

Bakteriofagi kao baktericidi u zaštiti bilja

Aleksa Obradović

*Poljoprivredni fakultet, 11080 Beograd, Nemanjina 6, Srbija
(aleksao@agrif.bg.ac.rs)*

REZIME

Zaštita bilja od patogenih bakterija predstavlja značajan problem u poljoprivrednoj proizvodnji. Visoka stopa umnožavanja, prilagodljivost i život u unutrašnjosti biljnih tkiva čine bakterije veoma nepogodnim i nedostupnim za suzbijanje. Zahvaljujući tome, lista baktericida, koji se mogu primeniti u zaštiti bilja, veoma je kratka. Poslednjih godina, rešenje problema sve više se traži u primeni bioloških mera zaštite. Bakteriofagi, virusi koji parazitiraju bakterije, sve su češće predmet istraživanja fitopatologa. Eksperimentalno je pokazano da se mogu iskoristiti kao veoma efikasno sredstvo za kontrolu štetnih bakterija. Činjenice da su opšte rasprostranjeni prirodni neprijatelji bakterija, jednostavni za gajenje i održavanje, specifični prema domaćinu, pogodni za integraciju sa drugim merama zaštite, bezopasni po čoveka i druge činioce biosfere, daju im značajnu prednost nad drugim sredstvima baktericidnog dejstva.

Ključne reči: Fitopatogene bakterije; bakteriofagi; baktericidi; biološka zaštita; integralna zaštita

UVOD

Bolesti biljaka, prouzrokovane faktorima biotske ili abiotske prirode, predstavljaju značajan problem kako u uslovima intenzivne poljoprivredne proizvodnje tako i u proizvodnji na okućnicama. Uprkos napretku fitopatologije, aktivnostima stručnjaka i proizvođača, i velikom broju preparata za zaštitu bilja, i dalje smo svedoci povremene pojave pojedinih bolesti značajnijeg intenziteta. Njihova pojava izaziva višestruke posledice, među kojima prvenstveno treba istaći umanjene ekonomski efekat proizvodnje, usled gubitka prinosa i kvaliteta. Međutim, ne retko se suočavamo sa posledicama nastalim posredno, usled neadekvatne ili prekomerne primene hemijskih preparata za zaštitu bilja od bolesti, i njihovog negativnog uticaja na čoveka i život-

nu sredinu. Stoga se kao imperativ istraživanjima u zaštiti bilja nameće potreba da se obezbedi efikasna zaštita od prouzrokovala bolesti, u cilju postizanja zadovoljavajućih prinosa, uz očuvanje zdravlja ljudi i čistoće prirode. Jedan od pravaca u traženju rešenja je i pronalaženje alternativa hemijskim sredstvima za zaštitu bilja kao potencijalnim zagađivačima hrane i životne sredine, uz uslov da se obezbedi podjednako efikasna zamena i da nova rešenja budu ekološki prihvatljiva i ekonomski opravdana. Najnovija istraživanja ukazuju da među biološkim agensima, rasprostranjenim u prirodi, postoje orgnizmi sa superparazitiskim i antibiotiskim potencijalom koji se mogu efikasno iskoristiti u zaštiti bilja.

FITOPATOGENE BAKTERIJE I NJIHOVO SUZBIJANJE

Fitopatogene bakterije, prema opasnosti koju predstavljaju u proizvodnji, zauzimaju mesto pri vrhu liste prouzrokovaca biljnih bolesti. Do sada je poznato oko 1600 vrsta bakterija, od kojih oko 100 su prouzrokovaci bolesti biljaka (Agrios, 2005). Njihovo suzbijanje predstavlja veliki izazov u poljoprivrednoj praksi, naročito u uslovima povoljnim za nastanak i širenje infekcije. Razlozi su uglavnom u biologiji i epidemiologiji patogena. Uspesno suzbijanje fitopatogenih bakterija je dosta otežano usled njihove osobine da se razvijaju u unutrašnjosti biljnog tkiva, gde su zaštićene od baktericidnog dejstva različitih faktora. Fitopatogene bakterije se veoma brzo umnožavaju u povoljnim uslovima. Populacija im je varijabilna i prilagodljiva, naročito u uslovima selekcionog pritiska ili prisustva nekog drugog ograničavajućeg faktora porasta. Selekcioni pritisak, nastao uspešnim unošenjem gena otpornosti u komercijalne genotipove gajenih biljaka, često rezultira pojavom sojeva bakterije sposobnih da prevaziđu otpornost i ostvare infekciju (Kousik i Ritchie, 1996; Pernezny i sar., 1999).

Kontrola populacije fitopatogenih bakterija zasniva se na profilaktičkim i terapeutskim merama borbe (Arsenijević, 1997). Prednost imaju profilaktičke ili preventivne mere, tj. primena postupaka kojima se otklanja opasnost od dospevanja patogena u kontakt sa osetljivom biljkom. Te mere podrazumevaju karantin, prognozno-izveštajnu službu, kao i razne agrotehničke mere (gajenje otpornih sorti, upotreba zdravog semenskog i sadnog materijala, primena plodoreda, izbor pogodnog zemljišta, pravilna i pravovremena setva i žetva, adekvatno đubrenje, rezidba, navodnjavanje i odvodnjavanje, zaoravanje i spaljivanje obolelih biljnih ostataka, suzbijanje vektora i uništavanje koroza) (Klement i sar., 1990).

Terapeutske ili kurativne mere podrazumevaju intervenciju posle ostvarene infekcije. Stoga imaju daleko manji značaj i dolaze u obzir samo u specifičnim slučajevima. Nasuprot velikom broju hemijskih preparata efikasnih u suzbijanju fitopatogenih gljiva, razvoj baktericida za primenu u biljnoj proizvodnji nije zabeležio adekvatan uspeh. Trenutno su uglavnom u upotrebi preparati na bazi jona bakra zbog svog ograničenog baktericidnog dejstva. Međutim, problem predstavlja pojava rezistentnih sojeva bakterija prema ovim jedinjenjima (Marco i Stall, 1983; Jones i sar., 1991; Ritchie i Dittapongpitch, 1991; Martin i sar., 2004).

