Najvažniji bakterijski patogeni biljaka iz porodice Cucurbitaceae

Čanji, Jan

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:204:099609

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**



Repository / Repozitorij:

Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb







SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

NAJVAŽNIJI BAKTERIJSKI PATOGENI BILJAKA IZ PORODICE Cucurbitaceae

DIPLOMSKI RAD

Jan Čanji

Zagreb, rujan 2021.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

Diplomski studij:

Fitomedicina

Najvažniji bakterijski patogeni biljaka iz porodice Cucurbitaceae

DIPLOMSKI RAD

Jan Čanji

Mentor:
prof. dr. sc. Edyta Đermić

Zagreb, rujan 2021.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

IZJAVA STUDENTA

O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, **Jan Čanji**, JMBAG 0178105001, rođen 12.11.1996. g. u Zagrebu, izjavljujem da sam samostalno izradio diplomski rad pod naslovom:

Najvažniji bakterijski patogeni biljaka iz porodice Cucurbitaceae

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedini autor ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznat s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____ _____

Potpis studenta

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studenta **Jan Čanji**, JMBAG 0178105001, naslova

Najvažniji bakterijski patogeni biljaka iz porodice Cucurbitaceae

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____ , dana _____ .

Povjerenstvo:			potpisi:
1.	prof. dr. sc. Edyta Đermić	mentor	_____
2.	izv. prof. dr. sc. Božidar Benko	član	_____
3.	doc. dr. sc. Joško Kaliterna	član	_____

Zahvala

Zahvaljujem svima koji su mi pomogli skupiti znanje i vještine tijekom akademskog obrazovnog procesa, te svim kolegama na fakultetu. Posebno zahvaljujem mentorici za vodstvo, strpljenje, svu potporu i znanje koje mi je prenijela. I naravno, hvala Bogu da je gotovo.

Sadržaj

1. Uvod 1

1.1. Cilj rada 2

2. Pregled literature 3

2.1. Tikvenjače (lat. Cucurbitaceae) 3

2.1.1. Lubenica 4
2.1.2. Krastavac 4
2.1.3. Buča i tikvica 5
2.1.4. Bundeva i muškatna tikva 5
2.1.5. Dinja 5

3. Značajni bakterijski patogeni tikvenjača (Cucurbitaceae L.) 7

3.1. *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* – uzročnik bakteriozne poligonalne pjegavosti listova tikvenjača 7

3.1.1. Epidemiologija 7
3.1.2. Simptomi 8
3.1.3. Morfologija 9
3.1.4. Suzbijanje 10

3.2. *Erwinia tracheiphila* – uzročnik bakterioznog venuća tikvenjača 12

3.2.1. Epidemiologija 12
3.2.2. Simptomi 12
3.2.3. Morfologija 14
3.2.4. Suzbijanje 15

3.3. *Xanthomonas cucurbitae* – uzročnik bakteriozne pjegavosti lista tikvenjača 17

3.3.1. Epidemiologija 17
3.3.2. Simptomi 17
3.3.3. Morfologija 19
3.3.4. Suzbijanje 19

3.4. *Acidivorax citrulli* – uzročnik bakteriozne mrljavosti ploda tikvenjača 20

3.4.1. Epidemiologija 21
3.4.2. Simptomi 21
3.4.3. Morfologija 23
3.4.4. Suzbijanje 23

3.5. *Serratia marcescens* – uzročnik žućenja vriježa 25

3.5.1. Epidemiologija 25
3.5.2. Simptomi 25
3.5.3. Morfologija 25
3.5.4. Suzbijanje 26

3.6. *Pseudomonas syringae* pv. s*yringae* – uzročnik pjegavosti i venuća zeljastih biljaka 27

3.6.1. Epidemiologija 27
3.6.2. Simptomi 28
3.6.3. Morfologija 29
3.6.4. Suzbijanje 29

3.7. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* – uzročnik vlažne truleži 30

3.7.1. Epidemiologija 30
3.7.2. Simptomi 30
3.7.3. Morfologija 31
3.7.4. Suzbijanje 31

4. Dijagnostika bakterioza tikvenjača 32

5. Zaključna razmatranja 35

6. Popis literature 37

Životopis 47

Sažetak

Diplomskog rada studenta **Jan Čanji**, naslova

Najvažniji bakterijski patogeni biljaka iz porodice Cucurbitaceae

Glavni predstavnici porodice tikvenjača (Cucurbitaceae L.) se kultiviraju ponajviše radi ishrane čovjeka. Ovisno o vrsti, koriste se u sirovom ili prerađenom obliku. Smanjeni prinos i/ili štete u skladištima uzrokovane fitopatogenima znatno utječu na uspješnost proizvodnje. Bakterije, kao predstavnici fitopatogenih prokariota, mogu uzrokovati značajno smanjenje prinosa i kvalitete proizvoda. Najvažnije bakterije koje se javljaju na tikvenačama su: *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*, *Erwinia tracheiphila*, *Xanthomonas cucurbitae*, *Acidovorax citrulli*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas syringae* pv. s*yringae* i *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. Analiza bakterija prisutnih u i na biljnim organizmima, kao i laboratorijska identifikacija uzročnika bakterioza tikvenjača, korisna je za proizvodnu praksu jedino ako se obavi pravovremeno. Uzorkovanje za potrebe laboratorijskih analiza uvjetovano je prepoznavanjem simptoma bolesti u polju. Rad donosi pregled suvremenih znanstvenih i stručnih znanja o bakteriozama tikvenjača, njihovoj raznolikosti, prisutnosti i pojavnosti uzročnika i epidemiologiji, te o specifičnostima njihove simptomatologije. Predstavljene su osnove temeljnih dijagnostičkih laboratorijskih protokola namijenjenih identifikaciji bakterijskih patogena tikvenjača, kao i strategije njihovog suzbijanja, s naglaskom na ekonomski i ekološki prihvatljive tehnike zaštite bilja koje je neophodno primjenijivati u cilju smanjenja ili sprječavanja šteta od bakterioza.

Ključne riječi: tikvenjače, bakterije, dijagnostika, suzbijanje, prevencija

Summary

Of the master's thesis – student **Jan Čanji,** entitled

The most important bacterial plant pathogens of the Cucurbitaceae family

The main representatives of the plant family of cucurbits (Cucurbitaceae L.) are cultivated mainly for human consumption. Depending on the species, they are used raw or processed. Reduced yields and/or storage losses caused by phytopathogens significantly affect production. Bacteria, as one of the representatives of plant pathogenic prokaryotes, can cause significant reduction of yield and quality. The most important bacterial species that occur on cucurbits are: *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*, *Erwinia tracheiphila*, *Xanthomonas cucurbitae*, *Acidovorax citrulli*, *Serratia marcescens, Pseudomonas syringae* pv. s*yringae* and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. Analysis of bacteria present in and on plant organisms, as well as laboratory identification of species causing bacterioses on cucurbits, is useful for production praxis only in case when it is performed on time. Sampling for laboratory analysis is conditioned by the recognition of disease symptoms in the field. The paper provides an overview of modern scientific and professional knowledge about bacterioses of cucurbits, their diversity, presence and occurrence of pathogens and epidemiology, and the specifics of their symptomatology. The basics of general diagnostic laboratory protocols intended for the identification of bacterial pathogens of cucurbits, as well as strategies for their control, are presented. Economically and environmentally friendly plant protection techniques that need to be applied, in order to reduce or prevent damage caused by bacterial diseases, were emphasized.

Keywords: cucurbits, bacteria, diagnostics, control, prevention

1. Uvod

Usjevi tikvenjača (Cucurbitaceae L.) obuhvaćaju veliku i raznoliku skupinu kultura jer se radi o porodici koja obuhvaća 134 roda s oko 965 vrsta biljaka. Tikvenjače su biljke koje zahtijevaju znatnu količinu topline, te se prema tome uzgajaju i beru tijekom proljetne, ljetne i jesenske sezone. Tikvenjače su važan dio raznolike prehrane u cijelom svijetu, te se koriste u sirovom, kuhanom, kandiranom ili konzerviranom obliku (McGrath, 2004). Pojedine vrste tikvenjača uzgajaju se zbog sjemenki jer su im one bogate uljem i mineralima, te se često prešaju. Prema zasijanim površinama, u Hrvatskoj se najviše uzgaja lubenica, zatim buče, tikvice i bundeve, pa dinje a zatim krastavac (FAO, 2019). Prema statistikama FAO-a iz 2019. godine, najveći je svjetski proizvođač lubenice, krastavca, dinje, buče i bundeve bila Kina.

Neke vrste roda *Cucurbita* ubrajaju se među najstarije biljne kulture na svijetu, a tome svjedoče brojni arheološki nalazi u Peruu i Meksiku (prema Hulina, 2011). Tikvenjače prati širok spektar štetočinja, pogotovo uzročnika bolesti, pošto biljkama iz te porodice većinom odgovara toplo vrijeme s visokom vlagom zraka. Patogeni negativno utječu na produktivnost tikvenjača, a poznato je oko 200 njihovih bolesti (Zitter i sur., 1996). Uzročnici tih bolesti su fitopatogene gljive, virusi, bakterije, te fitoplazme. Patogeni tikvenjača zaražavaju stižući iz tla ili zrakom, prenoseći se vjetrom, vektorima ili pak sjemenom.

Jedni od najznačajnijih uzročnika bolesti porodice Cucurbitaceae su bakterije kojima odgovaraju visoka temperatura i vlaga zraka (Sharma i sur., 2016).

Zbog sve učestalijih zahtjeva za analizu uzoraka različitih tikvenjača s raznolikim simptomima bakterioza u nekoliko prethodnih proizvodnih sezona na Zavodu za fitopatologiju Sveučilište u Zagrebu Agronomskog fakulteta, uz uočavanje optimizacije uvjeta za razvoj bakterija u našem podneblju, vezano uz modificiranje uobičajenih klimatskih uvjeta našeg podneblja, može se očekivati jačanje utjecaja ovog problema na uspješnost biljne proizvodnje u nas. Nakon izolacije mješovite mikrobne flore iz zaprimljenih uzoraka biljnog tkiva, prisutne prokariotske patogene moguće je identificirati odgovarajućim metodama molekularne dijagnostike. Problem nastaje obzirom da nije moguće kontinuirano raspolagati laboratorijskim reagensima, molekularnim probama i svim potrebnim materijalom za identifikaciju širokog spektra potencijalno prisutnih bakterija. Postoji potreba za sistematizacijom suvremenih podataka o pojavnosti, simptomatologiji i epidemiologiji najvažnijih bakterijskih patogena kultiviranih tikvenjača kako bi se postavili laboratorijski prioriteti za nabavu adekvatnih dijagnostičkih reagensa.

1.1. Cilj rada

Cilj ovog rada je izraditi pregled suvremenih znanstvenih i stručnih znanja o bakteriozama, njihovoj raznolikosti, prisutnosti i pojavnosti uzročnika i epidemiologiji, te specifičnosti njihove simptomatologije. Bit će predstavljene osnove temeljnih dijagnostičkih laboratorijskih protokola namijenjenih identifikaciji bakterijskih patogena tikvenjača. Zainteresirana poljoprivredna javnost će kroz ovaj diplomski rad dobiti pregled značajnih informacija iz ovog područja, s naglaskom na najvažnije bakterijske patogene u uzgoju tikvenjača.

2. Pregled literature

2.1. Tikvenjače (lat. Cucurbitaceae)

Najzastupljeniji rodovi u svijetu, tako i u Hrvatskoj, unutar porodice tikvenjača (lat. Cucurbitaceae) su: *Cucurbita*, *Citrullus* i *Cucumis*. FAO za 2019. godinu navodi da su najvažnije vrste unutar tih rodova: lubenica (*Citrullus lanatus* L.), krastavac (*Cucumis sativus* L.), buča (*Cucurbita pepo* L.), bundeva (*Cucurbita maxima* Duchesne), muškatna tikva (*Cucurbita moschata* Duchesne ex Poir.) i dinja (*Cucumis melo* L.) (FAO, 2019).

Svim navedenim biljkama iz te porodice su zajednička svojstva to što zahtijevaju pretežito toplo i vlažno vrijeme, te se sade jedanput godišnje. Zeljaste su i imaju puzave stabljike odnosno vriježe koje su duge 3 do 4m. Većinom su to jednodomne biljke s jednospolnim cvjetovima što znači da se na svakoj biljci formiraju posebno ženski i muški cvjetovi. Stranooplodne su biljke, te se oprašivanje najviše vrši kukcima (najviše pčelama). Kod većine postoji mogućnost samooplodnje. Mnogim vrstama unutar te porodice plodovi variraju po obliku, veličini, boji, izgledu egzokarpa na istoj biljci. Neki se plodovi upotrebljavaju u fiziološkoj zrelosti, neki se pak beru nezreli i koriste za konzerviranje, a nekima se sjemenke koriste za proizvodnju ulja.

Za buču se smatra da je jedna od najstarijih vrsta biljaka unutar te porodice jer je uzgajana već 8000 do 10000 god. pr. Kr. Utvrđeno je da je porijeklom iz Meksika. Bundeva je porijeklom iz Južne Amerike i smatra se da je uzgajana oko 4000 god. pr. Kr. Za lubenicu se ne zna točno otkad se uzgaja ali se procjenjuje na 5000 god. pr. Kr. te da je porijeklom iz Sudana. Za krastavce se smatra da su uzgajani već prije oko 2500 god. pr. Kr. i porijeklom dolaze iz Indije kako navode Chomicki i sur. (2019).

Danas se vrste roda *Cucurbita* uzgajaju uglavnom na područjima sredozemne, suptropske i tropske klime, te je u svijetu najveći proizvođač Kina. Kina proizvede oko 60 685 237 t lubenice i oko 70 288 130 t krastavca godišnje (FAO, 2019.). Hrvatska proizvede oko 20 300 t lubenice i 3000 t krastavaca godišnje (FAO, 2019.) što je zanemarivo na svjetskom nivou ali je značajno unutar našeg gospodarstva.

2.1.1. Lubenica

Lubenica (*Citrullus lanatus* L.) je važna povrtlarska kultura u toplijim regijama svijeta kako navode Paris i sur. (2013). Jednako tako je važna kultura koja se uzgaja i u Hrvatskoj, a to nam potvrđuju podaci FAO-a. U nas se lubenica uzgaja na oko 670 ha i prosječan prinos iznosi 30 297,5 kg/ha (FAO, 2019). Uzgaja se uglavnom na južnom dijelu Hrvatske, ponajviše u dolini rijeke Neretve. Jednogodišnja je kultura sa širokim korijenovim sustavom u zoni od 50 cm dubine tla, a središnja žila može doprijeti i do 2m u dubinu. Nadzemni dio je razgranat, zeljast i sastoji se od vrježa koje mogu biti duge od 3 do 4 metra. Cvjetovi su jednodomni, jednospolni, žute boje. Lubenica je stranooplodna vrsta. Optimalna temperatura za rast joj je oko 30 °C. Paris i sur. (2013) navode da zahtijeva dovoljnu količinu svjetla jer u slučaju da je duži period prevladava oblačno vrijeme, ili pak ako temperatura padne ispod 10 °C, lubenici pada kvaliteta i slatkoća mesa je manja. Lubenici odgovara rahlo, blago kiselo tlo, poput glinasto pjeskovitih, aluvijalnih tla. Za uzgoj je potrebno oko 400 m^3 vode/ha za sušnijih dana, a ako je uzgoj na otvorenom potrebna količina se smanjuje, ovisno o kišama.

Kao i kod većine vrsta tikvenjača, navodnjavanje nije potrebno u zadnjoj fazi dozrijevanja. Meso lubenice sadrži 91 % vode, 6 % šećera i malo masnoća. Sto grama mesa lubenice sadrži oko 125 kilodžula (30 kilokalorija) energetske vrijednosti, a šećeri čine najveći dio suhe tvari ploda. Najčešće se konzumira meso ploda u sirovom stanju. Sjemenke lubenice sadrže karotenoide, uključujući likopen, služe za ekstrakciju vitamina D. Perkins-Veazie i sur. (2006) navode da se u lubenici sintetizira aminokiselina citrulin.

2.1.2. Krastavac

Krastavac (*Cucumis sativus* L.) je široko uzgajana kultura i velika većina država imaju veliku potražnju za krastavcima, kao i njihovu proizvodnju. To često rezultira mnogim obiteljskim gospodarstvima koji se bave njihovim uzgojem, što potvrđuju FAO statistike. U Hrvatskoj se krastavci uzgajaju na oko 90 ha, sa prinosom od 33 333,3 kg/ha (FAO, 2019.). Uglavnom su najzastupljeniji krastavac salatar i krastavac za kiseljenje. Oni se uzgajaju na većini kontinenata baš zbog ranije spomenute velike potražnje ali i zbog toga što se radi o kulturi koja se lako prilagođava klimatskim uvjetima. Optimalna dnevna temperatura je oko 25 °C ali se biljka može normalno razvijati i uz temperature više od 15 °C. Relativna vlažnost zraka bi trebala biti od 85 do 90 % što se u plastenicima može postići ali je to na otvorenom znatno teže. Vlažnost tla bi za optimalan uzgoj trebala biti 70 % poljskog kapaciteta tla za vodu. Pošto krastavci razvijaju plodove već nakon dva mjeseca (malo ranije ili kasnije ovisno o agroklimatskim čimbenicima) u ta dva mjeseca ove biljke imaju potrebu za oko 80–150 l/m^2 vode (Parađiković, 2002). Odgovaraju im blago kisela rastresita tla, bogata organskim tvarima. Krastavac se uzgaja uglavnom na otvorenom ili u staklenicima/plastenicima. Jednogodišnja je vrsta, ima plitki korijenov sustav (do oko 30 cm dubine), te pripada u biljke sa slabije razvijenim korijenom. Vriježe su mu duge do 3 metra. Krastavac na istoj vriježi

sadrži muške i ženske cvjetove. Česti problem nastaje zbog veće količine muških cvjetova jer se dobiva manji urod (prema Lu i sur., 2010). Uz zahtjeve za uzgoj, krastavce kao i lubenice zaražavaju brojni patogeni, posebice bakterije.

