

Факултет Пољопривредни

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ

33/4-5.1.

(Број захтева)

31.01.2018.

(Датум)

Веће научних области
биотехничких наука

(Назив већа научне области коме се захтев
упућује)

ЗАХТЕВ

за давање сагласности на одлуку о прихватању теме докторске дисертације и о одређивању ментора

Молимо да, сходно члану 47. ст. 5. тач. 3. Статута Универзитета у Београду ("Гласник Универзитета", број 186/15-пречишћени текст и 189/16), дате сагласност на одлуку о прихватању теме докторске дисертације:

„Бактерије као паразити коштичавих воћака и бадема на подручју Црне Горе“.
(пун назив предложене теме докторске дисертације)

НАУЧНА ОБЛАСТ Фитомедицина

ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ:

Име, име једног од родитеља и презиме кандидата:

1.

Тамара, Ђоко, Поповић

2. Претходно образовање (назив и седиште факултета,
студијски програм):

Пољопривредни факултет, Група Фитопатологија
(магистарске студије)

Универзитет у Новом
Саду -

3. Година завршетка

претходног нивоа студија: 2005/2006.

4. Година уписа на докторске студије: 2016/2017.

5. Назив студијског програма
докторских студија:

Пољопривредне науке, модул Фитомедицина

ПОДАЦИ О МЕНТОРУ:

Име и презиме ментора: Алекса Обрадовић

Звање: редовни професор

Списак радова који квалификују ментора за вођење докторске дисертације:

1. Kuzmanović, N., Biondi, E., Ivanović, M., Prokić, A., Zlatković, N., Bertaccini, A., **Obradović, A.** (2016): Evaluation of different PCR primers for identification of tumorigenic bacteria associated with grapevine crown gall. *Journal of Plant Pathology* 98, 311-319.
2. Kuzmanović, N., Pulawska, J., Prokić, A., Ivanović, M., Zlatković, N., Jones, J. B., **Obradović, A.** (2015): *Agrobacterium arsenijevicii* sp. nov., isolated from crown gall tumors on raspberry and cherry plum. *Systematic and Applied Microbiology*, 38:373–378.
3. Kuzmanović, N., Ivanović, M., Prokić, A., Gašić, K., Blagojević, N., Pulawska, J., **Obradović, A.** (2013): Identification and characterization of *Agrobacterium* spp. isolated from apricot in Serbia. *European Journal of Plant Pathology*, 137:11–16.
4. Ivanović, M., **Obradović, A.**, Gašić, K., Minsavage, G. V. Dickstein, E. R. Jones, J. B. (2012): Exploring diversity of *Erwinia amylovora* population in Serbia by conventional and automated techniques and detection of new PFGE patterns. *European Journal of Plant Pathology*, 133: 545–557.
5. Janse, J.D., **Obradovic, A.** (2010): *Xylella fastidiosa*: its biology, diagnosis, control and risks. *Journal of Plant Pathology*, 92(1, Supplement), S1.35–S1.48

Обавештавамо вас да је Наставно-научно веће Пољопривредног факултета

на седници одржаној 31.01.2018. размотрило предложену тему и закључило да је тема подобна за израду докторске дисертације јер садржи оригиналну идеју и да је од значаја за развој науке, примену њених резултата, односно развој научне мисли уопште.

ДЕКАН ФАКУЛТЕТА

Проф. др Милица Петровић

- Прилог
1. Одлука Наставно-научног већа о прихватању теме и одређивању ментора
 2. Извештај Комисије

Универзитет у Београду
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ
Број: 33/4-5.1.
Датум: 31.01.2018. године
БЕОГРАД-ЗЕМУН

На основу члана 51. Правилника о правилима докторских академских студија члана 44. Статута Пољопривредног факултета, Наставно-научно веће факултета на седници одржаној 31.01.2018. године, донело је

О Д Л У К У

I ПРИХВАТА СЕ извештај о позитивној оцени научне заснованости теме докторске дисертације коју је поднела **мр ТАМАРА ПОПОВИЋ** и одобрава израда дисертације под насловом: **«БАКТЕРИЈЕ КАО ПАРАЗИТИ КОШТИЧАВИХ ВОЋАКА И БАДЕМА НА ПОДРУЧЈУ ЦРНЕ ГОРЕ».**

II За ментора се именује др Алекса Обрадовић, редовни професор.

III На одлуку о прихватању теме докторске дисертације и одређивању ментора сагласност даје одговарајуће Веће научних области Универзитета у Београду.

**П Р Е Д С Е Д Н И К
НАСТАВНО-НАУЧНОГ ВЕЋА
Д Е К А Н**

(Проф. др Милица Петровић)

Доставити: кандидату, ментору, Институту за фитомедицину, Студентској служби и архиви.

Универзитет у Београду
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ
Број:
Дана 22.12.2017. године
Београд – Земун

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ ФАКУЛТЕТА

Предмет: *Извештај Комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата мр Тамаре Поповић*

На основу члана 44. Став 1. Правилника о правилима докторских студија Пољопривредног факултета, а на предлог одговарајућег већа катедре и мишљење одговарајућег наставно-научног већа института, Наставно-научно веће факултета на седници одржаној 29.11.2017. године донело је одлуку бр. 33/2-3.3. да се образује Комисија за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата Тамаре Поповић под насловом „Бактерије као паразити коштичавих воћака и бадема на подручју Црне Горе“.

