

# Razrada metoda za dokazivanje *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* na semenu pasulja

Jelica Balaž<sup>1</sup>, Tatjana Popović<sup>1</sup>, Mirjana Vasić<sup>2</sup> i Zorica Nikolić<sup>3</sup>

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

<sup>2</sup>Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Maksima Gorkog 30, 21000 Novi Sad, Srbija

<sup>3</sup>Nacionalna laboratorija za ispitivanje semena, Maksima Gorkog 30,  
21000 Novi Sad, Srbija

## REZIME

U radu je ispitivana mogućnost utvrđivanja prisustva bakterije *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* na veštački inokulisanom semenu pasulja. Ispitivanja su vršena po metodi International Seed Federation (ISF), ekstrakcijom bakterija iz semena i izolacijom na poluselektivne podloge uz proveru patogenosti dobijenih izolata. Za potvrdu dobijenih rezultata korišćen je ELISA test i PCR.

Prema dobijenim rezultatima ova bakterija se može uspešno izolovati na poluselektivne podloge MT (Milk Tween Agar) i XCP1 (*Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* Agar). Patogenost je dokazana na mladim biljčicama pasulja. ELISA testovi i PCR su potvrdili da svi ispitivani izolati i reizolati pripadaju bakteriji *X. a.* pv. *phaseoli*.

**Ključne reči:** *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*; pasulj; seme; veštačka inokulacija; ELISA; PCR

## UVOD

*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Smith) Vauterin et al. (u daljem tekstu *Xap*) i varijetet *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* (Burkh.) Starr et Burkh. (u daljem tekstu *Xapf*) su patogeni pasulja (*Phaseolus vulgaris* L.) široko rasprostranjeni u svetu. Prisutni su svugde gde se pasulj gaji, u područjima tropske, suprotropske i umerene klime. U pojedinim zemljama tropskog klimatskog područja zabeleženi su gubici 10-75%, dok je u umerenom klimatskom području u južnim delovima pokrajine Ontario (Kanada), 1971-1972. godi-

ne na osetljivoj sorti Sanilak gubitak bio 38% (Wallen i Jackson, 1975). *Xap* je u Rumuniji, u periodu 1962-1969. godine, prouzrokovao gubitke od 45% (Severin, 1971), a u Mađarskoj, u periodu 1983-1985, gubici su bili 46-62,6% (Németh, 1990).

Kod nas je ova bakterija ekonomski najštetnija bakterioza pasulja. Posebno se ističe jak intenzitet pojave ove bakterije na pasulju koji se gaji na manjim parcelama i u okućnicama, gde se za setvu koristi nesertifikovano seme, bez deklaracije o zdravstvenom stanju i kvalitetu (Balaž, 1996). Tokom leta često se zapaža i potpuno sušenje useva.

Ova činjenica je vrlo bitna, jer seme predstavlja osnovni izvor inokuluma čime se omogućava širenje bakterije na velike razdaljine. U mlade mahune ova bakterija dospeva iz sprovodnog tkiva zaraženih biljaka, a odatle prodire u seme ostvarujući unutrašnju zarazu (Aggour i sar., 1989). Infekcija semenjače može nastati i posredstvom zida mahune. Do zaraze semena dolazi i tokom berbe, kada seme dospeva u kontakt sa zaraženim biljnim ostacima (spoljašnja zaraza). Minimum 1000 do 10000 bakterija po semenu je potrebno da se iz obolelog semena, pod povoljnim uslovima u polju, razviju obolele biljke (Weller i Saettler, 1980).

Nosioci primarnih infekcija u polju su uglavnom mlade biljke koje se razvijaju iz delimično zaraženog semena. Pojava simptoma je uslovljena dostizanjem relativno visoke populacije, 100000 do 1000000 ćel/g u biljnom tkivu (Gilbertson i Maxwell, 1992), što omogućava sekundarno širenje bakterije. Wallen i Sutton (1965) navode da je veoma mali procenat semena zaraženog bakterijom *Xap* (manji od 0,5%) dovoljan da prozrokuje jaku infekciju biljaka u polju.

U našoj zemlji je tek u poslednje vreme publikovano nekoliko radova o problematici fitopatogenih bakterija na semenu i laboratorijskim metodama za njihovu detekciju i identifikaciju (Balaž i sar., 2003; Balaž i Delibašić, 2005; Milijašević i sar., 2007).

Bakteriju *Xap* nije lako detektovati, jer može biti prisutna na semenu sa vidljivim simptomima i bez simptoma (latentne infekcije). Zbog toga, detekcija bakterija na semenu zahteva ekstrakciju bakterija iz semena i njihovu identifikaciju, korišćenjem raznih dijagnostičkih metoda.

Cilj ovog rada je bio razrada metode za detekciju *Xap* na semenu pasulja, koju je opisao International Seed Federation (ISF, 2006). Ispitivanja su obavljena u uslovima veštačke inokulacije semena pasulja.

## MATERIJAL I METODE

### Dokazivanje *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* na semenu pasulja u uslovima veštačke inokulacije

Ispitivanja su vršena 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) do-

bijen je iz kolekcije Instituta za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad. Izolat bakterije korišćen za veštačku inokulaciju semena (*Xap*, izolat X24) potiče iz kolekcije bakterija Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu, a za poređenja i kao referentni korišćeni su izolati *Xap* - GSPB 1241 i *Xapf* - CFBP 6165.