2.1.3. Buča i tikvica

Buča (*Cucurbita pepo* L.) i tikvica (*Cucurbita pepo* L. convar. *giromontiina*), najčešće se u Hrvatskoj uzgaja kao uljna buča ili uljna tikva jer ponajviše služi za proizvodnju ulja. Razlog tome je sadržaj sjemenki koje sadrže 42–51 % ulja i 17–32 % proteina. Često se koristi za pravljenje uljnih pogača, dok se meso mladih plodova koristi za konzumaciju (spravljanje raznovrsne hrane), a može se koristiti i kao organsko gnojivo.

Uzgaja se gotovo na svim kontinentima, a najviše u Aziji (FAO, 2019). Kod nas se pretežito uzgaja u Međimurju i Podravini, odnosno u sjevernoj Hrvatskoj. Korijen buče je vretenast, razvijen i proteže se u čak 5–8 m^3 tla (Pospišil, 2013). Stabljika je vrježa duga 3–4 m ali ima i dugovriježnih sorti kojima vrježa može biti duga čak 10 m. Listovi su raznih oblika. Jednodomna je biljka s jednospolnim cvjetovima (ne razlikuje se od drugih vrsta tog roda). Stranooplodna je i prema tome se lako oprašuje drugim sortama iste vrste. U slučaju samooplodnje (do 30 %) uglavnom dolazi do depresije (Pospišil, 2013). Kao i kod krastavca, minimalna temperatura za rast i razvoj je između 13 i 15 °C (ujedno i za cvatnju). Optimalna temperatura za oplodnju je nešto malo niža od 25 °C, a za rast i razvoj ploda je od 25 do 27 °C. Potreba za vodom je velika i iznosi oko 70 do 80 % poljskog kapaciteta tla za vodu.

2.1.4. Bundeva i muškatna tikva

Bundeva (*Cucurbita maxima* Duchesne) i muškatna tikva (*Cucurbita moschata* Duchesne ex Poir.) imaju karakteristike koje se podudaraju sa onima tikvice i obične buče. Najčešće se koriste za proizvodnju ulja ali i za konzumaciju u raznim pripremama, a uzgajaju se na tlima sa istim karakteristikama i u istom podneblju stoga ih zaražavaju iste bakterije koje mogu uzrokovatu značajne štete. U Hrvatskoj se tikve ili obične buče i bundeve uzgajaju na oko 370 ha sa prinosom od 12 937 kg/ha (FAO, 2019).

2.1.5. Dinja

Dinja (*Cucumis melo* L.), koja se dosta uzgaja u Aziji i SAD-u, u Hrvatskoj se znatno manje uzgaja, i to oko 4 puta manje od lubenice (FAO, 2019). Radi se o 180 ha i prosječnom prinosu od 26 277,8 kg/ha (FAO, 2019). Ova proizvodnja ipak nije zanemariva i ne isključuje se njena važnost. Plod je po sastavu vrlo sličan lubenici i najviše se koristi za konzumaciju u svježem ili sušenom stanju. Uzgaja se na južnijim dijelovima Hrvatske. Korijen dinje se razvija uglavnom

na dubini 35–40 cm. Nad zemljom se razvijaju vriježe duge do 3 m, a listovi su na rubovima plojke nazubljeni. Dinja je jednodomna biljka s odvojenim muškim i ženskim cvjetovima. Muški se većinom nalaze na glavnoj vriježi, a ženski se cvjetovi uglavnom razvijaju na bočnim vriježama. Za rast i razvoj potrebne su joj temperature iznad 15 °C dok su optimalne 20–27 °C. Optimalna relativna vlažnost zraka iznosi 45–60 % kako navode Sensoy i sur. (2007). Ovisno o podneblju i agroklimatskim čimbenicima potrebno je do 400 m^3/ha vode za rast i razvoj ove biljke.

3. Značajni bakterijski patogeni tikvenjača (Cucurbitaceae L.)

3.1. *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* – uzročnik bakteriozne poligonalne pjegavosti listova tikvenjača

U bakterijsku vrstu *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* su do ranih 2000tih svrstavali i ostale uzročnike bolesti koji su na biljci izazvali slične simptome kao ova bakterija (Newberry i sur., 2016). Bolest koju ova bakterija uzrokuje je poligonalna tj. uglata pjegavost listova tikvenjača. Pohronezny i sur. (1977) navode kako je to najraširenija bakterioza svih vrsta unutar por. *Cucurbitacea* koja smanjuje urod, masu te kvalitetu plodova. Bakterija *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* jedan je od 50 patovara koji pripadaju heterogenoj vrsti *Pseudomonas syringae* (Young i sur., 1996). Ova bakterija je prvi put opisana 1915. godine od strane Bryan i Smith (prema Arsenijević, 1997). Ona je patogen koji primarno napada krastavac, gdje je i najviše opisana. U Americi je proglašena jednom od najdestruktivnijih bolesti na krastavcima kako navode Fatmi i sur. (2017). U Rusiji, u Moskvi, je 1946. g. zabilježen pad prinosa čak do 50 % (Gorlenko and Voronkevich, 1946). Može se reći da je patogen rasprostranjen diljem svijeta pošto je zabilježen i u Kini, Japanu, Engleskoj, Iranu, Turskoj, Australiji, Argentini, Brazilu, gotovo svim državama Afrike i Europe (Bradbury, 1986). Patogen se javlja u brojnim naslovima znanstvenih publikacija srednje Europe kao veliki uzročnik smanjenja prinosa krastavca. Vrlo je čest i u našem podneblju u Hrvatskoj. Samom činjenicom da je stvarao probleme na usjevima krastavaca u Kaliforniji gdje vladaju topliji klimatski uvjeti, ali i u Danskoj sa hladnijom klimom, možemo zaključiti da se ova fitopatogena bakterija lako prilagođava. Za razvoj bolesti optimalne temperature iznose 25-30 °C i vlažnost zraka veća od 90 %, pri čemu gubitci mogu iznositi i do 80 % ukupnog prinosa kako navode Mijatović i sur. (2007). U Hrvatskoj je malo podataka o velikoj destruktivnosti ovog patogena ali na primjeru koji se dogodio u proljeća 2006. i 2007. godine zarazom krastavca i dinje bakterijom *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* u uvjetima sličnog podneblja na području Srbije, moramo biti na oprezu. Zbog visokog intenziteta zaraze klijanaca bili su u toj situaciji prisiljeni uništiti cijeli usjev kako navode Ristić i sur. (2007).

3.1.1. Epidemiologija

Najčešći domaćin ovog patogena su krastavci, no česte su i zaraze dinje, bundeve, buče, pa čak i lubenice. Najčešće se prenosi sjemenom, zaraženim biljnim ostacima (pogotovo ako je vlažnost tla veća, patogen je duže vijabilan) ili pak kao vegetativne bakterijske stanice u tlu. Kišne kapi i kukci mogu doprinijeti prijenosu bakterije sa zaražene biljke na drugu kao izvor sekundarnih infekcija. Prema Gilbert i Gardner (1918) bakterija prestaje biti infektivna nakon što se 20 mjeseci nalazi na površini sjemenke, no ostali

znanstvenici nakon njih, poput Jones i Doolittle (1921) su u svojim istraživanjima uspješno provodili zarazu i nakon više od 20 mjeseci čekanja. Bhat (2009) piše da dvogodišnje sjeme nije bez infektivnog inokuluma, te da se patogen održava na i unutar sjemena više od 21 mjesec, te se zaraza može očitovati u stadiju kotiledona.

Preživljavanje infektivnog inokuluma na biljnim ostatcima u ili na tlu usko je vezano za vlažnost zraka, odnosno tla. Kritzman i Zutra (1983) su zabilježili opstanak vijabilnog infektivnog inokuluma u sušnim uvjetima na samo 8 tjedana, a u vlažnijim uvjetima čak do 90 tjedana. Patogen može preživjeti do iduće sjetve odnosno i do godinu dana, ako ostane unutar biljnih ostataka u vlažnijim uvjetima. Prema navodima Bhat (2009) preživljavanje patogena drastično opada ako se on nalazi unutar biljnih ostataka u tlu, za razliku od biljnih ostataka na površini tla.

3.1.2. Simptomi

Simptomi izvršene zaraze se javljaju na nadzemnim dijelovima biljke; kotiledonima, listovima i plodovima. Na kotiledonima se uočavaju prvi simptomi jer se bakterija uglavnom prenosi zaraženim sjemenom. Radi se uglavnom o okruglastim, vodenastim pjegama koje variraju po obliku. Nakon određenog vremena zahvaćeno tkivo mijenja boju iz žutosmeđe u sve tamnije nijanse. Na pjegama se u slučaju velike vlažnosti zraka može javiti bakterijski eksudat kako navode Wiles i Walker (1951). Tkivo nekrotizira i otpada, te nastaju rupičasti oblici odnosno kotiledon ostaje perforiran. Kod brojnijih perforacija na kotiledonima oni se suše, deformiraju i može doći do ugibanja cijele mlade biljke (Arsenijević, 1997). Sekundarne zaraze se javljaju na listovima u vidu sitnijih vodenastih pjega koje se šire i poprimaju poligonalan, uglati oblik, obzirom da su ograničene lisnim žilama. Pjege su sivkaste do smeđe boje, u raznim nijansama (Slika 3.1.2.1.). Na naličju lisne plojke javlja se bijeli bakterijski eksudat koji se pretvara u bijelu nakupinu, a simptom je po kojem možemo razlikovati ovu bolest od plamenjače krastavca uzrokovane pseudogljivom *Pseudoperonospora cubensis* (Mijatović i sur., 2007). Pjege nekrotiziraju i ispadaju tako da list ostaje perforiran što stvara indirektne gubitke u proizvodnji smanjenjem fotosinteze (Jindal, 1994). Simptomi se javljaju i na plodovima nakon što se bakterija proširi sa peteljke na plod. Ako je plod u vrijeme nastanka zaraze u ranom stadiju razvoja, može se na njegovoj površini pojaviti smeđi bakterijski eksudat, dok sam plod smeđi, smežura se i otpadne. Taj simptom može biti od presudnog značaja za determinaciju bolesti. Na razvijenijim plodovima (plodovi koji su već postigli polovicu svoje prosječne veličine) se javljaju sitne uljne pjege sa žućkastim rubom, uglavnom okruglastog oblika. Kako pjege stare, one mijenjaju boju u bjelkastosmeđu, te mogu biti utisnute u egzokarp ploda. Zahvaćeno tkivo unutar pjege mekša i kako se bakterioza širi plodom, plod puca i dolazi do obilnog curenja bakterijskog eksudata žućkaste boje koji kasnije tamni i očvrsne. Latinska riječ *lachryma* znači suza te je ova bakterijska vrsta zbog simptoma curenja eksudata nalik na suze kojeg uzrokuje i dobila naziv. Verma i Sharma

(1999) navode da se bakterija sa zaraženih plodova prenosi na sjeme, te dalje na mlade klijance.



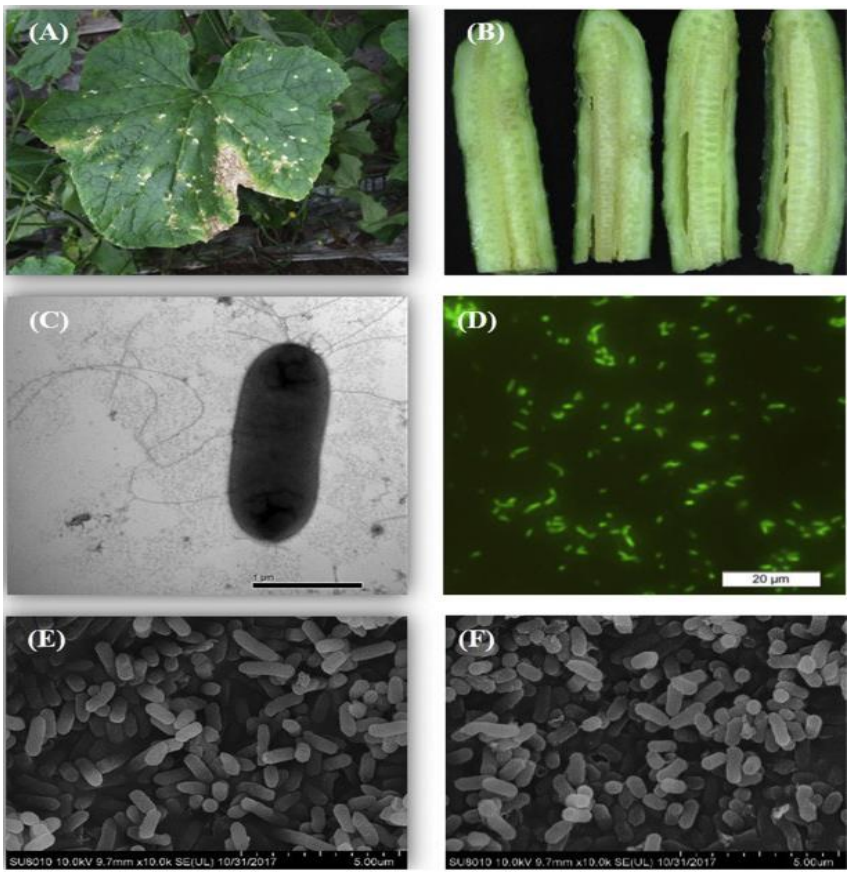
Slika 3.1.2.1. Simptomi poligonalne pjegavosti na listu krastavca.
Izvor: Gerald Holmes, Strawberry Center, Cal Poly San Luis Obispo, Bugwood.org
https://www.invasive.org/browse/detail.cfm?imgnum=1578263 – pristup 27.7.2021.

3.1.3. Morfologija

Bakterija *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* je gram-negativna bakterija, štapićasta oblika sa jedom do pet polarnih flagela, dimenzija stanice 0,5–1,0 × 1,5–4,0 µm (Bradbury, 1986). Spada u porodicu *Pseudomonadaceae*. Bakterija izolirana iz tkiva domaćina na hranjivoj podlozi s agarom formira bijele, blago uzdignute kolonije koje su okruglastog oblika i glatke. Za identifikaciju se koristi podloga King B na kojoj pojedine vrste iz roda *Pseudomonas*, a posebice ovaj patovar vrste *Pseudomonas syringae* proizvodi difuzibilni fluorescentni pigment, što je nakon uzgoja bakterijske kulture, lako prepoznatljivo (Palleroni, 1984).

Određeni patovari bakterije *Pseudomonas syringae, a među njima i* patovar *lachrymans* su nedavno, temeljem rezultata hibridizacije DNA i ribotipiziranja, klasificirani kao zasebna vrsta *Pseudomonas amygdali* (Jeong i sur., 2015). Li i sur. (2019) u svom istraživanju spominju uzročnika bakteriozne poligonalne pjegavosti listova tikvenjača pod nazivom *Pseudomonas amygdali* pv. *lachrymans*. Slika 3.1.3.1. prikazuje opće karakteristike

simptoma i morfologije poligonalne pjegavosti lista na krastavcu uzrokovane zarazom bakterijom *Pseudomonas amygdali* pv. *lachrymans*, soj NM002 (Li i sur., 2019).



Slika 3.1.3.1. Prikaz simptoma bakteriozne poligonalne pjegavosti na krastavcu (list (A) i plod (B)). Uzročnik, bakterija *Pseudomonas amygdali* pv. *Lachrymans* (stanica soja NM002 pod transmisijskim elektronskim mikroskopom (C) i uz fluorescencijsku mikroskopiju (D); stanice iz eksponencijalne faze rasta (E) i iz stacionarne faze (F).

Izvor: Li i sur. (2019)

3.1.4. Suzbijanje

Prevencija je vrlo značajan aspekt u suzbijanju ovog patogena. Jenns i sur. (1979). navode da umjetna inokulacija virusom TMV povećava otpornost biljaka na infekciju bakterijom *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*. Prskanjem biljke krastavca u stadiju s tri lista otopinama kalijevim oksalatom, dikalijevim fosfatom, trikalijevim fosfatom, dinatrijevim fosfatom, trinatrijevim fosfatom ili dikalcijevim fosfatom izazvat će otpornost listova u trajanju do pet tjedana na tog patogena kako navode Gottstein i Kuc (1989).