Кандидат је дана 08.12.2017. године јавно одбранила пријављену тему докторске дисертације пред комисијом у саставу: др Алекса Обрадовић, редовни професор Пољопривредног факултета Универзитета у Београду, др Горан Делибашић, редовни професор Пољопривредног факултета Универзитета у Београду -председник Комисије (Одлука број 22/917 од 08.12. 2017. године) и др Јелка Тиодоровић, ванредни професор Биотехничког факултета Универзитета Црне Горе. У име Комисије, председник подноси следећи:

ИЗВЕШТАЈ

1. Основни подаци о кандидату и дисертацији

1.1 Биографија кандидата

Мр Тамара Поповић рођена је 15. децембра 1975. године у Никшићу. Средњу школу Гимназију „Слободан Шкерковић“, природно-математички смер завршила је 1994. године у Подгорици. Школске 1994/1995. године уписала је Пољопривредни факултет, Универзитета у Новом Саду, одсек за заштиту биља. Дипломирала је 2000. године, одбраном дипломског рада „Проучавање биохемијско-физиолошких и патогених одлика *Erwinia carotovora*“. Последипломске студије уписала је школске 2001/2002. године на групи Фитопатологија, на Пољопривредном факултету у Новом Саду. Испите на последипломским студијама положила је просечном оценом 9.50. Магистарски рад под називом “Бактеријска популација на семену паприке и разрада метода за идентификацију *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*” одбранила је 2006. године на Пољопривредном факултету у Новом Саду. Завршене последипломске студије у предвиђеном року, са високом просечном оценом, као и успешно реализован и одбрањен магистарски рад, указују на осећај одговорности и посвећености, као и склоност кандидата ка научно-истраживачком раду. Међутим, након завршетка последипломских студија и одбране магистарског рада, мр Тамара Поповић је ангажована на пословима изван области научно-истраживачког рада, те стога није била у могућности да оствари очекивану продукцију научних радова.

Од 2009. године мр Тамара Поповић запослена је у Министарству пољопривреде и руралног развоја Црне Горе, Управи за безбједност хране, ветерину и фитосанитарне послове као начелник Одсека за здравствену заштиту биља. Активно је учествовала на бројним обукама (Better Training for Safer Food - BTSF и Technical Assistance and Information Exchange (TAIEX)) и међународним пројектима (IPA 2010 – Јачање капацитета Фитосанитарне управе; IPA 2012 – Јачање сектора безбједности хране, ветерине и фитосанитарног сектора Црне Горе). Активан је учесник у процесу преговора о приступању Црне Горе Европској унији, као члан радних група Поглавље 12 - Безбједност хране, ветеринарска и фитосанитарна политика и Поглавље 29 - Царинска унија. Као начелник Одсека за здравствену заштиту биља све време је била у току и пратила појаву и интензитет болести биљака у Црној Гори као и ризик од уноса и ширења карантинских патогена. Актуелност проблематике поново је потакла жељу за истраживачким радом и проучавањем популације патогених бактерија на коштичавим воћкама и бадему.

Школске 2016/17. године уписала је докторске студијене Пољопривредном факултету Универзитета у Београду, студијски програм Фитомедицина, ужа област истраживања: Фитопатологија. На основу положених испита прописаних наставним планом и програмом наведеног студијског програма, остварила је 112 ЕСПБ бодова.

Говори енглески језик. Члан је Друштва за заштиту биља Србије.

1.2 Предлог теме докторске дисертације

Комисија сматра да предложени наслов „**Бактерије као паразити коштичавих воћака и бадема на подручју Црне Горе**“ одговара предложеном програму истраживања које кандидат планира да оствари током израде дисертације. Наслов је адекватно формулисан, јасно одражава циљ и предмет истраживања.

2. Предмет и циљ дисертације

2.1 Предмет и програм истраживања

Предмет истраживања у оквиру ове дисертације биће бактерије као паразити коштичавих воћака и бадема на подручју Црне Горе. Производни засади коштичавих воћака - *Prunus* spp. (кајсија, бресква, нектарина, трешња, вишња, шљива) и бадема (*Prunus dulcis*) су међу економски најважнијим засадима широм света и узгајају се у различитом обиму на свим континентима.

Последњих година, захваљујући мерама подршке Министарства пољопривреде Црне Горе за подизање нових и модернизацију и опремање постојећих производних воћних засада, воћарска производња у Црној Гори добија све већи значај.

Рентабилност производње коштичавих воћака угрожавају патогене гљиве, бактерије, фитоплазме и вируси. По значају, раширености, али и немогућности успешне контроле, издвајају се обољења бактериозне и фитоплазмозне природе (Обрадовић и сар., 2010).

Као значајни патогени коштичавих воћака до сада су описане четири врсте бактерија: *Pseudomonas syringae* са својим патогеним варијететима: *pv. syringae* – проузроковач рак-рана и бактериозног изумирања воћака, *pv. morsprunorum* – проузроковач рак-рана и изумирања грана коштичавих воћака, *pv. persicae* –

проузроковач бактериозног изумирања брескве, нектарине и јапанске шљиве, *pv. avii*–проузроковач бактериозног рака трешње; *Agrobacterium tumefaciens* – проузроковач бактериозног рака корена; *Xanthomonas arboricola pv. pruni*–проузроковач бактериозне пегавости коштичавих воћака и *Xylella fastidiosa* – проузроковачлажне патуљавости брескве и палежи лишћа бадема, шљиве и трешње.