Primena antibiotika u kliničkoj terapiji vrlo brzo je prokrčila put primeni i u zaštiti bilja. Jedan od najviše korišćenih je streptomycin, koji se počeo koristiti za suzbijanje fitopatogenih bakterija još 50-ih godina prošlog veka. Nekonrolisana upotreba dovela je do dominantne pojave rezistentnih sojeva pojedinih ekonomski značajnih bakterija i tako značajno umanjila efikasnost streptomicina (Thayer i Stall, 1961; Minsavage i sar., 1990; Ritchie i Dittapongpitch, 1991; Obradović i Ivanović, 2007).

Poslednjih godina u primeni je nova grupa preparata, tzv. aktivatora otpornosti biljaka (SAR – systemic acquired resistance inducers), koji u kontaktu sa biljkom aktiviraju biohemijske procese i dovode do povećanja odbrambene sposobnosti i smanjenja mogućnosti ostvarenja infekcije patogenim mikroorganizmima (Qui i sar., 1997; Louws i sar., 2001; Obradović i sar., 2002a, 2002b, 2004a, 2004b, 2005). Međutim, u pojedinim patosistemima nisu ispoljili zadovoljavajuću efikasnost ili su čak imali negativan efekat na prinos (Louws i sar., 2001).

U nedostatku efikasnih baktericida očigledno je da za sprečavanje pojave i širenje bakterioza bilja rešenje treba tražiti u integralnom pristupu, odnosno sintezi znanja o biologiji i epidemiologiji patogena, tehnologiji biljne proizvodnje, kao i baktericidnom efektu pojedinih supstanci. Najnovija istraživanja ukazuju i na mogućnost efikasne primene nekih bioloških agenasa. Među onima koji su prihvaćeni za primenu u praksi nalaze se i bakteriofagi ili jednostavnije fagi (Flaherty i sar., 2000; Balogh i sar., 2003; Obradović i sar., 2004a, 2007a, 2008a).

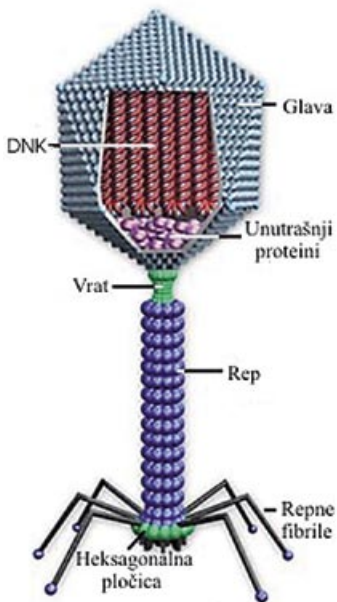
BAKTERIOFAGI KAO BAKTERICIDI

Otkriće bakteriofaga i osnovne karakteristike

Bakteriofagi predstavljaju posebnu grupu virusa čiji su domaćini bakterije. Odmah nakon otkrića, s početka prošlog veka, privukli su pažnju svojom sposobnošću da parazitiraju bakterije i tako utiču na njihovu brojnost u životnoj sredini. Otkrio ih je engleski bakteriolog Twort (1915), koji je zapazio da neke kolonije mikrokoka, posle duže inkubacije, dobijaju proziran izgled i da se više ne mogu gajiti na hranljivoj podlozi (loc. cit. Jones i sar., 2007). Nezavisno od Tworta, kanadski bakteriolog d'Herelle je 1917. godine otkrio „bolest“ bakterija koja se može preneti i posle filtriranja, i stoga pret-

postavio da je uzrok pojave virus koga je nazvao bakteriofagom (d'Herelle, 1917; loc. cit. Jones i sar., 2007).

Do sada je otkriveno i proučeno više vrsta bakteriofaga koji se međusobno razlikuju po obliku, veličini i sastavu. Po obliku se mogu svrstati u izometrijske (ikozaedarne), izdužene i končaste (filamentozne), i one posebnog oblika, odnosno fage koji imaju izometrijsku ili duguljastu glavicu sa kratkim ili dugim repićima. Svima je zajedničko da sadrže nukleinsku kiselinu, najčešće DNK, obavijenu proteinskim omotačem ili kapsidom (Slika 1) (Obradović i sar., 2008a).

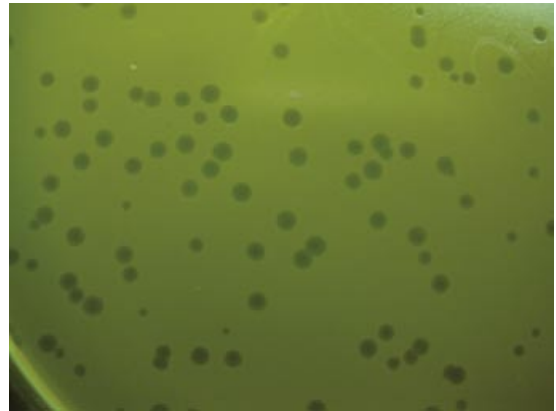


Slika 1. Šematski prikaz građe bakteriofaga T4 (<http://micro.magnet.fsu.edu/cells/viruses/images/bacteriophage.jpg>)

Odnos između bakterija i bakteriofaga, odnosno njihov životni ciklus, može biti litički i lizogeni (Kutter i Sulakvelidze, 2005). Litički odnos se odlikuje brzim umnožavanjem faga u bakterijskoj ćeliji nakon ubacivanja nukleinskog materijala i oslobađanjem novih faga posle lizisa, odnosno raspadanja bakterijske ćelije. Ovi fagi nazivaju se virulentnim. Na veštačkoj hranljivoj podlozi, razaranje ćelija bakterija uočava se u vidu prosvetljene zone kružnog oblika u kojoj nema razvoja. Ova zona se naziva „plak” (Slika 2). Lizogeni ciklus proživljavaju tzv. umereni fagi, koji se u inficiranoj ćeliji zadržavaju u obliku svoje nukleinske kiseline ugrađene u bakterijski hromozom (profag), i tako se prenose deobom na potomstvo bakterije. Bakterije koje nose profag

nazivaju se lizogene bakterije. U stresnim uslovima profag se oslobađa i aktivira litički ciklus koji se završava lizisom i oslobađanjem umnoženih čestica faga.