Khlaif i Abu-Blan (1994) pišu da su laboratorijskim testovima *in vitro* tretiranjem bakterije sredstvima Agrimycin-100, bakarni oksiklorid, streptomicinsulfat i trimiltox (mankozeb + bakrov oksiklorid + bakrov karbonat) inhibirali rast *P. syringae* pv. *lachrymans*

za 96,7, 84,3, 76,7 i 87,7 %. Navodi se da postoje još neka sredstva koja imaju inhibitorno djelovanje, poput bronopola, teramicina itd.

Prevencija tretiranjem sjemena je vrlo popularna metoda suzbijanja ove bakterije jer se i najviše prenosi tim putem. Certificirano, zdravo sjeme je najbitniji postupak u suzbijanju. Postoje kemijske metode i ne kemijske metode tretiranja sjemena. Umekawa i Watanabe (1978) ističu da su nekemijske metode učinkovitije od tretiranja sjemena kemijskim otopinama. Istraživanje su proveli sušenjem sjemena zagrijanim zrakom na 70 °C u trajanju od tri dana u skladištu, tretiranjem sjemena vrućom vodom na 52 °C u trajanju od 10 minuta ili 54 °C u trajanju od 5 minuta. Metoda sa vrućim zrakom je imala nešto malo veću učinkovitost. Leben i Sleesman (1981) su tu istu metodu smatrali nedovoljno učinkovitom, jer je ona, kako su napisali u svom istraživanju, imala učinkovitost tek oko 35–70 %. Zbog toga se često metode kombiniraju. Danas je vrlo često umakanje sjemena u natrijev hipoklorit (1:20) na 20 minuta, u kalcijev hipoklorit (1:4 –1:2) na 60 minuta, živin(II) klorid (1:1000) na 5–10 minuta ili se pak primjenjuju ostali registirani pripravci u kombinaciji s fungicidima, uvijek izabirući ekološki što prihvatljivija sredstva.

Tretiranje starijih biljaka u polju ne može potpuno uništiti patogena u biljci ali može znatno pridonijeti smanjenju njegovog prijenosa na zdrave biljke ili pak pomoći da ne dođe do ponovnih zaraze uz kontroliranu zaštitu. Česta je pojava fitotoksičnosti sredstava za zaštitu bilja ako se koristi previše pripravaka ili se pak oni primjenjuju iznad preporučenih količina/doze. Ridomil i Trimiltox Forte (bakar oksiklorid + mankozeb) bili su najučinkovitiji u smanjenju zaraze ovim patogenom i samim time spriječili veliki pad prinosa u istraživanju prema Khalif (1995). Neki navode korištenje bronopola, koji se danas uglavnom ne koristi, ali imao je visoku učinkovitost. Baktericidi na bazi bakra se vrlo često koriste. Kod nas su registrirani fungicidi i baktericidi Neoram WG (bakarni oksiklorid) i Cuprablau Z 35 WG (FIS, 2021).

Plodored je vrlo bitan, naravno uz rotaciju krastavca u minimalnom periodu od 3 godine. Duboko oranje u jesen je preporučljivo. Postupci i održavanje polja, plastenika, staklenika su bitni ali treba posebno naglasiti higijenu pribora, alata i strojeva. Izbjegavanje rada u vrlo vlažnim uvjetima (u polju), izbjegavanje prekomjernog navodnjavanja. Svaka ozljeda na biljci predstavlja opasnost i moguće je mjesto nastanka nove zaraze.

3.2. *Erwinia tracheiphila* – uzročnik bakterioznog venuća tikvenjača

Erwinia tracheiphila je bakterija koja uzrokuje bolest bakteriozno venuće tikvenjača, odnosno bakteriozno venuće krastavca. Vrlo je važan uzročnik biljnih bolesti diljem svijeta i zabilježena mu je pojava u Americi, Europi, Južnoj Africi i Japanu, kako navode Virsman i sur. (2016). Bolest je prvi put opisano E. F. Smith 1895. godine u Americi (Arsenijević, 1997), a uzročnik je jedna od prvih fitopatogenih bakterija koje su ikad opisane. Jedan od prvih fitopatologa, Erwin F. Smith je 1893. godine u Michiganu prvi put zapazio simptome, odnosno pravu epidemiju u polju zasađenom krastavcima, dinjama i bundevama. U Americi je smatrana jednom od najdestruktivnijih bolesti tikvenjača u srednjem i sjeveroistočnom području SAD-a koja uzrokuje do 80 % manji prinos (Rojas i sur., 2015). Bolest se uglavnom javlja na krastavcima ali i dinjama, bundevama i bučama, dok su lubenice otpornije na zarazu ovom bakterijom (Agrios, 2005). U nasadu lubenica u Meksiku je utvrđena zaraza ali tek na manje od 1 % biljaka (Sanogo i sur., 2011.). U Hrvatskoj ova bakterija nije detektirana niti su zabilježeni vektori koji je prenose, no zbog sve veće introdukcije raznih biljnih vrsta, postoji opasnost od unošenja vektora ovog patogena, a samim time i opasnost pojave ovog uzročnika i kod nas.

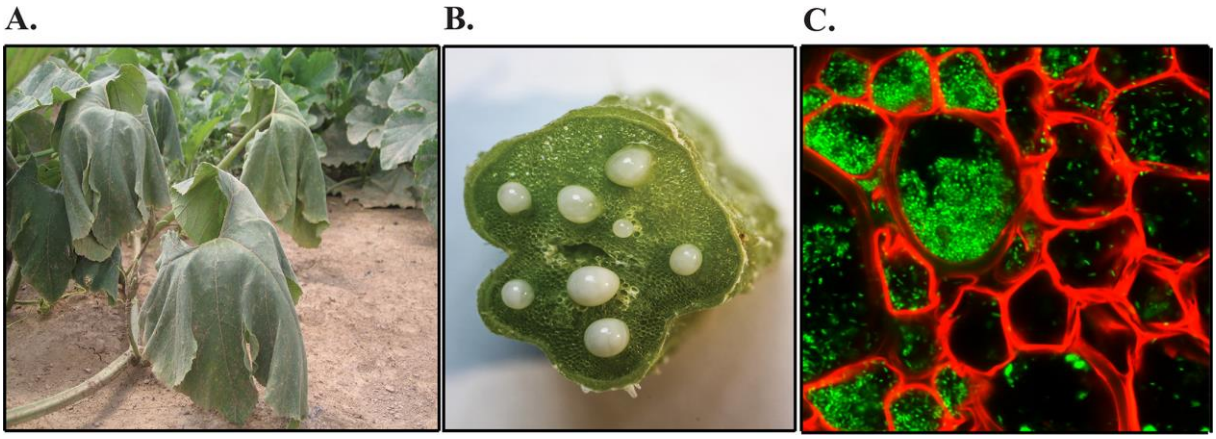
3.2.1. Epidemiologija

Bakterija *Erwinia tracheiphila* može inficirati biljku u bilo kojem razvojnom periodu ali su mlađe biljke osjetljivije i podložnije zarazi, kako navode Liu i sur. (2013). Patogen se najčešće unosi u tkivo biljke putem rana koje nastaju djelovanjem vektorskog kukca. Bakterija prezimi u probavnom traktu kukaca *Acalymma vittatum* F. ili *Diabrotica undecimpunctata howardi* Barber što je utvrđeno testom DASI-ELISA kako su naveli Garcia-Salazar i sur. (2000). Unatoč prolaska kroz probavni trakt kukaca, bakterija ne gubi svoju vitalnost. Ti vektori su, uz neke biljke trajnice, primarni izvor bakterijskog inokuluma, a hranjenjem na zaraženoj biljci patogen ulazi u vektora. Odrasli kukac se hrani stabljikom, listovima i dijelovima cvjetova. Patogen se zatim prenosi putem usnog aparata, te dalje kreće ksilemom gdje se umnožava i prenosi po biljci. Venuće počinje zbog prekomjernog umnožavanja bakterija u ksilemskom staničju i sekrecije izvanstanične polimerne tvari smolastog oblika koju izlučuje bakterija, a koja blokira prijenos vode u provodnom sustavu biljke (Sasu i sur., 2010).

3.2.2. Simptomi

Prvi simptomi se razvijaju na listovima, oko oštećenja prouzrokovanim hranjenjem vektora, i to u vidu zone koja je tamnije boje od ostatka lista (Smith, 1911), te cijela biljka

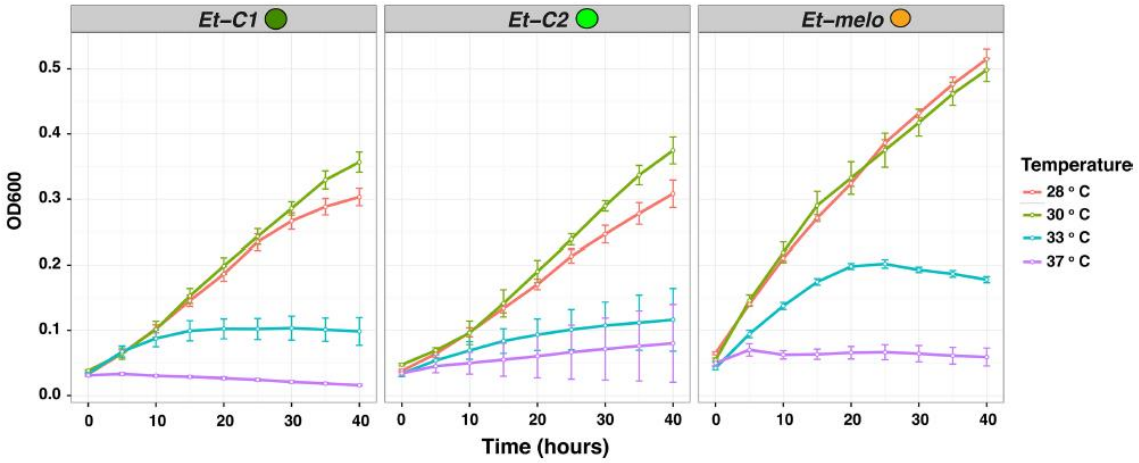
postupno poprima tamniju boju. Ako se radi o mlađim biljkama njihov razvoj može biti slabiji, a praćen je blagom promjenom boje listova. U početnim fazama infekcije biljka danju vene, a noću se oporavlja. Postupno gubi turgor, sve više vene i suši se. Prvo se smežuraju listovi i počinju se sušiti, zatim se suši stabljika, a naposljetku i cijela biljka. Rojas i sur. (2013) navode da se simptomi venuća javljaju 4–21 dan nakon ostvarivanja zaraze. Slika 3.2.2.1. prikazuje posljedice zaraze bakterijom *Erwinia tracheiphila*. Naravno, izraženost simptoma i brzina venuća uvelike ovisi o vrsti domaćina i njegovoj fenološkoj fazi (Brust 1997). Simptomi su vrlo slični onima koji se razvijaju pri nedostatku vode, te nalikuju utjecaju još nekih abiotskih čimbenika ali i pojedinim bolestima. Najbolji indikator bakterioze je bakterijski eksudat koji se može primijetiti kod starijih biljaka zbog puknuća između peteljke i stabljike. Ukoliko postoji sumnja na zarazu kod mlađih biljaka, zarezivanjem stabljike ili samim pritiskom na nju dolazi do curenja ljepljivog eksudata. Pošto kod tikvenjača postoje još neke bolesti provodnog staničja slične simptomatologije, najsigurnije je napraviti izolaciju bakterija i test PCR, kako navode Rojas i sur. (2015).



Slika 3.2.2.1. Posljedice zaraze biljaka bakterijom *Erwinia tracheiphila* na makroskopskoj i mikroskopskoj razini. (A) Vriježa zaražene buče u polju sa karakterističnim simptomom venuća. (B) Istjecanje eksudata *E. tracheiphila* iz začepljenih žila ksilema na presjeku simptomatične stabljike krastavca.(C) *In planta* konfokalna mikroskopska slika stanica bakterije *E. tracheiphila* (zelena boja) koje blokiraju ksilemsko provodno staničje (crvena boja) unutar tkiva tikvice.

Izvor: Shapiro i sur. (2018).

Temperatura od oko 28 °C najpogodnija je za umnožavanje bakterije *Erwinia tracheiphila* kako navode Shapiro i sur. (2018) u istraživačkom radu kojem su proučavali odnos temperature i rasta kolonija *in vitro* i njihove virulentnosti *in vivo*. Na slici 3.2.2.2. je grafički prikaz učinka temperature na *in vitro* rast bakterije *Erwinia tracheiphila*. Pojedinačni grafovi pokazuju *in vitro* rast za 7 izolata soja Et-C1, 2 izolata soja Et-C2 i 4 izolata soja Et-mela uzgojenih na četiri različite temperature. Rast bakterija procijenjen je optičkom gustoćom pri valnoj duljini od 600 nm (OD600), koja se mjerila svakog sata (tijekom ukupno 40 sati) i prikazan u intervalima od 10 sati. Svaka pojedinačna krivulja prikazuje prosječne vrijednosti ispitivanih izolata u odgovarajućem klasteru.

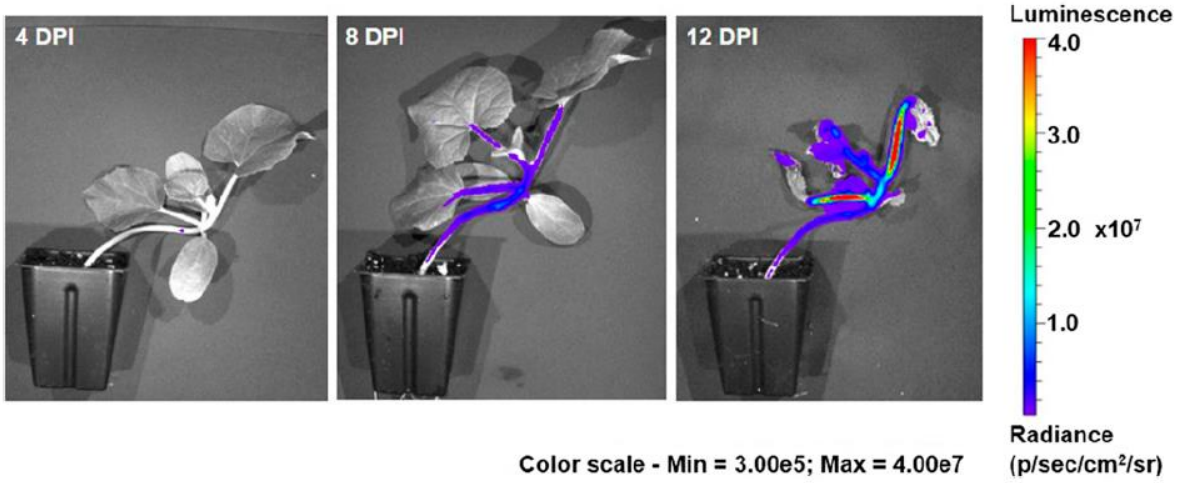


Slika 3.2.2.2. Grafički prikaz korelacije temperature i rasta kolonija bakterije *Erwinia tracheiphila in vitro*.

Izvor: Shapiro i sur. (2018).

3.2.3. Morfologija

Erwinia tracheiphila je gram-negativna, pokretna, fakultativno anaerobna bakterija koja se razvija u ksilemskom staničju. Spada u porodicu *Enterobacteriaceae.* Smith (1911), kao i Rojas i suradici (2015) napominju u svojim istraživanjima kako je od svih vrsta unutar roda *Erwinia*, vrsta *Erwinia tracheiphila* posebice teška za izolaciju iz maceriranog biljnog tkiva. Za izolaciju patogena najčešće se koristi ljepljiva nit, odnosno eksudat koji istječe prilikom prerezivanja vriježe (Arsenijević, 1997). Na hranjivoj podlozi s agarom formira male kolonije, kružnog oblika, bjelkastosive boje, sjajne površine. Slika 3.2.3.1. prikazuje rezultate istraživanja gdje je dinja sorte Athena FI zaražena sa 10^6 CFU (eng. *colony forming units*; stanice koje su sposobne oblikovati kolonije) bioluminiscentnih bakterija *Erwinia tracheiphila* TedCu10-BL#9 a nakon toga je fotografirana pomoću IVIS lumina sistema 3. Radi se o 4, 8 i 12 dana nakon inokulacije (DPI; eng. *days post inoculation*). Stabljika je prije inokulacije zarezana rezom od 1 mm pomoću sterilnog skalpela. Na većini biljka inokuliranih na ovaj način obavljena umjetna zaraza nije bila uspješna.



Slika 3.2.3.1. Prikaz širenja zaraze bakterijom nakon umjetne inokulacije biljke. Skala duginih boja predstavlja gustoću svijetlosti (brojnost fotona po sekundi).
Izvor: Virsman i sur. (2016).