Pseudomonas syringae као патоген воћака је веома распрострањен и сматра се економски штетном бактеријом у читавом свету. Од коштичавих воћака нарочито угрожава трешњу, кајсију и вишњу (Kennelly et al., 2007; Kaluzna et al., 2010). Спектар домаћина патогеног варијетета *morsprunorum* ограничен је на коштичаве воћке, најчешће шљиву, вишњу и трешњу, док *pv. syringae* може паразитирати и јабучасте воћке, као и читав низ других дрвенастих и зељастих биљака (Арсенијевић, 1997).

Проблематика бактериозног рака и изумирања коштичавих воћака проучавана је последњих 50 година у Србији, што је од изузетног значаја и за Црну Гору, због интензивног увоза и заснивања воћњака садним материјалом пореклом из Србије (Арсенијевић, 1997; Гавриловић и сар., 2005; Гавриловић, 2006; Обрадовић и сар., 2008).

P. syringae као патоген коштичавих воћака је мало и недовољно проучен у Црној Гори. У оквиру плантажног засада вишње Агрокомбината „13 јул“ на Ђемовском пољу 1984. године је више од 200 ha под засадом морало бити искрчено. Брзо ширење болести објашњава се високом заступљеношћу осетљивог сортимента (око 60%), као и повољним временским условима за развој бактериоза. На основу патогености, морфолошко-одгајивачких и биохемијско-физиолошких одлика, закључено је да проучавани сојеви припадају бактерији *Pseudomonas syringae* и испољавају највише сличности са *P. s. pv. syringae* и *P. s. pv. morsprunorum* (Вучинић и сар., 1992).

Pseudomonas syringae pv. persicae проузрокује бактериозни рак брескве. Ова бактерија је први пут изолована из брескве у Француској (EPPO Standards PM 7/43 (1)). Касније, утврђена је на брескви, нектарини и јапанској шљиви у Новом Зеланду (Young, 1988) и на џанарици у Енглеској (Young et al., 1996). Такође, присутна је и у Хрватској, где се налази на А2 карантинској листи. Овај патоген може довести до брзог изумирања воћака и забележене су озбиљне штете у регионима гајења брескве и нектарине у Француској и Новом Зеланду. У Црној Гори није потврђено присуство ове бактерије па се налази на Листи карантински штетних организама – Листа ПА.

P. syringae pv. avii описан је као патоген дивље трешње у Француској (Menard, 2003). Симптоми обољења које проузрокује слични су бактериозном изумирању. На оболелим биљкама уочавају се рак-ране, истицање смоле и некроза ксилема. Овај патоген у Црној Гори није регулисан штетни организам, тј. не налази се на листама карантински штетних организама.

Xanthomonas arboricola pv. pruni (Vauterinet et al., 1995), спада у економски веома значајне фитопатогене бактерије утврђене на свим континентима где се гаји коштичаво воће (EPPO Standards PM 7/64 (1)). Локално је присутна у неколико земаља чланица ЕУ: Белгија, Бугарска, Француска, Немачка, Италија, Румунија, Холандија, Словенија и Шпанија. Инфицира само *Prunus* врсте. Најчешћи домаћини су бресква, нектарина, јапанска шљива, кајсија и бадем (Ritchie, 1995). Локално ширење патогена дешава се калемљењем, резидбом и векторима као што су гриње и инсекти (Lamichhane, 2014), и зависи од росе, кише и ветра. Ширење патогена на даљину условљено је међународном трговином, преко латентно зараженог садног материјала и плодова.

Присуство *Xanthomonas arboricola pv. pruni* утврђено је на бадему у Црној Гори на подручју Подгорице. Током 1994. године на делу плантажног засада бадема (*Prunus amygdalus* Stokes), ПД „Плантаже“ у саставу Агрокомбината „13 јул“ у

Подгорици (објекат „Миљеш”, Тузи, величине 1.6ha), запажена је појава пегавости и шупљикавости лишћа и рак-рана као и сушење гранчица и грана бадема. Због интензивног ширења ове, до тада непознате, болести бадема и сушења воћних стабала уз престанак плодоношења, искрчено је 32.9 ha плантажног засада (објекат „Дубраве“, Тузи). У близини овог засада искрчено је око 20 ha јапанске шљиве, на којој су се појавили слични симптоми као и на бадему. Проучавањем патогених, морфолошких, одгајивачких и биохемијско-физиолошких одлика изолованих сојева, идентификовани су као *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*, чиме је потврђено присуство овог патогена у Црној Гори (Панић и сар., 1998).

Карантински статус *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* у Црној Гори као и интензиван увоз садног материјала пореклом из Италије, представља ризик од уношења и ширења патогена. Такође утврђено присуство патогена на бадему, намеће потребу да се провери присуство патогена и у другим локалитетима као и на другим домаћинима (бресква, нектарина, шљива, кајсија) у Црној Гори.

Agrobacterium tumefaciens је проузроковач бактериозног рака корена. Распрострањен је у свим крајевима света, а штете од ове бактерије у воћарству могу бити велике, поготово ако се појави у расадницима воћног садног материјала.

У Црној Гори ова бактерија није детаљније проучавана. Њена појава је забележена на садницама брескве и бадема у Бару и Даниловграду. Више од 50% садница у Бару је било заражено (Мијушковић, 1999). Недавно је објављен и први налаз *A. tumefaciens* на виновој лози у околини Подгорице.

Xylella fastidiosa је тренутно једна од најопаснијих и најштетнијих фитопатогених бактерија у подручјима њеног распрострањења. Проузрокује различите болести са великим економским утицајем на пољопривреду, јавне површине и околину.

