

Iznalaženje metoda za izolaciju *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* sa semena paprike

Jelica Balaž i Tamara Delibašić

*Poljoprivredni fakultet, Departman za zaštitu bilja „Dr Pavle Vukasović“,
Novi Sad*

REZIME

Ispitivana je mogućnost utvrđivanja prisustva bakterije *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* na semenu paprike, tokom 2002-2004. godine. Korišćene su direktne i indirektne metode izolacije. Jasni pozitivni i ponovljivi rezultati su dobijeni samo u uslovi-
ma veštačke inokulacije semena paprike i zasejavanja ekstrakta semena na određene
selektivne podloge. Kao najuspešnije za izolaciju *X.c.* pv. *vesicatoria* sa semena paprike,
pokazale su se selektivne podloge razvijene prema McGuire i Jones (1989) – Tween B i
McGuire i Jones (1984).

Na ispitivanim uzorcima komercijalnog semena paprike, tokom 2002. i 2003. go-
dine, nije utvrđeno prisustvo bakterije *X. c.* pv. *vesicatoria*.

Ključne reči: *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*; paprika; seme; veštačka in-
okulacija; selektivne podloge

UVOD

Xanthomonas campestris pv. *vesicatoria* je dobro poznat patogen paradajza i paprike; Bakterija je široko rasprostranjena u svetu i kod nas. U našoj zemlji je jedna od prvih, detaljno proučavanih fitopatogenih bakterija (Šutić, 1957).

Najnovija proučavanja bakterije *X. c.* pv. *vesicatoria* kod nas su vršili Obradović i saradnici (2000). Autori su dali bakteriološke karakteristike dobi-
jenih sojeva na osnovu potvrđene patogenosti, de-
taljnih biohemijsko-fizioloških ispitivanja i ELISA testa. Rezultati istraživanja su pokazali da ispitivani
sojevi pripadaju genetičkoj grupi "A" bakterije *X.c.*
pv. *vesicatoria* (Doidge 1920) Dye 1978.

Jača pojava *X.c.* pv. *vesicatoria* na paprici u našoj

zemlji, zapaža se od polovine 80-ih. Balaž (1988) ukazuje na jaku pojavu ove bakterije na paprici to-
kom 1987. godine, u regionu Srema, ali i na nekim lokalitetima južne Bačke (okolina Novog Sada, Sr-
bobrana i Žablja). Posebnu pažnju je privukla jaka pojava ove bakterioze u Sremu (okolina Rume),
zapažena tokom jula na usevu paprike, PP "Srem".

Najjači napad bio je kod sorti "kurtovska kapija" i "šorokšari". Zaraženo donje lišće je žutelo, sušilo se i masovno opadalo. Cvetovi su se, takođe, sušili. Obolele biljke su zaostajale u porastu ili su u pot-
punosti izumirale. Ovako jak intenzitet bolesti na usevu paprike PP "Srem", doveo je do značajnog smanjenja prinosa. Višegodišnji prosečni prinos pa-

prike (1982-1987) na ovom imanju bio je oko 20.7 t/ha, a u 1987. godini, na pojedinim, jako zaraženim sortama, svega 8 t/ha. U godinama kada ova bolest nije bila ni konstatovana (1983), prinos je bio 29.5 t/ha.

U cilju suzbijanja ove bakterioze, mogu se koristiti određene mere zaštite. Obradović i saradnici (1999) su proučavali izolate bakterije *X. c. pv. vesicatoria* dobijene iz raznih rejona gajenja paprike kod nas. Na osnovu reakcije diferencijalnih sorti, utvrđeno je da su kod nas rasprostranjene rase P1 i P3, što pruža mogućnost za oplemenjivački rad na paprici u cilju stvaranja otpornih sorti prema ovom patogenu. Dalja ispitivanja Obradovića i saradnika (2000), ukazuju na sve češću pojavu *X. c. pv. vesicatoria* i na paradajzu u Srbiji. Patogene karakteristike ovih sojeva ukazuju da se radi o sojevima koji parazitiraju paradajz, ali ne i papriku. Prema reakcijama diferencijalnih sorti, utvrđeno je da sojevi ove bakterije poreklom sa paradajza, pripadaju rasi 2 (T2), prema kojoj do sada nisu pronađeni geni otpornosti među predstavnicima roda *Lycopersicon*.

Suzbijanje *X. c. pv. vesicatoria* na paprici, može se postići i hemijskom zaštitom. Balaž i saradnici (2002) navode dobre rezultate u suzbijanju ove bakterioze primenom bakarnih preparata, kao i njihovom kombinacijom sa nekim od organskih fungicida (na bazi mankozeba i metirama).

Jedan od najpouzdanijih načina suzbijanja ove bakterije je proizvodnja zdravog semena. U svetu se ovom problemu posvećuje velika pažnja, osnivanjem brojnih specijalizovanih laboratorija za ispitivanje zdravstvenog stanja i kvaliteta semena (Schaad, 1982).

Kod nas se kontrola zdravstvenog stanja semena uglavnom još uvek svodi na rutinsko utvrđivanje prisustva fitopatogenih gljiva u nespecijalizovanim laboratorijama. Za utvrđivanje fitopatogenih bakterija na semenu metode su uglavnom složene, zbog čega se kod nas tek sada uvode u pojedine laboratorije. Rezultat toga je promet semena koje nije podvrgnuto adekvatnom bakteriološkom pregledu, i koje predstavlja značajan izvor inokuluma, koji se širi (Balaž i sar., 2003).