Bakteriofagi nemaju sopstveni enzimski sistem, zbog čega su direktno zavisni od ćelije domaćina koja obezbeđuje esencijalne metabolite i enzime. Nasuprot bak-



Slika 2. *Xanthomonas euvesicatoria*. Pojava plakova u vidu prosvetljenih zona okruglastog oblika kao znak lizisa bakterija parazitiranih fagima (original)

terijama koje stvaraju sopstvena jedinjenja velike energije, bakterijski virusi ne poseduju enzimsku komponentu, kao ni sistem prenosa elektrona povezan sa disanjem (Kutter i Sulakvelidze, 2005). Uopšteno, virusi svojim prisustvom menjaju metabolizam ćelije koji teče u pravcu sinteze virusnih čestica. Na ovaj način se parazitizam i umnožavanje virusnih čestica izjednačavaju, što predstavlja kvalitativnu odliku virusnog parazitizma. Ovakvom fiziološkom aktivnošću odlikuju se i bakteriofagi (Šutić, 1995).

Iako su bakteriofagi najbrojniji biološki agensi na planeti, njihov opstanak u prirodi umnogome zavisi od uticaja različitih faktora spoljne sredine (Balogh i sar., 2007). U dosadašnjim istraživanjima praktične primene faga u zaštiti bilja čest problem je bila nedovoljna perzistentnost faga na površini biljnog tkiva usled isušivanja i pogubnog dejstva sunčevog zračenja. Drastičan pad populacije primenjenih faga u spoljnoj sredini imao je za posledicu promenljivu efikasnost u suzbijanju bakterija i nestandardne rezultate, što je bila glavna smetnja masovnijoj primeni (Jones i sar., 2006).

Početa istraživanja

Otkriće bakteriofaga je ulilo nadu borbi protiv patogenih bakterija u oblasti humane medicine kao što su

infekcije bakterijama *Bacillus anthracis* i *Staphylococcus*, a takođe i lečenju tifusne groznice, dizenterije i kolere (Jones i sar., 2007).

Osim primene u kliničkoj patologiji, bilo je pokušaja primene faga i u fitopatologiji. Mallman i Hemstreet (1924; loc. cit. Jones i sar., 2007) utvrdili su da filtrat tečnosti dobijene iz obolelog biljnog materijala inhibira razvoj prouzrokovača truleži kupusa *in vitro*. Ubrzo potom su Kotila i Coons (1925; loc. cit. Jones i sar., 2007) iz uzorka zemljišta izolovali bakteriofage sposobne da parazitiraju *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum*. Thomas (1935) je koristio fage poreklom iz obolelog biljnog materijala za tretiranje semena kukuruza i suzbijanje *Pantoea stewartii* prouzrokovača bakteriozno uvelosti ili Stewartove bolesti kukuruza.

Međutim, uprkos početnom entuzijazmu bakteriofagi nisu postali „lek izbora“ u kontroli bakterioza biljaka. Nedovoljno razumevanje biologije faga i nedostatak eksperimentalnih tehnika imao je za posledicu nezadovoljavajuću efikasnost tretmana fagima (Kutter, 1997). Osim toga, smanjenom interesovanju za terapiju fagima doprinelo je i otkriće antibiotika, koji su se pokazali kao mnogo efikasniji baktericidi (Balogh i sar., 2003; Obradović i Ivanović, 2007).

U međuvremenu, u literaturi su se mogli naći i razlozi protiv upotrebe faga za kontrolu biljnih bolesti. Tako je Vidaver (1976) ukazala da kao posledica mutacije može doći do pojave rezistentnih sojeva bakterija, kao i promene patogenosti faga usled uticaja faktora spoljne sredine. Takođe, fagi mogu predstavljati opasnost po korisne sojeve bakterija u prehrambenoj industriji ili vrste koje žive u simbiozi sa gajenim biljkama.

Porast interesovanja za primenu bakteriofaga

Iako nije bilo napretka u njihovoj primeni u zaštiti bilja, bakteriofagi su ostali u upotrebi u fitobakteriologiji. Zahvaljujući visokoj specifičnosti odnosa virus–bakterija, fagi su omogućili razlikovanje usko povezanih grupa fitopatogenih bakterija, kao i rasa ili patogenih varijeteta iste bakterijske vrste i tako značajno doprineli klasifikaciji i identifikaciji patogenih bakterija (Klement i sar., 1990; Arsenijević, 1997). Osim toga, značajnu ulogu u proteklom periodu bakteriofagi su imali u osnovnim istraživanjima u oblasti molekularne biologije i genetike.

Kao rezultat novih saznanja o bakteriofagima, pojave rezistentnih sojeva bakterija prema antibioticima i bakarnim jedinjenjima, kao i usled izražene potrebe za zaštitom životne sredine od ostataka pesticida, doš-

lo je do obnavljanja interesovanja za primenu bakteriofaga u suzbijanju bolesti u savremenoj poljoprivredi. Ovome su naročito doprinele i potencijalne prednosti bakteriofaga kao bioloških agenasa za suzbijanje biljnih bolesti:

Fagi su prirodne komponente biosfere; oni se mogu izolovati iz svakog mesta gde se bakterija nalazi, uključujući zemlju, vodu, biljke, životinje, čak i ljudsko telo (Kutter i Sulakvelidze, 2005; Obradović i sar., 2006).