Спектар биљака домаћина још увек није до краја проучен, јер бактерија колонизира осим дрвенастих вишегодишњих биљака и бројне украсне и коровске биљке. Листа осетљивих биљака домаћина обухвата 359 врста из 75 ботаничких фамилија (EFSA, 2016). Значајни домаћини су винова лоза, бресква, шљива, трешња, бадем, маслина, крушка, цитруси, храст, брест и платан, али и многе друге пољопривредне и украсне биљке (Janse and Obradović, 2010).

Бактерија је у биљкама присутна искључиво у ћелијама ксилема, апреноси се са заражених биљака домаћина на здраве инсектима векторима (Cercopidae, Cicadellidae, Aphrophoridae), који се хране сисањем сокова из ксилема.

Xylella fastidiosa је распрострањена на америчком континенту. Главни ареал распрострањености ове бактерије до скоро био је тропски и суптропски појас. Међутим присуство *X. fastidiosa* утврђено је на храсту у Канади, а од 1994. године и на азијском континенту, у виновој лози на Тајвану, бадему у Ирану и Турској.

Бактерија је недавно унешена на Европски континент. Присуство *X. fastidiosa* на маслинама у јужној Италији 2013. године (Saponari et al., 2013) и на медитеранским биљним врстама (*Nerium oleander* и *Polygalamyrtilifolia*), на југу Италије, Корзици и дуж Медитеранске обале у Француској (EPPO Standards PM 7/24 (2), 2016), представља важну промену у географској дистрибуцији бактерије и биљкама домаћинима. У октобру 2016. године, у Шпанији је објављен први налаз *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa* на три млада стабла трешње која су се налазила у вртном центру у Мајорци. До сада, бактерија је утврђена на маслинама, шљиви и бадему, лаванди, олеандеру, *Polygalamyrtilifolia*, *Acacia saligna* и *Fraxinus angustifolia*. Први позитиван налаз *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa* је недавно откривен и на виновој лози. У Шпанији је 30. јуна 2017., утврђено присуство *X. fastidiosa* subsp. *multiplex* на бадему, у Аутономној Регији Валенсији.

Заражени биљни материјал је главни пут ширења *X. fastidiosa*. Посебну опасност представља биљни материјал у фази мировања, као и латентна инфекција односно одсуство симптома присуства патогена. Постоји могућност уношења *X. fastidiosa* инфективним вектором. Стога је брза и поуздана детекција изузетно важна у спречавању ширења ове бактерије.

Овај патоген није присутан у Црној Гори и налази се на листи карантинских штетних организама. *X. fastidiosa* представља велики фитосанитарни ризик за Црну Гору, због присуства великог броја биљака домаћина и повољних климатских услова за опстанак патогена и развој болести. Увоз биљног материјала пореклом из Италије, Шпаније и Француске могао би бити примаран начин уношења бактерије у Црну Гору.

Обзиром на наведене чињенице, болести бактериозне природе, у повољним временским условима, могу нанети озбиљне губитке биљној производњи. Зато је потребно детаљније проучити заступљеност и распрострањеност бактерија проузроковача обољења. Стога се за предмет истраживања ове дисертације предлажу бактерије као патогени коштичавих воћака у Црној Гори.

Програм истраживања подразумева прикупљање биљног материјала са различитих локалитета и изолацију фитопатогених бактерија. Узорковање ће се обавити у дужем временском интервалу како би се повећала вероватноћа и успешност изолације патогена како из симптоматичног тако и из материјала без симптома. Затим је предвиђена провера патогености сојева и примена класичних и савремених метода у изучавању диверзитета популације изолованих бактерија. Класичним бактериолошким методама биће проучене одгајивачке, биохемијске и физиолошке особине изолованих сојева. Идентификација и даља диференцијација изолованих бактерија до нивоа врсте и нижих таксономских категорија обавиће се применом адекватних молекуларних и серолошких техника. Програмом истраживања планирана је и провера осетљивости изолованих сојева према бактерицидима и присуство резистентних сојева.

2.2 Научни циљ истраживања

Научни циљ ове докторске дисертације јесте да се истраживањима утврди присуство и распрострањеност бактерија – патогена коштичавих воћака у Црној Гори. Иако у последњем периоду нису забележене штете већег обима, према подацима из домаће и стране литературе, губици настали дејством ових патогена могу имати огромне размере. Обзиром на интензиван промет садног материјала *Prunus* врста, постоји стална опасност од појаве бактериоза јачег интензитета или од уношења карантинских врста бактерија.

У многим земљама света све чешће се појављују налази карантинских организама, као што су *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*, *Pseudomonas syringae* pv. *persicae* и *Xylella fastidiosa*. Обзиром да се у Црну Гору увози садни материјал пореклом из земаља у којима су карантински организми присутни, велика је могућност уношења патогена латентно инфицираним садним материјалом.

Циљ истраживања је да се утврди састав и проуче врсте бактерија чланови популације патогена коштичавих воћака, која није била предмет интензивних проучавања у Црној Гори дуги низ година. Применом стандардних и савремених метода научног рада биће детаљно проучене патогене, биохемијско-физиолошке и генетичке одлике сојева. Идентификација и карактеризација одабраних сојева, осим традиционалним, обавиће се и савременим дијагностичким, серолошким и молекуларним техникама, које одликује брзина, осетљивост и поузданост. Овладавање у увођење у примену наведених техника експерименталног рада (ELISA, PCR,

realtimePCR) биће од изузетног научног значаја за садашња али и сва будућа истраживања бактериоза биљака у Црној Гори.

Осетљивост сојева према појединим бактерицидима проучиће се у циљу утврђивања евентуалне појаве резистентних сојева према бактерицидима. Тиме ће се обезбедити нови и научно засновани резултати на којима ће се базирати избор адекватних и ефикасних супстанци за сузбијање бактерија – патогена коштичавих воћака и бадема у Црној Гори.

