

Karakterizacija sojeva *Xanthomonas euvesicatoria*, patogena paprike u Srbiji

Maja Ignjatov¹, Katarina Gašić², Milan Ivanović², Milan Šević³, Aleksa Obradović² i Mirjana Milošević⁴

¹Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Maksima Gorkog, 30, 21000 Novi Sad, Srbija
(maja@ifvcns.ns.ac.rs)

²Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Institut za fitomedicinu, Nemanjina 6, 11080 Beograd, Srbija

³Institut za povrtarstvo, Karađorđeva 71, 11420 Smederevska Palanka, Srbija

⁴Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede Republike Srbije, Nemanjina 22-26, 11000 Beograd, Srbija

Primljen: 19. marta 2010.

Prihvaćen: 13. maja 2010.

REZIME

Tokom 2008. godine prikupljeni su uzorci obolelog lišća paprike sa simptomima bakterijske pegavosti iz različitih lokaliteta Republike Srbije. Izolacijom iz zaraženih listova dobio je 101 soj bakterija. Cilj ovog rada je proučavanje odlika i identifikacija izolovanih sojeva bakterije u skladu sa najnovijom nomenklaturom. Patogene i biohemijsko-fiziološke karakteristike sojeva proučene su korišćenjem standardnih bakterioloških testova. Određivanje fizioloških rasa bakterijske populacije izvršeno je na osnovu reakcije diferencijalnih sorti paprike Early Calwonder (ECW), njenih izogenih linija (ECW-10, ECW-20 ECW-30) i reakcijom sorte *Capsicum pubescens*. Proučena je osetljivost sojeva u *in vitro* uslovima na streptomycin, kasugamicin i bakar-sulfat. Rezultati proučavanja biohemijsko-fizioloških odlika sojeva ukazuju da naši sojevi pripadaju genetičkoj grupi „A“, odnosno vrsti *Xanthomonas euvesicatoria*. Proučavani sojevi, takođe, predstavljaju heterogenu populaciju u kojoj su zastupljene četiri fiziološke rase bakterije *X. euvesicatoria* (P1, P3, P7, P8). Sojevi rezistentni na streptomycin nisu detektovani ovim istraživanjima. Otpornost na 50 ppm kasugamicina utvrđena je kod 6 sojeva, a 13 sojeva je bilo otporno na 200 ppm bakar-sulfata. Prikazani rezultati ukazuju na opasnost od razvoja rezistentnosti bakterija na ova jedinjenja.

Cljučne reči: Paprika; bakterijska pegavost lista; *Xanthomonas euvesicatoria*; *Xanthomonas vesicatoria*; *Xanthomonas perforans*; *Xanthomonas gardneri*; fiziološke rase; rezistentnost

UVOD

Paprika (*Capsicum annuum*) u našoj zemlji ima veliki privredni značaj i spada u grupu najznačajnijih povrtaških useva. Gaji se na oko 20.000 ha, te se po zastupljenosti nalazi na drugom mestu, iza paradajza (Gvozdenović i sar., 2008). Veoma je zastupljena u ishrani jer se u plodu paprike nalazi veliki broj jedinjenja značajnih za ljudski organizam. Gajenje paprike ugrožava veliki broj prouzrokovaca bolesti, koji utiču kako na semensku proizvodnju, tako i na proizvodnju konzumne paprike. Bakterioze paprike često prouzrokuju značajne štete i stoga su predmet proučavanja mnogih istraživača širom sveta (Buonaurio i sar., 1994; Vauterin i sar., 1995; Sahin, 2001; Jones i sar., 2004; Obradović i sar., 2008). Kao prouzrokovaci bakterioza paprike u literaturi se navode: *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Doidge) Dye, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis i sar., *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi i sar., *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Okabe) Joung, Dye&Wilkie, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* van Hall (Arsenijević, 1997; Obradović i sar., 2001; CAB, 2004).

Zahvaljujući brojnim istraživanjima patogenih, biohemijskih, seroloških i molekularnih karakteristika, promene u taksonomiji bakterije *X. c.* pv. *vesicatoria*, prouzrokovaca bakteriozne pegavosti lišća i krastavosti plodova paprike, su tokom poslednje dve decenije bile vrlo dinamične. Nasuprot prvobitnom mišljenju Dye i saradnika (1964) da je populacija *X. c.* pv. *vesicatoria* prilično homogena, noviji rezultati su ukazali na postojanje dve genetski i fenotipski različite grupe (Stall i sar., 1994). Ovako podeljeni sojevi klasifikovani su u nove vrste – *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* (grupa A) i *X. vesicatoria* (grupa B) (Vauterin i sar., 1995). Međutim, Jones i saradnici (1998b), proučavajući sojeve *Xanthomonas* sp. poreklom iz paradajza, ukazuju na postojanje četiri grupe. Ubrzo potom, predlažu da ove grupe dobiju status vrsta i nove nazive: *Xanthomonas euvesicatoria* (grupa A), *Xanthomonas vesicatoria* (grupa B), *Xanthomonas perforans* (grupa C) i *Xanthomonas gardneri* (grupa D) (Jones i sar., 2000; Obradović i sar., 2004, 2008). Bakterije *X. a.* pv. *vesicatoria* (= *X. euvesicatoria*) i *X. vesicatoria* nalaze se na A2 karantinskoj listi za zemlje članice Evropskog udruženja za zaštitu bilja (European and Mediterranean Plant Protection Organization – EPPO). EPPO distributivna mapa ovih patogena pokazuje da su široko rasprostranjeni u svetu. U agroekološkim uslovima Srbije prouzrokovac bakteriozne pegavosti paprike *X. euvesicatoria* redovno se javlja i pričinjava značajne štete (Balaž, 1994; Arsenijević, 1997; Mijatović i sar., 2007).

