

Pestic. fitomed. (Beograd), 23 (2008) 81-88
Pestic. Phytomed. (Belgrade), 23 (2008) 81-88

UDC: 632.35:635.652:579.64
Naučni rad * Scientific Paper

Razrada metoda za dokazivanje *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* na semenu pasulja

Jelica Balaž¹, Tatjana Popović¹, Mirjana Vasić² i Zorica Nikolić³

¹Poljoprivredni fakultet, 21000 Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 8, Srbija
(balazjel@polj.ns.ac.yu)

²Institut za ratarstvo i povrtarstvo, 21000 Novi Sad, Maksima Gorkog 30, Srbija

³Nacionalna laboratorija za ispitivanje semena, 21000 Novi Sad, Maksima Gorkog 30, Srbija

REZIME

U radu je ispitivana mogućnost utvrđivanja prisustva bakterije *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* sa veštački inokulisanog semena pasulja. Korišćena je metoda International Seed Federation (ISF), koja uključuje ekstrakciju bakterija iz semena, izolaciju na poluselektivne podloge i proveru patogenosti dobijenih izolata. U cilju potvrde rezultata korišćene su brze savremene metode identifikacije (ELISA test i PCR).

Rezultati dobijeni tokom rada pokazuju da su poluselektivne podloge MT (Milk Tween Agar) i MSP (Modified Sucrose Peptone Agar) pogodne za izolaciju ove bakterije. Patogenost odabranih izolata dokazana je na kotiledonim listovima pasulja. Primenom ELISA testova i PCR, potvrđeno je da svi ispitivani izolati i reizolati pripadaju bakteriji *P. s. pv. phaseolicola*.

Cljučne reči: *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*; pasulj; seme; veštačka inokulacija; ELISA, PCR

UVOD

Pseudomonas savastanoi pv. *phaseolicola* (Burkholder) Gordan et al. (u daljem tekstu *Psp*) je široko rasprostranjena i ekonomski štetna bakterija boranije i pasulja (*Phaseolus vulgaris* L.) kod nas i u svetu. U godinama sa prohladnim i kišovitim prolećem, u Vojvodini su beleženi slučajevi potpunog propadanja i preoravanja useva boranije (Balaž, 1989).

Zaraženo seme je osnovni izvor inokuluma za *Psp*. Prema Van Vuurde i sar. (1991) rutinsko laboratorijsko testiranje je pokazalo da je 27,5% od 710 partija semena pasulja, različitog porekla, bilo zaraženo ovom bakterijom. Wharton (1967) navodi da je jedno zaraženo seme u 10000, odnosno jedno u 16000 (Guthrie i sar., 1965), dovoljno da izazove epifitociju u polju.

Iz obolele biljke, bakterija dospeva u seme preko zida mahune. Prisustvo bakterije u semenu se može ma-

nifestovati jasnom ili slabom pojavom simptoma, ali i bez simptoma (latentna infekcija). Pri ispitivanju prenošenja bolesti sa semena na klijance pasulja, Taylor i sar. (1979) navode da je u slučaju kada su simptomi na semenu bili slabo vidljivi ili odsutni, prenošenje bakterije na klijance iznosilo 35, odnosno 52%, a u slučaju vidljivo inficiranog semena 13%. Isti autori navode da je najviše infekcija razvijeno iz semena sa slabo vidljivim simptomima ili bez simptoma.

Uzimajući u obzir da *Psp* može biti prisutan na semenu pasulja sa i bez simptoma, cilj ovog rada je bio razrada metode za brzo i pouzdano dokazivanje ovog patogena. Provera i razrada metode je rađena sa veštački inokulisanim semenom pasulja.

MATERIJAL I METODE

Dokazivanje *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* na semenu pasulja u uslovima veštačke inokulacije

Ispitivanja su obavljena u Laboratoriji za bakteriologiju, Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu i Nacionalnoj laboratoriji za ispitivanje semena u Novom Sadu, tokom 2006-2007. godine. Uzorak netretiranog semena pasulja sorte dvadesetica (domaća sorta, nastala iz hibridne populacije medijana x gradištanac) (Vasić, 1997), dobijen je iz kolekcije Instituta za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad.

Izolot bakterije *Psp* korišćen za veštačku inokulaciju semena (*Ps-12*) potiče iz kolekcije bakterija Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu.

U radu je korišćena metoda koju je opisao International Seed Federation (ISF, 2006). Navedena metoda obuhvata ekstrakciju bakterije iz semena, izolaciju na poluselektivne podloge i proveru patogenosti dobijenih izolata. U cilju potvrde identifikacije korišćene su brze savremene metode identifikacije (ELISA testovi i PCR).