Karakteristike koje treba da ispuni metoda za pouzdano utvrđivanje fitopatogenih bakterija na semenu, detaljno navodi Roth (1989), a suština je sledeća: osetljivost i univerzalnost metode; metoda treba da je brza, pouzdana i ponovljiva; prilagodljiva za rutinska testiranja i da ne iziskuje velika materijalna ulaganja.

Prema Schaad (1989), metode za otkrivanje bakterija na semenu mogu biti direktne i indirektnе. Direktne metode zahtevaju najmanje tehničkog znanja. Obično su skupe, zahtevaju dosta vremena i dobijeni rezultati su često neubedljivi. Najčešće korišćena direktna metoda je uzgajanje biljčica ("growing-on" test) u stakleniku ili polju. Ovaj metod se obično koristi za utvrđivanje prisustva patogena koji se javljaju u relativno visokom populacionom nivou (1-10%) na semenu.

Indirektnе metode se zasnivaju na korišćenju ekstrakta semena za: inokulaciju biljke domaćina; izolaciju patogena na selektivne ili poluselektivne podloge (uz dalju identifikaciju klasičnim bakteriološkim postupkom, ili pomoću savremenih metoda); identifikaciju patogena direktno iz ekstrakta semena, pri čemu ispitivani mikroorganizam ne mora biti vitalan, jer se zasnivaju na hemijskim reakcijama (serološke - IF i ELISA test, metode zasnovane na specifičnosti DNK - PCR i sl.).

U cilju pouzdane identifikacije patogena iz semena, najbolje rešenje je kombinovanje dostupnih testova. Najbolja kombinacija podrazumeva izolaciju patogena na odgovarajuće selektivne podloge i dokazivanje patogenosti, a potom potvrda rezultata korišćenjem seroloških ili molekularnih metoda.

MATERIJAL I METODE

Ispitivanja su vršena u laboratorijskim uslovima od 2002. do 2004. godine. Kao biljni materijal korišćeno je komercijalno seme paprike prikupljeno tokom 2002. i 2003. godine. Korišćeni su uzorci semena začinske paprike „Aleva”, Novi Kneževac; „Vitamin”, Horgoš; „Agrounija”, Indija i neke sorte paprike tipa „babura”.

Za izolaciju korišćen je indirektni metod zasejavanjem suspenzije ekstrakta semena na selektivne i poluselektivne podloge. Radi procene ispravnosti i osetljivosti korišćenih metoda, u sva ispitivanja uključena je varijanta sa veštački zaraženim semenom, kao i čista suspenzija bakterije *X.c. pv. vesicatoria* (izolat, P-5). Izolat P-5 je poreklom sa lista paprike i potiče iz kolekcije fitopatogenih bakterija Laboratorije za bakterioze biljaka, Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu. Ovaj izolat je održavan na kosoj podlozi od kvasca, dekstroze i CaCO_3 [YDC - (Yeast Extract-Dextrose- CaCO_3)], pri temperaturi od oko 4°C. Za rad su korišćene kulture starosti 24-48 sati.

Veštačka inokulacija semena u svim ogledima vršena je potapanjem semena u suspenziju bakterije u trajanju od četiri sata, nakon čega je seme sušeno na sterilnoj filter hartiji, 20-24 sata u aseptičnoj komori.

Za izolaciju *X. c. pv. vesicatoria* sa semena paprike primenjeno je nekoliko metoda:

- Metoda izolacije prema Fitosanitarnoj proceduri (Phytosanitary Procedures, PM 3/45,1; EPPP standard, *Xanthomonas vesicatoria*; Test method for tomato seeds, OEPP/EPPO, 1998);

- Metoda izolacije prema McGuire i Jones (1989; 1984).

Ocenjivanje rezultata vršeno je tri do četiri dana posle zasejavanja, vizuelnim pregledom i brojanjem razvijenih kolonija bakterija u Petri kutijama, pomoću brojača bakterija (EŠKO 7).

U cilju dobijanja čistih izolata bakterije *X. c. pv. vesicatoria*, iz ispitivanih uzoraka ekstrakta semena, pojedinačne bakterijske kolonije razvijene na selektivnim i poluselektivnim podlogama, presejavane su na kosu YDC podlogu.

Na osnovu izgleda razvijenih kolonija na YDC podlozi, vršena je procena uspešnosti izolacija poređenjem dobijenih izolata sa izvornim izolatom (P-5) ove bakterije. Patogenost pojedinačnih izolata iz reprezentativnih grupa, proveravana je na mladim biljčicama paprike (3-4 nedelje starosti) gajenim u stakleniku. Inokulacija je vršena pomoću medicinske igle, infiltriranjem suspenzije bakterije u lisno tkivo, konc. oko 10^6 cfu/ml.

Izolacija *X. c. pv. vesicatoria* sa semena paprike prema Fitosanitarnoj proceduri (Phytosanitary Procedures, PM 3/45, 1, 1998, OEPP/EPPO).

Ekstrakcija semena

Za izolaciju su korišćena tri uzorka semena paprike: 101-P₁, 101-P₂ i 101-P₃ (Aleva-začinska) i dve metode ekstrakcije. Prva metoda je obuhvatila površinsko spiranje bakterija pomoću fiziološkog rastvora (za infekcije ostvarene na površini semena); druga metoda ekstrakcije podrazumeva mlevenje semena (za unutrašnje infekcije) uz dodavanje fiziološkog rastvora.