Za detekciju bakterija iz uzoraka semena pasulja korišćena je metoda ISF (2006). Navedena metoda obuhvata ekstrakciju bakterija iz semena, izolaciju na poluselektivne podloge i proveru patogenosti dobijenih izolata. U cilju potvrde identifikacije korišćene su brze savremene metode, i to serološke (ELISA test) i molekularna (PCR).

Kirjakov (1999) je takođe radio na dokazivanju *Xap* na semenu pasulja pomoću ekstrakcije i izolacije na selektivne i neselektivne podloge, s tim da je identifikacija dobijenih izolata izvršena na osnovu testova patogenosti i Biolog sistema (Biology MicroStation System).

### 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 je X24 (bakterija *Xap*), gajen na YDC podlozi (Yeast Extract Dextrose Calcium Carbonate Agar) (Schaad, 1988), tokom 48 sati. Korišćena je bakterijska suspenzija gustine  $3 \times 10^8$  ćel/ml podešena pomoću McFarlandove skale.

Seme je inokulisano 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 prvo su odmereni, a zatim potapani u sterilni ekstrakcioni rastvor (8,5 g NaCl, 0,2 ml Tween 20, 1000 ml H<sub>2</sub>O), u odnosu 1:2 (1 g semena u 2 ml ekstrakcionog rastvora). Uzorci su zatim ostavljeni u frižider na inkubaciju preko noći na 5°C.

### Izolacija na hranljive podloge

Nakon inkubacije, iz dobijenog ekstrakta veštački inokulisanog semena pasulja 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 nerazređenog ekstrakta. Uporedo su zasejavani i kontrolni

izolati *Xap* (X24, GSPB 1241 i CFBP 6165). Izolacija je vršena na poluselektivne podloge:

1) **MT (Milk Tween Agar)** (Goszczyńska i Serfontein, 1998): 10 g Proteose peptone No. 3 (Difco), 0,25 g  $\text{CaCl}_2$ , 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) **XCP1 (*Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* Agar)** (McGuire et al., 1986): 10 g peptona, 10 g KBr, 0,25 g  $\text{CaCl}_2$ , 15 g agara, 10 g rastvorljivog skroba od krompira i 1000 ml destilovane vode sterilisati u autoklavu 15 min na 121°C. Nakon hlađenja do 50°C dodati 0,15 ml kristal violeta (1% vodeni rastvor), 10 mg cefaleksina, 3 mg fluorouracila, 0,16 mg tobramicina, 40 mg nistatina i 10 ml Tweena 80 (odvojeno sterilisanog u autoklavu).

Zasejane petri-kutije stavljenе su na inkubaciju u termostatu na 28°C tokom 4-5 dana. Ogled je izvođen u dva ponavljanja.

Po završenoj inkubaciji upoređivan je izgled kolonija dobijenih iz ekstrakta sa kolonijama kontrolnih izolata *Xap* (iz razređenja gde se broj kolonija u petri-kutijama kretao 30-300).

Kolonije bakterija koje su nakon razvoja na podlogama MT i XCP1 ispoljavale sličnost sa kontrolnim izolatima *Xap* i *Xapf* presejane su na kosu YDC podlogu i posle 2-3 dana inkubacije izolati su ponovo upoređeni sa kontrolnim. Za dalja proučavanja je odabrano deset reprezentativnih izolata.

### Provera patogenosti

Seme osetljivog genotipa pasulja, sorte zlatko, zasejano je u saksije sa sterilnom zemljom i održavano pod povoljnim uslovima do pojave prvog vidljivog lista (10-ak dana posle setve semena). Inokulacija je vršena pomoću sterilne čačkalice, kojom je prethodno zahvaćena bakterijska kultura gajena 48 sati na kosoj YDC podlozi. Mlade biljčice su 1-3 sata pre inokulacije isprskane vodom, da bi se obezbedili bolji uslovi za infekciju. Inokulacija je izvođena ubodom u nodus biljčica čačkalicom (Slika 1) sve dok se vrh čačkalice ne pojavi sa druge strane nodusa, a pri izvlačenju čačkalica je nekoliko puta polako okretana, da bi se bakterijska kultura zadržala unutar nodusa. U ispitivanja su bili uključeni sledeći izolati: TX100, TX102, TX103, TX116, TX119,



Slika 1. Metod inokulacije  
Figure 1. Inoculation method

TX121, TX122, TX123, TX133 i TX135. Kao pozitivna kontrola korišćeni su kontrolni izolati *Xap* (X24, GSPB 1241 i CFBP 6165), a negativna kontrola je rađena ubodom bez nanošenja bakterijske kulture. Ogled je postavljen u četiri ponavljanja.

Inokulisane biljčice su održavane u klima-komori pri dnevnom režimu svetlosti, temperaturi od 25°C i relativnoj vlažnosti od 80%. Pojava simptoma na inokulisanim biljkama je praćena posle 4-5, 8-10 i 14 dana i upoređivana sa pozitivnom i negativnom kontrolom.

Patogenost je ocenjena na osnovu praćenja pojave i širenja nekroze (rak-rana), kao i pojave tipičnih simptoma na lišću.

### Reizolacija

Reizolacija je rađena prema uobičajenom laboratorijskom postupku na hranjive podloge NA (Nutrient agar) (Lelliott i Stead, 1987) i YDC. Za dalji rad je odabrano osam reizolata.