Inokulacija semena pasulja

Veličina uzorka je iznosila 5000 zrna pasulja, a poduzorci su se sastojali od po 1000 zrna (pet ponavljanja). Izolat korišćen za veštačku inokulaciju semena – *Ps12* (bakterija *Psp*) je gajen na NA podlozi (Nutrient agar) (Lelliott i Stead, 1987), tokom 48 sati. Korišćena je bakterijska suspenzija gustine 3×10^8 ćel/ml, koja je podešena pomoću McFarlandove skale.

Seme je inokulirano potapanjem u bakterijsku suspenziju preko noći na sobnoj temperaturi, nakon čega je tokom 24 sata sušeno na sterilnom filter-papiru.

Ekstrakcija

Poduzorci inokulisanog semena pasulja su odmereni, a zatim potopljeni u sterilni ekstrakcioni rastvor (8,5 g NaCl, 0,2 ml Tween 20, 1000 ml H₂O), u odnosu 1:2 (1 g semena u 2 ml ekstrakcionog rastvora). Nakon toga, poduzorci su stavljeni u frižider na 5°C na inkubaciju preko noći.

Izolacija na hranljive podloge

Iz dobijenog ekstrakta veštački inokulisanog semena pasulja (nakon inkubacije) pripremana je serija razređenja do 10^{-5} . U petri-kutije prečnika 9 cm standardnom metodom razmaza pomoću staklenog štapića zasejavano je po 0,1 ml od svakog razređenja, kao i od nerazređenog ekstrakta. Uporedo je zasejan i kontrolni izolat bakterije *Psp* (*Ps12*). Za izolaciju su korišćene poluselektivne podloge:

1) MT (Milk Tween Agar) (Goszczynska i Serfontein, 1998): 10 g Proteose peptone No. 3 (Difco), 0,25 g CaCl₂, 0,5 g tirozina, 15 g agara i 500 ml destilovane vode sterilisati u autoklavu 15 min na 121°C. Nakon hlađenja do 50°C, dodati 40 mg nistatina, 80 mg cefaleksina, 10 mg vankomicina, 10 g obranog mleka u prahu (odvojeno sterilisanog u autoklavu sa 500 ml destilovane vode) i 10 ml Tweena 80 (odvojeno sterilisanog u autoklavu);

2) MSP (Modified Sucrose Peptone Agar) (Mohan i Schaad, 1987): 20 g saharoze, 5 g Proteose peptone No. 3 (Difco), 0,5 g K₂HPO₄, 0,25 g MgSO₄ x 7H₂O, 20 g agara i 1000 ml destilovane vode sterilisati u autoklavu 15 min na 121°C. Nakon hlađenja do 50°C dodati 200 mg cikloheksimida, 80 mg cefaleksina, 10 mg vankomicina i 1 ml bromtimol plavog (15 mg/ml 95% etanola).

Zasejane petri-kutije su stavljene 4-5 dana na inkubaciju u termostat na 28°C. Ogljed je izvođen u dva ponavljanja.

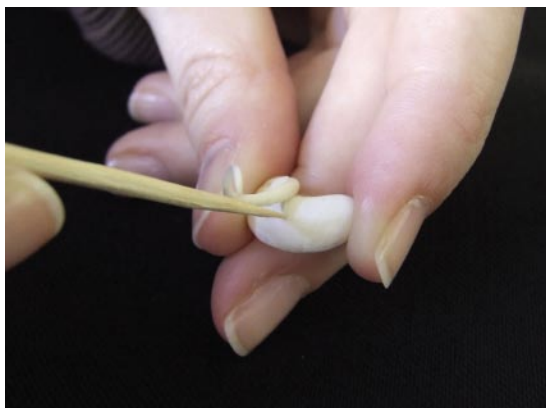
Nakon inkubacije je upoređivan izgled kolonija razvijenih iz ekstrakta sa kolonijama kontrolnog izolata *Psp* (iz razređenja gde se broj kolonija u petri-kutijama kretao 30-300).

Kolonije bakterija koje su nakon razvoja na podlogama MT i MSP ispoljavale sličnost sa kontrolnim izolatom *Psp* presejavane su na kosu Kingovu B podlogu (King's B) (Lelliott i Stead, 1987) i stavljene u termo-

stat na 27°C tokom 3-4 dana. Izolati su zatim ponovo upoređeni sa kontrolnim izolatom. Za dalja proučavanja je odabrano deset reprezentativnih izolata.