• Površinsko pranje

Uzorak od oko 1.000 semenki (6.65 g semena paprike) stavljen je u kolbu zapremine 250 ml sa 100 ml sterilnog fiziološkog rastvora (0.85% NaCl). Zatim je postavljen na treskalicu u trajanju od jedan sat, na 25°C. Nakon treskanja, fiziološki rast-

vor u kome je vršeno površinsko pranje semena je centrifugiran u 2 x 50ml sterilnim centrifugalnim kiretama na 12.000 g, 15 minuta na 4°C, posle čega je supernatant odbačen. Talog je resuspendovan sa po 1 ml sterilnog fiziološkog rastvora, nakon čega se obe suspenzije prebace u sterilne staklene bočice.

• Mlevenje

Uzorak od oko 1000 semenki pripremljen je suvim mlevenjem u sterilnom mlinu za kafu i stavljen u kolbu gde je dodato 10 ml sterilnog fiziološkog rastvora (0.85% NaCl). Nakon toga je homogenizat postavljen na treskalicu u trajanju od jedan sat. Posle treskanja, uzeto je po 0.5 ml dobijenog homogenizata, stavljen u epruvete i razređeno sa 4-5 ml sterilnog fiziološkog rastvora.

Izolacija

Od uzoraka ekstrakta semena uzimano je po 0.5 ml i pripremana je serija razređenja (10^{-1} – 10^{-5}).

Kao pozitivna kontrola korišćeno je seme paprike veštački inokulisano bakterijom *X. c. pv. vesicatoria* i čista suspenzija izolata ove bakterije. Zasejavano je po 0.1 ml iz svake varijante ogleđa (površinsko pranje i mlevenje) i od svakog razređenja na sledeće podloge:

- Hranljiva podloga sa glicerolom (NGA - Difco Nutrient Glycerol Agar: hranljivi agar 23 g; glicerol 10 g; cycloheximide 250 mg; destilovana voda 1000 ml);

- Hranljivi agar + 5% saharoze (Nutrient agar + 5% sucrose);

- Hranljivi agar + 1% glukoze (Nutrient agar + 1% glucose).

Ogledi su izvođeni u tri ponavljanja, inkubacija je vršena na temperaturi 27-28°C, 3-4 dana.

Izolacija *X. c. pv. vesicatoria* sa semena paprike na selektivne podloge prema McGuire i Jones-u (1989; 1984)

Za izolaciju je korišćen samo uzorak semena paprike 101-P₂ (Aleva - začinska), ali su ogledi izvođeni u više varijanti:

- dezinfikovano, veštački zaraženo seme paprike (*X. c. pv. vesicatoria*, izolat P-5);

- čista suspenzija bakterije (*X. c. pv. vesicatoria*, izolat P-5);

- dezinfikovano komercijalno seme paprike;

- nedezinfikovano komercijalno seme paprike;

Dezinfekcija semena je vršena potapanjem u Na-hipohlorit (2%) u trajanju od 10 minuta, nakon čega je vršeno ispiranje semena vodom i sušenje.

Ekstrakcija semena

Za ova ispitivanja je, takođe, korišćen uzorak semena paprike od oko 1000 semenki (6.65 g).

Svi uzorci su stavljeni u kolbe sa po 100 ml sterilnog peptonskog pufera (Sterile peptone buffer: 5.30 g KH_2PO_4 ; 8.61 g Na_2HPO_4 ; 1 g bakterijskog peptona; 1000 ml H_2O). Ovako pripremljeni uzorci su postavljeni tri sata na 4°C , a zatim su stavljeni na treskalicu u trajanju od jedan sat, na sobnoj temperaturi. Nakon treskanja, uzorci su profiltrirani kroz 0.45 mikromembranu posle čega je zabeležena zapremina filtrata. Filter je ispiran 60 sekundi sa 5 ml sterilnog peptonskog pufera koji je sadržavao 50 μl Tween 80, a zatim je pripremana serija razređenja (10^{-1} – 10^{-5}).

Ogledi su izvođeni u paralelnoj seriji (sve varijante), sa i bez filtracije ekstrakta semena.

Izolacija

Zasejavanje je vršeno iz svake varijante ogleđa i to razmazom sa po 0.2 ml bakterijske suspenzije iz filtriranog i sa po 0.1 ml iz nefiltriranog ekstrakta semena iz 10^{-3} , 10^{-4} i 10^{-5} razređenja, na sledeće selektivne podloge:

- Tween B (McGuire i Jones, 1989): pepton 10 g/L; KBr 10 g/L; CaCl_2 0.25 g/L, H_3BO_3 0.30 g/L; agar 15 g/L; posle autoklaviranja u podlogu se dodaje Tween 80 10 ml/L; cycloheximide 100 mg/L; cephalexin 65 mg/L; 5-fluorouracil 12 mg/L i tobramycin 0.4 mg/L;

- Selektivna podloga za izolaciju *X. c. pv. vesicatoria* sa semena i lista (McGuire i Jones, 1984): Bacto peptone 10 g/L; KBr 10 g/L; CaCl_2 0.25 g/L; agar 15 g/L; posle autoklaviranja u podlogu se dodaju Tween 80 10 ml/L; cycloheximide 75 mg/L; cephalexin 25 mg/L; 5-fluorouracil 6 mg/L; tobramycin 0.4 mg/L).

