istoj studiji je ukazano na prisustvo pet izoformi surfaktina (C12 – C16) u metabolomu *B. velezensis* B006. U sekvenci genoma *B. velezensis* NWUMFkBS10.5, takođe je dokazano prisustvo gena za biosintezu surfaktina, bacilomicina, iturina D i fengicina D (Adeniji et al., 2019). Isto tako, Nam et al. (2021) su detektovali familije lipopeptida: kurstakine, surfaktine, iturine i bacilomicine u ekstraktu *B. velezensis* NST6, od kojih je anti-stafilokokna aktivnost pripisana bacilomicinu D C15. Kang et al. (2018) predlažu endofitni soj *B. velezensis* CC09 kao „vakcinu” za suzbijanje bolesti pšenice (*Triticum aestivum* L.) izazvane fitopatogenim gljivama *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* i *Bipolaris sorokiniana* u *in vivo* uslovima, a biokontrolni potencijal ovog soja povezuju sa produkcijom iturina A. U ranijim studijama je opisano da bioaktivni molekuli iz grupe alkohola, alkena, karboksilnih kiselina i pirazina imaju antimikrobnu aktivnost širokog spektra (Janssens et al., 2019; Fatima et al., 2020). Antifungalna i antiviralna aktivnost pirazina 3-benzil-2,3,6,7,8,8a-heksahidropirol[1,2-a]pirazin-1,4-dion, koji je detektovan u ekstraktima sva tri antagonistička izolata iz sadašnje studije sa najvišim vrednostima površine pika, ranije je opisana u etil-acetatnom ekstraktu *B. velezensis* PEA1 u studiji Abdelkhalek et al. (2020). Antifungalna aktivnost još jednog pirazina, 3-propan-2-il-2,3,6,7,8,8a-heksahidropirol[1,2-a]pirazin-1,4-diona, koji je detektovan u visokoj koncentraciji kod sva tri testirana izolata, opisana je u radu Jasim et al. (2016), kod endofitnog soja *B. amyloliquefaciens* BmB 1 poreklom sa lekovite biljke *Bacopa monnieri* L. Diketopiperazin, (3S,8aS)-3-izopropilheksahidropirol[1,2-a]pirazin-1,4-dion detektovan u etil-acetatnom ekstraktu *B. velezensis* RA5401 iz zemljišta, pokazao je antiproliferativni efekat na kancerske ćelije (Rehman et al., 2018). Za ovaj diketopiperazin, takođe su dokazane antibakterijska (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 i *Micrococcus luteus* ATCC 9341) i antifungalna (*Aspergillus flavus* MTCC 183, *Candida albicans* MTCC 277, *Fusarium oxysporum* MTCC 284, *Rhizoctonia solani* MTCC 4634 i *Penicillium expansum* MTCC 2006) aktivnost, kao i dejstvo na promociju rasta klijanaca *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (Furtado et al., 2005; Ortiz-Castro et al., 2011; Kumar et al., 2014). Za preostala dva pirazina (2,8-dietoksi-1,7-diazatriciklo[7.3.0.0<sup>3,7</sup>]dodeka-2,8-dien i 2-acetil-3-metil-6,7,8,8a-tetrahidro-3H-pirol[1,2-a]pirazin-1,4-dion), detektovana sa visokim vrednostima površine pika u ekstraktima sva tri antagonistička izolata iz sadašnje studije, takođe je ranije potvrđena antibakterijska aktivnost (Kumari et al., 2019; dos Reis et al., 2019). Za alkohol 2,3-butanediol, koji je detektovan kod *B. velezensis* X5-2, u ranijim studijama je dokazana sposobnost indukovanja sistemske rezistencije kod biljaka (Grady et al., 2019), ali i uticaj na zatvaranje stoma

kod *A. thaliana* i *Nicotiana benthamiana* Domin., sprečavajući na taj način prodor folijarnih patogena u biljku (Wu et al., 2018). Kod sojeva *Bacillus subtilis* GB03 i *Bacillus amyloliquefaciens* IN937a, prisustvo 2,3-butanediola bilo je povezano sa promocijom rasta klijanaca *A. thaliana* i indukcijom sistemske rezistencije protiv patogena *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, takođe kod klijanaca *A. thaliana* (Ryu et al., 2003; Ryu et al., 2004). U istraživanju Vanitha et al. (2020), heneikosan detektovan u etil-acetatnom ekstraktu lista *Plumbago zeylanica* L., okarakterisan je kao novi mikrobicidni bioaktivni alkan sa odličnom antimikrobnom aktivnošću. Prema našim saznanjima, biološka aktivnost metoksimetana, koji je detektovan u značajnoj koncentraciji kod *B. velezensis* X5-2 na temperaturama 40 °C i 60 °C i koji bi mogao doprineti njegovoj antimikrobnoj aktivnosti, još uvek nije opisana. Za alkene (1-dodecen, 1-dokosen, 1-heksadecen, 1-eikosen, 1-oktadecen i 1-tetradecen) koji su detektovani u etil-acetatnim ekstraktima sva tri antagonistička izolata dokazana je antimikrobna aktivnost u brojnim ranijim studijama (Kumar et al., 2011; Ponnusamy et al., 2018; Ghaly et al., 2020). Indol, 1-metil-9H-pirido[3,4-b]indol, koji je detektovan u visokoj koncentraciji u sva tri ekstrakta iz sadašnje studije, ranije je detektovan u ekstraktu *Thermoactinomyces* sp. gde je prijavljena njegova antimikrobna aktivnost protiv različitih Gram-negativnih i Gram-pozitivnih bakterija, kvasaca i gljiva (Bratchkova et al., 2012).

Na osnovu *in vitro* eksperimenata *B. megaterium* X6-3 je pokazao aktivnost i u formi pune kulture i supernatanta. Na osnovu GC-MS analize dokazano je da se etil-acetatni ekstrakt ovog izolata razlikuje od ekstrakata drugih izolata testiranih u ovoj studiji po visokim vrednostima površine pika za karboksilne kiseline: 2-metilbutanoičnu kiselinu, 3-metilbutanoičnu kiselinu i 2-metilpropanoičnu kiselinu na obe temperature (40 °C i 60 °C), kao i za sirćetnu kiselinu na 60 °C. Kod *B. megaterium* X6-3 dokazano je prisustvo gena za surfaktin i kurstakin sintetazu, ali je HPLC-ESI-qTOF/MS analizom utvrđeno samo prisustvo različitih surfaktina (C12 – C16) koji su poznati po dejstvu na promociju rasta biljaka i po biokontrolnoj aktivnosti na širok spektar biljnih patogena (Munjal et al., 2016). Dva pirazina (3-propan-2-il-2,3,6,7,8,8a-heksahidropirololo[1,2-a]pirazin-1,4-dion i 3-benzil-2,3,6,7,8,8a-heksahidropirololo[1,2-a]pirazin-1,4-dion) i alkani, dodekan i tetradekan, pronađeni u ekstraktima *B. megaterium* X6-3, takođe su detektovani u dihlormetanskom ekstraktu *B. megaterium* BmBP17 koji je pokazao antibakterijsku aktivnost protiv fitopatogena *Xanthomonas axonopodis* pv. *punicae* i *Ralstonia solanacearum* (Munjal et al., 2016). Za isparljiva organska jedinjenja 2-metilbutanoičnu, 3-metilbutanoičnu i 2-metilpropanoičnu kiselinu dokazane su antifungalna i antibakterijska aktivnost (Chaves-López et al., 2015; Hayashida-Soiza et al., 2008). Detektovana isparljiva jedinjenja bi mogla biti ključna za antibakterijsku aktivnost antagonističkog izolata *B. megaterium* X6-3.

*P. orientalis* X2-1P je pokazao najjači antagonistički potencijal na testiranim *X. campestris* pv. *campestris* izolatima sa ozime uljane repice i u formi pune kulture i supernatanta. Veći diverzitet isparljivih organskih jedinjenja detektovan je u etil-acetatnom ekstraktu ovog izolata u poređenju sa benzenovim ekstraktom, na osnovu čega bi se etil-acetatna ekstrakcija mogla predložiti kao bolja metoda za buduća istraživanja ovakvog tipa. Isparljivo jedinjenje sa visokom vrednošću površine pika, po kojima se benzenov ekstrakt *P. orientalis* X2-1P razlikovao od etil-acetatnog ekstrakta ovog izolata na 60 °C bio je alkohol, 2-feniletanol. Ovo jedinjenje takođe nije detektovano ni u jednom od testiranih etil-acetatnih ekstrakata *Bacillus* spp. izolata (X5-2 i X6-3). PCR skriningom izolata *P. orientalis* X2-1P na prisustvo gena koji kodiraju za sintezu antibiotika dokazano je prisustvo gena za fenazin-1-karboksilnu kiselinu. Međutim HPLC-ESI-qTOF/MS analizom je samo detektovano prisustvo različitih derivata benzoeve kiseline i 2-hidroksifenil nitrita. Wan et al. (2008) su opisali 2-feniletanol kao jedinjenje sa antifungalnom aktivnošću. U studiji Zengerer et al. (2018), antagonistički potencijal *P. orientalis* F9 na različite fitopatogene bakterije (*Erwinia amylovora* i *Pseudomonas syringae* pvs. *syringae*, *actinidiae* i *persicae*) povezan je sa prisustvom safracinskog genskog klastera i fenazinskog operona (phzABCDEFGF), koji je esencijalan za konverziju horizminse kiseline u fenazin-1-karboksilat. Derivati fenazina, sa posebnim naglaskom na fenazin-1-karboksilnu kiselinu, produkovani od strane fluorescentnih pseudomonada intenzivno se proučavaju zbog dokazane antibiotske aktivnosti širokog spektra na različite bakterije, gljive i eukariote i zbog potencijala za primenu u suzbijanju bolesti biljaka

(Pierson & Pierson, 2010). Sposobnost izolata *P. orientalis* X2-1P da produkuje fenazin-1-karboksilnu kiselinu mogla bi biti zaslužna za dokazanu antibakterijsku aktivnost protiv *Xcc* sojeva sa ozime uljane repice. Tri jedinjenja: 4-acetamidobenzoeva kiselina, 4-hidroksibenzoeva kiselina i 2-hidroksifenil nitrita, koja su detektovana kod *P. orientalis* X2-1P, takođe su prethodno detektovana u benzenovom ekstraktu *Pseudomonas synxantha* P4/16\_1 koji je pokazao antifungalnu aktivnost protiv *Monilinia laxa* (Janakiev et al., 2019b).

U ovom radu je pokazana *in vivo* biokontrolna aktivnost tri odabrana antagonistička izolata: *B. velezensis* X5-2, *B. megaterium* X6-3 i *P. orientalis* X2-1P protiv testiranih *X. campestris* pv. *campestris* sojeva sa ozime uljane repice. Primenom tretmana 24 sata pre i 24 sata nakon aplikacije izolata/sojeva *X. campestris* pv. *campestris*, intenzitet bolesti je redukovao čak 82,37% i 72,47%, redom. Vreme aplikacije biokontrolnih agenasa je od krucijalnog značaja u poljskim uslovima. U ranijim studijama je opisano da su preventivni folijarni tretmani sa *B. subtilis* 210 uspešno redukovali broj lezija izazvanih patogenom *X. campestris* pv. *glycines* na soji, a da je *B. amyloliquefaciens* soj RC-2 potpuno inhibirao *Colletotrichum dematium* na dudu (Yoshida et al., 2001; Salerno & Sagardoy, 2003). Molina et al. (2003) su takođe istakli značaj preventivnih biokontrolnih tretmana u poređenju sa terapijskim tretmanima za suzbijanje vlažne truleži na krompiru (*Erwinia carotovora*) i raka paradajza (*Agrobacterium tumefaciens*). U ovom radu nije utvrđeno postojanje statistički značajnih razlika između primenjenih tretmana, što ih čini dobrim potencijalnim biokontrolnim agensima.

S obzirom na noviju prvu, a potom i redovnu pojavu simptoma bolesti prouzrokovanih fitopatogenom bakterijom *X. campestris* pv. *campestris* na ozimoj uljanoj repici u Srbiji tokom poslednje decenije, kao i na dokazani genetički diverzitet ispitivanih izolata, buduća istraživanja bi trebalo usmeriti na dalji monitoring *X. campestris* pv. *campestris* u zemlji i eventualno i šire, zatim na ispitivanje uticaja na prinos i mogućnosti prenošenja na seme, kako bi se utvrdili potencijalni putevi prenosa bakterije. Takođe, trebalo bi detaljnije ispitati utvrđeni genetički diverzitet, što bi podrazumevalo sekvenciranje većeg broja konzerviranih gena ili sekvenciranje kompletnih genoma, kao i determinisati tipove izolata na diferencijalnim genotipovima kupusnjača, kako bi se videlo da li postoji veza između pripadnosti rasi i genetičkog diverziteta. Budući biokontrolni ogledi bi podrazumevali ispitivanje antagonističke aktivnosti izolata u polju, u uslovima prirodne infekcije, kao i mogućnost sinergističkog dejstva biokontrolnih sojeva na *X. campestris* pv. *campestris*.

## **6. ZAKLJUČCI**

## 6. ZAKLJUČCI

1. Prisustvo fitopatogene bakterije *X. campestris* pv. *campestris* potvrđeno je na 10 od 18 monitoringom obuhvaćenih lokaliteta u Vojvodini tokom tri godine uzorkovanja (2014, 2016. i 2018).
2. Primenom rep-PCR dokazano je postojanje genetičkog diverziteta između *X. campestris* pv. *campestris* izolata poreklom sa ozime uljane repice. BOX-PCR je determinisao 10 (od 14 ukupno), ERIC-PCR šest (od 10), a REP-PCR dva (od četiri) nova profila, različita od profila dobijenih za referentne sojeve. Korelacija između geografskog porekla izolata i utvrđenih rep-PCR grupa nije utvrđena.
3. Na osnovu BLASTn analize sekvenci šest konzerviranih gena (*dnaK*, *fyuA*, *gyrB*, *rpoD*, *gltA* i *lepA*), reprezentativni izolati sa ozime uljane repice iz Srbije su identifikovani kao *X. campestris* pv. *campestris*, pokazujući procenat identiteta 100% sa različitim sojevima bakterije *X. campestris* pv. *campestris* deponovanim u NCBI bazi podataka.
4. Na osnovu filogenetske analize za svaki od šest sekvenciranih gena pojedinačno, svi proučavani izolati (reprezentativni i referentni) razdvojeni su u četiri grupe na osnovu gena *gyrB*, tri grupe na osnovu gena *lepA*, dve grupe na osnovu gena *dnaK*, *gltA* i *rpoD* i jednu grupu na osnovu sekvenci gena *fyuA*.
5. Na osnovu filogenetskog stabla od konkatamernih sekvenci, svi izolati (reprezentativni i referentni) su razvrstani u sedam genetički različitih grupa. Determinisane su tri nove grupe (II, VI i VII) u odnosu na prethodno okarakterisane za referentne sojeve (I, III, IV i V).
6. Analiza zasnovana na alelima dokazala je postojanje po dva različita alelska profila za gene P-X-*dnaK*, *gyrB* i *rpoD* i jednog alelskog profila za gen *fyuA* kod proučavanih izolata (reprezentativnih i referentnih). Kombinovanjem dobijenih alelskih profila, dokazano je postojanje pet tipova sekvenci (ST3, ST5, ST9, ST26 i ST47). Tip sekvence ST47 je bio najzastupljeniji i prisutan samo kod izolata sa ozime uljane repice iz Srbije.
7. Svi testirani izolati (reprezentativni i referentni) izazvali su nekrotične lezije različitih veličina na sorti ozime uljane repice Zorica, a na osnovu uočenog intenziteta zaraze na biljkama, izolati su podeljeni u tri grupe: visoko (šest izolata), srednje (sedam izolata) i slabo (dva izolata) virulentni.
8. Svih 15 testiranih izolata (reprezentativni i referentni) prouzrokovali su tipične nekrotične lezije na šest testiranih *B. oleracea* domaćina i to na brokoliju, karfiolu, kelerabi, kelju, kupusu i raštanu; značajno veći intenzitet zaraze utvrđen je na ozimjoj uljanoj repici u odnosu na ostale ispitivane domaćine.
9. Ispitivanja osetljivosti tri testirana hibrida ozime uljane repice na tri odabrana izolata *X. campestris* pv. *campestris* nisu pokazala statistički značajne razlike.
10. Ispitivanja osetljivosti 12 testiranih sorti uljane repice na tri testirana *X. campestris* pv. *campestris* izolata su pokazala da su sve sorte osetljive, pri čemu je jara sorta Jovana je bila najotpornija na najvirulentniji izolat NCPPB4679, dok su sorte Slavica i Kata bile najotpornije na najmanje virulentan izolat X291. U tretmanima sa izolatom Xc1, nisu pokazane statistički značajne razlike u osetljivosti sortimenta.

11. Ispitivanja osetljivosti 35 testiranih linija ozime uljane repice na tri testirana *X. campestris* pv. *campestris* izolata su pokazala statistički značajne razlike. Linije DB2-7, DB2-5 i P-2 su redom bile najosetljivije na tri testirana izolata NCPPB4679, Xc1 i Xc291, dok su linije A10 AMJ-3, DB1-5 i DBV1-2 bile najmanje osetljive na izolate NCPPB4679, Xc1 i Xc291, redom.

12. Na osnovu analize alfa diverziteta testiranih uzoraka filosofere i rizosfere ozime uljane repice sa prisutnim simptomima bolesti i bez simptoma, za uzorak Ph5 (filosfera bez simptoma bolesti) utvrđene su najveće OBS vrednosti i vrednosti za indekse diverziteta i indekse koji ukazuju na bogatstvo na svim ispitivanim taksonomskim nivoima (razdeo, familija, rod). Uzorci filosofere sa ispoljenim simptomima zaraze sa *X. campestris* pv. *campestris* Ph1 i Ph4, imali su najmanji diverzitet. Između uzoraka rizosfere nisu uočene značajne razlike u broju taksonomskih grupa, bez obzira na njihovo poreklo.

13. Na osnovu analiza grupisanja, testirani uzorci filosofere su jasno razdvojeni od uzoraka rizosfere ozime uljane repice. Dokazano je postojanje razlika u sastavu bakterijskih zajednica između uzorka filosofere bez (Ph5) i sa simptomima bolesti (Ph1-Ph4). Uočeno je i razlikovanje uzorka rizosfere R2 od ostalih uzoraka rizosfere (R1, R3-R5), na svim taksonomskim nivoima.

14. U uzorcima rizosfere u odnosu na uzorke filosofere uočen je veći diverzitet razdela. Ukupan broj detektovanih familija u testiranim uzorcima, ukazao je na veći diverzitet u uzorcima rizosfere (55 familija) u odnosu na uzorke filosofere [33 (Ph2) – 50 (Ph5) familija]. Familija Xanthomonadaceae je bila najdominantnija u uzorcima filosofere Ph1-Ph4 sa simptomima bolesti (40 – 75%), dok je njena relativna zastupljenost u uzorku Ph5 iznosila 0,4%. Najdominantnija familija u uzorku Ph5 bila je Bacillales familija XII Incertae Sedis (46,34%). Razlike u pogledu zastupljenosti različitih familija između testiranih uzoraka rizosfere nisu pronađene.