Umnožavaju se samo dok postoji bakterija-domaćin i brzo se razgrađuju kada je domaćin odsutan (Balogh, 2002; Kutter i Sulakvelidze, 2005).

Netoksični su i mogu se koristiti u situacijama kada upotreba hemijskih jedinjenja nije dozvoljena, kao što je slučaj u organskoj proizvodnji (Balogh, 2002; Jones i sar., 2007).

Specifični su, eliminišu samo kompatibilnu bakteriju, bez uticaja na ostale članove životne sredine (Gašić i sar., 2007). Ovo ukazuje na mogućnost povezivanja faga sa drugim vidovima biološke borbe, kao što su bakterije kompetitori ili antagonisti (Balogh, 2002; Svircev i sar., 2006).

Proizvodnja preparata faga ne zahteva visoke troškove kao ni posebnu opremu, a mogu se čuvati duži niz godina pri temperaturi 4°C bez značajnijeg gubitka efikasnosti (Balogh, 2002; Jones i sar., 2007).

Ponovno interesovanje za terapiju fagima rezultiralo je proučavanjem njihove efikasnosti u kontroli *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* prouzrokovača bakteriozne pegavosti (rešetavosti) lista i rak-rana koštihavih voćaka. Civerolo i Kiel su 1969. godine, primenom bakteriofaga sat vremena pre inokulacije bakterijom *X. c.* pv. *pruni*, umanjili intenzitet zaraze krošnje breskve na 22% u poređenju sa 58% na kontrolnim biljkama. Saccardi i saradnici (1993) su izolovali 8 sojeva faga parazita *X. c.* pv. *pruni*, proučili njihovu litičku sposobnost i izdvojili one sa najširim spektrom dejstva. Njihovom primenom uspešno su umanjili brojnost populacije navedenog patogena (Zaccardelli i sar., 1992; Saccardi i sar., 1993). Tanaka i saradnici (1990) uspeli su da umanje intenzitet zaraze duvana bakterijom *Ralstonia solanacearum* primenom suspenzije avirulentnog soja ove bakterije i faga patogenih za avirulentne i virulentne sojeve *R. solanacearum*. Intenzitet uvelosti biljaka tretiranih avirulentnim sojevima bakterije bio je 39,5%, a njihovom kombinacijom sa fagima 17,6%, dok je intenzitet simptoma u netretiranoj kontroli bio 95,8%. Ipak, nijedan od primera eksperimentalne primene faga nije zaživeo u praksi zbog problema promenljive efikasnosti.

Teškoće u praktičnoj primeni bakteriofaga

Intenziviranjem istraživanja u cilju povećanja efikasnosti primene bakteriofaga u praksi, istraživači su suočili sa brojnim preprekama (Jones i sar., 2008). Kao faktori od presudnog značaja za aktivnost faga nametnuli su se opstanak u različitim uslovima spoljne sredine i dospevanje u kontakt sa domaćinom kako bi se započeo novi ciklus replikacije pre nego što dođe do inaktivacije čestica faga. Ovako kompleksan uzajamni odnos virus-bakterija, kao i interakcija sa okruženjem, predstavlja ozbiljnu prepreku uvođenju preparata na bazi bakteriofaga u rutinsku upotrebu. Ovaj problem se delimično može rešiti selekcijom i izborom perspektivnih sojeva faga, prilagođenih preživljavanju u različitim uslovima spoljne sredine, izražene vitalnosti i stope replikacije.

Proučavanjem vitalnosti faga u *in vivo* uslovima, naročito u zoni filozofije, ispostavilo se da na opstanak čestica značajno utiče isušivanje i UV zračenje (Balogh i sar., 2003). Praćenjem brojnosti populacije faga na površini lista paradajza utvrđeno je da sunčevo zračenje ima negativan efekat na vitalnost čestica faga, bilo dejstvom UV spektra (UV-A i UV-B 280-400 nm) ili isušivanjem vodenog filma neophodnog za kretanje faga i kontakt sa domaćinom. Prilagođavanjem vremena aplikacije pokazalo se da se tretmanima u sumrak, pred zalazak sunca, može izbeći negativan uticaj dnevnog svetla i značajno produžiti opstanak faga, povećavajući šanse za ostvarivanje kontakta sa bakterijom domaćinom (Jones i sar., 2002). Rešenje problema povećanja vitalnosti faga i produženja perzistentnosti na biljkama potraženo je i u razvoju formulacije faga (Balogh i sar., 2003). Posle testiranja više potencijalnih supstanci, utvrđeno je da se efikasnost faga značajno povećava dodavanjem obranog mleka u prahu i saharoze neposredno pre upotrebe suspenzije faga za folijarno tretiranje paradajza (Balogh i sar., 2003, Obradović i sar., 2004a). Ovim istraživanjima pokazalo se da je boljim poznavanjem biologije i ekologije, kao i podešavanjem uslova, vremena i načina primene, moguće unaprediti efikasnost faga kao bioloških agenasa za primenu u zaštiti bilja (Obradović i sar., 2004a, 2008c; Jones i sar., 2007).