### Provera patogenosti reizolata

Provera patogenosti reizolata vršena je brzom metodom – infiltracijom bakterijske suspenzije (koncentracije  $10^6$ - $10^7$  ćel/ml) u mlade mahune boranije pomoću medicinske igle. Kao pozitivna kontrola korišćeni su kontrolni izolati *Xap* (X24, GSPB 1241 i CFBP 6165). Negativna kontrola je rađena infiltracijom mahuna destilovanom vodom. Inokulisane mahune su zatim postavljene na vlažan filter-papir u plastične kutije i održavane na sobnoj temperaturi (oko 25°C). Pojava simptoma praćena je tokom 3-7 dana. Ovu metodu inokulacije navode Balaž i sar. (1995).

### Serološke metode identifikacije (ELISA test)

Identifikacija izolata i reizolata dobijenih sa veštački inokulisanog semena pasulja izvršena 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 *Xap* (ADGEN Phytodiagnosics, Neogen Europe Ltd., Scotland, UK. za PTA ELISA test i LOEWE Biochemica GmbH, Germany za DAS ELISA test).

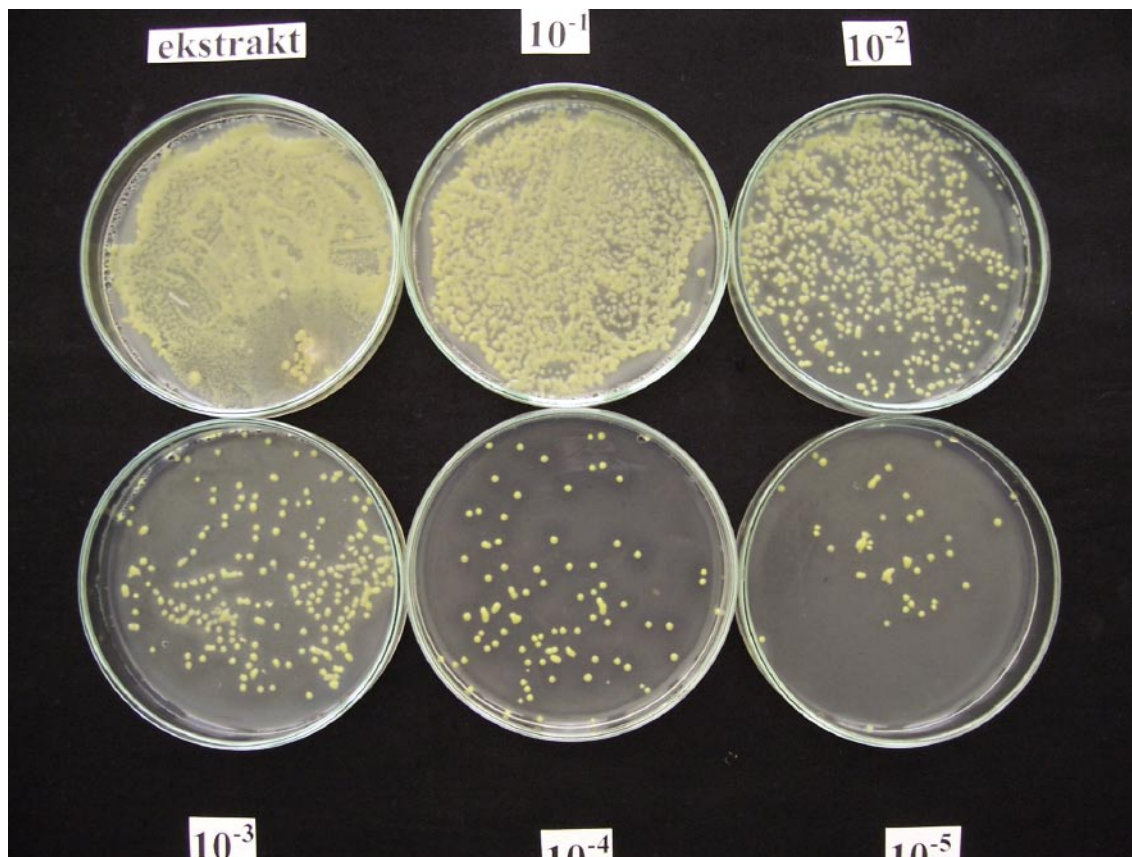
U ova ispitivanja su bili uključeni svi prikupljeni izolati i reizolati. Za pozitivnu kontrolu poslužili su kontrolni izolati *Xap* (X24, GSPB 1241 i CFBP 6165), a za negativnu izolat bakterije *Erwinia amylovora* (NCPPB 595). Za pripremu uzoraka (bakterijska suspenzija koncentracije  $3 \times 10^8$  ćel/ml podešena pomoću McFarlandove skale) izolati i reizolati su gajeni 48 časova na YDC podlozi.

ELISA testovi su izvođeni prema uputstvima proizvođača antiseruma. Očitavanje rezultata je vršeno po-

moću 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 negativne kontrole.

### Molekularne metode identifikacije (PCR)

U cilju identifikacije svih izolata i reizolata dobijenih iz veštački inokulisanog semena pasulja korišćena je i metoda lančane reakcije polimeraze (Polymerase Chain Reaction – PCR) (Audy i sar., 1994; Schaad i sar., 2001). Prajmeri za rad su sintetisani u 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 paro-



**Slika 2.** Izgled kolonija dobijenih iz veštački inokulisanog semena pasulja na hranljivoj podlozi XCP1 (različita razređenja)  
**Figure 2.** View of colonies from artificially inoculated bean seeds on XCP1 medium (different dilutions)

va /bp/) određena je približna molekulska masa PCR produkata.