15. Veći diverzitet rodova uočen je u rizosferi u odnosu na filosoferu. Najzastupljeniji rod u uzorcima filosofere sa simptomima bolesti bio je *Xanthomonas* (40 – 75%). *Exiguobacterium* je bio najdominantniji (46,34%) rod u uzorku filosofere Ph5 bez simptoma bolesti. Uočen je trend smanjivanja relativne zastupljenosti roda *Exiguobacterium* u uzorcima filosofere sa simptomima bolesti paralelno sa povećanjem zastupljenosti roda *Xanthomonas*. Značajne razlike u relativnoj zastupljenosti rodova između uzoraka rizosfere nisu uočene, bez obzira na poreklo.

16. Od ukupno 35 potencijalnih antagonističkih izolata (27 *Bacillus* spp. i osam *Pseudomonas* spp.), 16 (10 *Bacillus* spp. i šest *Pseudomonas* spp.) je pokazalo *in vitro* antagonističku aktivnost prema testiranim *X. campestris* pv. *campestris* izolatima. Od svih testiranih *Bacillus* spp. izolata, izolat X6-3 je pokazao najjači *in vitro* antagonistički potencijal pune kulture, dok je od *Pseudomonas* spp. izolata, X2-1P ispoljio najjaču antagonističku aktivnost.

17. Svih osam testiranih *X. campestris* pv. *campestris* izolata pokazali su sposobnost produkcije biofilma; šest izolata je pokazalo slabu i umerenu sposobnost produkcije biofilma, dok su dva izolata imala izraženu sposobnost produkcije biofilma.

18. Od svih testiranih antagonističkih izolata, samo dva *Bacillus* spp. izolata (X5-2 i X6-3) i tri *Pseudomonas* spp. izolata (X2-1P, X2-1PMF i X5-1PMF) su pokazali potencijal za suzbijanje tri testirana *X. campestris* pv. *campestris* izolata (NCPPB4679, Xc1 i Xc291) u formi supernatanta.

19. Na osnovu analize sekvenci gena za 16S rRNK i *tuf*, 10 *Bacillus* spp. izolata koji su pokazali *in vitro* antagonističku aktivnost u formi pune kulture i supernatanta identifikovani su kao *B. luti*, *B. velezensis*, *B. wiedmannii*, *B. megaterium*, *B. halotolerans* i *B. circulans*. Dva *Pseudomonas* spp. izolata su na osnovu sekvenci gena za 16S rRNK i *gyrB* identifikovana do nivoa roda (*Pseudomonas* sp.), dok su ostali identifikovani kao *P. orientalis*.

20. Na osnovu umnožavanja sekvenci gena za surfaktin sintetazu (*sfp*), kurstakin sintetazu (*krsA*, *krsB* i *krsC*), bacilomicin D sintetazu (*bamC*) i iturin operon (*ituA* i *ituB*) utvrđeno je da izolat *B. velezensis* X5-2 poseduje genetički potencijal za produkciju lipopeptida surfaktina, kurstakina, bacilomicina D i iturina. Kod izolata *B. megaterium* X6-3 detektovani su geni za surfaktin i kurstakin sintetazu. Kod izolata *P. orientalis* X2-1P i X5-1PMF amplifikovan je samo gen *phcA* koji kodira za fenazin-1-karboksilnu kiselinu, dok kod izolata X2-1PMF nije dokazano prisustvo nijednog od testiranih gena za produkciju antibiotika.

21. Na osnovu GC-MS analize, isparljiva organska jedinjenja sa najvećim vrednostima površine pika u ukupnim koncentracijama etil-acetatnih ekstrakata izolata *B. velezensis* X5-2, *B. megaterium* X6-3 i *P. orientalis* X2-1P bili su različiti pirazini, alkeni, karboksilne kiseline i indoli. U benzenovom ekstraktu detektovana su samo dva isparljiva organska jedinjenja iz grupe pirazina sa nešto većim vrednostima površine pika.

22. Isparljiva organska jedinjenja po kojima se razlikuje etil-acetatni ekstrakt *B. megaterium* X6-3 od ostalih bili su 2-metilbutanoična kiselina, 3-metilbutanoična kiselina, 2-metilpropanoična kiselina i sirćetna kiselina. Jedinjenja sa antimikrobnom aktivnošću po kojima se razlikuje etil-acetatni ekstrakt *B. velezensis* X5-2 od ostalih testiranih su 2,3-butanediol, metoksimetan i heneikosan.

23. HPLC-ESI-qTOF/MS analizom supernatanta *B. velezensis* X5-2, dokazano je prisustvo jedinjenja koji odgovaraju kurstakinima (C11 – C13), surfaktinima (C12 – C15), iturinima (C15 i C16) i bacilomicinu D (C14 i C15). U etil-acetatnom ekstraktu *B. megaterium* X6-3 detektovani su samo surfaktini (C12 – C16). U ekstraktima *P. orientalis* X2-1P detektovani su različiti derivati benzoeve kiseline i 2-hidroksifenil nitrit.

24. Efikasnost tretmana sa punim kulturama antagonističkih izolata X6-3, X5-2 i X2-1P, primenjenih 24 sata pre inokulacije *X. campestris* pv. *campestris* bila je između 66,96 – 82,37%, a tretmana supernatantima između 61,05 – 79,33%. Efikasnost tretmana sa punim kulturama izolata 24 sata nakon inokulacije *X. campestris* pv. *campestris* kretala se između 49,60 – 72,47%, a sa supernatantima u rangu od 54,51% do 71,15%. *B. velezensis* X5-2 pokazao je efikasnost od 71,07 – 79,33% u tretmanu 24 sata pre i 53,08 – 60,13% u tretmanu 24 sata nakon inokulacije biljaka sa *X. campestris* pv. *campestris*; *B. megaterium* X6-3 61,05 – 70,32% u tretmanu 24 sata pre i 49,60 – 71,15% u tretmanu 24 sata nakon inokulacije *X. campestris* pv. *campestris*, dok je *P. orientalis* X2-1P pokazao efikasnost 71,86 – 82,37% u tretmanu 24 sata pre i 63,34 – 72,47% u tretmanu 24 sata nakon inokulacije *X. campestris* pv. *campestris*.

## **7. LITERATURA**



## 7. LITERATURA

- Abbott, W. S. (1925). Formula for correction of observed mortality due to natural mortality. *Journal of Economic Entomology*, 18, 265-267.
- Abdelkhalek, A., Behiry, S. I., Al-Askar, A. A. (2020). *Bacillus velezensis* PEA1 inhibits *Fusarium oxysporum* growth and induces systemic resistance to cucumber mosaic virus. *Agronomy*, 10(9), 1312.
- Abdellaziz, L., Chollet, M., Abderrahmani, A., Béchet, M., Yaici, L., Chataigné, G., Jacques, P. (2018). Lipopeptide biodiversity in antifungal *Bacillus* strains isolated from Algeria. *Archives of microbiology*, 200(8), 1205-1216.
- Abdelfattah, A., Malacrino, A., Wisniewski, M., Cacciola, S. O., Schena, L. (2018). Metabarcoding: A powerful tool to investigate microbial communities and shape future plant protection strategies. *Biological Control*, 120, 1-10.
- Abderrahmani, A., Tapi, A., Nateche, F., Chollet, M., Leclère, V., Wathélet, B., Jacques, P. (2011). Bioinformatics and molecular approaches to detect NRPS genes involved in the biosynthesis of kurstakin from *Bacillus thuringiensis*. *Applied microbiology and biotechnology*, 92(3), 571-581.
- Adeniji, A. A., Aremu, O. S., Babalola, O. O. (2019). Selecting lipopeptide-producing, *Fusarium*-suppressing *Bacillus* spp.: Metabolomic and genomic probing of *Bacillus velezensis* NWUMFkBS10. *MicrobiologyOpen*, 8(6), e00742.
- Afrin, K. S., Rahim, M. A., Rubel, M. H., Natarajan, S., Song, J. Y., Kim, H. T., Nou, I. S. (2018). Development of race-specific molecular marker for *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* race 3, the causal agent of black rot of crucifers. *Canadian Journal of Plant Science*, 98(5), 1119-1125.
- Afrin, K. S., Rahim, M. A., Jung, H. J., Park, J. I., Kim, H. T., Nou, I. S. (2019). Development of molecular marker through genome realignment for specific detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* Race 5, a pathogen of black rot disease.
- Afrin, K. S., Rahim, M. A., Rubel, M. H., Park, J. I., Jung, H. J., Kim, H. T., & Nou, I. S. (2020). Development of PCR-Based Molecular Marker for Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* Race 6, the Causative Agent of Black Rot of Brassicas. *The plant pathology journal*, 36(5), 418.
- Aksoy, H. M., Ozturk, M., Tufan, S. (2018). First report on *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* causing bacterial black rot disease of cauliflower in Turkey. *Journal of Plant Pathology*, 100(1), 141-141.
- Alford, D. V., Nilsson, C., Ulber, B. (2003). Insect pests of oilseed rape crops. *Biocontrol of oilseed rape pests*, 1.
- Almeida, N. F., Yan, S., Cai, R., Clarke, C. R., Morris, C. E., Schaad, N. W., Vinatzer, B. A. (2010). PAMDB, a multilocus sequence typing and analysis database and website for plant-associated microbes. *Phytopathology*, 100(3), 208-215.
- An, S. Q., Potnis, N., Dow, M., Vorhölter, F. J., He, Y. Q., Becker, A., Tang, J. L. (2020). Mechanistic insights into host adaptation, virulence and epidemiology of the phytopathogen *Xanthomonas*. *FEMS microbiology reviews*, 44(1), 1-32.
- Antonijević, D., Mitrović, P. (2007). Leaf spot of oilseed rape. *Biljni lekar*, 35(4), 443-449.
- Arguelles-Arias, A., Ongena, M., Halimi, B., Lara, Y., Brans, A., Joris, B., Fickers, P. (2009). *Bacillus amyloliquefaciens* GA1 as a source of potent antibiotics and other secondary metabolites for biocontrol of plant pathogens. *Microbial cell factories*, 8(1), 1-12.

- Aronesty, E. (2013). Comparison of sequencing utility programs. *The open bioinformatics journal*, 7(1).
- Arsenijević, M. (1997). Bakterioze biljaka. Poljoprivredni fakultet, Novi Sad. S PRINT, Novi Sad.
- Athukorala, S. N., Fernando, W. D., Rashid, K. Y. (2009). Identification of antifungal antibiotics of *Bacillus* species isolated from different microhabitats using polymerase chain reaction and MALDI-TOF mass spectrometry. *Canadian journal of microbiology*, 55(9), 1021-1032.
- Balaž, J. (2007). Bacterial diseases of oilseed rape. *Biljni lekar*, 35(4): 462-463.
- Baranyk, P., Fábry, A. (1999). History of the rapeseed (*Brassica napus* L.) growing and breeding from middle age Europe to Canberra. In *International Rapeseed Congress*.
- Beckers, B., Op De Beeck, M., Thijs, S., Truyens, S., Weyens, N., Boerjan, W., Vangronsveld, J. (2016). Performance of 16s rDNA primer pairs in the study of rhizosphere and endosphere bacterial microbiomes in metabarcoding studies. *Frontiers in microbiology*, 7, 650.
- Béchet, M., Caradec, T., Hussein, W., Abderrahmani, A., Chollet, M., Leclère, V., Jacques, P. (2012). Structure, biosynthesis, and properties of kurstakins, nonribosomal lipopeptides from *Bacillus* spp. *Applied microbiology and biotechnology*, 95(3), 593-600.
- Behlau, F., Gochez, A. M., Lugo, A. J., Elibox, W., Minsavage, G. V., Potnis, N., Ramsuhag, A. (2017). Characterization of a unique copper resistance gene cluster in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* isolated in Trinidad, West Indies. *European Journal of Plant Pathology*, 147(3), 671-681.
- Bella, P., Moretti, C., Licciardello, G., Strano, C. P., Pulvirenti, A., Alaimo, S., Catara, V. (2019). Multilocus sequence typing analysis of Italian *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* strains suggests the evolution of local endemic populations of the pathogen and does not correlate with race distribution. *Plant Pathology*, 68(2), 278-287.
- Berendsen, R. L., Pieterse, C. M., Bakker, P. A. (2012). The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in plant science*, 17(8), 478-486.
- Berg, T., Tesoriero, L., Hailstones, D. L. (2005). PCR-based detection of *Xanthomonas campestris* pathovars in *Brassica* seed. *Plant Pathology*, 54(3), 416-427.
- Berg, G., Grube, M., Schloter, M., Smalla, K. (2014). Unraveling the plant microbiome: looking back and future perspectives. *Frontiers in microbiology*, 5, 148.
- Berić, T., Kojić, M., Stanković, S., Topisirović, L., Degrassi, G., Myers, M., Fira, D. (2012). Antimicrobial activity of *Bacillus* sp. natural isolates and their potential use in the biocontrol of phytopathogenic bacteria. *Food Technology and Biotechnology*, 50(1), 25-31.
- Better, M., Lewis, B., Corbin, D., Ditta, G., Helinski, D. R. (1983). Structural relationships among *Rhizobium meliloti* symbiotic promoters. *Cell*, 35(2), 479-485.
- 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).
- Bleiholder, H., Weber, E., Lancashire, P.D., Feller, C., Buhr, L., Hess, M. 2001. Growth stages of mono- and dicotyledonous plants, BBCH monograph. Berlin/Braunschweig, Germany: Federal Biological Research Centre for Agriculture and Forestry.
- Brader, G., Compant, S., Vescio, K., Mitter, B., Trognitz, F., Ma, L. J., Sessitsch, A. (2017). Ecology and genomic insights into plant-pathogenic and plant-nonpathogenic endophytes. *Annual Review of Phytopathology*, 55, 61-83.

- Bratchkova, A., Ivanova, V., Gousterova, A., Laatsch, H. (2012).  $\beta$ -Carboline alkaloid constituents from a *Thermoactinomyces* SP. strain isolated from Livingston Island, Antarctica. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 26(3), 3005-3009.
- Caamaño-Antelo, S., Fernández-No, I. C., Böhme, K., Ezzat-Alnakip, M., Quintela-Baluja, M., Barros-Velázquez, J., Calo-Mata, P. (2015). Genetic discrimination of foodborne pathogenic and spoilage *Bacillus* spp. based on three housekeeping genes. *Food microbiology*, 46, 288-298.
- Callahan, B.J., McMurdie, P.J., Rosen, M.J., Han, A.W., Johnson, A.J.A., Holmes, S.P. (2016). DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*. 13, 581.
- Calvo, H., Mendiara, I., Arias, E., Gracia, A. P., Blanco, D., Venturini, M. E. (2020). Antifungal activity of the volatile organic compounds produced by *Bacillus velezensis* strains against postharvest fungal pathogens. *Postharvest Biology and Technology*, 166, 111208.
- Cerutti, A., Jauneau, A., Auriac, M. C., Lauber, E., Martinez, Y., Chiarenza, S., Noël, L. D. (2017). Immunity at cauliflower hydathodes controls systemic infection by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Plant Physiology*, 174(2), 700-716.
- Chavagnat, F., Haueter, M., Jimeno, J., Casey, M. G. (2002). Comparison of partial *tuf* gene sequences for the identification of lactobacilli. *FEMS Microbiology Letters*, 217(2), 177-183.
- Chaves-López, C., Serio, A., Gianotti, A., Sacchetti, G., Ndagijimana, M., Ciccarone, C., Paparella, A. (2015). Diversity of food-borne *Bacillus* volatile compounds and influence on fungal growth. *Journal of applied microbiology*, 119(2), 487-499.
- Chalhoub, B., Denoeud, F., Liu, S., Parkin, I. A., Tang, H., Wang, X., Wincker, P. (2014). Early allopolyploid evolution in the post-Neolithic *Brassica napus* oilseed genome. *Science*, 345(6199), 950-953.
- Chen, X. H., Koumoutsis, A., Scholz, R., Eisenreich, A., Schneider, K., Heinemeyer, I., Borriss, R. (2007). Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Nature biotechnology*, 25(9), 1007-1014.
- Chen, M., Wang, J., Liu, B., Zhu, Y., Xiao, R., Yang, W., Chen, Z. (2020). Biocontrol of tomato bacterial wilt by the new strain *Bacillus velezensis* FJAT-46737 and its lipopeptides. *BMC microbiology*, 20(1), 1-12.
- Chen, G., Kong, C., Yang, L., Zhuang, M., Zhang, Y., Wang, Y., Lv, H. (2021). Genetic diversity and population structure of the *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* strains affecting cabbages in China revealed by MLST and rep-PCR based genotyping. *The Plant Pathology Journal*, 37(5), 476.
- Christiano, R. S. C., Dalla Pria, M., Junior, W. J., Amorim, L., Bergamin Filho, A. (2009). Modelling the progress of Asiatic citrus canker on Tahiti lime in relation to temperature and leaf wetness. *European Journal of Plant Pathology*, 124(1), 1-7.
- Cohan, F. M. (2001). Bacterial species and speciation. *Systematic biology*, 50(4), 513-524.
- Cole, J. R., Wang, Q., Cardenas, E., Fish, J., Chai, B., Farris, R. J., Tiedje, J. M. (2009). The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic acids research*, 37(suppl\_1), D141-D145.
- Compant, S., Samad, A., Faist, H., Sessitsch, A. (2019). A review on the plant microbiome: ecology, functions, and emerging trends in microbial application. *Journal of advanced research*, 19, 29-37.