Provera patogenosti

Za ova ispitivanja korišćeno je seme sorte oplenac, poznato kao osetljiv genotip pasulja. Seme je postavljeno u vlažan filter-papir i održavano 3-4 dana u mraku, na temperaturi od 25°C. Inokulacija naklijalog semena je vršena pomoću sterilne čačkalice, kojom je prethodno zahvaćena bakterijska kultura (starosti 48 sati) sa kose Kingove B podloge. Naklijalo seme je 1-3 sata pre inokulacije isprskano vodom, radi stvaranja boljih uslova za infekciju. Inokulacija je izvršena probadanjem kotiledona (Slika 1), nakon čega je čačkalica pri vađenju polako rotirana da bi se bakterijska kultura zadržala unutar kotiledona. U ispitivanja su bili uključeni sledeći izolati: TP100, TP101, TP102, TP104, TP105, TP110, TP111, TP112, TP120 i TP122. Za pozitivnu kontrolu je korišćen kontrolni izolat Ps12, a negativna kontrola je rađena ubodom bez bakterijske kulture. Ogled je postavljen u četiri ponavljanja.



Slika 1. Metod inokulacije
Figure 1. Inoculation method

Inokulisani sejanci su održavani u klima-komori pri dnevnom režimu svetlosti, temperaturi od 20°C i relativnoj vlažnosti od 80%. Pojava simptoma je praćena posle 4-5 i 8-10 dana i upoređivana sa pozitivnom i negativnom kontrolom. Patogenost je ocenjena petog i desetog dana posle inokulacije (pre nego što su kotiledoni propali), pregledom ravne unutrašnje strane kotiledona, radi utvrđivanja prisustva masnih pega na mestu inokulacije.

Reizolacija

Reizolacija je vršena po uobičajenom laboratorijskom postupku na hranljive podloge NA i NSA (Nutrient sucrose agar) (Lelliott i Stead, 1987). Dobijeni reizolati su presejani na kosu King B podlogu. Za dalji rad je odabrano četiri reizolata.

Provera patogenosti reizolata

Patogenost reizolata je proverena infiltracijom bakterijske suspenzije (koncentracije 10^6 - 10^7 čel/ml) u mlade mahune boranije pomoću medicinske igle. Kao pozitivna kontrola korišćen je kontrolni izolat Ps12, a za negativnu kontrolu je upotrebljena voda. Inokulisane mahune su zatim postavljene na vlažan filter-papir u plastične kutije i održavane na sobnoj temperaturi (oko 25°C). Pojava simptoma je praćena tokom 3-7 dana. Ovu metodu inokulacije navode Lelliott i Stead (1987).

Serološke metode identifikacije (ELISA test)

Identifikacija izolata i reizolata dobijenih iz veštački inokulisanog semena pasulja vršena je i serološkim metodama – PTA ELISA (Plate Trapped Antigen ELISA) i DAS ELISA (Double Antibody Sandwich ELISA) (Schaad i sar., 1990). U radu su korišćeni komercijalni antiserumi specifični za detekciju *Psp* (ADGEN Phytodiagnosics, Neogen Europe Ltd., Scotland, UK. za PTA ELISA test i LOEWE Biochemica GmbH, Germany za DAS ELISA test).

U ova ispitivanja su bili uključeni svi prikupljeni izolati i reizolati, a za pozitivnu kontrolu korišćen je kontrolni izolat *Psp* (Ps12). Kao negativna kontrola korišćen je izolat bakterije *Erwinia amylovora* (NCPFB 595). Za pripremu uzoraka (bakterijska suspenzija koncentracije 3×10^8 čel/ml podešena pomoću McFarlandove skale) izolati i reizolati su gajeni 48 časova na NA podlozi.

ELISA testovi su izvođeni prema uputstvima proizvođača antiseruma. Rezultati su očitani pomoću ELISA čitača (BIO-TEK ELx800UV) na talasnoj dužini od 405 nm. Pozitivnom reakcijom su smatrane vrednosti apsorpcije dva i više puta veće od vrednosti apsorpcije kod negativne kontrole.