Ispitivani izolati i reizolati su tokom 48 časova gajeni na YDC podlozi, a zatim je pravljena bakterijska suspenzija koncentracije  $3 \times 10^8$  ćel/ml (podešena pomoću McFarlandove skale) u sterilnoj destilovanoj vodi i ostavljena na  $-20^\circ\text{C}$ . Za rad je korišćeno po 0,4 ml suspenzije od svakog izolata i reizolata. Navedena količina je centrifugirana 1 minut na 11000 rpm, a za dalji rad je korišćen supernatant.

Za PCR su korišćeni prajmeri sledeće sekvence:

X4c: 5'-CGCCCGGAAGCACGATCCTCGAAG-3'

X4c: 5'-GGCAACACCCGATCCCTAAACA-GG-3', koji daju proizvod veličine 730 bp.

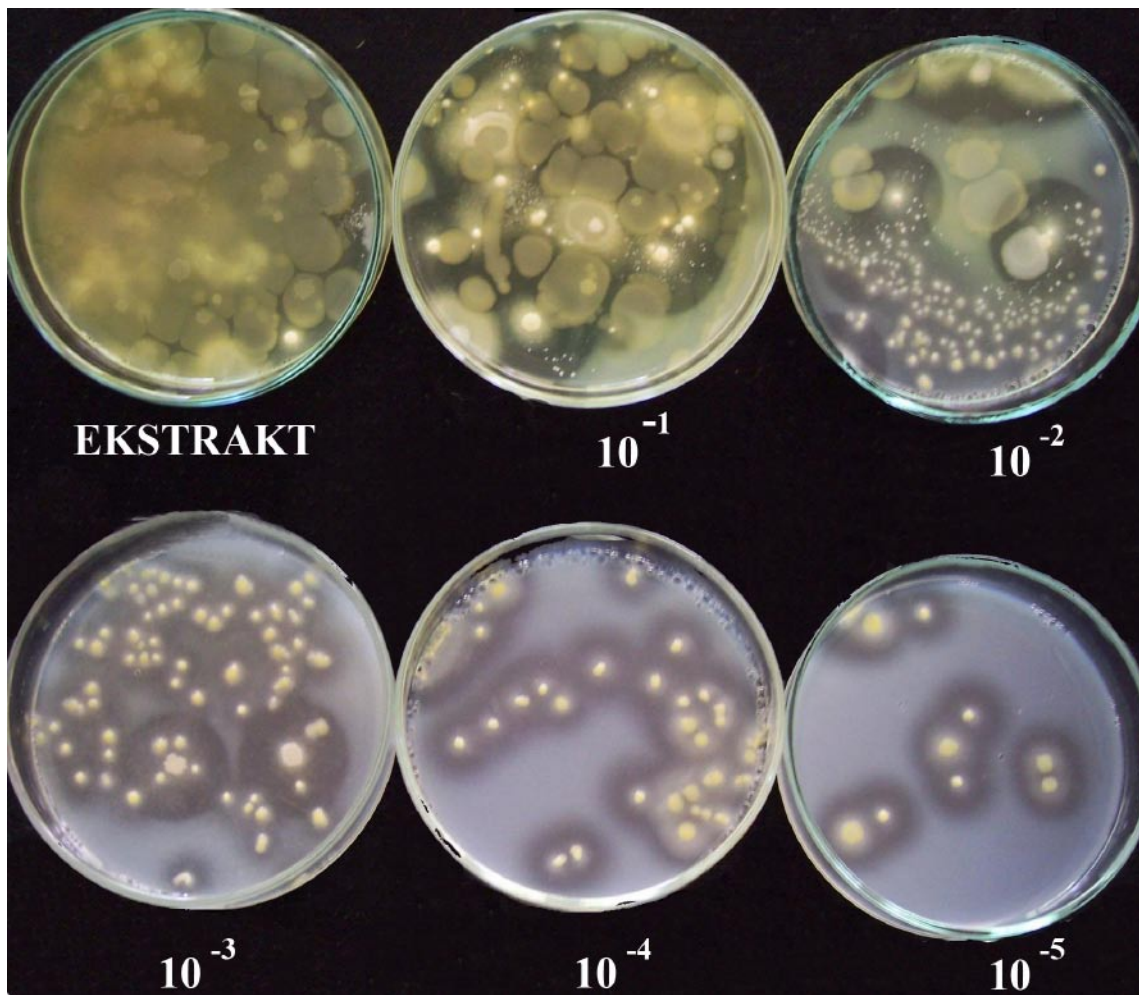
Za pozitivnu kontrolu poslužili su kontrolni izolati *Xap* (X24, GSPB 1241 i CFBP 6165), a za negativnu izolat bakterije *E. amylovora* (NCPBP 595).

Pozitivnim je ocenjen svaki uzorak u kome je amplifikovan fragment veličine 730 bp.