- Copeland, J. K., Yuan, L., Layeghifard, M., Wang, P. W., Guttman, D. S. (2015). Seasonal community succession of the phyllosphere microbiome. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 28(3), 274-285.
- 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(2), 403-414.
- Cruz, J., Tenreiro, R., Cruz, L. (2018). Inference of the phylogenetic diversity and population structure of *Xanthomonas campestris* affecting Brassicaceae using a multilocus sequence typing-based approach. *Plant Pathology*, 67(4), 948-956.
- da Silva, R. S., Moutinho, B. L., dos Santos, D. R., Vasconcelo-Rodrigues, I. S., Talamini, V., Fernandes, M. F., Fernandes, R. P. (2018). Using antagonistic soil bacteria and their cell-free filtrates to control the black rot pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Journal of Phytopathology*, 166(7-8), 494-501.
- da Silva, J. C., da Silva Junior, T. A. F., Soman, J. M., do Nascimento, D. M., de Melo, L. L., Oliveira, L. R., Maringoni, A. C. (2021). Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in the phyllosphere and rhizosphere of crops. *Plant and Soil*, 462(1), 389-403.
- 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(1), 73-80.
- Danielsson, J., Reva, O., Meijer, J. (2007). Protection of oilseed rape (*Brassica napus*) toward fungal pathogens by strains of plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens*. *Microbial ecology*, 54(1), 134-140.
- de Campos, S. B., Youn, J. W., Farina, R., Jaenicke, S., Jünemann, S., Szczepanowski, R., Passaglia, L. M. (2013). Changes in root bacterial communities associated to two different development stages of canola (*Brassica napus* L. var *oleifera*) evaluated through next-generation sequencing technology. *Microbial ecology*, 65(3), 593-601.
- de Souza, J. T., Raaijmakers, J. M. (2003). Polymorphisms within the *prnD* and *pltC* genes from pyrrolnitrin and pyoluteorin-producing *Pseudomonas* and *Burkholderia* spp. *FEMS microbiology ecology*, 43(1), 21-34.
- Degrune, F., Theodorakopoulos, N., Colinet, G., Hiel, M. P., Bodson, B., Taminiau, B., Hartmann, M. (2017). Temporal dynamics of soil microbial communities below the seedbed under two contrasting tillage regimes. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1127.
- Deleu, M., Paquot, M., Nylander, T. (2008). Effect of fengycin, a lipopeptide produced by *Bacillus subtilis*, on model biomembranes. *Biophysical journal*, 94(7), 2667-2679.
- Dimkić, I., Živković, S., Berić, T., Ivanović, Ž., Gavrilović, V., Stanković, S., Fira, D. (2013). Characterization and evaluation of two *Bacillus* strains, SS-12.6 and SS-13.1, as potential agents for the control of phytopathogenic bacteria and fungi. *Biological Control*, 65(3), 312-321.
- Dimkić, I., Stanković, S., Nišavić, M., Petković, M., Ristivojević, P., Fira, D., Berić, T. (2017). The profile and antimicrobial activity of *Bacillus* lipopeptide extracts of five potential biocontrol strains. *Frontiers in microbiology*, 8, 925.
- Dong, C. J., Wang, L. L., Li, Q., Shang, Q. M. (2019). Bacterial communities in the rhizosphere, phyllosphere and endosphere of tomato plants. *PLoS One*, 14(11), e0223847.

- Doornbos, R. F., van Loon, L. C., Bakker, P. A. (2012). Impact of root exudates and plant defense signaling on bacterial communities in the rhizosphere. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 32(1), 227-243.
- dos Reis, C. M., da Rosa, B. V., da Rosa, G. P., do Carmo, G., Morandini, L. M. B., Ugalde, G. A., Kuhn, R. C. (2019). Antifungal and antibacterial activity of extracts produced from *Diaporthe schini*. *Journal of biotechnology*, 294, 30-37.
- Dowson, W. J. (1939). On the systematic position and generic names of the Gram-negative bacterial plant pathogens. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene* No. 9-13, pp. 177-193.
- Duke, K. A., Becker, M. G., Girard, I. J., Millar, J. L., Fernando, W. D., Belmonte, M. F., de Kievit, T. R. (2017). The biocontrol agent *Pseudomonas chlororaphis* PA23 primes *Brassica napus* defenses through distinct gene networks. *BMC genomics*, 18(1), 1-16.
- Dunger, G., Guzzo, C. R., Andrade, M. O., Jones, J. B., Farah, C. S. (2014). *Xanthomonas citri* subsp. *citri* type IV pilus is required for twitching motility, biofilm development, and adherence. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 27(10), 1132-1147.
- Dzhalilov, F. S., Tiwari, R. D. (1995). Soil and cabbage plant debris as infection sources of black rot. *Archives of Phytopathology & Plant Protection*, 29(5), 383-386.
- EUBIA, 2019. EUBIA – European Biomass Industry Association. <http://www.eubia.org/cms/wiki-biomass/biofuels/biodiesel/>.
- 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(5), 805-818.
- Fargier, E., Fischer-Le Saux, M., Manceau, C. (2011). A multilocus sequence analysis of *Xanthomonas campestris* reveals a complex structure within crucifer-attacking pathovars of this species. *Systematic and Applied Microbiology*, 34(2), 156-165.
- Fatima, A., Safdar, N., Moin, B., Yasmin, A. (2020). Alkenes, fatty acids and phenols augment bioactivities of organic crops. *Food Bioscience*, 37, 100737.
- Feil, E. J., Li, B. C., Aanensen, D. M., Hanage, W. P., Spratt, B. G. (2004). eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. *Journal of bacteriology*, 186(5), 1518-1530.
- Fiddaman, P. J., Rossall, S. (1995). Selection of bacterial antagonists for the biological control of *Rhizoctonia solani* in oilseed rape (*Brassica napus*). *Plant Pathology*, 44(4), 695-703.
- Fira, D., Dimkić, I., Berić, T., Lozo, J., Stanković, S. (2018). Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. *Journal of biotechnology*, 285, 44-55.
- Francisco, A. P., Bugalho, M., Ramirez, M., Carriço, J. A. (2009). Global optimal eBURST analysis of multilocus typing data using a graphic matroid approach. *BMC bioinformatics*, 10(1), 1-15.
- Francisco, M., Soengas, P., Velasco, P., Bhadauria, V., Cartea, M. E., Rodríguez, V. M. (2016). Omics approach to identify factors involved in *Brassica* disease resistance. *Current issues in molecular biology*, 19(1), 31-42.
- Furtado, N. A., Pupo, M. T., Carvalho, I., Campo, V. L., Duarte, M. C. T., Bastos, J. K. (2005). Diketopiperazines produced by an *Aspergillus fumigatus* Brazilian strain. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 16, 1448-1453.

- Gaetán, S., López, N. (2005). First outbreak of bacterial leaf spot caused by *Xanthomonas campestris* on canola in Argentina. *Plant disease*, 89(6), 683-683.
- Gevers, D., Cohan, F. M., Lawrence, J. G., Spratt, B. G., Coenye, T., Feil, E. J., Swings, J. (2005). Re-evaluating prokaryotic species. *Nature reviews microbiology*, 3(9), 733-739.
- Ghaly, M.F., Tohamy, E.Y., El-Shafeiy, S.N., El-Azzouny, S.M. (2020). Chemical Constituents of Bioactive Secondary Metabolites of *Bacillus amyloliquefaciens* SW19 to Control Silkworm Bacterial Flacherie Caused by *Bacillus thuringiensis* SW2 in vitro. *Annals of Agri-Bio Research*, 25(1), 110-118.
- Ghezzi, J. I., Steck, T. R. (1999). Induction of the viable but non-culturable condition in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in liquid microcosms and sterile soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 30(3), 203-208.
- Gkarmiri, K., Mahmood, S., Ekblad, A., Alström, S., Högberg, N., Finlay, R. (2017). Identifying the active microbiome associated with roots and rhizosphere soil of oilseed rape. *Applied and environmental microbiology*, 83(22), e01938-17.
- Grady, E. N., MacDonald, J., Ho, M. T., Weselowski, B., McDowell, T., Solomon, O., Yuan, Z. C. (2019). Characterization and complete genome analysis of the surfactin-producing, plant-protecting bacterium *Bacillus velezensis* 9D-6. *BMC microbiology*, 19(1), 1-14.
- Gross, H., Loper, J. E. (2009). Genomics of secondary metabolite production by *Pseudomonas* spp. *Natural product reports*, 26(11), 1408-1446.
- Gupta, M., Vikram, A., Bharat, N. (2013). Black rot-A devastating disease of crucifers: a review. *Agricultural Reviews*, 34(4), 269-278.
- Harshey, R. M. (2003). Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal. *Annual Reviews in Microbiology*, 57(1), 249-273.
- Hartman, K., Van Der Heijden, M. G., Wittwer, R. A., Banerjee, S., Walser, J. C., Schlaeppli, K. (2018). Cropping practices manipulate abundance patterns of root and soil microbiome members paving the way to smart farming. *Microbiome*, 6(1), 1-14.
- Hayashida-Soiza, G., Uchida, A., Mori, N., Kuwahara, Y., Ishida, Y. (2008). Purification and characterization of antibacterial substances produced by a marine bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* strain. *Journal of applied microbiology*, 105(5), 1672-1677.
- 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 and Evolutionary Microbiology*, 47(2), 328-335.
- Hathout, Y., Ho, Y. P., Ryzhov, V., Demirev, P., Fenselau, C. (2000). Kurstakins: a new class of Lipopeptides isolated from *Bacillus thuringiensis*. *Journal of natural products*, 63(11), 1492-1496.
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Sanders, M. E. (2014). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 11, 506-514.
- Horsfall, J. G., Barratt, R.W. (1945). An improved grading system for measuring plant diseases. *Phytopathology*, 35, 655.
- Hsieh, F. C., Li, M. C., Lin, T. C., Kao, S. S. (2004). Rapid detection and characterization of surfactin-producing *Bacillus subtilis* and closely related species based on PCR. *Current microbiology*, 49(3), 186-191.

- Hu, X., Roberts, D. P., Maul, J. E., Emche, S. E., Liao, X., Guo, X., Liu, S. (2011). Formulations of the endophytic bacterium *Bacillus subtilis* Tu-100 suppress *Sclerotinia sclerotiorum* on oilseed rape and improve plant vigor in field trials conducted at separate locations. *Canadian journal of microbiology*, 57(7), 539-546.
- Huang, C. L., Pu, P. H., Huang, H. J., Sung, H. M., Liaw, H. J., Chen, Y. M., Chiang, T. Y. (2015). Ecological genomics in *Xanthomonas*: the nature of genetic adaptation with homologous recombination and host shifts. *BMC genomics*, 16(1), 1-13.
- Huang, Y. C., Lin, Y. C., Wei, C. F., Deng, W. L., Huang, H. C. (2016). The pathogenicity factor HrpF interacts with HrpA and HrpG to modulate type III secretion system (T3SS) function and t3ss expression in *Pseudomonas syringae* pv. *averrhoi*. *Molecular plant pathology*, 17(7), 1080-1094.
- Hugouvieux, V., Barber, C. E., Daniels, M. J. (1998). Entry of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* into hydathodes of *Arabidopsis thaliana* leaves: a system for studying early infection events in bacterial pathogenesis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 11(6), 537-543.
- Ignatov, A., Kuginuki, Y., Hidam, K. (2000). Distribution and inheritance of race-specific resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in *Brassica rapa* and *B. napus*. *Journal of Russian Phytopathological Society*, 1, 89-94.
- Islam, M., Lee, B. R., Park, S. H., La, V. H., Bae, D. W., Kim, T. H. (2017). Cultivar variation in hormonal balance is a significant determinant of disease susceptibility to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in *Brassica napus*. *Frontiers in plant science*, 8, 2121.
- ISTA (2013). 7-019 Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* on *Brassica* spp. (prepared by Roberts, S.J., Koenraadt, H.) *International Rules for Seed Testing, Annexe to Chapter 7: Seed Health Testing Methods*, Bassersdorf, Switzerland, International Seed Testing Association.
- Janakiev, T., Dimkić, I., Bojić, S., Fira, D., Stanković, S., Berić, T., 2019a. Bacterial communities of plum phyllosphere and characterization of indigenous antagonistic *Bacillus thuringiensis* R3/3 isolate. *Journal of Applied Microbiology*. 128, 528-543.
- Janakiev, T., Dimkić, I., Unković, N., Ljaljević Grbić, M., Opsenica, D., Gašić, U., Berić, T. (2019b). Phyllosphere fungal communities of plum and antifungal activity of indigenous phenazine-producing *Pseudomonas synxantha* against *Monilinia laxa*. *Frontiers in microbiology*, 10, 2287.
- Janssens, T. K., Tyc, O., Besselink, H., de Boer, W., Garbeva, P. (2019). Biological activities associated with the volatile compound 2, 5-bis (1-methylethyl)-pyrazine. *FEMS microbiology letters*, 366(3), fnz023.
- Jasim, B., Benny, R., Sabu, R., Mathew, J., Radhakrishnan, E. K. (2016). Metabolite and mechanistic basis of antifungal property exhibited by endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* BmB 1. *Applied biochemistry and biotechnology*, 179(5), 830-845.
- Jelušić, A., Berić, T., Mitrović, P., Dimkić, I., Stanković, S., Marjanović-Jeromela, A., Popović, T. (2021a). New insights into the genetic diversity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* isolates from winter oilseed rape in Serbia. *Plant Pathology*, 70(1), 35-49.
- Jelušić, A., Popović, T., Dimkić, I., Mitrović, P., Peeters, K., Višnjevec, A. M., Berić, T. (2021b). Changes in the winter oilseed rape microbiome affected by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* and biocontrol potential of the indigenous *Bacillus* and *Pseudomonas* isolates. *Biological Control*, 160, 104695.
- Jemil, N., Manresa, A., Rabanal, F., Ayed, H. B., Hmidet, N., Nasri, M. (2017). Structural characterization and identification of cyclic lipopeptides produced by *Bacillus methylotrophicus* DCS1 strain. *Journal of Chromatography B*, 1060, 374-386.

- Jensen, B. D., Vicente, J. G., Manandhar, H. K., Roberts, S. J. (2007). An increasing risk for bacterial plant diseases in Northern Europe? Occurrence and diversity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in vegetable *Brassica* fields in Nepal and identification of a new race. In: Plant Biotech Denmark. Copenhagen, Denmark: Faculty of Life Sciences, University of Copenhagen.
- 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 Disease*, 94(3), 298-305.
- Joos, L., Beirinckx, S., Haegeman, A., Debode, J., Vandecasteele, B., Baeyen, S., De Tender, C. (2020). Daring to be differential: metabarcoding analysis of soil and plant-related microbial communities using amplicon sequence variants and operational taxonomical units. *BMC genomics*, 21(1), 1-17.
- Jovanović, O., Antonijević, D., Jakovljević, D. (1997). Characteristics of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* isolates originating from cabbage plants. *Plant Protection*. 221, 175-181.
- Kamoun, S., Kamdar, H. V., Tola, E., & Kado, C. I. (1992). Incompatible interactions between crucifers and *Xanthomonas campestris* involve a vascular hypersensitive response: role of the *hrpX* locus. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 5, 22-33.
- Kang, X., Zhang, W., Cai, X., Zhu, T., Xue, Y., Liu, C. (2018). *Bacillus velezensis* CC09: A potential 'vaccine' for controlling wheat diseases. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 31(6), 623-632.
- Kawamura, E., Horiguchi, G., Tsukaya, H. (2010). Mechanisms of leaf tooth formation in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 62(3), 429-441.
- Kefi, A., Slimene, I. B., Karkouch, I., Rihouey, C., Azaeiz, S., Bejaoui, M., Limam, F. (2015). Characterization of endophytic *Bacillus* strains from tomato plants (*Lycopersicon esculentum*) displaying antifungal activity against *Botrytis cinerea* Pers. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(12), 1967-1976.
- Kim, D. R., Gang, G. H., Jeon, C. W., Kang, N. J., Lee, S. W., Kwak, Y. S. (2016). Epidemiology and control of strawberry bacterial angular leaf spot disease caused by *Xanthomonas fragariae*. *The plant pathology journal*, 32(4), 290.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of molecular evolution*, 16(2), 111-120.
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., Glöckner, F.O. 2013. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research*, 41, e1.
- Kloepper, J. W., Ryu, C. M., Zhang, S. (2004). Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology*, 94(11), 1259-1266.
- Knief, C., Delmotte, N., Chaffron, S., Stark, M., Innerebner, G., Wassmann, R., Vorholt, J. A. (2012). Metaproteogenomic analysis of microbial communities in the phyllosphere and rhizosphere of rice. *The ISME journal*, 6(7), 1378-1390.
- Köhl, J., van der Wolf, J. M. (2005). *Alternaria brassicicola* and *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in organic seed production of Brassicaceae: Epidemiology and seed infection (No. 363). *Plant Research International*.
- Köhl, J., Kolnaar, R., Ravensberg, W. J. (2019). Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: relevance beyond efficacy. *Frontiers in plant science*, 10, 845.



- Koch, S., Dunker, S., Kleinhenz, B., Röhrig, M., Tiedemann, A. V. (2007). A crop loss-related forecasting model for *Sclerotinia* stem rot in winter oilseed rape. *Phytopathology*, 97(9), 1186-1194.
- Kolton, M., Green, S. J., Harel, Y. M., Sela, N., Elad, Y., Cytryn, E. (2012). Draft genome sequence of *Flavobacterium* sp. strain F52, isolated from the rhizosphere of bell pepper (*Capsicum annuum* L. cv. Maccabi), 194(19), 5462-5463.
- Koskella, B. (2020). The phyllosphere. *Current Biology*, 30(19), R1143-R1146.
- Kuan, T. L., Minsavage, G. V., Schaad, N. W. (1986). Aerial dispersal of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* from naturally infected *Brassica campestris*. *Plant Disease*, 70(5), 409-413.
- Kumar, V., Bhatnagar, A. K., Srivastava, J. N. (2011). Antibacterial activity of crude extracts of *Spirulina platensis* and its structural elucidation of bioactive compound. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(32), 7043-7048.
- Kumar, S. N., Nambisan, B., Sundaresan, A., Mohandas, C., Anto, R. J. (2014). Isolation and identification of antimicrobial secondary metabolites from *Bacillus cereus* associated with a rhabditid entomopathogenic nematode. *Annals of microbiology*, 64(1), 209-218.
- Kumari, N., Menghani, E., Mithal, R. (2019). GCMS analysis of compounds extracted from actinomycetes AIA6 isolates and study of its antimicrobial efficacy, 26, 362-370.
- Ladin, Z. S., Ferrell, B., Dums, J. T., Moore, R. M., Levia, D. F., Shriver, W. G., Wommack, K. E. (2021). Assessing the efficacy of eDNA metabarcoding for measuring microbial biodiversity within forest ecosystems. *Scientific reports*, 11(1), 1-14.
- Lamichhane, J. R., Osdaghi, E., Behlau, F., Köhl, J., Jones, J. B., Aubertot, J. N. (2018). Thirteen decades of antimicrobial copper compounds applied in agriculture. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 38(3), 1-18.
- Lange, H. W., Tancos, M. A., Carlson, M. O., Smart, C. D. (2016). Diversity of *Xanthomonas campestris* isolates from symptomatic crucifers in New York State. *Phytopathology*, 106(2), 113-122.
- Lay, C. Y., Bell, T. H., Hamel, C., Harker, K. N., Mohr, R., Greer, C. W., St-Arnaud, M. (2018). Canola root-associated microbiomes in the Canadian Prairies. *Frontiers in microbiology*, 9, 1188.
- Le Marrec, C., Hyronimus, B., Bressollier, P., Verneuil, B., Urdaci, M. C. (2000). Biochemical and genetic characterization of coagulins, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins, produced by *Bacillus coagulans* I4. *Applied and environmental microbiology*, 66(12), 5213-5220.
- Legein, M., Smets, W., Vandenheuvel, D., Eilers, T., Muyschondt, B., Prinsen, E., Lebeer, S. (2020). Modes of action of microbial biocontrol in the phyllosphere. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1619.
- Leite, R. M. V. B. C., Ruano, O., Komori, N. (1994). Characterization of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* isolated from canola. *Summa Phytopathologica*, 20(1), 35-38.
- Lema, M., Soengas, P., Velasco, P., Francisco, M., Cartea, M. E. (2011). Identification of sources of resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in *Brassica napus* crops. *Plant disease*, 95(3), 292-297.
- Lemanceau, P., Blouin, M., Muller, D., Moënne-Loccoz, Y. (2017). Let the core microbiota be functional. *Trends in Plant Science*, 22(7), 583-595.
- Leveau, J. H. (2007). The magic and menace of metagenomics: prospects for the study of plant growth-promoting rhizobacteria. *European Journal of Plant Pathology*, 119(3), 279-300.