Razvoj rezistentnosti bakterija prema bakteriofagima svakako je doprineo opstanku i rasprostranjenosti bakterija u prirodi. Ova vrsta prilagodljivosti je od izuzetnog značaja za efikasnost faga u kontroli fitopatogenih bakterija. U cilju prevazilaženja eventualne pojave rezistentnih sojeva, Jackson (1989) je razvio nov pristup

primene faga za suzbijanje bakterioza u vidu mešavine tzv. h-mutananta. H-mutanti su fagi koji poseduju sposobnost da liziraju soj bakterije rezistentan prema materinskim fagima. Stoga, oni imaju širi spektar domaćina u odnosu na materinske fage. Njihova primena proverena je u praksi u suzbijanju prouzrokovaca bakteriozne pegavosti paradajza *Xanthomonas perforans*. Primenom ovog metoda značajno je unapređena efikasnost faga, kako u staklari tako i u poljskim uslovima (Flaherty i sar., 2000; Jones i sar., 2007, 2008).

Rezultati novijih istraživanja praktične primene faga u zaštiti bilja

Rezistentnost nekih bakterija prema do sada poznatim antibioticima, kao i nedostatak novih preparata baktericidnog dejstva, rezultirali su povećanim interesovanjem za terapiju fagima u polju humane medicine. U poredo, istraživanja mogućnosti primene bakteriofaga u zaštiti bilja dobijala su sve veći zamah. Bolje poznavanje njihove biologije i ekologije doprinelo je unapređenju efikasnosti njihove primene. Međutim, još uvek preovlađuju eksperimentalni rezultati, dok su primeri rutinske primene u praksi malobrojni.

Interesantan pristup primeni faga u suzbijanju *Erwinia amylovora*, prouzrokovaca bakteriozne plamenjače jabuke i kruške i drugih *Rosaceae*-a, razvijen je u Kanadi poslednjih godina. Gill i saradnici (2003) izolovali su 47 faga sposobnih da liziraju *E. amylovora* i grupisali ih na osnovu morfologije plakova i spektra domaćina. Osim što su fagi odabirani po specifičnosti prema sojevima fitopatogene bakterije, vršena je selekcija i po kompatibilnosti sa saprofitskom vrstom *Pantoea agglomerans*, koja takođe poseduje i antagonistički potencijal. Zatim je proučavana efikasnost faga sposobnih da parazitiraju širok spektar sojeva navedenog patogena na cvastima kruške u laboratoriji kao i u prirodnim uslovima. Međutim, kao nov pristup u ovim istraživanjima, soj *P. agglomerans* je korišćen kao vektor faga. Litička aktivnost faga i dodatni antagonistički efekat *P. agglomerans* uspešno su ostvarili zaštitu tretiranih biljaka, efikasnošću koja se može porediti sa efektom streptomicina (Svircev i sar., 2006).

Osim pokušaja folijarne primene bakteriofaga bilo je i tretmana usmerenih na kontrolu bakterija prisutnih u rizosferi biljaka. Bakteriozna uvelost, prouzrokovana bakterijom *R. solanacearum*, predstavlja veoma značajno oboljenje paradajza (Momol i Pernezny, 2005). Održavanje patogena u zemljištu i širok spektar domaćina otežavaju njegovo suzbijanje. Stoga je prouče-

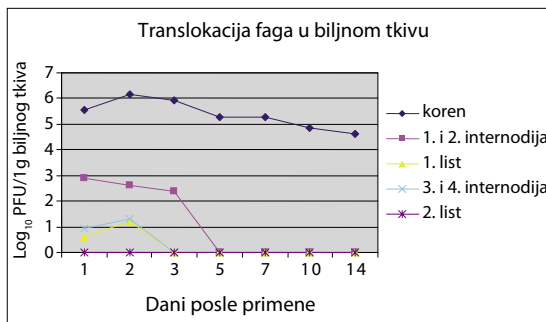
na mogućnost primene bakteriofaga unošenjem suspenzije u zonu korenovog sistema (Obradović i sar., 2008b). Problem ovog načina primene je opasnost da bakteriofagi budu imobilisani biofilmom u supstratu, nepovratno adsorbovani na površinu čestica supstrata, ili inaktivirani usled nepovoljne pH vrednosti supstrata (Gill i Abedon, 2003). Da bi fagi ispoljili efikasnost u kontroli *R. solanacearum* bilo je neophodno proveriti njihovu sposobnost održavanja u supstratu kao i mogućnost prodora i translokacije kroz biljno tkivo kako bi zatvorili puteve širenja bakterije. Rezultati ovih istraživanja pokazali su da posle zalivanja biljaka suspenzijom faga, tokom dve nedelje uzorkovanja, fagi su uspeali da i bez prisustva domaćina zadrže brojnost populacije na nivou koji se može detektovati (Slika 3). Detekcija faga u korenu i nadzemnim delovima biljaka paradajza ukazala je na sistemsku prirodu, odnosno sposobnost prodora i translokacije kroz biljno tkivo. Tretman fagima u momentu inokulacije pokazao se najefektnijim u zaštiti paradajza čak i u uslovima koji favorizuju bakteriju, tj. veoma pogodnim za ostvarenje infekcije biljaka prouzrokovalom uvelosti (Obradović i sar., 2008b).

U pogledu primene bakteriofaga u praksi, najdalje se otišlo njihovom integracijom u novu strategiju zaštite paradajza od bakteriozne pegavosti, i to u područjima gde klima povoljno utiče na nastanak i razvoj ovog oboljenja (Obradović i sar., 2007b, 2008c). U takvim uslovima zaštita paradajza od bakteriozne pegavosti predstavlja nerešiv problem. Usled pojave novih rasa bakterije *Xanthomonas euvesicatoria* i razvoja otpornosti ovog patogena prema baktericidima, gajenje otpornih genotipova i primena preparata na bazi streptomicina ili bakra ne obezbeđuje zadovoljavajući efekat zaštite (Momol i sar., 2002; Obradović i sar., 2004c). Stoga su započeta proučavanja mogućnosti primene bioloških agenasa, superparazita i antagonista navedenog patogena, bakterija stimulatora rasta biljaka i hemijskih supstanci aktiva-

tora sistemске otpornosti, u cilju integracije njihovih pozitivnih efekata u jedinstvenu i održivu strategiju zaštite. Na osnovu ranije ispoljene zadovoljavajuće efikasnosti u eksperimentima u staklari, tretmani bakteriofagima i aktivatorima otpornosti (acibenzolar-S-metil i harpin), kao i njihove međusobne kombinacije, odabrani su za dalja istraživanja u polju.