Populacija patogena je veoma dinamična i ranije je utvrđen veći broj fizioloških rasa (Minsavage i sar., 1990; Bouzar i sar., 1994; Kousik i Ritchie, 1996; Sahin i Miller, 1998; Obradović i sar., 2000a, 2004).

S obzirom da sojevi bakterije ne predstavljaju uniformnu populaciju, te da postoji veći broj fizioloških rasa, cilj ovog rada je karakterizacija i identifikacija izolovanih sojeva bakterije i utvrđivanje rasnog sastava populacije *Xanthomonas* kompleksa, prouzrokovaca bakteriozne pegavosti paprike u Srbiji, kao i usaglašavanje rezultata prema najnovijoj sistematici i nomenklaturi.

MATERIJAL I METODE

Izolacija patogena

Uzorci lišća različitih sorti paprike, sa simptomima bakteriozne pegavosti, prikupljeni su iz više lokaliteta u Srbiji tokom 2008. godine. Izolacija je vršena maceracijom fragmenata lista uzetih na prelazu zdravog i obolelog dela tkiva pomoću avana i tučka. Zatim je kap macerata razmazana bakteriološkom petljom po podlozi od kvašćevog ekstrakta, glukoze i CaCO₃ (YDC) u petri-posudama (R=9 cm) (Arsenijević, 1997). Zasejana podloga je postavljena u termostat pri 26°C tokom 2-3 dana. Nakon inkubacije i razvoja kolonija, za dalja proučavanja odabrane su pojedinačne žute, sluzaste kolonije, prečnika 2-3 mm. Čiste kulture bakterija dobijene su presejavanjem pojedinačnih kolonija na zakošenu YDC podlogu. Izolovan je 101 soj bakterija čija je vitalnost održavana periodičnim presejavanjem i čuvanjem kultura u frižideru pri temperaturi oko 7°C. Sojevi su, takođe, čuvani i u vidu suspenzije u vodi (konc. oko 10⁸ cfu/ml) u mikropruветama pri sobnoj temperaturi.

Za proučavanja bakterioloških karakteristika korišćene su kulture bakterija starosti 24h. Kao kontrolni poslužili su sojevi iz drugih kolekcija: Nacionalne kolekcije fitopatogenih bakterija Velike Britanije (*X. gardneri* – NCPPB 881, *X. vesicatoria* – NCPPB 1423, *X. perforans* – NCPPB 4321) i Instituta za fitomedicinu Poljoprivrednog fakulteta u Beogradu (*X. euvesicatoria* KFB 1, KFB 13, KFB 189 i *Xanthomonas vesicatoria* KFB 062).

Patogene odlike proučavanih sojeva

Provera patogenosti izvršena je metodom infiltracije bakterijske suspenzije (konc. 10⁸ cfu/ml) u tkivo između nerava petog ili šestog stalnog lista paprike sorte Kalifornijsko čudo, pomoću medicinskog šprica i igle (Obradović i sar., 2000a). Biljke paprike održavane su u

laboratorijskim uslovima pri sobnoj temperaturi, a nastale promene posmatrane su narednih 7 dana.

Proučavana je i sposobnost sojeva da prouzrokuju hipersenzitivnu reakciju (HR) duvana sorte Samsun infiltracijom suspenzije bakterija u lisno tkivo između nerava (Klement, 1963). Biljke duvana održavane su u laboratorijskim uslovima pri sobnoj temperaturi, a ocena je izvršena na osnovu pojave nekroze tkiva u toku 24 časa.

Bakteriološke karakteristike

U cilju identifikacije sojeva proučavane su sledeće bakteriološke karakteristike: razlikovanje bakterija po Gramu (3% KOH test), razvoj pri 37°C, metabolizam glukoze (O/F test), redukcija nitrata, hidroliza skroba, želatina i eskulina, pektolitička aktivnost na kriškama krompira, aktivnost oksidaze, stvaranje katalaze, stvaranje kiseline iz manoze, D-arabinoze, D-glukoze, D-galaktoze i dekstrina, korišćenje *cis*-akonitinske kiseline, tolerantnost na trifenil-tetrazolijum-hlorid (TTC) koncentracije 0,02% i 0,1% (Lelliot i Stead, 1987; Klement i sar., 1990; Arsenijević, 1997; Schaad i sar., 2001). Odgajivačke odlike ocenjene su na osnovu razvoja bakterijskih kolonija na podlogama YDC, MPA, mSQ, TTCA, Milk Tween (MT) i Tween 80 (Kelman, 1954; Schaad i sar., 2001; Balaž i Delibašić, 2005; Balaž i sar., 2008).

Identifikacija fizioloških rasa

Određivanje fizioloških rasa bakterijske populacije izvršeno je na osnovu reakcije diferencijalnih sorti paprike Early Calwonder (ECW), njenih izogenih linija (ECW-10, ECW-20, ECW-30) i reakcijom sorte *Capsicum pubescens*. Ogled je izveden tako što je seme navedenih genotipova paprike posejano u plastične kutije napunjene mešavinom sterilnog peska i komercijalnog supstrata (Florabella Klasmann tip 1) u odnosu 1:3 i održavano u termostatu pri 22°C do nicanja biljaka. Potom su mlade biljke presađene u plastične saksije sa zemljišnim supstratom (Florabella Klasmann tip 1) i gajene u zaštićenom prostoru uz smenu svetla i tame svakih 12 sati, pri temperaturi 25°C. Biljke u fazi 7-8 stalnih listova, inokulisane su infiltracijom suspenzije bakterija (10^8 cfu/ml) medicinskim špricom u tkivo između nerava petog ili šestog lista (Obradović i sar., 2000a). Determinacija fizioloških rasa patogena izvršena je na osnovu reakcije biljaka na testirane sojeve ponaosob (Tabela 1) (Sahin i Miller, 1998). Kao znak kompatibilne (osetljive) reakcije tkivo lista u zoni infiltracije postaje vodenasto 3-5 dana nakon inokulacije. Inkompatibilnu reakciju karakteriše pojava hipersenzitivnosti (HR) 12-36 sati posle infiltracije.