- Li, Y., Héloir, M. C., Zhang, X., Geissler, M., Trouvelot, S., Jacquens, L., Adrian, M. (2019). Surfactin and fengycin contribute to the protection of a *Bacillus subtilis* strain against grape downy mildew by both direct effect and defence stimulation. *Molecular plant pathology*, 20(8), 1037-1050.
- Lima, W. C., Paquola, A. C., Varani, A. M., Van Sluys, M. A., Menck, C. F. (2008). Laterally transferred genomic islands in Xanthomonadales related to pathogenicity and primary metabolism. *FEMS microbiology letters*, 281(1), 87-97.
- Liu, S. Y. (2003). Advance in research and control of diseases in oilseed rape in China. In *Proceedings 11th International Rapeseed Congress, Copenhagen, Denmark (Vol. 4, pp. 1061-1063)*.
- Liu, K., Garrett, C., Fadamiro, H., Kloepper, J. W. (2016). Antagonism of black rot in cabbage by mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). *BioControl*, 61(5), 605-613.
- Louws, F. J., Fulbright, D. W., Stephens, C. T., De Bruijn, F. J. (1994). Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Applied and environmental microbiology*, 60(7), 2286-2295.
- Lu, H., Patil, P., Van Sluys, M. A., White, F. F., Ryan, R. P., Dow, J. M., Bogdanove, A. J. (2008). Acquisition and evolution of plant pathogenesis-associated gene clusters and candidate determinants of tissue-specificity in *Xanthomonas*. *PloS one*, 3(11), e3828.
- Lugo, A. J., Elibox, W., Jones, J. B., Ramsubhag, A. (2013). Copper resistance in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* affecting crucifers in Trinidad. *European journal of plant pathology*, 136(1), 61-70.
- Ma, Y., Kong, Q., Qin, C., Chen, Y., Chen, Y., Lv, R., Zhou, G. (2016). Identification of lipopeptides in *Bacillus megaterium* by two-step ultrafiltration and LC-ESI-MS/MS. *AMB Express*, 6(1), 1-15.
- Maiden, M. C. (2006). Multilocus sequence typing of bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 60, 561-588.
- Manching, H. C., Balint-Kurti, P. J., Stapleton, A. E. (2014). Southern leaf blight disease severity is correlated with decreased maize leaf epiphytic bacterial species richness and the phyllosphere bacterial diversity decline is enhanced by nitrogen fertilization. *Frontiers in plant science*, 5, 403.
- Marinković, R., Marjanović-Jeromela, A., Mitrović, P. (2009). Osobenosti proizvodnje ozime uljane repice (*Brassica napus* L.). *Zbornik Radova-A Periodical of Scientific Research on Field & Vegetable Crops*, 46(1).
- Marjanović-Jeromela, A., Prodanović, S. (2021). Dobre poljoprivredne prakse i tehnologije za ublažavanje dejstva prirodnih nepogoda u proizvodnji uljane repice u Srbiji. Rim, FAO. pp.1-28. <https://www.fao.org/3/cb5193sr/cb5193sr.pdf>
- Mason, A. S., Snowdon, R. J. (2016). Oilseed rape: learning about ancient and recent polyploid evolution from a recent crop species. *Plant Biology*, 18(6), 883-892.
- Massawe, V. C., Hanif, A., Farzand, A., Mburu, D. K., Ochola, S. O., Wu, L., Gao, X. (2018). Volatile compounds of endophytic *Bacillus* spp. have biocontrol activity against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytopathology*, 108(12), 1373-1385.
- Massomo, S. M. S., Mortensen, C. N., Mabagala, R. B., Newman, M. A., Hockenhuil, J. (2004). Biological control of black rot (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) of cabbage in Tanzania with *Bacillus* strains. *Journal of Phytopathology*, 152(2), 98-105.
- Mehta, N. (2019). Development of prediction models for the management of rapeseed-mustard diseases-Current scenario. *Plant Disease Research*, 34(2), 81-112.

- Mew, T. W., Natural, M. P. (1993). Management of *Xanthomonas* diseases. In *Xanthomonas* (pp. 341-362). Springer, Dordrecht.
- Milovanović, P., Kljajić, P., Popović, T., Andrić, G., Pražić Golić, M. (2019). Dynamic of *Brassicogethes aeneus* (F.) (Coleoptera, Nitidulidae) populations in Serbia's downriver Danube section and their susceptibility to insecticides. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 17(2), e1008, 1-15.
- Mishra, S., Arora, N. K. (2012). Evaluation of rhizospheric *Pseudomonas* and *Bacillus* as biocontrol tool for *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(2), 693-702.
- Mitrović, P., Milovac, Ž., Marinković, R. (2009). Current problems in the protection of winter rapeseed (*Brassica napus* var. *napus* L.). *Zaštita bilja*, 60(2), 127-144.
- Mitrović, P., Trkulja, V. (2010). *Leptosphaeria maculans* i *Leptosphaeria biglobosa*—uzročnici raka stabla i suhe truleži korijena uljane repice. *Glasnik zaštite bilja*, 33(4), 34-45.
- Molina, L., Constantinescu, F., Michel, L., Reimmann, C., Duffy, B., Défago, G. (2003). Degradation of pathogen quorum-sensing molecules by soil bacteria: a preventive and curative biological control mechanism. *FEMS microbiology ecology*, 45(1), 71-81.
- Monteiro, L., Mariano, R. D. L. R., Souto-Maior, A. M. (2005). Antagonism of *Bacillus* spp. against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48, 23-29.
- Moreira, L. M., Facincani, A. P., Ferreira, C. B., Ferreira, R. M., Ferro, M. I. T., Gozzo, F. C., Soares, M. R. (2015). Chemotactic signal transduction and phosphate metabolism as adaptive strategies during citrus canker induction by *Xanthomonas citri*. *Functional & integrative genomics*, 15(2), 197-210.
- Munjal, V., Nadakkakath, A. V., Sheoran, N., Kundu, A., Venugopal, V., Subaharan, K., Kumar, A. (2016). Genotyping and identification of broad spectrum antimicrobial volatiles in black pepper root endophytic biocontrol agent, *Bacillus megaterium* BP17. *Biological Control*, 92, 66-76.
- Monreal, C. M., Zhang, J., Koziel, S., Vidmar, J., González, M., Matus, F., Etcheverria, P. (2018). Bacterial community structure associated with the addition of nitrogen and the dynamics of soluble carbon in the rhizosphere of canola (*Brassica napus*) grown in a Podzol. *Rhizosphere*, 5, 16-25.
- Nam, J., Alam, S. T., Kang, K., Choi, J., Seo, M. H. (2021). Anti-staphylococcal activity of a cyclic lipopeptide, C15-bacillomycin D, produced by *Bacillus velezensis* NST6. *Journal of Applied Microbiology*, 131(1), 93-104.
- Nastro, R. A., Arguelles-Arias, A., Ongena, M., Di Costanzo, A., Trifuoggi, M., Guida, M., Fickers, P. (2013). Antimicrobial activity of *Bacillus amyloliquefaciens* ANT1 toward pathogenic bacteria and mold: effects on biofilm formation. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 5(4), 252-258.
- Ndlovu, T., Rautenbach, M., Vosloo, J. A., Khan, S., Khan, W. (2017). Characterisation and antimicrobial activity of biosurfactant extracts produced by *Bacillus amyloliquefaciens* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a wastewater treatment plant. *AMB Express*, 7(1), 1-19.
- Nega, E., Ulrich, R., Werner, S., Jahn, M. (2003). Hot water treatment of vegetable seed—an alternative seed treatment method to control seed-borne pathogens in organic farming. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 110: 220-234.
- Neik, T. X., Barbetti, M. J., Batley, J. (2017). Current status and challenges in identifying disease resistance genes in *Brassica napus*. *Frontiers in plant science*, 8, 1788.

- Nyvall, R. F. (2019). Ecological Interactions and Biological Control. Edited By David A. Andow, David W. Ragsdale, Robert F. Nyvall, 348.
- 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), 965-965.
- OECD. 2012. Organisation for Economic Co-operation and Development. Consensus document on the biology of the brassica crops (*Brassica* spp.). Series on Harmonisation of Regulatory oversight of Biotechnology, No 54, OECD, Paris, pp 142.
- Omar, H., Mazen, S., Ruba, A., Ralf-Udo, E. (2012). Effectiveness of bacterial and fungal isolates to control *Phoma lingam* on oilseed rape *Brassica napus*. *American Journal of Plant Sciences*, 2012.
- Ongena, M., Jourdan, E., Adam, A., Paquot, M., Brans, A., Joris, B., Thonart, P. (2007). Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environmental microbiology*, 9(4), 1084-1090.
- Ongena, M., Jacques, P. (2008). *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in microbiology*, 16(3), 115-125.
- Ortiz-Castro, R., Díaz-Pérez, C., Martínez-Trujillo, M., Rosa, E., Campos-García, J., López-Bucio, J. (2011). Transkingdom signaling based on bacterial cyclodipeptides with auxin activity in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(17), 7253-7258.
- Pajčin, I., Vlajkov, V., Frohme, M., Grebinyk, S., Grahovac, M., Mojićević, M., Grahovac, J. (2020). Pepper bacterial spot control by *Bacillus velezensis*: Bioprocess solution. *Microorganisms*, 8(10), 1463.
- Palacio-Bielsa, A., Cambra, M. A., López, M. M. (2009). PCR detection and identification of plant-pathogenic bacteria: updated review of protocols (1989-2007). *Journal of Plant Pathology*, 249-297.
- Pammel, L.H. (1895a) Bacteriosis of rutabaga (*Bacillus campestris* n sp.). *American monthly microscopical journal*, 16, 145-151.
- Pammel, L.H. (1895b) Bacteriosis of rutabaga (*Bacillus campestris* n. sp.). *Iowa State College, Agricultural Experiment Station Bulletin*, 27, 130-134.
- 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(4), 419-423.
- Pathak, K. V., Keharia, H. (2014). Identification of surfactins and iturins produced by potent fungal antagonist, *Bacillus subtilis* K1 isolated from aerial roots of banyan (*Ficus benghalensis*) tree using mass spectrometry. *3 Biotech*, 4(3), 283-295.
- Pathak, K. V., Bose, A., Keharia, H. (2014a). Characterization of novel lipopeptides produced by *Bacillus tequilensis* P15 using liquid chromatography coupled electron spray ionization tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS). *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 20(2), 133-143.
- Pathak, K. V., Bose, A., Keharia, H. (2014b). Identification and characterization of novel surfactins produced by fungal antagonist *B. acillus amyloliquefaciens* 6 B. *Biotechnology and applied biochemistry*, 61(3), 349-356.
- Patil, P. B., Bogdanove, A. J., Sonti, R. V. (2007). The role of horizontal transfer in the evolution of a highly variable lipopolysaccharide biosynthesis locus in xanthomonads that infect rice, citrus and crucifers. *BMC evolutionary biology*, 7(1), 1-13.

- Peiffer, J. A., Spor, A., Koren, O., Jin, Z., Tringe, S. G., Dangl, J. L., Ley, R. E. (2013). Diversity and heritability of the maize rhizosphere microbiome under field conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(16), 6548-6553.
- 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 Scientiarum Polonorum-Hortorum Cultus*, 14(6), 141-150.
- Perišić, M., Panić, M. (1964). Contribution to the study of bacterial diseases on cabbage (*Xanthomonas campestris*) in Yugoslavia. *Microbiology*, Belgrade, 1, 39-47.
- Perrière, G., Gouy, M. (1996) WWW-query: an on-line retrieval system for biological sequence banks. *Biochimie*, 78(5), 364-369.
- Petrocelli, S., Tondo, M. L., Daurelio, L. D., Orellano, E. G. (2012). Modifications of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* lipopolysaccharide affect the basal response and the virulence process during citrus canker. *PLoS One*, 7(7), e40051.
- Petrova, S. N., Andronov, E. E., Belimov, A. A., Beregovaya, Y. V., Denshchikov, V. A., Minakov, D. L. (2020). Prokaryotic Community Structure in the Rapeseed (*Brassica napus* L.) Rhizosphere Depending on Addition of 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate-Utilizing Bacteria. *Microbiology*, 89(1), 115-121.
- Pierson, L. S., Pierson, E. A. (2010). Metabolism and function of phenazines in bacteria: impacts on the behavior of bacteria in the environment and biotechnological processes. *Applied microbiology and biotechnology*, 86(6), 1659-1670.
- Pieterse, C. M., Zamioudis, C., Berendsen, R. L., Weller, D. M., Van Wees, S. C., Bakker, P. A. (2014). Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annual review of phytopathology*, 52, 347-375.
- Popović, T., Jošić, D., Starović, M., Milovanović, P., Dolovac, N., Poštić, D., Stanković, S. (2013a). Phenotypic and genotypic characterization of *Xanthomonas campestris* strains isolated from cabbage, kale and broccoli. *Archives of Biological Science*, 65(2), 585-593.
- Popović, T., Balaž, J., Starović, M., Trkulja, N., Ivanović, Ž., Ignjatov, M., Jošić, D. (2013b). 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), 418-418.
- Popović, T., Balaž, J., Ignjatov, M., Mitrović, P., Gavrilović, V., Jošić, D. (2014). Identification and genetic characterisation of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* as an oilseed rape pathogen in Serbia. *Journal of Plant Pathology*, 96(3), 553-560.
- 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.
- Popović, T., Jelušić, A., Mitrović, P., Iličić, R., Marković, S. (2020). Allelic profile of Serbian *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* isolates from cabbage. *Pesticidi i fitomedicina*, 35(1), 19-26.
- Ponnusamy, R. K., Vaikuntavasan, P., Subramanian, R., Mathiyazhagan, K., Palanisamy, M., Ayyanar, K. (2018). Molecular detection of antimicrobial peptide genes and identification of antifungal compounds of *Bacillus* sp. against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* causing wilt in banana. *Current Journal of Applied Science and Technology*, 28(2), 1-8.

- Pradhan, B. B., Ranjan, M., Chatterjee, S. (2012). XadM, a novel adhesin of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, exhibits similarity to Rhs family proteins and is required for optimum attachment, biofilm formation, and virulence. *Molecular plant-microbe interactions*, 25(9), 1157-1170.
- R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. ISBN 3-900051-07-0. R Foundation for Statistical Computing. (2012). Vienna, Austria. URL: <http://www.R-project.org/>.
- Raaijmakers, J. M., Weller, D. M., Thomashow, L. S. (1997). Frequency of antibiotic-producing *Pseudomonas* spp. in natural environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(3), 881-887.
- Raaijmakers, J. M., Paulitz, T. C., Steinberg, C., Alabouvette, C., Moënne-Loccoz, Y. (2009). The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant and soil*, 321(1), 341-361.
- Rademaker, J. L. W., Louws, F. J., Versalovic, J. A. M. E. S., de Bruijn, F. J., Kowalchuk, G. A. (1998). Characterization of the diversity of ecologically important microbes by rep-PCR genomic fingerprinting. *Molecular microbial ecology manual*, 3, 1-27.
- Ramarathnam, R., Bo, S., Chen, Y., Fernando, W. D., Xuewen, G., De Kievit, T. (2007). Molecular and biochemical detection of fengycin-and bacillomycin D-producing *Bacillus* spp., antagonistic to fungal pathogens of canola and wheat. *Canadian Journal of Microbiology*, 53(7), 901-911.
- Ramette, A., Frapolli, M., Défago, G., Moënne-Loccoz, Y. (2003). Phylogeny of HCN synthase-encoding hcnBC genes in biocontrol fluorescent pseudomonads and its relationship with host plant species and HCN synthesis ability. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 16(6), 525-535.
- Rakow, G. (2004). Species origin and economic importance of *Brassica*. In *Brassica*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 3-11
- Rastogi, G., Sbodio, A., Tech, J. J., Suslow, T. V., Coaker, G. L., Leveau, J. H. (2012). Leaf microbiota in an agroecosystem: spatiotemporal variation in bacterial community composition on field-grown lettuce. *The ISME journal*, 6(10), 1812-1822.
- Rastogi, G., Coaker, G. L., Leveau, J. H. (2013). New insights into the structure and function of phyllosphere microbiota through high-throughput molecular approaches. *FEMS microbiology letters*, 348(1), 1-10.
- Rathore, R., Dowling, D. N., Forristal, P. D., Spink, J., Cotter, P. D., Bulgarelli, D., Germaine, K. J. (2017). Crop establishment practices are a driver of the plant microbiota in winter oilseed rape (*Brassica napus*). *Frontiers in Microbiology*, 8, 1489.
- Rehman, N. U., Abed, R. M., Hussain, H., Khan, H. Y., Khan, A., Khan, A. L., & Al-Harrasi, A. (2018). Anti-proliferative potential of cyclotetrapeptides from *Bacillus velezensis* RA5401 and their molecular docking on G-protein-coupled receptors. *Microbial pathogenesis*, 123, 419-425.
- Republički zavod za statistiku. (2012). Popis poljoprivrede 2012. – Poljoprivreda u Republici Srbiji. 1–203. <https://publikacije.stat.gov.rs/G2013/Pdf/G201314002.pdf>
- Rijlaarsdam, A., Woudt, B., Simons, G., Koenraadt, H., Oosterhof, J., Asma, M., De Koning, J. (2004, April). Development of specific primers for the molecular detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. In EPPO conference on quality of diagnosis and new diagnostic methods for plant pests.
- 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 and Microbiology*, 3(127), 2.