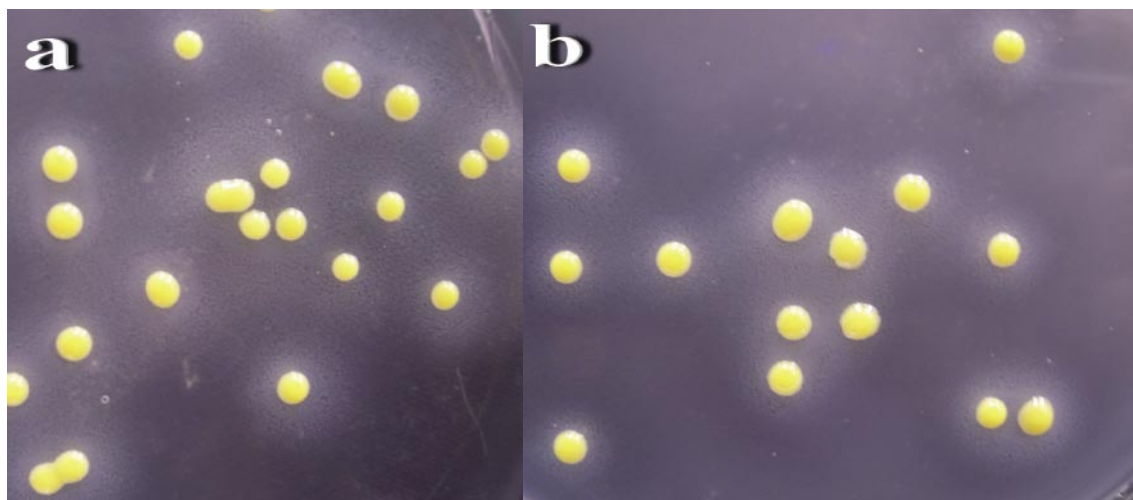
## REZULTATI I DISKUSIJA

### Izolacija na hranljive podloge

Nakon 4-5 dana, na poluselektivnim podlogama MT i XCP1 obrazovale su se brojne bakterijske kolonije, žute, ispučene i sluzaste, različite veličine (prečnika 1-3 mm). Pojedinačne kolonije su se jasno uočavale u razređenjima  $10^{-3}$ - $10^{-5}$  (Slike 2 i 3).



**Slika 3.** Izgled kolonija dobijenih iz veštački inokulisanog semena pasulja na hranljivoj podlozi MT (različita razređenja)  
**Figure 3.** View of colonies from artificially inoculated bean seeds on MT medium (different dilutions)



**Slika 4.** Izgled kolonija na XCP1 podlozi (detalj): a – izolacija sa veštački inokulisanog semena pasulja, b – kontrolni izolat X24  
**Figure 4.** View of colonies on XCP1 medium (detail): a – isolation from artificially inoculated bean seeds, b – control isolate X24

Na XCP1 podlozi kolonije su bile okružene većim prosvetljenim zonama usled hidrolize skroba (Slike 2 i 4), a kod podloge MT oko kolonija se se uočavale dve zone hidrolize i to veće prosvetljene zone usled hidrolize kazeina i manje mlečne zone usled hidrolize Tweena 80 (Slike 3 i 5).

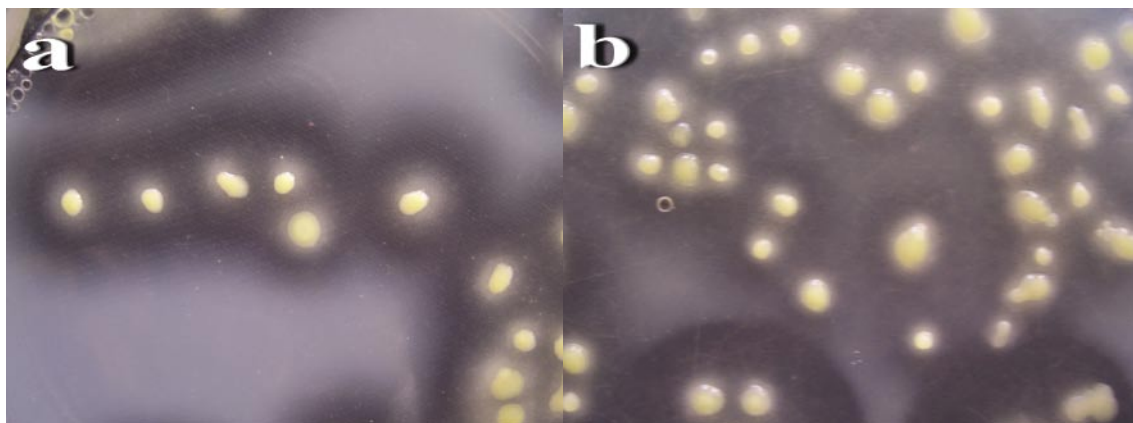
Posle više od 5 dana inkubacije kolonije bakterije *Xapf* (izolat CFBP 6165) stvarale su mrki pigment u navedenim podlogama.

Tebaldi i sar. (2007) navode slične rezultate dobijene prilikom izolacije *Xap* iz ekstrakta celog i mlevenog, prirodno inficiranog semena pasulja na poluselektivne podloge XCP1 i MT. Poluselektivne podloge MT i XCP1 za izolaciju *Xap* i *Xapf* iz semena pasulja ta-

kođe navode Kurowski (2002), National Seed Health System (2002), Remeus i Sheppard (2006) i Sheppard i sar. (2007).

Rezultati naših ispitivanja potvrđuju da su podloge XCP1 i MT zbog svoje selektivnosti i jednostavne pripreme pogodne za izolaciju *Xap* i *Xapf* iz semena pasulja. Prednost MT podloge je mogućnost izolacije i diferencijacije i drugih fitopatogenih bakterija sa pasulja (*Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* i *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*) (Goszczyńska i Serfontein, 1998).

Za dalja proučavanja je odabrano po dva izolata iz svakog poduzorka. Sa hranljive podloge MT dobijeni su izolati pod sledećim šiframa: TX100, TX102,



**Slika 5.** Izgled kolonija na MT podlozi (detalj): a – izolacija sa veštački inokulisanog semena pasulja, b – kontrolni izolat X24  
**Figure 5.** View of colonies on MT medium (detail): a – isolation from artificially inoculated bean seeds, b – control isolate X24

TX103, TX133 i TX135, a sa XCP1 izolati pod šiframa: TX116, TX119, TX121, TX122 i TX123.