Još u ogleđima u zaštićenom prostoru uočen je do tada nezabeležen pozitivan efekat integracije tretmana fagima i aktivatorima otpornosti (Obradović i sar., 2005). Primenom acibenzolar-S-metila, u biljkama paradajza starosti šest nedelja došlo je do aktiviranja otpornosti prema patogenu do nivoa hipersenzitivnosti. U uslovima veoma povoljnim za ostvarenje infekcije i pri visokoj koncentraciji inokuluma (10^8 bakterija/ml), to je imalo za posledicu vidljive nekroze biljnog tkiva na mestima prodora bakterija, podsećajući na simptome prirodne infekcije. Iako je ovim dalje širenje patogena na tretiranim biljkama bilo zaustavljeno, nekroza tkiva je umanjila asimilativnu površinu lišća i mogla je da uspori normalan rast i razvoj biljaka. Takva reakcija biljaka u polju, pri jačem intenzitetu zaraze, prouzrokovala bi dodatne negativne efekte i stoga je bilo potrebno naći način da se nivo otpornosti biljaka zadrži ali da se smanji intenzitet njenog pobuđivanja i izbegne pojava nekroze tkiva. Kombinacija tretmana aktivatora otpornosti i bakteriofaga donela je rešenje nastalog problema. Ispostavilo se da su bakteriofagi uspešno smanjili populaciju bakterija na površini lišća umanjujući i broj prodora patogena kroz prirodne otvore, a samim tim i intenzitet reakcije biljke čija je otpornost pobuđena preparatom acibenzolar-S-metil.

Naredni eksperimenti su izvedeni na ogleđnim poljima Florida Univerziteta, u uslovima suptropske klime, izuzetno povoljnim za pojavu bakteriozne pegavosti. Rezultati ogleđ izvedenih u staklari (Obradović i sar., 2005) i tokom tri sezone na polju (Obradović i sar., 2004a), ukazali su da primena selekcionisanih sojeva bakteriofaga, formulisanih obranim mlekom i saharozom, u kombinaciji sa aktivatorima sistemске otpornosti biljaka, pruža efikasnu zaštitu paradajza čak i u uslovima suptropske klime. Navedena istraživanja doprinela su da tretman bakteriofagima, integrisan sa drugim merama zaštite, postane deo standardnog programa integralne zaštite paradajza od bakteriozne pegavosti na poljima Floride i južnih SAD, što predstavlja prvi praktičan primer rutinske primene bakteriofaga u zaštiti bilja u svetu (Momol i sar., 2005; Jones i sar., 2007; Obradović i sar., 2008c).



Slika 3. Fag RS52. Translokacija faga u tkivu biljaka paradajza (Obradović i sar., 2008a)

ZAKLJUČAK

Suzbijanje fitopatogenih bakterija predstavlja veliki izazov u poljoprivrednoj praksi, naročito u uslovima povoljnim za nastanak i širenje infekcije. U nedostatku efikasnih baktericida, sprečavanje pojave i širenje bakterioza bilja može se postići jedino integracijom pozitivnih efekata različitih metoda zaštite, među kojima biološke mere sve više dobijaju na značaju.

Od malobrojnih bioloških agenasa koji su našli primenu u praksi veliku pažnju u poslednje vreme privlače virusi koji parazitiraju bakterije tj. bakteriofagi. Rezistentnost nekih bakterija prema do sada poznatim antibioticima, kao i nedostatak novih preparata baktericidnog dejstva, rezultirali su povećanim interesovanjem za terapiju fagima. Osim toga, bolje poznavanje njihove biologije i ekologije doprinelo je unapređenju efikasnosti njihove primene.

Istraživanja mogućnosti primene bakteriofaga i aktivatora sistemne otpornosti rezultirala su integracijom njihovih pozitivnih efekata u jedinstvenu i održivu strategiju zaštite paradajza od bakteriozne pegavosti. Primena selekcionisanih sojeva bakteriofaga, formulisanih obranim mlekom i saharozom, u kombinaciji sa aktivatorima otpornosti biljaka, obezbedila je efikasnu zaštitu paradajza čak i u uslovima izuzetno povoljnim za pojavu bolesti. Ova kombinacija tretmana postala je deo standardnog programa zaštite paradajza u SAD i tako pokazala da se bakteriofagi mogu uspešno koristiti kao biološki agensi u zaštiti bilja od patogenih bakterija.

ZAHVALNICA

Deo rezultata ovog rada ostvaren je u okviru projekta TR20062 koji finansira Ministarstvo za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije.

LITERATURA

Agrios, G.N.: Plant Pathology. Elsevier Academic Press, USA, 2005.

Arsenijević, M.: Bakterioze biljaka. S-print, Novi Sad, 1997.

Balogh, B.: Strategies for Improving the Efficacy of Bacteriophages for Controlling Bacterial Spot of Tomato. Masters Thesis, University of Florida, Florida, USA, 2002.

Balogh, B., Jones, J.B., Momol, M.T., Olson, S.M., Obradović, A. and Jackson, L.E.: Improved efficacy of newly formulated bacteriophages for management of bacterial spot on tomato. *Plant Disease*, 87: 949-954, 2003.

Balogh, B., Iriarte, F.B., Obradović, A., Momol, M.T. and Jones, J.B.: Phages don't have it easy. *Phytopathology*, 97: S141, 2007.