Tabela 1. Klasifikacija rasa *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* sojeva poreklom iz paprike (Sahin i Miller, 1998)

Rase	Diferencijalne linije paprike				
	ECW	ECW-10 <i>Bs1</i>	ECW-20 <i>Bs2</i>	ECW-30 <i>Bs3</i>	<i>Capsicum pubescens</i> <i>Bs4</i>
P0	–	HR	HR	HR	HR
P1	–	–	HR	HR	HR
P2	–	–	HR	–	–
P3	–	–	HR	–	HR
P4	–	–	–	–	HR
P5	–	–	–	–	–
P6	–	–	–	–	HR
P7	–	–	HR	HR	–
P8	–	–	HR	–	–

(–) Kompatibilna reakcija; (HR) Hipersenzitivna reakcija

Osetljivost na CuSO_4 , streptomycin-sulfat i kasugamicin

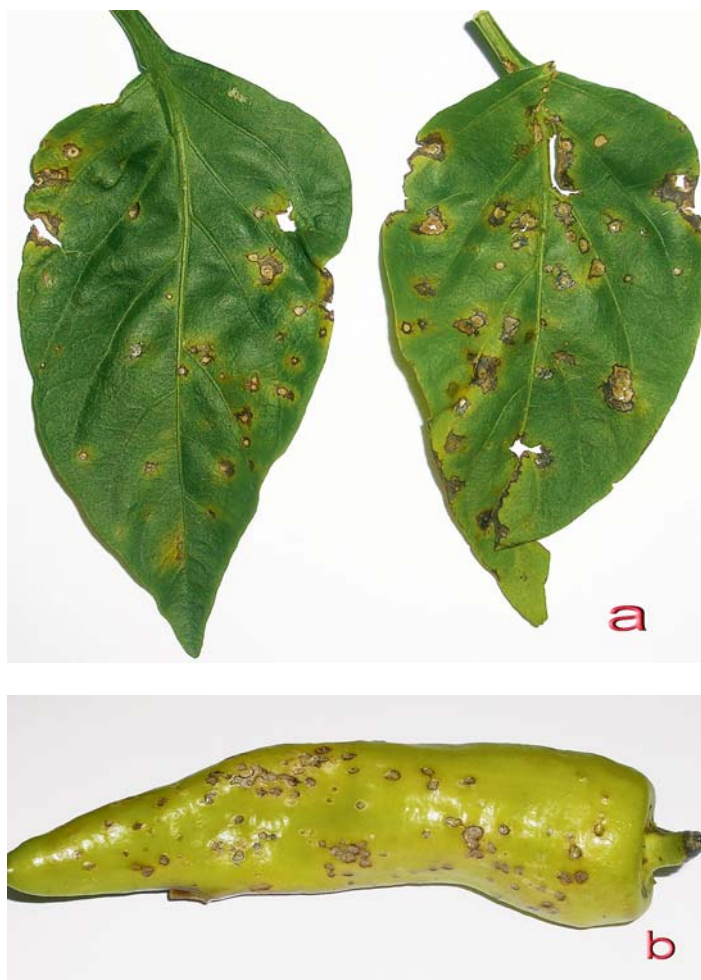
U cilju ocene osetljivosti sojeva na baktericide korišćena je podloga sa saharozom i peptonom (SPA) (Lelliot i Stead, 1987). U autoklaviranu i delimično prohladenu podlogu dodat je vodeni rastvor bakar-sulfata do konačne koncentracije 100 ili 200 ppm, odnosno aktivne komponente antibiotika streptomicina ili kasugamicina do konačne koncentracije 50, 100 ili 200 ppm. Podloge su zatim razlivena u petri-posude, a proučavani sojevi su zasejani pipetiranjem $3\mu\text{l}$ bakterijske suspenzije, koncentracije oko 10^8 cfu/ml, na podlogu u vidu kapi. Posle 48h inkubacije pri 28°C ocenjen je razvoj kolonija na podlozi. Kao kontrola je korišćen soj *X. vesicatoria* (KFB 062) rezistentan na bakar-sulfat i pomenute antibiotike, a zasejana je i podloga bez dodatka testiranih baktericida. Ogljed je izveden u tri

ponavljanja. Preparati na bazi antibiotika nisu registrovani za upotrebu u zaštiti bilja u našoj zemlji i ovom prilikom korišćeni su *in vitro* u eksperimentalne svrhe.

REZULTATI

Simptomi bolesti

Tokom 2008. godine prvi simptomi bakterijske pegavosti paprike u polju uočeni su krajem juna i početkom jula u vidu tamnozelenih, vlažnih pega na mladim listovima. Vremenom, središnji deo pega nekrotira i postaje mrk (Slika 1a). Pega se šire i spajaju, obrazujući veće zone nekrotiranog tkiva. Obolelo lišće se deformiše, dobija bledezelenu boju i lako se odvaja od stabla i opada. Na plodu se, takođe, uočavaju nekrotične, mrke pege koje usled pucanja perikarpa vremenom dobijaju izgled krasta (Slika 1b).