Molekularne metode identifikacije (PCR)

Metodom lančane reakcije polimeraze (Polymerase Chain Reaction – PCR) (Schaad i sar., 2001) izvršena je identifikacija izolata i reizolata dobijenih iz veštački

inokulisanog semena pasulja. Prajmeri za rad su sintetisani u nemačkoj firmi Metabion GmbH, Germany. Za pripremu PCR smeše korišćen je Master Mix (Eppendorf, Germany). Umnožavanje DNK fragmenta je vršeno u PCR aparatu (Mastercycler ep gradient S, Eppendorf, Germany). PCR proizvodi su razdvojeni elektroforezom (Fotodyne, USA), a gelovi su posmatrani na UV transiluminatoru (TF X 35 MC, Sigma, France) i fotografisani pomoću DOC PRINT DP-001. FDC (Vilber Lourmat, France). Na osnovu DNA markera DNA Ladder Sigma, 50 baznih parova (bp) određena je približna molekulska masa PCR produkata.

Prilikom pripreme uzorka DNK korišćena je modifikovana metoda amplifikacije gena za fazeolotoksin, koju navode Güven i sar. (2004). Bakterijska suspenzija koncentracije 3×10^8 ćel/ml (podešena prema McFarlandovoj skali) pripremana je od izolata i reizolata gajenih 48 časova na King B podlozi. Po 0,5 ml suspenzije je kuvano tokom 15 min, a potom su ćelijski ostaci odstranjeni centrifugiranjem 10 min na 11000 rpm. Po 2 μ l supernatanta je korišćeno kao uzorak DNK u PCR.

Prema protokolu koji navode Schaad i sar. (2001), korišćen je Nested PCR koji se sastojao od dve PCR reakcije, pri čemu je nastali proizvod iz prve PCR reakcije korišćen kao matrica za drugu. Na taj način je povećana osetljivost PCR reakcije. Za prvi PCR korišćeni su prajmeri:

P 5.1: 5'-AGCTTCTCCTCAAAACACCTGC-3'
P 3.1: 5'-TGTTTCGCCAGAGGCAGTCATG-3',
koji daju proizvod veličine 500 bp. Po završenom umnožavanju PCR produkti su razblaženi 10 puta i za drugi PCR je uzeto po 2 μ l. Drugi PCR je izveden sa prajmerima:

P 5.2: 5'-TCGAACATCAATCTGCCAGCCA-3'
P 3.2: 5'-GGCTTTTATTATTGCCGTGGGC-3',
koji daju proizvod veličine 450 bp.

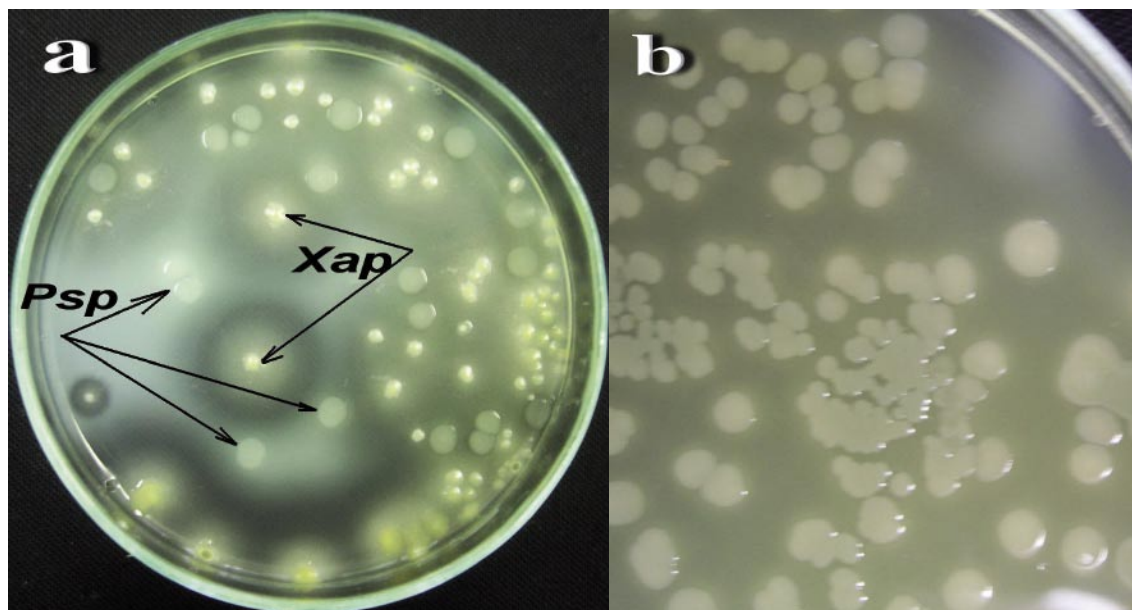
Kao pozitivna kontrola korišćen je izolat Ps12, a kao negativna kontrola poslužila je bakterija *E. amylovora* (NCPPB 595).