3.2.4. Suzbijanje

Kad se ostvari zaraza biljke putem vektora, nema sredstva ili mjere koja može pomoći, tako da je glavni naglasak u suzbijanju bakterije na kontroli i suzbijanju vektora (*Acalymma vittatum* F. i *Diabrotica undecimpunctata howardi* Barber). Sama prisutnost vektora može dosta utjecati na konačni prinos zbog njegovog hranjenja na biljci, tako da se preporučuje suzbijanje u oba slučaja. U Americi se suzbija sredstvima na bazi karbarila, bifentrina, beta-ciflutrina, gama i lambda cihalotrina. Od njih, samo sredstva na bazi gama i lambda cihalotrina imaju dozvolu za tretiranje unutar nasada tikvenjača u RH (tražilica FIS, 2021). Unatoč tome, ti štetnici još nisu prisutni u našem području tako da nema informacija o suzbijanju sredstvima za zaštitu bilja.

Redovit pregled i održavanje higijene u nasadu je vrlo bitan čimbenik jer se može primijetiti simptom venuća listova na slabije razvijenim mladim biljkama ukoliko dođe do rane infekcije. Ako nije uzgoj na otvorenoj površini ulazak vektora se može spriječiti filterima za zrak unutar plastenika ili staklenika.

Bundeva jako privlači vektore i štiti dinju od njihove najezde. Na slici 3.2.4.1. prikazani su načini borbe protiv dolaska vektora ove bakterije bez primjene insekticida.



Slika 3.2.4.1. Različiti načini zaštite biljaka u uzgoju od vektora bakterije *Erwinia tracheiphila* bez primjene insekticida. Slika lijevo pokazuje dva reda bundeve (*Cucurbita maxima* L.) zasađene oko glavne kulture, dinje. Slika desno prikazuje zaštitu dinje od vektora *Acalymma vittatum* Barber u niskom tunelu.

Izvor: Rojas i sur. (2015).

3.3. *Xanthomonas cucurbitae* – uzročnik bakteriozne pjegavosti lista tikvenjača

Xanthomonas cucurbitae je bakterija koja uzrokuje bakteriozniu pjegavost lista tikvenjača. Ova bakterija je prvi put opisana od strane Bryana 1926. godine u New York-na bundevama. Tada je bila imenovana kao *Xanthomonas campestris* pv. *cucurbitae* ali joj je naziv, na prijedlog Vauterina i sur., 1995. godine izmijenjen u *Xanthomonas cucurbitae* kako se naziva i danas. U zadnjih 10 godina, po navodima Zhang i Babadoost (2018), bakteriozna pjegavost lista tikvenjača postala je jedna od najvažnijih bolesti koja se javlja u proizvodnji bundeva i buča na uzgojnim područjima u SAD-u, a ponajviše na području Illinoisa ali i ostalim proizvodnim područjima diljem svijeta. Zhang i Babadoost (2018) navode (prema Ravanlou i Babadoost, 2015) da gubitci u prinosu bundeva zbog bakterioze mogu doseći i do 100 %. Na području Georgie u SAD-u je zabilježena zaraženost 20–25 % nasada lubenica, uz napomenu da su su simptomi bili prisutni samo na listovima kako navode Dutta i sur. (2013). Bakterija je izolirana u Kanadi prvi puta 2012. godine, kako navode Trueman i sur. (2014). Bakterioza je zapažena u Aziji, Australiji, Europi i Sjevernoj Americi na krastavcima, bundevama, bučama i lubenicama (Ravanlou i Babadoost, 2015; Dutta i sur., 2013; Lamichhane i sur., 2010; Pruvost i sur., 2009; Pruvost i sur., 2008; Williams i Zitter 1996). Poznato je je ovaj patogen prisutan u Europi, a zabilježen je i na području Crne Gore u 2010. godini. Za sad nema izvještaja o pojavi i širenju ove bakterioze u RH, premda je spomenuta u Glasilu biljne zaštite 2019. godine (Plavec, 2019). Unošenje ovog patogena i širenje bolesti koje on uzrokuje u našoj zemlji predstavlja ozbiljnu prijetnju te je za njegovo spriječavanje važna prevencija.

3.3.1. Epidemiologija

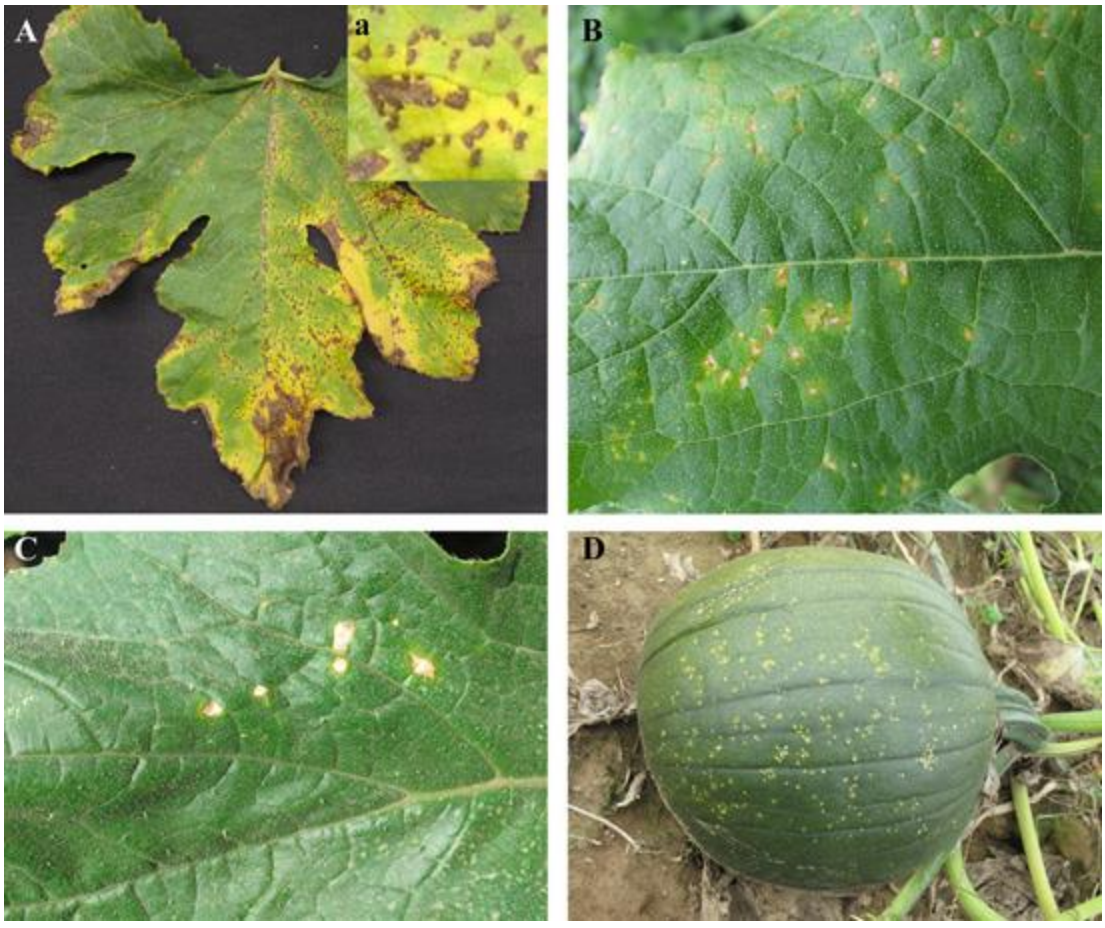
Još uvijek se istražuje biologija bakterije *Xanthomonas cucurbitae* i epidemiologija same bakterioze, kako navode Zhang i Babadoost (2018). Bakterija se prenosi sjemenom (Williams i Zitter, 1996) ali i unutar biljnih ostataka, kako navode Babadoost i Zitter (2009). Bakterijski inokulum se prenosi i vodom (navodnjavanje, kiša), te radnim priborom. Optimalna temperatura za razvoj bakterije je 25–30 °C i patogen se prestaje umnožavati nakon 35 °C. U istraživanju Babadoost i Zitter (2009) su pokušali izolirati patogena iz tla, no nisu uspjeli, stoga se zaključuje da se dosadašnjim istraživanjima nije dokazalo održavanje infektivnog inokuluma u tlu.

3.3.2. Simptomi

Prvi simptomi se mogu opaziti na kotiledonama biljaka u obliku blago ulegnutih pjega tamnije boje. Dobro vidljivi simptomi se u vidu lezija javljaju na prvim pravim listovima prilikom porasta temperature i vlage u fazi 4 lista kako navode Ravanlou i Babadoost (2015).

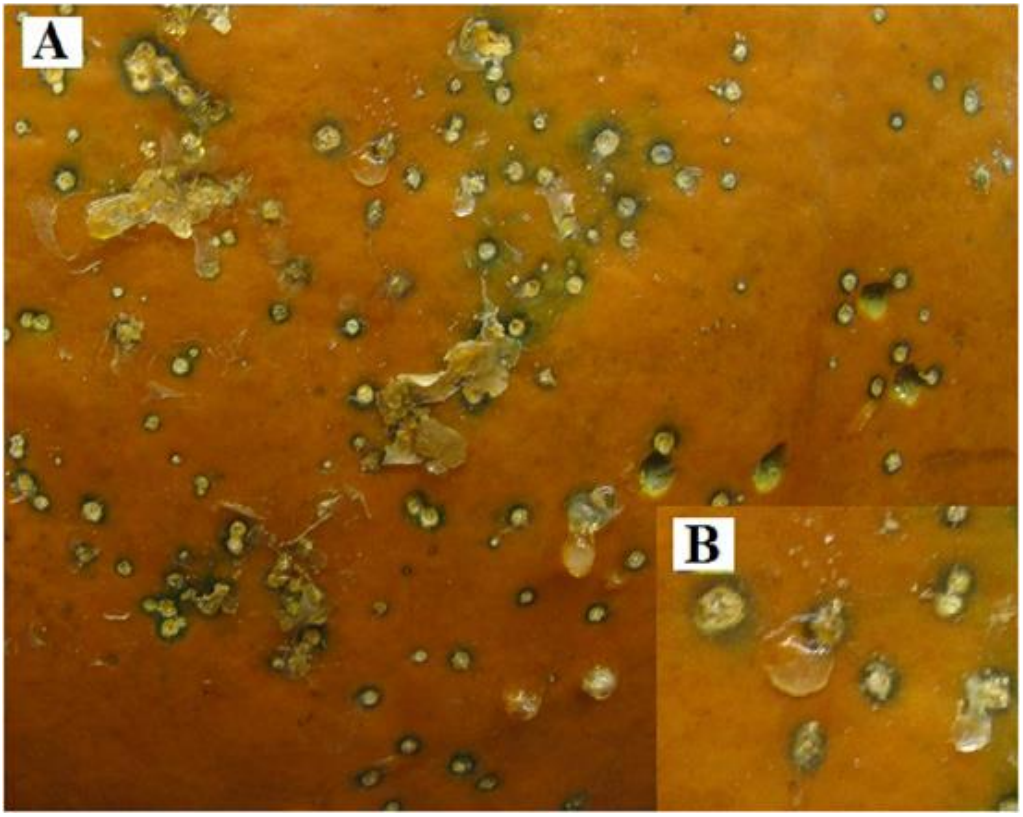
Početne lezije su male (oko 1 mm promjera), vodenaste, oštrih rubova, nijansi žute i smeđe boje. Kasnije se neke od lezija povećavaju, nekrotiziraju od unutrašnjosti prema van, s prozirnim su centrom i imaju klorotičan obrub. Gustoća lezija može biti velika stoga dolazi do spajanja i sušenja cijelog lista (Slika 3.3.2.1.). Kod otpornijih sorti na rubovima lezija se stvara meristemizacijom pluteni kambij i nekrotično tkivo otpada. U tom slučaju listovi ostaju rupičasti.

Zbog tog simptoma na otpornijim sortama se može bakterioznu pjegavost lista ponekad zamijeniti s poligonalnom pjegavosti (uzročnik je *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*). Simptomi se na plodovima javljaju najkasnije, negdje tjedan dana prije berbe, u obliku vodenastih pjega sa svjetlijim klorotičnim rubom, sličnim onima na listovima ali manjih promjera (oko 1 mm) (Slika 3.3.2.2.). Što je zreliji plod i kako time postaje veći, proporcionalno se javlja više pjega koje su većih dimenzija. Ravanlou i Babadoost (2015) navode da može doći do formiranja lezija koje dosežu duboko u meso ploda pri čemu može doći dopucanja površine, što rezultira razvojem truleži. U slučaju pogodnih uvjeta za razvoj ove bakterioze, doći će do pojave većih lezija na plodovima što dovodi do masovne truleži i propadanja plodova, te se na mjestu pucanja kore plodova vidi bakterijski iscjedak (Babadoost i Zitter 2009).



Slika 3.3.2.1. Prikaz simptoma *Xanthomonas cucurbitae* na bundevi. (A), (B) i (C) varijacije lezija koje se javljaju na licu lisne plojke, (D) lezije na plodu bundeve.

Izvor: Ravanlou i Babadoost (2015).



Slika 3.3.2.2. Prikaz vodenastih pjega na zrelijem plodu bundeve. (A) površina ploda, (B) detalj površine ploda s vodenastim pjegama i bakterijskim iscjedkom (eksudat).

Izvor: Ravanlou i Babadoost (2015).

3.3.3. Morfologija

Bakterija *Xanthomonas cucurbitae* je žuta, aerobna, gram-negativna, štapićasta bakterija dimenzija 0,4–0,6 × 0,5–1,3 µm koja ne formira spore (William i Zitter, 1996). Spada u porodicu *Xanthomonadaceae*. Na agarskoj podlozi YDC (ekstrakt kvasca, dekstroza, $CaCO_3$) ova bakterija formira žute, sluzave, blago sjajne kolonije (Ravanlou i Babadoost, 2015).

3.3.4. Suzbijanje

Bakterija se prenosi sjemenom tako da je certificirano zdravo sjeme najvažnija mjera suzbijanja za ovu bakteriju. Mjere za suzbijanje su većinom iste kao i za uzročnika poligonalne pjegavosti. Značajan utjecaj na učestalost i jačinu šteta od ove bakterioze postiže se poštivanjem plodoreda, dubokim oranjem u jesen, higijenom i održavanjem polja, plastenika, staklenika, pribora, alata i strojeva. Prekomjerno navodnjavanje, vlaga ili loša drenaža pružaju dobre uvjete za širenje bakteriozne pjegavosti lista tikvenjača. U Hrvatskoj nema aktivnih tvari registriranih specifično za suzbijanje ove bakterioze.

3.4. *Acidivorax citrulli* – uzročnik bakteriozne mrljavosti ploda tikvenjača

Acidovorax citrulli je bakterija koja uzrokuje bakterioznu mrljavost ploda lubenice ali i ostalih biljaka unutar porodice tikvenjača. Bolest je prvi put zabilježena na lubenici 1965. godine na površini poljoprivredne stanice za introdukciju biljaka USDA na području Georgie u SAD-u (Goth i Webb, 1965). Schaad i suradnici navode (2003) da su se trinaest godina kasnije pojavili isti simptomi bolesti, iz istog izvora sjemena, te je uzročnik imenovan kao *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp*. citrulli* (Schaad i sur., 1978). Simptomi su se javljali samo na klijancima i pretpostavlja se da je to bilo zbog nepovoljnih vremenskih uvjeta. Prvom pravom pojavom simptoma na plodovima lubenice se smatra 1969. godina u Floridi, kako navode Crall i Schrenck (1969). Oni su uspjeli povezati okolnosti i pretpostaviti da se radi o istom uzročniku bolesti kako navode Latin i Hopkins (1995). Osamdesetih godina nije došlo do znatnih nalaza ove bakterioze ali je 1978. godine u Australiji objavljen izvještaj gdje je prvi put upotrijebljen opis „bakteriozna mrljavost“, dok je za uzročnika naveden rod *Pseudomonas* (Latin i Hopkins, 1995). Nije prošlo dugo kad se ova bolest počela širiti po SAD-u. Prvo se pojavila na Floridi 1987. godine gdje je zabilježen katastrofalan gubitak usjeva lubenice (Wall i Santos, 1998, prema Somodi i sur. 1991), a 1988. godine i na Guamu i Tinianu (otocima u SAD). Tada se bolest opisivala prljavo tamnim lezijama koje su se javljale na plodovima lubenice (Somodi i sur., 1991). Nakon toga se bakterioza javila u Indiani, Oklahomi, Teksasu (Latin i Rane, 1990, preme Jacobs i sur., 1992, Black i sur., 1994), a zadnjih desetak godina je nalažena diljem svijeta, kako navode Burdman i Walcott (2012). Iz *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp*. citrulli* je bakterija preimenovana u *Pseudomonas avenae* subsp. *citrulli* jer su Hu i sur. (1991) uočili sličnost između te vrste i *Pseudomonas avenae*. U *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* je preimenovana 1992. godine od strane Willems i sur. jer je po njihovim istraživanjima ova vrsta fenotipski najbliže rodu *Acidovorax*. Na posljetku, 2008. godine je patogen nazvan *Acidovorax citrulli* (Shaad i sur., 2008). Patogen je izoliran iz lubenice gdje uzrokuje najveće štete ali se javlja i na dinji, tikvici, krastavcu, pa čak i na rajčici i patlidžanu (Burdman i Walcott, 2012). Patogen je na EPPO listi A1 karantenskih štetočinja, te je poznato da je prisutan i u Europi. Godine 2014., na ljeto, je utvrđena na području Srijema u Srbiji (Zlatković i sur. 2019, prema Obradović i sur. 2014, Popović i Živanović 2014). U sjevernoj Makedoniji je bakterija nađena na usjevu lubenica 2019. godine, te je prouzročila štete do 90 % smanjenog prinosa na 5 ha, kako navode Mitrev i Arsov (2019). U Hrvatskoj nema provedenih istraživanja izolacije ovog patogena, niti ima registriranih sredstva za zaštitu (FIS, 2021).