Slika 1. *X. euvesicatoria* – a) nekrotična pegavost lišća paprike, b) nekrotične pege i kraste na plodu paprike; prirodna infekcija

Izolacija patogena

Tri dana posle izolacije, na YDC podlozi, razvile su se krupne, sjajne, žute i ispupčene kolonije bakterija, karakteristične za pripadnike roda *Xanthomonas*.

Pojedinačne kolonije izolovanih bakterija su presejane, metodom razmaza, radi provere čistoće, a zatim su ponovo izborom i presejavanjem pojedinačnih kolonija tipičnog izgleda dobijene čiste kulture 101 soja odbranog za dalja proučavanja (Tabela 2).

Tabela 2. Proučavani sojevi *X. euvesicatoria* poreklom iz Srbije

Šifre sojeva RKFB	Sorta paprike	Datum	Lokalitet
164	Nepoznata / unknown	20.07.2008.	Kula
165	Nepoznata / unknown	20.07.2008.	Topola
166	Nepoznata / unknown	20.07.2008.	Topola
167	Nepoznata / unknown	20.07.2008.	Kula
189, 190	Slonovo uvo	17.06.2008.	Despotovo
191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201	Boni	17.06.2008.	Despotovo
202, 203	HS-2	20.06.2008.	Horgoš
204, 205, 206, 207	HS-6	20.06.2008.	Horgoš
208, 209, 210, 211	Slonovo uvo	23.06.2008.	Smederevo
212, 213	Palanačka bela	23.06.2008.	Smederevo
214, 215, 216, 217	Slonovo uvo	25.06.2008.	Bačka Palanka
218, 219	Slonovo uvo	25.06.2008.	Tovariševo
220, 221, 222	S-20	26.06.2008.	Bašaid
223, 224, 225, 226	Kaloča	26.06.2008.	Senta
227, 228, 229, 230	Kaloča	26.06.2008.	Kikinda
231, 232, 233	HS-6	27.06.2008.	Novi Kneževac
234, 235, 236	Slonovo uvo	27.06.2008.	Novi Kneževac
237, 238, 239, 240	Ami	30.06.2008.	Gospodinci
241, 242	Centerion	30.06.2008.	Gospodinci
243, 244, 245, 246	S-20	01.07.2008.	Gložan
247, 248, 249, 250	HS-6	01.07.2008.	Gložan
251, 252, 253, 254	HS-6	01.07.2008.	Pivnice
255, 256	S-80	01.07.2008.	Silbaš
257, 258	Istra	03.07.2008.	Vukovar
259, 260, 261, 262	Slonovo uvo	07.07.2008.	Ruski Krstur
263, 264, 265, 266	Slonovo uvo	07.07.2008.	Kula
267, 268	Slonovo uvo	09.07.2008.	Odžaci
269, 270	Anita	09.07.2008.	Vrbas
271, 272, 273	Slonovo uvo	09.07.2008.	Kucura
274, 275	HS-8	11.07.2008.	Stanišić
276, 277, 278, 279	Slonovo uvo	11.07.2008.	Lalić
280, 281	Amfora	15.07.2008.	Stapar
282, 283	Ami	15.07.2008.	Sombor
284, 285	Šorok šari	15.07.2008.	Ratkovo

Patogene odlike proučavanih sojeva

Svi proučavani sojevi ispoljili su patogenost prema biljci domaćinu – sorti paprike Kalifornijsko čudo. Prve promene tkiva na mestu infiltracije suspenzije bakterija u list paprike uočene su sa naličja lista tri dana posle inokulacije (Slika 2a). U početku se formira



ju tamnozeleno-zelene zone, vodenastog izgleda, a sa lica tkivo dobija svetlozelenu boju. Kasnije nastaje kolaps tkiva, praćen promenom boje i nekrozom, sa jasno izraženim mrkim ivicama.

Posle 24h od infiltracije svi proučavani sojevi prozurokovali su hipersenzitivnu reakciju duvana sorte Samsun (Slika 2b).



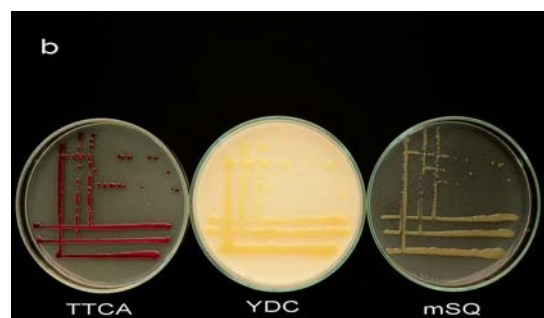
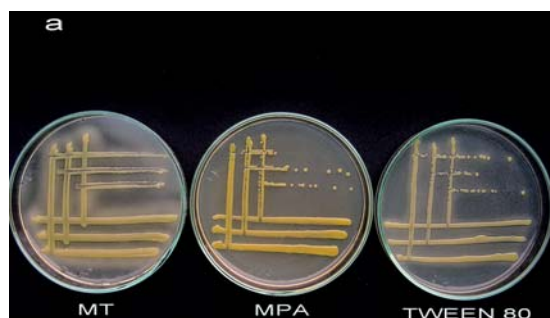
Slika 2. *X. euvesicatoria* – a) soj RKFB 226, tamnozeleno vodenasta zona na naličju lista paprike sorte Kalifornijsko čudo kao znak kompatibilne reakcije, b) hipersenzitivna reakcija lista duvana sorte Samsun

Bakteriološke karakteristike

Proučavani sojevi pripadaju gramnegativnim bakterijama. Na mesopeptonskoj podlozi kolonije su sitne, prečnika 2 mm, ravne, sjajne, žuto-smeđe boje, dok se na MT podlozi oko kolonija uočavaju dve zone hidrolize (mlečne zone usled hidrolize Tween-a i prosvetljene zone usled hidrolize kazeina), a na podlozi sa

dotakom Tween-a 80 uočavaju se samo mlečne zone hidrolize (Slika 3a).