Pozitivnim je ocenjen svaki uzorak u kome je amplifikovan fragment veličine 450 bp.

REZULTATI I DISKUSIJA

Izolacija na hranljive podloge

Izolacijom na poluselektivne podloge MT i MSP obrazovale su se brojne različite bakterijske kolonije. Pojedinačne kolonije bakterije *Psp* mogle su se jasno raspoznati u razređenjima 10^{-1} - 10^{-3} . Na MT podlozi su se posle četiri dana inkubacije uočavale tipične beličastokrem kolonije, ravne i okrugle, neujednačene veličine (prečnika 3-5 mm) (Slika 2). Ovakav izgled za *Psp* na podlozi MT navode ISF (2006) i Kurowski i Remeeus



Slika 2. Izgled kolonija na MT podlozi: a – izolacija sa veštački inokulisanog semena pasulja, b – kontrolni izolat Ps12 (detalj)
Figure 2. View of colonies on MT medium: a – isolation from artificially inoculated bean seeds, b – control isolate Ps12 (detail)

(2008). Prema ISF (2006) mnoge kolonije *Psp* na MT podlozi stvaraju bledo-plavi fluorescentni pigment korišćenjem UV svetla. Poluselektivnu MT podlogu za izolaciju *Psp* sa semena pasulja preporučuju Goszczynska i Serfontein (1998) i Kurowski i Remeus (2008).

U istim petri-kutijama na MT podlozi su se jasno uočavale i kolonije bakterije *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (u daljem tekstu *Xap*), žute, ispučene i sluzaste, okružene sa dve zone hidrolize, većom prosvetljenom nastalom usled hidrolize kazeina i manjom mlečnom usled hidrolize Tweena 80 (Sheppard i sar., 2007) (Slika 2a). Ovaj podatak pokazuje da je korišćeno seme bilo prirodno zaraženo ovom bakterijom. Daljim radom identifikacija bakterije *Xap* je i dokazana. Podloga MT se koristi kako za izolaciju *Psp* tako i *Xap* (Goszczynska i Serfontein, 1998).

Na podlozi MSP posle četiri dana od zasejavanja takođe su se obrazovale brojne kolonije bakterija. Među njima su se jasno uočavale svetložute, ispučene i sjajne kolonije, prečnika oko 2-3 mm (Slika 3). Oko ovih kolonija, boja podloge je prelazila u svetlo žutu. Ovakav izgled kolonija bakterije *Psp* na MSP podlozi navode Mohan i Schaad (1987), Jansing i Rudolph (1996) i Kurowski i Remeus (2008). Poluselektivnu podlogu MSP za izolaciju *Psp* sa semena pasulja preporučuje veći broj autora (Mohan i Schaad, 1987; Jansing i Rudolph, 1996; National Seed Health System, 2002; Kurowski i Remeus, 2008).

Rezultati naših istraživanja su potvrdili prednost MT podloge, koja omogućava istovremenu detekciju

dve fitopatogene bakterije (*Psp* i *Xap*), koje se javljaju na pasulju. Goszczynska i Serfontein (1998) navode da ova podloga osim izolacije omogućava i diferencijaciju bakterija sa pasulja i to *Xap*, *Psp* i *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (u daljem tekstu *Pss*). Kurowski i Remeus (2008) takođe navode korišćenje MT podloge za izolaciju i razlikovanje kolonija *Psp* od *Pss*.