Civerolo, E.L. and Kiel, H.L.: Inhibition of bacterial spot of peach foliage by *Xanthomonas pruni* bacteriophage. *Phytopathology*, 63: 1279-1284, 1969.

Flaberty, J.E., Jones, J.B., Harbaugh, B.K., Somodi, G.C. and Jackson, L.E.: Control of bacterial spot on tomato in the greenhouse and field with h-mutant bacteriophages. *Hort Science*, 35: 882-884, 2000.

Gašić, K., Ivanović, M. i Obradović, A.: Proučavanje specifičnosti bakteriofaga prema *Xanthomonas sp.* patogena paprike i paradajza. Zbornik rezimea XIII simpozijuma sa savetovanjem o zaštiti bilja, Zlatibor, 2007, str. 121-122.

Gill, J.J. and Abedon, S.T.: Bacteriophage ecology and plants. Feature article. *APSnet*. November, 2003.

Gill, J.J., Svircev, A.M., Smith, R. and Castle, A.J.: Bacteriophages of *Erwinia amylovora*. *Applied and Environmental Microbiology*, 4: 2133-2138, 2003.

Jackson, L.E.: Bacteriophage prevention and control of harmful plant bacteria. US Patent No. 4,828,999. 1989.

Jones, J.B., Woltz, S.S., Jones, J.P. and Portier, K.L.: Population dynamics of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* on tomato leaflets treated with copper bactericides. *Phytopathology*, 81: 714-719, 1991.

Jones, J.B., Obradović, A., Balogh, B., Momol, M.T. and Jackson, L.E.: Control of bacterial leaf spot on tomato with bacteriophages. *Phytopathology*, 92: S108, 2002.

Jones, J.B., Iriarte, F.B., Obradović, A., Balogh, B., Momol, M.T. and Jackson, L.E.: Management of bacterial spot on tomatoes with bacteriophages. Proceedings 1st International Symposium on Biological Control of Bacterial Diseases, Darmstadt, Germany – Mitt. Biol. Bundesanst. Land- Forstwirtschaft., 408: 154-157, 2006.

Jones, J.B., Jackson, L.E., Balogh, B., Obradović, A., Iriarte, F.B. and Momol, M.T.: Bacteriophages for plant disease control. *Annual Review of Phytopathology*, 45: 245-262, 2007.

Jones, J.B., Iriarte, F.B., Balogh, B., Obradović, A. and Momol, M.T.: Challenges involved in deploying bacteriophages for control of bacterial plant diseases. Book of abstracts 2nd International Symposium on Biological Control of Bacterial Plant Diseases, Orlando, Florida, USA, 2008, p. 48.

Klement, Z., Rudolf, K. and Sands, D.C.: Methods in Phytobacteriology. Akadémiai Kiadó, Budapest, Hungary, 1990.

- Kousik, C.S., Ritchie, D.F.:** Disease potential of pepper bacterial spot pathogen races that overcome the *Bs2* gene for resistance. *Phytopathology*, 86: 1336-1343, 1996.
- Kutter, E.:** Phage therapy: Bacteriophages as antibiotics. 1997. <http://www.evergreen.edu/phage/phagetherapy/phagetherapy.htm>
- Kutter, E. and Sulakvelidze, A.:** Bacteriophages – biology and application. CRC Press, USA, 2005.
- Louws, E.J., Wilson, M., Cambell, H.L., Cuppels, D.A., Jones, J.B., Shoemaker, P.B., Sabin, F. and Miller, S.A.:** Field control of bacterial spot and bacterial speck of tomato using a plant activator. *Plant Disease*, 85: 481-488, 2001.
- Marco, G.M. and Stall, R.E.:** Control of bacterial spot of pepper initiated by strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that differ in sensitivity to copper. *Plant Disease*, 67: 779-781, 1983.
- Martin, H.L., Hamilton, V.A. and Kopittke, R.A.:** Copper tolerance in Australian populations of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* contributes to poor field control of bacterial spot of pepper. *Plant Disease*, 88: 921-924, 2004.
- Minsavage, G.V., Canteros, B.I. and Stall, R.E.:** Plasmid-mediated resistance to streptomycin in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Phytopathology*, 80: 719-723, 1990.
- Momol, M.T., Jones, J.B., Olson, S., Obradović, A., Balogh, B. and King, P.:** Integrated Management of Bacterial Spot on Tomato in Florida. Fact Sheet PP110, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, 2002. EDIS Web site <http://edis.ifas.ufl.edu>.
- Momol, M.T. and Pernezny, K.:** Tomato. PDMG-V3-53, 2006 Florida Plant Disease Management Guide, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, 2005. EDIS Web site <http://edis.ifas.ufl.edu>.
- Obradović, A., Jones, J.B., Momol, M.T., Olson, S.M., King, P. i Balogh, B.:** Mogućnost primene nekih bioloških agenasa i aktivatora otpornosti biljaka u integralnoj zaštiti paradajza od bakterijske pegavosti. Zbornik rezimea XII simpozijuma o zaštiti bilja i savetovanja o primeni pesticida, Zlatibor, 2002a, str. 40.
- Obradović, A., Jones, J.B., Momol, M.T., Olson, S.M., Pradhanang, P. and Balogh, B.:** Efficacy of biocontrol agents and resistance inducers against tomato bacterial spot in the greenhouse. Annual Meeting of the American Phytopathological Society, Milwaukee, WI, USA. *Phytopathology*, 92: S60, 2002b.
- Obradović, A., Jones, J.B., Momol, M.T., Balogh, B. and Olson, S.M.:** Management of tomato bacterial spot in the field by foliar applications of bacteriophages and SAR inducers. *Plant Disease*, 88: 736-740, 2004a.
- Obradović, A., Jones, J.B., Momol, T., Balogh, B. and Olson, S.M.:** Bakteriofagi i aktivatori sistemne otpornosti – nova strategija u zaštiti paradajza od bakterijske pegavosti. Zbornik rezimea V kongresa o zaštiti bilja, Zlatibor, 2004b, str. 178.
- Obradović, A., Mavridis, A., Rudolph, K., Janse, J.D., Arsenijević, M., Jones, J.B., Minsavage, G.V. and Wang, J.F.:** Characterization and PCR-based typing of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* from peppers and tomatoes in Serbia. *European Journal of Plant Pathology*, 110(3): 285-292, 2004c.
- Obradović, A., Jones, J.B., Momol, M.T., Olson, S.M., Jackson, L.E., Balogh, B., Guven, K. and Iriarte, F.B.:** Integration of biological control agents and systemic acquired resistance inducers against bacterial spot on tomato. *Plant Disease*, 89: 712-716, 2005.
- Obradović, A., Gašić, K. i Ivanović, M.:** Izolacija bakteriofaga specifičnih prema sojevima *Xanthomonas euvesicatoria* patogenu paprike u Srbiji. Zbornik rezimea VIII savetovanja o zaštiti bilja, Zlatibor, 2006, str. 74.
- Obradović, A. i Ivanović, M.:** O primeni antibiotika u zaštiti bilja. *Biljni lekar*, 1: 52-59, 2007.
- Obradović, A., Gašić, K. i Stepanović, M.:** Mogućnost primene faga u zaštiti bilja. Zbornik rezimea XIII simpozijuma sa savetovanjem o zaštiti bilja, Zlatibor, 2007a, str. 32-34.
- Obradović, A., Jones, J.B., Balogh, B. and Momol, M.T.:** Development of an integrated management of tomato bacterial spot – a strategy that lives in practice. Book of Abstracts 2nd International Symposium on Tomato Diseases, Kusadasi, Turkey, 2007b, p. 84.
- Obradović, A., Gašić, K. i Stepanović, M.:** Bakteriofagi u zaštiti bilja. *Biljni lekar*, 1: 36-44, 2008a.
- Obradović, A., Iriarte, F.B., Minsavage, G.V., Hong, J.C., Momol, M.T. and Jones, J.B.:** Bacteriophage translocation in tomato plants and prospects for control of tomato bacterial wilt. Book of Abstracts 2nd International Symposium on Biological Control of Bacterial Plant Diseases, Orlando, Florida, USA, 2008b, p. 58.
- Obradović, A., Jones, J.B., Balogh, B. and Momol, M.T.:** Integrated management of tomato bacterial spot. In: *Integrated Management of Plant Diseases Caused by Fungi, Phytoplasma and Bacteria* (A. Ciancio and K.G. Mukerji, eds.), Springer Science & Business Media B.V., 2008c, pp. 211-223.
- Pernezny, K., Collins, J., Stall, R.E., Shuler, K. and Datnoff, L.E.:** A serious outbreak of race 6 of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* on pepper in southern Florida. *Plant Disease*, 83: 79, 1999.
- Qui, D., Wei, Z.M., Bauer, D.W. and Beer, S.V.:** Treatment of tomato seed with harpin enhances germination and