Na podlozi sa kvaščevim ekstraktom, glukozom i CaCO_3 (YDC) sojevi formiraju okrugle, ispupčene i sjajne kolonije, sluzastog izgleda, svetložute do žuto-smeđe boje, tipične za bakterije roda *Xanthomonas*. Na TTCA podlozi bakterija formira kolonije crvene boje, dok su kolonije bakterije na mSQ podlozi sitne, krem-žute boje (Slika 3b).



Slika 3. *X. euvesicatoria* – izgled kolonija bakterije na različitim hranljivim podlogama – a) MT, MPA, Tween 80, b) TTCA, YDC i mSQ

Proučavani sojevi razlažu glukozu oksidativno (O), ne redukuju nitrate, hidrolizuju želatin i eskulin ali ne i škrob, poseduju ferment katalazu ali ne i oksidazu i pektinazu. Stvaraju kiselinu iz manoze, D-arabinoze, D-glukoze, D-galaktoze i dekstrina,

i razvijaju se na podlozi sa *cis*-akonitinskom kiselinom (Tabela 3). Pri koncentraciji 0,02% trifenil-tetrazolijum-hlorida (TTC) u podlozi razvoj bakterija je potpun, dok koncentracija od 0,1% sprečava porast kolonija.

Tabela 3. Biohemijsko-fiziološke odlike sojeva izolovanih iz paprike u Srbiji

Test	Proučavani sojevi RKFB164-167 RKFB 189-285	Kontrolni sojevi			
		Domaćin <i>Capsicum annuum</i>	Domaćin <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.		
		<i>Xanthomonas euvesicatoria</i> KFB1, KFB 13	<i>Xanthomonas vesicatoria</i> NCPPB 1423	<i>Xanthomonas perforans</i> NCPPB 4321	<i>Xanthomonas gardneri</i> NCPPB 881
Razlikovanje bakterija po Gramu (3% KOH)	GN	GN	GN	GN	GN
HR duvana	+	+	+	+	+
Sluzast razvoj na YDC* podlozi	+	+	+	+	+
Razvoj na 37°C	+	+	+	+	+
Metabolizam glukoze	O	O	O	O	O
Redukcija nitrata	-	-	-	-	-
Amilolitička aktivnost	-	-	+	+	-
Hidroliza	+	+	+	+	+
- Želatina	+	+	+	+	+
- Eskulina					
Pektolitička aktivnost na kriškama krompira	-	-	+	+	-
Aktivnost oksidaze	-	-	-	-	-
Stvaranje katalaze	+	+	+	+	+
Stvaranje kiseline iz:					
- Manoze	+	+	+	+	+
- D-arabinoze	+	+	+	+	+
- D-glukoze	+	+	+	+	+
- D-galaktoze	+	+	-	+	-
- Dekstrina	+	+	+	+	-
Korišćenje <i>cis</i> -akonitinske kiseline	+	+	+	+	-
Tolerantnost na TTC**:	+	+	+	+	+
- 0,02%	-	-	-	-	-
- 0,1%					

* YDC podloga od glukoze, kvašćevog ekstrakta i CaCO₃

** TTC-trifenil tetrazolium hlorid

GN - Gramnegativna reakcija

Određivanje fizioloških rasa

Na osnovu reakcije inokulisanih biljaka paprike sorte ECW i njenih izogenih linija ECW-10, ECW-20, ECW-30 i biljaka paprike *Capsicum pubescens*, konstatovano je da sojevi pripadaju fiziološkim

rasama: P1, P3, P7 i P8 bakterije *Xanthomonas euvesicatoria*. Od ukupnog broja proučavanih sojeva, na osnovu ocenjenih reakcija biljaka na patogen, fiziološkoj rasi P1 pripada 5 sojeva, rasi P3 jedan soj, rasi P7 pripada 17 sojeva, a rasi P8 pripada 78 sojeva (Tabela 4).

Tabela 4. Procentualna zastupljenost fizioloških rasa proučavanih sojeva bakterije *X. euvesicatoria*

Rasa	Zastupljenost rasa (%)	Šifre sojeva RKFB
P1	5	206, 207, 209, 210, 211
P3	1	197
P7	17	166, 167, 189, 190, 191, 192, 193, 208, 247, 248, 249, 259, 260, 261, 262, 274, 275
P8	77	164, 165, 194, 195, 196, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285

Osetljivost na baktericide

U rezultatima *in vitro* ogleda uočene su razlike u reakciji proučavanih sojeva na baktericide. Koncentracija 100 ppm bakar-sulfata nije delovala na razvoj kolonija proučavanih sojeva. Međutim, pri koncentraciji 200 ppm ovog jedinjenja u podlozi razvijalo se samo 13 sojeva, dok je 88 ispoljilo osetljivost. Utvrđena je razlika i u pogledu osetljivosti na kasugamicin. Za razliku od 95 sojeva koji se nisu razvijali pri koncentraciji 50 ppm ovog preparata, 6 sojeva je ispoljilo rezistentnost. Nasuprot kasugamicinu, streptomycin-sulfat je ispoljio baktericidno dejstvo pri najmanjoj testiranoj koncentraciji od 50 ppm, inhibirajući razvoj svih sojeva *X. euvesicatoria* poreklom iz Srbije.