Ove podloge su razrađene od istih autora i vrlo su slične. Osnovna razlika je u tome što prvo navedena podloga sadrži povećane količine antibiotika i bornu kiselinu. Podloga Tween-B se navodi za izolaciju *X. c. pv. vesicatoria* iz semena paradajza (McGuire i Jones, 1989), a selektivna podloga prema McGuire i Jones-u (1984) se predlaže za izolaciju *X. c. pv. vesicatoria* iz semena i listova.

Ogledi su izvođeni u tri ponavljanja. Nakon zasejavanja, razvoj bakterijskih kolonija je trajao 3–4 dana na temperaturi od 27 do 28°C .

REZULTATI

Prisustvo *X. c. pv. vesicatoria* na semenu pa-

prike dokazivano prema Fitosanitarnoj proceduri (Phytoplant Procedures PM 3/45, 1, 1998, OEPP/EPPO).

Rezultati izolacije bakterije *X. c. pv. vesicatoria* sa semena paprike prema Fitosanitarnoj proceduri, su pokazali da korišćene podloge (NGA; hranljivi agar + 5% saharoze; hranljivi agar + 1% glukoze) nisu pokazale dovoljnu selektivnost.

Tipične kolonije za *X. c. pv. vesicatoria* su se jedino razvile u varijanti gde je zasejavan čist izolat bakterije *X. c. pv. vesicatoria* (P-5), obrazujući na NGA podlozi žute; sitne i sjajne kolonije, a na podlogama hranljivi agar sa saharozom ili glukozom, one su imale sluzast izgled i brži porast. Presejavanjem ovih kolonija na kosu YDC podlogu, kolonije su imale karakterističan razvoj: žute, sluzaste i bujne (Slika 1).

Na pomenutim podlogama, korišćenjem oba vida ekstrakcije (površinsko pranje i mlevenje), inkulisanog i komercijalnog semena, razvijale su se brojne kolonije bakterija, od žutih do belih, sitnijih i krupnijih, među kojima je bilo teško raspoznati *X. c. pv. vesicatoria*. Sitne bele kolonije su odmah isključene iz daljih ispitivanja. Pretpostavljeno je da sitne, žute kolonije, pripadaju bakteriji *X. c. pv. vesicatoria*. Međutim, zasejavanjem određenog broja ovih kolonija na kosu YDC podlogu, razvijale su se kolonije krem-žučkaste do beličaste boje koje su razlagale CaCO_3 , prosvetljavajući pritom podlogu, što nije karakteristično za *X. c. pv. vesicatoria* (Slika 2).

Prisustvo *X. c. pv. vesicatoria* na semenu paprike dokazivano na selektivnim podlogama prema McGuire i Jones-u (1989; 1984).

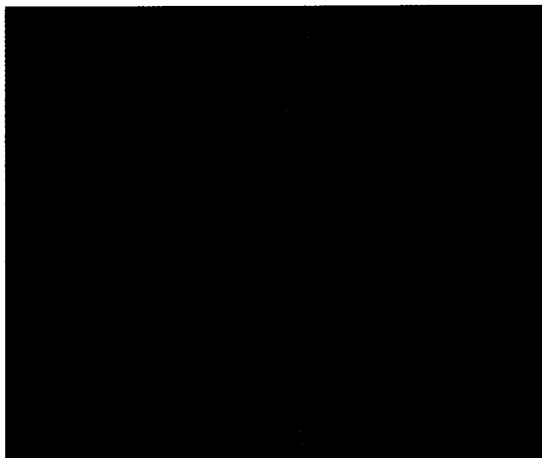
Rezultati izolacije bakterije *X. c. pv. vesicatoria* sa semena paprike na selektivne podloge prema McGuire i Jones (1989; 1984), bili su znatno jasniji i pouzdaniji, jer su odmah ukazivali na prisustvo kolonija *X. c. pv. vesicatoria*, mada su ovi rezultati dobijeni samo u varijanti sa veštački zaraženim semenom (pozitivna kontrola), i u slučaju korišćenja čiste suspenzije ove bakterije (P-5). Na ovim podlogama razvijene bakterijske kolonije su bile karakterističnog izgleda i jasno uočljive već 3–4 dana posle zasejavanja.

U varijanti gde je korišćeno veštački zaraženo seme (prethodno dezinfikovano), na ispitivanim selektivnim podlogama, razvile su se žute kolonije, pravilno okrugle, prečnika oko 2 mm, blago ispupčene i sjajne, tipične za bakteriju *X. c. pv. vesicatoria*. Posebna prednost ove metode je u tome što

se oko ovih žutih kolonija, kada je u pitanju *X. c. pv. vesicatoria*, pojavljuje beličasta zona što ukazuje na hidrolizu Tweena 80 i na stvaranje kalcijumoleata,

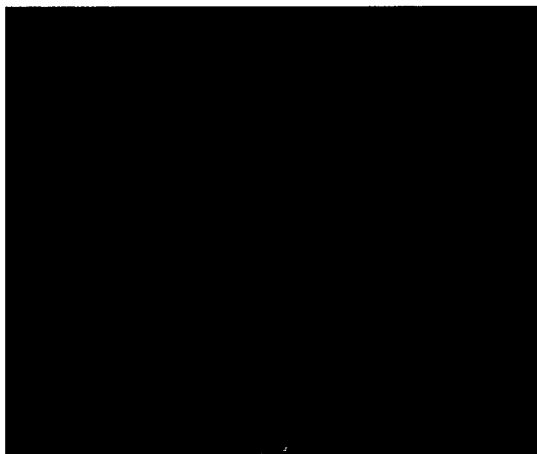
koji se taloži u podlozi (Slika 3).