- Romero, F. M., Marina, M., Pieckenstein, F. L. (2016). Novel components of leaf bacterial communities of field-grown tomato plants and their potential for plant growth promotion and biocontrol of tomato diseases. *Research in microbiology*, 167(3), 222-233.
- Rubel, M. H., Robin, A. H. K., Natarajan, S., Vicente, J. G., Kim, H. T., Park, J. I., Nou, I. S. (2017). Whole-genome re-alignment facilitates development of specific molecular markers for races 1 and 4 of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, the cause of black rot disease in *Brassica oleracea*. *International journal of molecular sciences*, 18(12), 2523.
- Rubel, M. H., Natarajan, S., Nath, U. K., Denison, M. I. J., Hee-Jeong, J., Hoy-Taek, K., & Ill-Sup, N. (2019). Development of a marker for detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* races 1 and 2 in *Brassica oleracea*. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 60(4), 511-517.
- Runno-Paurson, E., Lääniste, P., Eremeev, V., Edesi, L., Metspalu, L., Kännaste, A., Niinemets, Ü. (2021). Powdery mildew (*Erysiphe cruciferarum*) evaluation on oilseed rape and alternative cruciferous oilseed crops in the northern Baltic region in unusually warm growing seasons. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B – Soil & Plant Science*, 71(6), 443-452.
- Ryu, C. M., Farag, M. A., Hu, C. H., Reddy, M. S., Wei, H. X., Paré, P. W., Kloepper, J. W. (2003). Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(8), 4927-4932.
- Ryu, C. M., Farag, M. A., Hu, C. H., Reddy, M. S., Kloepper, J. W., Paré, P. W. (2004). Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 134(3), 1017-1026.
- Saharan, G. S., Mehta, N., Sangwan, M. S. (Eds.). (2005). *Diseases of oilseed crops*. Indus Publishing.
- Salerno, C. M., Sagador, M. A. (2003). Short communication: Antagonistic activity by *Bacillus subtilis* against *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* under controlled condition. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 1(2), 55-58.
- Salter, S. J., Cox, M. J., Turek, E. M., Calus, S. T., Cookson, W. O., Moffatt, M. F., Walker, A. W. (2014). Reagent and laboratory contamination can critically impact sequence-based microbiome analyses. *BMC biology*, 12(1), 1-12.
- Sarkar, S. F., Guttman, D. S. (2008). Evolution of the Core Genome of *Pseudomonas syringae*, a Highly Clonal, Endemic Plant Pathogen. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(6), 1961-1961.
- Schaad, N. W., White, W. C. (1974). Survival of *Xanthomonas campestris* in soil. *Phytopathology*, 64(12), 1518-1520.
- Schmidt, C. S., Mrnka, L., Lovecká, P., Frantík, T., Fenclová, M., Demnerová, K., Vosátka, M. (2021). Bacterial and fungal endophyte communities in healthy and diseased oilseed rape and their potential for biocontrol of *Sclerotinia* and *Phoma* disease. *Scientific reports*, 11(1), 1-17.
- Schmieder, R., Edwards, R. (2011). Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics*, 27(6), 863-864.
- Sharma, A., Li, X., Lim, Y. P. (2014). Comparative genomics of Brassicaceae crops. *Breeding science*, 64(1), 3-13.
- Shendure, J., Ji, H. (2008). Next-generation DNA sequencing. *Nature biotechnology*, 26(10), 1135-1145.

- Singh, D. I. N. E. S. H., Dhar, S. H. R. I., Yadav, D. K. (2010). Effect of endophytic bacterial antagonists against black rot disease of cauliflower caused by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Indian Phytopathol*, 63(2), 122-126.
- Singh, D., Raghavendra, B. T., Rathaur, P. S., Singh, H., Raghuwanshi, R., Singh, R. P. (2014). Detection of black rot disease causing pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* by bio-PCR from seeds and plant parts of cole crops. *Seed Science and Technology*, 42(1), 36-46.
- 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(9), 1411-1418.
- Sivakumar, N., Sathishkumar, R., Selvakumar, G., Shyamkumar, R., Arjunekumar, K. (2020). Phyllospheric Microbiomes: Diversity, Ecological Significance, and Biotechnological Applications. In: *Plant Microbiomes for Sustainable Agriculture*. Springer, Cham, pp. 113-172.
- Song, C., Zhu, F., Carrión, V. J., Cordovez, V. (2020). Beyond plant microbiome composition: Exploiting microbial functions and plant traits via integrated approaches. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 8, 896.
- Statistical Yearbook of the Republic of Serbia. (2018). Belgrade: Statistical office of the Republic of Serbia. <https://publikacije.stat.gov.rs/G2018/Pdf/G20182051.pdf>.
- Statistical Yearbook of the Republic of Serbia. (2019) Belgrade: Statistical office of the Republic of Serbia. <https://publikacije.stat.gov.rs/G2019/Pdf/G20192052.pdf>
- Statistical Yearbook of the Republic of Serbia. (2021) Belgrade: Statistical office of the Republic of Serbia. <https://publikacije.stat.gov.rs/G2021/PdfE/G20212054.pdf>
- Stepanović, S., Ćirković, I., Mijač, V., Švabić-Vlahović, M. (2003). Influence of the incubation temperature, atmosphere and dynamic conditions on biofilm formation by *Salmonella* spp. *Food Microbiology*, 20(3), 339-343.
- Sudyoung, N., Tokuyama, S., Krajangsang, S., Pringsulaka, O., Sarawaneeyaruk, S. (2020). Bacterial antagonists and their cell-free cultures efficiently suppress canker disease in citrus lime. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 127(2), 173-181.
- Sutton, J. C., Williams, P. H. (1970). Relation of xylem plugging to black rot lesion development in cabbage. *Canadian Journal of Botany*, 48(2), 391-401.
- Sundin, G. W., Wang, N. (2018). Antibiotic resistance in plant-pathogenic bacteria. *Annual Review of phytopathology*, 56, 161-180.
- Swings, J., Vauterin, L., Kersters, K. (1993). The bacterium *Xanthomonas*. In *Xanthomonas*. Springer, Dordrecht, pp. 121-156.
- Taylor, J.D., Conway, J., Vicente, J.G. (2002) Sources and origin of resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in *Brassica* genomes. *Phytopathology*, 92, 105–111.
- Teixeira, P. J. P., Colaianni, N. R., Fitzpatrick, C. R., Dangl, J. L. (2019). Beyond pathogens: microbiota interactions with the plant immune system. *Current opinion in microbiology*, 49, 7-17.
- Thapa, S., Prasanna, R. (2018). Prospecting the characteristics and significance of the phyllosphere microbiome. *Annals of microbiology*, 68(5), 229-245.
- Tian, X., Shi, Y., Geng, L., Chu, H., Zhang, J., Song, F., Shu, C. (2017). Template preparation affects 16S rRNA high-throughput sequencing analysis of phyllosphere microbial communities. *Frontiers in plant science*, 8, 1623.



- Tomić, M., Furman, T., Nikolić, R., Savin, L., Simikić, M. (2009). Proizvodnja i korišćenje biodizela na bazi uljane repice. *Savremena poljoprivredna tehnika*, 35(1-2), 58-63.
- TRBA 466. (2010). Classification of prokaryotes (bacteria and archaea) into risk groups: Technical Rule for Biological Agents, GMBI 2010, 68-80, pp. 1428-1667
- Tsuge, K., Inoue, S., Ano, T., Itaya, M., Shoda, M. (2005). Horizontal transfer of iturin A operon, *itu*, to *Bacillus subtilis* 168 and conversion into an iturin A producer. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49(11), 4641-4648.
- Turner, T. R., James, E. K., Poole, P. S. (2013). The plant microbiome. *Genome biology*, 14(6), 1-10.
- Vallad, G. E., Pernezny, K. L., Balogh, B., Wen, A., Figueiredo, J. F. L., Jones, J. B., Roberts, P. D. (2010). Comparison of kasugamycin to traditional bactericides for the management of bacterial spot on tomato. *HortScience*, 45(12), 1834-1840.
- Valverde, A., Hubert, T., Stolov, A., Dagar, A., Kopelowitz, J., Burdman, S. (2007). Assessment of genetic diversity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* isolates from Israel by various DNA fingerprinting techniques. *Plant Pathology*, 56(1), 17-25.
- Vanitha, V., Vijayakumar, S., Nilavukkarasi, M., Punitha, V. N., Vidhya, E., Praseetha, P. K. (2020). Heneicosane – A novel microbicidal bioactive alkane identified from *Plumbago zeylanica* L. *Industrial Crops and Products*, 154, 112748.
- Vauterin, L., Hoste, B., Kersters, K., Swings, J. (1995). Reclassification of *Xanthomonas*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 45(3), 472-489.
- Versalovic, J., Schneider, M., De Bruijn, F. J., Lupski, J. R. (1994). Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in molecular and cellular biology*, 5(1), 25-40.
- 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(5), 492-499.
- 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(10), 1134-1141.
- Vicente, J. G., Holub, 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.
- Vishnivetskaya, T. A., Kathariou, S., Tiedje, J. M. (2009). The *Exiguobacterium* genus: biodiversity and biogeography. *Extremophiles*, 13(3), 541-555.
- Venkatachalam, S., Ranjan, K., Prasanna, R., Ramakrishnan, B., Thapa, S., Kanchan, A. (2016). Diversity and functional traits of culturable microbiome members, including cyanobacteria in the rice phyllosphere. *Plant Biology*, 18(4), 627-637.
- Wan, M., Li, G., Zhang, J., Jiang, D., Huang, H. C. (2008). Effect of volatile substances of *Streptomyces platensis* F-1 on control of plant fungal diseases. *Biological Control*, 46(3), 552-559.
- Wang, J., Guo, R., Wang, W., Ma, G., Li, S. (2018). Insight into the surfactin production of *Bacillus velezensis* B006 through metabolomics analysis. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 45(12), 1033-1044.

- 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.
- Weller, D. M. (1988). Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annual review of phytopathology*, 26(1), 379-407.
- Weller, D. M. (2007). *Pseudomonas* biocontrol agents of soilborne pathogens: looking back over 30 years. *Phytopathology*, 97(2), 250-256.
- Wu, L., Li, X., Ma, L., Borriss, R., Wu, Z., Gao, X. (2018). Acetoin and 2, 3-butanediol from *Bacillus amyloliquefaciens* induce stomatal closure in *Arabidopsis thaliana* and *Nicotiana benthamiana*. *Journal of experimental botany*, 69(22), 5625-5635.
- Wulff, E. G., Mguni, C. M., Mansfeld-Giese, K., Fels, J., Lübeck, M., Hockenhull, J. (2002). Biochemical and molecular characterization of *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. subtilis* and *B. pumilus* isolates with distinct antagonistic potential against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Plant pathology*, 51(5), 574-584.
- Yang, D., Wang, B., Wang, J., Chen, Y., Zhou, M. (2009). Activity and efficacy of *Bacillus subtilis* strain NJ-18 against rice sheath blight and *Sclerotinia* stem rot of rape. *Biological Control*, 51(1), 61-65.
- Yoshida, S., Hiradate, S., Tsukamoto, T., Hatakeda, K., Shirata, A. (2001). Antimicrobial activity of culture filtrate of *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2 isolated from mulberry leaves. *Phytopathology*, 91(2), 181-187.
- Young, J. M., Park, D. C., Shearman, H. M., Fargier, E. (2008). A multilocus sequence analysis of the genus *Xanthomonas*. *Systematic and applied microbiology*, 31(5), 366-377.
- Zaccardelli, M., Campanile, F., Moretti, C., Buonauro, R. (2008). Characterization of Italian populations of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* using primers based on DNA repetitive sequences. *Journal of Plant Pathology*, 90(2), 375-381.
- Zeng, W., Melotto, M., He, S. Y. (2010). Plant stomata: a checkpoint of host immunity and pathogen virulence. *Current opinion in biotechnology*, 21(5), 599-603.
- Zengerer, V., Schmid, M., Bieri, M., Müller, D. C., Remus-Emsermann, M. N., Ahrens, C. H., Pelludat, C. (2018). *Pseudomonas orientalis* F9: a potent antagonist against phytopathogens with phytotoxic effect in the apple flower. *Frontiers in microbiology*, 9, 145.
- Zerriouh, H., de Vicente, A., Pérez-García, A., Romero, D. (2014). Surfactin triggers biofilm formation of *Bacillus subtilis* in melon phylloplane and contributes to the biocontrol activity. *Environmental microbiology*, 16(7), 2196-2211.
- Zheng, X., Koopmann, B., Ulber, B., von Tiedemann, A. (2020). A global survey on diseases and pests in oilseed rape – current challenges and innovative strategies of control. *Frontiers in Agronomy*, 15.
- Zhou, F., Zhang, X. L., Li, J. L., Zhu, F. X. (2014). Dimethachlon resistance in *Sclerotinia sclerotiorum* in China. *Plant Disease*, 98(9), 1221-1226.

## **8. PRILOZI**

## 8. PRILOZI

**Prilog 1.** Spisak linija, sorti i hibrida ozime uljane repice korišćenih za ispitivanje osetljivosti na *X. campestris* pv. *campestris*

Tip ozime uljane repice		
Linija	Sorta	Hibrid
♀ P-1	Anna	NS Pek
♀ P-2	Branka	NS Ras
♀ P-3	Ilija	NS Vid
♀ A3 AMJ-1	Jasna	-
♀ A4 AMJ-2	Jelena	-
♀ A10 AMJ-3	Jovana <sup>a</sup>	-
♀ A15 AMJ-4	Kata	-
♀ AK60	Nevena	-
♂ R1	Slavica	-
♂ R3	Svetlana	-
♂ R.F	Zlatna	-
♂ DB1	Zorica	-
♂ DB1-1	-	-
♂ DB1-2	-	-
♂ DB1-4	-	-
♂ DB1-5	-	-
♂ DB1-6	-	-
♂ DB2	-	-
♂ DB2-1	-	-
♂ DB2-2	-	-
♂ DB2-3	-	-
♂ DB2-4	-	-
♂ DB2-5	-	-
♂ DB2-6	-	-
♂ DB2-7	-	-
♂ DBV1-1	-	-
♂ DBV1-2	-	-
♂ DBV1-3	-	-
♂ DBV1-4	-	-
♂ DBV1-5	-	-
♂ DBV1-6	-	-
♂ DBV1-7	-	-
♂ DBV2-1	-	-
♂ DBV2-2	-	-
♂ DBV2-5	-	-

<sup>a</sup> jara sorta uljane repice

**Prilog 2.** Pristupne šifre referentnih *X. campestris* pv. *campestris* sojeva iz NCBI baze podataka korišćenih za filogenetsku analizu

Šifre izolata	NCBI pristupne šifre						
	<i>rpoD</i>	<i>gyrB</i>	<i>dnaK</i>	<i>fyuA</i>	<i>gluA</i>	<i>lepA</i>	P-X- <i>dnaK</i>
Xc2010	MN872657	MN872646	MN872624	MN872635	MN872602	MN872613	MN876207
NCPBP4678	MH972129	MH972147	MH972111	MH972093	MH972021	MH972075	MN876218
NCPBP4679	MH972130	MH972148	MH972112	MH972094	MH972022	MH972076	MN876219
NCPBP4680	MH972132	MH972150	MH972114	MH972096	MH972024	MH972078	MN876221
NCPBP4682	MH972135	MH972153	MH972117	MH972099	MH972027	MH972081	MN876224
NCPBP528	NC_003902	NC_003902	NC_003902	NC_003902	NC_003902	NC_003902	NC_003902
CN18	NZ_CP017319	NZ_CP017319	NZ_CP017319	NZ_CP017319	NZ_CP017319	NZ_CP017319	NZ_CP017319
3811	NZ_CP025750	NZ_CP025750	NZ_CP025750	NZ_CP025750	NZ_CP025750	NZ_CP025750	NZ_CP025750
ICMP							
21080	CP012145	CP012145	CP012145	CP012145	CP012145	CP012145	CP012145
B100	NC_010688	NC_010688	NC_010688	NC_010688	NC_010688	NC_010688	NC_010688
8004	CP000050	CP000050	CP000050	CP000050	CP000050	CP000050	CP000050

**Prilog 3.** Podaci o *Xanthomonas* spp. sojevima korišćenim za analizu zasnovanu na alelima

Šifra soja	Domaćin	Tip sekvence (ST)	Alelski profil			
			<i>dnaK</i>	<i>fyuA</i>	<i>gyrB</i>	<i>rpoD</i>
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>						
<b>Tip 1</b>						
CFBP 4952	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	ST5	1	3	1	11
CFBP 1119	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	ST5	1	2	1	11
CFBP 1869	<i>B. oleracea</i>	ST5	1	3	1	11
CFBP 5815	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	ST5	1	3	1	11
CFBP 5127	<i>B. oleracea</i>	ST5	1	3	1	11
CFBP 5128	<i>B. oleracea</i>	ST5	1	3	1	11
CFBP 5129	<i>B. oleracea</i>	ST5	1	3	1	11
CFBP 5816	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	ST12	1	4	1	12
CFBP 5818	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	ST12	1	4	1	12
CFBP 1121	<i>B. oleracea</i> convar. <i>bullata</i> var. <i>gemmifera</i>	ST26	9	3	1	11
<b>Tip 3</b>						
NCPBP528 <sup>T</sup>	<i>B. oleracea</i> var. <i>gemmifera</i>	ST25	9	3	1	4
CFBP 5683	<i>B. oleracea</i>	ST27	9	13	1	11
<b>Tip 4</b>						
Xcc 147	<i>B. oleracea</i>	ST1	1	1	1	1
CFBP 4956	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	ST3	1	3	1	4
CPBF 46	<i>B. oleracea</i> convar. <i>acephala</i> var. <i>sabellica</i>	ST6	1	3	1	14
CFBP 5817	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	ST12	1	4	1	12
<b>Tip 5</b>						
CFBP 6865	<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i>	ST9	1	3	3	11
CFBP 1712	<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i>	ST27	9	13	1	11
CFBP 1713	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	ST27	9	13	1	11
<b>Tip 6</b>						
CPBF 213	<i>B. oleracea</i> var. <i>costata</i>	ST2	1	3	1	1
CPBF 1126	<i>B. oleracea</i>	ST2	1	3	1	1
CPBF 279	<i>B. oleracea</i>	ST5	1	3	1	11
CPBF 1135	<i>B. oleracea</i> convar. <i>capitata</i> var. <i>alba</i>	ST5	1	3	1	11
CPBF 278	<i>B. oleracea</i>	ST8	1	3	1	21
CPBF 667	<i>B. oleracea</i>	ST10	1	4	1	4
CPBF 1136	<i>B. oleracea</i> convar. <i>capitata</i> var. <i>alba</i>	ST10	1	4	1	4
CPBF 1175	<i>B. oleracea</i> convar. <i>botrytis</i> var. <i>botrytis</i>	ST12	1	4	1	12
CPBF 1176	<i>B. oleracea</i> convar. <i>botrytis</i> var. <i>botrytis</i>	ST14	1	4	1	31
CFBP 4954	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	ST26	9	3	1	11
CPBF 208	<i>B. oleracea</i> var. <i>costata</i>	ST34	15	18	10	19
CPBF 589	<i>B. oleracea</i> convar. <i>botrytis</i> var. <i>botrytis</i>	ST44	25	3	1	27
<b>Tip 7</b>						
CFBP 4953	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	ST5	1	3	1	11
CFBP 5130	<i>B. oleracea</i>	ST5	1	3	1	11
CPBF 140	<i>B. oleracea</i> var. <i>costata</i>	ST7	1	3	1	16
CPBF 210	<i>B. oleracea</i> convar. <i>botrytis</i> var. <i>botrytis</i>	ST11	1	4	1	11