3.4.1. Epidemiologija

Način prijenosa, odnosno epidemiologija *Acidivorax citrulli* još nije poznata. Pretpostavlja se mogućnost prezimljenja patogena u zaraženim biljnim ostatcima unutar tla i unutar alternativne biljke domaćina. Sjeme predstavlja najvažniji izvor primarnog inokuluma, prema tome se u sjemenu održava i njime se prenosi kako navode Rane i Latin (1992). Pošto je za vrijeme ostvarivanja zaraze zapaženo prodiranje bakterije do plodnice cvijeta pretpostavlja se da na taj način patogen kontaminira sjeme (Lessl i sur., 2007). U nekim istraživanjima se navodi kako pčele mogu pridonijeti u prijenosu ove bakterije u fazi oprašivanja zbog prodora patogena unutar ženskog cvijeta u fazi cvatnje (Fessehaie i sur., 2005). Poznato je da je za širenje ove bakterioze, kao i kod mnogih drugih fitopatogenih bakterija, pogodna visoka temperatura i vlažnost zraka, posebice gusti sklop i prekomjerno navodnjavanje. Ukoliko se ne reguliraju ti parametri može doći i do 100 % zaraze biljaka, posebice ako se radi o zatvorenom prostoru rasadnika (Rane i Latin, 1992).

Postoji mogućnost sekundarne latentne zaraze na biljkama na kojima je već prisutan uzročnik ali u uvjetima koji još nisu povoljni za razvoj bakterijske populacije. Simptomi na sjemenu ili latentno zaraženim biljkama nisu vidljivi i to dodatno otežava prevenciju prenošenja inokuluma.

3.4.2. Simptomi

Prvi simptomi su vidljivi već 5–8 tjedana nakon sadnje na kotiledonima, uz nervaturu, u obliku vodenastih pjega nepravilnih oblika (Slika 3.4.2.1.). Već nakon par dana tkivo unutar pjega nekrotizira i tamni. Ako infekcija zahvati hipokotil, doći će do odumiranja biljke već u ranim fazama rasta. Na listovima se mogu uočiti sitnije pjege nepravilnog oblika tamne boje. Isto tako sitne tamne pjege se javljaju na vriježama koje vremenom nekrotiziraju, pucaju, te se javljaju uzdužne rane. Na mjestu formiranja rane može se pojaviti bakterijski eksudat (OEPP/EPPO, 2016).

Veliki problemi nastaju kod karakterističnih simptoma koji se javljaju na zrelim plodovima lubenice i dinje. To su vodenaste, maslinastozelene sitnije pjege koje se javljaju na gornjoj strani ploda. Vremenom pjege rastu i razvojem poprimaju sve nepravilniji oblik (Slika 3.4.2.2.). Mogu prekriti cijeli gornji dio ploda već prije fiziološke zrelosti (OEPP/EPPO, 2016; Slika 3.4.2.3.). Pjege poprimaju tamniju boju, nekrotirizaju i pucaju. Kroz nastale lezije u plod mogu prodrijeti i drugi patogenih te može doći do sekundarnih infekcija, a uz dodatno djelovanje saprofita na kraju dolazi do truleži plodova. Inficirani plodovi potpuno gube na vrijednosti i nisu više upotrebljivi, kako navode Obradović i sur. (2014).



Slika 3.4.2.1. Prikaz vodenastih pjega na naličju kotiledona u ranom stadiju zaraze bakterijom *Acidovorax citrulli*.

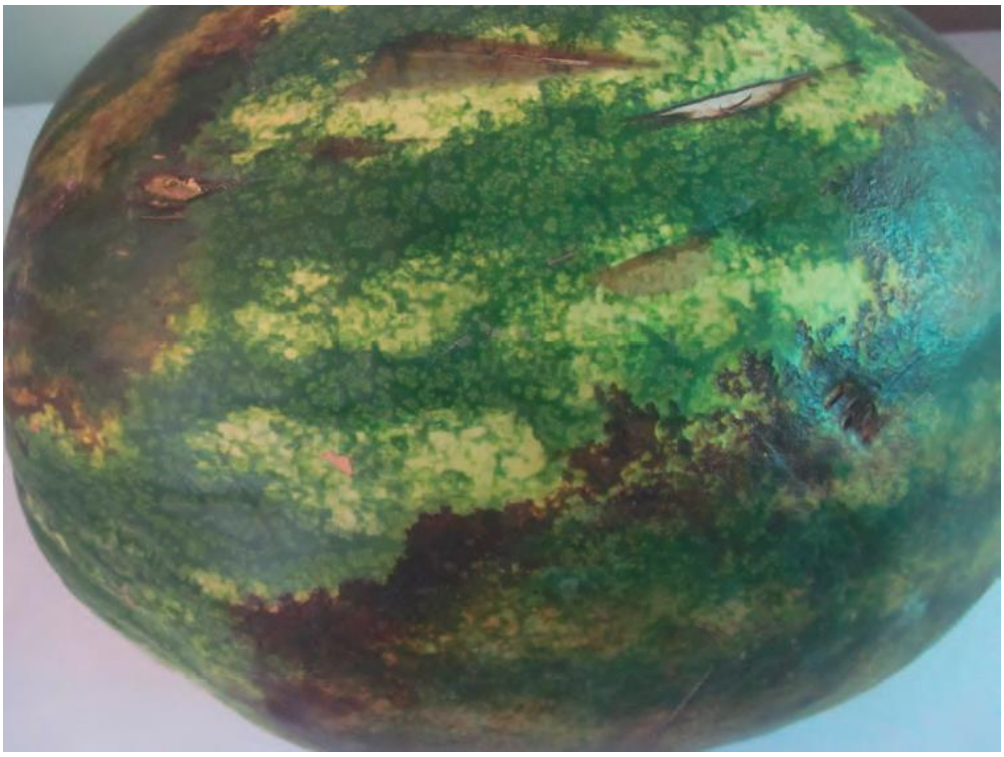
Izvor: N. Zlatković (2019).



Slika 3.4.2.2. Vodenaste pjege nepravilnog oblika kao posljedica zaraze bakterijom *Acidovorax citrulli*.

Izvor: EPPO Global Database

https://gd.eppo.int/taxon/PSDMAC/photos – pristup 7.7.2021



Slika 3.4.2.3. Simptomi mrljavosti ploda tikvenjača uzrokovanoj bakterijom *Acidovorax citrulli* na plodu lubenice.

Izvor: N. Zlatković (2019).

3.4.3. Morfologija

Acidovorax citrulli je gram-negativna aerobna bakterija, ravnog ili blago zakrivljenog štapićastog oblika dimenzija 0,5 × 1,7 µm, sa jednom dugom polarnom flagelom (Burdman i Walcott, 2012). Na King B podlozi kolonije su okruglaste, glatke, transparentne i bez pigmenta. Optimalne temperature za rast *in vitro* su 27–30 °C. Spada u porodicu *Comamonadaceae*.

3.4.4. Suzbijanje

Neke sorte lubenice su pokazale veću otpornost na patogena nego druge i to se podudara s bojom kore lubenice. Lubenice s tamnijom bojom kore su otpornije nego svijetlije i prugaste kako navode Webb i Goth (1965).

Kako postoje otpornije sorte lubenice tako postoji razlika između sojeva ovog patogena, odnosno razlike reakcije koje izazivaju kod biljke domaćina. Walcott i suradnici (2000) su utvrdili pomoću gel elektroforeze DNA, analize masnih kiselina (GC-FAME) i PCR-a da se sojevi ove vrste mogu razdvojiti na barem dvije različite genetičke skupine. Sojevi koji spadaju u prvu skupinu su izolirani iz raznih domaćina, a sojevi druge grupe su uglavnom

izolirani iz lubenice i oni su znatno agresivniji. Geni *hrp* koji kontroliraju komponente sistema sekrecije tip III (T3SS) imaju ključnu ulogu u pogledu patogenosti većine fitopatogenih bakterija kao i *A. citrulli* (Bahr i Burdman, 2010).

Primarni izvor inokuluma je sjeme putem kojeg dolazi do uzgojnih površina, stoga su zaštitne mjere i sprječavanje širenja bakterioze dosta zahtjevne (Hopkins i Latin, 1995, prema Rane i Latin, 1992). Detaljne epidemiološke karakteristike još uvijek nisu poznate stoga suzbijanju treba pristupiti oprezno.

Na prvom mjestu bi trebala biti primjena zdravog, certificiranog sjemena, plodored, izbjegavati prekomjerno navodnjavanje, provoditi higijenske mjere u rasadniku, pogotovo ako se radi o plasteniku ili stakleniku. U higijenske mjere na otvorenom podrazumijeva se i zaoravanje biljnih ostataka u jesen te izbjegavanje gustog sklopa jer u slučaju veće vlage ili pak jačih kiša može doći do učestalih zaraza. Najvažnije je ipak imati kontrolirane uvjete, reagirati na mogućnosti izvora infektivnog inokuluma i pokušati spriječiti abiotski stres biljke. Ako ipak dođe do pojave znakova zaraze na biljci, zaraženu biljku je poželjno odmah ukloniti. Ako primijetimo da je zahvaćen cijeli usjev, otvorena je opcija uništavanja biljaka spaljivanjem. Sjeme se može tretirati otopinama HCl (1 %) ili CaOCl2 (1 %) uz izlaganje agensima u vremenu od 15 minuta (Hopkins i sur., 1996). Tretmani sjemena uključuju i termoterapiju, NaOCl, fermentaciju, HCl i peroksioctenu kiselinu koji znatno smanjuju uspješnost prijenosa patogena, ali mogu negativno utjecati na fiziologiju sjemena (Fatmi i sur., 2005).

Postoje nepatogeni sojevi *A. citrulli* koji imaju potencijal za biološko suzbijanje kako bi se kontrolirali patogeni sojeva iste vrste (Johnson i sur., 2011). Nađena su dva soja rizobakterija koje imaju posebno inhibitorno djelovanje prema patogenu (Adhikari i sur., 2017). Radi se o relativno novim istraživanjima koja se mogu uzeti u obzir u budućim pokušajima zaustavljanja prijenosa ove ekonomski vrlo štetne fitopatogene bakterije.

3.5. *Serratia marcescens* – uzročnik žućenja vriježa

Serratia marcescens je bakterija koja uzrokuje žućenje vriježa (eng. *Cucurbit yellow vine disease*, CYVD). Biljke koje su domaćini ovoj bakteriji su uglavnom iz porodice *Cucurbitaceae* ali najčešće se javlja na buči i bundevi, a razlog tome je ishrana vektora baš na tim kulturama. Prvi put je ova bakterioza zapažena 1988. godine na uzgojnim površinama lubenice unutar SAD-a, u Oklahomi i Texasu, kako navode Zlatković i sur. (2019). Trenutno nije poznato da je bakterija prisutna na našem području ali kako postoji mogućnost introdukcije vektora, treba uvijek biti na oprezu. Osim što je razlog tome činjenica da ona može uzrokovati gubitke ukupnog prinosa i do 100 %, te time predstavlja veliku opasnost za uzgoj tikvenjača na području SAD-a (Bruton i sur., 2003) i drugdje, potrebno je imati u vidu da je ova vrsta oportunistički patogen ljudi (Cooney i sur., 2014). Isti izvor navodi kako je ova vrsta bakterije uzrokovala različite vrste cistitisa, atritis, zarazu oka i respiratornog trakta, meningitis, endokarditis te zaraze postojećih rana. Između ostalih sojeva ove bakterije, izolirani su i pojedini koji imaju potencijal u biološkom suzbijanju drugih fitopatogenih mikroorganizama (Cooney i sur., 2014).

3.5.1. Epidemiologija

Serratia marcescens se prenosi putem vektora *Anasa tristis,* to je stjenica iz porodice Coreidae. Bakterija prezimi u tijelu vektora te se na proljeće prilikom njegovog hranjenja (sisanje) prenosi na biljku domaćina (Wayadande i sur., 2009). Od akvizicije do inokulacije treba proći samo jedan do dva dana (Bextine, 2001, preme Wayadande i sur., 2009). Vektor ga prenosi do floemskog staničja odakle se dalje prenosi unutar biljke.

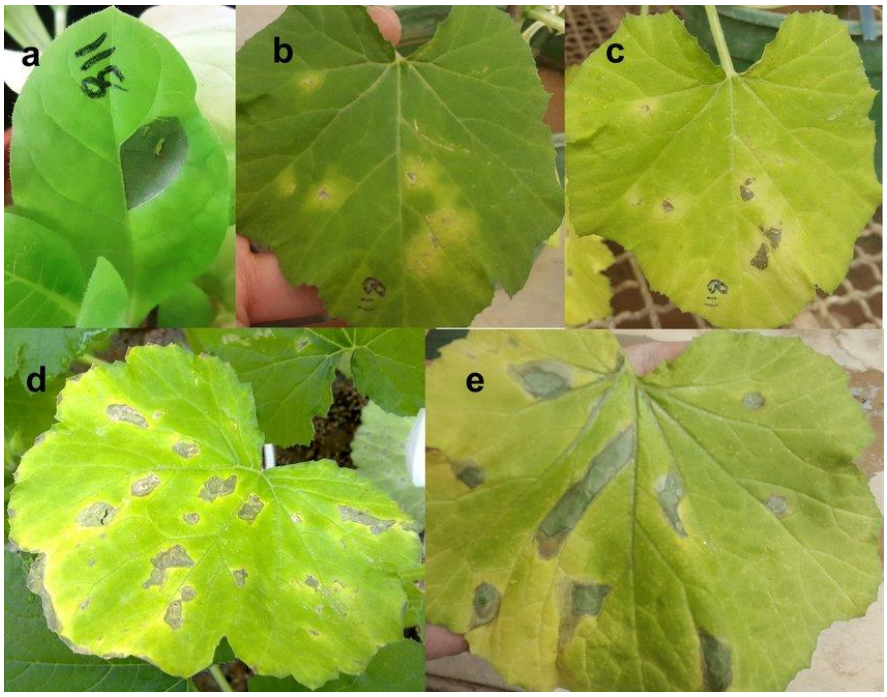
3.5.2. Simptomi

Simptomi bakterioze se javljaju 2–3 tjedna prije fiziološke zrelosti plodova, kako navode Zlatković i sur. (2019). Listovi žute, prestaju rasti, floemsko staničje smeđi. Može doći do naglog venuća vriježa bez popratnih simptoma (Zlatković i sur., 2019). Zbog otežane dijagnostike ovog patogena, često se greškom zamjenjuje s bakterioznim venućem krastavaca, ili pak sa fuzariozom, kako navode Seebold i Bessin (2011). Isto tako može doći do sekundarnih infekcija preko zaraženih vriježa ili listova koje dodatno otežavaju stanje biljke. Slika 3.5.3.1. prikazuje simptome uzrokovane ovom bakterijom.

3.5.3. Morfologija

Serratia marcescens je štapićasta, gram-negativna, anaerobna bakterija koja se razvija u flomskom staničju. Patovari te vrste inficiraju ljude, mogu prebivati u tlu, patogeni su kukaca, endofiti biljaka, te patogeni biljaka koji napadaju floem. Kako to da vektor *Anasa*

tristis može preživjeti uz prisustvo ove bakterije jedno je od pitanja na koje se još ne zna odgovor. Na hranjivoj podlozi s agarom formira okruglaste, glatke sjajne kolonije s ružičastocrvenim pigmentom. Spada u porodicu u *Enterobacteriaceae* (Besler i Little, 2016).



Slika 3.5.3.1. Simptomi zaraze biljaka nakon umjetne zaraze bakterijom *Serratia marcescens*. Kloroza na listu duhana (a). Na istom listu buče razvile su se klorotične pjege 5 dana nakon inokulacije (b) i nekrotične pjege 10 dana nakon inokulacije (c).
Promjene boje listova s nekrozama (d i e).
Izvor: Ebrahim Osdaghi, Serratia marcescens associated with squash leaf chlorosis and necrotic spots in Iran - Scientific Figure on ResearchGate
https://www.researchgate.net/figure/Hypersensitive-response-in-tobacco-plants-a-and-symptoms-on-squash-plants-b-e-induced_fig1_321489847 – pristup 28.7.2021.

3.5.4. Suzbijanje

Suzbijanje se provodi uglavnom suzbijanjem vektora. U vrijeme oprašivanja se grijanjem površine biljaka može spriječiti mehanički prijenos bakterije s vektora. Alternativa je primjena insekticida folijarno, prije njihove pojave ili sistemici neposredno pred pojavu. Ličinke su osjetljivije nego odrasli kukci, tako da bi se insekticidi, radi što bolje učinkovitosti, trebali primjenjivati u točno propisano vrijeme. Postoji mogućnost postavljanja mreža oko usjeva, u smislu barijera, kako bi se vektorima onemogućio pristup. Uz navedeno, uklanjanje zaraženih biljnih ostataka i plodored bi trebale biti obavezne mjere suzbijanja.