Prema dobijenim rezultatima, minimalna inhibitorna koncentracija streptomycin-sulfata je 50 ppm, kasugamicina 50 ppm za većinu i 100 ppm za sve sojeve. Minimalna inhibitorna koncentracija bakar-sulfata takođe nije ista za sve sojeve. Većina je osetljiva na 200 ppm ovog baktericida, za razliku od 13 sojeva koji su se normalno razvijali, što ukazuje na moguću pojavu rezistentnosti bakterije *X. euvesicatoria* na navedeno jedinjenje bakra.

DISKUSIJA

Tokom 2008. godine iz različitih lokaliteta u Srbiji prikupljen je veliki broj uzoraka lišća paprike sa simptomima bakteriozne pegavosti, u cilju izolacije sojeva patogena i proučavanja njihovih patogenih i biohemijsko-fizioloških odlika.

Prema najnovijoj nomenklaturi paprike parazitira više bakterija *Xanthomonas* kompleksa, u koji spadaju: *Xanthomonas euvesicatoria* (grupa A), *Xanthomonas vesicatoria* (grupa B), *Xanthomonas perforans* (grupa C) i *Xanthomonas gardneri* (grupa D) (Vauterin i sar., 1995; Jones i sar., 2000; Obradović i sar., 2004, 2008). Vauterin i saradnici (1995) su, na osnovu nekih biohemijskih karakteristika, izvršili reklasifikaciju sojeva bakterije *X. c. pv. vesicatoria* u dve nove odvojene grupe: neamilolitičku grupu A koja pripada vrsti *X. axonopodis pv. vesicatoria* i amilolitičku grupu B, tj. vrstu *X. vesicatoria*. Kasnije, prema fenotipskim i genetskim karakteristikama dolazi do promena. Tako grupa A obuhvata neamilolitičke sojeve imenovane kao *X. euvesicatoria*. Grupama B i C pripadaju amilolitički sojevi podeljeni u vrste *X. vesicatoria* i *X. perforans*, a sojevi grupe D su svrstani u *X. gardneri* (Vauterin i sar., 1995; Jones i sar., 2000, 2004; Obradović i sar., 2004, 2008). Za grupu A (*X. euvesicatoria*) karakteristično je da: ne ispoljava amilolitičku i pektolitičku aktivnost, hidrolizuje želatin i eskulin, ne poseduje oksidazu, stvara kiseline iz manoze, D-arabinoze, D-glukoze, D-galaktoze i dekstrina, razvija se uz dodatak *cis*-akonitinske kiseline.

Amilolitička i pektolitička aktivnost je diferencijalna karakteristika grupe B i C u odnosu na neamilolitičke i nepektolitičke predstavnike grupe A i D. Za grupu D takođe nije karakteristično stvaranje kiseline iz dekstrina i D-galaktoze, kao ni korišćenje *cis*-akonitinske kiseline, što je diferencijalna karakteristika u odnosu na grupu A (Jones i sar., 2000; Obradović i sar., 2008; Ignjatov i sar., 2009; Kornev i sar., 2009).

Rezultati proučavanja patogenih, biohemijskih i fizioloških karakteristika sojeva izolovanih iz paprike u Srbiji pokazali su da proučavani sojevi ne predstavljaju uniformnu populaciju. S obzirom da poseduju najviše karakteristika genetičke grupe „A“ može se reći da pripadaju vrsti *X. euvesicatoria* (Tabela 3). Naša istraživanja ukazuju da je u pogledu fiziološke specijalizacije populacija bakterije *X. euvesicatoria* heterogena i da su zastupljene četiri fiziološke rase: P1, P3, P7 i P8 (Tabela 4). Najzastupljenija je rasa P8 sa 77%, potom rasa P7 sa 17%, dok su rase P1 i P3 zastupljene sa 5%, odnosno 1%.

Glavni uzrok čestih pojava bakteriozne pegavosti jakog intenziteta je gajenje osetljivog sortimenta paprike u svetu i kod nas. Na osnovu reakcije diferencijalnih sorti paprike i paradajza Jones i saradnici (1998a) opisali su 9 fizioloških rasa bakterije *X. c. pv. vesicatoria* (P0-P8). Selekcioni pritisak nastao unošenjem gena otpornosti u komercijalne genotipove gajenih biljaka često rezultira pojavom sojeva sposobnih da prevaziđu otpornost

(Pernezny i Collins, 1997). To je i razlog što je tokom poslednjih decenija ustanovljen veći broj rasa ovog patogena, što znatno otežava stvaranje otpornih sorti na sve postojeće rase. Utvrđeni su geni otpornosti paprike (*Bs1*, *Bs2*, *Bs3*) i geni avirulentnosti bakterije *X. c. pv. vesicatoria* (*avrBs1*, *avrBs2* i *avrBs3*) (Hibberd i sar., 1987; Swanson i sar., 1988). Postoje rase koje parazitiraju samo paradajz (*XcvT*), one koje parazitiraju samo papriku (*XcvP*), kao i one čiji su domaćini i paprika i paradajz (*XcvPT*) (Minsavage i sar., 1990). Obradović i saradnici (2000a) su u svojim istraživanjima ustanovili dve grupe jugoslovenskih sojeva koji pripadaju rasama P1 i P3 bakterije *X. c. pv. vesicatoria*. U kasnijim istraživanjima rezultati dobijeni na osnovu reakcije diferencijalnog sortimenta paprike ukazuju da izolati poreklom sa paprike pripadaju rasama 7 i 8 (P7 i P8), a izolati poreklom sa paradajza rasi 2 (T2) (Obradović i sar., 2004).