Međutim, stvaranje beličastih oreola, svojstvo je i nekih saprofitnih žućkastih ili beličastih bakteri-



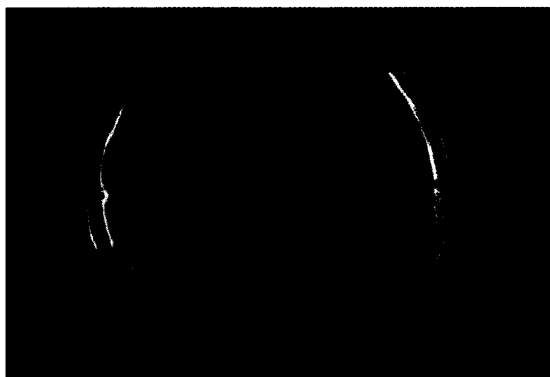
Sl.1. Tipičan, sluzast razvoj *X. c. pv. vesicatoria* na YDC podlozi

Fig. 1. Typical, mucoid development of *X. c. pv. vesicatoria* on YDC medium



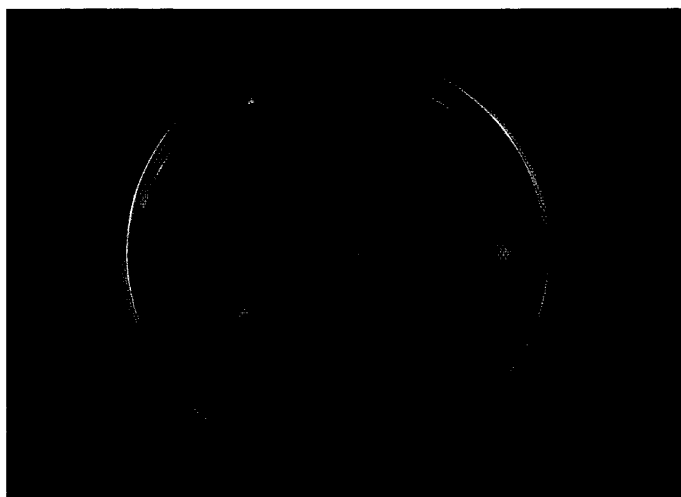
Sl.2. Razvoj saprofitne bakterijske kolonije na YDC podlozi

Fig. 2. Development of saprofitic bacterium colonia on YDC medium



Sl.3. *X. c. pv. vesicatoria* (veštačka inokulacija semena). Žute, sjajne kolonije sa beličastom zonom (levo); detalj (desno), na selektivnoj podlozi (McGuire i Jones, 1984)

Fig. 3. *X. c. pv. vesicatoria* (artificial inoculation). Yellow, shine colonies with whitish zone (left); detail (right), on selective medium (McGuire and Jones, 1984)



Sl. 4. Beličasti oreoli oko žutih i belih saprofitnih kolonija (komercijalno seme)

Fig. 4. Whitish zones around of yellow and white saprofitic colonies (commercial seed)

jskih kolonija (Slika 4). Opređeljujući znak da se radi o bakteriji *X. c. pv. vesicatoria* je i karakterističan izgled kolonija roda *Xanthomonas*.

Presejavanjem sitnih, žutih, sjajnih kolonija na YDC podlogu, razvile su se kolonije po izgledu tipične za bakteriju *X. c. pv. vesicatoria*.

Patogenost ovih izolata potvrđena je inokulacijom listova paprike. Pozitivna reakcija se manifestovala nakon nekoliko dana, pojavom tamnozelenih, vlažnih pega, što je praćeno žućenjem, nekrozom, a kasnije i opadanjem lišća.

U Tabeli 1. prikazan je broj kolonija bakterija

dobijen iz ekstrakta semena paprike veštački inokulisanog bakterijom *X.c. pv. vesicatoria* (razređenje 10^{-3}), na selektivnim podlogama (McGuire, 1989; 1984).

Rezultati su imali sličan trend u obe varijante, korišćenjem filtrirane i nefiltrirane suspenzije bakterije, dobijene iz ekstrakta veštački inokulisanog semena, samo što je nešto veći broj kolonija razvijen na selektivnim podlogama u varijantama gde je korišćen i postupak filtracije (Tabela1).

Slični rezultati, odnosno pojava žućkastih, sitnih, sjajnih, okruglih kolonija sa mutnim beličastim oreo-

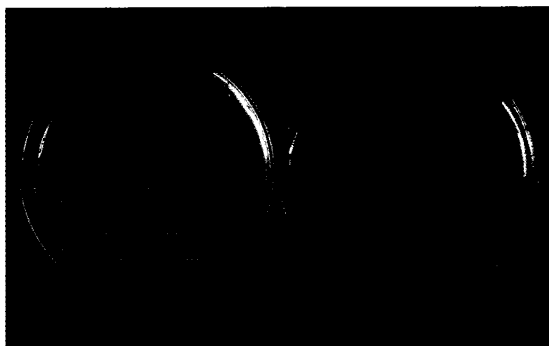
Tabela 1. Broj kolonija bakterija *X.c.pv. vesicatoria* na selektivnim podlogama (McGuire i Jones, 1989; 1984) dobijenih iz ekstrakta veštački inokulisanog semena paprike (*X.c. pv. vesicatoria*, P-5)