3. Основне хипотезе од којих се полази у истраживању

Предложена истраживања полазе од претпоставке да *Prunus* врсте паразитира више врста патогених бактерија.

Имајући у виду да бактериозе коштичавих воћака и бадема нису биле предмет интензивних проучавања у Црној Гори дужи низ година, као и да се за даљу репродукцију сваке године увезе значајна количина биљног материјала, који често долази из ризичних подручја, основна претпоставка је да се у популацији бактерија присутним у засадима ових биљака у Црној Гори могу наћи неке већ раније познате врсте али и оне на листи карантинских организама.

Карантински статус *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*, *Pseudomonas syringae* pv. *persicae* и *Xylella fastidiosa* оправдава потребу да се провери и утврди њихово евентуално присуство на територији Црне Горе.

Такође, претпоставља се да су у производним засадима коштичавих воћака присутне некарантинске врсте патогених бактерија које још увек нису довољно проучени патогени биљака у Црној Гори, а које могу проузроковати значајне штете. Коришћењем класичних и специфичних диференцијалних бактериолошких тестова, као и молекуларних метода, извршиће се идентификација и проучавање патогена, и тако проверити претпоставка о присуству и распрострањености различитих врста фитопатогених бактерија.

Препарати на бази бакра се редовно користе у заштити биља не само од патогених бактерија, у Црној Гори. Претпоставка је да се, услед неуједначене или прекомерне примене ових препарата, у популацији фитопатогених бактерија могу наћи сојеви различите осетљивости. Стога, биће проучена реакција изолованих сојева према различитим бактерицидима. Наведена истраживања употпунила би знање о патогенима коштичавих воћака у Црној Гори.

4. Методе које ће се применити у истраживањима

4.1 Материјал

Обилазак терена и прикупљање узорака биљног материјала

Узорци биљног материјала, са симптомима који могу бити бактериозне етиологије, биће прикупљени са различитих локалитета широм Црне Горе, првенствено из региона познатих по гајењу коштичавих воћака. Узорковање биљног материјала вршиће се од раног пролећа, почетком лета као и током јесењег периода. Узорковаће се биљни материјал са симптомима налик присуству и активности патогених бактерија (рак-ране, сушење једногодишњих гранчица, црни врхови гранчица, жутило и увелост лишћа, пегавост лишћа, некроза пупољака) као и биљни материјал без симптома, због провере присуства латентних инфекција и састава епифитне популације.

Изолација патогена

Изолација бактерија ће се обавити одман након прикупљања биљног материјала, а користиће се различите бактериолошке хранљиве подлоге:

- подлога од квашчевог екстракта, глукозе и калцијум карбоната (YDC) препоручује се за бржу и ефикаснију изолацију врста рода *Xanthomonas* (Арсенијевић, 1997; Klement et al., 1990; LelliottandStead, 1987; Schaadet al., 2001);
- подлога обogaћена сахарозом (NSA) (Lelliottet al., 1966) и
- хранљиви агар (NA) стандардна бактериолошка подлога која се препоручује за изолацију врста рода *Pseudomonas* (Lelliottet al., 1966; Арсенијевић, 1997).

Карактеристике патогена на овим подлогама имају и важан дијагностички карактер. Након пречишћавања и добијања чистих култура изоловани сојеви ће бити депоновани у колекцију на дуготрајно чување, а за потребе даљег проучавања и идентификације биће одржавани у воденој суспензији или пресејавањем на подлогама.

4.2 Методе

Идентификација и диференцијација сојева

Проучавање се одгајивачке, биохемијске и физиолошке одлике изолованих сојева бактерија према методама описаним у литератури (Арсенијевић, 1997; Klement et al., 1990; Lelliott and Stead, 1987; Schaad et al., 2001).

Од одгајивачких особина биће проучен изглед колонија на различитим хранљивим подлогама (боја, облик, пречник, изглед обода, испупченост и сјај колонија), стварање флуоресцентног пигмента на Кинговој подлози Б (Kinget al., 1954), реакција по Граму помоћу КОН теста (Арсенијевић, 1997; Schaad et al., 2001), развој бактерија при различитим температурама (Schaadet al., 2001), толерантност према различитим концентрацијама NaCl (Арсенијевић, 1997).

Такође, за диференцијацију врста рода *Pseudomonas* биће примењен LOPAT тестов (Lelliottet al., 1966): стварање левана (L); стварање оксидазе (O); пектолитичка активност на кришкама кромпира (P); активност аргинин–дехидролазе (A); хиперсензитивна реакција (HR) дувана (T). LOPAT тестови представљају важан корак у детерминацији *P. syringae*, при чему се посебан значај придаје стварању левана, HR дувана и активности оксидазе.

У циљу идентификације бактерија биће проучене неке основне биохемијско–физиолошке одлике: коришћење угљеникових једињења, активност каталазе, стварање H₂S, индола, редукција нитрата, хидролиза скроба и O/F тест (LelliottandStead, 1987; Арсенијевић, 1997; Klement et al., 1990).

При диференцијацији патогених варијетета бактерије *P. syringae* користиће се диференцијални тестови: разлагање желатина, хидролиза ескулина, стварање тирозиназе, коришћење (D+) тартарата (GATTa), помоћу којих се могу разликовати варијетети *syringae* и *morsprunorum* (CrosseandGarrett, 1963; Jones, 1971).