S obzirom na mali spektar aktivnih materija za suzbijanje prouzrokovala bakteriozne pegavosti paprike i nekontrolisanu upotrebu antibiotika, kao i čestu primenu bakarnih preparata, proučen je efekat ovih baktericida u uslovima *in vitro*. Razlike u osetljivosti patogena na bakar-sulfat i kasugamicin ukazuju da postoji opasnost od razvoja rezistentnosti bakterija. Sojevi rezistentni na streptomycin nisu detektovani u ovim proučavanjima. Ranijim istraživanjima osetljivosti sojeva u *in vitro* uslovima na bakar-sulfat i streptomycin utvrđeno je da su koncentracije streptomicina od 20, 50, 100 i 200 ppm i bakar-sulfata od 200 ppm potpuno zaustavile razvoj kolonija na podlozi (Obradović i sar., 2000b). Pretpostavlja se da razlog pojave rezistentnosti proučavanih sojeva na bakar-sulfat leži u širokoj i čestoj upotrebi ove i drugih aktivnih supstanci na bazi jona bakra za kontrolu mikroba i bakterioza u biljnoj proizvodnji.

ZAKLJUČAK

Rezultati proučavanja biohemijsko-fizioloških odlika izolovanih sojeva ukazuju da naši sojevi pripadaju genetičkoj grupi „A“, odnosno vrsti *Xanthomonas euvesicatoria*. Proučavani sojevi, takođe, predstavljaju heterogenu populaciju u kojoj su zastupljene četiri fiziološke rase bakterije *X. euvesicatoria* (P1, P3, P7, P8). Uzimajući u obzir gajenje osetljivog sortimenta, pojavu rezistentnih sojeva bakterija na bakar i postojanje više fizioloških rasa patogena, neophodno je istraživanja usmeriti u pravcu stvaranja tolerantnih linija i sorti, kao i mogućnosti korišćenja prirodnih agenasa u cilju zaštite od prouzrokovala bakteriozne pegavosti paprike.

ZAHVALNICA

U radu su prikazani rezultati doktorske disertacije Maje Ignjatov pod naslovom „Diverzitet populacije *Xanthomonas* spp. patogena paprike u Srbiji“, čiji je mentor prof. dr Aleksa Obradović, Poljoprivredni fakultet, Beograd.

Doktorska disertacija, kao i ovaj rad, rezultat su realizacije projekta Instituta za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad, TR20075 – „Stvaranje sorti i hibrida povrća za proizvodnju u zaštićenom prostoru“, čiju realizaciju finansira Ministarstvo za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije.

LITERATURA

- Arsenijević, M.:** Bakterioze biljaka. S print, Novi Sad, 1997.
- Balaž, J.:** Pegavost lišća paprike prouzrokovana bakterijom *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Savremena poljoprivreda, vanredni broj, 42: 341-345, 1994.
- Balaž, J. i Delibašić, T.:** Iznalaženje metoda za izolaciju *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* sa semena paprike. Pesticidi i fitomedicina, 20(1): 51-60, 2005.
- Balaž, J., Popović, T., Vasić, M. i Nikolić, Z.:** Razrada metoda za dokazivanje *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* na semenu pasulja. Pesticidi i fitomedicina, 23(2): 89-98, 2008.
- Bouzar, H., Jones, J.B., Stall, R.E., Hodge, N.C. and Minsavage, G.V.:** Physiological, chemical, serological and pathogenic analysis of a worldwide collection of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* strains. Phytopathology, 84: 663-671, 1994.
- Buonaurio, R., Stravato, V.M. and Scortichini, M.:** Characterization of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* from *Capsicum annuum* L in Italy. Plant Disease, 78: 296-299, 1994.
- CAB International:** CAB-Plant Protection Compendium. CD-ROM edition, Oxfordshire, UK, 2004.
- Dye, D.W., Starr, M.P. and Stolp, H.:** Taxonomic classification of *Xanthomonas vesicatoria* based upon host specificity, bacteriophage sensitivity, and cultural characteristics. Journal of Phytopathology, 51: 394-407, 1964.
- Gvozdrenović, Đ., Bugarski, D., Gvozdrenović-Varga, J., Vasić, M., Červenski, J., Takač, A. i Jovičević, D.:** Doprinosi unapređenju povrtarske proizvodnje za 70 godina rada Instituta za ratarstvo i povrtarstvo. Zbornik radova Instituta za ratarstvo i povrtarstvo, 45(1): 113-129, 2008.
- Hibberd, A.M., Basset, M.J. and Stall, R.E.:** Allelism tests of three dominant genes for hypersensitive resistance to bacterial spot of pepper. Phytopathology, 77: 1304-1307, 1987.