Table 1. The number of bacterial colonies *X.c.pv. vesicatoria* on Selective media (McGuire and Jones, 1989;1984) obtained from artificialy inoculated pepper seed extract (*X. c. pv. vesicatoria*, P-5)

Razredjenje Dilution	Podloga Medium	Filtrirano Filtrate	Nefiltrirano Not filtrate
		Prosečan broj kolonija u Petri kutiji Mean number of colonies in Petri-dish	Prosečan broj kolonija u Petri kutiji Mean number of colonies in Petri-dish
10^{-3}	Selekt. podloga za izol. <i>X. c. pv. vesicatoria</i> (McGuire i Jones, 1984)	90	35
	Tween-B (McGuire i Jones, 1989)	125	40

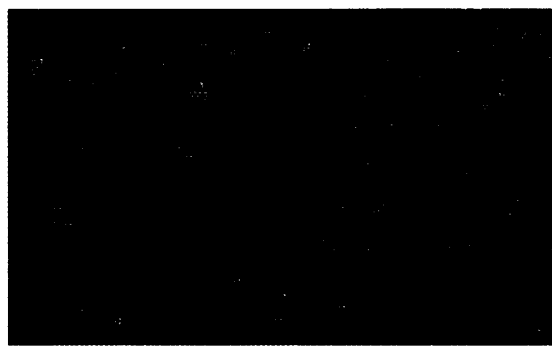
lom dobijeni su i u varijanti gde je korišćen čist izolat bakterije *X. c. pv. vesicatoria* (P-5), samo su ovde kolonije bile znatno brojnije i njihov broj nije bilo moguće odrediti ni u četvrtom, ni u petom razređenju (Slika 5).

Iz uzoraka komercijalnog semena paprike, u varijanti gde je seme površinski dezinfikovano, na



1989; 1984) razvio se veliki broj kolonija bakterija različitog izgleda (Slika 6), ali prisustvo bakterije *X.c. pv. vesicatoria* nije utvrđeno.

Dalja ispitivanja u vezi sa razradom i utvrđivanjem pouzdanosti i ponovljivosti rezultata dobijenim na ovim selektivnim podlogama (u uslovima veštačke inokulacije), ispitivala je Delibašić



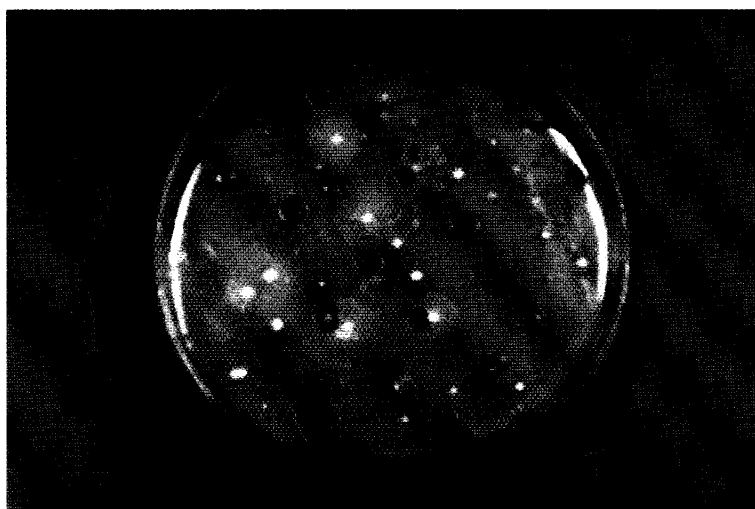
Sl. 5. *X. c. pv. vesicatoria* (izolat P-5). Brojne, sitne, žute kolonije sa beličastom zonom iz razređenja 10^{-4} i 10^{-5} (levo); detalj (desno)

Fig. 5. *X. c. pv. vesicatoria* (strain P-5). The numerous, small, yellow colonies with whitish zones, dilution 10^{-4} and 10^{-5} (left); detail (right)

navedenim selektivnim podlogama, tek posle nekoliko dana, pojavile su se samo beličaste, saprofitne kolonije bakterija, ili bela paučinasta micelija gljiva.

Iz uzoraka komercijalnog semena paprike, na pomenutim selektivnim podlogama (McGuire i Jones,

(2004; neobjavljeni podaci). Koristeći različit procenat veštački zaraženog semena (1, 10 i 100%) u šest razređenja (Tabela 2). Ovi rezultati ukazuju na to da se u uslovima veštačke inokulacije semena paprike, ekstrakcijom i zasejavanjem ova bakterija može uspešno izolovati na selektivnu



Sl. 6. Brojne, saprofitne kolonije razvijene iz ekstrakta komercijalnog semena paprike na Tween B podlozi (McGuire i Jones, 1989)

Fig. 6. The numerous, saprofitic colonies developed from commercial pepper seed extract on Tween B medium (McGuire and Jones, 1989)

Tabela 2. Broj razvijenih kolonija na podlozi Tween B (McGuire i Jones, 1989), korišćenjem 1, 10 i 100% veštački inokulisanog semena paprike**Table 2.** The number of developed colonies on Tween B medium (McGuire i Jones, 1989) using 1, 10 and 100 % of artificially inoculated pepper seed

Razređenje Dilution	Podloga Tween-B (McGuire i Jones, 1989) Medium Tween-B (McGuire and Jones, 1989)		
	Veštački zaraženo seme - Artificially inoculated seed		
	1%	10%	100%
10 ⁻¹	300	Brojne, sitne, kolonije	Brojne, sitne kolonije
10 ⁻²	72	Brojne, sitne kolonije,	Brojne, sitne, kolonije
10 ⁻³	13	250	Brojne, sitne, kolonije
10 ⁻⁴	2	30	220
10 ⁻⁵	0	2	104
10 ⁻⁶	0	0	61

podlogu Tween B. U zavisnosti od procenta zaraze semena, broj kolonija razvijenih na podlozi je imao odgovarajući korelacioni trend. Slični podaci su dobijeni i na drugoj selektivnoj podlozi (McGuire i Jones, 1984), s tim što je u ovom slučaju broj kolonija po razređenju bio nešto viši.