Осим тога, биће проучено и: коришћење млечне киселине, карактеристике развоја бактерија у течной подлози са сахарозом, виталност бактерија на подлози обogaћеној сахарозом, хидролиза казеина, коришћење L – леуцина, стварање честица леда (INA), стварање токсина сириномицина и коронатина (CrosseandGarrett, 1963; Jones, 1971, LatorreandJones, 1979; Lindow, 1990).

За детекцију гена одговорног за синтезу (*syrB*) и секрецију сириномицина (*syrD*), специфичних за врсту *P. s. pv. syringae*, као и за детекцију гена одговорног за продукцију коронатина (*cfI*), специфичног за врсту *P. s. pv. morsprunorum* пасу 1, користиће се PCR тест (Bereswillet al., 1994; Soresstenet al., 1998; BultreysandGheysen, 1999).

Карактеризација сојева молекуларним методама

Изоловани сојеви ће бити анализирани и молекуларним методама, првенствено тестовима за утврђивање присуства гена и делова ДНК специфичних за поједине врсте бактерија, применом реакције ланчаног умножавања фрагмената ДНК (PolimeraseChainReaction, PCR).

Једна од метода која се користи за утврђивање разлика између бактеријских сојева јесте и реакција ланчаног умножавања репетитивних секвенци, којом се синтетишу висококонзервативне кратке понављајуће ДНК секвенце расуте по целом геному бактерије. Применом Rep-PCR методе, уз коришћење REP, ERIC и BOX прајмера, могуће је установити разлике у генетским профилима проучаваних патогених варијетета (Schaadet al., 2001; Гашић и Обрадовић, 2009; Гашић и сар., 2012). Применом ових прајмера долази до умножавања бактеријске ДНК и добијају се посебни генетски профили који се састоје од фрагмената различите дужине на основу којих је могуће разликовати бактеријске изолате. Њиховим раздвајањем на агарозном гелу добија се високоспецифичан генетски профил. Rep-PCR омогућава поређење генетског профила непознатог бактеријског изолата са секвенцама генома познате бактерије.

Провера патогености проучаваних сојева

Патогене карактеристике проучаваних сојева биће проверене прелиминарно тестом хиперсензитивности (HR) дувана, као и инокулацијом делова и несазрелих плодова биљака домаћина (Гашић и Обрадовић, 2009; Гавриловић, 2006; Гашић и сар., 2012).

Осетљивост према бактерицидима

Осетљивост изучаваних сојева према различитим врстама бактерицида биће проучена праћењем развоја на подлогама са одређеним концентрацијама бактерицида (Zevenhuizen et al., 1979).

5. Очекивани резултати и научни допринос

Као резултат предложеног програма истраживања очекује се:

1. Изолација и идентификација бактерија - патогена коштичавих воћака и бадема;
2. Утврђивање хетерогености сојева у оквиру појединачних врста и нижих таксономских категорија;
3. Потврда карантинског статуса бактерија са листе карантинских патогена или рано откривање новоинтродукованих врста присутних још увек у латентној форми или на ограниченом подручју;
4. Провера осетљивости изолованих сојева према бактерицидима и присуство резистентних сојева;

Осим наведених резултата, од значаја како за будућа фитобактериолошка истраживања у Црној Гори тако и за предузимање конкретних мера заштите биља, као научни допринос може се навести то што ће реализацијом експерименталног дела дисертације бити савладане и у примену уведене савремене методе проучавања фитопатогених бактерија, чиме ће се остварити пренос знања и експертизе, проширити сарадња и омогућити даља самостална истраживања ових патогена у Црној Гори.

6. Закључак

Кандидат Тамара Поповић, магистар, поднела је пријаву за израду докторске дисертације под насловом: „**Бактерије као паразити коштичавих воћака и бадема на подручју Црне Горе**“. Сагледавањем значаја проблематике која је обухваћена предложеним истраживањима, комисија позитивно оцењује предложену тему и програм истраживања, како са научног тако и са практичног становишта.

Научни допринос ове дисертације огледаће се у утврђивању присуства и распрострањености бактерија – патогена коштичавих воћака у Црној Гори. Према подацима из домаће и стране литературе, губици настали дејством ових патогена могу имати огромне размере. Обзиром на интензиван промет садног материјала *Prunus* врста, постоји стална опасност од појаве бактериоза јачег интензитета или од уношења нових - карантинских врста бактерија у Црну Гору. У многим земљама све чешће се појављују налази карантинских организама, као што су *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*, *Pseudomonas syringae* pv. *persicae* и *Xylella fastidiosa*. Обзиром да се у Црну Гору увози садни материјал пореклом из земаља у којима су ови карантински организми присутни, велика је могућност уношења патогена латентно инфицираним садним материјалом.

Бактериозе коштичавих воћака нису биле предмет проучавања дуги низ година у Црној Гори. Зато је циљ истраживања да се утврди стање и промене у саставу популације бактерија патогена коштичавих воћака применом стандардних и савремених метода истраживања. Биће детаљно проучене патогене, биохемијско-физиолошке и генетичке одлике сојева, као и евентуална појава сојева резистентних према бактерицидима. Нека од тих истраживања биће примењена по први пут у Црној Гори, што представља значајан допринос у области фитопатологије. Такође, омогућиће избор адекватних и ефикасних супстанци за сузбијање бактерија – патогена коштичавих воћака и бадема у Црној Гори.

Идентификација и карактеризација одабраних сојева, осим традиционалним, обавиће се и савременим дијагностичким серолошким и молекуларним техникама, које одликује брзина, осетљивост и поузданост. Овладавање и увођење у примену наведених техника експерименталног рада (ELISA, PCR, realtimePCR) биће од изузетног научног значаја за садашња али и сва будућа истраживања бактериоза биљака у Црној Гори.