(nastavljeno)

### Prilog 3.

Šifra soja	Domaćin	Tip sekvence (ST)	Alelski profil			
			<i>dnaK</i>	<i>fyuA</i>	<i>gyrB</i>	<i>rpoD</i>
CPBF 329	<i>B. oleracea</i> var. <i>costata</i>	ST13	1	4	1	22
CPBF 824	<i>B. oleracea</i>	ST16	1	23	1	29
CPBF 211	<i>B. oleracea</i> convar. <i>botrytis</i> var. <i>botrytis</i>	ST36	17	4	1	6
CPBF 212	<i>B. oleracea</i> var. <i>costata</i>	ST37	18	3	12	12
CPBF 216	<i>B. oleracea</i> convar. <i>botrytis</i> var. <i>botrytis</i>	ST38	19	20	1	20
CPBF 332	<i>B. oleracea</i> var. <i>costata</i>	ST40	21	3	1	24
CPBF 668	<i>B. oleracea</i>	ST46	27	22	1	28
<b>Tip 8</b>						
CFBP 5820	<i>B. oleracea</i>	ST3	1	3	1	4
CFBP 1124	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	ST4	1	3	1	9
CFBP 1710	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	ST4	1	3	1	9
CFBP 1711	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	ST4	1	3	1	9
CFBP 6863	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	ST4	1	3	1	9
<b>Tip 9</b>						
CFBP 6650	<i>B. oleracea</i>	ST3	1	3	1	4
CFBP 5814	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	ST18	3	2	6	7
CFBP 4955	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	ST26	9	3	1	11
<b>Tip 10</b>						
CPBF 331	<i>B. oleracea</i> var. <i>costata</i>	ST2	1	3	1	1
CPBF 330	<i>B. oleracea</i> var. <i>costata</i>	ST39	20	3	1	23
CPBF 604	<i>B. oleracea</i> convar. <i>capitata</i> var. <i>sabauda</i>	ST45	26	3	1	1
<b>Tip 11</b>						
CPBF 1198	<i>Brassica kaber</i> var. <i>pinnatifida</i>	ST30	11	3	1	4
CPBF 489	<i>B. oleracea</i> var. <i>costata</i>	ST43	24	4	14	26
<b>Nepatogeni <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i></b>						
CFBP 3838	<i>Iberis</i> sp.	ST15	1	10	1	12
<b><i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>raphani</i></b>						
CFBP 5827	<i>Raphanus sativus</i>	ST17	2	12	1	5
CFBP 5829	<i>R. sativus</i>	ST19	4	7	1	10
CFBP 5828	<i>R. sativus</i>	ST20	5	11	1	6
F756C	<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i>	ST28	10	15	1	13
CPBF 1171	<i>B. oleracea</i> convar. <i>capitata</i> var. <i>sabauda</i>	ST29	10	24	1	30
CPBF 143	<i>B. oleracea</i> convar. <i>capitata</i> var. <i>alba</i>	ST32	13	16	8	17
CPBF 207	<i>B. oleracea</i> convar. <i>botrytis</i> var. <i>botrytis</i>	ST33	14	17	9	18
CPBF 209	<i>B. oleracea</i> var. <i>costata</i>	ST35	16	19	11	9
<b><i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>incanae</i></b>						
CFBP 1371	<i>Matthiola incana</i>	ST23	8	5	2	3
CFBP 5686	<i>M. incana</i>	ST23	8	5	2	3
CFBP 1438	<i>M. incana</i>	ST23	8	5	2	3
CFBP 2527	<i>M. incana</i>	ST23	8	5	2	3
CFBP 1606	<i>M. incana</i>	ST24	8	8	5	2
CPBF 1257	<i>Erysimum</i> sp.	ST31	12	8	15	11
<b><i>Xanthomonas campestris</i></b>						
CFBP 5825	<i>Barbarea vulgaris</i>	ST21	6	6	4	8
CFBP 5826	<i>B. vulgaris</i>	ST21	6	6	4	8
CFBP 5824	<i>Armoracia lapathifolia</i>	ST22	7	9	2	8
CPBF 394	<i>Ranunculus</i> sp.	ST41	22	21	13	25
<b><i>Xanthomonas</i> sp.</b>						
CPBF 47	<i>Rorippa nasturtium-aquaticum</i>	ST42	23	14	7	15

**Prilog 4.** Distribucija očitavanja u testiranim uzorcima filofsere (Ph) i rizofsere (R) biljaka ozime uljane repice sa simptomima (**1** – linija SO 14, **2** – sorta Kata, **3** – sorta Nevena, **4** – hibrid NS Ras) i bez simptoma (**5** – sorta Zorica) infekcije *X. campestris* pv. *campestris*, srednja vrednost (MeanLength) i standardna devijacija (SDLength) dužine očitavanja.

Uzorak	Broj očitavanja	MeanLength	SDLength
Ph1	99684	464,56	5,56
Ph2	83213	462,73	8,52
Ph3	85329	464,22	6,59
Ph4	83824	464,27	6,5
Ph5	46475	460,4	9,92
R1	88100	454,1	13,02
R2	84009	454,65	15,08
R3	78596	454,11	13,49
R4	100649	453,94	13,33
R5	88612	453,88	12,95

**Prilog 5.** Relativna zastupljenost različitih razdela (a) i rodova (b) u uzorcima filofsere (Ph1-Ph5) i rizofsere (R1-R5). Najniža vrednost ■, srednja vrednost ■, najveća vrednost ■.

#### a) Razdeo

Razdeo	Uzorcii filofsere					Uzorcii rizofsere				
	Ph1	Ph2	Ph3	Ph4	Ph5	R1	R2	R3	R4	R5
Proteobacteria	91,25	72,55	65,64	80,67	35,10	28,32	31,47	28,91	29,71	29,44
Firmicutes	7,64	23,64	32,45	17,78	47,31	3,24	1,50	2,82	2,71	2,98
Actinobacteria	0,68	1,30	0,78	0,91	12,44	16,06	12,87	12,79	15,21	15,14
Bacteroidetes	0,20	1,62	0,58	0,11	0,63	16,06	34,14	16,03	18,17	12,84
ud-Bacteria	0,22	0,89	0,51	0,49	3,57	6,39	2,94	6,87	6,23	7,41
Acidobacteria	0,00	0,00	0,00	0,01	0,21	13,43	6,12	12,25	12,13	16,92
Verrucomicrobia	0,00	0,00	0,00	0,00	0,04	5,66	4,28	8,74	4,87	4,35
Planctomycetes	0,00	0,00	0,00	0,01	0,06	3,44	1,32	3,46	2,84	3,00
Candidatus Saccharibacteria	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03	2,27	2,58	1,25	2,10	2,21
Candidate division WPS-1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	2,07	1,17	3,63	2,78	2,52
Chloroflexi	0,00	0,00	0,00	0,01	0,45	1,19	0,56	1,03	0,96	1,02
Gemmatimonadetes	0,00	0,00	0,00	0,00	0,05	1,10	0,60	1,44	1,31	1,20

#### b) Rod

Rod	Uzorcii filofsere					Uzorcii rizofsere				
	Ph1	Ph2	Ph3	Ph4	Ph5	R1	R2	R3	R4	R5
Xanthomonas	74,13	40,12	44,75	60,23	0,31	0,07	0,25	0,05	0,04	0,01
Exiguobacterium	6,57	23,12	31,98	17,04	46,34	0,01	0,13	0,02	0,01	0,01
Massilia	5,17	9,32	6,91	4,53	13,62	0,95	0,87	0,72	1,38	0,77
Pseudomonas	3,13	6,80	7,19	1,37	0,75	0,27	3,21	1,00	0,48	0,41
ud-Enterobacteriaceae	3,06	3,19	2,20	5,08	1,89	0,06	0,92	0,07	0,13	0,04
Buchnera	2,07	2,61	0,16	4,40	5,84	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Pantoea	1,30	1,26	1,24	2,23	4,34	0,01	0,14	0,01	0,01	0,02
ud-Oxalobacteraceae	0,76	1,24	1,01	0,52	1,51	0,47	0,72	0,29	0,45	0,27
ud-Xanthomonadaceae	0,63	0,35	0,36	0,52	0,01	0,91	0,35	0,75	0,71	0,63
Paenibacillus	0,50	0,17	0,20	0,34	0,03	0,35	0,14	0,16	0,19	0,25
Sphingomonas	0,39	5,94	1,19	0,89	2,61	3,09	2,94	3,62	3,48	3,20
Hymenobacter	0,02	1,04	0,25	0,05	0,34	0,04	0,12	0,06	0,06	0,15
ud-Microbacteriaceae	0,47	0,86	0,32	0,43	1,64	0,23	0,85	0,38	0,25	0,29
Serratia	0,01	0,56	0,00	0,21	0,01	0,01	0,02	0,04	0,02	0,03

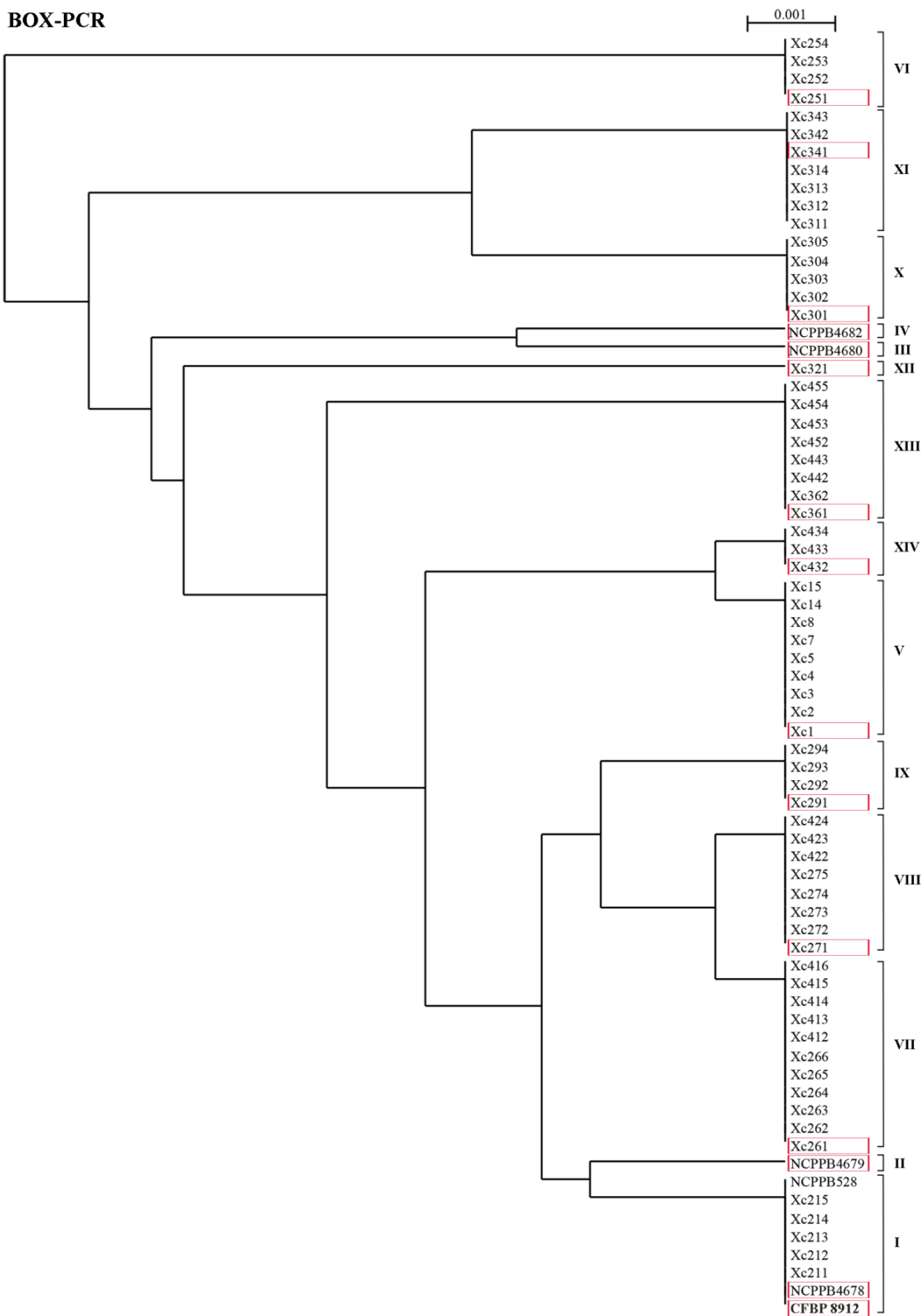
ud-Micrococcaceae	0,01	0,08	0,07	0,04	3,12	0,36	0,46	0,23	0,29	0,34
Arthrobacter	0,07	0,04	0,08	0,12	1,66	2,74	3,42	1,48	1,94	2,06
Kocuria	0,01	0,01	0,02	0,02	1,07	0,00	0,01	0,00	0,00	0,01
Paracoccus	0,00	0,01	0,02	0,01	0,86	0,03	0,06	0,01	0,02	0,08
ud-Intrasporangiaceae	0,00	0,00	0,01	0,01	0,71	0,14	0,14	0,26	0,14	0,11
Acinetobacter	0,02	0,04	0,05	0,02	0,63	0,02	0,11	0,01	0,33	0,03
ud-Actinomycetales	0,00	0,01	0,01	0,01	0,59	0,28	0,22	0,29	0,28	0,24
Nocardioides	0,00	0,00	0,00	0,01	0,51	0,33	0,34	0,46	0,31	0,35
Gp6	0,00	0,00	0,00	0,01	0,04	6,22	2,54	5,38	4,82	7,21
ud-Chitinophagaceae	0,00	0,00	0,00	0,00	0,04	3,65	1,52	3,61	3,22	2,96
Flavobacterium	0,00	0,02	0,14	0,00	0,00	2,59	13,03	2,18	4,69	1,01
Saccharibacteria_genera_incertae_sedis	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03	2,27	2,58	1,25	2,10	2,21
ud-Planctomycetaceae	0,00	0,00	0,00	0,01	0,03	2,26	0,78	2,18	1,83	1,86
Gaiella	0,00	0,00	0,00	0,01	0,06	2,19	0,84	1,11	1,58	1,94
Gp4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,09	1,15	1,72	2,20	3,29
WPS-1_genera_incertae_sedis	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	2,07	1,17	3,63	2,78	2,52
ud-Sphingomonadaceae	0,01	0,15	0,02	0,03	0,26	2,00	2,05	2,34	2,81	2,18
Skermanella	0,00	0,00	0,01	0,00	0,13	1,61	0,92	1,53	1,20	1,02
ud-Betaproteobacteria	0,01	0,02	0,01	0,01	0,01	1,58	0,70	2,18	1,70	2,19
Spartobacteria_genera_incertae_sedis	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	1,55	0,73	2,05	1,27	1,29
Adhaeribacter	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	1,44	1,61	2,40	1,85	0,89
ud-Actinobacteria	0,00	0,00	0,00	0,00	0,11	1,41	0,57	1,19	1,19	1,36
ud-Spartobacteria	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,39	0,32	1,74	0,75	0,61
Bacillus	0,02	0,00	0,01	0,02	0,12	1,31	0,52	1,17	1,16	1,24
ud-Rhizobiales	0,00	0,00	0,00	0,00	0,05	1,29	0,60	1,08	1,11	1,80
Aridibacter	0,00	0,00	0,00	0,00	0,05	1,24	0,69	1,67	1,50	1,88
Ferruginibacter	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,22	0,80	1,13	0,59	0,48
ud-Gammaproteobacteria	0,16	0,07	0,05	0,06	0,20	1,21	0,33	0,89	0,73	2,04
Microvirga	0,00	0,00	0,00	0,00	0,06	1,16	0,42	0,76	0,76	0,62
Pedobacter	0,03	0,16	0,00	0,01	0,02	1,14	7,42	0,64	1,71	0,50
ud-Comamonadaceae	0,02	0,14	0,05	0,01	0,25	1,10	1,76	1,00	1,22	0,85
Gemmatimonas	0,00	0,00	0,00	0,00	0,05	1,10	0,60	1,44	1,31	1,20
ud-Cytophagales	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,09	0,14	0,50	0,38	0,87
ud-Acidobacteria_Gp4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,07	0,33	0,67	0,51	0,98
Ohtaekwangia	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	1,01	0,21	0,73	0,96	1,01
Flavisolibacter	0,00	0,00	0,00	0,00	0,07	1,00	0,64	1,40	1,44	0,75
Luteolibacter	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,93	2,30	2,41	1,20	0,46
ud-Actinobacteria	0,00	0,00	0,00	0,01	0,07	0,89	0,51	0,83	1,01	1,02
Microlunatus	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,89	0,38	0,57	0,84	0,90
Gp3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,83	0,47	0,87	0,98	0,93
ud-Bacillales	0,04	0,12	0,14	0,10	0,31	0,79	0,31	0,62	0,63	0,77
ud-Myxococcales	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,77	0,30	1,17	0,87	1,22
Rubrobacter	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,68	0,19	0,41	0,74	0,74
Gp7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,64	0,40	0,83	0,98	0,90
Ramlibacter	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,59	0,53	0,51	0,51	0,26
Cellvibrio	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,57	0,19	0,18	0,15	0,04
Blastococcus	0,00	0,00	0,00	0,02	0,07	0,56	0,57	0,64	0,84	0,51
ud-Burkholderiales	0,00	0,01	0,00	0,01	0,03	0,56	0,35	0,77	0,70	0,85
Subdivision3_genera_incertae_sedis	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,53	0,19	0,58	0,45	0,72
ud-Sinobacteraceae	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,51	0,15	0,54	0,41	0,62



ud-Proteobacteria	0,06	0,04	0,03	0,04	0,05	0,51	0,15	0,39	0,39	0,48
Chryseobacterium	0,11	0,25	0,02	0,03	0,01	0,06	3,66	0,11	0,16	0,13
Dyadobacter	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,09	2,57	0,08	0,23	0,09
ud-Rhizobiaceae	0,01	0,04	0,01	0,01	0,02	0,16	1,31	0,18	0,37	0,24
Rhodococcus	0,02	0,16	0,07	0,04	0,20	0,27	1,19	0,32	0,15	0,10
Brevundimonas	0,00	0,02	0,00	0,00	0,01	0,12	1,06	0,16	0,34	0,08
Stenotrophomonas	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,14	0,93	0,09	0,26	0,11
Devosia	0,00	0,00	0,00	0,00	0,04	0,20	0,87	0,22	0,31	0,29
Duganella	0,00	0,17	0,06	0,04	0,01	0,02	0,72	0,01	0,07	0,02
Taibaiella	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,07	0,60	0,12	0,07	0,12
ud-Methylophilaceae	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,20	0,57	0,25	0,20	0,20
Rhizobium	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,32	0,57	0,18	0,24	0,34
ud-Bacteroidetes	-	0,00	0,00	0	0,00	0,46	0,23	0,77	0,65	0,83
Nitrosospira	-	-	-	-	-	0,28	0,20	0,76	0,42	0,13
Opiritus	0,00	-	-	-	-	0,42	0,20	0,67	0,45	0,52
ud-Acidimicrobiales	-	0,00	0,00	0,00	0,06	0,45	0,26	0,55	0,53	0,50
ud-Verrucomicrobia	-	-	-	-	-	0,27	0,19	0,51	0,19	0,17
Arenimonas	-	-	-	-	0,01	0,37	0,30	0,50	0,44	0,27
ud-Cytophagales	-	-	-	-	0	1,09	0,14	0,50	0,38	0,87
Lentzea	-	-	-	-	0,00	0,15	0,18	0,07	0,69	0,22
Promicromonospora	-	-	-	-	0	0,04	0,09	0,03	0,29	0,62
Chryseolinea	-	-	0,00	-	-	0,37	0,03	0,29	0,14	0,58
Gp16	0,00	-	-	0,00	0,09	0,49	0,23	0,45	0,47	0,56
Steroidobacter	-	-	-	-	0,00	0,20	0,06	0,24	0,15	0,55