Istraživanja na utvrđivanju prisustva bakterije *X. c. pv. vesicatoria* na komercijalnom semenu paprike potrebno je nastaviti, da bi se rezultati dobijeni veštačkom inokulacijom semena potvrdili.

DISKUSIJA

Prema rezultatima naših istraživanja, na komercijalnom semenu analiziranih uzoraka začinske paprike (Aleva) iz 2002. i 2003. godine, nije utvrđeno prisustvo bakterije *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, koristećenjem ekstrakta semena za izolaciju na razne hranljive, selektivne i poluselektivne podloge (NGA; hranljivi agar + 5% saharoze, ili 1% glukoze; Tween B, i sl.). Razlog može biti da u ovim godinama, s obzirom na sušu, infekcija semena nije ni ostvarena.

Tokom ovih ispitivanja *X. c. pv. vesicatoria* je izolovana na određene selektivne podloge (McGuire i Jones, 1984; 1989), samo iz ekstrakta semena paprike, veštački inokulisanog.

Podloge za izolaciju bakterije *X. c. pv. vesicatoria* iz semena paprike prema Fitosanitarnoj proceduri (NGA; hranljivi agar + 5% saharoze; hranljivi agar + 1% glukoze), nisu ispoljile dovoljan stepen selektivnosti prema ovoj bakteriji i mogućnost da se odmah po izolaciji jasno razlikuju kolonije *X. c. pv. vesicatoria*

od raznih saprofitnih bakterija, koje takođe obrazuju žute kolonije.

U ovom slučaju neophodna su dalja serološka ispitivanja (aglutinacija, IF ili ELISA test), kao i provera patogenosti izolata, uz konvencionalne biohemijsko-fiziološke testove. Prema našem mišljenju, ove podloge ne ispunjavaju dovoljnu selektivnost za *X. c. pv. vesicatoria*, jer ne sadrže antibiotike, osim cikloheksimida (NGA), koji deluje samo fungicidno, tako da su se na ovim podlogama razvijale i brojne saprofitne bakterije. Prema tome, ovaj metod ne isključuje izolaciju *X. c. pv. vesicatoria*, ali zahteva duži period identifikacije (Dye i sar., 1964; Lelliott i Stead, 1987; Phytosanitary Procedures PM 3/45, 1, 1998, OEPP/EPPO; McGuire i Jones, 1989; Schaad i sar., 2001) većeg broja izolata.

Selektivne podloge za izolaciju bakterije *X. c. pv. vesicatoria* iz semena paprike, prema McGuire i Jones (1989; 1984) pokazale su se efikasnijim i pouzdanijim, jer su ispoljile višu selektivnost, što je dokazano u varijanti gde je vršena veštačka inokulacija semena. Na ovim selektivnim podlogama, kolonije su bile gotovo identične; žute, sitne, prečnika oko 2 mm, blago ispupčene i sjajne. Karakterističan znak za prepoznavanje ovih kolonija je i beličasta zona (kalcijum-oleat) koja ukazuje na hidrolizu Tween-a 80, što je karakteristika roda *Xanthomonas*.

Prema dobijenim rezultatima, podloge koje sadrže određene antibiotike i Tween (sa ili bez borne kiseline), pogodne su i ispoljavaju zadovoljavajuću selektivnost pri izolaciji bakterije *X. c. pv. vesicatoria*, što je utvrđeno u našim ogledima sa veštačkom inokulacijom semena.

McGuire i Jones (1989) navode da se postupkom filtriranja ekstrakta semena povećava koncentracija bakterija, što je u našim rezultatima i potvrđeno. Rezultati naših ispitivanja su pokazali da zasejavanje kolonija bakterija (dobijenih iz ekstrakta semena paprike veštački inokulisanog bakterijom *X. c. pv. vesicatoria*) sa selektivnih podloga (McGuire i Jones, 1989, 1984), na kosu YDC podlogu, omogućava pouzdano razlikovanje *X. c. pv. vesicatoria* od ostalih, saprofitnih bakterija.

Inokulacija paprike, infiltriranjem suspenzije bakterije (oko 10^6 cfu/ml) u lisno tkivo, pokazala se kao jednostavan i pouzdan način za dokazivanje patogenosti bakterije *X. c. pv. vesicatoria*.

Ispitivanja na utvrđivanju prisustva bakterije *X. c. pv. vesicatoria* na komercijalnom semenu paprike, korišćenjem navedenih selektivnih podloga (McGuire i Jones, 1989; 1984) potrebno je nastaviti, da bi se rezultati dobijeni veštačkom inokulacijom semena potvrdili.