- Ignatov, A.N., Kornev, K.P., Mateeva, E.V., Pekhtereva, E.S., Polityko, V.A., Budenkov, N.I. and Schaad, N.W.:** Occurrence of bacterial spot and bacterial canker of tomato in the Russian Federation. Proceedings Second International Symposium on the Tomato Diseases, Kusadasy, Turkey – Acta Horticulturae, 808: 247-250, 2009.
- Jones, J.B., Bouzar, H., Somodi, G.C., Stall, R.E. and Pernezny, K.:** Evidence for the preemitive nature of tomato race 3 of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in Florida. Phytopathology, 88: 33-38, 1998a.
- Jones, J.B., Stall, R.E. and Bouzar, H.:** Diversity among xanthomonads pathogenic on pepper and tomato. Annual Review of Phytopathology, 36: 41-58, 1998b.
- Jones, J.B., Bouzar, H., Stall, R.E., Almira, E.C., Roberts, P. and Bowen, B.W.:** Sytematic analysis of Xanthomonads (*Xanthomonas* spp.) associated with pepper and tomato lesions. International Journal od Systematic Bacteriology, 50: 1211-1219, 2000.
- Jones, J.B., Lacy, G.H., Bouzar, H., Stall, R.E. and Schaad, N.W.:** Reclassification of the Xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. Systematic and Applied Microbiology, 27: 755-762, 2004.
- Kelman, A.:** The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. Phytopathology, 44: 693-695, 1954.
- Klement, Z.:** Rapid detection of the pathogenicity of phytopathogenic pseudomonads. Nature, 199: 299-300, 1963.
- Klement, Z., Rudolph, K. and Sands, D.C.:** Methods in Phytobacteriology. Akademiai Kiado, Budapest, 1990.
- Kornev, K.P., Matveeva, E.V., Pekhtereva, E.S., Polityko, V.A., Ignatov, A.N., Punina, N.V. and Schaad, N.W.:** *Xanthomonas* species causing bacterial spot of tomato in the Russian Federeation. Proceedings Second International Symposium on Tomato Diseases – Acta Horticulturae, 808: 243-246, 2009.
- Kousik, C.S. and Ritchie, D.F.:** Race shift in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* within a season in field grown pepper. Phytopatology, 86: 952-958, 1996.
- Lelliott, R.A. and Stead, D.E.:** Methods for the Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants (volume 2). British Society for Plant Pathology Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK, 1987.
- Mijatović, M., Obradović, A. i Ivanović, M.:** Zaštita povrća. AgroMivas, Smederevska Palanka, 2007.
- Minsavage, G.V., Dahlbeck, D., Whalen, M.C., Kearny, B., Bonas, U., Staskawicz, B.J. and Stall, R.E.:** Gene for gene relationships specifying disease resistance in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* – pepper interactions. Molecular Plant Microbe Interaction, 3: 41-47, 1990.
- Obradović, A., Arsenijević, M., Mavridis, A. i Rudolph, K.:** Patogene i biohemijsko fiziološke karakteristike sojeva *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* patogena paprike u Srbiji. Zaštita bilja, 51(1-2), 231-232: 157-175, 2000a.
- Obradović, A., Mavridis, A., Rudolph, K. and Arsenijević, M.:** Bacterial spot of capsicum and tomato in Yugoslavia. OEPP/EPPO Bulletin, 30: 333-336, 2000b.
- Obradović, A., Mavridis, A., Rudolph, K., Arsenijević, M. and Mijatović, M.:** Bacterial diseases of pepper in Yugoslavia. In: Plant Pathogenic Bacteria (De Boer SH, ed.), Kluwer Academic Publishers, 2001, pp. 255-258.
- 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, 2004.
- Obradović, A., Jones, J.B., Balogh, B. and Momol, M.T.:** Integrated management of tomato bacterial spot. In: Integrated Management of Diseases Caused by Fungi, Phytoplasma and Bacteria (Ciancio A., Mukerji K.G., eds.), Springer Science+Business Media B. V., 2008, pp. 211-223.
- Pernezny, K. and Collins, J.:** Epiphytic populations of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* on pepper: Relationships to host-plant resistance and exposure to copper sprays. Plant Disease, 81: 791-794, 1997.
- Sabin, F. and Miller, S.A.:** Resistance in *Capsicum pubescens* to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* Pepper Race 6. Plant Disease, 82(7): 794-799, 1998.
- Sabin, F.:** Pepper races 7, 8 and 10 of *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* isolated from diseased pepper plants in Turkey. Plant Pathology, 50: 809, 2001.
- Schaad, N., Jones, J.B. and Chun, W.:** Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. APS Press, USA, 2001.
- Stall, R.E., Beauliev, C., Egel, D., Hodge, N.C., Leite, R.P., Miusavage, G.V., Bouzar, H., Jones, J.B., Alvarez, A.M. and Benedict, A.A.:** Two Genetically Diverse Groups of Strains Are included in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. International Journal of Systemic Bacteriology, 44: 47-53, 1994.
- Swanson, J., Kearney, B., Dahlbeck, D. and Staskawicz, B.:** Cloned avirulence gene of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* complements spontaneous race-change mutants. Molecular Plant Microbe Interaction, 1: 5-9, 1988.
- Vauterin, L., Hoste, B., Kersters, K. and Swings, J.:** Reclassification of *Xanthomonas*. International Journal of Systematic Bacteriology, 45: 472-489, 1995.

Characterization of *Xanthomonas euvesicatoria* Strains Pathogens of Pepper in Serbia

SUMMARY

During spring and summer of 2008, 101 bacterial strains was isolated from the diseased pepper leaves collected from different pepper growing areas in the Republic of Serbia. The aim of this research was to characterize the isolated strains and determine their taxonomic position according to the most recent nomenclature.

Pathogenic, biochemical and physiological characteristics of isolated bacteria were tested using standard bacteriological tests. The pathogen races were determined according to the reaction of differential varieties of Early Calwonder (ECW), their isogenic lines (ECW-10R, ECW-20R, ECW-30R) and *Capsicum pubescens*. The sensitivity of strains to bactericides was studied *in vitro* by culturing bacteria on sucrose pepton agar (SPA) plates, amended with filter-sterilized aqueous solution of streptomycin and kasugamycin (50, 100, 200 ppm) or copper-sulphate (100, 200 ppm).

Based on pathogenic, biochemical and physiological characteristics, the investigated strains belonged to *Xanthomonas euvesicatoria*. The reaction of pepper differential varieties indicated that these strains belonged to pepper races P1, P3, P7, P8. Streptomycin resistant strains were not detected, but 6 strains were resistant to kasugamycin (50 ppm) and 13 strains to copper-sulphate (200 ppm), indicating bacterial resistance development.

Keywords: Pepper; Bacterial leaf spot; Xanthomonas complex; *Xanthomonas euvesicatoria*; *Xanthomonas vesicatoria*; *Xanthomonas perforans*; *Xanthomonas gardneri*; Physiological races; Resistance