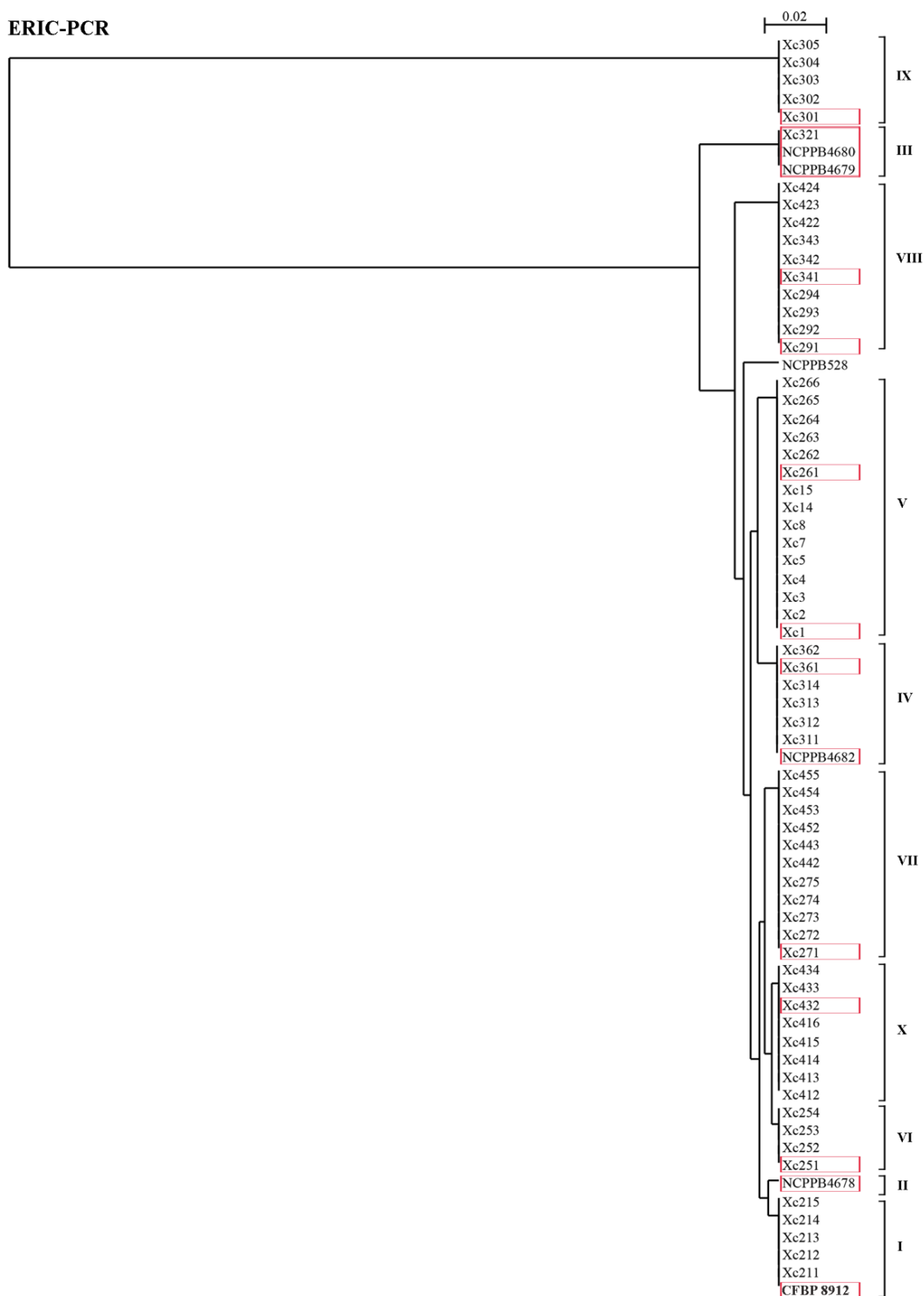
**Prilog 6.** Podaci o vremenskim uslovima (prosečna temperatura i količina padavina) tokom zimske i prolećne faze razvoja ozime uljane repice, koji su prethodili pojavi simptoma prouzrokovanih sa *X. campestris* pv. *campestris*.

Meteorološka stanica	Lokalitet	Godina	Mesec	Prosečna temperatura (°C)	Prosečna količina padavina (mm)
Novi Sad	Kovilj	2014	Septembar	17,2	84,3
			Oktobar	13,3	64,1
		2015	April	11,7	15,9
			Maj	17,8	119,7
Novi Sad	Futog Kovilj Novi Sad Bačka Palanka	2015	Septembar	19,4	52,6
			Oktobar	12,0	74,6
		2016	April	14,2	74,5
			Maj	16,9	85,0
Sombor	Odžaci Nova Crvenka Karavukovo	2015	Septembar	18,5	36,7
			Oktobar	11,4	89,2
		2016	April	13,5	23,0
			Maj	16,4	62,0
Palić	Bačka Topola	2015	Septembar	19,0	35,6
			Oktobar	11,3	84,3
		2016	April	13,4	24,9
			Maj	16,5	60,0
Kikinda	Ada Gornji Breg	2015	Septembar	19,4	57,6
			Oktobar	11,6	70,2
		2016	April	13,9	14,3
			Maj	16,4	80,7
Novi Sad	Rimski Šančevi	2017	Septembar	16,9	81,5
			Oktobar	12,5	38,9
		2018	April	17,2	49,0
			Maj	20,4	63,8

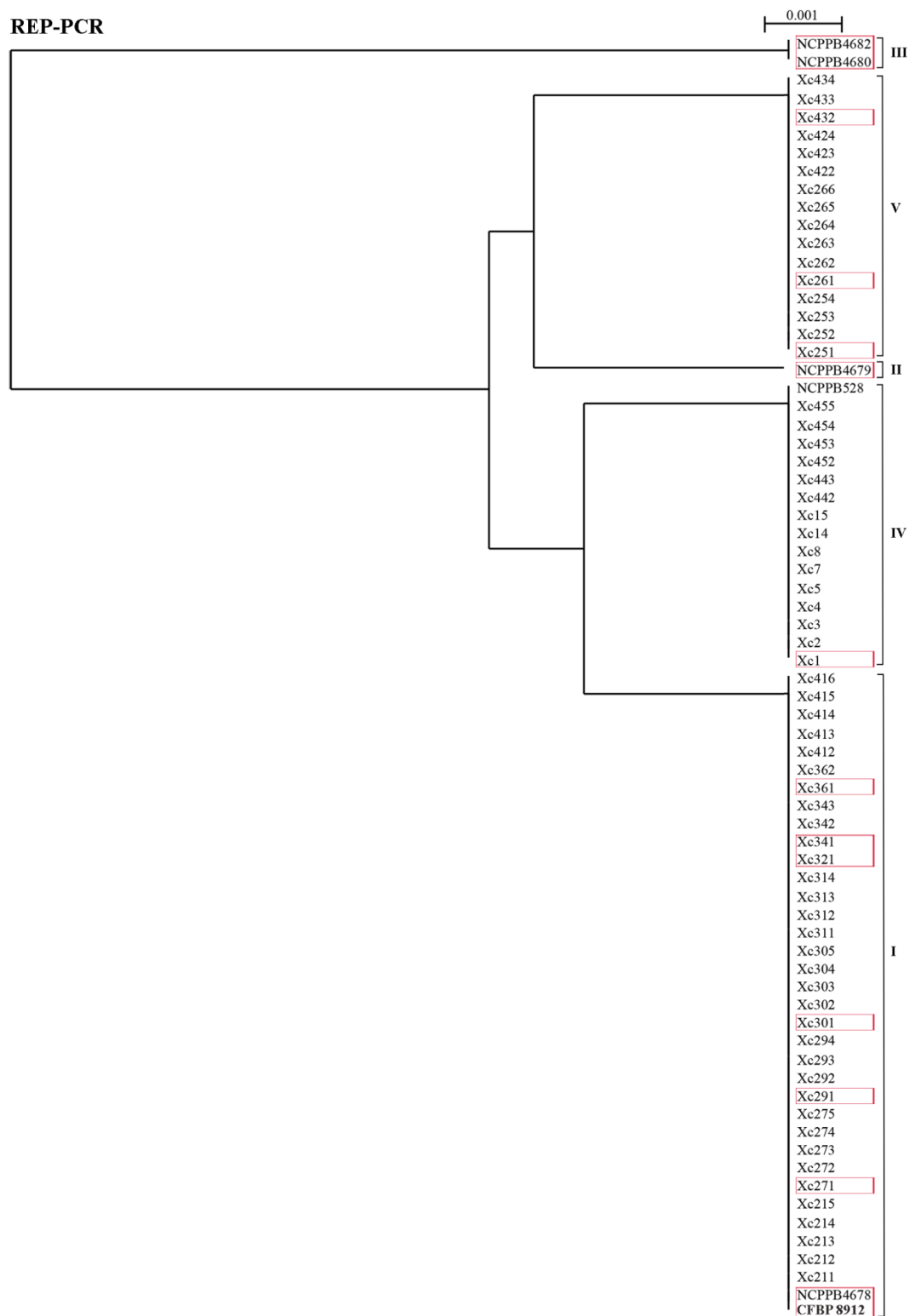


**Prilog 7.** Dendrogrami dobijeni UPGMA analizom 65 *X. campestris* pv. *campestris* izolata sa ozime uljane repice, pet referentnih sojeva sa ozime uljane repice iz Srbije (CFBP 8912, NCPPB4678, NCPPB4679, NCPPB4680 i NCPPB4682) i *X. campestris* pv. *campestris* patotip soja NCPPB528 primenom BOX-PCR prajmera. Deset izolata koji su odabrani kao reprezentativni za dalja istraživanja i pet referentnih sojeva uokvireni su crveno na slici. Svaki klaster dendograma odgovara jednom DNK profilu, a brojevi naznačeni pored klastera, odgovaraju brojevima prikazanim u Tabeli 9 (Jelušić et al., 2021a).

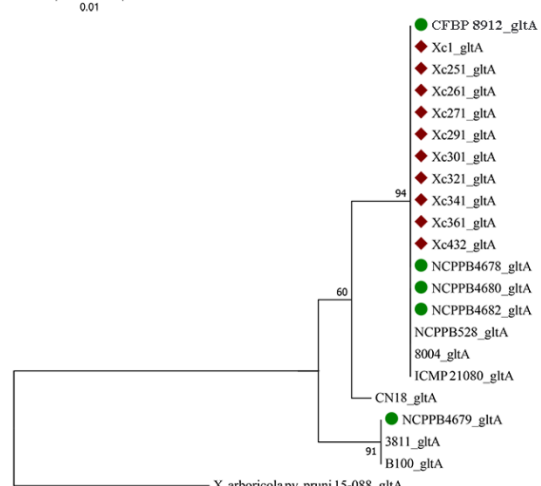
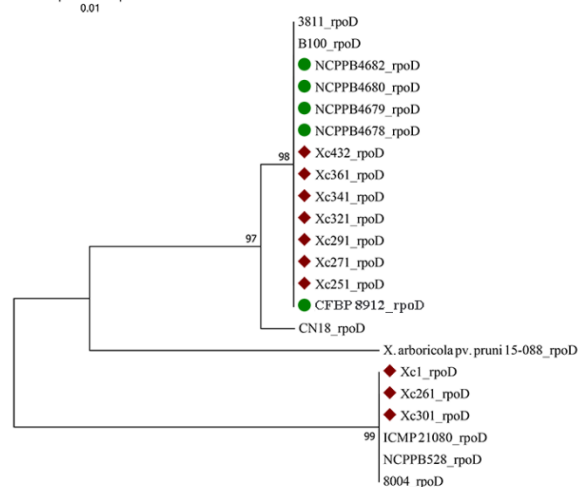
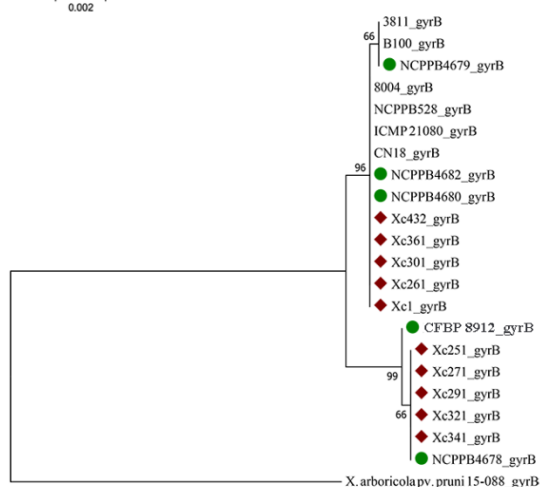
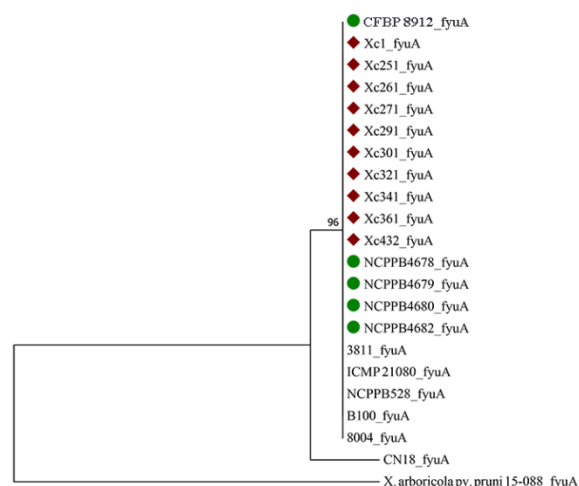
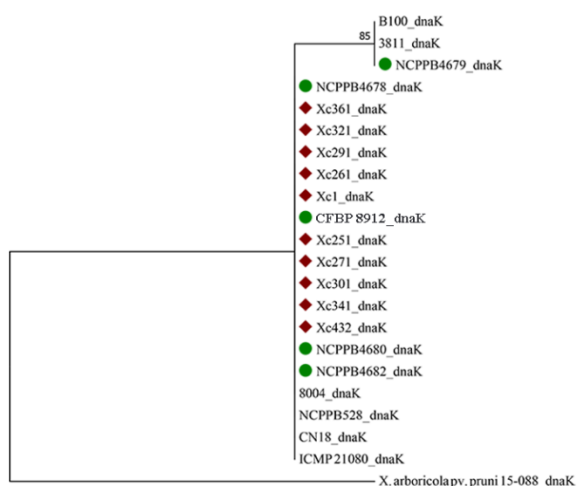
## ERIC-PCR



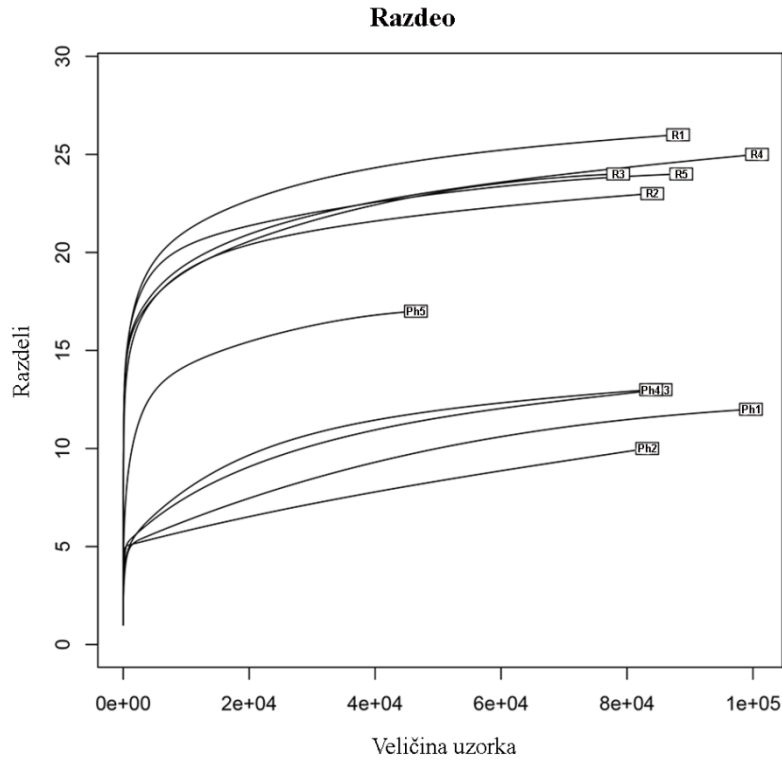
**Prilog 8.** Dendrogrami dobijeni UPGMA analizom 65 *X. campestris* pv. *campestris* izolata sa ozime uljane repice, pet referentnih sojeva sa ozime uljane repice iz Srbije (CFBP 8912, NCPPB4678, NCPPB4679, NCPPB4680 i NCPPB4682) i *X. campestris* pv. *campestris* patotip soja NCPPB528 primenom ERIC-PCR prajmera. Deset izolata koji su odabrani kao reprezentativni za dalja istraživanja i pet referentnih sojeva uokvireni su crveno na slici. Svaki klaster dendograma odgovara jednom DNK profilu, a brojevi naznačeni pored klastera, odgovaraju brojevima prikazanim u Tabeli 9 (Jelušić et al., 2021a).