Svi proučavani i kontrolni izolati *Xap* (X24, GSPB 1241 i CFBP 6165) na kosoj YDC podlozi obrazuju žute i sluzaste kolonije. Izolat *Xapf*(CFBP 6165) posle 5-6 dana u podlozi stvara mrki pigment.

### Provera patogenosti

Na inokulisanim biljčicama pasulja, kod svih ispitivanih izolata prvi simptomi su se uočavali već posle 4-5 dana od inokulacije u vidu tamnije zelenih izduženih pega oko mesta uboda. Pege su ubrzo postajale crvenkasto-mrke i izdužene. U okviru pega dolazilo je do pucaanja tkiva i obrazovanja sitnih rak-rana. Nekroza je postepeno zahvatala i celo stablo (Slika 6).

Početni simptomi hloroze i nekroze lišća javljali su se nakon osam dana od inokulacije, dok je potpuno sušenje i uvijanje vršnog lišća registrovano posle 14-18 dana. Nakon dvadesetak dana po inokulaciji većina biljčica je bila sasušena.

Kod negativne kontrole nikakve promene nisu konstatovane.

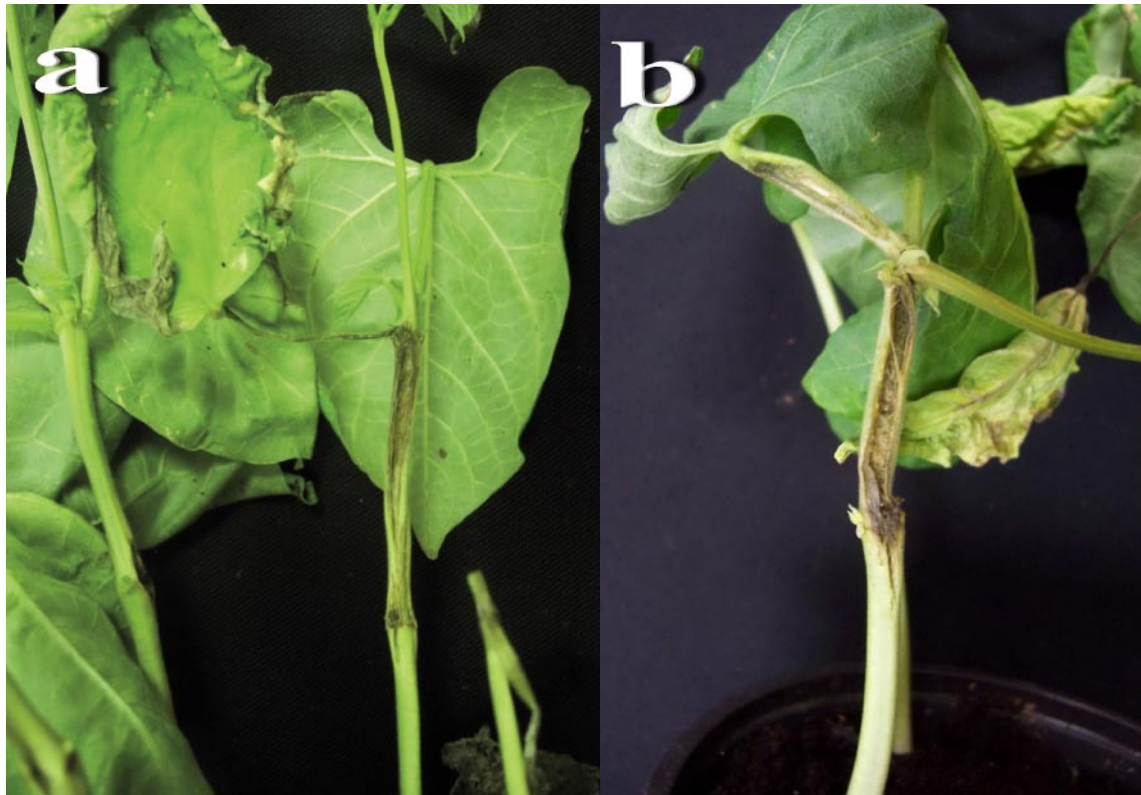
Metodu provere patogenosti izolata *Xap* i *Xapf*ubodom u nodus mladih biljčica pasulja preporučili su i Sheppard i sar. (1989), Kurowski (2002) i Sheppard i sar. (2007).

### Reizolacija

Nakon tri dana razvoja na hranljivim podlogama NA i YDC reizolovane su kolonije bakterija tipične za *Xap*. Odabrano je osam reizolata (RTX100/1, RTX100/2, RTX122/1, RTX122/2, RTX123/1, RTX123/2, RTX133/1 i RTX133/2).

### Provera patogenosti reizolata

Na mladim mahunama boranije su se u okviru tkiva infiltriranog suspenzijom bakterija javile vlažne pege nakon tri dana od inokulacije. U okviru vodenastih pega se obrazovao i žućkast bakterijski eksudat. Posle pet do šest dana od inokulacije pege su postajale mrke,



**Slika 6.** Simptom na inokulisanim biljčicama pasulja: a – izolati TX116, b – kontrolni izolati GSPB 1241, c – negativna kontrola

**Figure 6.** Symptom on inoculated plant of bean: a – isolate TX116, b – control isolate GSPB 1241, c – negative control

a tkivo u okviru njih se izdizalo u vidu „plika” i često pucalo, uz obrazovanje jasno izraženog prstena (oko pege) crvene boje. Slične rezultate na inokulisanim mahunama prilikom provere patogenosti izolata *Xap* takođe navode Balaž i sar. (1995).