growth and induces resistance to *Ralstonia solanacearum*. *Phytopathology*, 87: S80, 1997.

Ritchie, D.F. and Dittapongpitch, V.: Copper- and streptomycin-resistant strains and host differentiated races of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in North Carolina. *Plant Disease*, 75: 733-736, 1991.

Saccardi, A., Gambin, E., Zaccardelli, M., Barone, G. and Mazzucchi, U.: *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* control trials with phage treatments on peaches in the orchard. *Phytopathologia Mediterranea*, 32: 206-210, 1993.

Svircev, A.M., Lehman, S.M., Kim, W.S., Barszcz, E., Schneider, K.E. and Castle, A.J.: Control of the fire blight pathogen with bacteriophages. *Mitt. Biol. Bundesanst. Land-Forstwirtschaft.*, 408: 259-261, 2006.

Šutić, D.: Viroze bilja. Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu. Beograd, 1995.

Tanaka, H., Negishi, H. and Maeda, H.: Control of tobacco bacterial wilt by an avirulent strain of *Pseudomonas solanacearum* M4S and its bacteriophage. *Ann. Phytopath. Soc. Japan*, 56: 243-246, 1990.

Thayer, P.L. and Stall R.E.: A survey of *Xanthomonas vesicatoria* resistance to streptomycin. *Proc. Fla. State Hort. Soc.*, 75: 163-165, 1961.

Thomas, R.C.: A bacteriophage in relation to Stewart's disease of corn. *Phytopathology*, 25: 371-372, 1935.

Vidaver, A.K.: Prospects for control of phytopathogenic bacteria by bacteriophages and bacteriocins. *Annual Review of Phytopathology*, 14: 451-456, 1976.

Zaccardelli, M., Saccardi, A., Gambin, E. and Mazzucchi, U.: *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* bacteriophages on peach trees and their potential use for biological control. *Phytopathologia Mediterranea*, 31: 133-140, 1992.

Bacteriophages as Bactericides in Plant Protection

SUMMARY

Control of plant pathogenic bacteria is a serious problem in production of many agricultural crops. High multiplication rate, adaptability and life inside plant tissue make bacteria unsuitable and inaccessible for most of control measures. Consequently, the list of bactericides available for plant protection is very short. Lately, biological control measures have been intensively studied as a potential solution of the problem. Investigation of bacteriophages, viruses that attack bacteria, is a fast-expanding area of research in plant protection. Several experiments have shown that they can be used as a very efficient tool for control of plant pathogenic bacteria. The fact that they are widespread natural bacterial enemies, simple for cultivation and management, host-specific, suitable for integration with other control practices, human and environment friendly, provide a great advantage for the application of phages over other bactericides.

Keywords: Plant pathogenic bacteria; Bacteriophages; Bactericides; Biological control; Integrated disease management