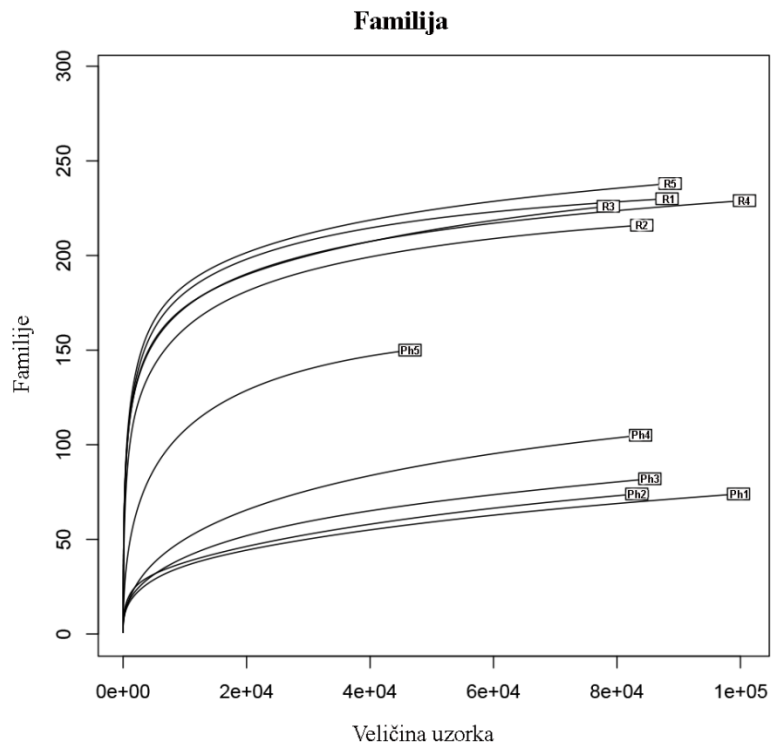
**Prilog 9.** Dendrogrami dobijeni UPGMA analizom 65 *X. campestris* pv. *campestris* izolata sa ozime uljane repice, pet referentnih sojeva sa ozime uljane repice iz Srbije (CFBP 8912, NCPPB4678, NCPPB4679, NCPPB4680 i NCPPB4682) i *X. campestris* pv. *campestris* patotip soja NCPPB528 primenom REP-PCR prajmera. Deset izolata koji su odabrani kao reprezentativni za dalja istraživanja i pet referentnih sojeva uokvireni su crveno na slici. Svaki klaster dendograma odgovara jednom DNK profilu, a brojevi naznačeni pored klastera, odgovaraju brojevima prikazanim u Tabeli 9 (Jelušić et al., 2021a).



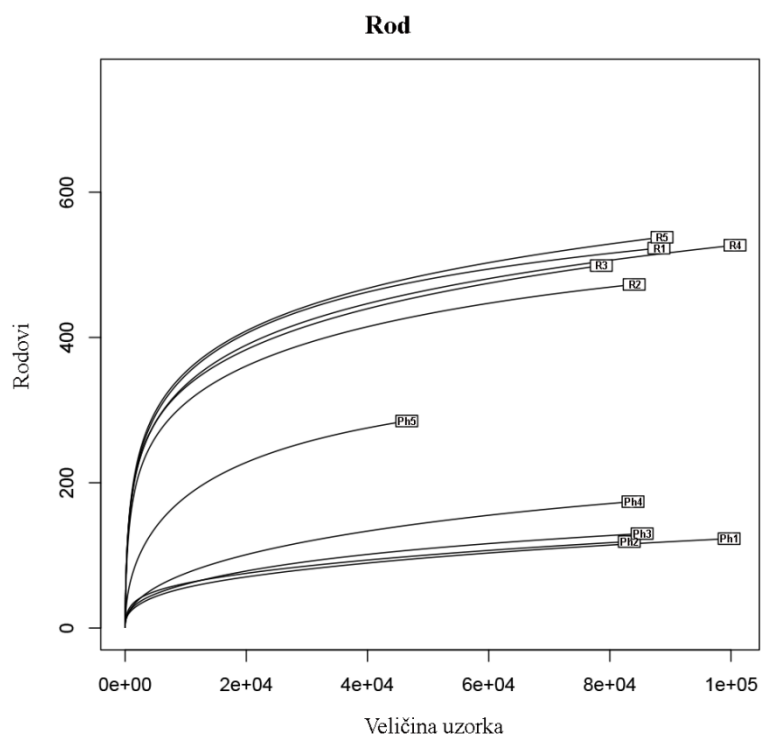
**Prilog 10.** „Neighbour-joining” filogenetska stabla konstruisana na osnovu parcijalnih sekvenci šest konzerviranih gena (*dnaK*, *fyuA*, *gyrB*, *rpoD*, *gltA* i *lepA*) za 15 *X. campestris* pv. *campestris* izolata sa ozime uljane repice [10 reprezentativnih ◆ i pet referentnih ●], patotip soj NCPPB528 i pet *X. campestris* pv. *campestris* sojeva iz NCBI baze podataka. Stablo je ukorenjeno sa *X. arboricola* pv. *pruni* sojem 15-088, koji je korišćen kao autgrupa (Jelušić et al., 2021a).



**Prilog 11.** Rarefakciona analiza ukupnog diverziteta u uzorcima filosofere (Ph) i rizosfere (R) ozime uljane repice sa ispoljenim simptomima bolesti (1 – linija SO 14, 2 – sorta Kata, 3 – sorta Nevena, 4 – hibrid NS-Ras) i bez simptoma bolesti (5 – sorta Zorica) na nivou razdela. X-osa predstavlja broj sekvenci, a y-osa broj taksona (Jelušić et al., 2021b).

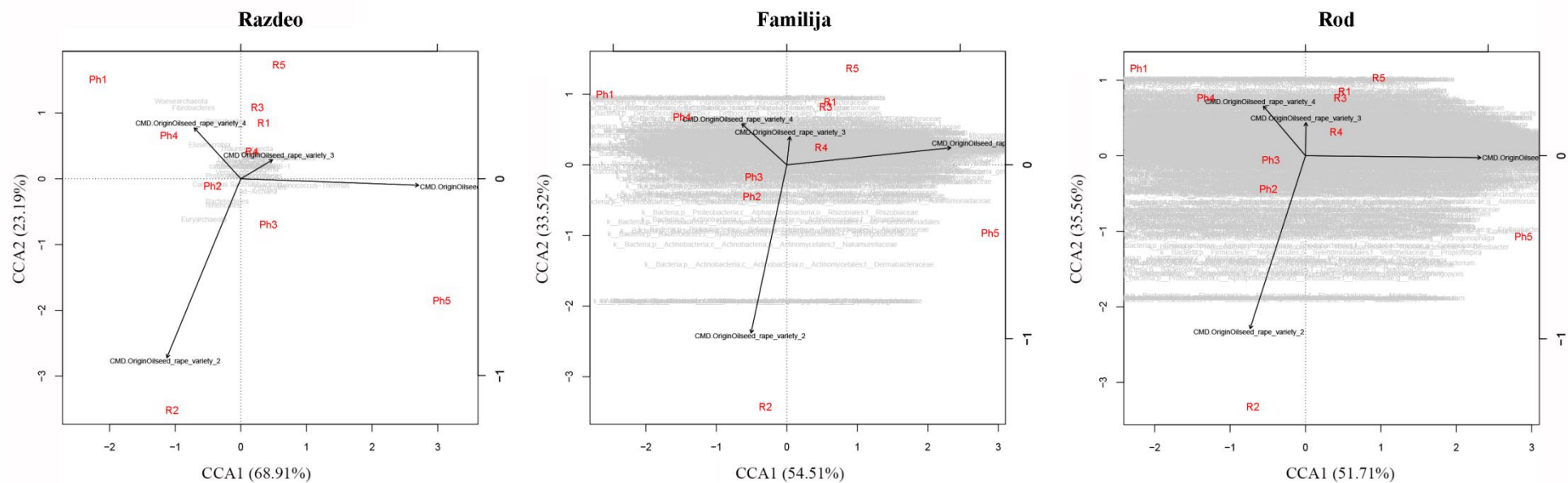


**Prilog 12.** Rarefakciona analiza ukupnog diverziteta u uzorcima filosofere (Ph) i rizosfere (R) ozime uljane repice sa (1 – linija SO 14, 2 – sorta Kata, 3 – sorta Nevena, 4 – hibrid NS Ras) i bez (5 – sorta Zorica) ispoljenih simptoma infekcije *X. campestris* pv. *campestris* na nivou familije. X-osa predstavlja broj sekvenci, a y-osa broj taksona (Jelušić et al., 2021b).



**Prilog 13.** Rarefakciona analiza ukupnog diverziteta u uzorcima filosofere (Ph) i rizosfere (R) ozime uljane repice sa ispoljenim simptomima bolesti (1 – linija SO 14, 2 – sorta Kata, 3 – sorta Nevena, 4 – hibrid NS Ras) i bez simptomima bolesti (5 – sorta Zorica) na nivou roda. X-osa predstavlja broj sekvenci, a y-osa broj taksona (Jelušić et al., 2021b).





**Prilog 14.** Kanonska analiza korespondencije (CCA) podataka o testiranim uzorcima filozofere (Ph) i rizosfere (R) biljaka ozime uljane repice sa ispoljenim simptomima bolesti (1 – linija SO 14; 2 – sorta Kata; 3 – sorta Nevena; 4 – hibrid NS Ras) i bez simptoma bolesti (5 – sorta Zorica) na nivou razdela, familije i roda (Jelušić et al., 2021b).

**Prilog 15.** Liste isparljivih organskih jedinjenja koja su imala najveće vrednosti površine pika u etil-acetatnim (*B. velezensis* X5-2, *B. megaterium* X6-3 i *P. orientalis* X2-1P) i benzenovim (*P. orientalis* X2-1P) ekstraktima, njihova retencionna vremena, molekulske mase i molekulske formule predstavljene u ukupnim koncentracijama (a), i nakon izlaganja 40 °C (b) i 60 °C (c)

**a) Ukupne koncentracije**

Retenciono vreme	Naziv jedinjenja	Molekulska formula	Molekulska masa
<b>Alkani</b>			
21,01	tetradekan	C <sub>14</sub> H <sub>30</sub>	198,4
25,76	heksadekan	C <sub>16</sub> H <sub>34</sub>	226,4
<b>Alkeni</b>			
15,48	1-dodecen	C <sub>12</sub> H <sub>24</sub>	168,3
20,81	1-tetradecen	C <sub>14</sub> H <sub>28</sub>	196,4
25,61	1-heksadecen	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub>	224,4
29,92	1-oktadecen	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub>	252,5
33,86	1-eikosen	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub>	280,5
37,45	1-dokosen	C <sub>22</sub> H <sub>44</sub>	308,6
<b>Karboksilne kiseline</b>			
10.83	borna kiselina	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	61,8
34.89	heksadekanoična kiselina	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	256,4
38.35	oktadekanoična kiselina	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	284,5
<b>Pirazini</b>			
28,22	2-acetil-3-metil-6,7,8,8a-tetrahidro-3H-pirol[1,2-a]pirazin-1,4-dion	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	210,2
30,57	(3S,8aS)-3-izopropilheksahidropirol[1,2-a]pirazin-1,4-dion	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	196,3
32.87	2,8-dietoksi-1,7-diazatriciklo[7.3.0.0 <sup>3,7</sup> ]dodeka-2,8-dien	C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	250,3
32,96	3-propan-2-il-2,3,6,7,8,8a-heksahidropirol[1,2-a]pirazin-1,4-dion	C <sub>11</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	210,3
40,54	3-benzil-2,3,6,7,8,8a-heksahidropirol[1,2-a]pirazin-1,4-dion	C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	244,3
<b>Indoli</b>			
33,56	1-metil-9H-pirido[3,4-b]indol	C <sub>24</sub> H <sub>20</sub> N <sub>4</sub>	364,4
<b>Estri</b>			
40,86	2-etilheksil heksadekanoat	C <sub>24</sub> H <sub>48</sub> O <sub>2</sub>	368,6

## b) 40 °C

Retenciono vreme	Naziv jedinjenja	Molekulska formula	Molekulska masa
<b>Alkani</b>			
10,41	dodekan	C <sub>12</sub> H <sub>26</sub>	170,3
11,18	dimetilundekan	C <sub>13</sub> H <sub>28</sub>	184,4
12,23	tetradekan	C <sub>14</sub> H <sub>30</sub>	198,4
13,85	heksadekan	C <sub>16</sub> H <sub>34</sub>	224,4
17,25	heneikosan	C <sub>21</sub> H <sub>44</sub>	296,6
<b>Alkeni</b>			
10,34	1-dodecen	C <sub>12</sub> H <sub>24</sub>	168,3
12,17	1-tetradecen	C <sub>14</sub> H <sub>28</sub>	196,4
13,8	1-heksadecen	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub>	224,4
15,26	1-oktadecen	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub>	252,5
16,6	1-eikosen	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub>	280,5
<b>Karboksilne kiseline</b>			
3,32	sičetna kiselina	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	60,1
5,4	2-metilpropanoična kiselina	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	88,1
6,4	3-metilbutanoična kiselina	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	102,1
6,9	2- metilbutanoična kiselina	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	102,1
<b>Alkoholi</b>			
5,55	2,3-butanediol	C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	90,1
8,42	2-(2-etoksietoksi)etanol	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>	134,2
10,33	2-(2-butoksietoksi)etanol	C <sub>17</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	336,4
<b>Acetati</b>			
7,22	1-acetiloksietil acetat	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	146,1
<b>Etri</b>			
2,32	metoksimetan	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O	46,1

## c) 60 °C

Retenciono vreme	Naziv jedinjenja	Molekulska formula	Molekulska masa
<b>Alkani</b>			
10,41	dodekan	C <sub>12</sub> H <sub>26</sub>	170,3
11,18	dimetilundekan	C <sub>13</sub> H <sub>28</sub>	184,4
12,23	tetradekan	C <sub>14</sub> H <sub>30</sub>	198,4
12,67	etildimetildekan	C <sub>14</sub> H <sub>30</sub>	198,4
13,05	pentadekan	C <sub>15</sub> H <sub>32</sub>	212,4
13,41	dimetiltetradekan	C <sub>16</sub> H <sub>34</sub>	226,4
13,85	heksadekan	C <sub>16</sub> H <sub>34</sub>	224,4
14,6	metilheksadekan	C <sub>17</sub> H <sub>36</sub>	240,5
14,7	dimetilpentadekan	C <sub>17</sub> H <sub>36</sub>	240,5
15,31	oktadekan	C <sub>18</sub> H <sub>38</sub>	254,5
17,25	heneikosan	C <sub>21</sub> H <sub>44</sub>	296,6
<b>Alkeni</b>			
10,34	1-dodecen	C <sub>12</sub> H <sub>24</sub>	168,3
12,17	1-tetradecen	C <sub>14</sub> H <sub>28</sub>	196,4
13,8	1-heksadecen	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub>	224,4
15,26	1-oktadecen	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub>	252,5
16,6	1-eikosen	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub>	280,5
<b>Karboksilne kiseline</b>			
3,32	sirćetna kiselina	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	60,1
5,4	2-metilpropanoična kiselina	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	88,1
6,4	3-metilbutanoična kiselina	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	102,1
6,9	2-metilbutanoična kiselina	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	102,1
7,46	2-metilbut-2-enoična kiselina	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	100,1
<b>Alkoholi</b>			
5,55	2,3-butanediol	C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	90,1
8,42	2-(2-etoksietoksi)etanol	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>	134,2
8,75	fenilmetanol	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> O	108,1
9,63	2-feniletanol	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O	122,2
10,33	2-(2-butoksietoksi)etanol	C <sub>17</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	336,4
<b>Acetati</b>			
6,9	sirćetna kiselina; 1,1-etanediol	C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	122,1
7,22	1-acetiloksietil acetat	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	146,1
<b>Etri</b>			
2,32	metoksimetan	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O	46,1
13	1-oktadekanol	C <sub>18</sub> H <sub>38</sub> O	270,5
<b>Benzeni</b>			
13,21	2,3-dibutilfenol	C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> O	206,3

## BIOGRAFIJA

Aleksandra D. Jelušić rođena je 03.11.1992. godine u Bijeljini (Republika Srpska, BiH). Osnovne akademske studije na Biološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, upisala je 2011. godine na studijskom programu Biologija. Master akademske studije je završila 2016. godine na matičnom fakultetu, na modulu Biologija mikroorganizama. Školske 2016/17 upisala je doktorske akademske studije na Biološkom fakultetu u Beogradu, na modulu Mikrobiologija. Od jula 2018. godine, zaposlena je kao istraživač-pripravnik na Univerzitetu u Beogradu, Institutu za multidisciplinarna istraživanja na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije III43010 pod nazivom „Modifikacije antioksidativnog metabolizma biljaka sa ciljem povećanja tolerancije na abiotski stres i identifikacija novih biomarkera sa primenom u remedijaciji i monitoringu degradiranih staništa“. U septembru 2020. godine izabrana je u zvanje istraživač-saradnik. U periodu od 2019-2021. godine bila je angažovana na projektu finansiranom od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije i Nemačke službe za akademsku razmenu pod nazivom „Genotipovi ječma sa različitom tolerancijom na biotski i abiotski stres: Da li redoks signali iz hloroplasta učestvuju u trade-off strategiji?“ i projektu Programa saradnje srpske nauke sa dijasporom (vaučeri za razmenu znanja) Fonda za nauku Republike Srbije pod nazivom „New approaches for biocontrol of the novel group of plant tumorigenic agrobacteria discovered in Serbia and Germany“. Član je Udruženja mikrobiologa Srbije i Društva za zaštitu bilja Srbije.

Do sada je objavila 15 radova u međunarodnim naučnim časopisima i 4 rada u časopisima od nacionalnog značaja. Na domaćim i inostranim naučnim skupovima učestvovala je sa 22 saopštenja.

## Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Александра Д. Јелушић

Број индекса Б3017/2016

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Карактеризација и биолошка контрола *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* са озиме уљане репице (*Brassica napus* L.)

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

Потпис аутора

У Београду, \_\_\_\_\_

Александар Јелушић

**Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског  
рада**

Име и презиме аутора Александра Д. Јелушић

Број индекса Б3017/2016

Студијски програм Биологија

Наслов рада Карактеризација и биолошка контрола *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*  
са озиме уљане репице (*Brassica napus* L.)

Ментор др Татјана Поповић и проф. др Тања Берић

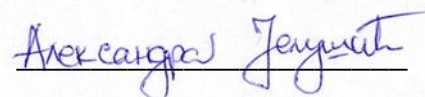
Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

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

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

**Потпис аутора**

У Београду, \_\_\_\_\_



Alexandar Jelusic

### Изјава о коришћењу

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

Карактеризација и биолошка контрола *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* са озиме уљане репице (*Brassica napus* L.)

која је моје ауторско дело.

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

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (CreativeCommons) за коју сам се одлучио/ла.

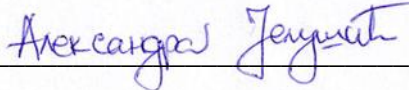
1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.

Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

**Потпис аутора**

У Београду, \_\_\_\_\_



Alexandar Janković



1. **Ауторство.** Дозвољава те умножава ње, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољава те умножава ње, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољава те умножава ње, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољава те умножава ње, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољава те умножава ње, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољава те умножава ње, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.