Sijam i saradnici (1991) navode selektivnu podlogu CKTM (soja pepton, bacto tripton, dekstroza, uz određene amino-kiseline, soli i antibiotike), kao vrlo uspešnu za izolaciju *X. c. pv. vesicatoria* iz semena paradajza i paprike. Autori ističu bolju selektivnost ove podloge u odnosu na Tween B, u smislu bolje redukcije kontaminirajuće mikroflora. Sa semena paradajza, na CKTM podlozi detektovali su 17.7-100% izolata *X. c. pv. vesicatoria* od ukupnog broja razvijenih bakterija, u odnosu na 6.3-44.4% korišćenjem podloge Tween B.

Van Ettekoven (2000) za izolaciju *X. c. pv. vesicatoria* sa semena paprike i paradajza, takođe navodi podlogu sa Tween-om (TMB) i CKTM podlogu.

LITERATURA

Balaž, J.: Pojava novih i nekih manje poznatih bakterioza u Jugoslaviji tokom 1987. godine (Prethodno saopštenje). XII seminar iz zaštite bilja Vojvodine, Arandelovac, 1988.

Balaž, J., Knežević, T. i Rašić, Đ.: Ispitivanje mogućnosti hemijskog suzbijanja ekonomski najsetetnijih fitopatogenih bakterija u našim uslovima. XII jugoslovenski simpozijum o zaštiti bilja i savetovanje o primeni pesticida, Zlatibor, 2002.

Balaž, J., Obradović, A. i Knežević, T.: Bakterioze na semenu i sadnom materijalu povrtnarskih, ratarskih i ukrasnih biljaka. Biljni lekar, 6: 629-638, 2003.

Delibašić T.: Neobjavljeni podaci, 2004.

Dye, D. W., Starr, M. P. and Stolp, H.: Taxonomic clarification of *Xanthomonas vesicatoria* based upon host specificity, bacteriophage sensitivity and cultural

characteristics. *Phytopathologische Zeitschrift*, 51: 394-402, 1964.

EPPO: Phytosanitary Procedures. *Xanthomonas vesicatoria*. Test Methods for Tomato Seeds. PM 3/45(1), EPPO, 1998.

Lelliott, R. A. and Stead, D.E.: Methods for Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants. Blackwell, Oxford, UK, 1987.

McGuire, R. G. and Jones, J. B.: Evaluation of a selective medium for the isolation of *Xanthomonas campestris pv. vesicatoria* from seeds and foliage. *Phytopathology*, 74: 882, 1984.

McGuire, R. G. and Jones, J. B.: Detection of *Xanthomonas campestris pv. vesicatoria* in tomato. **In:** Detection of Bacteria in Seed and Other Planting Material (Saettler, A. W., Schaad, N. W. and Roth, D. A., eds.), 1989.

Obradović, A., Arsenijević, M. i Mijatović, M.: Određivanje rasa bakterije *Xanthomonas campestris pv. vesicatoria* patogena paprike u Jugoslaviji. Četvrto jugoslovensko savetovanje o zaštiti bilja, Zlatibor, 1999.

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): 157-175, 2000.

Obradović, A., Arsenijević, M., Mijatović, M. i Ivanić, M.: Sve učestalija pojava *Xanthomonas campestris pv. vesicatoria* parazita paradajza u Srbiji. XI jugoslovenski simpozijum o zaštiti bilja i savetovanje o primeni pesticida, Zlatibor, 2000.

OEPP/EPPO: Quarantine Procedure. No. 45. *Xanthomonas campestris pv. vesicatoria*. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 22: 247-252, 1992.

Roth, D. A.: Review of Extraction and Isolation Methods. **In:** Detection of Bacteria in Seed and Other Planting Material (Saettler, A. W., Schaad, N. W., Roth, D. A., eds.), 1989.

Saettler, A. W., Schaad, N. W. and Roth, D. A.: Detection of Bacteria in Seed and Other Planting Material. Aps Press, The American Phytopathological Society, USA, 1989.

Schaad, N. W.: Detection of Seedborne Bacterial Plant Pathogens. *Plant Disease*, 66: 885-890, 1982.

Schaad, N. W.: Detection and Identification of Bacteria. **In:** Detection of Bacteria in Seed and Other Planting Material (Saettler, A. W., Schaad, N. W., Roth, D. A., eds.), 1989.

Schaad, N. W., Jones, J. B. and Chun, W.: Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. Aps Press, The American Phytopathological Society, USA, 2001.

Sijam, K., Chang, C. J. and Gitaitis, R. D.: An Agar Medium for the Isolation and Identification of *Xanthomonas campestris pv. vesicatoria* from Seed. *Phytopathology*, 81: 831-834, 1991.

Šutić, D.: Bakterioze crvenog patlidžana. Institut za zaštitu bilja, Beograd, 1957.

Van Ettekoven, K. (ed.): Seed Health Testing Methods Reference Manual. ISHI – Vegetable, 2000.

Devising Methods for Isolation of *Xanthomonas campestris* PV. *vesicatoria* from Pepper Seed

SUMMARY

The possibility of the bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* detection on pepper seeds was investigated in 2002-2004. Direct and indirect isolation methods were applied. Reliable positive and repeatable results were obtained in conditions of artificial inoculation of seeds and isolation from the seed extract to special selective media.

The most successful selective media for *X. c.* pv. *vesicatoria* isolation from seeds were the media according by McGuire and Jones (1989, 1984). The investigated samples of commercial pepper seed were proved to be free of *X. c.* pv. *vesicatoria* bacteria.

Keywords: *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*; Pepper; Seed; Artificial inoculation; Selective medium