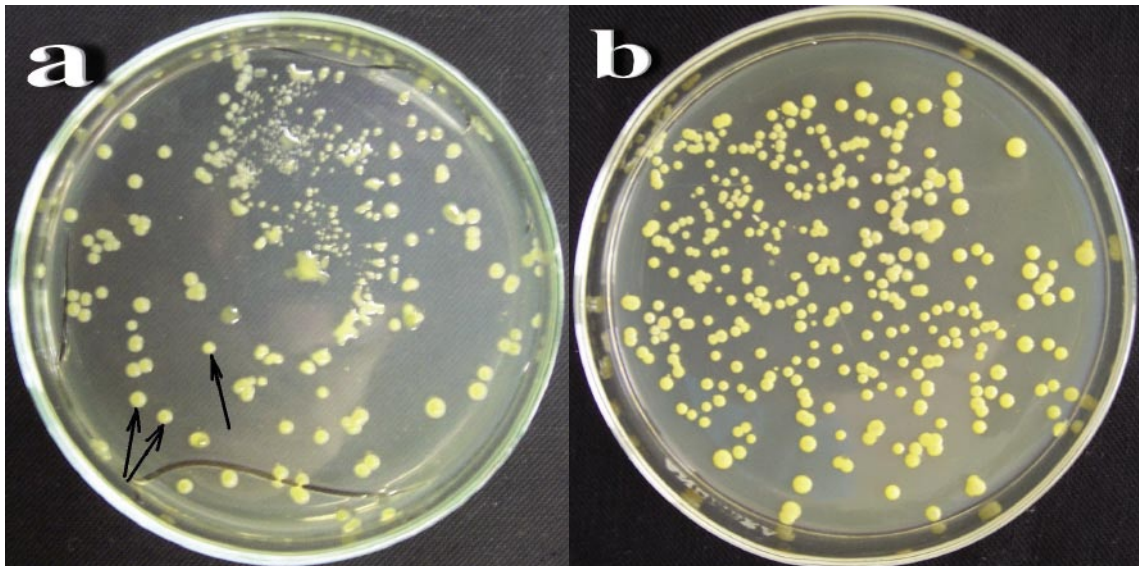
Za dalja proučavanja je odabrano po dva izolata iz svakog poduzorka. Sa hranljive podloge MT dobijeni su izolati pod sledećim šiframa: TP100, TP101, TP102, TP104 i TP105, a sa podloge MSP izolati pod šiframa: TP110, TP111, TP112, TP120 i TP122.

Svi proučavani izolati kao i kontrolni (Ps12) na kosoj King B podlozi su stvarali fluorescentni pigment.

Provera patogenosti

Na inokulisanim kotiledonim listićima, kod svih ispitivanih izolata posle 5 dana od inokulacije pojavile su se tamnozeleno, masne pege oko mesta uboda. Van Vuurde i Van den Bovenkamp (1987, 1989) korišćenjem istog metoda provere patogenosti izolata *Psp* takođe navode pojavu tipičnih masnih pega na mestu inokulacije, odnosno uboda. Nakon 10 dana od inokulacije kotiledoni listići su celom površinom bili zahvaćeni sitnim masnim pegama (Slika 4). Kod negativne kontrole nisu uočene nikakve promene.

Prema ISF (2006) kod inokulisanih biljaka postoji i mogućnost stvaranja hlorotičnih oreola na prvom listu



Slika 3. Izgled kolonija na MSP podlozi: a – izolacija sa veštački inokulisanog semena pasulja, b – kontrolni izolati Ps12
Figure 3. View of colonies on MSP medium: a – isolation from artificially inoculated bean seeds, b – control isolate Ps12



Slika 4. Simptom na inokulisanim kotiledonima pasulja: a – izolot TP111, b – kontrolni izolot Ps12, c – negativna kontrola

Figure 4. Symptom on an inoculated bean cotyledon: a – isolate TP111, b – control isolate Ps12, c – negative control

pasulja, usled aktivnosti fazeolotoksina. U našem radu, pojavu hlorotičnih oreola nismo zapazili, što može biti rezultat temperature od 20°C u klima-komori jer je optimalna temperatura za stvaranje fazeolotoksina 18°C (Nüske i Fritsche, 1989).

Reizolacija

Sa hranljivih podloga NA i NSA, nakon tri dana razvoja reizolovane su bakterijske kolonije tipične za *Psp*. Odabrano je četiri reizolata (RTP101, RTP105, RTP110 i RTP120).

Provera patogenosti reizolata

Na mladim mahunama boranije već trećeg dana nakon inokulacije u okviru tkiva infiltriranog suspenzijom bakterija javile su se vlažne i masne pege.

U okviru masnih pega, posle 4-5 dana od inokulacije obrazuje se beličast bakterijski eksudat, a ivični deo pega u većini slučajeva dobija crvenkastu boju. Lelliott i Stead (1987) za proveru patogenosti izolata bakterije *Psp* takođe navode inokulaciju nezrelih mahuna pasulja, a pozitivnom reakcijom se smatra pojava karakterističnih vlažnih pega.