3.6. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* – uzročnik pjegavosti i venuća zeljastih biljaka

Pseudomonas syringae pv. *syringae* je bakterija koja uzrokuje pjegavost i venuće zeljastih biljaka, te pojavu rana i bakterioznog odumiranja voćaka. Prvi put je zabilježena 1902. godine u Nizozemskoj, prilikom izolacije iz *Syringa vulgaris* L. (obični jorgovan), po kojem je ova vrsta dobila ime. Široki je spektar domaćina karakterističan za ovu vrstu, te postoji preko 50 njenih patovara (Rudolph i sur., 1997). Bakterija je prisutna diljem svijeta, a isto tako je vrlo zastupljena u Europi i državama oko Hrvatske (Slika 3.6.1.). U Srbiji je zabilježena 2014. godine kao uzročnik lisne pjegavosti uljane tikve odnosno buče (Balaž i sur., 2014). Postoji mogućnost da je već ima na uzgojnim površinama Hrvatske ali još nije evidentirana. Ova vrsta je izraziti polifag, a opasnost za tikvenjače jer izrazita jer su joj one učestali domaćini.



Slika 3.6.1. Areal bakterije *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* u središnjoj i istočnoj Europi.
Izvor: Izvor: CABI/EPPO, 2021. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*
https://www.cabi.org/isc/datasheet/45014#toDistributionMaps – pristup 3.7.2021.

3.6.1. Epidemiologija

Kod zeljastih biljaka patogen se prenosi sjemenom ili zaraženim biljnim ostacima. Do infekcije dolazi i tijekom vegetacije ukoliko je jedna od obližnjih biljaka zahvaćena bakteriozom. Epidemiologija ove vrste još nije istražena do kraja i to predstavlja dodatni problem u proizvodnji.

U istraživanjima koje traje već 13 godina, analizom sojeva *Psoudomonas syringae* izoliranih iz različitih okruženja i staništa, utvrđeno je da je ova vrsta filogenetski kompleks

na temelju divergencije genomskih sekvenci podijeljen na 13 filogrupa (Berge i sur. 2014, prema Newberry i sur., 2018). Navodi se kako grupe 1 do 8 uključuju sve prepoznatljive patovare i patotipske sojeve, a preostale grupe uključuju ostale sojeve koji su porijeklom iz prirodnog okruženja.

3.6.2. Simptomi

Simptomi se na tikvenjačama prvo javljaju na kotiledonima (već 3 dana nakon inokulacije) i to u obliku vodenastih pjega (Newberry i sur., 2018). U početku su to pjege isprane zelene boje (Slika 3.6.2.1.), kasnije postaju kružne nekrotične lezije koje se šire po pravim listovima. Rubovi nekroza se odvajaju i otpadaju. Na lubenici su lezije sivkaste do crne, s klorotičnim prstenom, dok su kod buča pjege većinom žute boje.



Slika 3.6.2.1. Poligonalne svijetlozelene pjege na listovima krastavca zaraženim bakterijom *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*.

Izvor: N. Zlatković (2019).

3.6.3. Morfologija

Pseudomonas syringae pv. *syringae* je gram-negativna, aerobna, štapićasta bakterija koja ne formira spore. Svi sojevi proizvode fluorescentni pigment i enzim katalazu. Kolonije bakterije su kružne, bijele boje, konveksne i sluzave na saharoznoj podlozi s agarom (5 % saharoze), kako navode Balaž i sur. (2014). Bakterija za rast i razvoj preferira vlažnije uvjete s temperaturama od 25–28 °C.

3.6.4. Suzbijanje

Pošto se bakterija prenosi sjemenom, zdravo, certificirano sjeme je obavezno. Ako takvo sjeme nije moguće nabaviti potrebno je obaviti dezinfekciju sjemena vrućom vodom, premda taj postupak može smanjiti brojnost, ali ne i potpuno eliminirati patogena (Sharma i sur., 2016). Kao i za većinu bakterija, uništavanje biljnih ostataka, plodored i održavanje higijene su vrlo značajne mjere sprječavanja nastanka velikih šteta uzrokovanih ovom bakterijom. Također, za suzbijanje ove vrste bakterija, djelotvorne su iste mjere zaštite kao i one ranije navedene kod opisa bakterije *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* (poglavlje 3.1.4.)

3.7. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* – uzročnik vlažne truleži

Pectobacterium carotovorum subsp. *carotovorum* je bakterija koja uzrokuje vlažnu trulež, a najčešće je to na korjenastim biljkama. *Pectobacterium* je prethodno klasificiran u rod *Erwinia*, koji je bio podijeljen u nekoliko vrsta i podvrsta. Podjela se temelji na molekularnoj i biokemijskoj analizi, te razlici u rasponu domaćina, kako navode Dana i sur. (2015). Nekoliko vrsta iz roda *Erwinia* su prekvalificirane u rodove *Erwinia, Brenneria, Pectobacterium, Dickeya i Pantoea* (Waleron i sur., 2002, prema Samson i sur. 2005). Jones je bakteriju otkrio 1901. godine na mrkvi, kako navodi Arsenijević (1997). Do danas, ona je prisutna diljem svijeta. Radi se o polifagnoj vrsti s velikim brojem domaćina. Često se nalazi na krumpiru, luku, mrkvi, salati, a biljke domaćini mogu biti i tikvenjače. Ne rijetko se javlja na lubenici, dinji i krastavcu (Dana i sur., 2015). U Španjolskoj je patogen nađen na opijumskom maku (*Papaver somniferum* L.), kako navode Aranda i sur. (2008)., te se kasnije proširio po Europi. Nisu nađeni podaci da je ova vrsta u Hrvatskoj detektirana na tikvenjačama, ali je poznata kao jedan od uzročnika vlažne truleži krumpira (crna noga krumpira) i drugih domaćina, te je 2019. g. izolirana iz luka (Ivić i sur., 2020). Trenutno ne predstavlja veliku opasnost za uzgoj tikvenjača ali bi prisutnost te bakterije u bliskoj budućnosti mogla stvarati probleme zbog čimbenika pogodnih za njen opstanak i uspješno prenošenje, kao što je to slučaj kod luka.

3.7.1. Epidemiologija

Bakterija se prenosi sjemenom, ali jednako tako ulazi u biljku kroz razna oštećenja. Štete na biljci su prouzrokovane uglavnom ishranom kukca, abiotskim čimbenicima (najčešće su to klimatski uvjeti, npr. tuča), oštećenja prouzrokovana oruđem ili strojevima itd. Prijenos dodatno pospješuje voda (navodnjavanje ili kiša), vjetar te muhe koje privlači miris truljenja, kako navodi Arsenijević (1997). Patogen se uglavnom lokalizira u vodenastim dijelovima biljaka, a to su u prvom redu plodovi i korijen. Stoga se često razvoj bakterijske populacije u biljci može nastaviti u skladištima i tamo dodatno uvećati štete.

3.7.2. Simptomi

Simptomi bakterioze se uglavnom zapažaju na plodovima ili na vodenastim dijelovima biljke ali se mogu javiti i na listovima i stabljici (Slika 3.7.2.1.). Prvi simptomi su vodenaste pjege koje su u početku sitnije, a vremenom se šire. Kako se šire, u sredini pjege dolazi do sve uočljivije razgradnje tkiva zbog djelovanja pektolitičkih enzima koji razgrađuju središnju lamelu unutar biljnih tkiva. Nakon toga stanice pucaju, tkivo mekša i truli. Simptom je prepoznatljiv i podsjeća na vlažnu trulež (eng. *soft rot*) po čemu je bakterioza dobila ime (Arsenijević, 1997). Na kraju cijeli zahvaćeni dio tkiva truli, ovisno o kojem dijelu biljke se radi, biljka ugiba, a ako se radi o plodu on potpuno gubi uporabnu vrijednost.



Slika 3.7.2.1. Simptomi bakteriozne truleži na plodovima, listu i stabljici krastavca.
Izvor: Plant Disease 101:279-287 (2017).
https://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PDIS-05-16-0763-RE – pristup 28.7.2021.

3.7.3. Morfologija

Pectobacterium carotovorum subsp. *carotovorum* je gram-negativna, fakultativno anaerobna, štapićasta bakterija, dimenzija 0,5–1,0 x 1,0–3,0 µm, koja ne formira spore. Flagele su peritriho razmještene. *Erwinia carotovora* luči brojne enzime koji razgrađuju biljne stanične stijenke, poput pektolitičkih enzima (koji razgrađuju pektin), celulaze (koja razgrađuje celulozu), hemicelulaze, proteinaze i sl. Kao mezofilna bakterija, *Erwinia carotovora* najbolje uspijeva u temperaturnom rasponu između 27 i 30 °C i preferira vlažnije uvjete, ali je dosta osjetljiva na povišene temperature (Czajkowski i sur, 2015). *In vitro* na agarnoj hranjivoj podlozi stvara kružne, bjelkastosive kolonije, hrapavije površine. Na podlozi King B nije fluorescentna.

3.7.4. Suzbijanje

Na početku, kao najznačajniju mjeru suzbijanja prijenosa bakterije *Erwinia carotovora* treba navesti upotrebu zdravog sadnog materijala tj. certificirano zdravo sjeme u slučaju sjetve. Ako se pojave simptomi treba zaraženu biljku što prije ukloniti s uzgojne površine. Zaštita biljka od ozljeda, te oprezno upravljanje strojevima i oruđem također imaju znatan utjecaj u sprječavanju prijenosa bakterije. Potrebno je zaštititi biljke od stresa uzrokovanog klimatskim čimbenicima te izbjegavati prekomjerno navodnjavanje (Arsenijević, 1997). Posebice treba paziti na korektno skladištenje. Dobra prohodnost zraka, te što niža temperatura zraka koja ne utječe na kvalitetu uskladištenog proizvoda dobra su strategija u sprječavanju razvoja šteta u skladištima. Prilikom uskladištavanja potrebno je paziti na vlagu i stanje ploda koji se unosi u skladište.

4. Dijagnostika bakterioza tikvenjača

Da bi se dijagnosticiralo bakteriozu, potrebno je u uzorcima biljnog tkiva identificirati uzročnika bolesti. Uzorak je dio biljke koji sadrži vidljive simptome bakterioze te se na njemu provodi analiza (Klement i sur., 1990; prema Đermić, 2007). Oni se mogu razlikovati ovisno o kojoj bakteriji je riječ, a mnogi se od njih pojavljuju u različitim bolestima. Kod većine latentnih bakterioza, u uzorku je moguće detektirati fitopatogenu bakteriju, premda se radi o asimptomatskom biljnom tkivu. Uzorak bi trebao biti što svježiji, ali ukoliko uzorak neće ići odmah na dijagnostičku analizu, potrebno ga je čuvati u hladnjaku.

Nakon toga se najčešće vrše izolacija i uzgoj bakterija iz biljnog tkiva, a zatim i pročišćavanje pročišćenih bakterijskih izolata. Za izolaciju i uzgoj nam je potreban hranjivi bakteriološki agar. Uglavnom se za izolaciju bakterija koriste podloge NA (engl. *nutrient agar*) i King B (prema Klement i sur., 1990). Hranjiva kruta podloga NA se koristi za izolaciju većine fitopatogenih bakterija, dok se poluselektivna podloga King B koristi kod određenih vrsta (rod *Pseudomonas*), gdje izolati razvijaju drugačija morfološka obilježja u odnosu na ona na podlozi NA (Schaad, 1988). Hranjive podloge se skuhaju, autoklaviraju i izliju u Petrijevu zdjelicu, najčešće promjera 10cm, a potom stavljaju u kabinet za rad u sterilnim uvjetima (laminar) na sušenje. Dijelove uzorka simptomatičnog tkiva koji su odabrani za analizu, prije maceracije u puferu ili sterilnoj destiliranoj vodi, treba površinski sterilizirati kratkim uranjanjem u 3 %-tnu vodenu otopinu natrijevog hipoklorita (varikina). Nakon toga se to biljno tkivo uroni u malu količinu sterilne destilirane vode ili pufera za ekstrakciju gdje se nareže sterilnim skalpelom te usitni tj. macerira pomoću metalnih igala i pinceta. Petrijeva zdjelica s maceriranim biljnim tkivom se protresa na termomikseru nekoliko minuta kako bi iz macerata izašlo što više eventualno prisutnih bakterija. Na taj način dobiva se suspenzija bakterija kojom se u sljedećem koraku obavlja nacjepljivanje prethodno pripremljenih i osušenih hranjivih podloga u Petrijevim zdjelicama (NA i King B). Nacjepljivanje suspenzija se obavlja pomoću mikropipete sa sterilnim nastavcima i staklenog štapića kojim se suspenzije ravnomjerno raspoređuju po cijeloj površini hranjivog agara. Petrijevke se stavljaju u termostatirani inkubator na inkubaciju u trajanju od 48 h pri 28 °C koja je optimalna za većinu fitopatogenih bakterija (Đermić, 2007). Nakon toga se na pločama uočavaju narasle okruglaste kolonije bakterija.

Odabiru se morfološki različite kolonije (one koje se međusobno ne dodiruju) te se bakterije iz njih izoliraju i pročišćuju subkultivacijama na svježim hranjivim podlogama. Iz svake odabrane kolonije se bakteriološkom iglom uzimaju uzorci i standardnom metodom razmaza ezom stavljaju po površini agara NA i King B u zasebnim Petrijevim zdjelicama. Svrha toga je dobivanje čistih kultura, odnosno bakterijskih izolata, klonova. Obavezno je spaljivanje eze iza svakog pojedinog postupka kako bi se bakterije razrijeđivale prilikom razmaza. Razmaz ezom se vrši uz rotaciju zdjelice da bi se na pojedinim dijelovima (u zoni kasnijih razmaza) dobile površine s manjim brojem nacijepljenih bakterija. Nakon ovog postupka se zdjelice inkubiraju u termostatu na 48 h pri 28 °C. S čistim bakterijskim izolatima

vrše se svi sljedeći dijagnostički postupci, kako laboratorijski, tako i provjere patogenosti izoliranih bakterija.

Određivanje Gram-reakcije izolata se provodi nakon uzgoja čistih kultura. Za sve izolate se određuje reakcija po Grammu pomoću KOH-testa (prema Klement i sur., 1990). Na predmetno stakalce se sterilnom čačkalicom nanesu uzorci bakterija uzgajanih na hranjivoj podlozi i potom suspendiraju, laganim kružnim pokretima pomoću čačkalice, u 3 %-tnoj vodenoj otopini KOH. Ako pri tom nastaje nit koja je viskozna i rasteže se od bakterijske suspenzije do vrha podignute čačkalice, radi se o Gram-negativnoj bakteriji. Ako nit nije prisutna radi se o Gram-pozitivnoj reakciji.

Kako bi se identificiralo patogena, koriste se serološki testovi, genomski molekularni testovi i testiranje patogenosti. Od seroloških testova se najčešće koristi ELISA-test i test imunofluorescencije (IF-test). Od genomskih molekularnih testova najčešće se provode konvencionalni PCR *Real-time* PCR. Više specifičnih molekularnih i biokemijskih metoda se razvilo za identifikaciju pektolitičkih enterobakterija, kakve si i mnogi bakterijski patogeni tikvenjača, obzirom da se one često nalaze u vodom i bakterijskom sluzi bogatim biljnim organima, te je njihova izolacija i analiza otežana (Schaad, 1988; prema Catara i sur, 2021.).

ELISA-test (eng. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) je imunoenzimski test koji se provodi na čvrstim nosačima, a pomoću kojega se potvrđuje prisutnost određenog patogena (bakterija, virus itd,) te se dobiva podatak o njegovoj obilnosti u pripravku (koncentracija u odnosu na kontrolni uzorak). Rezultat testa je reakcija promjene boje reakcijske smjese unutar polistirenske mikrotitarske ploče, a ta je promjena posljedica imunološkog prepoznavanja i vezanja patogena sa specifičnim protutijelima, te vizualizacija njihovog kompleksa enzimom kataliziranom kemijskom reakcijom (ubrzana razgradnja ponuđenih supstratnih molekula). Jačina promjene boje reakcijske smjese očitava se spektrofotometrijski, te se u usporedbi s kontrolom očitani rezultat može kvantificirati, tj. može se odrediti koncentracija prisutnih patogena u analiziranom biljnom tkivu (poznate mase). Ovisno o tipu tkiva uzorka, oni trebaju biti posebno pripremljeni prije provođenja ove metode.

Test imunofluorescencije (IF-test) je serološki test kojim se, pomoću vezanja primarnih protutijela i sekundarnih protutijela (obilježenih fluorescentnim bojilom), mogu vizualizirati ciljane bakterije u uzorku. Uzorak se priprema na specijalnom predmetnom stakalcu, te se mikroskopira pomoću mikroskopa koji sadrži dodatni modul za fluorescenciju. IF-test je preciznija tehnika od ELISA-testa jer isključuje lažne pozitivne rezultate, obziorm da se u IF-u može vidjeti oblik i odrediti veličina stanice bakterija.