Основе експерименталног рада, савладане током магистратуре, као и детаљан увид у проблематику болести биљака и ризик од уноса нових патогена у Црну Гору, квалификују кандидата за реализацију наведеног програма истраживања. Стога, комисија позитивно оцењује поднету пријаву и предлаже Наставно-научном већу да Тамари Поповић, магистру, одобри израду докторске дисертације, у оквиру уже научне области Фитопатологија, под насловом „**Бактерије као паразити коштичавих воћака и бадема на подручју Црне Горе**“.

7. Име и референце предложеног ментора

Име и презиме ментора: Алекса Обрадовић
Звање: редовни професор

Списак радова који квалификују ментора за вођење докторске дисертације:

1. Kuzmanović, N., Biondi, E., Ivanović, M., Prokić, A., Zlatković, N., Bertaccini, A., **Obradović, A.** (2016): Evaluation of different PCR primers for identification of tumorigenic bacteria associated with grapevine crown gall. *Journal of Plant Pathology* 98, 311-319.
2. Kuzmanović, N., Pulawska, J., Prokić, A., Ivanović, M., Zlatković, N., Jones, J. B., **Obradović, A.** (2015): *Agrobacterium arsenijevicii* sp. nov., isolated from crown gall tumors on raspberry and cherry plum. *Systematic and Applied Microbiology*, 38:373–378.
3. Kuzmanović, N., Ivanović, M., Prokić, A., Gašić, K., Blagojević, N., Pulawska, J., **Obradović, A.** (2013): Identification and characterization of *Agrobacterium* spp. isolated from apricot in Serbia. *European Journal of Plant Pathology*, 137:11–16.
4. Ivanović, M., **Obradović, A.**, Gašić, K., Minsavage, G. V. Dickstein, E. R. Jones, J. B. (2012): Exploring diversity of *Erwinia amylovora* population in Serbia by conventional and automated techniques and detection of new PFGE patterns. *European Journal of Plant Pathology*, 133: 545–557.
5. Janse, J.D., **Obradovic, A.** (2010): *Xylella fastidiosa*: its biology, diagnosis, control and risks. *Journal of Plant Pathology*, 92(1, Supplement), S1.35–S1.48.

Београд-Земун

Дана 22. 12. 2017. године

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

1. Др Алекса Обрадовић, редовни професор
Универзитет у Београду- Пољопривредни
факултет. Ужа научна област:
Фитопатологија

2. Др Горан Делибашић, редовни професор
Универзитет у Београду, Пољопривредни
факултет. Ужа научна област:
Фитопатологија

3. Др Јелка Тиодоровић, ванредни професор
Универзитет Црне Горе, Биотехнички
факултет. Ужа научна област:
Фитопатологија

Прилози:

Прилог 1.

Списак саопштених и објављених научних и стручних радова кандидата Тамаре Поповић

1. Балаж, Ј., Делибашић, Т. (2005). Изналажење метода за изолацију *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* са семена паприке. Пестициди и фитомедицина, 20 (1): 51 - 60.

Прилог 2.

Списак литературе која ће се користити

1. Арсенијевић, М. (1997). Бактериозе биљака. С принт, Нови Сад.
2. Bereswill, S., Bugert, P., Volksch, B., Ullrich, M., Bender, C., Geider, K. (1994). Identification and relatedness of coronatine-producing *Pseudomonas syringae* pathovars by PCR analysis and sequence determination of the amplification products. *Applied and Environmental Microbiology* 8:2924-2930.
3. Bultreys, A., Gheysen, I. (1999). Biological and molecular detection of toxic lipodepsipeptide-producing *Pseudomonas syringae* strains and PCR identification in plants. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 1904-1909.
4. Crosse, J.E., Garrett, C.M.E. (1963). Studies on the bacteriophagy of *Pseudomonas mors-prunorum*, *Ps. syringae* and related organisms. *Journal of Applied Bacteriology* 26:159-177.
5. EFSA (2016). Update of a database of host plants of *Xylella fastidiosa*: 20 November 2015. Scientific report, EFSA Journal 2016; doi:10.2903/j.efsa.2016.4378.
6. EPPO Standards PM 7/64 (1) (2006). *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*. Diagnostic protocols for regulated pests. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 36, 129-133.
7. EPPO Standards PM 7/43(1) (2005). *Pseudomonas syringae* pv. *persicae*. Diagnostic protocols for regulated pests. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 35, 285–287.
8. EPPO Standards PM 7/24 (2) (2016). *Xylella fastidiosa*: Diagnostic protocols for regulated pests. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 46, 463–500.
9. Гавриловић, В., Милијашевић, С., Арсенијевић, М. (2005). Бактериозно сушење пупољака трешње. *Биљни лекар* 4:418-421.
10. Гавриловић, В. (2006). Патогене и биохемијско физиолошке карактеристике бактерија рода *Pseudomonas* паразита воћака, *Заштита биља*, 255-258, 5-55.
11. Гашић, К, Обрадовић, А. (2009). Примена REP-PCR и неких класичних метода у детекцији *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*. *Заштита биља* 267:19-36.
12. Gašić, K., Prokić, A., Ivanović, M., Kuzmanović, N., Obradović, A. (2012). Differentiation of *Pseudomonas syringae* pathovars originating from stone fruits. *Pesticides and Phytomedicine* 27(3):219-229.
13. Janse, J.D., Obradovic, A. (2010). *Xylella fastidiosa*: its biology, diagnosis, control and risks. *Journal of Plant Pathology*, 92(1, Supplement), S1.35–S1.48.
14. Jones, A.L. (1971). Bacterial canker of sweet cherry in Michigan. *Plant Disease Reporter* 55 (11):961-965.