### Serološke metode identifikacije (ELISA test)

Na osnovu rezultata ELISA testa potvrđeno je da svi proučavani izolati i reizolati pripadaju bakteriji *Xap* jer reaguju sa specifičnim antitelima. Pozitivna reakcija registrovana je merenjem promene boje pomoću ELISA čitača. Svi uzorci kao i pozitivna kontrola imali su nekoliko puta veću vrednost apsorbacije od vrednosti očitanane kod negativne kontrole (*E. amylovora*).

### Molekularne metode identifikacije (PCR)

Korišćenjem lančane reakcije polimeraze sa prajmerima koje su preporučili Audy i sar. (1994) i Schaad i sar. (2001), potvrđeno je da svi proučavani izolati i reizolati pripadaju bakteriji *Xap*, jer su kao i kod kontrolnih izolata amplifikovani fragmenti nukleinske kiseline veličine 730 bp (Slika 7). U slučaju bakterije *E. amylovora*, korišćene kao negativna kontrola, reakcija je u svim testovima bila negativna.

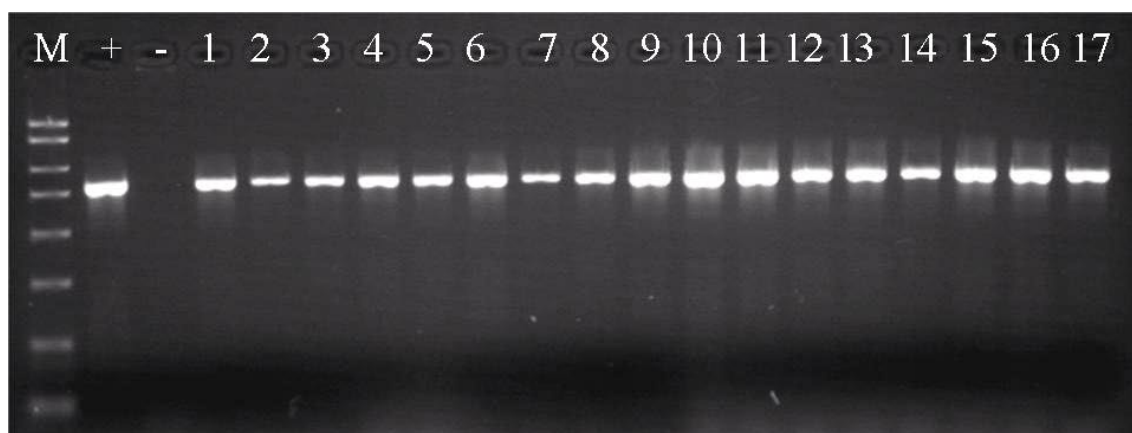
Dijagnoza obične plamenjače pasulja i detekcija njenog prouzrokovača *Xap* zasnovana na korišćenju standardnih fitobakterioloških metoda zahteva dosta vremena i materijala. Zato se u novije vreme ove meto-

de dopunjuju serološkim i molekularnim metodama (Audy i sar. 1994; Halfeld-Vieira i sar., 2001; Todorović i sar., 2006).

U našim istraživanjima primena savremenih metoda identifikacije (PCR i ELISA testovi) omogućila je brzu i pouzdanu identifikaciju dobijenih izolata i reizolata *Xap* iz semena pasulja.

### LITERATURA

- Aggour, A.R., Coyne, D.P., Vidaver, A.K. and Eskridge, K.M.*: Transmission of the Common Blight Pathogen in Bean Seed. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 114(6): 1002-1008, 1989.
- Audy, P., Laroche, A., Saindon, G., Huang, H.C. and Gilbertson, R.L.*: Detection of the bean common blight bacteria, *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and *X. c. phaseoli* var. *fuscans*, using the polymerase chain reaction. *Phytopathology*, 84(10):1185-1192, 1994.
- Balaž, J.*: Bakterioze na pasulju i boraniji. *Biljni lekar*, 4: 337-342, 1996.
- 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., Obradović, A. i Knežević, T.*: Bakterioze na semenu i sadnom materijalu povrtnarskih, ratarskih i ukrasnih biljaka. *Biljni lekar*, 6: 629-638, 2003.
- Balaž, J., Vasić, M., Pecić, J. and Doroški, H.*: Contribution to the Study of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* as Parasite of Bean in Yugoslavia. *Breeding and Cultivation of Wheat*,



**Slika 7.** Amplifikacija fragmenta DNA veličine 730 bp korišćenjem prajmera X4e/X4c. M: Marker DNA Ladder Sigma 50 bp, +: X24, -: NCPPB 595, 1: GSPB 1241, 2: TX100, 3: TX102, 4: TX103, 5: TX116, 6: TX119, 7: TX121, 8: TX122, 9: TX123, 10: TX133, 11: TX135, 12: RTX100/1, 13: RTX100/2, 14: RTX122/1, 15: RTX122/2, 16: RTX123/1, 17: RTX133/2 )  
**Figure 7.** Amplification of a 730 bp DNA fragment using X4e/X4c primers. M: Marker DNA Ladder Sigma 50 bp, +: X24, -: NCPPB 595, 1: GSPB 1241, 2: TX100, 3: TX102, 4: TX103, 5: TX116, 6: TX119, 7: TX121, 8: TX122, 9: TX123, 10: TX133, 11: TX135, 12: RTX100/1, 13: RTX100/2, 14: RTX122/1, 15: RTX122/2, 16: RTX123/1, 17: RTX133/2