Lančana reakcija polimeraze (PCR, engl. P*olymerase chain reaction*) te lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu (engl. *Real-time* PCR) su molekularne tehnike koje se bave genomima patogena. Iako je tehnika PCR u realnom vremenu nešto novijeg nastanka od konvencionalnog PCR-a, ona je naprednija jedino u smislu kontinuiranog praćenja aktivnosti enzima DNA polimeraze. U toj se tehnici u zatvorenoj reakcijskoj tubi se u svakom pojedinom ciklusu umnožavanja traženog produkta detektira nastala fluorescencija kojom se indirektno kvantificira produkt amplifikacije DNA. To je razlog što kod Real time PCR-a nema

potrebe za post-PCR tehnikama (npr. elektroforeza produkata), već se pomoću računalno tj. kontrolnim programom dobivaju vrlo precizni rezultat prikaza brojnosti umnoženih ciljanih fragmenata DNA, što dozvoljava procjenu brojnosti patogena u početnom analiziranom uzorku (Đermić, 2007). Osnovna reakcija je jednaka PCR metodi i zasniva se na umnažanju kratkog dijela sekvence genomske DNA patogena u veliki broj identičnih kopija. Preduvjet za to je poznavanje slijeda nukleotida DNA odsječka koji se želi umnožiti, a koji postoji isključivo u traženoj vrsti patoegna, te temeljem toga odabrati odgovarajući par oligonukleotidnih početnica s kojih DNA polimeraza započinje umnožavanje DNA. Reakcija PCR se može podijeliti na tri faze: eksponencijalnu, linearnu i fazu platoa. U eksponencijalnoj fazi koja je ujedno i početna, količina umnožavanih produkata eksponencijalno se povećava s obzirom da reagensi tada nisu ograničeni. U linearnoj fazi je linearni porast količine umnažanih produkata jer su tada reagensi za umnožavanje DNA ograničeni. U jednom trenutku će se neki reagensi potpuno iscrpiti i količina produkta umnožavanja će ostati stalna. To je faza platoa u PCR-u. Real-time PCR nam omogućuje konstantno praćenje umnožavanja produkata tokom cijele reakcije umnožavanja.

Testiranje patogenosti bakterijskih izolata je još uvijek nezaobilazan način kojim se potvrđuje da je izolirani i identificirani bakterijski patogen uzročnik bolesti tj. simptoma koji su se razvili u prirodnoj zarazi u polju (prema Catara i sur., 2021). Za njegovu provedbu ponekad je potrebno duže vremena, a može trajati i do nekoliko godina za pojedine bakterije tj. za pojedine njihove domaćine. To, ipak, nije slučaj kod testiranja patogenosti fitopatogenih bakterija koje zaražavaju tikvenjače. Testiranje se provodi na biljkama uzgajanim u teglama i to na onim vrstama i sortama bilja kakoje su najosjetljivije. Ishod biotesta je uvijek neizvjestan jer je potrebno inokulacije izvoditi u, za zarazu, optimalnim uvjetima tako da nisu rijetka neuspješna istraživanja patogenosti i potrebno ih je ponavljati. Supstrat u teglama prilikom inokulacije treba biti suh jer treba pogodovati transpiraciji biljaka. Biljke koje aktivno rastu treba održavati u stakleniku ili komori za rast na 25 do 28 °C, te ih održavati zaštićenima od sekundarnih infekcija ili napada kukaca. Idealan slučaj za svaki pokus bi bio da odnos umjetno inokuliranih biljka prema biljkama za kontrolu bude 3:1 (npr. za 10–15 inokuliranih biljka, postoji 3–5 kontrola), ali to varira o vrsti testnih biljaka (Klement i sur., 1990). Uvjeti nakon cijepljenja trebaju biti jednaki onima prije cijepljenja, a najčešće do razvoja simptoma bakterioza na zeljastim domaćinima treb 8–10 dana. Postoje alternativne metode inokulacije, a njihov izbor ovisi o biljci domaćinu o kojem se radi.

5. Zaključna razmatranja

Bakterioze prouzrokovane fitopatogenim bakterijama stvaraju velike probleme u uzgoju tikvenjača (porodica Cucurbitaceae) diljem svijeta i jedna su od najznačajnijih skupina patogena kod ovih vrsta. One smanjuju prinos, otežavaju proizvodnju i skladištenje, smanjuju kvalitetu biljnog proizvoda, a neke od njih prijetnja su zdravlju ljudi.

Iako u Hrvatskoj nema puno detektiranih vrsta fitopatogenih bakterija značajnih u proizvodnji tikvenjača, mnoge činjenice ukazuju na porast njihove pojavnosti. Naime, proizvođači sve češće uočavaju raznolike simptome bakterioza na ovim kulturama, a iz godine u godinu raste broj zahtjeva za analizu uzoraka. Vrlo štetne u našim proizvodnim uvjetima mogle bi biti naročito vrste *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*, *Xanthomonas cucurbitae* i *Acidivorax citrulli*. Posebno opasna bi mogla biti vrsta *Serratia marcescens*, koja osim bolesti biljaka može uzrokovati i bolesti ljudi.

Nakon intenzivnog proučavanja znanstvene i stručne literature o ovoj temi, uz detaljan pregled suvremenih znanja o bakteriozama, njihovoj raznolikosti, prisutnosti i pojavnosti uzročnika te epidemiologiji, kao i o specifičnostima njihove simptomatologije, može se zaključiti da je uočena povezanost optimizacije uvjeta za razvoj bakterijskih bolesti u našem podneblju prethodnih godina (vezano uz modificiranje do sada uobičajenih klimatskih uvjeta), s rastom sortimenta i intenziviranjem proizvodnje ovih kultura na pojedinim lokacijama.

Uglavnom se radi o bakterijama kojima odgovaraju visoka temperatura i vlaga zraka. To je razlogom što se može, ponajviše zbog introdukcije bakterijskih inokuluma sjemenom, ali i zbog povoljnih klimatskih parametara za razvoj i širenje bakterioza u periodima dok su biljke mlade i vrlo osjetljive na zarazu, očekivati jačanje utjecaja ovog problema na uspješnost proizvodnje tikvenjača u nas.

Pošto je suzbijanje fitopatogenih bakterija vrlo složeno i često neizvjesno, te da vrijedi činjenica da jednom zaražene biljke ostaju bolesne tijekom cijelog života, a u velikoj većini slučajeva zbog bakterioze i ugibaju, najučinkovitije je njihovo štetno djelovanje smanjivati primjenom preventivnih mjera zaštite bilja. Osim toga, potrebno je integrirati sve mjere koje sprječavaju ostvarenje zaraze, pa tako i kemijske i mehaničke. Ako je već došlo do zaraze, poželjno je izolirati ili uništiti zaraženi biljni materijal koji bi predstavljao izvor inokuluma za nove sekundarne zaraze usjeva. Mjere suzbijanja fitopatogenih bakterija u uzgoju tikvenjača u bliskoj budućnosti bi bilo poželjno razvijati u smjeru pronalaženja dodatnih alternativa, kao što je biološko suzbijanje bakteriofagima ili drugim mikroorganizmima. Nedavno su izolirani sojevi bakterije *Acidovorax citrulli* koji nisu patogeni, a imaju potencijal za biološko suzbijanje patogenih sojeva iste vrste. Također i nekoliko sojeva rizobakterija suzbija rast ovog patogena. Radi se o relativno novim istraživanjima koja se mogu uzeti u obzir za buduće pokušaje sprječavanja velikih šteta koje mogu uzrokovati bakterioze, pri čemu je uvijek treba imati u vidu kako ekonomske, tako i ekološke aspekte tih biološki složenih intervencija.

Prepoznavanje simptoma i spoznaja da je došlo do zaraze bakterijama su krucijalni. Često se događa da proizvođači pravovremeno ne uoče simptome bakterioza, nego ih postanu svjesni tek kada njihova pojava postane masovna. Također, često se misli da se radi o abiotičkim djelovanjima ili zarazi drugim skupinama patogena, jer se simptomi fitobakterioza tikvenjača podudaraju sa simptomima pojedinih drugih biljnih bolesti ili pak s posljedicama djelovanja abiotičkih faktora. Pažnju bi pri pregledu usjeva i utvrđivanji zdravstvenog stanja usjeva trebalo usmjeriti na detalje i imati na umu razlikovne znakove ovih ekonomski značajnih bakterioza, navedene u ovom radu.

Dijagnostika bakterioza moguća je isključivo laboratorijskom analizom. Mnogim zainteresiranim stranama u Hrvatskoj laboratorijska analiza nije lako dostupna iz financijskih razloga ili zbog nedostupnosti adekvatnih laboratorija. Čak i u slučaju kada fitobakteriološki laboratorij jest dostupan, čest je slučaj da u svakom trenutku ne raspolaže neophodnim dijagnostičkim reagensima i molekularnim probama potrebnim za identifikaciju svih potencijalno prisutnih fitobakterijskih vrsta iz filogenetski vrlo širokog spektra. To su razlozi zašto pregledi simptoma bakterioza od strane kompetentnih fitomedicinara u usjevima, predstavljaju vrlo značajan aspekt u pravovremenom prepoznavanju simptoma, a nakon toga u uzorkovanju biljnog materijala i suzbijanju bakterioza.

Ovim radom je, sistematizacijom suvremenih podataka o pojavnosti, simptomatologiji i epidemiologiji najvažnijih bakterijskih patogena kultiviranih tikvenjača, realiziran cilj kojim su naglašene ranije navedene bakterijske vrste za čije bi se dijagnostičke protokole trebalo uspostaviti laboratorijske prioritete. Time bi se u budućnosti osigurala kontinuirana mogućnost identifikacije onih vrsta bakterija, parazita tikvenjača, od kojih se u nas očekuje najveća pojavnost praćena visokom štetnošću.

6. Popis literature

1. Adeolu M., Alnajar S., Naushad S., Gupta R. S. (2016). Genome-based phylogeny and taxonomy of the 'Enterobacteriales': proposal for Enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morganellaceae fam. nov., and Budviciaceae fam. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 66(12): 5575-5599. doi: 10.1099/ijsem.0.001485. Epub 2016 Sep 11. PMID: 27620848.

2. Adhikari M., Yadav D. R., Kim S. W., Um Y. H., Kim H. S., Lee S. C., Song J. Y., Kim H. G., Lee Y. S. (2017). Biological Control of Bacterial Fruit Blotch of Watermelon Pathogen (*Acidovorax citrulli*) with Rhizosphere Associated Bacteria. Plant Pathology Journal 33(2): 170-183. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5378438/ – pristup 15.5.2021.

3. Agrios G. N. (1997). Plant Pathology. San Diego: Academic Press, 4th edition.

4. Agrios G. N. (2005). Planth Pathology (5th edition). Elsevier Academic Press, Burlington, MA.

5. Aranda S., Montes-Borrego M., Muñoz-Ledesma F. J., Jiménez-Díaz R. M., Landa B. B. (2008). First Report of Pectobacterium carotovorum Causing Soft Rot of Opium Poppy in Spain. Plant Dis. 92(2):317. doi: 10.1094/PDIS-92-2-0317A. PMID: 30769401.

6. Arsenijević M. (1997). Bakterioze biljaka. S-Print, Novi Sad, (treće izmenjeno i dopunjeno izdanje).

7. Babadoost M., Zitter T. A. (2009). Fruit rots of pumpkin: A serious threat to the pumpkin industry. Plant Dis. 93:772–782.

8. Bahar O., Burdman S. (2010). Bacterial fruit blotch: A threat to the cucurbit industry. Israel Journal of Plant Sciences 58(1):19-31.

9. Balaž J., Iličić R., Maširević S., Jošić D., Kojić S. (2014). First Report of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Causing Bacterial Leaf Spots of Oil Pumpkin (*Cucurbita pepo*) in Serbia. Plant Dis. 98(5):684. doi: 10.1094/PDIS-07-13-0714-PDN. PMID: 30708564.

10. Besler K. R., Little E. L. (2016). Diversity of Serratia marcescens strains associated with cucurbit yellow vine disease in Georgia. Plant Dis. 101: 129–136. doi: 10.1094/PDIS-05-16-0618-RE

11. Bextine B.R. (2001). Insect transmission of *Serratia marcescens*, causal agent of cucurbit yellow vine disease. Ph.D. dissertation, Oklahoma State University, Stillwater.

12. Bhat N. A., Bhat K. A., Zargar M. Y., Teli M. A., Nazir M., Zargar S. M. (2010). Review article current status of angular leaf spot (*Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*) of cucumber: a review article. International Journal of Current Research, 8: 1-11.

13. Black M. C., Isakeit T., Barnes L. W., Kucharek T. A., Hoover R. J., Hodge N. C. (1994). First report of bacterial fruit blotch of watermelon in Texas. Plant Disease, Vol. 78: 831.Bradbury J.F. (1986). Guide to Plant Pathogenic Bacteria. CAB International Mycological Institute, p. 329.

14. Brust G. E. (1997). Differential susceptibility of pumpkins to bacterial wilt related to plant growth stage and cultivar. Crop. Prot. 16:411-414.

15. Bruton B. D., Mitchell F., Fletcher J., Pair S. D., Wayadande A., Melcher U., Brady J., Bextine B., Popham T. W. (2003). *Serratia marcescens*, a phloem-colonizing, squash bugtransmitted bacterium: Causal agent of cucurbit yellow vine disease. Plant Disease 87:937-944.

16. Burdman J., Walcott R. (2012). *Acidovorax citrulli*: Generating basic and applied knowledge to tackle a global threat to the cucurbit industry. Molecular Plant Pathology 13(8): 805–815.

17. CABI, (2021). Crop Protection Compendium. Wallingford, UK: CAB International. www.cabi.org/ – pristup 15.6.2021.

18. Catara V., Cubero J., Pothier J., Bosis E., Bragard C., Đermić E., Holeva M. C., Jacques M-A., Petter F., Pruvost O., Robène I., Studholme D. J., Tavares F., Vicente J. G., Koebnik R., Costa J. (2021). Trends in Molecular Diagnosis and Diversity Studies for Phytosanitary Regulated *Xanthomonas*. Microorganisms 9(4): 862.

19. Chomicki G., Schaefer H., Renner S. S. (2020). Origin and domestication of Cucurbitaceae crops: insights from phylogenies, genomics and archaeology. New Phytol. 226(5):1240-1255. doi: 10.1111/nph.16015.

20. Cooney S., O'Brien S., Iversen C., Fanning S. (2014). Bacteria: Other pathogenic Enterobacteriaceae – *Enterobacter* and other genera. In: Encyclopedia of food safety. Vol. 1, 433-441. (ed. Motarjemi Y.) Academic Press. Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378612-8.00104-9; ISBN: 978-0-12-378613-5.

21. Czajkowski R., Pérombelon M. C. M., Jafra S., Lojkowska E., Potrykus M., van der Wolf J. M., Sledz W. (2015). Detection, identification and differentiation of *Pectobacterium* and Dickeya species causing potato blackleg and tuber soft rot: a review. Ann Appl Biol. 166(1): 18–38. doi: 10.1111/aab.12166.

22. Dana H., Khodakaramian G., Rouhrazi K. (2015). Characterization of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *Carotovorum* Causing Watermelon Soft Rot Disease in Iran. Journal of Phytopathology. 163. 10.1111/jph.12367.

23. Dutta B., Gitaitis R. D., Lewis K. J., Langston D. B. (2013). A new report of *Xanthomonas cucurbitae* causing bacterial leaf spot of watermelon in Georgia, USA. Plant Dis. 97:556.

24. Đermić E. (2007). Fenotipska i genotipska raznolikost sojeva fitopatogene bakterije *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow *et al*. u Hrvatskoj. Doktorska disertacija. Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet.

25. Fatmi M., Walcott R. R., Schaad N. W. (2017). Detection of Plant-Pathogenic Bacteria in Seed and Other Planting Material, Second Edition ISBN: 978-0-89054-541-6.

26. Fessehaie A., Hopkins D., Gitaitis R., Langston D., Walcott R. (2005). Role of honey bees in watermelon seed infestation by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. Phytopathology 93(5): 528-534.

27. FIS, Fitosanitarni informacijski sustav. Ministarstvo poljoprivrede RH. https://fis.mps.hr/trazilicaszb/ – pristup 3.7.2021

28. Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO 2021. http://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL – pristup 23.7.2021.

29. Garcia-Salazar C., Gildow F. E., Fleischer S. J., Cox-Foster D., Lukezic F. L. (2000). Alimentary canal of adult *Acalymma vittata* (*Coleoptera*: *Chrysomelidae*): Morphology and potential role in survival of *Erwinia tracheiphila* (*Enterobacteriaceae*) Can. Entomol. 132:13.

30. Garcia-Salazar C., Gildow F. E., Fleischer S. J., Cox-Foster D., Lukezic F. L. (2000). ELISA Versus Immunolocalization to Determinethe Association of *Erwinia tracheiphila* in *Acalymma vittatum* (*Coleoptera: Chrysomelidae*). Environmental Entomology 29: 542-550. https://www.researchgate.net/publication/230651606_ELISA_Versus_Immunolocalization_to_Determine_the_Association_of_Erwinia_tracheiphila_in_Acalymma_vittatum_Coleoptera_Chrysomelidae – pristup 26.4.2021.