15. Kaluzna M., Ferrante P., Sobiczewski P., Scortichini M. (2010). Characterization and genetic diversity of *Pseudomonas syringae* isolates from stone fruits and hazelnut using repetitive-PCR and MLST. *Journal of Plant Pathology* 92 (3):781-787.
16. Kennelly, M.K., Cazorla, F.M, deVicente, A., Ramos, C. Sundin, G.W.(2007). *Pseudomonas syringae* disease of fruit trees. Progress toward understanding and control. *Plant Disease*, 91: 4-17.
17. King, E.O., Ward, M.K., Raney, D.E. (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 44:301-307.
18. Klement, Z., Rudolf, K., Sands, D. C. (1990). *Methods in phytopathology*. Akadémiai Kiadó, Budapest.
19. Lamichhane, J. R. (2014). *Xanthomonas arboricola* disease of stone fruit, almond and walnut trees: Progress toward understanding and management. *Plant Disease* 12:1600-1610.
20. Latorre, B.A., Jones, A.L. (1979). *Pseudomonas morsprunorum*, the cause of bacterial canker of sour cherry in Michigan and its epiphytic association with *P. syringae*. *Phytopathology* 69:335-339.
21. Lelliott, R.A., Billing, E., & Hayward, A.C. (1966). A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic Pseudomonads. *Journal of Applied Bacteriology* 29(3): 470-489.
22. Lelliott, R.A., Stead, D. E. (1987). *Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants*. Oxford, London, Edinburgh: British Society for Plant Pathology, Blackwell Scientific Publications.
23. Lindow, S.E. (1990). Bacterial ice nucleation activity. (in: *Methods in Phytopathology* eds. S.Klement, K. Rudolph, D.C. Sands pp.185-198). Akadémiai Kiadó, Budapest.
24. Menard, M., Sutra, L., Luisetti, J., Prunier, J.P., Gardan, L. (2003). *Pseudomonas syringae* pv. *avii* (pv. nov.), the causal agent of bacterial canker of wild cherries (*Prunus avium*) in France. *European Journal of Plant Pathology*, 109(6), 565-576.
25. Мијушковић, М. (1999). Болести и штеточине суптропских воћака. Универзитет Црне Горе, Биотехнички институт – Подгорица.
26. Obradović, A., Gavrilović, V., Ivanović, M. and Gašić, K.(2008). *Pseudomonas* blight of raspberry in Serbia. In: *Pseudomonas syringae* Pathovars and Related Pathogens (Fatmi B., Collmer A., Iacobellis N.S., Mansfield J.W, Murill J., Schaad N.W. and Ullrich M., eds.). Kluwer Academic Publishers Group, 2008, pp. 413-417.
27. Обрадовић, А., Кузмановић, Н., Талић, А., Гашић, К., Ивановић, М. (2010). Бактериозе и фитоплазмозе коштичавих воћака. Биљни лекар, 4-5: 323 - 338.

28. Panić, M., Jovanovic, O., Antonijevic, D., Miladinovic, Z. (1998). The first appearance of bacterial plant pathogen *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* in Yugoslavia. *Zastita bilja* 49: 285-94.
29. Ritchie, D.F. (1995). Bacterial Spot. Pages 50-52 in: Compendium of Stone Fruit Diseases, Ogawa, J. M., Zehr, E. I., Bird, G. W., Ritchie, D. F., Uriu, K., Uyemoto, J. K., eds. APS Press, St. Paul, US.
30. Saponari, M., Boscia, D., Nigro, F., Martelli, G.P. (2013). Identification of DNA sequences related to *Xylella fastidiosa* in oleander, almond and olive trees exhibiting leaf scorch symptoms in Apulia (southern Italy). *Journal of Plant Pathology*, 95: 668.
31. Schaad, N.W., Jones, J.B., Lacy, G.H. (2001). *Xanthomonas*. In: Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria, 3rd edition. (eds) Schaad N. W., Jones J. B., Chun W., APS Press, St. Paul, MN, p. 175-200.
32. Soresten, K.N., Kim, K.H., Takemoto, J.Y. (1998). PCR detection of cyclic lipodepsinonapeptide - producing *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and similarity strains. *Applied and Environmental Microbiology* 64:226-320.
33. Vauterin, L., Hoste, B., Kersters, K., Swings, J. (1995). Reclassification of *Xanthomonas*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 45,472-489.
34. Вучинић, З., Тиодоровић, Ј., Живаљевић, С., Вукићевић, В. (1992). Проучавање бактериоза вишње у Црној Гори. *Пољопривреда и шумарство*, XXXVIII, 1-2, 3-23.
35. Young, J.M. (1988). *Pseudomonas syringae* pv. *persicae* from nectarine and Japanese plum in New Zealand. *EPPO Bulletin*, 18: 141-153.
36. Young, J.M., Jones, D.S., Gillings, M. (1996). Relationships between populations of *Pseudomonas syringae* pv. *persicae* determined by restriction fragment analysis. *Plant Pathology*, 45(2): 350-357.
37. Zevenhuizen, L., J. Dolfing, E. J. Eshuis, Scholtenkoerselman, I. J. (1979). Inhibitory effects of copper on bacteria related to the free ion concentration. *Microbial Ecology* 5, 139-146.