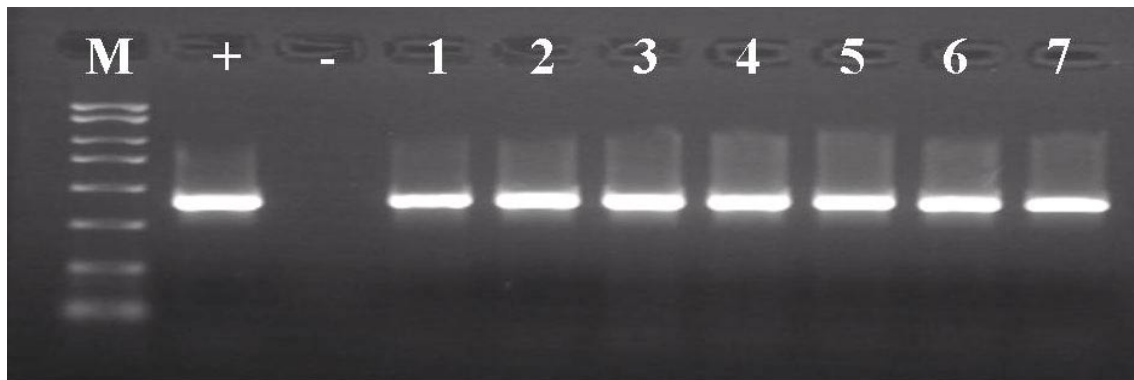
Serološke metode identifikacije (ELISA test)

Primenom ELISA testa potvrđeno je da svi proučavani izolati i reizolati pripadaju bakteriji *Psp* jer reaguju sa specifičnim antitelima. Pojava pozitivne reakcije registrovana je merenjem promene boje pomoću ELISA čitača. Svi uzorci kao i pozitivna kontrola imali su vrednost apsorpcije nekoliko puta veću od vrednosti očitanih kod negativne kontrole (*E. amylovora*).

Molekularne metode identifikacije (PCR)

Rezultati lančane reakcije polimeraze pokazuju da su kod svih proučavanih izolata i reizolata kao i kod kontrolnog izolata Ps12 amplifikovani fragmenti nukleinske kiseline veličine 450 bp (Slika 5), čime je potvrđeno da pripadaju bakteriji *Psp*. U slučaju bakterije *E. amylovora* (negativna kontrola), reakcija je u svim testovima bila negativna. Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima koje za ovakva ispitivanja navode Schaad i sar. (1995) i Güven i sar. (2004).

Balaž i Delibašić (2005) i Milijašević i sar. (2007) navode da je za identifikaciju i detekciju bakterija sa semena najbolje kombinovati nekoliko metoda. Najbolja kombinacija podrazumeva izolaciju patogena na odgovarajuće selektivne podloge i dokazivanje patogenosti, a potom potvrdu identiteta dobijenih izolata korišćenjem seroloških i/ili molekularnih metoda.



Slika 5. Amplifikacija fragmenta DNA veličine 450 bp iz fazeolotoksin gena korišćenjem prajmera P 5.1/P 3.1 i P 5.2/P 3.2. M: Marker DNA Ladder Sigma 50 bp, +: Ps12, -: NCPPB 595, 1: TP100, 2: TP102, 3: TP105, 4: TP110, 5: TP111, 6: RTP101, 7: RTP120

Figure 5. Amplification of a 450 bp DNA fragment from the phaseolotoxin gene using P 5.1/P 3.1 and P 5.2/P 3.2 primers. M: Marker DNA Ladder Sigma 50 bp, +: Ps12, -: NCPPB 595, 1: TP100, 2: TP102, 3: TP105, 4: TP110, 5: TP111, 6: RTP101, 7: RTP120

Primena savremenih metoda identifikacije (PCR i ELISA testovi) i u našim istraživanjima je omogućila brzu identifikaciju dobijenih izolata i reizolata *Psp* iz semena pasulja.