- Sunflower and Legume Crops in the Balkan Countries. Albena, IWS, Bulgaria, 1995, pp. 356-359.
- Gilbertson, R.L. and Maxwell, D.P.:** Common Bacterial Blight of Bean. Plant diseases of international importance. Volume II. Diseases of vegetables and oil seed crops (H.S. Chaube, J. Kumar, A.N. Mukhopadhyay and U.S. Singh, eds.) Englewood Cliffs, New Jersey, USA, Prentice Hall, Inc., 1992, pp. 18-39.
- 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.
- Halfeld-Vieira, B.A., Souza, R.M., Figueira, A.R. and Boari, A.J.:** Identificação de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e *X. axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* através da técnica de PCR. Fitopatologia Brasileira, 26:737-740, 2001.
- ISF:** Method for the Detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* on Bean Seed. Nyon, Switzerland, 2006.
- Kirjakov, I.D.:** Проучвания върху бактериозите по фасула (*Phaseolus vulgaris* L.) в България и средствата за борба с тях. Автореферат на дисертация за присъждане на научна и образователна степен „Доктор”. Добрич, България, 1999.
- Kurowski, C.:** Detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* on Bean (*Phaseolus vulgaris*). International Seed Health Initiative – Vegetables, Switzerland, 2002.
- 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.
- McGuire, R.G., Jones, J.B. and Sasser, M.:** Tween media for semiselective isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* from soil and plant material. Plant Disease, 70: 887-891, 1986.
- 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.
- National Seed Health System:** Seed Health Testing and Phytosanitary Field Inspection Methods Manual. Reference Manual B (RM-B), Version dated 09/18/02, 2002.
- Németh, J.:** Babpatogén baktériumok hazai dominancia-vizonyainak vizsgálata a köztermesztésben jelentős fajták bevonásával a dominancia viszony-változások okainak elemzése. Növényvédelem, XXVI. Évfolyam, 8. szam, 1990.
- Remeus, P.M. and Sheppard, J.W.:** Proposal for a new method for detecting *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* on bean seeds. ISTA Method Validation reports 3, 2006, pp. 1-11.
- Schaad, N.W.:** Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. APS Press, The American Phytopathological Society, 1988.
- 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.
- Severin, V.:** Cercetari asupra prevenirii arsurii comune a faseolei [*Xanthomonas phaseoli* (E.F. Smith) Dowson]. Analele Institutului de Cercetari Pentru Protectia Plantelor, VII: 125-139, 1971.
- Sheppard, J.W., Kurowski, C. and Remeus, P.M.:** International Rules for Seed Testing, 7-021: Detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* on *Phaseolus vulgaris*. International Seed Testing Association (ISTA), Bassersdorf, Switzerland, 2007.
- Sheppard, J.W., Roth, D.A. and Saettler, A.W.:** Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* in Bean. In: Saettler AW, Schaad NW, Roth DA, eds. Detection of bacteria in seed and other planting material. St. Paul, USA: APS Press, 17-29, 1989.
- Tebaldi, N.D., Souza, R.M. and Machado, J.C.:** Detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes de feijão em meio de cultura semi seletivo. Fitopatologia Brasileira, 32: 056-058, 2007.
- Todorović, B., Balaž, J., Milijašević, S., Duduk, B. i Rekanović, E.:** Identifikacija *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (Smith 1897) Dye 1978 b, klasičnim bakteriološkim, serološkim i molekularnim metodama. Pesticidi i fitomedicina, 21(1): 55-62, 2006.
- Vasić, M.:** Dvadesetica, nova sorta pasulja belog zrna. Selekcija i semenarstvo, 4(3-4): 125-127, 1997.
- Wallen, V.R. and Jackson, H.R.:** Model for Yield Loss Determination of Bacterial Blight of Field Beans Utilizing Aerial Infrared Photography Combined with Field Plot Studies. Phytopathology, 65(9): 942-948, 1975.
- Wallen, V.R. and Sutton, M.D.:** *Xanthomonas phaseoli* var. *fuscans* (Burkh.) Starr et Burkh. on field bean in Ontario. Canad. J. Botany, 43: 437-446, 1965.
- Weller, D.M. and Saettler, A.W.:** Colonization and Distribution of *Xanthomonas phaseoli* and *Xanthomonas phaseoli* var. *fuscans* in Field-Grown Navy Beans. Phytopathology, 70(6): 500-506, 1980.

# Elaboration of Methods for Detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* on Bean Seeds

## SUMMARY

*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* detection on artificially inoculated bean seeds was investigated. The method of the International Seed Federation – ISF (2006) was used. It included bacteria extraction from seeds and isolation on semiselective media with pathogenicity test of the investigated isolates. ELISA and PCR were used for verification of results.

The results showed that the semiselective media MT (Milk Tween Agar) and XCP1 (*Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* Agar) were very suitable for isolation of *X. a.* pv. *phaseoli*. Pathogenicity was confirmed on young bean plants. ELISA test and PCR confirmed that all investigated isolates and reisolates belong to the bacterium *X. a.* pv. *phaseoli*.

**Keywords:** *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*; Bean; Seed; Artificial inoculation; ELISA; PCR