31. Gilbert W. W., Gardner M. W. (1918). Seed treatmentcontrol and over-wintering of cucumber angular leaf spot. Phytopathology 8: 229-233.

32. Gorlenko M. V., Voronkevich I. V. (1946). The cycleof development of the agent of the bacteriosis of cucumbers Bacterium *lachrymans* Smith and Bryanunder natural conditions. CR Academy of Sciences. USSR 51: 641-644.

33. Goth R. W., Webb R. E. (1975). Bacterial wilt of watermelon. Abstract. Proceedings of the American Phytopathological Society 2: 122-123.

34. Hu F. P., Young J. M., Triggs C. M. (1991). Numerical analysis and determinative tests for nonfluorescent plant-pathogenic *Pseudomonas* spp. and genomic analysis and reclassification of species related to *Pseudomonas avenae* Manns 1909. International Journal of Systematic Bacteriology 41(4): 516-525.

35. Ivić D., Novak A., Mustapić L., Plavec J., Tomić Ž. (2020). Pojava novih i neučestalihbiljnih bolesti u 2019. godini. Glasilo biljne zaštite 20(4): 462-471.

36. Jacobs J. L., Damicone J. P., McCraw B. D. (1992). First report of bacterial fruit blotch of watermelon in Oklahoma. Plant Disease 76: 1185.

37. Jenns A. E., Caruso F. L., Kuc J. (1979). Non-specific resistance to pathogens induced systemically by local infection of cucumber with tobacco necrosis virus, *Colletotrichum lagenarium* or *Pseudomonas lachrymans*. Phytopathologia Mediterranea 18: 129-134.

38. Jindal K.K. (1994). Occurrence of angular leaf spotbacterium Pseudomonas syringae pv. lachrymans on cucumber plant. Plant Disease Research 9: 66-67.

39. Johnson K. L., Minsavage G. V., Le T., Jones J. B., Walcott R. R. (2011). Efficacy of a nonpathogenic *Acidovorax citrulli* strain as a biocontrol seed treatment for bacterial fruit blotch of cucurbits. Plant Disease 95: 697-704.

40. Jones L. R., Doolittle S. P. (1921). Angular leaf spot of cucumber. Phytopathology 11: 297-298.

41. Khlaif H. (1995). Varietal reaction and control of angular leaf spot disease on cucumber. Dirasat Series-B, Pure and Applied Sciences 22: 1201-1208.

42. Khlaif H., Abu-Blan H. (1994). Effectiveness of selected fungicides and bactericides in inhibiting *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans in vitro* and in controlling the pathogen in green house. Dirasat Series-B, Pure and Applied Sciences 21: 115-125.

43. Klement Z., Rudolph K., Sands D. C. (1990). Methods in Phytobacteriology. Akadémiai Kiadó, Nyomd Vàllalat, Budapest.

44. Kritzman G., Zutra D. (1983). Survival of *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* in soil, plant debris and the rhizosphere of non-host plants. Phytoparasitica 11: 99-108.

45. Lamichhane J. R., Varvaro L., Balestra G. M. (2010). Bacterial leaf spot caused by *Xanthomonas cucurbitae* reported on pumpkin in Nepal. New Disease Reports 22: 20.

46. Latin R. X., Hopkins D. L. (1995). Bacterial Fruit Blotch of Watermelon. The Hypothetical Exam Question Becomes Reality. Plant Disease 79(8): 761-765.

47. Latin R. X., Rane K. K. (1990). Bacterial fruit blotch of watermelon in Indiana. Plant Disease 74: 331.

48. Leben C. (1983). Chemicals plus heat as seed treatments for control of angular leaf spot of cucumber seedlings. Plant Disease 67: 991-993.

49. Leben C., Sleesman J. P. (1981). Bacterial pathogens: reducing seed and *in vitro* survival by physical treatments. Plant Disease 65: 876-878.

50. Lessl J. T., Fessehaie A., Walcott R. R. (2007). Colonization of female watermelon blossoms by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, and the relationship between blossom inoculation dosage and seed infestation. Phytopathology 155:114-121.

51. Li L., Yuan L., Shi Y., Xie X., Chai A., Wang Q., Li B. (2019). Comparative genomic analysis of *Pseudomonas amygdali* pv. *lachrymans* NM002: Insights into its potential virulence genes and putative invasion determinants. Genomics, Volume 111, Issue 6, Pages 1493-1503. ISSN 0888-7543, https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2018.10.004. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0888754318304828 – pristup 28.7.2021.

52. Liu Q., Rojas E. S., Batzer J. C., Gleason M. L. (2013). Impact of plant age on development of bacterial wilt on mskmelon. Pythology 103:S2.83.

53. Lu R., Ariana D. P., Cen H. (2010). Characterization of the Optical Properties of Normal and Defective Pickling Cucumbers and Whole Pickles. Proceedings of SPIE. Orlando, Florida 76760:76760G. p. 1-8.

54. Mijatović M., Obradović A., Ivanović M. (2007). Zaštita povrća. AgroMivas, Smederevska Palanka.

55. Mitrev S., Arsov E. (2019). First Report of Bacterial Fruit Blotch on Watermelon Caused by *Acidovorax citrulli* in the Republic of North Macedonia. Plant Disease. The American Phytopathological Society doi.org/10.1094/PDIS-01-20-0204-PDN.

56. Newberry E. A., Babu B., Roberts P. D., Dufault N. S., Goss E. M., Jones J. B., Paret M. L. (2018). Molecular Epidemiology of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Causing Bacterial Leaf Spot of Watermelon and Squash in Florida. Plant Disease 102: 511-518.

57. Newberry E. A., Jardini T. M., Rubio I., Roberts P. D., Babu B., Koike S. T., Bouzar H., Goss E. M., Jones J. B., Bull C. T., Paret M. L. (2016). Angular leaf spot of cucurbits is associated with genetically diverse *Pseudomonas syringae* strains. Plant Dis. 100:197-1404.

58. Obradović A., Prokić A., Zlatković N., Gašić K. (2014). Mrljavost ploda – nova bakterioza lubenice u Srbiji. Zbornik radova, XV savetovanje „Savremena proizvodnja povrća“. Savremeni povrtar, br. 52: 24-26.

59. OEPP/EPPO (2016). Standards PM 7/127 (1). Diagnostic protocol for regulated pests. *Acidovorax citrulli*. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 46 (3): 444–462. https://www.eppo.int/RESOURCES/eppo_standards/pm7_diagnostics – pristup 15.6. 2021

60. Palleroni N. J. (1984). Genus I *Pseudomonas* Mingula 1894 pp. 141-199. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. I (Eds. N. R. Krieg and J. G. Holt). Williams and Wilkins, Baltimore.

61. Paradiković N. (2002). Osnove proizvodnje povrća. Katava d.o.o., Osijek.

62. Paris H. S., Daunay M. C., Janick J. (2013). Medieval iconography of watermelons in Mediterranean Europe. Ann. Bot;112:867–879. doi: 10.1093/aob/mct151.

63. Perkins-Veazie P., Collins J. K., Davis A. R., Roberts W. (2006). Carotenoid content of 50 watermelon cultivars. J Agric Food Chem. 54 (7): 2593–7. PMID 16569049

64. Plavec G. (2019). Bakterijske bolesti tikvenjača. Glasilo biljne zaštite 19(3): 2019. orcid.org/0000-0002-0449-2351

65. Pohronezny K., Larsen P. O., Ematty D. A., Farley J. D. (1977). Field studies of yield losses in pickling cucumber due to angular leafspot. Plant Disease Reporter 61: 386–390.

66. Popović T., Ivanović Ž. (2014). Occurrence of *Acidovorax citrulli* Causing Bacterial Fruit Blotch of Watermelon in Serbia. Plant Disease Vol. 99(6): 886.

67. Pruvost O., Robene-Soustrade I., Ah-You N., Jouen E., Boyer C., Waller F., Hostachy B. (2008). First report of *Xanthomonas cucurbitae* causing bacterial leaf spot of pumpkin on Reunion Island. Plant Dis. 92: 1591.

68. Pruvost O., Robene-Soustrade I., Ah-You N., Jouen E., Boyer C., Wuster G., Hostachy B., Napoles C., Dogley W. (2009). First report of *Xanthomonas cucurbitae* causing bacterial leaf spot of watermelon in the Seychelles. Plant Dis. 93: 671.

69. Rane K.K., Latin R.X. (1992). Bacterial fruit blotch of watermelon: Association of the pathogen with seed. Plant Disease 76: 509-512.

70. Ravanlou A., Babadoost M. (2015). Development of Bacterial Spot, Incited by *Xanthomonas cucurbitae*, in Pumpkin Fields, HortScience horts 50(5): 714-720.

71. Ristić D., Gašić K., Ivanović M., Obradović A. (2007). Iznenadna pojava *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* na krastavcu i dinji u Srbiji. XIII Simpozijum sa savetovanjem o zaštiti bilja, Zlatibor, 26-30.11. Zbornik rezimea, str. 122-123.

72. Rojas E. S., Batzer J. C., Beattie G. A., Fleischer S. J., Shapiro L. R., Williams M. A., Bessin R., Bruton B. D., Boucher T. J., Jesse L. C. H., Gleason M. L. (2015). Bacterial Wilt of Cucurbits: Resurrecting a Classic Pathosystem. Plant Dis. 99(5): 564-574. doi: 10.1094/PDIS-10-14-1068-FE. PMID: 30699691.

73. Rojas E. S., Gleason M. L. (2011). Epiphytic Survival of *Erwinia tracheiphila* on Muskmelon (*Cucumis melo* L.). Plant Disease 96(1): 62-66.

74. Rudolph K., Burr T.J., Mansfield J.W., Stead D., Vivian A., von Kietzell J. (1997). *Pseudomonas Syringae* Pathovars and Related Pathogens. Developments in Plant Pathology 9: 575–83.

75. Samson R., Legendre J. B., Christen R., Fischer-Le Saux M., Achouak W., Gardan L. (2005). Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder et al., 1953) Brenner *et al*. 1973 and *Brenneria paradisiaca* to the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* comb. nov. and *Dickeya paradisiaca* comb. nov. and delineation of four

novel species*, Dickeya dadantii* sp nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov., *Dickeya dieffenbachiae* sp. nov. and *Dickeya zeae* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol 55: 1415–1427.

76. Sanogo S., Etarock B. F., Clary M. (2011). First Report of Bacterial Wilt Caused by *Erwinia tracheiphila* on Pumpkin and Watermelon in New Mexico. Plant Disease 19(12): 1583. doi: 10.1094/PDIS-06-11-0507.

77. Sasu M. A., Seidl-Adams I., Wall K., Winsor J. A., Stephenson A. G. (2010). Floral transmission of *Erwinia tracheiphila* by cucumber beetles in a wild *Cucurbita pepo*. Environ Entomol. 39(1): 140-8. doi: 10.1603/EN09190. PMID: 20146850.

78. Schaad N. W. (1988). Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. Schaad N. W. (ed.) APS Press, St. Paul, Minnesota, USA.

79. Schaad N. W., Postnikova E., Randahawa P. (2003). Emergence of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* as a Crop Threatening Disease of Watermelon and Melon. N.S. Iacobellis et. al. (eds.), *Pseudomonas syringae* and Related Pathogens 573-581.

80. Schaad N. W., Sowell G. Jr., Goth R. N., Colwell R. R., Webb R. G. (1978): *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli* subsp. nov. International Journal of Systemic Bacteriology 28: 117-125.

81. Seebold K. W., Bessin R. T. (2011). Plant Pathology Fact Sheet Yellow Vine Decline of Cucurbits. Cooperative Extension Service, University of Kentucky- College of Agriculture.

82. Sensoy S., Ertek A., Gedik I., Kucukyumuk C. (2007). Irrigation frequency and amount affect yield and quality of field-grown melon (*Cucumis melo* L.). Agricultural Water Management 88(1–3).

83. Shapiro L. R., Paulson J. N., Arnold B. J., Scully E. D., Zhaxybayeva O., Pierce N. E., Rocha J., Klepac-Ceraj V., Holton K., Kolter R. (2018). An introduced crop plant is driving diversification of the virulent bacterial pathogen *Erwinia tracheiphila*. mBio 9:e01307-18.

84. Sharma A., Katoch V., Rana C. (2016). Chanchal Important Diseases of Cucurbitaceous Crops and Their Management. CRC press: 301-324. ISBN: 978-1-4822-3458-9.

85. Smith E. F. (1911). Bacteria in relation to plant diseases. Carnegie Institution Washington Publications, Washington, DC.

86. Somodi G. C., Jones J. B., Hopkins D. L., Stall R. E., Kucharek T. A., Hodge N. C., Watterson J. C. (1991). Occurrence of a bacterial watermelon fruit blotch in Florida. Plant Disease 75: 1053–1056.

87. Trueman C. L., Roddy E., Goodwin P. H. (2014). First report of bacterial spot (*Xanthomonas cucurbitae*) of pumpkin in Ontario, Canada. New Disease Reports 30: 8. https://www.ndrs.org.uk/article.php?id=030008 – pristup 3.11.2020.

88. Umekawa M., Watanabe Y. (1978). Dry heat and hotwater treatment of cucumber seeds for control of angular leaf spot. Bulletin of the vegetable and ornamental crops research station-B Morioka Iwate No. 2, pp. 55-61.

89. Verma L. R., Sharma R. C. (1999). Diseases of Horticultural Crops- vegetables, ornamentals and mushrooms. Indus Publishing Company, New Delhi, p. 731.

90. Virsman C. M., Deblais L., Rajashekara G., Miller S. A. (2016). Differential colonization dynamics of cucurbit hosts by *Erwinia tracheiphila*. Phytopathology 106: 684-692.

91. Waleron M., Waleron K., Podhajska A. J., Lojkowska E. (2002). Genotyping of bacteria belonging to the former *Erwinia* genus by PCR–RFLP analysis of a recA gene fragment. Microbiology 148: 583–595.

92. Wall G. C., Santos V. M. (1988). A new bacterial disease on watermelon in the Mariana Islands. Phytopathology 78: 1605.

93. Wayadande A., Bruton B. D., Fletcher J., Pair S. D., Mitchell F. (2009). Retention of Cucurbit Yellow Vine Disease Bacterium *Serratia marcescens* Through Transstadial Molt of Vector *Anasa tristis* (*Hemiptera: Coreidae*). Annals of the Entomological Society of America 98: 770-774.

94. Webb R. E., Goth R. W. (1965). A seed borne bacterium isolated from watermelon. Plant Disease Report 49: 818–821.

95. Wiles A. B., Walker J. C. (1951). The relation of *Pseudomonas lachrymans* to cucumber fruits and seeds. Phytopathology 41: 1059-1064.

96. Williams P. H., Zitter T. A. (1996). Bacterial leaf spot, p. 35. In: T. A. Zitter, D. L. Hopkins, and C. E. Thomas (eds.). Compendium of cucurbit diseases. American Phytopathological Society, St. Paul, MN.

97. Young J. M., Saddler G. S., Takikawa Y., De Boer S. H., Vauterin L., Gardan L., Gvozdyak R. I., Stead D. E. (1996). Names of plant pathogenic bacteria 1864–1995. Review of Plant Pathology 75: 721– 63.

98. Zhang X., Babadoost M. (2018). Characteristics of Xanthomonas cucurbitae Isolates from Pumpkins and Survival of the Bacterium in Pumpkin Seeds. Plant Dis. 102(9): 1779-1784. doi: 10.1094/PDIS-08-17-1216-RE. Epub Jul 2. PMID: 30125182.

99. Zlatković N., Gašić K., Prokić A., Obradović A. (2019). Bakterioze tikava. Biljni lekar 47(6): 431-445.

Životopis

Jan Čanji, rođen je 12.11.1996. god. u Zagrebu. Obrazovanje je započeo u Osnovnoj školi Lovre pl. Matačića od 2003. godine do 2005. godine, a zatim se prebacio u Osnovnu školu Borovje i tamo je pohađao nastavu od 2005. godine do 2011. godine. U 2011. godini upisuje Tehničku školu Ruđera Boškovića u kojoj je pohađao nastavu do 2015. godine. U 2015. godini, na jesen, upisuje Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, gdje trenutno završava diplomski studij, smjer Fitomedicina. Godine 2007., usporedno s osnovnom školom je pohađao Glazbeno učilište Elly Bašić, sve do 2013. godine i nastavio svirati saksofon u sklopu orkestra učilišta Elly Bašić sve do 2015. godine. Tijekom obrazovanja je učio engleski jezik 13 godina, te je stekao dodatno znanje boraveći pola godine u SAD-u (samoprocjena, B2 kategorija). Njemački jezik je učio samo u osnovnoj školi od 4. do 8. razreda (samoprocjena, A1 kategorija). Prilikom završetka Tehničke škole Ruđera Boškovića stekao je znanje u radu s računalima i dobio potvrdu u vidu završnog rada i certifikata. Tijekom studija Jan je volontirao i bio zaposlen.