LITERATURA

- Balaž, J.:** Bakteriološke karakteristike i fiziološke rase *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (Burkholder) Young, Dye et Wilkie u Jugoslaviji. Zaštita bilja, 40(2), 188: 187-194, 1989.
- Balaž, J. i Delibašić, T.:** Iznalaženje metoda za izolaciju *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* sa semena paprike. Pesticidi i fitomedicina, 20(1): 51-60, 2005.
- Goszczyńska, T. and Serfontein, J.J.:** Milk-Tween Agar, a Semiselective Medium for Isolation and Differentiation of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. Journal of Microbiological Methods, 32(1): 65-72, 1998.
- Guthrie, J.W., Huber, D.M. and Fenwick, H.S.:** Serological detection of halo blight. Plant Disease Report, 4(1): 297-299, 1965.
- Güven, K., Jones, J.B., Momol, M.T. and Dickstein, E.R.:** Phenotypic and Genetic Diversity among *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. J. Phytopathology, 152, 658-666, 2004.
- ISF:** Method for the Detection of *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* on Bean seed. Nyon, Switzerland, 2006, pp. 1-7.
- Jansing, H. and Rudolph, K.:** ISTA Handbook on Seed Health Testing. Working Sheet No. 66 (*Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*), 1996.
- Kurowski, C. and Remeus, P.M.:** Detection of *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* on *Phaseolus vulgaris*. International Seed Testing Association (ISTA), Bassersdorf, Switzerland, 2008.
- Lelliott, R.A. and Stead, D.E.:** Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants, Methods in Plant Pathology. Volume 2. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK, 1987.
- Milijašević, S., Todorović, B., Rekanović, E., Potočnik, I. and Balaž, J.:** *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, Bacterial Canker of Tomato: 2. Comparison of the Effectiveness of Extraction Procedures and Sensitivity of Methods for Detection in Tomato Seeds. Pesticidi i fitomedicina, 22(2): 121-130, 2007.
- Mohan, S.K. and Schaad, N.W.:** An improved agar plating assay for detecting *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and *P. s.* pv. *phaseolicola* in contaminated bean seed. Phytopathology, 77, 1390-1395, 1987.
- National Seed Health System:** Seed Health Testing and Phytosanitary Field Inspection Methods Manual. Reference Manual B (RM-B), Version dated 09/18/02, 2002.
- Nüske, J. and Fritsche, W.:** Phaseolotoxin production by *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*: the influence of temperature. J. Basic. Microbiol., 29(7): 441-447, 1989.
- Schaad, N.W., Cheong, S.S., Tamaki, S., Hatziloukas, E. and Panopoulos, N.J.:** A Combined Biological and Enzymatic Amplification (BIO-PCR) Technique to Detect *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in Bean Seed Extracts. Phytopathology, 85: 243-248, 1995.
- Schaad, N.W., Jones, J.B. and Chun, W.:** Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. APS PRESS, The American Phytopathological Society, 2001.

Schaad, N.W., Süle, S., van Vuurde, J.W.L., Vrugink, H., Alvarez, A.M., Benedict, A.A., de Wael, L. and van Laere, O.: Serology. In: Methods in Phytobacteriology, Ch. 1.9. (Z. Klement, K. Rudolph, and D.C. Sands, eds.), Akadémiai Kiadó, Budapest, 1990, pp. 153-190.

Sheppard, J.W., Kurowski, C. and Remeus, P.M.: Detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* on *Phaseolus vulgaris*. International Seed Testing Association (ISTA), Bassersdorf, Switzerland, 2007.

Taylor, J.D., Dudley, C.L. and Presly, L.: Studies of halo-blight seed infection and disease transmission in dwarf beans. *Annals of Applied Biology*, 93(3): 267-277, 1979.

Van Vuurde, J.W.L. and Van den Bovenkamp, G.W.: ISTA Handbook on Seed Health Testing. Working Sheet No. 65 (*Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*), 1987.

Van Vuurde, J.W.L. and Van den Bovenkamp, G.W.: Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in Bean. In: Detection of Bacteria in Seed and Other Planting Material (A.W. Saettler, N.W. Schaad and D.A. Roth, eds.). The American Phytopathological Society Press, pp. 30-40, 1989.

Van Vuurde, J.W.L., Franken, A.A.J.M., Birnbaum, Y. and Jochems, G.: Characteristics of Immunofluorescence Microscopy and Of Dilution-plating to Detect *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in Bean Seed Lots and for Risk Assessment of Field Incidence of Halo Blight. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 97(4): 233-244, 1991.

Vasić, M.: Dvadesetica, nova sorta pasulja belog zrna. *Selekcija i semenarstvo*, 4(3-4): 125-127, 1997.

Wharton, A.C.: Detection of infection by *Pseudomonas phaseolicola* (Burkh.) Dowson in white seeded dwarf bean seed stocks. *Ann. Appl. Biol.*, 60(2): 305-312, 1967.

Elaboration of Methods for Detection of *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* on Bean Seeds

SUMMARY

Pseudomonas savastanoi pv. *phaseolicola* detection on artificially inoculated bean seeds was investigated. The method of the International Seed Federation – ISF (2006) was used. It includes bacteria extraction from seeds, isolation on semiselective media and checking the pathogenicity of investigated isolates. For verification of results, quick new methods of investigation were used (ELISA test and PCR).

The results show that semiselective media MT (Milk Tween Agar) and MSP (Modified Sucrose Peptone Agar) can be appropriate for isolation of this bacterium. Pathogenicity of the investigated isolates was confirmed on cotyledon leaves of bean. ELISA test and PCR confirmed that all investigated isolates and reisolates belong to the bacterium *P. s.* pv. *phaseolicola*.

Keywords: *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*; Bean; Seed; Artificial inoculation; ELISA; PCR